

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

**Bidirektionaler Zusammenhang der Calciumhomöostase und der
APP-Prozessierung bei der Alzheimerkrankheit**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2022**

vorgelegt von: Klara Luise Meyer
geb. am: 27.07.1994 in Baden-Baden

Erklärung gemäß §7 Absatz 1 Nr. 2 – Eidesstattliche Versicherung

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.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die im Kapitel Kooperationen aufgeführten Personen 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 (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater 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 in 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.

Leipzig, 6. März 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Kooperationen	7
3	Zusammenfassung	8
3.1	Bidirektionaler Zusammenhang der Calciumhomöostase und der APP-Prozessierung bei der Alzheimerkrankheit	8
3.2	Bidirectional relationship of calcium homeostasis and APP processing in Alzheimer's disease	9
4	Einleitung	11
4.1	Die Alzheimerkrankheit	11
4.1.1	Historisches	11
4.1.2	Epidemiologie und Gesundheitsökonomie	11
4.1.3	Krankheitsbild	12
4.1.4	Diagnose	13
4.1.5	Neuropathologie	14
4.2	Molekulare Mechanismen der Alzheimerkrankheit	15
4.2.1	APP-Prozessierung	16
4.3	Regulatorische Mechanismen vermittelt über die Calciumhomöostase . .	19
4.3.1	Speichergesteuerte Calciumkanäle	20
4.3.1.1	STIM	21
4.3.1.2	ORAI	22
4.3.1.3	Funktionsweise	23
4.3.1.4	Pathophysiologie	26
4.4	CRISPR/Cas	27
4.5	Das FMR-Protein	30
4.6	Zielsetzung der Arbeit	31
5	Material und Methoden	33
5.1	Material	33
5.1.1	Chemikalien	33
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	35
5.1.3	Geräte und Zubehör	36
5.1.4	Zelllinien	39

5.1.5	Kits	40
5.1.6	Plasmide	40
5.1.7	humane <i>post mortem</i> Hirnproben	41
5.2	Methoden	42
5.2.1	Zellbiologische Methoden	42
5.2.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	42
5.2.1.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	43
5.2.2	Molekularbiologische Methoden	44
5.2.2.1	Retransformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS	44
5.2.2.2	Isolation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien	45
5.2.2.3	Transfektion von Zellen	45
5.2.2.4	Generierung von stabil transfizierten STIM1- und STIM2-Knockout-Zellen	46
5.2.2.5	RNS-Isolation	47
5.2.2.6	Quantifizierung der RNS	47
5.2.2.7	rekombinante cDNS-Synthese	48
5.2.2.8	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	48
5.2.3	Proteinbiochemische Methoden	51
5.2.3.1	Verarbeitung von Zellen	51
5.2.3.2	Herstellung von Lysat	52
5.2.3.3	Herstellung von Homogenaten aus Zellen	52
5.2.3.4	Herstellung von PNFs	52
5.2.3.5	BCA-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration	53
5.2.3.6	Messung der Enzymaktivität	54
5.2.3.6.1	Messung der α -Sekretase-Aktivität	56
5.2.3.6.2	Messung der β -Sekretase-Aktivität	56
5.2.3.6.3	Messung der γ -Sekretase-Aktivität	56
5.3	Calcium-Imaging	57
5.4	Statistische Methoden	59
5.4.1	Umgang mit Extremwerten	59
6	Ergebnisse	60
6.1	funktionelle Überprüfung des STIM-Knockout mittels Calciumimaging	60
6.2	Einfluss von STIM auf α , β -, und γ -Sekretase	62
6.2.1	Einfluss von STIM auf die α -Sekretase	63

6.2.2	Einfluss von STIM auf die β -Sekretase	63
6.2.3	Einfluss von STIM auf die γ -Sekretase	63
6.3	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf α -, β -, und γ -Sekretase	65
6.3.1	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α -Sekretase	65
6.3.2	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β -Sekretase	66
6.3.3	Einfluss von STIM 1 und STIM 2 auf die γ -Sekretase	66
6.4	Einfluss von Calcium über SOCE auf die γ -Sekretase	68
6.5	STIM und Orai in <i>post mortem</i> Gehirnproben	70
6.5.1	MÜN-Hirnproben-qRT-PCR	70
6.5.2	Einfluss des Alters auf die Expression von Orai und STIM	71
6.5.3	Einfluss des Braak-Stadiums auf die Expression von Orai und STIM	72
6.5.4	Einfluss von A β auf die Expression von Orai und STIM	72
6.6	Expression von FMR1 und FMR2 in Alzheimer-Modellzelllinien	74
7	Diskussion	78
7.1	Einfluss der Calciumhomöostase auf die Alzheimerkrankheit	78
7.2	Unterschiede in der Funktion von STIM1 und STIM2	84
7.3	Einfluss der STIM-Proteine auf α -, β - und γ -Sekretasen	86
7.3.1	Einfluss von STIM-Proteinen auf die α -Sekretase	86
7.3.2	Einfluss von STIM-Proteinen auf die β -Sekretase	87
7.3.3	Einfluss von STIM-Proteinen auf die γ -Sekretase	87
7.4	Einfluss der STIM1 und STIM2 auf α -, β - und γ -Sekretasen	89
7.4.1	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α -Sekretase	89
7.4.2	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β -Sekretase	90
7.4.3	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ -Sekretase	90
7.5	Einfluss von Calcium über SOCE auf die γ -Sekretase	93
7.6	Genexpression von STIM- und Orai-Proteinen in <i>post mortem</i> Gehirnproben von Alzheimerpatienten	95
7.6.1	Einfluss von Alter und Braak-Status auf die Expression von STIM und Orai	95
7.6.2	Einfluss von A β auf die Expression von STIM und Orai	96
7.7	SOCE und Gedächtnisbildung	97
7.8	Die Expression von FMR1 und FMR2 in Alzheimer-Modellzelllinien	98
7.9	Ausblick	103
8	Anhang	105

1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
ACTB	Actin β
AD	engl. <i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimerkrankheit
ADAM	engl. <i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AICD	engl. <i>APP intracellular domain</i>
AL2ICD	engl. <i>ALP2- intracellular domain</i>
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APH	engl. <i>anterior pharynx defective</i>
APLP	engl. <i>amyloid precursor-like protein</i>
APP	engl. <i>amyloid precursor protein</i> , Amyloid Vorläuferprotein
APP ^{swe}	<i>APP swedish</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
A β	Amyloid- β
BACE	engl. <i>β-site APP-cleaving enzyme</i>
BCA	engl. <i>bicinchoninic acid</i>
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	engl. <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
Calpain	engl. <i>calcium dependent protease with papain-like activity</i>
cas	engl. <i>CRISPR-associated</i>
CC	engl. <i>coiled-coil</i>
CCE	engl. <i>capacitative Ca²⁺ entry</i> , kapazitativer Calcium-Einstrom
CDI	engl. <i>calcium-dependent inactivation</i>
cDNS	engl. <i>complementary DNS</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CMD	CRAC-modulierende Domäne
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

CPA	engl. <i>cyclopiazonic acid</i>
CRAC	engl. <i>calcium release-activated calcium channel</i>
CREB	engl. <i>cAMP response element binding protein</i>
CRISPR	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNP	CRISPR-Ribonukleoprotein
CTF	c-terminales Fragment
ctrl	Kontrolle
Cu ⁺	Kupfer
CuSO ₄	Kupfersulfat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dd	bidestilliert
DH5 α	Douglas Hanahan
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	engl. <i>dimethylsulfoxide</i>
DNS	Desoxyribunuklotidsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	engl. <i>ethylen glycol tetraacetic acid</i>
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl	englisch
EOAD	engl. <i>early onset Alzheimer's disease</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und weitere
ETON	engl. <i>extended transmembrane Orai n-terminal</i>
FAD	engl. <i>familial Alzheimer's disease</i> , familiäre Alzheimererkrankung
FCDI	engl. <i>fast calcium-dependent inactivation</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FDG-PET	Fluor-desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FMR	engl. <i>fragile X mental retardation</i>
FMRP	engl. <i>fragile X mental retardation protein</i>
FRAXE-Syndrom	fragiles XE-Syndrom
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FURA2-AM	Fura-2-Acetomethyl
g	Erdbeschleunigung

G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GSK	engl. <i>glycogen synthase kinase</i>
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HeLa	Henrietta Lachs
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
ICD	engl. <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IDE	engl. <i>insulin-degrading enzyme</i>
IHF	engl. <i>integration host factor</i>
IQ	Intelligenzquotient
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilo-Basenpaar
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LCIS	engl. <i>life cell imaging solution</i>
LTD	engl. <i>long-term depression</i>
LTP	engl. <i>long-term potentiation</i>
LOAD	engl. <i>late onset Alzheimer's disease</i>
MCI	engl. <i>mild cognitive impairment</i>
MCU	mitochondrialer Calciumuniporter
MEF	engl. <i>mouse embryo fibroblast</i>
Mio	Millionen
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
mg	Milligram
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MMS	engl. <i>mini mental status</i>

MPEP	2-Methyl-6-Phenylethynyl-Pyridin
mPTP	engl. <i>mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNS	engl. <i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MÜN	München
nAchR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NCSTN	Nicastrin
NICD	engl. <i>notch intracellular domain</i>
NFAT	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFT	neurofibrilläre Tangles
NF κ B	engl. <i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
nSoc	engl. <i>neuronal store-operated Ca²⁺-influx</i>
NTF	n-terminales Fragment
O ₂ ⁻	Hyperoxid-Anionen
OD	optische Dichte
PAM	engl. <i>protospacer-adjacent motif</i>
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PKC	Proteinkinase C
PM-ER-junction	<i>plasma membrane-endoplasmic reticulum junction</i>
PNF	Postnukleäre Fraktion
POLR2F	RNS-Polymerase Untereinheit 2
pre-crRNS	engl. <i>precursor-CRISPR-RNS</i>
PP	engl. <i>protein phosphatase</i>
PS	Presenilin
PSEN	engl. <i>presenilin enhacer</i>
qRT-PCR	engl. <i>real time quantitative</i> PCR, quantitative Echtzeit-PCR
RNS	Ribonukleinsäure
RNSi	Ribonukleinsäure Interferenz
ROC	engl. <i>receptor-operated channel</i>
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

RT	engl. <i>real time</i>
RyR	Ryanodin-Rezeptor
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SAM	engl. <i>sterile α motif</i>
SCDI	engl. <i>slow calcium-dependent inactivation</i>
sAPP α	engl. <i>soluble α-secreted APP</i>
SARAF	engl. <i>SOCE-associated regulatory factor</i>
SERCA	<i>sarco-endoplasmicreticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SOCE	engl. <i>store operated calcium entry</i>
STIM	engl. <i>stromal interaction molecul</i>
TBP	TATA-Bindeprotein
TG	Thapsigargin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
TRP	engl. <i>transient receptor protein</i>
U	Umdrehungen
UPR	engl. <i>unfolded protein reaction</i> , ungefaltete Proteinreaktion
VGCC	engl. <i>voltage-gated calcium channel</i> , spannungsabhängiger Calciumkanal
v-ATPase	engl. <i>vacuolar type-ATPase</i>
WT	Wildtyp
α -CTF	engl. <i>α-cleaved C-terminal fragment</i>
β -CTF	engl. <i>β-cleaved C-terminal fragment</i>
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

2 Kooperationen

In der vorliegenden Arbeit wurden manche Teile der dargestellten Ergebnisse im Rahmen von Kooperationen erarbeitet. In untenstehender Tabelle findet sich eine Übersicht aller beteiligten Personen mit ihrem Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit.

	Tätigkeit	ausführende Person
allgemein	Betreuung/ Projekt- und Versuchsplanung	PD Dr. Marcus Grimm
keine Abbildung	Beratung und Absprache zum geplanten Versuchsaufbau des STIM-Knockouts mittels CRISPR/cas9	Prof. Dr. Barbara Niemeyer, Dr. Dalia Alansary, Dr. Maik Konrad
Abbildung 5	Assistenz bei Messung, Unterstützung bei Auswertung	Dr. Maik Konrad
keine Abbildung	Aufbereitung, RNS-Isolation, cDNS-Synthese der Gehirnproben aus der Probandenbank in München	Dr. Sven Grösgen
Abbildung 14	Aufbereitung, RNS-Isolation, cDNS-Synthese der MEF-Zellen	Dr. Christoph Stahlmann
keine Abbildung	Aufbereitung, RNS-Isolation, cDNS-Synthese der mit AICD retransfizierten MEF APP/APLP2 -/- Zellen	Dr. Sven Grösgen
Abbildung 15	Aufbereitung, RNS-Isolation, cDNS-Synthese der MEF-Zellen	Olga Streidenberger
Abbildung 16	Aufbereitung, RNS-Isolation, cDNS-Synthese der SH-SY5Y-Zellen	Dr. Christoph Stahlmann

3 Zusammenfassung

3.1 Bidirektionaler Zusammenhang der Calciumhomöostase und der APP-Prozessierung bei der Alzheimerkrankheit

Die Alzheimerkrankheit ist weltweit die häufigste primäre Ursache für Demenz. Neuropathologisch ist die Erkrankung durch die Akkumulation von Amyloid- β ($A\beta$) in amyloiden Plaques sowie Neurofibrillenbündel gekennzeichnet. Neurofibrillenbündel entstehen bei der Hyperphosphorylierung von Tau. $A\beta$ entsteht bei der amyloidenen Prozessierung des Alzheimer-Vorläuferproteins APP, primär durch den Schnitt der β - und der γ -Sekretase. Im nicht-amyloidenen Prozessierungsweg wird durch den α -Sekretaseschnitt mit anschließendem Schnitt der γ -Sekretase hingegen kein $A\beta$, sondern das Peptid p3 gebildet. Die Alzheimererkrankung ist eine multifaktorielle Erkrankung, die mit einer gestörten Calciumhomöostase einhergehen könnte. Die Calciumdysregulation scheint ein sehr frühes Ereignis in der Alzheimerpathogenese zu sein. Mit einem verbesserten Verständnis der Regulationsprozesse könnte zur weiteren Erforschung der Krankheit beigetragen werden. Der basale Calciumstrom im größten Calciumspeicher der Zelle, dem ER, wird hauptsächlich über SOCE (engl. *store operated Ca²⁺-entry*) reguliert. Hierbei interagiert der Calciumsensor STIM (engl. *stromal interaction molecule*) mit Orai in der Plasmamembran und es bildet sich der Crac-Kanal (engl. *calcium release-activated channel*) aus.

Es wurden Zellmodelle mit einem Knockout von STIM1 und STIM2 generiert, um den Einfluss von STIM auf die α -, β - und γ -Sekretasen zu untersuchen. Zusätzlich erfolgte in *post mortem* Gehirnproben von Alzheimerpatienten eine Analyse der Genexpression von Orai und STIM in Abhängigkeit des Alters, des Braak-Status sowie des $A\beta$ -Gehalts. Ergänzend wurde die Auswirkung von APP und Prozessierungsprodukten auf die Genexpression von FMR1 und FMR2 untersucht. Beide Gene codieren für ein mRNS-bindendes Protein, welches an der synaptischen Plastizität beteiligt ist.

SOCE scheint einen regulierenden Einfluss über die γ -Sekretase auf die $A\beta$ -Produktion zu haben. Hierbei würden die STIM-Proteine, vermutlich indirekt über die Regulation des Calciumstroms, eine steigernde Wirkung auf die Genexpression von Bestandteilen der γ -Sekretase sowie von APP ausüben. Die Genexpression von IDE, ein $A\beta$ -degradierendes Protein, scheint erniedrigt. Kompensatorisch auf das vermehrt anfal-

lende A β kann eine verringerte Aktivität der γ -Sekretase festgestellt werden. Bei einer stärkeren Aktivierung von SOCE, durch die Inkubation mit Thapsigargin, kann eine Steigerung der γ -Sekretasenaktivität verzeichnet werden. Ein Effekt von STIM auf BACE scheint unter den Bedingungen der vorliegenden Arbeit nicht vorhanden. Die Wirkung von STIM auf die α -Sekretase lässt sich nicht eindeutig klären und ist möglicherweise auf einen gesteigerten Umsatz von α -CTF durch die γ -Sekretase zu erklären.

In *post mortem* Gehirnproben lässt sich eine Erhöhung der Genexpression von Orai1, Orai2, Orai3 sowie STIM1 und STIM2 nachweisen. Eine positive Korrelation mit dem Alter liegt für alle Gene bei gleichzeitigem Vorliegen eines erhöhten Braak-Status vor. Auch mit dem A β -Gehalt zeigt sich eine positive Korrelation für Orai1 und Orai3 sowie beide STIM-Proteine.

Das fragile-X-Mental-Retardation Protein FMRP ist ein RNS-bindendes Protein und wirkt an der neuronalen Plastizität mit, die sowohl bei der Alzheimererkrankung als auch beim fragilen X-Syndrom beeinträchtigt ist. FMRP interagiert mit APP und führt zu höheren A β -Spiegeln. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass FMRP von Prozessierungsprodukten von APP beeinflusst werden kann. Das genregulatorische AICD scheint einen hemmenden Einfluss auf FMR2 zu haben. Sowohl Calcium, als auch FMRP tragen durch Regulation der Proteinbiosynthesen von synaptischen Strukturen zur Gedächtnisbildung bei.

3.2 Bidirectional relationship of calcium homeostasis and APP processing in Alzheimer's disease

Alzheimer's disease is the most common primary cause of dementia worldwide. Neuro-pathologically, the disease is characterized by the deposition of amyloid- β (A β) in amyloid plaques as well as neurofibrillary tangles. Neurofibrillary tangles are formed during hyperphosphorylation of tau. A β is generated by amyloidogenic processing of the Alzheimer's precursor protein APP, primarily by the cleavages of β - and γ -secretase. In contrast, in the non-amyloidogenic processing pathway, no A β is formed by the α -secretase cleavage followed by the γ -secretase cleavage, but the peptide p3 is generated instead. Alzheimer's disease is a multifactorial disorder that may be associated with an impaired calcium homeostasis. Calcium dysregulation appears to be a very early event in AD pathogenesis. Improved understanding of the regulatory processes can contribute to further research into the disease. The basal calcium current in the largest calcium store

of the cell, the endoplasmic reticulum, is mainly regulated by SOCE (store operated Ca^{2+} -entry). The calcium sensor STIM (stromal interaction molecule) interacts with Orai in the plasma membrane and the Crac channel (calcium release-activated channel) is formed.

Cell models were generated with a knockout of STIM1 and STIM2 to study the influence of STIM on α -, β - and γ -secretases. In addition, analysis of gene expression of Orai and STIM in relation to age, Braak status, and $\text{A}\beta$ content was performed in post-mortem brain samples from Alzheimer's disease patients. Supplementary, the effect of APP and APP processing products on gene expression of FMR1 and FMR2 was investigated. Both genes encode an mRNA-binding protein involved in synaptic plasticity.

SOCE appears to have a regulatory effect on $\text{A}\beta$ production via γ -secretase. Here, STIM proteins would exert an enhancing effect on gene expression of components of γ -secretase as well as APP, presumably indirectly via regulation of the calcium current. Gene expression of IDE, an $\text{A}\beta$ -degrading protein, appears to be decreased. Compensatory to the increased $\text{A}\beta$, a decreased activity of γ -secretase can be observed. With a stronger activation of SOCE, by incubation with thapsigargin, an increase of γ -secretase activity can be recorded. An effect of STIM on BACE does not appear to be present under the conditions of the present work. The effect of STIM on α -secretase cannot be clearly elucidated and may be explained by an increased turnover of α -CTF by γ -secretase.

In post mortem brain samples, an increase in gene expression of Orai1, Orai2, Orai3, and STIM1 and STIM2 can be proven. A positive correlation with age is present for all genes in the simultaneous presence of an increased Braak status. There is also a positive correlation with $\text{A}\beta$ content for Orai1 and Orai3 as well as both STIM proteins.

Fragile X mental retardation protein FMRP is an RNA-binding protein and participates in neuronal plasticity, which is impaired in both Alzheimer's disease and fragile X syndrome. FMRP interacts with APP and leads to higher $\text{A}\beta$ levels. In the context of this work, it was demonstrated that FMRP can be affected by processing products of APP. The gene regulatory AICD appears to have an inhibitory effect on FMR2. Both calcium and FMRP contribute to memory formation by regulating protein biosyntheses of synaptic structures.

4 Einleitung

4.1 Die Alzheimerkrankheit

4.1.1 Historisches

„Mein IQ ist von 148 auf 114 gefallen. Meine Verarbeitungsgeschwindigkeit ist kaum schneller als die eines Backsteins, und das Bewusstsein meiner selbst ist nahe an dem einer Eidechse.“ (Richard Taylor). So äußert sich der ehemalige amerikanische Psychologe Richard Taylor in seinem Buch „Alzheimer und ich“ zu seiner Alzheimer-Erkrankung.

Die Alzheimer-Erkrankung (*engl. Alzheimer's disease, AD*) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die zum Verlust des Gedächtnis und anderen geistigen Fähigkeiten führt. Eine Krankheit bei der man sich selbst verliert, wird es auch häufig von Betroffenen und deren Angehörigen beschrieben. Auch Auguste Deter, die als erste Alzheimerpatientin bekannt wurde, konnte ihrem behandelnden Arzt Alois Alzheimer nicht mehr korrekt auf die Frage nach ihrem Namen antworten. Alois Alzheimer war Psychiater und Neuropathologe und behandelte seine Patientin im Krankenhaus in Frankfurt. Nach ihrem Tod 1906 untersuchte er das Gehirn im neuropathologischen Institut in München. Er erkannte als erster den Zusammenhang zwischen klinischer Symptomatik und neuropathologischem Bild und beschrieb dies als „Eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer 1907). Emil Kräplin prägte dann dafür den Begriff Alzheimerkrankheit in seinem 1910 erschienen Buch „Psychiatrie“ (Hippius und Müller 2008).

4.1.2 Epidemiologie und Gesundheitsökonomie

Es gibt verschiedene Ursachen für Demenz, wobei Alzheimer mit 70 % die meisten Fälle verursacht. Weltweit wurde die Zahl der Erkrankten im Jahr 2015 auf 46 Mio. geschätzt und es wird ein Anstieg bis 2050 auf 115 Mio. prognostiziert (*World Alzheimer Report 2020* 2020).

In Deutschland wird anhand von epidemiologischen Feldstudien errechnet, wie viele Personen an Demenz erkrankt sind. Damit soll die Prävalenzrate erstellt werden, die für zukünftige Schätzungen genutzt werden kann (*Estimating the prevalence of dementia in Europe* 2021). Die Prävalenzrate verdoppelt sich aktuell ungefähr alle fünf Altersjahre. So sind circa 1 % der 65-jährigen an Alzheimerdemenz erkrankt, aber mehr als 40 % der über 90-jährigen Personen. Die Inzidenz, also die Zahl der Neuerkrankungen, wird

mittels Längsschnittstudien erhoben und mit 1,7- 2,3 % angegeben. Es besteht hierbei eine hohe Kongruenz bei Studien aus Europa und weltweit. Im Mittel erkranken in Deutschland pro Jahr also mehr als 330.000 Personen an der Alzheimer-Erkrankung. Dies entspricht pro Tag über 900 Neuerkrankungen. Die Alzheimer-Erkrankung ist irreversibel und verkürzt die altersübliche zu erwartende Lebenszeit. Das Sterberisiko ist für Personen, die an Demenz erkrankt sind, 1,5- bis 3-mal so hoch, wie für eine gleichaltrige, nicht an Demenz erkrankte Person (Guehne u. a. 2005). Die Krankheitsdauer liegt im Mittel für Frauen bei 7,5 Jahren und für Männer bei 6,1 Jahren bei einer Diagnosestellung zwischen 65 und 75 Jahre (Haaksma u. a. 2020). Aufgrund der höheren Alterserwartung erkranken deutlich mehr Frauen als Männer an Alzheimerdemenz (K. Andersen u. a. 1999).

Für das Gesundheitssystem ist die Alzheimer-Erkrankung eine hohe Belastung. Die erkrankten Personen benötigen eine hohes Maß an personeller Zuwendung in der Pflege und Beaufsichtigung. Die Personalkosten stellen auch den größten Kostenfaktor. Eine deutlich geringe Rolle spielen die Kosten für Diagnostik und Behandlung (*World Alzheimer Report 2020* 2020).

4.1.3 Krankheitsbild

Die Alzheimer-Erkrankung ist durch das kontinuierliche Fortschreiten unterschiedlicher Symptome geprägt. Die Verlaufsgeschwindigkeit ist jedoch variabel. Bevor die Veränderungen der kognitiven Leistungsfähigkeiten auffallen, besteht schon ein jahrelanger Verlauf der Krankheit. Die Alzheimer-Erkrankung wird deshalb in drei Stadien, bestehend aus präklinischer Phase, milder kognitiver Beeinträchtigung (*engl. MCI, mild cognitive impairment*) und manifeste Demenz, eingeteilt.

Die präklinische Phase ist eine biologisch definierte Phase, wobei die Diagnosestellung nur apparativ erfolgt und noch keine oder kaum Symptome vorliegen. Im Stadium der milden kognitiven Beeinträchtigung klagen Betroffene über eher unspezifische Verhaltensänderungen wie Rückzug oder depressive Verstimmung. Die kognitive Beeinträchtigung ist zudem bereits messbar, beeinträchtigt den Alltag der Betroffenen aber noch nicht maßgeblich. Nur ein Drittel der Betroffenen mit MCI entwickelt dann aber auch eine manifeste Alzheimer-Erkrankung (Mitchell und Shiri-Feshki 2009).

Die manifeste Alzheimer-Erkrankung wird wiederum in drei Stadien eingeteilt. Es werden ein frühes, mittleres und spätes Stadium unterschieden, wobei sich entsprechend des MMS-Test (*engl. mini mental status*) von ≥ 20 , ≥ 10 und ≤ 10 Punkten orientiert wird. Ein wichtiges Kriterium ist auch die Fähigkeit der Betroffenen sich im Alltag

zu orientieren. Bei einer leichten Demenz sind die Betroffenen in ihrer Persönlichkeit noch nicht verändert, finden sich in vertrauter Umgebung im Alltag zurecht, aber haben Schwierigkeiten mit anspruchsvolleren Aufgaben. Im mittleren Stadium überwiegen die kognitiven Defizite. Neue Inhalte können nur noch schwer erfasst werden und auch bei einfachen Aktivitäten des Alltagslebens kommt es zu zunehmender Einschränkung. Im späten Stadium sind die Patienten komplett auf Hilfe angewiesen und desorientiert. Zusätzlich kommt es häufig zu Persönlichkeitsveränderungen. Die Betroffenen werden aggressiv, Gereiztheit, Angst und Unruhe nehmen zu. Auf der körperlichen Ebene treten Urininkontinenz, motorische Unruhe, Gang- und Schluckstörungen auf. Die Patienten versterben häufig infolge Kachexie, Lungenentzündung oder anderer interkurrenter Krankheiten.

Es werden zwei Formen der Alzheimerdemenz unterschieden. Die präsenile, familiäre Alzheimer-Erkrankung und die senile, sporadisch auftretende Form. Die senile Form, auch als LOAD (*engl. late onset Alzheimer's disease*) bezeichnet, ist die deutlich häufiger auftretende Alzheimer-Erkrankung und betrifft Patienten die älter als 65 Jahre sind. Die familiäre Form betrifft jüngere Patienten zwischen 30 und 60 Jahren. In den meisten Fällen ist die Entstehung auf die vererbte Form der Alzheimer-Erkrankung (*engl. familial Alzheimer's disease, FAD*) zurückzuführen. Hierbei können autosomal dominant vererbte Punktmutationen in den Genen für APP (Haass u. a. 1993), Presenilin 1 (PS1) (R. F. Clark u. a. 1995) oder Presilinin 2 (PS2) (Renbaum und Levy-Lahad 1998) nachgewiesen werden.

4.1.4 Diagnose

Die Diagnosestellung erfolgt einerseits durch die Eigen- und Fremdanamnese, die genaue klinisch-diagnostische Beobachtung mit Erstellen des psychopathologischen Befundes sowie kognitive Tests und andererseits zunehmend mit Hilfe von Biomarkern und Bildgebung. Für die 11. Neuauflage des ICD-Katalogs (*engl. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) werden neue Diagnosekriterien für die Alzheimer-Erkrankung diskutiert. Zum einen soll auf den Terminus „Demenz“ verzichtet werden und stattdessen für alle Stadien der Begriff Alzheimer-Erkrankung eingeführt werden. Zusätzlich soll bei der diagnostischen Herangehensweise vermehrt auf neurobiologische Veränderungen eingegangen werden (Dubois u. a. 2007). Durch die Frühdiagnostik wäre es möglich, im Stadium der MCI von einer Alzheimer-Erkrankung zu sprechen, noch bevor eine manifeste Demenz vorliegt. Eingesetzt wird die MRT-Untersuchung (Magnetresonanztomografie). Hierbei können Atrophiezeichen untersucht

werden. Diese können, wenn sie in bestimmten Arealen vorliegen, als Prädiktor für die Entwicklung einer Alzheimer-Erkrankung angesehen werden (Visser u. a. 2002). Durch die molekulare Bildgebung ist die Erfassung von Amyloid-Ablagerungen im Gehirn *in vivo* möglich. Hierzu werden vornehmlich die drei Tracer F¹⁸-Florbetaben („neuraCeq“, Piramal Healthcare), F¹⁸-Florbetapir („AMYVID“, Lilly Pharma AG/Avid Radiopharmaceuticals) sowie F¹⁸-Flutemetamol („Viazym“, GE Healthcare) eingesetzt (Barthel u. a. 2011, Vandenberghe u. a. 2010, C. M. Clark u. a. 2011). Außerdem können mit dem Tracer F¹⁸-THK5351 Tau-Ablagerungen erkannt werden (Harada u. a. 2016). Gut etabliert zur frühen Prädiktion ist auch die FDG-PET-Bildgebung (Fluor¹⁸desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie), womit der Glukosestoffwechsel im Gehirn dargestellt werden kann. Ebenso werden vermehrt neurochemische Verfahren eingesetzt, dafür wird im Liquor die Menge an A β 42 gemessen. Ein erniedrigter Wert im Liquor kann routinemäßig mittels ELISA (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay*, antikörperbasiertes Nachweisverfahren) gemessen werden und entspricht einer vermehrten Amyloidablagerung im Gehirn (Santos u. a. 2012). Eine blutbasierte Frühdiagnostik steht klinisch noch nicht zur Verfügung. Lösungsansätze sind multiparametrische Verfahren, bei denen ein Biomarkerpanel statt einzelner Biomarker eine genauere Vorhersage erlauben könnten.

Gemeinsamkeit der Verfahren ist, dass die Biomarker lediglich Ausschluss über das Vorliegen bestimmter Proteinablagerungen geben, erlauben aber für sich alleine keine Diagnose einer Alzheimer-Erkrankung.

4.1.5 Neuropathologie

Die diagnostisch genutzten Veränderungen im Gehirn basieren auf makroskopisch und mikroskopisch neuropathologischen Ursachen. Der große Verlust von Synapsen und Neuronen zeigt sich in einer makroskopischen Atrophie vor allem im Bereich der frontotemporalen und parieto-okzipitalen Hirnrinde.

Spezifische mikroskopische Merkmale der Alzheimerkrankheit sind Ablagerungen des Amyloid- β -Peptids in Form von extrazellulären Plaques, sowie intrazellulären Neurofibrillenbündeln („Tangles“). Die Tangles bestehen aus modifizierten Tau-Proteinen (Goedert 1996). Tau trägt als mikrotubuliassoziertes Protein zur Stabilität der Mikrotubuli bei und ist ein wichtiger Bestandteil des Cytoskeletts. In der abnorm phosphorylierten Form wird es bei Alzheimerkrankheit nachgewiesen. Die modifizierte Form entsteht hauptsächlich durch Phosphorylierung der Aminosäure Serin oberhalb der Mikrotubuli bindenden Region (F. Liu, Zaidi u. a. 2002). In Folge dissoziiert das hyperphosphorylier-

te Tau von den Mikrotubuli und aggregiert zu unlöslichen filamentösen Strukturen. Es kommt zur Destabilisierung der Mikrotubulinetze mit Veränderungen im Hirnstoffwechsel und Zelltod (Iqbal u. a. 2005).

Die charakteristische Verteilung der Neurofibrillenbündel je nach Schweregrad der Alzheimerkrankheit wurde genutzt um eine *post mortem* Klassifikation zu erstellen. Nach Braak und Braak werden sechs Stadien unterschieden. Die Ausbreitung reicht von Ablagerungen nur im entorhinalen–perirhinalen Kortex (Stadium I und II) über Stadium III und IV mit Ablagerungen im limbischen System und Hippokampus zu Ablagerungen im gesamten Neokortex (Stadium V und VI) (H. Braak und E. Braak 1995).

Ein großer Schritt gelang 1984 Glenner und Wong, die das 4 kDa große Amyloidprotein aus menschlichem Gehirn isolierten und damit den Grundstein für die Hypothese der Amyloid-Kaskade legten (Glenner und Wong 1984). Die Ursache der Demenz wird hier in Ablagerungen des Amyloidpeptid β -A4 gesehen, welches die Hauptkomponente der senilen Plaques bildet. Inzwischen werden unterschiedlich lange Peptide unterschieden. Die meisten Peptide sind n-terminal verkürzt oder modifiziert und bestehen aus Aminosäureketten zwischen 1-34 und 1-43 Aminosäuren.

Die beiden wichtigsten Peptide sind die Peptide Amyloid- β 40 ($A\beta$ 40), sowie Amyloid- β 42 ($A\beta$ 42). Letzteres ist durch zwei weitere Aminosäuren an Position 41 (Isoleucin) und 42 (Alanin) hydrophob und aggregiert dadurch vermehrt (Jarrett und Lansbury Jr 1993). Beide $A\beta$ -Formen entstehen auch im normalen Stoffwechsel. Bei der Alzheimerkrankheit ist jedoch das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau gestört. (J. A. Hardy und Higgins 1992) Es fällt mehr $A\beta$ an, welches akkumuliert und sich in $A\beta$ -Oligomeren zusammenlagert. Hieraus entstehen zunächst Fibrillen und dann die unlöslichen senilen Plaques. Die Plaques leiten als neurotoxische Komponenten zelluläre Kaskaden ein, die zu Hyperphosphorylierung von Tau, sowie zum Zelltod von Neuronen und der Reduzierung von Synapsen führen, was letztendlich in Demenz mündet (J. Hardy und Selkoe 2002).

4.2 Molekulare Mechanismen der Alzheimerkrankheit

$A\beta$ entsteht durch Spaltung des Alzheimer-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP). APP ist ein Transmembranprotein Typ 1 und liegt auf dem langen Arm von Chromosom 21 (Kang, Lemaire u. a. 1987). Durch alternatives Splicing entstehen mehrere

Isoformen. Es überwiegen die drei Isoformen APP₆₉₅, APP₇₅₁ und APP₇₇₀. Erstere Isoform kommt vor allem im neuronalen Gewebe vor (Kang und Müller-Hill 1990). Neben APP gehören auch APLP1 (*engl. amyloid precursor-like protein*) und APLP2 zur gleichen konservierten Proteinfamilie (Wasco, Bupp u. a. 1992; Wasco, Gurubhagavatula u. a. 1993). Die A β Domäne ist allerdings nur in APP konserviert (Bayer u. a. 1999). Seit der Entdeckung des APPs wird an seiner physiologischen Funktion geforscht. Da es im Zellstoffwechsel auf vielfältige Weise prozessiert wird, haben auch die Metabolite unterschiedliche Funktionen in der Zelle, die auch noch nicht komplett bekannt sind. Dies ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Vermutlich vermittelt es unter anderem bei Zellwanderung und Synapsenumbau (Sabo u. a. 2001; Sabo u. a. 2003) und spielt eine Rolle beim Wachstum und Differenzierung der Neuronen (Hung u. a. 1992).

4.2.1 APP-Prozessierung

APP entsteht im endoplasmatischen Retikulum (ER) und gelangt dann, vermittelt über ein n-terminales Signalpeptid erst in den Golgi-Apparat und dann weiter in das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). In sekretorischen Vesikeln gelangt APP anschließend an die Zelloberfläche, wo durch den Schnitt der α -Sekretase lösliches sAPP α (*engl. soluble α APP*) entsteht (Nicht-amyloidogene Prozessierung). A β entgegen entsteht durch die amyloidogenen APP-Prozessierung entlang des kompletten Syntheseprozesses (Greenfield u. a. 1999). Nach der Internalisierung wird das APP endosomal recycelt oder in Lysosomen degradiert (Haass u. a. 1993).

sAPP α ist im Gegensatz zu A β neuroprotektiv, indem es die Nervenzelle vor Exzitotoxizität schützt. (Mattson 1997). Ring *et al.* wiesen nach, dass sAPP α ausreicht um die Effekte von APP Mangel bei Mäusen auszugleichen (Ring u. a. 2007).

sAPP α entsteht im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg von APP. Hierbei wird APP an der Zelloberfläche durch die α -Sekretase geschnitten (Parvathy u. a. 1999). Der Schnitt erfolgt zwischen der Aminosäureposition 16 (Lysin) und 17 (Leucin) in der Domäne der A β -Sequenz. Die α -Sekretase ist eine Typ 1 transmembranäre Metalloprotease (Roberts u. a. 1994) und gehört zu der ADAM-Familie (*engl. a disintegrin and metalloproteinase*). Bekannt sind ADAM9, ADAM10 und ADAM17 (Lammich u. a. 1999). Regulatorisch greift vor allem ADAM17 in die Aktivität der α -Sekretase ein (Buxbaum u. a. 1998). Durch den Schnitt der α -Sekretase entsteht neben dem wasserlöslichen sAPP α auch das membrangebundene α -CTF (C83) (*engl. α -cleaved C-terminal fragment*).

Durch den Schnitt der β -Sekretase entsteht das β -CTF (C99) (*engl. β -cleaved C-terminal fragment*) sowie das $A\beta$ -Peptid. Dieser Weg wird daher auch als amyloidogene Prozessierung bezeichnet. Die β -Sekretase ist eine membrangebundene Aspartylprotease mit einer Typ 1 transmembranären Domäne (Vassar u. a. 1999). Bislang konnten zwei β -Sekretasen identifiziert werden, wovon vor allem BACE1 (*engl. β -site APP cleaving enzyme*) in Neuronen aktiver ist und als relevant für die Alzheimerkrankheit gehalten wird (Bennett u. a. 2000). BACE1 ist im Trans-Golgi-Netzwerk, dem Golgi-Apparat und den Endosomen lokalisiert, da hier mit einem sauren pH-Wert das Optimum für das Enzym vorliegt (Vassar u. a. 1999). Außerdem findet die amyloidogene Prozessierung eher in Cholesterol- und Glycosylphosphatidylinositolreichen Kompartimenten sogenannten *lipid-rafts* statt, im Gegensatz zum nicht-amyloidogenen Prozess an den phospholipidreichen *non-Rafts* (Marlow u. a. 2003; R. Williamson und Sutherland 2011).

Sowohl α -CTF, als auch β -CTF sind, neben vielen anderen Peptiden, ein Substrat für die γ -Sekretase (Parks und Curtis 2007). Die γ -Sekretase ist ein komplexes Protein mit mehreren Untereinheiten und wird ebenfalls zur Familie der Aspartylproteasen gezählt. Im Zentrum der Protease befindet sich entweder PS1 (auch PSEN1, Presenilin 1) oder PS2 (auch PSEN2, Presenilin 2) (Vetrivel u. a. 2006). Es bildet mit seinen neun Transmembrandomänen das katalytische Zentrum (Laudon u. a. 2005). Weitere essenzielle Untereinheiten sind APH1 (*engl. anterior pharynx defective 1*) mit APH1A und APH1B, (Francis u. a. 2002) PSEN (*engl. Presenilin enhancer*) (Kimberly u. a. 2003) sowie Nicastrin (Yu u. a. 2000). Die γ -Sekretase arbeitet innerhalb des hydrophoben Milieus in der Membran, vor allem von Vesikeln, Endosomen und synaptischen Membranen. Durch den Schnitt der γ -Sekretase entsteht aus α -CTF das Peptid p3 im nicht-amyloidogenen Weg, sowie die intrazelluläre Domäne von APP, AICD (*engl. APP intracellular domain*) (Lammich u. a. 1999). AICD wird auch im amyloidogenen Weg durch den Schnitt von β -CTF freigesetzt, wobei hier auch das für die Alzheimerkrankheit relevante $A\beta$ entsteht (Vassar u. a. 1999).

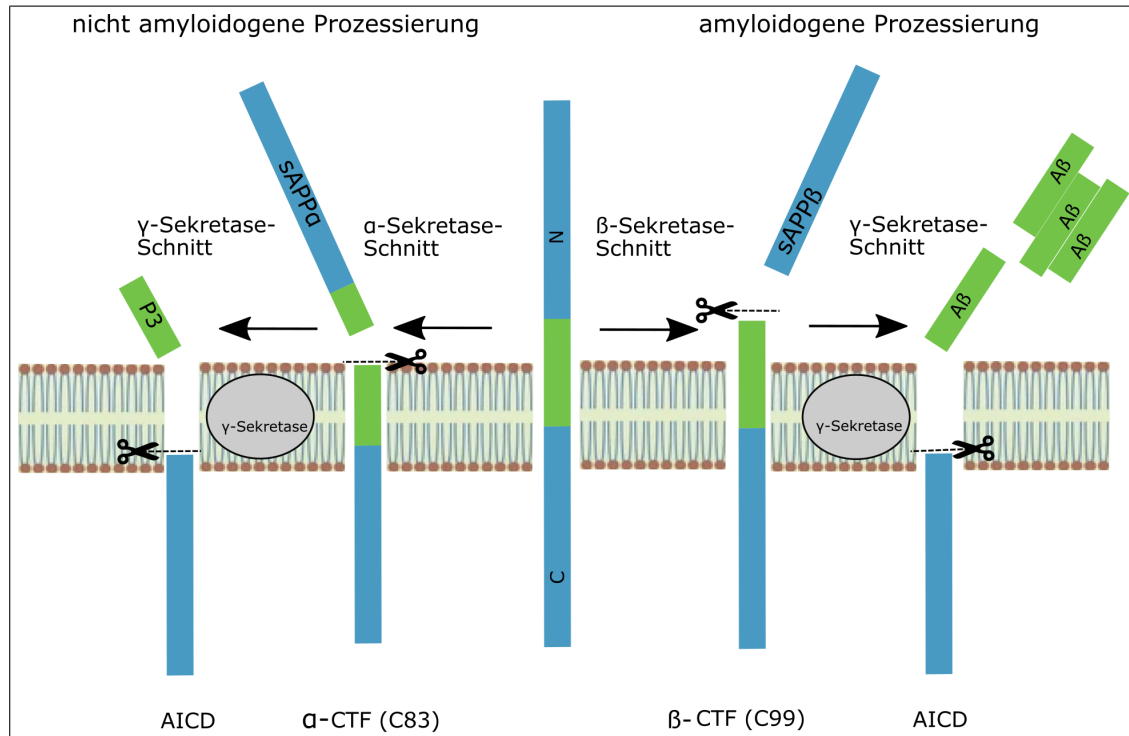


Abbildung 1: Schema der APP-Prozessierung

Vereinfachte schematische Darstellung der APP-Prozessierung. Links ist der nicht amyloidogene Weg dargestellt. Durch den initialen Schnitt der α -Sekretase entsteht sAPP α und α -CTF. Dieses wird durch den Schnitt der γ -Sekretase weiter zu p3 und AICD prozessiert. Rechts ist der amyloidogene Weg dargestellt. Hier entsteht durch den Schnitt der β -Sekretase sAPP β und β -CTF. Durch den Schnitt der γ -Sekretase wird A β freigesetzt. Dieses lagert sich zu Oligomeren zusammen. (Abbildung abgeändert nach G.-f. Chen u. a. 2017)

Die Prozessierung durch die γ -Sekretase erfolgt in mehreren Schritten, wobei die verschieden langen A β -Peptide entstehen. Es erfolgen neben dem Schnitt der γ -Sekretase noch weitere Prozessierungen in Richtung des c-Terminus des β -CTF. Zunächst erfolgt ein Schnitt nach Aminosäure 48 oder 49 der A β Domäne (ϵ -Schnitt), womit A $\beta_{48/49}$ entsteht (Sastre u. a. 2001; Weidemann u. a. 2002). Danach wird meist ein Tripeptid entfernt (ζ -Schnitt) bevor die γ -Sekretase schneidet (Zhao u. a. 2004). Hierbei wird am häufigsten A β_{40} freigesetzt, aber es entstehen auch die Spezies A β_{42} , sowie A $\beta_{37,38,39}$ und $_{-42}$. Neben APP sind auch weitere Typ-1-Transmembranproteine Substrate der γ -Sekretase. Ein wichtiges ist der Notch-Rezeptor. Durch den Schnitt an der S3-Stelle entsteht ebenfalls eine genregulatorische intrazelluläre Domäne, NICD (*engl. notch intracellular domain*) (De Strooper, Annaert u. a. 1999).

4.3 Regulatorische Mechanismen vermittelt über die Calciumhomöostase

Unter physiologischen Bedingungen liegt Calcium als zweifach positiv geladenes Ion vor, welches eine wichtige Rolle in den Signalwegen des Körpers spielt. Für die Calciumionen besteht ein großes Konzentrationsgefälle über die Zellmembran hinweg. Die Konzentration ist innerhalb der Zellen mit nur 0,001 mmol/l sehr niedrig. Im Extrazellulärraum liegt die Calciumkonzentration bei 2,5 mmol/l. Damit reichen schon kleine Veränderungen in der Durchlässigkeit der Zellmembran für die Calciumionen aus, um einen starken Einstrom zu erzielen. Die Calciumkonzentration muss in allen Organismen genau reguliert werden, was über viele fein ausbalancierte Mechanismen gelingt.

Im intrazellulären Raum wird Calcium durch Pufferproteine wie Calbindin oder Parvalbumin gebunden, um die niedrige Konzentration konstant zu halten (Chard u. a. 1993). Außerdem wird Calcium auch aus dem Lumen in intrazelluläre Kompartimente wie das ER befördert (Mattson, LaFerla u. a. 2000). Dies geschieht über die SERCA-Pumpe (engl. *Sarco-endoplasmicreticulum Ca²⁺-ATPase*). Zusätzlich sorgt die *plasma membrane Ca²⁺-ATPase* für die Beförderung von Calcium aus dem Lumen zurück in den Extrazellulärraum. Dies geschieht auch durch den Austausch mit Natrium über den Natrium-Calcium-Austauscher.

Soll im Signalweg nun der Calciumeinstrom vermittelt werden, gibt es verschiedene Ca²⁺-Kanäle, die Calcium vom Extrazellulärraum oder aus dem ER ins Lumen strömen lassen. Die Kanäle werden anhand ihres Aktivierungsmechanismus verschiedenen Gruppen zugeteilt. Rezeptorgesteuerte Kanäle werden durch ihre Liganden aktiviert und werden als ROCs (engl. *receptor-operated channel*) bezeichnet. Die spannungsgesteuerten Kanäle (engl. *voltage gated Ca²⁺ channels*, VGCC) reagieren auf die Depolarisation der Membran. Die TRP-Kanäle (engl. *transient receptor protein channels*) können durch verschiedene intra- und extrazelluläre Mechanismen aktiviert werden, wie oxidativer Stress, Wachstumsfaktoren oder Temperatur und werden daher auch nochmal in sieben Unterfamilien unterteilt (Majewski und Kuznicki 2015; Nilius und Owsianik 2011). Das ER ist auch an der Erzeugung von Calciumsignalen beteiligt. Über IP₃-Rezeptoren (*Inositol-1,4,5-triphosphat*) (Bezprozvanny 2005) und Ryanodin-Rezeptoren (RyRs) (Amador u. a. 2013) wird Calcium aus dem ER freigesetzt. Beide Kanäle scheinen in neuronalen Zellen mit RACCs und VOCCs gekoppelt zu sein (Baro u. a. 2006).

Das Wiederauffüllen der ER-Speicher wurde zunächst als kapazitiver Einstrom (*engl. capacitative Ca^{2+} entry, CCE*) bezeichnet. Mit dem genaueren Verständnis für die Vorgänge wird der Calciumeinstrom heute als speicherabhängiger Calciumeinstrom beschrieben (*engl. store-operated Ca^{2+} entry, SOCE*). Der Zusammenhang von Calciumeinstrom, Öffnung der Kanäle und Füllungskapazität wurde mit der Beschreibung von Orai- und STIM-Proteinen geklärt.

4.3.1 Speichergesteuerte Calciumkanäle

SOCE ist sowohl in erregbaren, wie nicht erregbaren Zellen ein wichtiger Mechanismus zum Wiederauffüllen der Calciumspeicher im ER (A. Baba u. a. 2003; Hogan u. a. 2009). In den ersten Publikationen von 1986 und 1989 nahm Putney an, dass der Calciumeinstrom alleinig durch den Botenstoff IP_3 reguliert wird (Putney Jr 1986; Takemura und Putney Jr 1989). Noch im selben Jahr widerlegte er zusammen mit Takemura seine Annahme. In ihren Versuchen mit Thapsigargin, heute als ein irreversibler Hemmstoff der SERCA Pumpe bekannt, war ein vermehrter Calciumeinstrom zu beobachten, ohne dass es zu Inositolphosphatbildung gekommen war (Takemura, Hughes u. a. 1989). 1992 beschrieben Hoth *et al.* dann erstmals die Abhängigkeit von ER-Speicherentleerung und SOCE in Mastzellen (Hoth und Penner 1992). Die Autoren prägten auch den Begriff I_{crac} als Bezeichnung für den Einstrom von Calcium durch den aktivierten Kanal (*engl. Ca^{2+} release-activated channels*).

Durch die zunehmende Möglichkeit der RNSi –Screens konnten zwei wichtige Komponenten des SOCEs entdeckt werden. Zum einen STIM1, ein Protein welches bisher als Vermittler zwischen stromalen und hämatopoetischen Zellen bekannt war. Daher auch die Bezeichnung als *stromal interacting molecule* (deutsch stromales Interaktionsmolekül, STIM). Es wurde fast zeitgleich in der S2-Zelllinie aus *D. melanogaster* (Roos u. a. 2005) und HeLa-Zellen entdeckt (Liou, M. L. Kim u. a. 2005). Das andere Molekül ist Orai, beschrieben erstmals 2006 von zwei Laboren in Boston (Vig u. a. 2006, Feske u. a. 2006) und einem Labor in Irvine (S. L. Zhang u. a. 2006). Orai ist eine Untereinheit des Kanals selbst und an der Porenbildung beteiligt. Daher wurde es nach Orai, Wächtern der Himmelstür in der griechischen Mythologie, benannt.

4.3.1.1 STIM

STIM besteht aus 685 Aminosäuren und ist ein Typ-1-Transmembran-Protein. Es kommt vor allem in der Membran des ER vor (Roos u. a. 2005). Der n-Terminus ragt ins ER, der c-Terminus ins Cytosol (Williams u. a. 2001). STIM1 ist am n-Terminus mit einer kanonischen EF-Hand ausgestattet. Als EF-Hand wird ein Strukturmotiv in Proteinen bezeichnet. Zwei α -Helices sind dabei wie Daumen und Zeigefinger der rechten Hand angeordnet. Die EF-Hand ist der Calciumsensor des STIM-Proteins. Zwischen den beiden Helices befindet sich eine Schleife, die Bindungsstelle für die Calciumionen. Der n-Terminus enthält auch die SAM-Domäne (*engl. sterile α motif*), ein Protein-Protein-Interaktionsmolekül (Roos u. a. 2005; Williams u. a. 2001). Dann folgt die Transmembrandomäne, die STIM im ER verankert. Am c-Terminus befindet sich die Region zur Kopplung von STIM und Orai1. Sie ist aus drei Doppelwendel-Domänen (*coiled-coil, CC*) zusammengesetzt (CC1 AS 233–343, CC2 AS 353–388, CC3 AS 400 – 450). Die SOAR-Domäne (*engl. STIM-Orai activating region*) erstreckt sich über die zweite und dritte CC-Domäne. SOAR vermittelt die Bindung von STIM an Orai. Die polybasische Region, AS 382–387, bindet an die α -helikale Region des c-Terminus von Orai (Liou, Fivaz u. a. 2007). An Position 475–483 folgt die CMD/CDI Domäne (*CRAC-modulierende Domäne (AS 475–483), engl. Ca^{2+} -dependent inactivation (AS 447–530)*), eine Region, die für die schnelle Calcium-abhängige Inaktivierung zuständig ist (Liou, Fivaz u. a. 2007). Am Ende des c-Terminus folgt eine Serin-Prolin-reiche und abschließend eine polybasische Lysin-reiche Domäne (Moccia u. a. 2015). Diese verankert STIM in der Plasmamembran (Liou, Fivaz u. a. 2007). Außerdem unterstützt es die Interaktion von STIM und Orai (Yuan u. a. 2009).

STIM2 ist ein weiteres Mitglied der STIM-Familie. Es besteht aus 833 Aminosäuren und besitzt den gleichen transmembranären Aufbau wie STIM1. STIM1 und STIM2 sind homolog in Bezug auf n-terminale EF-Hand und die SAM-Domäne. Unterschiede bestehen in der zweiten CC-Region (Hoth und Niemeyer 2013). Es liegt auch eine stabilere Bindung zwischen der EF-Hand und der SAM-Domäne vor. Bei einer ausreichenden Calciumkonzentration im ER ist die Bindung strukturstabiler und STIM2 resistenter gegen Oligomerisierung (Zheng u. a. 2008).

STIM1 und STIM2 haben ähnliche Bindungsaffinitäten zu Calcium. Für STIM1 liegt die Dissoziationskonstante K_d zwischen 0,2–0,6 mM und für STIM2 bei 0,5 mM (Zheng u. a. 2008). Allerdings reagiert STIM2 viel sensibler auf Veränderungen der Calciumkonzentration. STIM2 wird daher eher als Regulator der basalen Calciumkonzentration angesehen (Brandman u. a. 2007). STIM1 und STIM2 werden von allen Zelltypen

exprimiert. STIM1 überwiegt dabei in den meisten Geweben, wobei im Gehirn eine vermehrte Expression von STIM2 gegenüber STIM1 beschrieben wird. Hierbei findet sich STIM2 vor allem im Hippocampus und Kortex (Berna-Erro u. a. 2009; Steinbeck u. a. 2011). STIM1 und STIM2 sind primär im ER zu finden, STIM1 wurde auch in der Plasmamembran beschrieben (Spasova u. a. 2006).

4.3.1.2 ORAI

Orai ist die in der Plasmamembran lokalisierte porenformende Einheit des CRAC-Kanals. Es gibt die drei Homologe Orai 1-3. Alle drei Isoformen kommen in Gehirn vor, wobei Orai3 überwiegt (R. Kraft 2015). Jedes Protein besteht aus vier transmembranären Untereinheiten. Die Transmembranstrukturen beginnen und enden mit ihrem n- und c-Terminus im Plasma. Sie werden dabei von einer intrazellulären und zwei extrazellulären Schleifen gekoppelt. Beide intrazellulären Stränge werden für die Kopplung mit STIM benötigt.

Im Jahr 2012 wurde die genaue Kristallstruktur des Kanals beschrieben (Hou u. a. 2012). Um die Mittelachse sind sechs Orai-Proteine angeordnet, sodass ein Hexamer entsteht. Hierbei bildet die Transmembrandomäne 1 (TM1) einen inneren Ring und kleidet die Pore aus. Die Helices TM2 und TM3 bilden den mittleren Ring. Die TM4 sind in der Peripherie um den Kanal angeordnet. Das n-terminalen Ende von TM1 liegt in α -Helix-Struktur vor und wird als ETON (*engl. extended transmembrane Orai n-terminal*) bezeichnet. Es ist für die Bindung von STIM wichtig (Derler u. a. 2013). Neben TM1 sind auch verschiedene umliegende Regionen der anderen Transmembranproteine beteiligt (Palty, Stanley u. a. 2015).

Orai ist hochselektiv für Calcium. Im Bereich vor der Pore wird Calcium durch die negativ geladenen Aminosäuren D110, 112 und 114 in den Schleifen von TM1 und TM2 angezogen (Frischauf u. a. 2015). Der Selektivitätsfilter wird von der Aminosäure E106 der TM1 gebildet. Durch die hexametrische Struktur lagern sich so sechs Glutamatreste zusammen (Vig u. a. 2006). Auf den Selektivitätsfilter folgt in der Pore ein hydrophober Bereich mit stark ausgeprägten van-der-Waals-Kräften (Zhou u. a. 2010) und im Cytoplasma dann die ETON Region. In der Interaktion mit STIM verhindert ETON durch seine positive Ladung, dass im geschlossenen Zustand Calciumionen durch den Kanal diffundieren (Hou u. a. 2012).

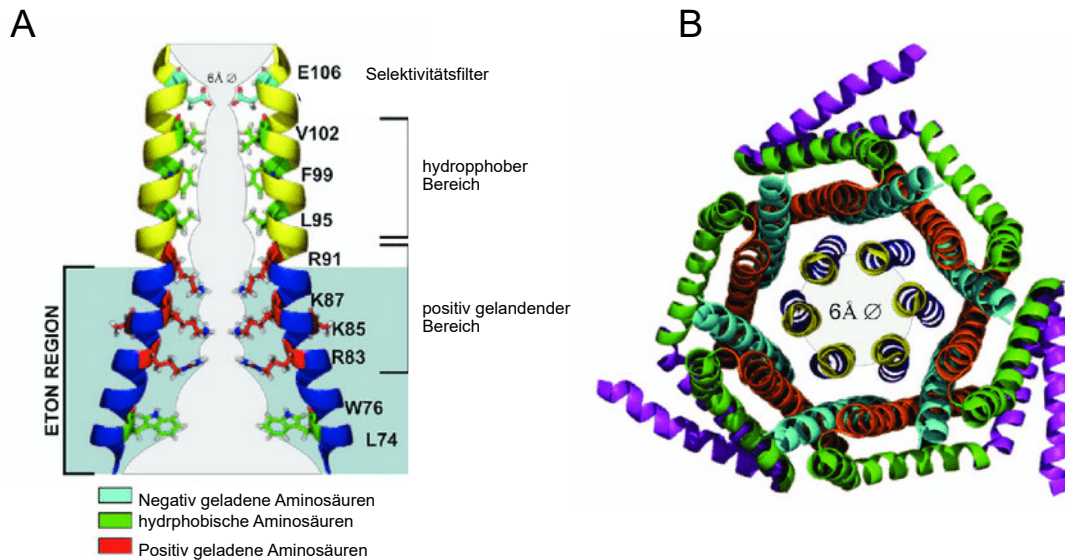


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Orai

(A) Schema von humanem Orai1. Dargestellt sind zwei zusammen gelagerte TM1-Stränge. In der Abbildung erkennbar sind die ETON-Region und relevante Aminosäuren, welche den positiv geladenen, hydrophoben und negativ geladenen Bereich der Pore bilden. (B) Schema der Orai Untereinheiten. Die Darstellung basiert auf der Kristallstrukturanalyse von Orai in *D. melanogaster*. (Abbildung abgeändert nach Fahrner u. a. 2013)

4.3.1.3 Funktionsweise

Viele Signalwege erfolgen über den *2nd Messenger* (sekundärer Botenstoff) Calcium (Clapham 2007). Auch in den Neuronen spielt die Calciumkonzentration im ER eine sehr wichtige Rolle. Über Calcium wird beispielsweise die Gentranskription (Mellström und Naranjo 2001), die Plastizität von Neuronen (A. Baba u. a. 2003) oder die Modulation von Synapsen geregelt (Berridge 1998; Nishiyama u. a. 2000). Die Calciumkonzentration hängt von Calciumein- oder ausstrom aus intrazellulären Calciumspeichern ab. Ist Calcium an der EF-Hand gebunden, besteht eine hydrophobe Bindung mit der SAM-Domäne. Außerdem wird die SOAR-Region von der ersten *coiled-coil*-Region blockiert. Sinkt nun die Calciumkonzentration, löst sich Calcium von der Bindungsstelle der EF-Hand ab. Es kommt zur Schwächung der EF-Hand-SAM-Bindung mit Konformationsänderung und Oligomerisierung von STIM. Die Konformationsänderung bewirkt, dass die polybasische Domäne der SOAR-Region freigelegt wird und mit Orai interagieren kann. Der ganze Vorgang erfolgt an PM-ER-junctions (*engl. plasmamembran-ER-junction*). Dies sind Bereiche in der Zelle, wo zwischen Plasmamembran und dem

ER nur noch 10-25 nm Platz sind. Das ist nah genug für die direkte physische Interaktion von STIM und Orai (Luik u. a. 2006). Nur durch diese Annäherung kann STIM mit Orai, welches auf der Plasmamembran lokalisiert ist, interagieren. Es kommt zur synchronen Umlagerungen der TM-Helices von Orai. Der Kanal ist offen und Calcium strömt ein.

Erreicht die Calciumkonzentration ihren Ausgangswert von 250-600 μM , wird der Prozess beendet und der STIM-Orai-Komplex zerfällt (Stathopoulos u. a. 2008). Dies geschieht über calcium-abhängige Inaktivierung (CDI). Hierbei wird nochmal zwischen schneller (*fast CDI, FCDI*) (Palty, Raveh u. a. 2012) und langsamer (*slow CDI, SC-DI*) Inaktivierung unterschieden (Zweifach und Lewis 1995). Die schnelle Inaktivierung erfolgt über einen Feedback Mechanismus woran STIM und Orai, aber auch zusätzliche calciumregulierende Proteine wie Calmodulin beteiligt sind (Litjens u. a. 2004). Die langsame Regulierung ist über STIM1 und SARAF (*engl. SOCE-associated regulatory factor, SOCE regulierender Faktor*) reguliert (Palty, Raveh u. a. 2012). SARAF ist ein zusätzliches im ER lokalisiertes Protein. Es interagiert über einen komplexen Mechanismus mit verschiedenen Teilen der c-terminalen Hemmungsdomäne von STIM und schützt die Zelle so vor einer Überladung mit Calcium.

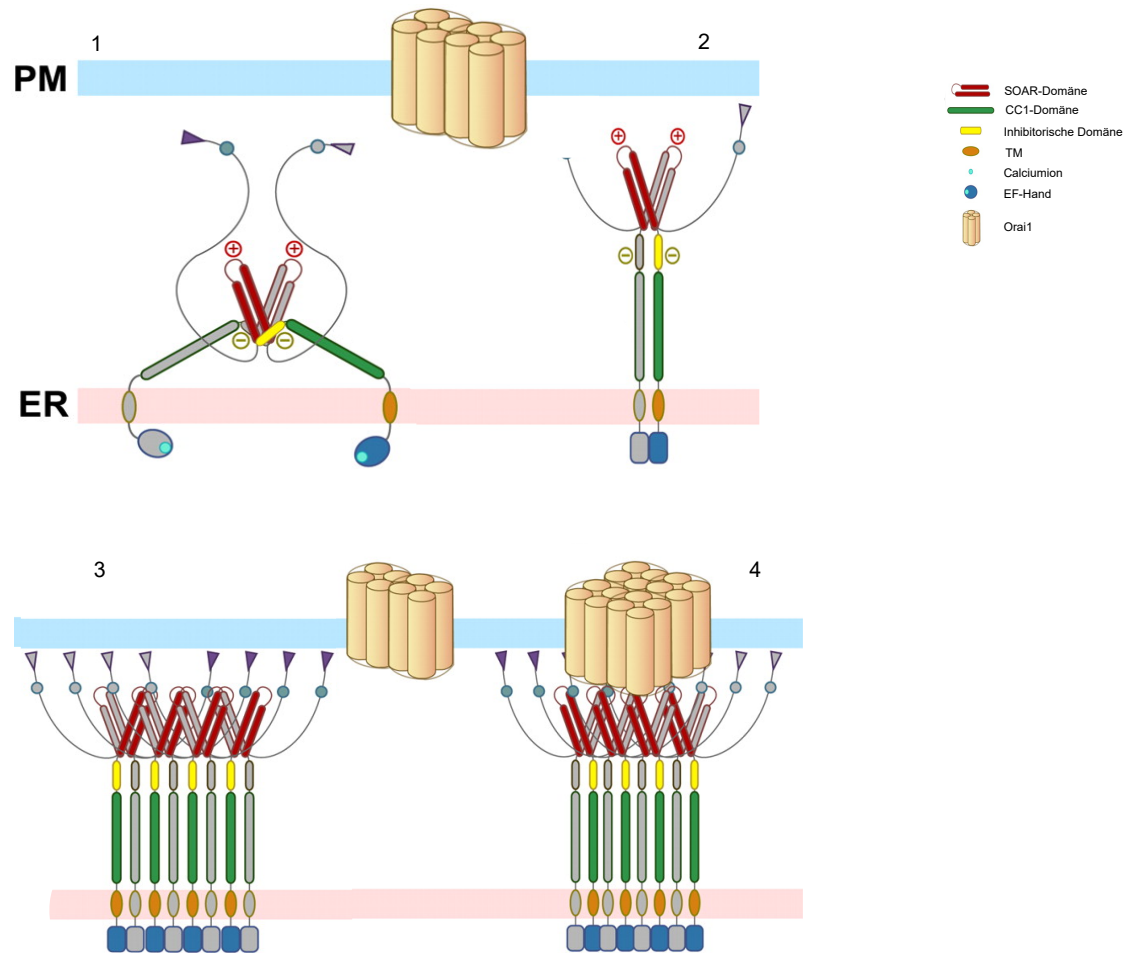


Abbildung 3: Schematische Darstellung von SOCE

(1) Inaktives STIM1 liegt als Dimer vor. Die SOAR-Region wird von den inhibitorischen Domänen verdeckt. Eine Verminderung der Calciumkonzentration führt zur Aktivierung von STIM. (2) Es kommt zur Konformitätsänderung und die SOAR-Region wird freigelegt. (3) STIM lagert sich zu Oligomeren zusammen. (4) An den PM-ER-junctions lagert sich STIM an den aktivierten Orai-Kanal.

(Abbildung nach X. Yang u. a. 2012)

4.3.1.4 Pathophysiologie

Bei Dysregulation der Calciumkonzentration kann es zu verschiedenen Schäden in der Zelle kommen. 1994 postulierte Khachaturian als erster einen Zusammenhang zwischen der Alzheimererkrankung und der Calciumhomöostase. Die ersten Studien mit Fibroblasten von Alzheimerpatienten zeigten einen unregulierten Calciumausstrom bei Stimulation des IP_3 -Agonisten (Ito u. a. 1994). Mit einem fehlerhaften SOCE sind neurodegenerative Erkrankungen wie Huntington (J. Wu u. a. 2011), eine bestimmte Form der Enzephalitis (Lazzari u. a. 2011) aber auch die Alzheimerkrankheit (Leissring u. a. 2000; Yoo u. a. 2000) assoziiert.

Im Gehirn scheint hier vor allem STIM2 die wichtigere Rolle einzunehmen. Sowohl die Gruppe um Berna-Erro, als auch um Sun zeigten, dass STIM2 den speicherabhängigen Calciumeinstrom (SOCE) in Neuronen des Hippocampus von Mäusen induziert. (Berna-Erro u. a. 2009; Sun u. a. 2014). SOCE könnte an der Ausbildung und Morphogenese der Dornfortsätze an der Oberfläche der Neuronen beteiligt sein. Die dendritischen Dornfortsätze nehmen exzitatorische Signale auf und verändern je nach Signal ihre Morphologie in pilzförmig (*engl. mushroom spines*), dünn (*engl. thin spines*) oder stoppelig (*engl. stubby spines*) (Sala und Segal 2014). So führen *long-term potentiation (LTP)* zur Ausbildung von eher pilzförmigen Dornfortsätzen, während *long-term depression (LTD)* Schrumpfung verursacht (Bourne und K. M. Harris 2007). Die pilzförmigen Fortsätze werden als Speicher früherer synaptischer Vorgänge angesehen und damit auch als Gedächtnisspeicher der Neuronen (Bourne und K. M. Harris 2007; Matsuzaki 2007). Ein Verlust dieser Fortsätze und vor allem der Synapsen können die Gedächtnisveränderungen bei der Alzheimerkrankheit erklären (Bezprozvanny und Hiesinger 2013; DeKosky und Scheff 1990). STIM und Orai-Proteine wurden wiederum vor allem in den pilzförmigen Dornfortsätzen in Neuronen des Hippocampus und Kortex gefunden (Korkotian, Frotscher u. a. 2014; Segal und Korkotian 2014).

Sun *et al.* beschreiben einen deutlichen Rückgang von pilzförmigen Dornfortsätzen in einem Alzheimer-Mausmodell in Abhängigkeit von SOCE. Hierbei kam es bei Presenilin-1 M146V KI Mäusen, einem Mausmodell für FAD, zu massiven Dysregulationen im Calciumhaushalt und Destabilisierung der Dornfortsätze. STIM2 war herunterreguliert und SOCE somit gestört, was zu verminderten Calciumeinstrom führte. Hierdurch war auch die Aktivität der Calmodulinkinase II reduziert, was sich im Verlust der pilzförmigen Fortsätze zeigte. Sie konnten auch zeigen, dass die herunterregulierte STIM2 Aktivität in Proben von älteren Mäusen, sowie in Hirnproben von Alzheimerpatienten vorhanden ist. Im Umkehrschluss führte eine Überexpression von STIM2 im Tiermodell und damit

ein ausgeglichener Calciumeinstrom wieder zur Stabilisierung der Fortsätze (Sun u. a. 2014).

Aber auch STIM1 ist nicht zu vernachlässigen. In Neuronen ist die Gentranskription über SP4 kontrolliert, welches wiederum in Abhängigkeit von STIM1 und SOCE steht (Lalonde u. a. 2014). Ebenso ist die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren, wie CREB, (engl. *cAMP response element binding protein*), NFAT (engl. *nuclear factor of activated T-cells*) oder NF κ B (engl. *nuclear factor- κ -light-chain-enhancer of activated B-cells*) von Calcium abhängig (Hagenston und Bading 2011).

4.4 CRISPR/Cas

2020 wurde der Nobelpreis für Chemie an Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna für die „Entwicklung einer Methode zur Genombearbeitung“ verliehen (*The Nobel Prize in Chemistry 2020 2021*). Gemeint ist damit ihr Beitrag zur Entwicklung der Genschere CRISPR/cas9. Mehr als 30 Jahre zuvor wurden von Ishino *et al.* in *Escherichia coli* eine Sequenz in der DNS beschrieben, die nicht zum restlichen genetischen Code zu passen schien. Es handelte sich um fünf homologe Sequenzen mit palindromen Abschnitten, die von Abschnitten mit 32 variablen Nukleotiden unterbrochen wurden (Ishino u. a. 1987). Ähnliche Sequenzen wurden dann auch in *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen u. a. 1993) und *Haloferax mediterranei* (Mojica, Ferrer u. a. 1995) beschrieben. 2002 wurde diese Gruppe von Genen mit Wiederholungen und Unterbrechungen von ähnlich langen Sequenzen von Jansen *et al.* zu einer Genfamilie zusammengefasst (Jansen u. a. 2002). Der gefundene Aufbau spiegelt sich in der Namensgebung als *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), was etwa mit gebündelte, regelmäßig unterbrochene, kurze, palindrome Sequenzwiederholungen übersetzt werden kann, wider. Gleichzeitig wurden vier CRISPR-assoziierte Gene (*cas*, engl. *CRISPR-associated*) beschrieben (Jansen u. a. 2002). Es werden dementsprechend zwei Hauptkomponenten unterschieden, die *Repeat-Spacer-Sequenz* und das vorangehende *cas-Operon*, die gemeinsam das CRISPR/cas-System bilden. Die sich wiederholenden Einheiten (engl. *repeats*) sind identisch in ihrer Sequenz und ihrer Länge. Häufig beinhalten sie palindromische Abschnitte. Die Spacer liegen dazwischen und enthalten hochvariable Fremd-DNS. Direkt davor liegt eine Adenin- und Thymin-reiche Sequenz, die sogenannte *leader-Region*. Hier binden Regulatorproteine und initiieren die CRISPR-Transkription. Die *cas-Region* codiert für eine Vielzahl von funktionalen Proteinen wie Nukleasen, Polymerasen oder Helikasen. 2005 wurde die Hypothese

erstellt, dass es sich bei dem CRISPR/cas-System um ein adaptives Immunsystem von Bakterien handeln könnte. Es wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben, dass die Basenabfolge der Spacer mit Phagen und Viren-DNS übereinstimmt (Bolotin u. a. 2005; Mojica, García-Martínez u. a. 2005; Pourcel u. a. 2005). 2007 wurde gezeigt, dass Individuen von *Streptococcus thermophilus*, die mit Phagen infiziert sind, Teile der Fremd-DNS in die Spacer-Region einbauen können und infolgedessen Immunität gewinnen. CRISPR/cas als Teil der adaptiven Immunabwehr von Bakterien wurde also bestätigt (Barrangou u. a. 2007).

Die Abwehr erfolgt in drei Schritten. Als erstes wird in der Adaption die Fremd-DNS modifiziert und als Spacer in den CRISPR-Array eingefügt. Die Fremd-DNS wird als Protospacer bezeichnet. Die Identifizierung eines geeigneten Protospacers erfolgt über die PAMs (*engl. protospacer-adjacent motifs, an Protospacer angrenzende Motive*). Dies sind kurze Regionen, die von einem stabilen Komplex aus Cas1 und Cas2 erkannt werden (Garneau u. a. 2010, Mojica, Díez-Villaseñor u. a. 2009). Die Integration in den CRISPR-Array erfolgt in der Nähe der leader-Sequenz (Peng u. a. 2003). Somit wird sichergestellt, dass die Spacer chronologisch eingebaut werden und die Immunantwort auf die jüngste Infektion reagiert und dabei optimiert wird (Barrangou u. a. 2007; Van der Oost u. a. 2009). Die Integration erfolgt mit dem Komplex aus Cas1 und Cas2 und zum Teil zusätzlichen Hilfsproteinen, wie IHF (*engl. integration host factor*) (Wright u. a. 2017). Der nächste Schritt ist die cr-RNS-Transkription und Prozessierung. Aus dem primären Transkript entsteht die Vorläufer CRISPR-RNS (*pre-crRNS, engl. precursor-CRISPR-RNS*). Diese wird dann an spezifischen Stellen gespalten und es entstehen die reifen cr-RNS-Moleküle, gekennzeichnet durch die Spacer-Sequenzen mit der Fremd-DNS (Brouns u. a. 2008). Als letztes erfolgt das Erkennen und Zerstören fremder, eingedrungener DNS durch einen Ribonukleoproteinkomplex, was als Interferenz bezeichnet wird. Hierbei bildet die cr-RNS zusammen mit dem CRISPR-Ribonukleoprotein-Komplex (crRNP) einen Interferenzkomplex. Die PAM-Region eindringender DNS wird über komplementäre Basenpaarung innerhalb eines Spacers erkannt und die Phagen- oder Viren-RNS wird degradiert (Deveau u. a. 2008; Sashital u. a. 2012).

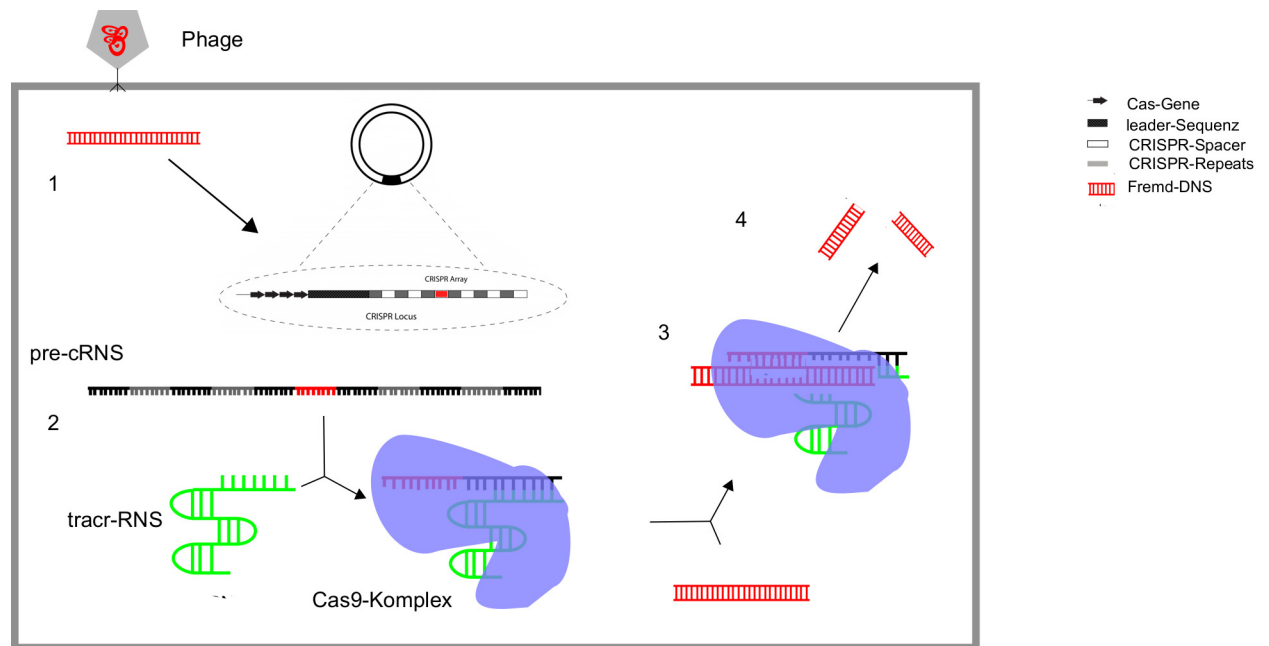


Abbildung 4: Schema des CRISPR/cas Systems

(1) Der Phage infiziert das Bakterium. Fremd-DNS wird in das Zytoplasma des Bakteriums injiziert. Die Fremd-DNS wird in den CRISPR-Locus eingebaut.

(2) Nach Bildung der cr-RNS bindet diese an die tracr-RNS und gelangt so zum Cas9-Komplex.

(3) Durch die Bindung kommt es zur Aktivierung von cas9. Der aktivierte Komplex bindet nun an Ziel-DNS, die zur PAM-Region komplementär ist.

(4) Cas9 zerschneidet die Ziel-DNS.

(Abbildung abgeändert nach Peter Cavanagh 2014)

Es folgten weitere Studien zum CRISPR/cas-System. Dabei konnte gezeigt werden, dass das System auch horizontalen Gentransfer verhindern kann, indem kurze RNS-Stücke als Lotsen zur Ziel-DNS dienen (Brouns u. a. 2008). Spätestens als auch entdeckt wurde, dass sich CRISPR/cas auf andere Spezies übertragen lässt (Sapranauskas u. a. 2011), begann die rasante Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Genomeditierung, also die zielgerichtete Veränderung der DNS. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die CRISPR/cas9 Methode genutzt, um das Genom von SH-SY5Y-Zellen zu verändern. Diese beruht auf dem oben beschriebenen adaptiven Abwehrmechanismus von Bakterien. Der grundlegende Mechanismus ist immer gleich, jedoch werden inzwischen mehrere Systeme unterschieden, die sich in Haupt- und Subgruppen gliedern lassen (Makarova u. a. 2015). Die CRISPR-cas9-Methode wird zum

Typ II gezählt und stammt aus *S. pyogenes*. Hierbei reicht cas9 aus, um im Interferenz-Schritt an die Ziel-DNS zu binden und dort auch DNS zu schneiden. Allerdings wird im Schritt zuvor eine zusätzliche tracr-RNS (engl. *trans-activating*) benötigt. Diese vermittelt die Bindung zwischen der cr-RNS und cas9. Die Aktivierung erfolgt durch die Endoribonuklease RNase III (Deltcheva u. a. 2011). Zur Herstellung eines Knockouts, also einer gezielten Deletion, wird die gewünschte Ziel-DNS als PAM-Region gekennzeichnet und als Spacer eingebaut. Über die cr-RNS erfolgt die Bindung daran und cas9 schneidet sequenzspezifisch die DNS (Jinek u. a. 2012). Die Veränderung des „Code des Lebens“ wird innerhalb weniger Wochen möglich, so weiter die Begründung des Nobelpreiskomitees.

4.5 Das FMR-Protein

Das fragile X-Syndrom, auch Martin-Bell-Syndrom, ist eine X-chromosomal assoziierte Krankheit und ein häufiger Grund für angeborene geistige Behinderung (Crawford u. a. 2001). Durch eine Mutation kommt es zu einer Verlängerung auf über 200 Kopien des CGC-Tripletts im *fragile X mental retardation 1* Gen (FMR1, fragiles X mentales Retardierungsgen), welches für FMRP (engl. *fragile X mental retardation protein, fragiles X mentales Retardierungsprotein*) codiert (Pieretti u. a. 1991). Die Vererbung verläuft x-chromosomal, wodurch mehr Männer als Frauen von dieser Krankheit betroffen sind. Zusätzlich kommt es zur Antizipation, also zu einer Verlängerung der CGC-Triplett-Kette bei jeder Meiose und somit zu einer stärkeren Ausprägung der Krankheit von Generation zu Generation. Das Hauptsymptom ist eine Entwicklungsstörung mit Intelligenzminderung. Diese reicht von Lernschwäche bis zu schwererer kognitiver Störung. Weitere Symptome sind eine Störung der Sprachentwicklung sowie psychiatrische Auffälligkeiten wie autistische Verhaltensweisen. Körperlich syndromale Veränderungen sind große Hoden, große Ohren und eine Vergrößerung des Kopfumfangs.

Das Fragile XE-Syndrom (FRAXE) ist ebenfalls eine angeborene Erkrankung deren Ursache eine Mutation im FMR2-Gen ist. Es ist eine Erkrankung mit nicht-syndromaler, meist leichter geistiger Retardierung. Die Erkrankung wird ab einer Wiederholungsanzahl von 200 CGC-Tripletts des FMR2-Gens manifest. Das fragile X-Syndrom und das FRAXE-Syndrom werden zu den Trinukleotidrepeat-Erkrankungen gezählt. Ab 200 oder mehr Wiederholungen liegt die Vollmutation vor. Es kommt dann zur Methylierung und damit zur Ausschaltung des Genomabschnitts. FMRP wird nicht mehr exprimiert (Sutcliffe u. a. 1992).

FMRP ist ein mRNS-bindendes Protein und spielt in der Genexpression eine wichtige Rolle, durch Beeinflussung der Translation potentiell mehrerer hunderter mRNSs. Hier sind viele darunter, welche vor allem im Soma und Dendriten von Neuronen vorkommen und die Neuroplastizität steuern. FMRP reguliert reversibel die Expression dieser Proteine durch Hemmung der Translation (O'Donnell und Warren 2002E. Chen u. a. 2014). FMRP liegt im Gehirn in einer phosphorylierten Form gebunden an der Ziel-mRNS vor. Die Dephosphorylierung erlaubt die Dissoziation von FMRP und Ziel-mRNS und wird von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) induziert (Nalavadi u. a. 2012).

FMRP führt zu Veränderungen in den Dornfortsätzen von Neuronen (Irwin u. a. 2001). Es wird vermutet, dass viele Symptome des fragilen X-Syndroms auf die beeinträchtigte synaptische Plastizität zurückzuführen sind. Neben postsynaptischen NMDA-Rezeptoren, sind auch postsynaptische mGluR an der Aktivierung von LTD beteiligt. Möglicherweise wirkt FMRP auf die synaptische Plastizität im Hippocampus durch Beeinflussung der metabotropen Glutamatrezeptor-abhängigen Langzeitdepression (mGluR-LTD) ein. Hierbei scheint FMRP die Translation, von für die LTD erforderlichen Proteinen, zu hemmen. Bei FMRP-Knockout-Mäusen, einem Mausmodell für fragiles X-Syndrom, liegen vermehrt synaptische Proteine vor, ohne dass es zu vermehrter Transkription kommt (Bear u. a. 2004; Nosyreva und Huber 2006).

Ein weiteres FMRP-Zieltranskript ist APP-mRNS (E. K. Lee u. a. 2010). Westmark *et al.* vermuten, dass FMRP die Translation von APP unterdrückt. Durch Aktivierung des mGluR5 kommt es zur Verdrängung von FMRP und die Translation von APP nimmt zu. In FMRP-Knockout-Modellen wird auch eine erhöhte APP-Synthese mit vermehrter Anreicherung von A β beschrieben (Renoux u. a. 2014; C. J. Westmark und Malter 2007).

4.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Alzheimererkrankung ist weltweit die häufigste primäre Ursache für Demenz. Neuropathologisch ist die Erkrankung durch die Ablagerung von Amyloid- β in amyloiden Plaques sowie Neurofibrillenbündel aus dem Tau-Protein gekennzeichnet (Goedert 1996; J. A. Hardy und Higgins 1992). Die Alzheimererkrankung ist eine multifaktorielle Erkrankung. Neben Entstehung von A β durch die amyloide Prozessierung, werden auch Veränderungen in der Calciumhomöostase beschrieben. Die Calciumdysregulation scheint ein sehr frühes Ereignis in der Alzheimerpathogenese sein. Hierbei können Veränderungen im Calciumzellstoffwechsel bereits vor klinische Symptome auftreten

(Etcheberrigaray u. a. 1998; Leissring u. a. 2000). Zusätzlich scheinen sich die Calciumdysregulation und die Amyloidentstehung gegenseitig zu beeinflussen und zu verstärken. Auch die Hyperphosphorylierung von Tau kann durch die gestörten Signalwege bei Veränderungen der Calciumhomöostase aggraviert werden (Saito u. a. 1993).

In einer der vorliegenden Arbeit vorausgehenden Promotionsarbeit aus der gleichen Arbeitsgruppe beschäftigte sich O.Streidenberger mit dem Einfluss von APP und Presenilin auf STIM und Orai. Ebenso untersuchte O.Streidenberger in MEF-Zellen wie sich ein STIM-Knockout auf die α -/ β - und γ -Sekretasen auswirkte. Es stellte sich heraus, dass zur Beurteilung insbesondere der neuronale Kontext fehlt. In der vorliegenden Arbeit sollte der mögliche Beitrag einer veränderten Calciumhomöostase auf die Alzheimerkrankheit beleuchtet werden. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde auf die Betrachtung neuronaler Zellen gelegt. Zunächst sollte der Einfluss der Calciumhomöostase auf, die an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen, untersucht werden. Hierzu wurden mittels der CRISPR/cas9-Methode STIM1 und STIM2 in SH-SY5Y-Zellen ausgeknockt. Es sollte eine funktionelle Überprüfung des Knockouts mittel Calciumimaging durchgeführt werden. Anschließend sollte die Auswirkung des veränderten Calciumhaushaltes auf Gen- und Aktivitätsebene der Sekretasen beschrieben werden.

Ergänzend sollte in *post mortem* Gehirnproben von Alzheimerpatienten eine Analyse der Genexpression von Orai und STIM in Abhängigkeit des Alters, des Braak-Status und des A β -Gehalts stattfinden.

Neben Calcium können auch FMR-Proteine durch Regulation der Proteinbiosynthese von synaptischen Strukturen zur Gedächtnisbildung beitragen. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Genexpression von FMR1 und FMR2 untersucht werden. Hierbei wurde der Frage nachgegangen, ob APP oder Prozessierungsprodukte von APP, die Expression von FMR1 und FMR2 beeinflussen können.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Abkürzung	Herkunft
AICD (1-20)-Peptid		Genscript
Bicinchoninsäure		Sigma Aldrich
bidestilliertes Wasser	ddH ₂ O	
Bromphenolblau		Roth
Chloroform		Merck
Chlorwasserstoff	HCl	Merck
Complete Protease Inhibitor Cocktail mit EDTA		Roche
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck
Dulbecco's modified Eagles Medium	DNEM	Sigma Aldrich
Ethanol		Sigma Aldrich
Ethyl -Acetat		VWR
Ethylendiamin-tetraessigsäure	EDTA	C.Roth
Fast SYBR Green Master Mix		Life Technologies
Fetales Rinderserum	FBS/FCS	Pan Biotech
FuGENE HD Transfektionsreagenz		Promega
Fura-2-AM		Invitrogen
Geneticin G418		Thermo Scientific
Glukose		Merck
Glycerin		Roth
HBS-Puffer		Synvolux Therapeutics

Tabelle 1 – Fortsetzung Chemikalien

Chemikalie	Abkürzung	Herkunft
Hepes		Sigma Aldrich
Hygromycin B		Pan Biotech
Isopropanol		VWR
JetPRIME Buffer		Polyplus transfection
JetPRIME Transfektionsreagenz		Polyplus transfection
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kalziumchlorid-dihydrat	CaCl ₂ x 2H ₂ O	VWR
KH ₂ PO ₄ x3H ₂ O		Merck
Kupfersulfat-pentahydrat	CuSO ₄ x 5H ₂ O	C.Roth
Lipofectamine 2000		Life Technologies
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Roth
Methanol		VWR
Minimum Essential Medium	MEM	Sigma Aldrich
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O		Roth
Natrium-cacodylat-trihydrat		Fluka
Natriumchlorid	NaCl	VWR
Natrium-Desoxycholat		Sigma Aldrich
Natrium-Dodecylsulfat	SDS	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	NaOH	Roth
Natriumpyruvat		Sigma Aldrich
n-Heptan		Merck
n-Hexan		VWR
NP-40 Substitute		Fluka
Nuclease-freies Wasser		Qiagen
OptiMEM		Life Technologies
Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	P ₂ SO ₄	C.Roth
Puromycin		Thermo Scientific
Saccharose		Sigma Aldrich
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	C.Roth

Tabelle 1 – Fortsetzung Chemikalien

Chemikalie	Abkürzung	Herkunft
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 grade	HPLC-Wasser	VWR
Wasser, RNS-frei		Qiagen
Zeocin		Life Technologies
β -Sekretase Substrat		Merck Millipore
γ -Sekretase Substrat		Merck Millipore

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Material	Herkunft
10cm-Schalen für Zellkultur	Sarstedt
12-Well-Platten für Zellkultur	Falcon
24-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
6-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
96-Deep Well-Platte	Nunc
96-Well-Platte für Zellkultur	Falcon
96-Well-Platte, transparent	Greiner
96-Well-Platte, weiß	Nunc
96-Well-Sammelplatte	Nunc
96-Well-Sterilfilterplatte	Merck Millipore
Einfrierröhrchen, 1,8ml	Nunc
Falconröhrchen, 15ml und 50ml	Sarstedt
Glasflaschen, 2ml	NeoLab
Glas-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 0,5mm	Peqlab

Tabelle 2 – Fortsetzung Materialien

Material	Herkunft
Glaspipetten	NeoLab
Glasröhrchen	Wheaton
Gummischaber	Hartenstein
Kanülen 23G x 1", 0,6mm x 25mm	Becton, Dickinson and Company
Kanülen 24G x 1", 0,55mm x 25mm	Becton, Dickinson and Company
Keramik-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 1,4mm	Peqlab
Pasteurpipetten	VWR
Petrischalen	Sarstedt
Reaktionsgefäß, 1,5ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß, 2ml	Eppendorf
Spritzen, 1ml	Becton, Dickinson and Company
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Verschlussfolie für 96-Well-Platten	Peqlab
Verschlussfolie für RT-PCR-Platten	Thermo Scientific

5.1.3 Geräte und Zubehör

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Herkunft
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
Fluorometer Safire 2	Tecan
Gefrierschrank -20 °C Premium	Liebher
Gefrierschrank -80 °C Hera Freeze	Thermo Electron
Heizblock Thermoshaker	Universal Labortechnik
Inkubationsschüttler New Brunswick Innova 44	Eppendorf
Inkubator HeraCell 150	Heraeus

Tabelle 3 – Fortsetzung Geräte

Gerät	Herkunft
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
Power Supply Consort EV231	Sigma Aldrich
Präzisionswaage EW	Kern
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
Transferkammer TransBlot Cell	BioRad
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckmann Coulter
Vortex Genie2 Bender	Hobein
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

Tabelle 3 – Fortsetzung Geräte

Gerät	Herkunft
Zentrifuge Labfuge GL	Heraeus

5.1.4 Zelllinien

Tabelle 4: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
SH-SY5Y WT	humane Neuroblastom-Zelllinie
SH-SY5Y mock	in dieser Arbeit generierte Vergleichszelllinie zu SH-SY5Y S1/2 $-/-$, SH-SY5Y S1 $-/-$ und SH-SY5Y S2 $-/-$
SH-SY5Y S1/2 $-/-$	SH-SY5Y WT mit stabilem Knockout von STIM1 und STIM2, im Rahmen dieser Arbeit generiert
SH-SY5Y S1 $-/-$	SH-SY5Y WT mit stabilem Knockout von STIM1, im Rahmen dieser Arbeit generiert
SH-SY5Y S2 $-/-$	SH-SY5Y WT mit stabilem Knockout von STIM2, im Rahmen dieser Arbeit generiert
MEF WT	Wildtyp-Maus-Fibroblast, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg), (Heber u. a. 2000)
MEF APP/APLP2 $-/-$	APP/APLP2-defiziente Mausfibroblasten, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg), (Heber u. a. 2000)
MEF APP Δ CT15	Mausfibroblasten mit, durch homologe Rekombination eingeführtes, verändertem APP-Gen. Kodiert für ein um 15 AS c-terminales verkürztes APP, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulrike Müller (Heidelberg), (Ring u. a. 2007)
MEF PS1/PS2 $-/-$	Mausfibroblast mit Knockout von Presenilin 1 und Presenilin 2, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bart de Strooper (Leuven, Belgien), (Herremans u. a. 2000)
MEF PS1 rescue	Mausfibroblast, stabile Expression von Presenilin 1 durch Retransfektion von PS1, generiert von Dr. Eva Hesser (Plasmidkonstrukt-Klonierung durch Dr. Marcus Grimm)

Tabelle 4 – Fortsetzung Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
MEF APP ⁻	Mausfibroblast mit Einzelknockout von APP
MEF APLP2 ⁻	Mausfibroblast mit Einzelknockout von APLP2
MEF C83	Mausfibroblast mit stabiler Expression der letzten 83 Aminosäuren
MEF C99	Mausfibroblast mit stabiler Expression der letzten 99 Aminosäuren, generiert von Dr. Heike Grimm

5.1.5 Kits

Tabelle 5: Kits

Kit	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi-Kit zur Plasmid-Isolation aus transformierten Bakterien	Qiagen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit zur Synthese komplementärer DNS	Thermo Fisher Scientific

5.1.6 Plasmide

Tabelle 6: Plasmide

Plasmid	Verwendung	Selektion	Herkunft
pSpCas9(BB)-2A-Puro	CRISPR/cas9-Vektor	<i>E. coli</i> DH5α: Amp 100 µg/ml, SH-SY5Y: Pur. 2 µg/ml	(Ran u. a. 2013)
pSpCas9(BB)-2A-Puro STIM1-KO	CRISPR/cas9-Vektor	<i>E. coli</i> DH5α: Amp 100 µg/ml, SH-SY5Y: Pur. 2 µg/ml	Anna Lauer
pSpCas9(BB)-2A-Puro STIM2-KO	CRISPR/cas9-Vektor	<i>E. coli</i> DH5α: Amp 100 µg/ml, SH-SY5Y: Pur. 2 µg/ml	Anna Lauer

5.1.7 humane *post mortem* Hirnproben

In der Arbeit wurden humane *post mortem* Hirnproben untersucht. In der Tabelle 7 wird eine statistische Übersicht der verwendeten Proben gegeben. Eine komplette Auflistung findet sich im Anhang.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten humanen Hirnproben

	männlich	weiblich	gesamt
Kontrolle	6	8	14
AD	13	17	30

5.2 Methoden

5.2.1 Zellbiologische Methoden

5.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

nach Masters 2000 und Freshney 2015, verändert

Die Grundlage der Arbeit sind die Zellkultur und Zellmodelle. Die saubere und sterile Arbeit in der Zellkultur ist daher essentiell. Zunächst wurden die kryokonservierten Zellen im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut. Die Kryotubes mit der Zellsuspension wurde mit Ethanol besprüht, um sie anschließend auf die Sterilbank zu bringen, wo alle weiteren Arbeitsschritte durchgeführt wurden. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon, in welches 8,5 ml Kultivierungsmedium vorgelegt wurden, überführt. Da in unserer Arbeitsgruppe standardmäßig mit 1,5 ml Kryotubes mit Zellsuspension gearbeitet wurde, wurden 8,5 ml, statt wie bei Masters *et al.* 10 ml vorgelegt, um ein Endvolumen von 10 ml zu erhalten. Die Zellsuspension wurde bei 1500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zentrifugationsdauer wurde aus Zeitgründen, im Unterschied zum Originalprotokoll, verkürzt und fand dafür mit geringgradig höhere Umdrehungszahl statt. Das Zellpellet wurde in 5 ml des jeweiligen vorbereiteten, erwärmten Mediums resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in das Kultivierungsgefäß gegeben und auf das jeweilige Endvolumen mit Medium aufgefüllt. Der erste Mediumwechsel fand nach 24 Stunden statt. Für jede Zellkultur sind die verwendeten Medien in Tabelle 8 aufgeführt.

Die Zellen wurden unter konstanten Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Sobald die Zellen in den 10 cm Zellkulturschalen konfluent waren, wurden sie gesplittet und in neue Kultivierungsgefäße ausgesät. Hierzu wurde zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt. Um das restliche Medium zu entfernen, wurde mit 5 ml DMEM gespült und wieder abgesaugt. Nun wurde für 3 Minuten 1,5 ml Trypsin zugegeben. Trypsin löst die Zell-Zell-Kontakte und die Zellen konnten dann mit 8,5 ml Medium abgelöst werden. Hierzu wurde die Schale leicht am Rand beklopft und hin und her bewegt, bis sich die Zellen vom Boden abgelöst hatten. Die Zellverbände wurden mittels Scherkräfte der Pipette nun weiter vereinzelt und dann in die neuen Kultivierungsgefäße überführt. Je nach geplantem Experiment und Wachstumsverhalten der Zellen wurden Verdünnung zwischen 1:2 und 1:20 gewählt.

Tabelle 8: Zellkulturmedien

DNEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, FCS: fetales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*), NEAA: Non-essential Amino Acid Solution

Zelllinie	Medium
SH-SY5Y WT MEF WT	
MEF APP/APLP2 -/- MEF APP Δ CT15 MEF PS1/PS2 rescue	DNEM, 10% FCS (v/v)
SH-SY5Y mock SH-SY5Y S1/2 -/- SH-SY5Y S1 -/- SH-SY5Y S2 -/-	DNEM, 10 % FCS (v/v), 1 % NEAA, Puromycin 100 μ g/mL

5.2.1.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

nach Masters 2000 und Freshney 2015, verändert

Für die längerfristige Aufbewahrung der Zellen wurden Gefrierkulturen der verschiedenen Zelllinien angelegt. Hierzu wurden Zellen aus fast konfluenten Schalen ausgewählt, weil dann davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellen sich in der Wachstumsphase befinden. Die Erwartung war, möglichst viele lebensfähige Zellen in gutem Zustand zu konservieren.

Einfrierlösung

Zellmedium

20 % (v/v) FCS

10 % (v/v) DMSO

in DMEM

Die Zellen wurden wie in 5.2.1.1 beschrieben gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin abgelöst, um eine homogenen Zellsuspension zu erhalten. Die Reaktion wurde mit 3,5 ml Medium gestoppt und die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm. In Abwandlung zum Originalprotokoll war der Zentrifugationsschritt aus Zeitgründen auf 5 Minuten bei geringfügig höhere Drehzahl verkürzt. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 4,5 ml

der vorbereiteten Einfrierlösung aufgenommen. Die Zelllösung wurde in drei Kryotubes à 1,5 ml verteilt und auf -80 °C gebracht. Hierzu erfolgte eine kontinuierliche Abkühlung um 2 °C/Stunde. Für die längerfristige Aufbewahrung wurden die Kryotubes dann im Stickstofftank bei -180 °C gelagert.

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.2.1 Retransformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS

nach Sambrook u. a. 1989

Chemokompetente *E. coli* DH5 α -Zellen wurden in Aliquots auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterienkulturen wurden 5 μ l der gelösten Plasmide gegeben. Eine Negativkontrolle wurde ohne Zugabe von Plasmid gleich behandelt. Aus Zeitgründen wurde die Inkubation auf Eis von ursprünglich 30 Minuten bei Sambrook auf 20 Minuten verkürzt. Es erfolgte ein Hitzeschock, indem die Zellen für 90 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad gestellt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden dickerwandigere Falcontubes als im Originalprotokoll eingesetzt, weshalb der Hitzeschock von 60 Sekunden im Originalprotokoll auf 90 Sekunden ausgeweitet wurde. Die Zellen wurden anschließend in ein Reagenzglas mit vorgelegtem LB-Medium überführt. Die Bakterienkultur wurde schüttelnd für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % (w/v)) wurde das Pellet 1:20 verdünnt. 200 μ l wurden auf LB-Agar mit Ampicillin (100 μ g/ml) ausplattiert. Über Nacht wurden die Platten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

LB-Medium (*engl. lysogeny broth*) für Bakterien

0,5 % (w/v) NaCl

1 % (w/v) Bacto-Trypton

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt

in ddH₂O

einzelnen autoklavieren und steril pipettieren

Einstellen des pH-Werts auf 7,0 mit HCl

LB-Agarplatten für Bakterien

LB-Medium

1,5 % (w/v) Agar

in Petrischalen gießen und aushärten lassen

5.2.2.2 Isolation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien

nach Handbuch des QIAGEN Plasmid Maxi Kit, QIAGEN, Version April 2012

Plasmid-DNS wurde mittels Plasmid-DNS-Maxipräparation isoliert. Verwendet wurde hierfür das EndoFree Plasmid Maxi-Kit der Firma Qiagen. Hierzu wurden 200 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum mit einer *E. coli*-DH5 α -Kultur beimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolation gemäß des Herstellerprotokolls.

Die DNS-Konzentrationsbestimmung wurde am Ende im NanoDrop-Spektrophotometer durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

5.2.2.3 Transfektion von Zellen

nach Herstellerprotokoll Lipofectamine 2000, Thermo Fisher Scientific, Version Juli 2005

Die Transfektion der SH-SY5Y-Zellen mit dem CRISPR/cas9-Plasmid wurde in dieser Arbeit durch Lipofektion unter Verwendung des Reagenz Lipofectamine 2000 durchgeführt. In der Vorbereitung wurden SH-SY5Y-wt-Zellen auf 6-well-Platten ausgesät und bis zu einer Dichte von mindestens 95 % kultiviert.

In zwei sterile Reaktionsgefäße wurden je 500 μ l OptiMEM vorgelegt. In ein Reaktionsgefäß wurde 20 μ l Lipofectamine 2000 hinzugegeben, in das andere 8 μ l der Plasmidlösung. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden beide Reaktionsgefäße für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen vermischt und noch einmal für 20 Minuten inkubiert. In der vorbereiteten 6-well-Platte wurde das Medium abgesaugt und auf 37 °C vorgewärmtes OptiMEM auf die Zellen gegeben. 500 μ l des Transfektionsansatzes wurde in jedes Well pipettiert und durch vorsichtiges horizontales Bewegen der Platte über den gesamten Zellen verteilt. 8 Stunden später erfolgte ein Wechsel auf das Standardkultivierungsmedium.

5.2.2.4 Generierung von stabil transfizierten STIM1- und STIM2-Knockout-Zellen

nach Herstellerprotokoll Lipofectamine 2000, Thermo Fisher Scientific

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Zelllinien durch stabile Transfektion generiert. Dazu wurden wie in Kapitel 5.2.2.3 beschrieben, SH-SY5Y-wt-Zellen mit verschiedenen Plasmiden transfiziert. Zwei weitere Wells blieben ohne Plasmid. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte der Wechsel auf das Selektionsmedium. Spätestens alle 72 Stunden wurde das Medium erneuert, um den Selektionsdruck hochzuhalten. Bei regelmäßigen optischen Kontrollen dienten die beiden Wells ohne Plasmid als Vergleich. Die stabile Transfektion wurde als erfolgreich und abgeschlossen erachtet, sobald die beiden Kontrollkulturen abgestorben waren, die transfizierten Zellen jedoch regelmäßiges Wachstumsverhalten zeigten. Die Kultivierung der transfizierten Zellen wurde bis zur Konfluenz fortgesetzt. Zur Vereinzelung der Zellen wurden 500 µl Trypsin-EDTA-Lösung zur Kultur pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation bei 37 °C wurde 1 ml des Selektionsmediums hinzugegeben und die Zellen wurden mit einer Glaspipette vereinzelt. In einem Falcon-Röhrchen wurden 5 ml Medium vorgelegt. Die Zellen wurden in das Medium überführt und für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 ml Selektionsmedium resuspendiert. In 10 cm Zellkulturschalen wurden 5 Tropfen der Zelllösung gegeben und mit Selektionsmedium auf 10 ml aufgefüllt. Die Zellen wurde als Mischkulturen in die Zellkultur aufgenommen.

Tabelle 9: stabil transfizierte Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Plasmid	Antibiotikum
SH-SY5Y mock	SH-SY5Y wt	pSpCas9(BB)-2A-Puro	Puromycin
SH-SY5Y S1/S2 -/-	SH-SY5Y wt	pSpCas9(BB)-2A-Puro STIM1-KO STIM2 KO	Puromycin
SH-SY5Y S1 -/-	SH-SY5Y wt	pSpCas9(BB)-2A-Puro STIM1-KO	Puromycin
SH-SY5Y S2 -/-	SH-SY5Y wt	pSpCas9(BB)-2A-Puro STIM2 KO	Puromycin

5.2.2.5 RNS-Isolation

TRIzol-Reagent nach Protokoll des Hersteller Life Technologies

Die Zellen wurden nach Erreichen von 100 % Konfluenz geerntet, um daraus die RNS zu isolieren. Dazu wurden die Zellen zunächst mit TRIzol lysiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abgeschabt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben stark geschüttelt und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 12000 rpm) bildeten sich drei Phasen aus. Die untere Phase bestand aus DNS, die mittlere aus Proteinen und die obere, klare Phase enthielt die RNS. Die RNS wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde zehn Mal invertiert und dann 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und nach zehn Minuten setzte sich die RNS als untere Phase ab. Die RNS wurde durch die Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und mit 15000 rpm pelletiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml Ethanol. Danach wurde das Pellet einige Minuten an der Luft getrocknet und dann in 100 µl H₂O aufgenommen. Abschließend erfolgte die Resuspendierung bei 55 °C für 10 Minuten. Nun wurde die RNS photometrisch mithilfe des NanoDrop-Spektrophotometer quantifiziert (5.2.2.6).

5.2.2.6 Quantifizierung der RNS

nach Grösgen 2014

Im NanoDrop-Spektrophotometer wurde die RNS bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert und auf ihre Reinheit überprüft. Proteine haben ihr Extinktionsmaximum bei 280 nm, wohingegen die Nukleinsäuren bei 260 nm ihren Maximalwert haben. Aus der 260/280 Ratio konnten somit Rückschlüsse auf die Proteinkontamination und auf die Reinheit der RNS gezogen werden. Der Zielwert lag für diese Arbeit bei 1,9-2,2. Anhand der Extinktion konnte auch die Konzentration berechnet werden. Hierfür galt folgender Sachverhalt

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/mL}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/mL},$$

wobei die Extinktion von 1 einem RNS-Gehalt von 40 µg/ml entspricht.

5.2.2.7 rekombinante cDNS-Synthese

nach Herstellerprotokoll High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific

Es erfolgte die Umschreibung der wie in 5.2.2.5 beschrieben, gewonnenen RNS in komplementäre cDNS, dem eigentlichen Ausgangsprodukt der RT-PCR. Dazu wurden 2 µg der RNS mit dem Ansatz aus dem „High Capacity cDNS Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems versetzt. Der RT-PCR Ansatz setzte sich, nach Herstellerprotokoll, wie folgt zusammen.

Master-Mix

2.0 µL 10x RT Buffer

0.8 µL 25x dNTP Mix

2.0 µL 10x RT Random Primer

1.0 µL MultiScribe Reverse Transcriptase

4.2 µL Nuklease-freies Wasser

10 µL RNS (eingestellt auf 0.2 µg/µL)

Programmeinstellung für cDNS

Schritt	Dauer	Temperatur
1	10 Minuten	25 °C
2	120 Minuten	37 °C
3	5 Minuten	85 °C
4	konstant	4 °C

5.2.2.8 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

nach Grösgen 2014

Die Echtzeit-PCR (Real-time PCR, RT-PCR) basierte auf der PCR-Reaktion zur Vervielfältigung von DNS. Zusätzlich wurde ein Doppelstrang-bindender Farbstoff eingebracht um mittels Fluoreszenzmessung die Konzentration zu bestimmen. Ziel war es, das Expressionsniveau verschiedener Gene vergleichen zu können. Die Quantifizierung der

Gene erfolgte im Vergleich zu sogenannter *Houskeeping Genes*, Genen, die konstant, unabhängig von äußeren Einflüssen und gleichmäßig in allen Geweben exprimiert werden. In den Experimenten wurde SYBR-Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Der Nachweis der Gene erfolgte über Primer, die genspezifisch binden. Die Primer für die einzelnen Versuchen sind in Tabelle 10, 11 und 12 aufgeführt. Die jeweilige Gensequenz der cDNS wurde dann durch die spezifischen Primer amplifiziert. In dem doppelsträngigen Produkt interkalierte der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green und konnte quantitativ nachgewiesen werden. Die Auswertung erfolgte anhand der $\Delta/\Delta\text{CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen 2001. Zur Durchführung der RT-PCR wurden 10 μl des folgenden Ansatz in die Vertiefung der 96-well Platte pipettiert.

Ansatz für RT-PCR

40 μL Fast SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems)
2 μL PrimerA (Endkonzentration 200nM)
2 μL PrimerB (Endkonzentration 200nM)
16 μL RNS-freies Wasser
20 μL cDNS

Die Messung erfolgt in einem 7500 Fast Real Time PCR System Gerät der Firma Life Technologies unter Verwendung der SDS V 1.3.1.21 Software. Die Geräteeinstellungen sind der folgenden Übersicht zusammengestellt.

	Zyklen	Temperatur	Dauer	Prozess
Schritt 1	1	95 °C	20 Sekunden	Denaturierung
Schritt 2	40	95 °C	3 Sekunden	Denaturierung
Schritt 3		60 °C	30 Sekunden	Anlagerung/Elongation
Schritt 4	1	60 °C-95 °C		Erstellen einer Dissoziationskurve

Tabelle 10: Primer-Sequenzen für die Real-Time PCR zur Bestimmung der Genexpression in humanen Proben

Gen	<i>forward primer</i>	<i>reverse primer</i>
ACTB	CTTCCTGGGCATGGAGTC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
APH1A	GCCTCTGTGGTCTGGTTCAT	TCTGCCTTCTTAAGCAGCTTGT
APH1B	ATCGCCGGAGCTTTCTTC	TTTCTGTGTTGGTCCATCTTTG
BACE1	CTTCGTTTGCCCAAGAAAGT	ACACCAGCTGCTCTCCTAGC
NCSTN	CTGTACGGAACCAGGTGGAG	GAGAGGCTGGGACTGATTTG
PS1	CTCAATTCTGAATGCTGCCA	GGCATGGATGACCTTATAGCA
PS2	GATCAGCGTCATCGTGGTTA	GGAACAGCAGCATCAGTGAA
PSEN	CATCTTCTGGTTCTTCCGAGAG	CATCTTCTGGTTCTTCCGAGAG
ADAM10	GCAAACCTGAAACCTGGGAAA	TTCCCTCCCTTGACACAGTCT
ADAM17	ATGTTTCACGTTTGCAGTCTCC	AGCTCTTCAGGTGGTTCTCTG
APP	GGCAGTTATCCAGCATTTCC	ATTGAGCATGGCTTCCACTC
IDE	CTCCAGGCATCATTATCATCAT	TGCCCTAGACAGGTTTGCAC
POLR2F	CCCGAAAGATCCCCATCAT	CACCCCCCAGTCTTCATAGC

Tabelle 11: Primer-Sequenzen für die Real-Time PCR zur Bestimmung der Genexpression in humanen Hirnproben

Gen	Cat. no. bei QIAGEN
STIM1	QT00083538
STIM2	QT00023744
ORAI1	QT00202587
ORAI2	QT00215229
ORAI3	QT00231910
TBP	QT00000721
HPRT1	QT00059066

Tabelle 12: Primer-Sequenzen für die Real-Time PCR zur Bestimmung der Genexpression von FMR in humanen und murinen Proben

Gen	<i>forward primer</i>	<i>reverse primer</i>
Fmr1	CACCTCAAAGCGAGCCCACA	GCTGCCTTGA ACTCTCTCCAGTTGT
Fmr2	AGTGCACAGCCAACGAG	GTTGCAGGCGTAGACTG
FMR1	AGTCACCTCAAAGCGAGCACA	GCCTTGA ACTCTCCAGCTGCTT
FMR2	AACCCAGTGCAGCCAGTTCA	GGAATGGGTCATCTCCCGCAA
TBP	CGGAGAGTTCTGGGATTGT	GGTTCGTGGCTCTCTTAT
Actb	CCTAGGCACCAGGGTGTGAT	TCTCCATGTCGTCCCAGTTG
Polr2f	AAGCGGACTACCACTCCTTA	GGATGCAGGGATGATGTTCT

5.2.3 Proteinbiochemische Methoden

5.2.3.1 Verarbeitung von Zellen

nach Burg 2014

Zur Gewinnung von konditioniertem Zellkulturmedium wurde das Medium vorsichtig in Falcon-Röhrchen oder Eppendorf-Reaktionsgefäße abpipettiert. Durch die Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C wurden Zellreste entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und direkt verwendet oder eingelagert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Vor der weiteren Verwendung von Zellen wurden diese dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit einem Gummischaber vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden die Zellen anschließend für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen konnten für weitere Experimente verwendet werden. Alternativ konnten die Zellen nach dem Waschschrift auch direkt chemisch aufgeschlossen werden. (5.2.3.2)

5.2.3.2 Herstellung von Lysat

nach Mett 2014 und Burg 2014

Lysepuffer

dd H₂O

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.

Die Zellen wurden wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben dreimal mit PBS gewaschen. Auf die Zellen wurde dann 500 µl des Lysepuffers gegeben. Die Zellen wurden 10 Minuten auf Eis mit dem Lysepuffer inkubiert. Anschließend wurden sie vorsichtig mit einem Gummischaber vom Boden gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine weitere 30-minütige Lyse auf Eis.

5.2.3.3 Herstellung von Homogenaten aus Zellen

nach Burg 2014

Unter Verwendung eines Minilys-Homogenisators wurden pelletierte Zellen mechanisch aufgeschlossen. Hierzu wurde Wasser, angepasst an die jeweilige Zellmenge, verwendet. Der mechanische Aufschluss erfolgte durch beschleunigte Keramikkügelchen für 30 Sekunden bei 5000 U/min.

5.2.3.4 Herstellung von PNFs

durchgeführt wie in Burg u. a. 2013 beschrieben

In den zellulären Membranen der Zellen konnte auch die Sekretase-Aktivität (5.2.3.6) gemessen werden. Hierzu wurden PNFs (postnukeläre Fraktion) hergestellt. Die Zellen

wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem Gummischaaber in γ -Sekretase-Assaypuffer abgeschabt. Im Minilys-Gerät wurden die Zellen durch Keramikkügelchen (Durchmesser 1,4 mm) bei 5000 U/min für 30 Sekunden homogenisiert (5.2.3.3). Mittels BCA-Test (5.2.3.5) wurden die Homogenate auf den gleichen Proteingehalt von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Als nächstes erfolgte ein zehnmütiger Zentrifugationsschritt bei 900 xg und 4 °C, damit sich die Zellkerne und größeren Fragmente absetzten. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert. Bei 55000 rpm und 4 °C wurde für 75 Minuten zentrifugiert, sodass am Ende dieses Schrittes ein Membranpellet vorlag. Das Membranpellet wurde in 800 μl des γ -Sekretase-Assaypuffers aufgelöst. Dieser Vorgang geschah im Minilys-Gerät für 10 Sekunden bei 4000 U/min durch Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 0,5 mm. Die Membranpräparationen konnten nun für die Messung der Sekretase-Aktivität verwendet werden.

γ -Sekretase Assaypuffer

10 nM Tris/HCl pH 7,4
200 mM Saccharose
1 mM EDTA
in dd H₂

5.2.3.5 BCA-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration

nach P. K. e. Smith u. a. 1985, Durchführung wie in Rothhaar u. a. 2012 beschrieben, verändert

BCA – Lösung

1 ml 4% CuSO₄ x 5 H₂O
39 ml Bicinchoninsäure

Der BCA-Test (*engl. bicinchoninicacid*) wurde als Testmethode zur quantitativen Proteinbestimmung verwendet. Für die Versuche war es wichtig, dass die Proben annäherungsweise den gleichen Proteingehalt aufweisen. Mit dem BCA-Test konnte die Proteinkonzentration bestimmt und anschließend auf den gleichen Proteingehalt eingestellt werden. Cu(II) wird im alkalischen Milieu in Gegenwart von Proteinen zu Cu(I) reduziert. Cu(I) bildet mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex. Die Gesamtkupfermenge ist proportional zum vorhandenen Protein und lässt sich photometrisch be-

stimmen. Für den BCA Test wurde eine Standardverdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen von 0,1 bis 1,1 mg/ml je 10 µl Rinderserum Albumin aufgetragen. In Erweiterung zu Rothhaar u. a. 2012 wurde mit einer zusätzlichen Negativkontrolle gearbeitet. Dies erlaubte das Erstellen der Eichkurve mit einem festen Nullpunkt. Neben die Standardreihe wurden in dreifacher Auftragung 0,5-15 µl des Testlysats pipettiert. Die Menge des Testlysats richtete sich nach der erwarteten Proteinmenge, beziehungsweise nach dem eingesetzten Material und war dabei nicht wie bei Rothaar auf geringe Mengen unter 2 µl begrenzt. Nun wurden in alle Wells 200 µl der vorbereiteten BCA-Lösung gegeben und die Platte erst 15 Minuten bei 37 °C und dann 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 560 nm. Mithilfe der Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt, anhand der die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden konnte.

5.2.3.6 Messung der Enzymaktivität

nach Burg u. a. 2013 und Burg 2014, etabliert von Dr. Viola Hauptenthal, erweitert im Rahmen der vorliegenden Arbeit

Die Messung der Sekretase-Aktivität erlaubte eine Aussage über die enzymatische Umsetzung der Sekretase in lebenden Zellen in Echtzeit. Die verwendeten Substrate bestanden aus einer Peptidsequenz, die der Sekretase als Schnittstelle dient. Als α -Sekretase-Substrat wurde ein Substrat mit einer APP-Sequenz eingesetzt, für die β -Sekretase-Substrate mit einer APP^{swe}-Sequenz und für die γ -Sekretase wurden Substrate mit β -CTF-Sequenz eingesetzt. Die jeweiligen Messparameter sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Peptidsequenz sorgte zusätzlich für die räumliche Trennung der Fluorochrome, die an den Enden der Substrate lagen. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ermöglicht die Freisetzung der Fluoreszenz erst bei räumlicher Nähe der Zielmoleküle. Hierbei fluoresziert ein Zielmolekül nach Anregung von außen mit einer bestimmten Wellenlänge. Diese Wellenlänge regt das andere Zielmolekül an, wenn es sich in räumlicher Nähe befindet, sodass es seinerseits mit einer anderen Wellenlänge fluoresziert. Während der Sekretase-Messung schnitt die Sekretase an der Peptidsequenz und es kam folglich zur Annäherung der beiden Fluorochrome. Hierbei erfolgte nun die Energieübertragung von Donor- zum Akzeptorfluorochrome. Diese Energieübertragung wurde als Fluoreszenz sichtbar und wurde vom Detektor erfasst.

LCIS-Lösung

140 mM NaCl

2,5 mM KCl

1,8 mM CaCl₂

1,0 mM MgCl₂

20 mM HEPES/pH 7,4

ddH₂O

Zur Messung der Sekretaseaktivität in Echtzeit wurden die Zellen auf einer 96-well-Platte kultiviert. Die Konfluenz sollte hierbei innerhalb von 48 Stunden nach Aussaat erreicht werden. Vor der Substratzugabe wurden die Zellen vorsichtig zweimalig mit LCIS-Lösung gewaschen. Hierbei war darauf zu achten, dass die LCIS-Lösung möglichst komplett abgesaugt wurde und gleichzeitig dabei keine Zellen mit abgesaugt wurden. Die Substratzugabe erfolgte unmittelbar vor der Messung der Fluoreszenz im Infinite M100-Fluorometer. Vor dem Start der Messung wurde durch eine Probemessung in 5 verschiedenen Wells die Z-Position festgelegt. Bei der Auswertung der Daten wurde der lineare Bereich der Steigung verrechnet.

Tabelle 13: Messparameter für die Sekretase-Aktivitätsmessung

Sekretasemessung	Messparameter	Zyklen/Intervall	Konzentration
α -Sekretase in lebenden Zellen	Anregung: 355 nm (± 10 nm) Emission: 440 nm (± 10 nm)	50/ 50 Sekunden	5 μ M
β -Sekretase in lebenden Zellen	Anregung: 345 nm (± 5 nm) Emission: 500 nm (± 10 nm)	180/ 60 Sekunden	7 μ M
γ -Sekretase in lebenden Zellen	Anregung: 355nm (± 10 nm) Emission: 440 nm (± 10 nm)	50/ 180 Sekunden	12,5 μ M
γ -Sekretase in PNFs	Anregung: 355 nm (± 10 nm) Emission: 440 nm (± 10 nm)	50/ 180 Sekunden	6,25 μ M

5.2.3.6.1 Messung der α -Sekretase-Aktivität

Für Messung der α -Sekretase wurde das α -Sekretase Substrat in einer Konzentration von 30 μM eingesetzt. Die Messung erfolgte für 120 Zyklen bei einer Zyklusdauer von 120 Sekunden. Pro Well wurden 100 μl des mit LCIS versetzten Substrats eingesetzt.

5.2.3.6.2 Messung der β -Sekretase-Aktivität

Die β -Sekretase-Aktivität wurde bei einer Substratkonzentration von 10 μM gemessen. Dazu wurde die entsprechende Menge des Substrats mit warmer LCIS-Lösung verdünnt und 50 μl je Well aufgetragen. Die Messung erfolgte alle 60 Sekunden bei einer Länge von 180 Messzyklen.

5.2.3.6.3 Messung der γ -Sekretase-Aktivität

nach M. O. Grimm u. a. 2015

Zur Messung der γ -Sekretase-Aktivität wurde das Substrat mit LCIS-Lösung auf eine Konzentration von 12,5 μM verdünnt und für die Messung wurden 50 μl pro Well eingesetzt. Die Messung erfolgte für 50 Messzyklen à 180 Sekunden. Die Sekretaseaktivität konnte auch in PNFs gemessen werden. Hierzu wurden die Zellen wie in Kapitel 5.2.3.4 zu PNFs (postnukleäre Fraktion) verarbeitet. Für die Messung der Sekretasenaktivität wurden je 100 μl der Membranpräparation in eine Vertiefung der schwarzen 96-well-Platte pipettiert. Das Substrat wurde auf eine finale Konzentration von 1:50 verdünnt und pro Well wurden 10 μl eingesetzt. Die Messungeinstellungen waren ebenfalls 50 Messzyklen à 180 Sekunden. Die Messung der γ -Sekretase Aktivität erfolgte auch unter Verwendung des Inhibitors Thapsigargin. Hierzu wurde 10 Minuten vor Beginn der Messung das Zellkulturmedium abgesaugt und es erfolgte die Inkubation mit Thapsigargin in einer Endkonzentration von 1 μM . Die Kontrollzellen wurden in gleicher Weise mit DMSO behandelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretase-Messung um einen anschließenden BCA-Test erweitert. Die angestrebte gleichmäßige Konfluenz der Zellen vor Beginn der Messung wurde bisher nur optisch kontrolliert. Mit einem anschließenden BCA-Test konnte die Versuchsbedingung standardisiert werden. Es war möglich die Ausgangslage zu objektivieren. Eine bessere Vergleichbarkeit der Versuche wurde möglich.

Die Platte wurden direkt nach Beendigung der Messung im Infinite M100 auf Eis gestellt. Sie wurde dann bei maximaler Umdrehungszahl für 10 Minuten in der Plattenzentrifuge zentrifugiert. Je Well wurden 20 µl Lysepuffer zugegeben und für 30 Minuten aus Eis inkubiert. Mit der Pipette wurde der komplette Inhalt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein kurzer Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 30 Sekunden. Anschließend erfolgte mit dem Überstand ein BCA-Test wie in Kapitel 5.2.3.5 beschrieben. Bei der Auswertung erfolgte eine Verrechnung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Wells mit der gemessenen Steigung.

5.3 Calcium-Imaging

durchgeführt wie in Diener u. a. 2018 beschrieben

Calcium-Imaging wurde genutzt um den zytosolischen Calcium-Haushalt einer Zelle mikroskopisch zu bestimmen. Hierbei wurde unter Verwendung von fluoreszierenden Calcium-Chelatoren, im Rahmen dieser Experimente Fura-2, die Emission über die Zeit gemessen. Calciumgebundenes Fura-2 lässt sich mit Licht der Wellenlänge 340 nm anregen, wohingegen freies Fura-2 von einer Wellenlänge von 380 nm aktiviert wurde. Die Emission erfolgte bei 150 nm. Veränderte sich nun die intrazelluläre Calciumkonzentration, veränderte sich dementsprechend auch der Anteil des freien und gebundenen Fura-2. Durch die Berechnung der 340/380 Ratio über die Zeit konnte so der Calciumhaushalt der Zelle betrachtet werden. Fura-2 wurde mit Acetomethylgruppen verestert um die Zellmembran zu überwinden. Es diffundierte dann als Fura-2 AM (Fura-2 Acetomethyl) passiv durch die Zellmembran. Im Zellinneren erfolgte die Abspaltung der Acetomethylgruppen durch unspezifische Esterasen.

In Vorbereitung auf die Messung wurden die Zellen auf Coverslips in 6-Well Platten ausgesät. Vor Messbeginn wurde Fura-2 direkt in das Zellkulturmedium gegeben mit einer Zielkonzentration von 1 µM. Anschließend wurde Fura-2 AM bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 25 Minuten inkubiert. Die Coverslips wurden in eine speziell konstruierte Perfusionskammer eingespannt. Diese erlaubte die Spülung mit verschiedenen Lösungen über einen Zulauf und eine direkte Absaugung des Ablaufs. Alle fünf Sekunden wurden die Zellen nun mit Licht der Wellenlänge 340 und 380 nm für 10-20 ms angeregt.

Die erste Untersuchung erfolgte mit 2 mM calciumhaltiger Ringerlösung um einen basalen zytosolischen Calciumwert zu ermitteln. Anschließend wurde 1 µM Thapsigargin

gelöst in calciumfreier Ringerlösung zugesetzt. Thapsigargin wurde als pharmakologischer Inhibitor der SERCA-Pumpe verwendet, wodurch es zur passiven Freisetzung von Calcium aus dem ER kam. Dies war als 1. Peak (Thapsigargin Peak, TG-Peak) zu sehen. Im nächsten Messschritt wurden 2 mM calciumhaltige Ringerlösung verwendet. Es kam nun zum massiven Einstrom von Calcium in die Zelle, was als 2. Peak (SOCE-Peak) zu sehen war. Es wurden jeweils durch Subtraktion der Mittelwerte vor dem Peak von den Peakmaximalwerten Δ TG und Δ SOCE berechnet. Das abschließende Plateau zeigte die Beseitigung der Calciumionen aus dem Intrazellulärraum. Die Berechnung erfolgt ähnlich. Es wurde die Differenz aus dem Mittelwert von fünf Werten des Calciumplateaus und Mittelwerten der letzten Werte vor dem Calciumeinstrom berechnet.

2 mM Ca²⁺-Lösung

ddH₂O
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 Ca²⁺-Lösung

ddH₂O
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

Im Folgenden findet sich eine Übersicht der verwendeten Hard- und Software für die Auswertung des Calcium-Imaging.

Messsoftware	Live Acquisition T.I.L.L. Photonics
Auswertesoftware	Offline Analysis T.I.L.L. Photonics
Lichtquelle	Polychrom V T.I.L.L. Photonics
Kontrolleinheit	Imaging control Unit ICU T.I.L.L. Photonics
Mikroskop	Axio Observer A1 Carl Zeiss Microscopy GmbH
Kamera	Andor Technology plc.
Aufnahme mit 20x Objektiv	AHF Analysetechnik AG
F76-521 Fura-2 HC Filter	AHF Analysetechnik AG

5.4 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm Microsoft Excel 2013 sowie IBM SPSS Statistics Version 27. Zur Überprüfung ob eine Normalverteilung der Daten gegeben ist, wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Die Signifikanz wurde bei normalverteilten Daten mit dem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test ermittelt. Ansonsten wurde der Mann-Whitney U Test angewandt. Für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde mittels ANOVA (*engl. analysis of variance*) die Signifikanz von Effekten ermittelt. Bei normalverteilten und mindesten intervallskalierten Daten wurde die Korrelation nach Pearson berechnet. Waren die Bedingungen nicht erfüllt, wurde die Korrelation nach Spearman berechnet. Die p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen und damit wurde die Nullhypothese abgelehnt. Die Signifikanz wurde wie folgt angegeben: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.4.1 Umgang mit Extremwerten

Bei dem Umgang mit großen Datenmengen ist eine genaue Prüfung der Daten auf Extremwerte, sogenannte Ausreißer sinnvoll. Dies sind Werte, welche nicht zu den übrigen Werten zu passen scheinen, weil sie besonders groß oder klein im Vergleich zur Gesamtheit der übrigen Werte sind. Um Ausreißer zu erkennen, können die Daten zunächst in der beschreibenden Statistik graphisch als Boxplot dargestellt werden, sollten danach aber objektiviert werden.

Ausreißer haben einen großen Einfluss auf das arithmetische Mittel und können weitere Analysen der Daten, wie z.B. Regression stark verzerren. Gleichzeitig kann es sich aber auch um echte Ausreißer handeln, wenn sie tatsächlich einen wahren Wert widerspiegeln.

Als Einschlusskriterium wurde der Mittelwert \pm der 3-fachen Standardabweichung festgelegt, ein Bereich der 99 % aller Werte der Gauß'schen Verteilungskurve einschließt. Bei der Berechnung der multiplen linearen Regression kamen noch weitere Verfahren zum Prüfen von Ausreißern hinzu. Hierbei wurde sich ebenfalls an der \pm 3-fachen Standardabweichung orientiert und es konnten nicht standardisierte Residuen ausgeschlossen werden. Genutzt wurde ebenfalls die Cook-Distanz, ein Maß für den Einfluss eines einzelnen Wertes auf das gesamte Modell.

6 Ergebnisse

6.1 funktionelle Überprüfung des STIM-Knockout mittels Calciumimaging

Calcium ist in vielfältiger Weise in der Regulation von Zellen beteiligt. Eine besondere Form des Calciumstroms stellt der *store operated calcium entry* (SOCE) dar. Am SOCE sind STIM1 und STIM2 als Calciumsensoren beteiligt. Um zu untersuchen, ob STIM1 und STIM2 über die Calciumregulation Einfluss auf die APP-Prozessierung nehmen, wurden wie in Kapitel 5.2.2.4 beschrieben, mittels der CRISPR/cas9-Methoden verschiedene Knockout Zelllinien hergestellt. Als Kontrollzellen dienten SH-SY5Y mock, eine Zelllinie in die ein Leerplasmid transfiziert wurde. Untersucht wurden SH-SY5Y S1/2 *-/-* ein Doppelknockout von STIM1 und STIM2, SH-SY5Y STIM1 *-/-*, Knockout von STIM1 sowie SH-SY5Y STIM2 *-/-*, Knockout von STIM2.

Im ersten Schritt wurde die Transfektion mittels Calciumimaging überprüft. Das Calciumimaging erlaubt die Darstellung der Calciumkonzentration über die Zeit und wurde wie in Kapitel 5.3 beschrieben durchgeführt. Die erste Messung von 150-750 Sekunden fand mit calciumfreiem extrazellulärem Milieu statt. Es erfolgte die Zugabe von Thapsigargin. Thapsigargin ist ein pharmakologischer Inhibitor der SERCA-Pumpen. Durch die Inhibition kam es zur passiven Entleerung der ER-Speicher. Da das extrazelluläre Milieu calciumfrei gehalten wurde, konnte der Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol gemessen werden. Dieser Anstieg ist in der Abb. 5 als erster Peak zu sehen (TG-induzierter Peak). Durch die Speicherentleerung kam es zur Aktivierung des SOCEs durch die STIM-Proteine. Stieg nun die extrazelluläre Calciumkonzentration, durch den Wechsel auf die calciumhaltige Lösung ab Sekunde 750, an, kam es zum Calciumeinstrom, welcher als 2. Peak in der Abb.5 zu sehen ist. Ab Sekunde 850 ist ein Plateau zu erkennen. Dies zeigt das Wiederauffüllen der ER-Speicher und den Transport von Calcium in den extrazellulären Raum gegen die Zeit. Die zytosolische Calciumkonzentration sank langsam ab.

Die Kontrollzelllinie SH-SY5Y mock zeigte den erwarteten, physiologischen Calciumstrom (SOCE). Der Doppelknockout in der SH-SY5Y S1/2 *-/-* Zelllinie war erfolgreich. In der Darstellung zeigte sich kein Calciumstrom mehr. Die genaue Berechnung ergab lediglich noch eine Aktivität von 7,98 % ($\pm 1,76$, $p \leq 0,001$). Der Einzelknockout von STIM2 (SH-SY5Y STIM2 *-/-*) zeigte ebenfalls nur noch eine Aktivität von 11,99 % ($\pm 3,41$, $p \leq 0,001$). Der Einzelknockout von STIM1 hingegen führte zu keiner komplet-

ten Abnahme des Calciumstroms. Es zeigte sich ein deutliche Restaktivität des SOCEs von 72,1 % ($\pm 13,91$, $p \leq 0,001$). In der vorliegenden Arbeit konnte der Knockout von STIM in SH-SY5Y-Zellen mittels CRISPR/cas9 etabliert werden und funktionell bestätigt werden.

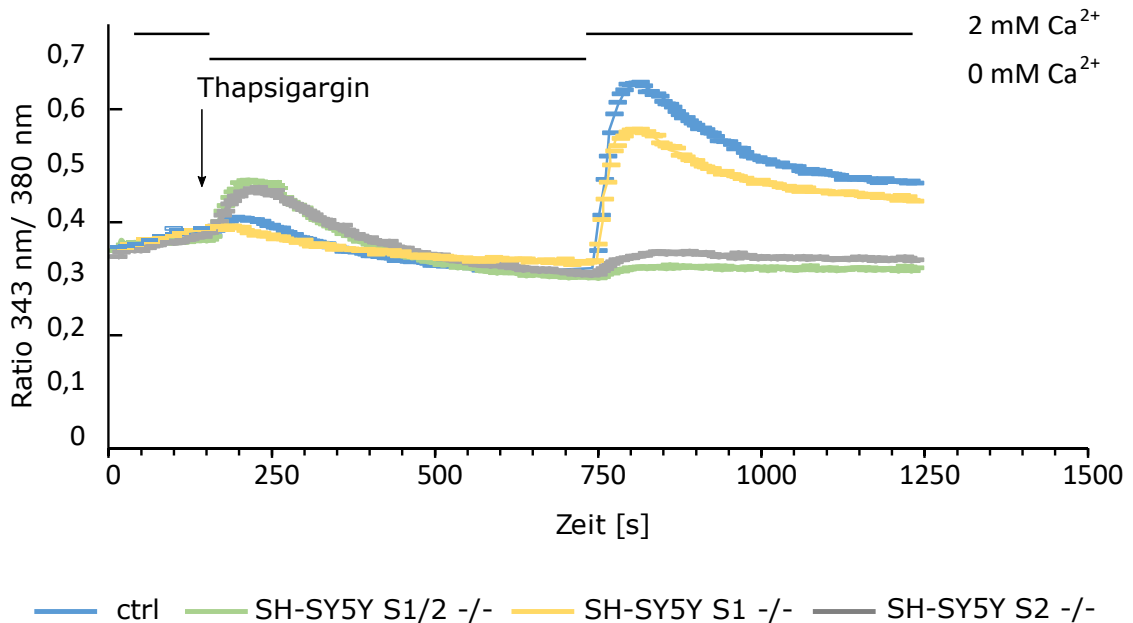


Abbildung 5: funktionelle Überprüfung des Knockouts mittels Calciumimaging
Messung der Calciumkonzentration mittels Ca²⁺-Imaging in unterschiedlichen SH-SY5Y-Zelllinien. Dargestellt ist der Verlauf der mittleren Calciumkonzentration über die Zeit. Für jede Versuchsreihe wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt. (ctrl=Kontrolle, hier SH-SY5Y mock)

6.2 Einfluss von STIM auf α , β -, und γ -Sekretase

Den α -, β - und γ -Sekretasen wird eine wichtige Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Pathologie zugeschrieben. Um zu untersuchen ob STIM1 und STIM2 einen Einfluss auf die Sekretasen ausüben, wurde folglich die Aktivität und die Genexpression der Sekretasen überprüft. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu eine humane neuronale Zelllinie verwendet, da die Expression der STIM-Proteine und die Regulation des Calciumhaushaltes spezifisch in Neuronen untersucht werden sollte.

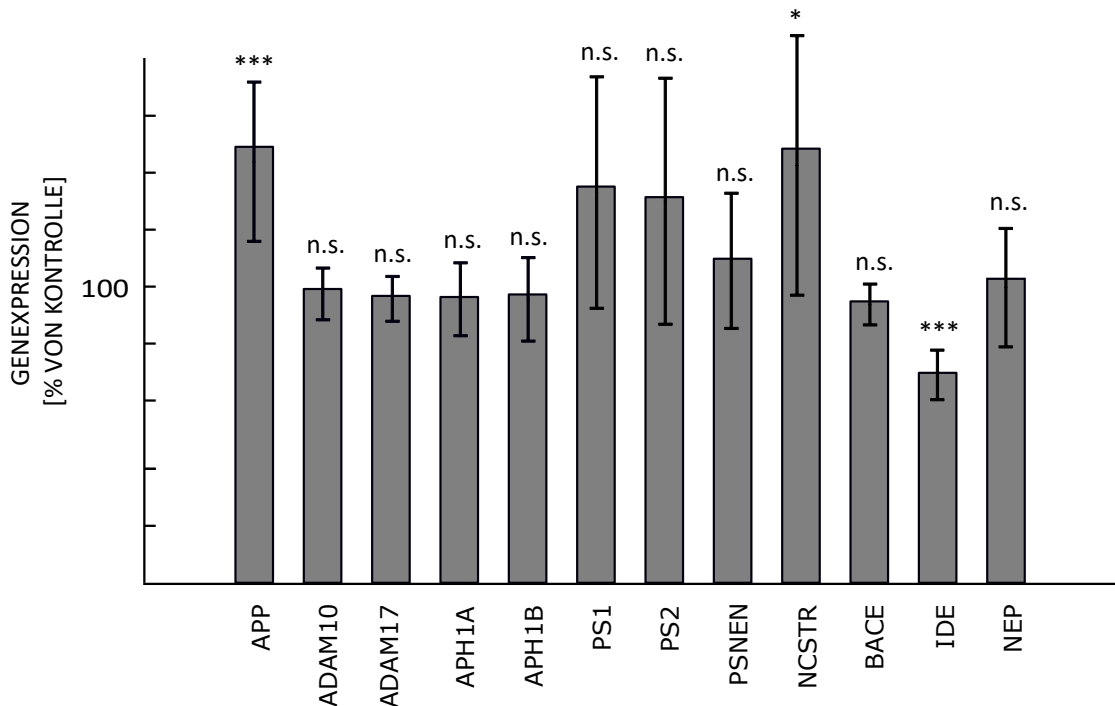


Abbildung 6: Genexpression von APP, α -, β -, γ - Sekretase und IDE in SH-SY5Y S1/2 -/- Zellen

Quantitative Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR. SH-SY5Y mock diente als Kontrolle. Alle Angaben normiert auf SH-SY5Y mock und prozentual angegeben. ADAM10, ADAM17, APH1B, PS1, PS2, PSENEN, NCSTRN, BACE und IDE je n=12. Für APP und APH1A je n=24. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung für APP und PSNEN 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.)

6.2.1 Einfluss von STIM auf die α -Sekretase

Zunächst wurde die α - Sekretase, wie in 5.2.2.8 beschrieben, auf Transkriptionsebene untersucht. Hierbei zeigte sich bei den SH-SY5Y S1/2 -/- keine signifikante Veränderung der Metalloproteasen. Die Genexpression von ADAM10 ($99,5\% \pm 9,6$, $p = 0,892$) sowie ADAM17 ($97,1\% \pm 8,3$, $p=0,415$) blieben unverändert.

6.2.2 Einfluss von STIM auf die β -Sekretase

Als nächstes wurde die Genexpression der β -Sekretase untersucht. Hier zeigte die Genexpression von BACE keinen Unterschied zwischen den SH-SY5Y Kontrollzellen und den SH-SY5Y S1/2 -/- ($95,3\% \pm 7,5$, $p = 0,155$). Die Enzymaktivität der β -Sekretase wurde mittels Fluoreszenzanalyse, wie in Kapitel 5.2.3.6 beschrieben, untersucht. Diese veränderte sich zwischen den SH-SY5Y mock und den SH-SY5Y S1/2 -/- nicht, weder im Lebendzellassay ($106,2\% \pm 9,1$, $p \geq 0,05$) noch im Versuch mit PNFs ($100,94\% \pm 22,0$, $p \geq 0,05$). Somit scheint es, dass STIM1 und STIM2 keinen Einfluss auf die β -Sekretase ausüben.

6.2.3 Einfluss von STIM auf die γ -Sekretase

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ -Sekretase untersucht. Bei der Analyse der Genexpression zeigte sich, dass Nicastrin als wichtiger Bestandteil der γ -Sekretase, signifikant auf $146,9\%$ ($\pm 43,9$, $p \geq 0,05$) gesteigert war. Für weitere Bestandteile der γ -Sekretase konnte keine signifikante Steigerung nachgewiesen werden. Die Expression von PS1 betrug $134,2\%$ ($\pm 39,1$, $p = 0,058$), von PS2 $130,5\%$ ($\pm 41,6$, $p = 0,103$) und von PSNEN $109,7\%$ ($\pm 22,9$, $p = 0,305$). Die Expression von APH1A ($96,7\% \pm 12,9$, $p = 0,389$) und APH1B ($97,6\% \pm 14,1$, $p = 0,684$) war ebenfalls nicht signifikant verändert.

Die Aktivität der γ -Sekretase wurde mittels Fluoreszenzanalyse, wie in Kapitel 5.2.3.6 beschrieben, untersucht. Wie in Abbildung 7 erkennbar, sank die Aktivität der γ -Sekretase in den SH-SY5YS 1/2 -/- auf $70,34\%$ ($\pm 32,19$, $p \leq 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe der SH-SY5Y mock. Untersucht wurde auch die Aktivität der γ -Sekretase auf PNFs. Hierbei zeigte sich eine nicht signifikante Verringerung der Aktivität auf $90,12\%$ ($\pm 14,90$, $p = 0,07$). Zusammengefasst lässt sich also eine gesteigerte Genexpression bei gleichzeitig gesunkener Aktivität der γ -Sekretase feststellen.

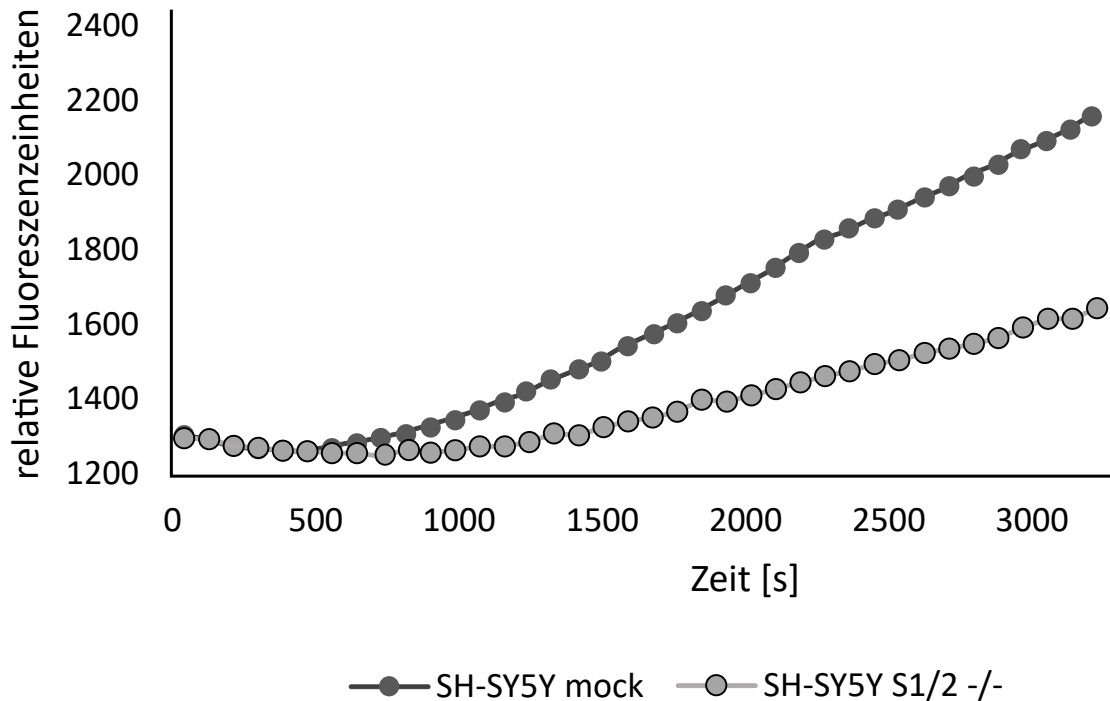


Abbildung 7: Messung der γ -Sekretase Aktivität

Messung der γ -Sekretase Aktivität in lebenden SH-SY5Y S1/2 -/- und SH-SY5Y mock als Kontrolle. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test berechnet bei $n=37$ für SH-SY5Y mock und $n=39$ für SH-SY5Y STIM 1/2 -/- in fünf unabhängigen Messungen. (n =Anzahl der Proben)

Parallel zur gesunkenen Aktivität ließ sich eine reaktiv gesteigerte Genexpression von APP erkennen. In den Zellen konnte eine signifikante Erhöhung der Expression von APP um fast 50 % ($147,63\% \pm 26,93$, $p \leq 0,001$), wie in Abbildung 6 dargestellt, gemessen werden.

Die Genexpression von IDE hingegen war signifikant auf 71,05 % ($\pm 7,67$, $p \leq 0,01$), wie in Abbildung 6 dargestellt, verringert.

6.3 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf α -, β -, und γ -Sekretase

An dieser Stelle stellt sich nun die Frage ob die Veränderungen von STIM1 oder STIM2 hervorgerufen wurden. Hierzu wurden Knockouts je von STIM1 und STIM2 generiert. Die funktionelle Überprüfung des STIM1- und STIM2-Knockouts sind in Kapitel 6.1 dargestellt. Da STIM1 und STIM2 möglicherweise in unterschiedlicher Weise auf die Calciumveränderung reagieren und im Gehirn auch nicht in gleicher Verteilung vorkommen, wurde in dieser Arbeit mit Einzelknockouts gearbeitet. Hierbei wurde die Aktivität der Sekretasen in SH-SY5Y STIM1 $-/-$ und SH-SY5Y STIM2 $-/-$ im Vergleich zu SH-SY5Y mock untersucht.

Wie auch schon in den Doppelknockoutzellen war in den Einzelknockoutzellen die Expression von APP deutlich gesteigert. In den SH-SY5Y STIM1 $-/-$ erreichte die Expression von APP 264,79 % ($\pm 41,99$, $p \leq 0,01$) der Expression von APP in den Vergleichszellen. Auch in den SH-SY5Y STIM2 $-/-$ war die Expression auf 202,59 % ($\pm 21,39$, $p \leq 0,001$) gesteigert. Die Expression von IDE war nur in den SH-SY5Y STIM1 $-/-$ auf 75,62 % ($\pm 20,77$, $p \leq 0,05$) vermindert. In den SH-SY5Y STIM2 $-/-$ Zellen konnte keine Veränderung gemessen werden (101,75 % $\pm 35,58$, $p = 0,915$) (Abbildung 8).

6.3.1 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α -Sekretase

Im Gegensatz zu den SH-SY5Y S1/2 $-/-$ zeigten die Einzelknockoutzellen einen Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α -Sekretase. Die Expression der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 war sowohl in den SH-SY5Y STIM1 $-/-$ sowie den SH-SY5Y STIM2 $-/-$ gesteigert. Die Expression von ADAM10 war auf 121,37 % ($\pm 17,56$, $p \leq 0,05$) und von ADAM17 auf 123,75 % ($\pm 13,8$, $p \leq 0,01$) in den SH-SY5Y STIM1 $-/-$ gesteigert. In den SH-SY5Y STIM2 $-/-$ steigerte sich die Expression von ADAM10 auf 113,82 % ($\pm 14,81$, $p \leq 0,05$) und ADAM17 auf 135,44 % ($\pm 15,23$, $p \leq 0,001$) (Abbildung 8).

6.3.2 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β -Sekretase

Die Expression der β -Sekretase zeigte sich, wie auch in der SH-SY5Y S1/2 $-/-$ Zelllinie (Kapitel 6.2.2), unverändert. Die Expression von BACE1 erreichte in den SH-SY5Y STIM1 $-/-$ 111,89 % ($\pm 14,96$, $p \geq 0,05$) und in den SH-SY5Y STIM2 $-/-$ 114,8 % ($\pm 18,17$, $p \geq 0,05$) (Abbildung 8).

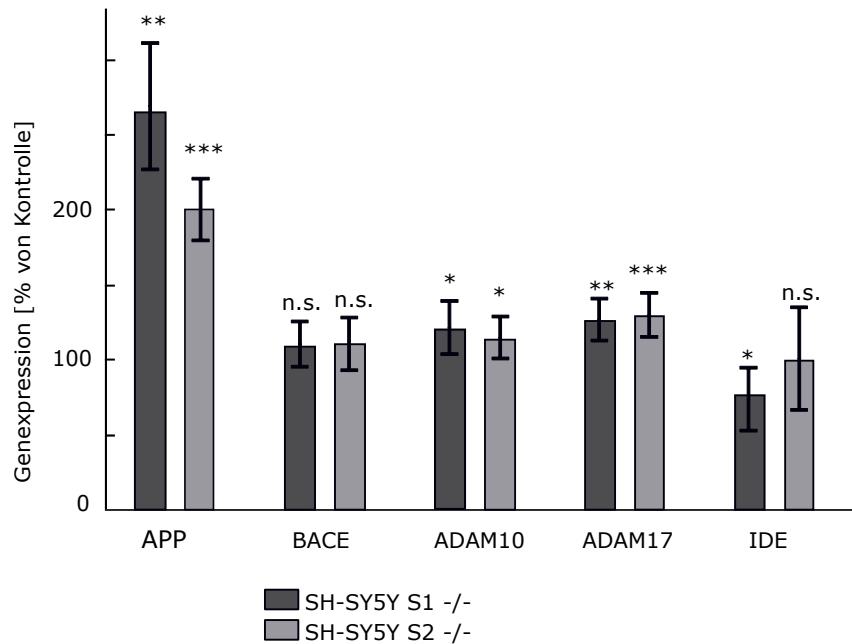


Abbildung 8: Genexpression von APP, α -Sekretase, β -Sekretase und IDE in SH-SY5Y S1 $-/-$ und SHSY5Y S2 $-/-$ Zellen

Quantitative Bestimmung der Genexpression von SH-SY5Y STIM1 $-/-$, SH-SY5Y STIM2 $-/-$ und SH-SY5Y mock als Kontrolle mittels qRT-PCR von APP, β -Sekretase, α -Sekretase und IDE. Je $n=12$. Alle Angaben in [%] – Anteil von SH-SY5Y mock. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde für APP mittels Mann-Whitney U Test bestimmt. Für alle anderen Gene wurde der ungepaarten, 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.)

6.3.3 Einfluss von STIM 1 und STIM 2 auf die γ -Sekretase

Während bei den SH-SY5Y S1/2 $-/-$ die Expression von Nicastrin als wichtiger Bestandteil der γ -Sekretase erhöht war und die Expression der weiteren Komponenten nicht signifikant verändert war, zeigte sich bei den Einzelklonen ein weniger eindeutiges Bild.

In den SH-SY5Y STIM1 $-/-$ war Nicastrin signifikant auf 161,27 % ($\pm 13,76$, $p \leq 0,001$)

gesteigert, in den SH-SY5Y STIM2 $-/-$ auf 130,52 % ($\pm 26,9$, $p \leq 0,05$). Die Expression von APH1A erhöhte sich in den SH-SY5Y STIM1 $-/-$ auf 150,74 % ($\pm 35,27$, $p \leq 0,05$) und auf 195,5 % ($\pm 49,44$, $p \leq 0,01$) in den SH-SY5Y STIM2 $-/-$. Die Expression von APH1B hingegen war in beiden Zelllinien signifikant verringert (SH-SY5Y STIM1 $-/-$ 49,15% $\pm 17,06$, $p \leq 0,001$; SH-SY5Y STIM2 $-/-$ 68,3% $\pm 30,7$, $p \leq 0,05$).

Ähnlich stellt es sich bei PS1 und PS2 dar. Die Expression von PS1 war in beiden Zelllinien signifikant erhöht auf 171,3 % (33,17, $p \leq 0,001$; STIM1 $-/-$) bzw. auf 167,96 % (27,5, $p \leq 0,001$, STIM2 $-/-$), wohingegen die Expression von PS2 erniedrigt war (STIM1 $-/-$ 32,42 % $\pm 6,72$, $p \leq 0,001$; STIM2 $-/-$ 36,63 % $\pm 8,88$, $p \leq 0,001$).

Die Genexpression von PSNEN erhöhte sich in den SH-SY5Y STIM1 $-/-$ auf 108,11 % ($\pm 9,14$, $p \leq 0,05$) sowie in den SH-SY5Y STIM2 $-/-$ auf 131,31 % ($\pm 34,68$, $p \geq 0,05$).

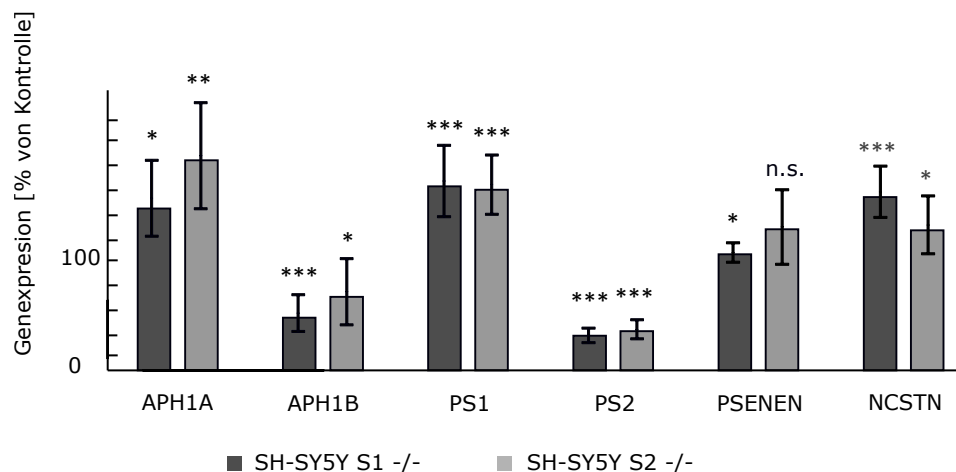


Abbildung 9: Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ -Sekretase

Quantitative Bestimmung der Genexpression von SH-SY5Y STIM1 $-/-$, SH-SY5Y STIM2 $-/-$ und SH-SY5Y mock als Kontrolle mittels qRT-PCR von APH1A, APH1B, PS1, PS2, PSNEN und NCSTN. Je $n=12$. Alle Angaben in [%] – Anteil von SH-SY5Y mock. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde für PSNEN mittels Man-Whitney U Test bestimmt. Für alle anderen Gene wurde zur Signifikanzberechnung der ungepaarten, zweiseitige Student's t-Test verwendet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. = nicht signifikant, n =Anzahl an Proben.)

Neben der Expression wurde auch die Aktivität der γ -Sekretase ermittelt. Bei den STIM1-Knockout wurde eine Aktivität von 57,16 % ($\pm 13,06$, $p \leq 0,001$) gemessen. Auch in den SH-SY5Y STIM2 $-/-$ sank die Aktivität auf 72,63 % ($\pm 27,57$, $p \leq 0,01$).

6.4 Einfluss von Calcium über SOCE auf die γ -Sekretase

Um den möglichen Einfluss von Calcium auf die γ -Sekretase weiter zu überprüfen, wurden die Zellen mit Thapsigargin behandelt. Thapsigargin ist ein nicht kompetitiver Inhibitor der SERCA-Pumpe. Es kommt zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytosol bei gleichzeitiger Verminderung der Calciumkonzentration im ER. Im Vergleich zwischen den Zellen, die mit Thapsigargin behandelt wurden und der Zellen ohne Hemmstoff, können Rückschlüsse auf den Einfluss von Calcium auf die Enzymaktivität gezogen werden.

Die Enzym-Aktivitätsmessung erfolgte wie in Kapitel 5.2.3.6 beschrieben. Erst kurz vor der Messung erfolgte die Zugabe von Thapsigargin zusammen mit dem Fluoreszenzfarbstoff. Damit konnte in dieser Arbeit das gravierende Absterben von Zellen durch die Inkubation mit Thapsigargin verhindert werden. Die Kontrollzellen wurden in gleicher Weise mit DMSO behandelt. Nach der Messung erfolgte ein BCA-Test und die Auswertung erfolgte normiert auf den Proteingehalt. Hiermit wurde in dieser Arbeit sichergestellt, dass es nicht zu Verzerrung der Ergebnisse kam, wenn es durch die Zugabe von Thapsigargin im geringen Umfang zu Zellverlust kam. Untersucht wurden SH-SY5Y S1/2 $-/-$ Zellen im Vergleich zu SH-SY5Y mock Zellen. Anschließend wurden auch die Einzelknockoutzellen SH-SY5Y S1 $-/-$ sowie SH-SY5Y S2 $-/-$ untersucht.

Die Ergebnisse zeigten eine nicht signifikante Reduktion der Enzymaktivität der γ -Sekretase in den SH-SY5Y S1/2 $-/-$ im Vergleich zu SH-SY5Y mock Zellen, wenn beide Zellreihen mit Thapsigargin behandelt wurden (85,27 % \pm 30,94, $p = 0,14$). Die Reduktion ist deutlich geringer, als in Versuchen ohne Thapsigargin. (Vergleiche Kapitel 6.2.3. Hier sank die Aktivität auf 70,34 % (\pm 32,19, $p \leq 0,001$). Allerdings war der Rückgang in den Zellen, die als Kontrollzellen mit DMSO behandelt wurden, in einem ähnlichen Größenverhältnis. Hier betrug die γ -Sekretase Aktivität in den SH-SY5Y S1/2 $-/-$ ebenfalls noch 85,56 % (\pm 19,9, $p = 0,11$).

Die Einzelknockouts SH-SY5Y STIM1 $-/-$ und SH-SY5Y STIM2 $-/-$ wurden ebenfalls untersucht. Die Kontrollzellreihe unter Behandlung mit DMSO zeigte wie auch in Kap. 6.3.3 eine Verringerung der Aktivität auf 82,19 % (\pm 44,73, $p = 0,05$). Im Gegensatz dazu steht eine Steigerung bei den SH-SY5Y S1 $-/-$ unter Behandlung mit Thapsigargin auf 187,12 % (\pm 83,32, $p = 0,07$). Nun wurde hier auch wieder SH-SY5Y mock bei Behandlung mit DMSO als 1 bzw 100 % gesetzt und als Bezugsgröße verwendet.

Im Vergleich mit SH-SY5Y mock führte Thapsigargin zur Steigerung auf 129,39 % ($\pm 72,05$, $p=0,4$). Unter dem STIM1-Knockout kam es durch Thapsigargin zur signifikanten Steigerung der Aktivität auf 291,56 % ($\pm 131,17$, $p \leq 0,01$). Bei der Betrachtung von SH-SY5Y S1 -/- in Bezug auf das Kontrollleerplasmid ergab sich auch eine Steigerung auf 242,12 % ($\pm 107,81$, $p \leq 0,05$).

Die Versuche bei den SH-SY5Y STIM2 -/- zeigten die folgenden Veränderungen: Zunächst wurden auch hier wieder die Daten aus Kapitel 6.3.3 bestätigt mit einer Verminderung der Aktivität auf 77,01 % ($\pm 15,35$, $p \leq 0,01$) der SH-SY5Y S2 -/- im Vergleich zu den Kontrollzellen. Trotz der Behandlung mit Thapsigargin blieb die Aktivität vermindert auf 69,32 % ($\pm 23,74$, $p = 0,3$).

Im direkten Vergleich der SH-SY5Y STIM2 -/- kam es durch Thapsigargin zu einer Steigerung auf 139,36 % ($\pm 47,71$, $p \leq 0,05$).

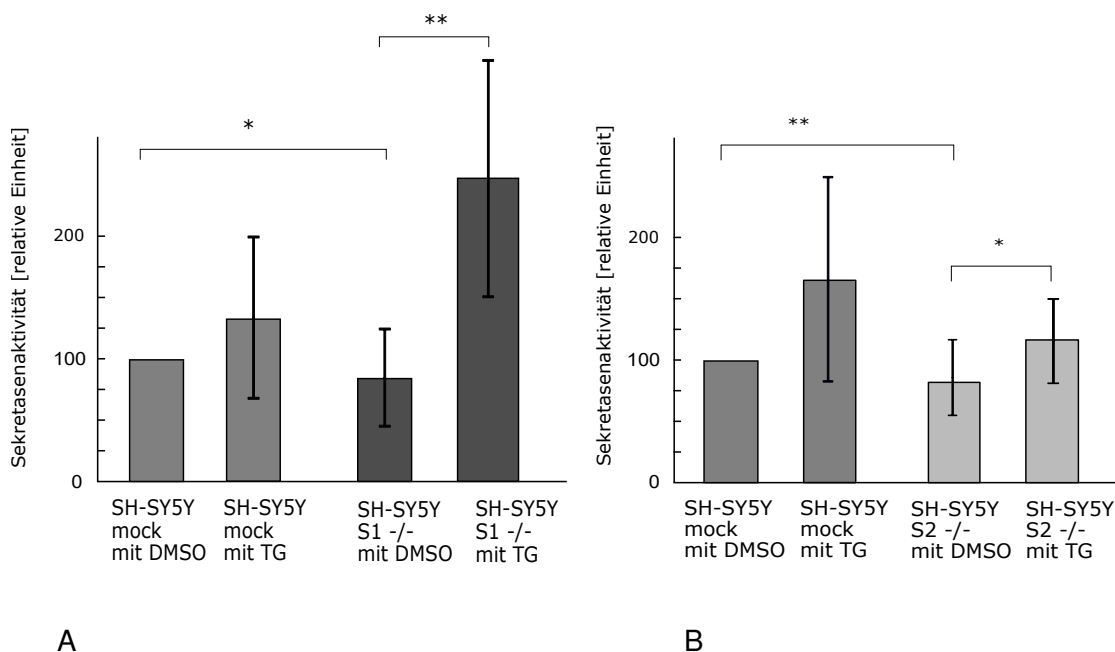


Abbildung 10: Messung der γ -Sekretase Aktivität nach Inkubation mit Thapsigargin

Messung der γ -Sekretase Aktivität nach Inkubation mit Thapsigargin in lebenden SH-SY5Y STIM1 -/- (A) und SH-SY5Y STIM2 -/- (B). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der γ -Sekretasenaktivität in SH-SY5Y mock bei Inkubation mit DMSO. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung

SH-SY5Y mock mit DMSO n=16, SH-SY5Y mock mit TG n=5, SH-SY5Y S1 -/- mit DMSO n=15, SH-SY5Y S1 -/- mit TG n=6, SH-SY5Y S2 -/- mit DMSO n=14, SH-SY5Y S2 -/- mit TG n=6

(TG=Thapsigargin, n=Anzahl an Proben)

6.5 STIM und Orai in *post mortem* Gehirnproben

6.5.1 MÜN-Hirnproben-qRT-PCR

Die MÜN-Reihe umfasst 44 *post mortem* Gehirnproben mit bekanntem Braak-Stadium. Daraus ließen sich zwei Gruppe ableiten. Eine Gruppe im Braak-Stadium 0-3 mit 14 Proben, welche als Kontrollgruppe diente (non-AD) sowie eine AD-Gruppe mit 30 Proben im Braak-Stadium 4-6. Eine komplette Liste der verwendeten Proben mit Zuordnung zu den Braak-Stadien findet sich im Anhang. Untersucht wurde die Expression der am SOCE beteiligten Proteine Orai und STIM mittels qRT-PCR.

In der AD-Gruppe konnte eine signifikante erhöhte Genexpression aller untersuchten Proteine nachgewiesen werden. Die Expression von STIM1 war auf 224 % ($\pm 28,96$, $p \leq 0,05$) und von STIM2 auf 216 % ($\pm 10,35$, $p \leq 0,05$) gesteigert. Im Vergleich dazu erhöhte sich die Expression von Orai1 auf 224 % ($\pm 16,42$, $p \leq 0,05$), von Orai2 auf 216 % ($\pm 64,0$, $p = 0,09$) und von Orai3 auf 227,16 % ($\pm 35,1$, $p \leq 0,05$).

Hierbei lag auch eine gegenseitige starke Korrelation zwischen den STIM- und Orai-Genen vor. Beispielsweise korrelierte die Expression von STIM1 mit STIM2 mit $r=0,68$, $p \leq 0,001$.

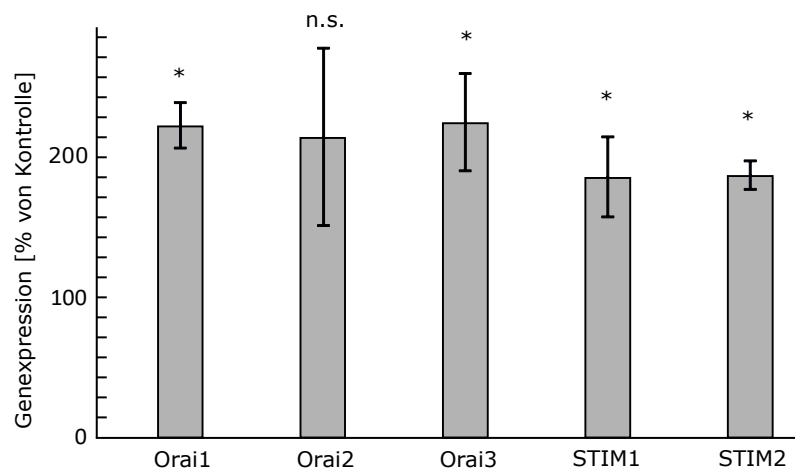


Abbildung 11: Genexpression von Orai1, Orai2, Orai3, STIM1 und STIM2

Quantitative Bestimmung der Genexpression von Orai und STIM in humanen AD Hirnproben. Alle Angaben in [%]-Anteil von humanen non-AD Hirnproben. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Die Signifikanz wurde bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney U Test berechnet.

(non-AD: n=14, AD: n=30, * $p \leq 0,05$, n.s.= nicht signifikant)

6.5.2 Einfluss des Alters auf die Expression von Orai und STIM

Das Alter ist der wichtigste Risikofaktor bei der Entstehung der Alzheimerkrankheit. Im Folgenden wurde untersucht, ob der Faktor Alter einen Einfluss auf die Expression der STIM- und Orai-Gene hat. Das mittlere Alter in der Gesamtgruppe betrug 77,21 Jahre, der Median 77,5 Jahre. Bei Betrachtung der Variable Alter in den Alzheimergruppe betrug der Mittelwert 77,15 und der Median 78,0. In der Kontrollgruppe non-AD war der Mittelwert 77,36 und der Median 77,0 Jahre. Insgesamt war die Variable Alter normalverteilt und in beiden Gruppen gleich ausgeprägt.

Es wurde kohortenübergreifend eine Korrelationsanalyse für das Alter mit der Genexpression durchgeführt. Die Korrelation wurde nach Pearson berechnet.

Es ergab sich nur für Orai3 eine signifikante negative Korrelation von $r = -0,313$ ($p \leq 0,05$). Nach Cohen entspricht dies einem mittleren Effekt. STIM1 und STIM2 zeigten eine schwach positive Korrelation. (STIM1 $r=0,18$, STIM2 $r=0,16$). Für Orai 1 ($r = -0,03$, $p = 0,8$) sowie Orai2 ($r=0,09$, $p=0,6$) zeigten sich keine Effekte. In der linearen Regressionsanalyse konnte auch nur für Orai3 ein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Pro Lebensjahr würde die Expression von Orai3 um 0,12 (korrigiertes $r^2 = 0,075$) Einheiten sinken. Die lineare Regressionsanalyse ist in diesem Fall deutlich dem bloßen Betrachten der Mittelwerte überlegen, da für Orai 3 im Fisher-Test ($F(1,39)=4,23$) die Nullhypothese mit $p \leq 0,05$ verworfen werden kann.

Es erfolgte eine Einteilung in eine AD und non-AD-Kohorte.

Es konnten vornehmlich in der Kontrollgruppe Effekte gesehen werden, die allerdings nicht signifikant waren. Für Orai1 ($r=0,28$), Orai2 ($r=0,24$) und Orai3 ($r=0,26$) zeigten sich nach Cohen schwache Effekte, für STIM1 eine mittlere ($r=0,36$) und für STIM2 eine schwache ($r=0,28$) Effektstärke. In der AD-Gruppe hingegen waren für STIM1 und STIM2 nur schwache, nicht signifikante Effekte sichtbar. (STIM1 $r=0,18$, STIM2 $r=0,15$). Für die übrigen Gene zeigte sich kein Effekt.

Um den Zusammenhang besser zu untersuchen wurde als nächstes eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die Alzheimererkrankung wurde als dichotome Variable und das Alter als intervallskalierte Variable betrachtet. Die Expression der Gene wurden als abhängige Variablen untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass in diesem Modell für die STIM- und Orai-Gene keine Signifikanz erreicht werden konnte. Allerdings bestätigte sich, dass vor allem die Variable Alzheimer einen Einfluss auf die Genexpression hat. Die Variable Alter war von geringerer Bedeutung.

6.5.3 Einfluss des Braak-Stadiums auf die Expression von Orai und STIM

Da bisher vor allem die Variable Alzheimer die Expression der STIM- und Orai-Gene zu beeinflussen scheint, ist es interessant zu wissen, ob das Alzheimer-Stadium dabei eine genauere Aussage ermöglicht. Der Braak-Status teilt die Alzheimererkrankung, je nach Ausbreitungs- und Fortschreitungsgrad von Pathologien im Gehirn, in sieben Gruppen ein. In der statistischen Auswertung erlaubte der Braak-Status eine Unterteilung der Kohorte in sieben Gruppen und wurde als ordinalskalierte, unabhängige Variable betrachtet. Die Berechnung der Korrelation erfolgte daher nach Spearman-Rho. Für alle Gene ergab sich eine positive Korrelation mit dem Braak-Status. Für Orai1 errechnete sich eine Korrelation von $r=0,426$ ($p \leq 0,01$), für Orai2 von $r=0,276$ ($p=0,08$), für Orai3 von $r=0,398$ ($P \leq 0,01$) sowie für STIM1 von $r=0,29$ ($p=0,06$) und STIM2 von $r=0,354$ ($p \leq 0,05$). Es wird also für Orai1, Orai3 und STIM2 von einem mittleren Effekt und für Orai2 und STIM1 von einem schwachen Effekt ausgegangen. Anschließend wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hier zeigte sich ein teilweiser linearer Effekt für Orai1 $F(1,38)=3,89$, $p \leq 0,05$. Das Modell erreicht für Orai1 eine mittlere Anpassungsgüte ($R=0,35$) und für Orai2 eine schwache Anpassungsgüte ($R=0,28$, $R^2 = 0,08$). Mit der Variable Braak-Status kann also für einige Gene die Expression vorausgesagt werden. So würde Orai1 um 0,15 Einheiten und Orai3 um 0,43 Einheiten pro Braak-Status ansteigen. Orai1 hat hierbei einen signifikanten Einfluss ($p \leq 0,05$). Für STIM1 und STIM2 besteht in diesem Modell keine signifikante lineare Korrelation. Dennoch ergeben sich nach Cohen schwache Hinweise, dass das Modell auch für STIM1 und STIM2 geeignet ist (STIM1 $R=0,2$, $R^2 = 0,02$, STIM2 $R=0,2$, $R^2 = 0,04$).

6.5.4 Einfluss von A β auf die Expression von Orai und STIM

Der Braak-Status ergibt sich aus pathologischen Kriterien. In der Autopsie können hierbei nur die sichtbaren Veränderungen beschrieben werden. Diese beruhen auf zellulären Veränderungen wie der Ablagerung von A β und Tau. In den vorliegenden Proben wurde der Gehalt A β 40 und A β 42 pro Milligramm Protein bestimmt. Bei der Auswertung des A β -Gehalts zeigte sich, dass die Daten nicht normalverteilt sind und Ausreißer vorhanden sind. Da die Korrelationsberechnung sehr sensibel auf Ausreißer reagiert, wurde obwohl metrische Daten vorliegen, der robustere, nicht parametrische Spearman's-Rho-Test zur Korrelationsanalyse verwendet.

Es besteht eine starke Korrelation zwischen dem Braak-Status und dem A β -Gehalt der Proben, für A β 40 von $r=0,55$ ($p \leq 0,001$) und für A β 42 von $r=0,41$ ($p \leq 0,001$). Der

Braak-Status wurde anschließend noch gruppenweise betrachtet, wodurch die Korrelation noch eindeutiger wurde. Hierbei galt für A β 40 $r=0,76$ ($p \leq 0,001$) und für A β 42 $r=0,62$ ($p \leq 0,001$). A β 40 und A β 42 ließen sich auch als gemeinsamen Einflussfaktor betrachten. Hierzu wurde die Summe aus beiden gebildet und wiederum die Korrelation bestimmt. Für die einzelnen Braak-Stadien betrug die Korrelation nun $r=0,56$ ($p \leq 0,001$) und in der gruppenweisen Betrachtung $r=0,76$ ($p \leq 0,001$).

Es wurde sowohl für jede A β -Form einzeln, als auch für die Summe sowie für den Quotient aus beiden untersucht, ob eine Korrelation mit der Expression von STIM und Orai besteht.

In der Gesamtgruppe konnten hierbei vor allem Effekte beobachtet werden, wenn die Summe aus A β 40 und A β 42 pro Milligramm Protein betrachtet wurde. Für Orai1 zeigte sich nach Cohen ein starker Effekt ($r=0,54$, $p \leq 0,01$). Für Orai2 bestand keine Korrelation. Eine mittlere Korrelation zeigte sich für Orai 3 ($r=0,33$, $p \leq 0,05$). Die Expression von STIM1 zeigte ebenfalls eine mittlere Korrelation ($r=0,277$, $p=0,08$). Signifikant war hier jedoch nur die Korrelation mit A β 40 ($r=0,35$, $p \leq 0,05$) und nicht mit der Summe von A β . Die Expression von STIM2 hingegen erreichte eine Korrelation von $r=0,387$, $p \leq 0,05$, was einer mittleren Effektstärke entspricht.

In der anschließend durchgeführten linearen Regression zeigte sich, dass kein lineares Modell angenommen werden kann. Es wurden weder die Kriterien an die Anpassungsgüte erfüllt, noch konnte gezeigt werden, dass die Variable Summe von A β signifikanten Einfluss auf die Expression von Orai und STIM hatte.

6.6 Expression von FMR1 und FMR2 in Alzheimer-Modellzelllinien

FMRP ist ein RNS-bindendes Protein und vor allem in den neuronalen Dendriten aktiv. Da es sich auf die neuronale Plastizität auswirkt, wurde untersucht wie sich die Expression von FMR1 und FMR2 in verschiedenen Alzheimer-Modellzelllinien verhält.

In den MEF APP/APLP2 $-/-$ war die Expression von FMR2 um mehr als den Faktor 20 erhöht (Abbildung 12). Es wurde eine Steigerung im Vergleich zur Kontrollzelllinie MEF WT (Wildtyp) auf 2240,67 % ($\pm 507,02$, $p \leq 0,001$) beobachtet. Bei FMR1 hingegen ist kein solcher Anstieg zu verzeichnen. Im Gegensatz, die Expression von FMR1 sank auf 79,68 % ($\pm 55,3$, $p \leq 0,05$). Bei den MEF APP Δ CT15 Zellen, Zellen mit der Expression eines verkürzten APPs war die Expression von FMR2 ebenfalls stark gesteigert. Es wurde eine signifikante Erhöhung auf 3249,93 % ($\pm 690,15$, $p \leq 0,01$) beobachtet. Bei der Expression von FMR1 war eine nicht signifikante Steigerung auf 116,61 % ($\pm 18,37$, $p = 0,051$) auszumachen.

Zusammenfassend lässt sich, wie auch in Abbildung 12 dargestellt, eine starke Erhöhung um mehr als den Faktor 20 der Expression von FMR2 in Gegensatz zu FMR1 in Zellen mit verkürztem oder fehlendem APP beobachten.

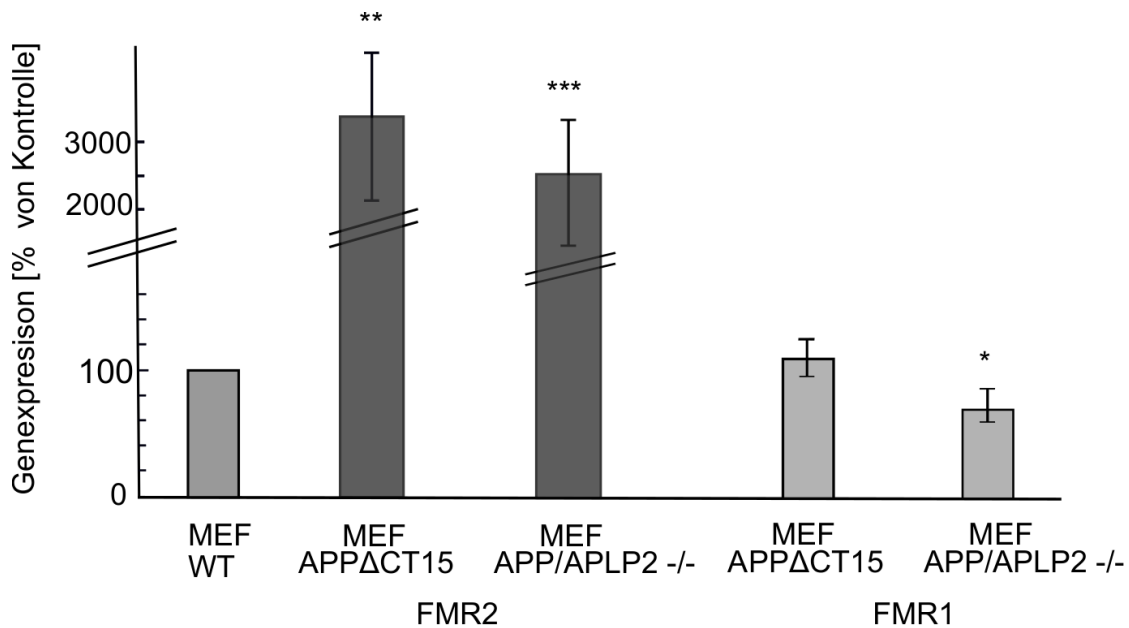


Abbildung 12: Genexpression von FMR2 und FMR1 in MEF APP/APLP2 -/- und MEF APP Δ CT15 Zellen

Quantitative Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR von FMR1 und FMR2 in MEF APP/APLP2 -/- und MEF APP Δ CT15. MEF WT diente als Kontrollzelllinie. Je n=6 in zwei unabhängigen Messungen. Alle Angaben sind normiert auf MEF WT und prozentual angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test zur Signifikanzberechnung genutzt.

(WT=Wildtyp, n=Anzahl der Proben, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.)

Um diese starke Erhöhung der Expression genauer zu beschreiben, war es nun wichtig zu wissen, ob diese auf das Fehlen von APP oder APLP2 zurückzuführen ist. Dazu wurde das Experiment mit MEF APP- und MEF APLP2- wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Es zeigte sich ein Anstieg von FMR2 auf 257,67 % ($\pm 26,21$, $p \leq 0,001$) in den MEF APP- Zellen. Ein niedrigerer Anstieg auf 118,95 % ($\pm 57,83$, $p \leq 0,05$) war in der Expression von FMR1 zu beobachten.

Bei den APLP2 Knockout-Zellen war die Expression von FMR2 ebenfalls erhöht auf 452,08 % ($\pm 174,82$, $p \leq 0,01$). Die Expression von FMR1 betrug 183,71 % ($\pm 119,6$, $p \leq 0,001$).

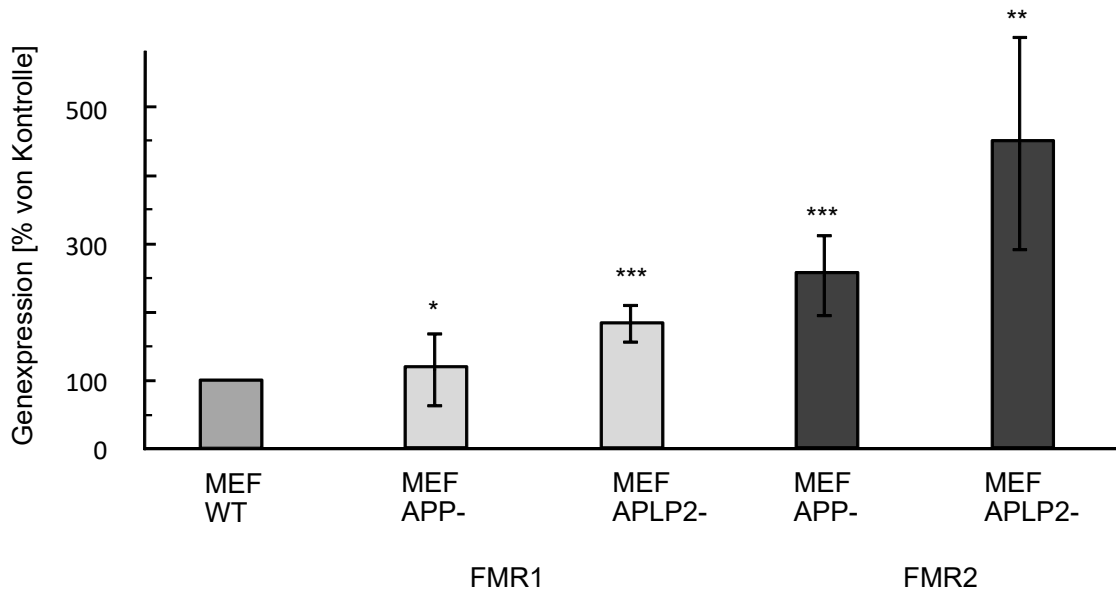


Abbildung 13: Genexpression von FMR1 und FMR2 in MEF APP- und MEF APLP2-Zellen

Quantitative Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR von FMR1 und FMR2 in APP- und APLP2- Zellen (n=6). MEF WT diente als Kontrollzelllinie (n=6). Alle Angaben sind normiert auf MEF WT und prozentual angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Für FMR1 wurde in den APP-Zellen bei fehlender Normalverteilung der Mann-Whitney-U Test verwendet. Für alle anderen Gene wurde bei gegebener Normalverteilung der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test zur Signifikanzberechnung verwendet.

(WT=Wildtyp, n=Anzahl der Proben, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Im nächsten Schritt wurden die MEF APP/APLP2 -/- Zellen mit AICD retransfiziert. In der qRT-PCR wurden die beiden Zelllinien einander gegenübergestellt. Hier zeigte sich, dass die Retransfektion von AICD einen Einfluss auf die Expression von FMR ausübt. Die Genexpression von FMR2 hat sich wieder an das Vorniveau abgesenkt. Die Expression von FMR2 betrug 98,99 % ($\pm 22,25$, $p = 0,92$) der Expression in den Kontrollzellen. Beim FMR-Gen war die Expression auf 70,56 % ($\pm 7,18$, $p \leq 0,001$) verringert.

Die SH-SY5Y-Zelllinie ist eine humane Neuroblastom-Zelllinie. Als SH-SY5Y α -CTF oder C83 wird eine Zelllinie mit der stabilen Expression der letzten 83 c-terminalen Aminosäuren von humanem APP₆₉₅ bezeichnet. Analog dazu exprimieren SH-SY5Y β -CTF oder C99 die letzten 99 c-terminalen Aminosäuren von APP₆₉₅. Es sollte untersucht werden, wie sich die Expression von FMR1 und FMR2 in einer humanen Zelllinie

verhält. Bei der stabilen Expression der letzten 83 beziehungsweise 99 Aminosäuren von APP₆₉₅ wird AICD überexprimiert. Wie in Abbildung 14 gezeigt, war in den SH-SY5Y α -CTF-Zellen die Expression von FMR1 und FMR2 nicht signifikant verändert. Die Expression von FMR1 war auf 120,2 % ($\pm 21,5$, $p = 0,12$) erhöht und die Expression von FMR2 auf 116,62 % ($\pm 19,43$, $p = 0,14$). Bei den SH-SY5Y β -CTF-Zellen war die Expression von FMR2 auf 166,63 % ($\pm 37,88$, $p \leq 0,05$) gesteigert. FMR1 war kaum verändert und die Expression betrug 93,51 % ($\pm 23,22$, $p = 0,6$).

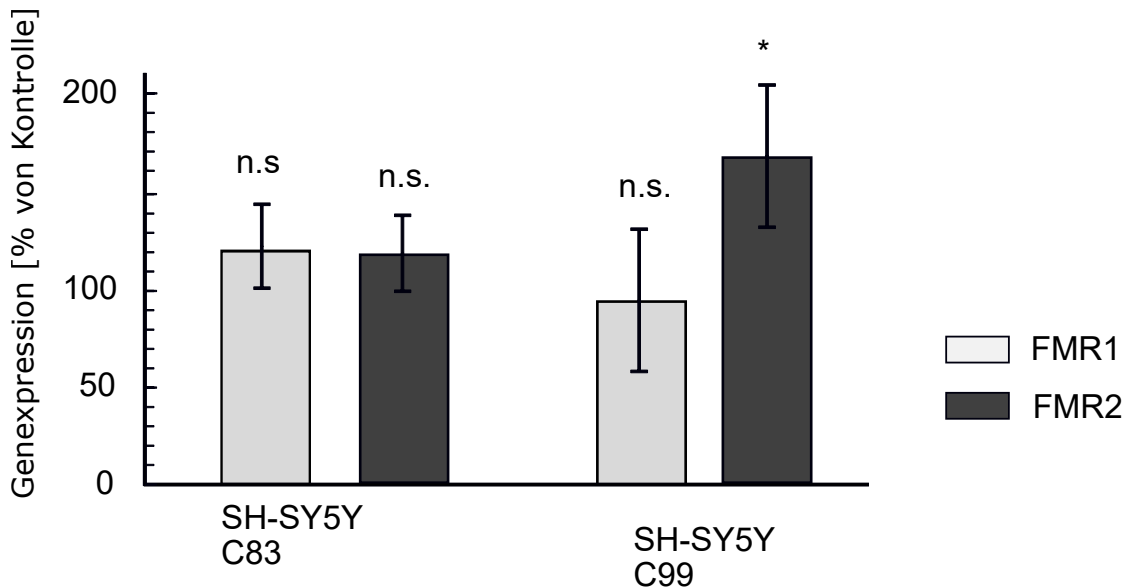


Abbildung 14: Genexpression von FMR1 und FMR2 in SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Expression der letzten 83 bzw. 99 Aminosäuren

Quantitative Bestimmung der Genexpression von FMR1 und FMR2 in SH-SY5Y-Zellen mittels qRT-PCR. SH-SY5Y WT diente als Kontrollzelllinie. Je $n=6$. Alle Angaben sind auf SH-SY5Y WT normiert und prozentual angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung. Bei gegebener Normalverteilung wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's t-Test zur Signifikanzberechnung genutzt.

(WT=Wildtyp, n = Anzahl der Proben, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s.=nicht signifikant.)

7 Diskussion

7.1 Einfluss der Calciumhomöostase auf die Alzheimerkrankheit

1993 wurden von Barger *et al.* schon vermutet, dass die toxische Wirkung von A β auf die Neuronen durch die Destabilisierung der Calciumhomöostase verursacht wird (Barger u. a. 1993). Tatsächlich zeigte sich in letzter Zeit, dass die Calcium-Hypothese, in Anlehnung an die Amyloid-Hypothese von Glenner und Wong von 1984 (Glenner und Wong 1984), im Verständnis der zellulären Signalwege bei Alzheimer eine zentrale Rolle spielt. Vielmehr noch scheint es einen engen Zusammenhang zwischen der Amyloidkaskade und der veränderten Calciumkonzentration zu geben. In Abbildung 15 wird der Zusammenhang der Calciumdysregulation und der Alzheimerkrankheit schematisch dargestellt.

Sowohl bei der familiären Form, mit unter anderem Mutationen im Presenilin-Gen, wie auch der sporadischen Alzheimerkrankheit stehen die beeinträchtigte APP-Prozessierung und die veränderte Calciumhomöostase im Zentrum und beeinflussen sich gegenseitig. Bei FAD ist häufig das mutierte Presenilin das Bindeglied zwischen APP-Prozessierung und Calciumdysregulation. Viele der nachstehend zitierten Studien beruhen auf *in-vitro*-Experimenten mit Zellmodellen, in welchen eine mutierte Form des Presenilin exprimiert wurde. Die zitierten Studien weisen darauf hin, dass Mutationen im Presenilin-Gen im Zusammenhang mit einer IP₃-induzierten Calciumüberladung stehen.

Bei der sporadischen Form der Alzheimerkrankheit führen die mit dem Alter einhergehende Veränderungen biochemischer Prozesse zur stressinduzierten Dysregulation des Calciumhaushaltes. Neuronale Prozesse werden durch fein austarierte Mechanismen über Calcium gesteuert. Dysregulationen im Calciumhaushalt der Mitochondrien und des ERs der Neuronen können die neuronale Funktion beeinträchtigen (Supnet und Bezprozvanny 2010).

Im ER wird das meiste intrazelluläre Calcium gespeichert. Die schnelle Freisetzung der Calciumionen aus dem ER erfolgt über IP₃-Rezeptoren. Dies sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit IP₃ als sekundärem Botenstoff. Im Gehirn finden sich zusätzlich auch Ryanodin-Rezeptoren (RyR) in verschiedenen Isoformen, die ebenfalls an der Calciumfreisetzung aus dem ER beteiligt sind. Die Veränderung des Calciumhaushalts beginnt in einem sehr frühen, noch nicht symptomatischen Stadium von Alzheimer (Etcheberri-

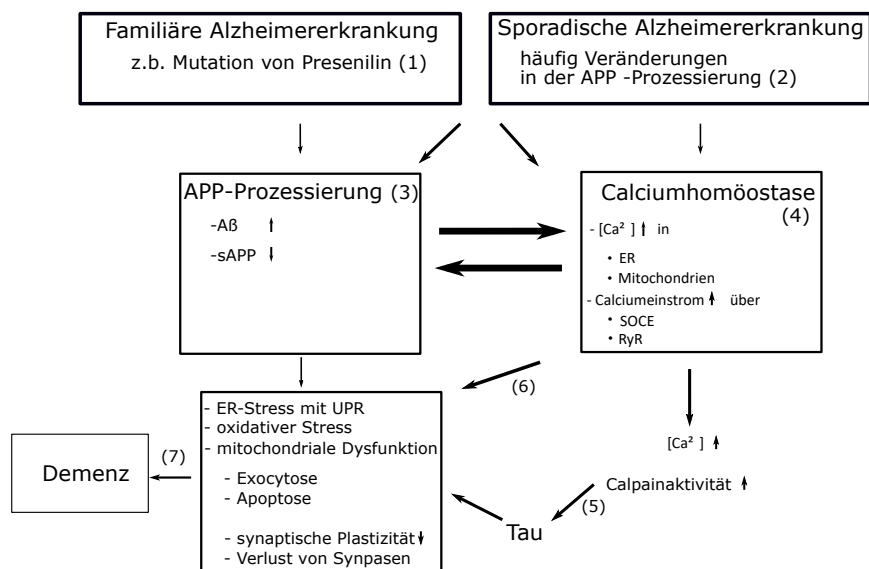


Abbildung 15: Schema Calciumdysregulation und Alzheimerkrankheit

Das Schema zeigt die neuropathologischen Veränderungen bei der Alzheimererkrankung und den möglichen Zusammenhang mit der Calciumhomöostase. Dargestellt sind mögliche Mechanismen, wie die veränderte Calciumhomöostase zu Apoptose und damit einhergehender Demenz führen kann.

(Schema abgeändert nach LaFerla 2002, zusätzliche Quellenangaben ua. (1) R. F. Clark u. a. 1995; Honarnejad und Herms 2012 (2) Haass u. a. 1993 (3) De Strooper, Saftig u. a. 1998; Mattson, Mark u. a. 1997 (4) Honarnejad und Herms 2012 (5) Mattson 1990 (6) Popugaeva und Bezprozvanny 2013 Workgroup und Khachaturian 2017 (7) DeKosky und Scheff 1990)

garay u. a. 1998) und auch, bevor extrazelluläre A β -Pathologien gefunden werden (Larson u. a. 1999; Leissring u. a. 2000). Es werden mehr IP $_3$ - und Ryanodin-Rezeptoren exprimiert, sodass es bei deren Aktivierung zur stärkeren Freisetzung von Calcium kommt (Mattson, LaFerla u. a. 2000). Der Calciumausstrom via IP $_3$ -Rezeptoren und Ryanodin-Rezeptoren ist erheblich gesteigert (Chan u. a. 2000, LaFerla 2002). Zusätzlich reagieren die einzelnen IP $_3$ -Rezeptoren auch sensitiver auf IP $_3$ (Cheung u. a. 2008). Diese frühe Hochregulierung der Ryanodin-Rezeptoren, vor allem in Neuronen des Kortex und Hippocampus, führt zur fehlerhaften calciuminduzierten Calciumfreisetzung, was wiederum die NMDA-Rezeptoraktivierung beeinträchtigt (Goussakov u. a. 2010).

SERCAs halten die niedrige zytoplasmatische Calciumkonzentration aufrecht, indem sie ATP-abhängig Calciumionen ins ER pumpen. Es wird vermutet, dass die SERCA-Aktivität bei der Alzheimererkrankung verringert ist. Bei Zellenmodellen mit mutiertem Presenilin war, wie oben beschrieben, der Calciumausstrom über Ryanodin- und IP $_3$ -Rezeptoren erhöht und zusätzlich auch die Calciumaufnahme ins ER über SERCA stark verringert (Brunello u. a. 2009).

SOCE stellt das zentrale Bindeglied zwischen Calciumausstrom aus dem ER und Calciumeinstrom über die Membran dar. STIM als Calciumsensor im ER interagiert mit Orai an der Plasmamembran, was zum speichergesteuerten Calciumeinstrom (SOCE) führt. Neben Orai interagiert STIM noch mit weiteren Calciumkanälen an der Plasmamembran und reguliert teilweise deren Aktivität. Hierzu gehören L-Typ Calciumkanäle (Cav1.2), spannungsgesteuerte Kanäle (Dittmer u. a. 2017) und metabotrope Glutamat-rezeptoren (mGluR) (Hartmann u. a. 2014).

Eine weiterer schneller Regulationsmechanismus der Neuronen ist die Aufnahme von Calciumionen in Mitochondrien. Mitochondrien können als bewegliche Puffersysteme lokal an Stellen mit hoher zytosolischer Calciumkonzentration agieren. Die Aufnahme der Calciumionen erfolgt über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU). Bei der Alzheimererkrankung kommt es zur Überladung der Mitochondrien mit Calcium, was dann zu neuronaler Dysfunktion und Zelltod führt (Esteras und Abramov 2020).

Zunehmend wird auch über die gegenseitige Einflussnahme von A β und anderen APP-Prozessierungsprodukten und die Regulation des Calciumgleichgewichts berichtet. A β führt direkt zu einem höheren Calciuminflux durch Modulation von spannungsabhängigen Calciumkanälen (*engl. voltage-gated calcium channel, VGCC*), nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR), ionotropen Glutamatrezeptoren (NMDAR), AMPA-Rezeptoren, *calcium homeostasis modulator 1* und den speichergesteuerten Calciumkanä-

len (Crac) (Alberdi u. a. 2010; Z. Ma u. a. 2012; Texidó u. a. 2011; Thibault u. a. 2012; Zeiger u. a. 2013). A β bindet an eine Unterform des nACh-Rezeptor. Dies führt zu einem verstärkten Calciumeinstrom und zur Endozytose des Rezeptors. Außerdem werden Ryanodin-Rezeptoren aktiviert, was die Calciumüberladung noch potenziert (Wang u. a. 2000). Häufig wird auch diskutiert, ob A β selber als ein calciumpermabler Kanal, den Amyloidkanal, fungiert (Arispe u. a. 1993). Zumindest das kurze Amyloidfragment A β_{25-30} erhöht die Permeabilität der Membran für Calcium (Zaretsky und Zaretskaia 2020). *In vivo* wurde bei transgenen Alzheimermausmodellen ebenfalls eine erhöhte Calciumkonzentration in ruhenden Zellen in der direkten Nähe zu A β -Plaques gezeigt (Kuchibhotla u. a. 2008).

Die toxische Wirkung von A β führt an den Mitochondrien zur Behinderung der MCU. Durch die Bindung an Cyclophilin D steigert A β die Ausbildung von *mitochondrial permeability transition pores* und beeinträchtigt den mitochondrialen Calciumfluss (Esteras und Abramov 2020).

Durch die gesteigerte Prozessierung von APP im amyloidogenen Weg bei Alzheimer reduziert sich die Menge an sAPP α , dem eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird (Mattson, Mark u. a. 1997). sAPP α kann über den PI3K/Akt-Signalweg in den mitochondrialen Stoffwechsel eingreifen und möglicherweise die Apoptoseinduktion beeinflussen (Lopez Sanchez u. a. 2019). Ebenso ist es an der synaptischen Plastizität beteiligt (Ring u. a. 2007). Über Hemmung von VGCC und Dephosphorylierung von NMDA-Rezeptoren kann sAPP α zur Reduktion des Calciumeinstroms beitragen (Furukawa u. a. 1996).

Die Calciumdysregulation hat weitreichende Folgen für die einzelnen Neurone sowie ihr Zusammenspiel bei der Gedächtnisbildung. In *post mortem* Gehirnproben von Alzheimerpatienten wurden eine Abnahme der Synapsendichte und -zahl beschrieben (DeKosky und Scheff 1990). In Synapsen kommen die meisten der oben genannten Calciumkanäle vor. Vor allem NMDA-Rezeptoren sind an der synaptischen Plastizität beteiligt. Durch calciuminduzierte Calciumfreisetzung über die RyR mit Ausbildung postsynaptischer AMPA-Rezeptoren kommt es zur synaptischen Langzeitpotenzierung. Auch metabotrope Glutmatarezeptoren werden über postsynaptischen Calciumeinstrom via IP $_3$ und RyR getriggert und führen zu *long-term-depression*. Bei Alzheimer kommt es zur vermehrten Calciumfreisetzung aus dem ER in den Dendriten mit Hypererregbarkeit, was dann mit Verlust von dendritischen Spines, verminderter synaptischer Übertragung und Synapsenverlust einhergeht (Goussakov u. a. 2010; H. Zhang, Sun u. a. 2016). Die Apoptose der Zellen wird durch die zusätzliche mitochondriale Beeinträchti-

gung verstärkt induziert. In den Mitochondrien entstehen während des Elektronentransports Sauerstoffradikale (Hyperoxid-Anionen, O_2^-). Über die Superoxiddismutase und die Calcium/Calmodulin stimulierte Stickoxidsynthase entsteht H_2O_2 und in Abhängigkeit von O_2 , Fe^{2+} , Cu^+ und NO , freie Hydroxylradikale ($OH\cdot$). Die Radikale verursachen eine Lipidperoxidation, eine Schlüsselreaktion der Apoptoseinduktion. Die entstehenden Produkte schädigen den ATP-abhängigen Ionentransport, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Glukose- und Glutamatrezeptoren, dadurch wird die Ionen- und vornehmlich die Calciumhomöostase drastisch gestört. Durch die irreversiblen Schäden kommt es zur Apoptose und Zelldegeneration. Physiologisch kommt es durch die Aktivierung von Glutamatrezeptoren zum Calciumeinstrom mit folgender erhöhter Calciumkonzentrationen, diese führt zum Anstieg der NO-Produktion, womit die Langzeitpotenzierung moduliert wird. Bei Übererregung, mit zu hohen Calciumkonzentrationen, kommt es pathologisch allerdings zur eingeleiteten Apoptose. Durch die Oligomerisierung von $A\beta$ entstehen ebenfalls freie Hydroxylradikale und verursachen gleichzeitig eine Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren. Ebenfalls werden vermehrt mPTPs (*engl. mitochondrial permeability transition pore*) ausgebildet über die apoptoseinduzierende Faktoren ins Zytosol diffundieren (Mattson, Mark u. a. 1997).

Durch Hyperphosphorylierung von Tau, ebenfalls durch die Calciumdysregulation verstärkt, kommt es zu unkontrollierter Aggregation und Ausbildung von Neurofibrillären Tangles (NFT), die sich neben $A\beta$ bei der Alzheimererkrankung im Gehirn ablagern (Mattson 1990). Der Anstieg von intrazellulärem Calcium trägt zur Überaktivierung von Calpain bei, was letztendlich zur neuronalen Degeneration führt. Calpain (*engl. calcium-dependent protease with papain-like activity*) inaktiviert und zerstört bei abnorm hohen Calciumspiegel zelluläre Strukturen, synaptische Proteine, Transkriptionsfaktoren und andere Regulationsproteine (Ferreira 2012). Eine Aktivitätssteigerung von Calpain wurde bei Alzheimerpatienten im präfrontalen Kortex nachgewiesen (Saito u. a. 1993). Calcineurin A und cAMP-abhängige Proteinkinase A sind zwei durch Calpain modulierte Proteine. Beide sind über weitere regulierende Mechanismen an der Gedächtnisbildung beteiligt. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A moduliert über CREB (*engl. cAMP response element binding protein*), Gene, die für Proteine codieren, die bei der Umwandlung von Kurzzeitgedächtnis in Langzeitgedächtnis benötigt werden. Die autoinhibitorische Domäne von Calcineurin A wird von Caspain gespalten, sodass eine höhere Aktivität von Calcineurin A bei Alzheimer-Hirnproben beschrieben wird (F. Liu, Grundke-Iqbal u. a. 2005). Calcineurin A induziert über PP1 (*engl. protein phosphatase*) Langzeitdepressionen. Zusätzlich aktiviert es den Transkriptionsfaktor NFAT (*engl. nuclear*

factor of activated T-cells). Calpain schneidet auch IP₃-Rezeptoren und aktiviert diese damit dauerhaft, was die Calciumdysregulation bei Alzheimerpatienten weiter verstärkt (Kopil u. a. 2011). Calpain ist ebenfalls an der Hyperphosphorylierung von Tau beteiligt (Amadoro u. a. 2006). Die extrazellulär-signalregulierte Kinase 1/2 (ERK1/2) und GSK-3 β (engl. *glycogen synthase kinase 3*) werden ebenfalls von Calpain reguliert. Beide sorgen durch die Hyperphosphorylierung von Tau für die Ausbildung von NFT.

Die pathologische Wirkung von Calpain wird gestützt, durch die Beobachtung einer Abnahme von Calpastatin, einem Inhibitor von Calpain, bei Alzheimerpatienten (Rao u. a. 2008). Dieser Zusammenhang wird durch Rescue-Experimente mit Alzheimer-Mausmodellen gestützt, in denen die Überexpression von Calpastatin mit einem Rückgang der Calpain-Aktivität und der Tauphosphorylierung einherging (Liang u. a. 2010; Morales-Corraliza u. a. 2012). Zusätzlich dazu konnte nachgewiesen werden, dass ein synthetischer Calpain-Inhibitor in genmodifizierten APP/PS1-Mäusen das räumliche Gedächtnis und die synaptische Plastizität verbessert (Trinchese u. a. 2008). Bei normaler Funktionsweise soll Calpain durch α -Sekretaseaktivität eine alzheimerprotektive Funktion besitzen (Siman u. a. 1990).

A β und Tau sind beides missgefaltete Peptide, die Zellstress verursachen. Vor allem bei metabolischem Stress werden solche missgefalteten Peptide und Proteine über Autophagie lysosomal degradiert. Dies ist für das Überleben von Neuronen unerlässlich. Bei Alzheimerpatienten werden akkumulierte Vakuolen in geschwollenen und missgebildeten Neuronen gefunden, welche auf eine Störung in der Autophagie zurückgehen. Es scheint, dass vor allem die v-ATPase (engl. *vacuolar-type ATPase*) der Lysosomen bei der Alzheimererkrankung in ihrer Funktion beeinträchtigt ist. Sie sorgt über H⁺-Import für den sauren lysosomalen pH-Wert. Bei Hemmung der v-ATPase steigt der lysosomale pH-Wert an und es wird der lysosomale TRPML1-Kanal aktiviert, über den Calciumionen ins Zytosol fließen und die zytosolische Calciumkonzentration erhöhen (Christensen u. a. 2002; J.-H. Lee u. a. 2015). Der Funktionsverlust der v-ATPase erhöht die Anfälligkeit der Neuronen für A β - und Taupathologien, jedoch nur im Zusammenhang mit Zellalterung und Zellstress. Im Mausmodell kam es zum vermehrten Auftreten von autophagischen Vakuolen mit Neurodegeneration und kognitiven Beeinträchtigungen (Dubos u. a. 2015; W. R. Williamson u. a. 2010).

Das ER ist an der Synthese, Faltung und Reifung von Proteinen beteiligt. Dies wird über komplexe Mechanismen reguliert. Eine Veränderung, wie beispielsweise dysregulierte Calciumkonzentration im ER, führen zur Akkumulation von un- oder missgefalteten Proteinen. Dieser ER-Stress löst die *unfolded protein reaction* (UPR, ungefaltete Proteinreaktion) aus. Die UPR ist ein Anpassungsmechanismus der Zelle. Bei irrever-

siblem oder chronischem Stress wird der Zelltod durch Apoptose ausgelöst um die geschädigten Zellen zu eliminieren. Bei postmortalen Hirnproben von Alzheimerpatienten wurden verschiedenen Manifestationen von ER-Stress beschrieben, die Victor Cornejo und Claudio Hetz in ihrem Review auflisten (Cornejo und Hetz 2013). Hierzu gehören beispielsweise erhöhte Phosphorylierung von PERK und eIF2 α , alternative Spleißvarianten von XBP1 oder Hochregulation von CHOP, alles Komponenten des Signalweges der UPR. Die neurotoxische Wirkung von A β könnte auch im Zusammenhang mit ER-Stress stehen. Bei Zellen mit mutiertem Presenilin führt die Calciumfreisetzung aus dem ER zu einer erhöhtem Empfindlichkeit der Zellen gegenüber ER-stressvermittelter Apoptose (Mattson, Guo u. a. 1998).

7.2 Unterschiede in der Funktion von STIM1 und STIM2

STIM und Orai nehmen eine wichtige Funktion bei der Regulation des Calciumhaushalts ein. In dieser Arbeit wurde folglich untersucht, ob und inwiefern diese an SOCE beteiligten Proteine bei der Alzheimererkrankung verändert sind.

STIM1 und STIM2 sind als Calciumsensoren beteiligt, die Orai-Proteine bilden nach Aktivierung durch STIM den Crac-Kanal. Um zu überprüfen, ob STIM über die Calciumregulation Einfluss auf die APP-Prozessierung nimmt, wurden ein STIM-Knockout durchgeführt. In dieser Arbeit wurde erfolgreich mittels CRISPR/cas9 ein Zellmodell etabliert. Es erfolgte die Messung des Calciumeinstroms mittels Calcium-Imaging in vier Zellreihen. Der Knockout wurde funktionell überprüft und bestätigt. Es zeigte sich, dass in den SH-SY5Y S1/S2 -/- der Doppelknockout von STIM erfolgreich war, da kaum noch ein Calciumstrom messbar war. Es bestätigt sich die Annahme, dass STIM als Aktivator von SOCE benötigt wird. Einen Unterschied beim Calciumeinstrom zeigte sich bei den SHSY5Y S1 -/- Zellen gegenüber den SH-SY5Y S2 -/- Zellen. Der Knockout von STIM1 führte nur zu einer Verringerung des Calciumeinstroms, wohingegen der Knockout von STIM2 zu einer kompletten Reduktion führte. Es lässt sich hier die Hypothese aufstellen, dass hauptsächlich STIM2 an der Kopplung mit Orai beteiligt ist.

Die unterschiedlichen Rollen von STIM1 und STIM2 in Neuronen sind noch nicht vollständig verstanden. STIM2 wurde als Variante von STIM1 in Wirbeltieren entdeckt. Es kommt wie STIM1 ubiquitär vor. In Neuronen überwiegt die Expression von STIM2 gegenüber STIM1 (Williams u. a. 2001). Gleichzeitig muss hier aber auch nochmal genauer unterschieden werden. So scheint STIM2 vor allem in Zellen des Hippocampus und des Cortex das dominante STIM-Protein zu sein (Sun u. a. 2014, Uhlen 2015). Kushni-

reva *et al.* beschreiben eine Verteilung von STIM1 und STIM2 in neuronalen Zellen in Abhängigkeit des Alters der Zellkultur. So ist STIM2 in älteren Neuronen der dominante Typ, während STIM1 vor allem in jüngeren Zellen vorzukommen scheint. (Kushnireva u. a. 2020). Innerhalb der Neuronen wird STIM2 vor allem in den dendritischen Spines beschrieben, STIM1 hingegen im Soma (Korkotian, Oni-Biton u. a. 2017, Sun u. a. 2014).

In seiner Arbeitsgruppe konnte Berna-Erro ebenfalls eine Reduktion des Calciumeinstroms in neuronalen STIM2 *-/-* Maus-Zellen, bei gleichbleibendem Calciumeinstrom in STIM1-defizienten neuronalen Zellen zeigen. Zur Inhibition der SERCA-Pumpe verwendete die Arbeitsgruppe CPA (*engl. cyclopiazonic acid*). CPA bindet an der gleichen Stelle wie das in dieser Arbeit verwendete Thapsigargin und inhibiert die SERCA-Pumpe irreversibel. Damit erreichte die Arbeitsgruppe eine Reduktion des Calciuminflux im STIM-Knockout auf 32,93 % im Vergleich zu den Kontrollzellen (Berna-Erro u. a. 2009). Ling Ong *et al.* beobachteten in HEK STIM2 *-/-* Zellen ebenfalls eine Reduktion des Calciumeinstroms (Ong u. a. 2015). Unklar bleibt, warum in Neuronen eher STIM2 als STIM1 für die Regulation des Calciumeinstroms genutzt wird. Während in den meisten nicht-erregbaren Zellen SOCE zum schnellen Wiederauffüllen des Calciumspeichers genutzt wird, könnte die Funktion in Neuronen eine andere sein und daher anders reguliert sein (Parekh und Putney Jr 2005). Möglicherweise ist in Neuronen ein stetiger Calciumeinstrom geeigneter für die Regulation der Synapsenausbildung. Hierbei könnte die unterschiedlich starke Sensitivität der beiden STIM-Proteine gegenüber Calcium eine Rolle spielen. STIM1 und STIM2 haben zwar ähnliche Bindungsaffinitäten zu Calcium, jedoch liegt STIM2 durch kleine Konformationsänderungen im Aufbau in einer stabileren Form vor. Es häufen sich die Überlegungen, dass STIM2 vor allem für den basalen Calciumeinstrom die entscheidende Funktion inne hat. So führt eine Überexpression von STIM2 zur starken Erhöhung des basalen Calcium und ein Knockdown von STIM2 zu einer Reduzierung. Schon kleine Veränderungen der Calciumkonzentration im ER, die noch nicht zur Aktivierung von SOCE ausreichen, führen zu Translokation von STIM2 zu den ER-PM-junctions (Brandman u. a. 2007). Bekannt ist, dass bei niedriger Calciumkonzentration vermehrt STIM2-Orai-Komplexe vorliegen und STIM2 eher bei niedrigen Calciumspiegeln im ER aktiviert wird. (Gruszczynska-Biegala und Kuznicki 2013)

7.3 Einfluss der STIM-Proteine auf α -, β - und γ -Sekretasen

Die dysregulierte Calciumhomöostase wird immer häufiger in Verbindung mit der Pathogenese der Alzheimerkrankheit gebracht. Belege gibt es für die Interaktion von APP-Prozessierungsprodukten und denen an SOCE beteiligten Komponenten. In dieser Arbeit sollte der reverse Mechanismus, also der Einfluss von SOCE auf die APP-Prozessierung genauer betrachtet werden.

7.3.1 Einfluss von STIM-Proteinen auf die α -Sekretase

Durch den Schnitt der α -Sekretase wird der nicht-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung eingeleitet. ADAM10 und ADAM17, als die beiden wichtigsten Vertreter der α -Sekretase schneiden im extramembranären Bereich von APP, sodass dann durch die weitere Prozessierung sAPP α entsteht.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine qRT-PCR durchgeführt um Veränderungen auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Hierbei zeigte sich im Vergleich der SH-SY5Y S1/2 $-/-$ zu den Kontrollzellen kein Unterschied.

Die ADAMs werden durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert. Die meisten greifen in die Regulation der Sekretasenaktivität ein, wie die Dynamin-abhängige Endozytose von ausgereiften ADAM10 an der Zelloberfläche oder der PKC-Signalweg (Proteinkinase C) (Carey u. a. 2011, Alkon u. a. 2007). Auf der Transkriptionsebene sind ebenfalls verschiedene Stoffe bekannt, die die Transkription von ADAM10 und/oder ADAM17 beeinflussen. Untersucht sind fast nur Stoffe, die zu einer Erhöhung der Genexpression führen. Das bekannteste ist Retinalsäure und deren Derivate wie All-trans-Retinsäure oder Acitretin (Vincent 2016). In der Literatur findet sich jedoch kein Hinweis, dass die Regulation von ADAM auf Transkriptionsebene direkt über Calcium gesteuert sein könnte. Gleichzeitig lässt sich nicht ausschließen, dass in den anderen Signalwegen Calcium als Botenstoff eine wichtige Rolle spielt. Bei den STIM-Knockout-Zellen ließ sich ein beeinträchtigter Calciumstrom über SOCE beobachten. Durch die verwendete Lösungen waren aber genug Calciumionen vorhanden, sodass sich nicht überprüfen ließ, ob weitere calciumabhängige Signalwege beeinträchtigt waren. In ihrer Promotionsarbeit konnte O. Streidenberger einen verringerte Enzymaktivität der α -Sekretase in calciumfreiem Medium im Vergleich zu calciumreichem Medium sowohl in MEF WT als auch in MEF STIM1/2 $-/-$ zeigen. Dies macht deutlich, dass Calciumionen durchaus eine Rolle spielen könnten.

7.3.2 Einfluss von STIM-Proteinen auf die β -Sekretase

Die β -Sekretase wird auf Transkriptionsebene hauptsächlich von BACE1 codiert und ist ein Transmembranprotein. Wie auch die α -Sekretase schneidet es APP extramembranär. Durch diesen Schnitt wird jedoch der amyloidogene Weg der APP-Prozessierung eingeleitet. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Calciumregulation über STIM auf die Genexpression der β -Sekretase untersucht. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Zellreihen. Auch die Untersuchung von PNFs und von Lebendzellen ergab für beide Zellreihen gleichbleibende Sekretasenaktivität. Diese Ergebnisse decken sich mit den Arbeiten von O. Streidenberger aus der gleichen Arbeitsgruppe. In MEF S1/2 $-/-$ konnte im Vergleich zu MEF Wildtypzellen kein Unterschied in der Sekretaseaktivität gezeigt werden.

Da durch die β -Sekretase der amyloidogene Weg mit der Entstehung von $A\beta$ eingeleitet wird, gibt es viele Forschungsgruppen die sich mit der Beeinflussung der β -Sekretase beschäftigen, auch mit dem Ziel, mögliche Behandlungen gegen das Entstehen oder Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit zu entwickeln. Bei Alzheimerpatienten und in Mausmodellen von Alzheimer wird eine erhöhte BACE-Expression beschrieben (Fukumoto u. a. 2002). Die BACE-Expression scheint mit Zellstress wie Entzündungsreaktion und reaktiven Sauerstoffradikalen assoziiert (Tamagno u. a. 2002). Durch diese Mechanismen verstärkt sich auch die Calciumdysregulation. Nach der Behandlung von neuronalen Zellen mit Ionomycin wurde eine verstärkte Expression von BACE beschrieben. Ebenso nach Inkubation der Zellen mit $A\beta_{1-42}$. Möglicherweise folgt dies einem Signalweg mit der Regulation über den Transkriptionsfaktor NFAT (Cho u. a. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur der Effekt von STIM auf die Regulation von BACE untersucht. Durch den Knockout ist die Calciumregulation beeinträchtigt, jedoch noch nicht komplett gestört. Dies kann den Unterschied zwischen den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen und Ergebnisse in der Literatur erklären. Allerdings werden auch niedrige Calciumkonzentrationen mit erhöhter BACE-Aktivität in Verbindung gebracht (Hayley u. a. 2009). Jedoch muss auch festgestellt werden, dass trotz Identifizierung möglicher Angriffspunkte an BACE, sowohl translational auch als post-translational, alle klinischen Studien bisher erfolglos eingestellt wurden.

7.3.3 Einfluss von STIM-Proteinen auf die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist sowohl an der amyloidogenen als auch nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung beteiligt. Auch für die γ -Sekretase stellte sich die Frage, ob sie von der

Calciumregulation durch STIM beeinflusst wird. Es wurde folglich die Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt sowie eine Aktivitätsmessung durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass STIM einen Einfluss auf die γ -Sekretase zu haben scheint. Es zeigte sich eine gesteigerte Genexpression von Bestandteilen der γ -Sekretase, bei gleichzeitig gesunkener Aktivität. Die Steigerung der Genexpression einerseits und die verminderte Aktivität andererseits, könnten sich in der Gesamtbetrachtung die Waage halten. Es wurde folglich überprüft, ob eine Veränderung in der Genexpression von APP, einem Substrat der γ -Sekretase, zu ermitteln war. Hierbei wurde eine stark vermehrte Expression um fast 50 Prozent nachgewiesen. Dies würde dafür sprechen, dass die gesteigerte Genexpression von Bestandteilen der γ -Sekretase in der Summe überwiegt und es zu einem gesteigerten Umsatz von APP kommt. APP würde dann kompensatorisch vermehrt exprimiert werden. O. Streidenberger konnte in ihrer Arbeit zudem eine Erhöhung auch im Proteinlevel nachweisen. Zusätzlich wurde neben der erhöhten Genexpression von APP auch eine verminderte Genexpression von IDE gemessen. IDE ist eine Protease, die unter anderem das durch den γ -Sekretase-Schnitt aus APP entstehende A β , abbaut. Die Herunterregulation von IDE konnte von O. Streidenberger auch in MEF STIM 1/2 -/- gezeigt werden. Das Fehlen von STIM würde also über die Beeinflussung der γ -Sekretase zur vermehrten Expression von APP beitragen, was dann wiederum vermutlich zu einer gesteigerten APP-Prozessierung mit der Entstehung von A β führt. Gleichzeitig würde weniger A β durch IDE abgebaut werden. Als Resultat würde vermehrt A β anfallen und sich als Plaques ablagern. Diese Amyloidablagerungen stehen im Zentrum der Alzheimerpathogenese.

Unklar bleibt die verminderte Aktivität der γ -Sekretase. Möglicherweise ist es ein Regulierungsversuch der Zelle auf das vermehrt anfallende A β .

Im Vergleich mit der fachspezifischen Literatur zeigt sich, dass einige Arbeitsgruppen eine Erhöhung des A β -Spiegels bei erniedrigtem SOCE nachweisen konnten und, dass eine Verminderung von A β bei Überexpression von STIM und damit einem gesteigerten SOCE vorliegt (Yoo u. a. 2000; Zeiger u. a. 2013). So nutzten beispielsweise *Scremin et al.* den Crac-Kanal-Inhibitor BTP2, was in etwa den gleichen Effekt wie ein STIM-Knockout hat. Dadurch konnten eine Akkumulation von A β im Kulturmedium von Gliazellen nachgewiesen werden. Gliazellen sind an der Produktion von A β beteiligt. Der Nachweis wurde auf Proteinebene im Western Blot erbracht und bestätigt somit den in dieser Arbeit nur hypothetisch aufgestellten Sachverhalt (Scremin u. a. 2020). Im Gegensatz zu den von *Scremin et al.* publizierten Ergebnissen, konnten *Pierrot et al.* eine erhöhte intraneuronale A β -Produktion bei erhöhter zytosolischer Calciumkonzentration

beobachten (Pierrot u. a. 2004).

Besonders interessant sind die Ergebnisse, die vor allem einen Zusammenhang zwischen der γ -Sekretase und dem SOCE-Mechanismus sehen, da der γ -Sekretase-Schnitt das zentrale Ereignis der A β -Produktion ist. Der inverse Zusammenhang zwischen der Aktivität der γ -Sekretase und SOCE konnte in diversen Publikationen belegt werden. Die Inhibition der γ -Sekretase führt zu einem verstärkten SOCE und andersherum erniedrigt sich SOCE bei einer Überexpression der γ -Sekretase (Akbari u. a. 2004; Yoo u. a. 2000). Einigen Autoren postulieren, dass hierfür intrazelluläre Signalproteine eine Rolle spielen könnten, die auf STIM oder Orai wirken und durch den Schnitt der γ -Sekretase entstehen. Mögliche Proteine wären beispielsweise AICD, das bei der Spaltung von APP entsteht und NICD, das bei der Spaltung von Notch entsteht. Beide sind auch als Transkriptionsfaktoren bekannt (Shideman u. a. 2009).

Dies erklärt jedoch nicht abschließend, ob damit automatisch auch der STIM-Knockout Auswirkungen auf die γ -Sekretase hat, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurden. Auch wie genau SOCE zu höheren A β -Level führt ist noch nicht abschließend erforscht.

7.4 Einfluss der STIM1 und STIM2 auf α -, β - und γ -Sekretasen

STIM1 und STIM2 sind zwar homologe Proteine, im Detail unterscheiden sie sich jedoch in ihrer Funktion und ihrer Verteilung im Gewebe. In dieser Arbeit wurden daher auch Zellreihen für die Einzelbetrachtung von STIM1 und STIM2 generiert.

7.4.1 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die α -Sekretase

Der Versuchsaufbau für die Untersuchung der Sekretasen wurde beibehalten. Gemessen wurde die Genexpression von ADAM10 und ADAM17, den beiden wichtigsten Komponenten der α -Sekretase, in STIM1-Knockout- sowie STIM2-Knockout-Zellen. Hierbei zeigte sich, dass die Calciumkonzentration doch eine Auswirkung auf die α -Sekretase haben könnte. Die Genexpression von ADAM10 und ADAM17 war sowohl in den SH-SY5Y S1^{-/-} als auch in den SH-SY5Y S2^{-/-} leicht erhöht. Denkbar wäre, dass es zu einer erhöhten Genexpression bei verminderter Aktivität der α -Sekretase kommt. Möglicherweise ist die Veränderung der Genexpression von ADAM10 und ADAM17 aber auch nicht auf einen direkten Zusammenhang mit STIM zurückzuführen, sondern ergibt sich daraus, dass der α -Sekretase-Schnitt α -CTF, ein Substrat der γ -Sekretase, generiert. Die γ -Sekretase scheint in ihrer Funktion eher von der Calciumkonzentra-

tion beeinflusst (siehe Kapitel 7.3.3). Kommt es nun zu einem größeren Umsatz von α -CTF durch die γ -Sekretase, kann kompensatorisch die Expression von ADAM10 und ADAM17 erhöht sein.

7.4.2 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die β -Sekretase

Bei der Untersuchung der β -Sekretase konnten durch die Einzelknockouts keine weiteren Erkenntnisse generiert werden. Die Aktivität sowie die Genexpression von BACE scheint unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit weder von STIM1, noch von STIM2 beeinflusst. Höchstwahrscheinlich kann erst bei einer sehr starken Calciumdysregulation in Folge von zellulärem Stress eine Assoziation zwischen BACE und Calcium beobachtet werden.

7.4.3 Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ -Sekretase

Bei den SH-SY5Y S1/2 $-/-$ Zellen wurde schon die mögliche Beeinflussung der γ -Sekretase durch STIM betrachtet. Es zeigte sich eine herunterregulierte Aktivität bei erhöhter Genexpression. Bei der Untersuchung, ob STIM1 oder STIM2 hier den größeren Einfluss haben, zeigte sich bei beiden Knockouts eine Aktivitätsminderung der γ -Sekretase. STIM1 führte zu einer 15 Prozentpunkte stärkeren Verminderung als STIM2. Bei der Betrachtung der Genexpression waren in beiden Zellreihen nicht alle Bestandteile der γ -Sekretase vermehrt exprimiert.

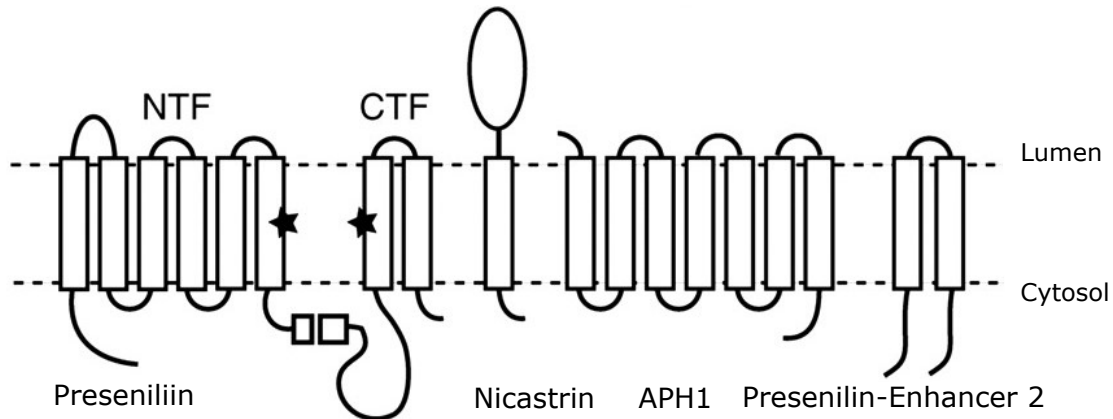


Abbildung 16: Schematischer Aufbau der γ -Sekretase

Dargestellt ist der schematische Aufbau der Aspartylprotease als ein Komplex aus den vier Untereinheiten Presenilin, Nicastrin, APH1 und Presenilin-Enhancer 2. Presenilin bildet das katalytische Zentrum der γ -Sekretase (schwarze Sterne) (NTF=n-terminales Fragment, CTF=c-terminales Fragment) (Abbildung von Kimberly u. a. 2003.)

In Abbildung 16 ist der schematische Aufbau der γ -Sekretase dargestellt. Erkennbar ist die Zusammensetzung der Aspartylprotease als ein Komplex aus mehreren Untereinheiten. Von Presenilin und APH1 sind je zwei verschiedene Untereinheiten bekannt. Es gibt PS1 und PS2 sowie APH1A und APH1B, welche auch auf verschiedenen Genen codiert sind und dann in der einen oder anderen Form exprimiert werden.

Vor diesem Hintergrund, lässt sich feststellen, dass jeweils eine Form von Presenilin und APH1 vermehrt exprimiert wurde (PS1 und APH1A) und die andere Form vermindert (PS2 und APH1B). Presenilin-Enhancer 2 und Nicastrin lagen vermehrt vor. In der Literatur finden sich Belege, dass die Homologe von Presenilin und APH1 auch unterschiedliche Funktionen haben und so die unterschiedliche Zusammensetzung der γ -Sekretase durchaus beachtet werden muss. So führt der Knockout von PS1, genauso wie von APH1A, zu schweren Entwicklungsstörungen und zum Tod von Mausembryonen, wohingegen PS2 und APH1B-Knockout-Mäuse überleben und auch deutlich geringere phänotypische Veränderungen zeigen (G. Ma u. a. 2005; Shen u. a. 1997) Außerdem gibt es auch eine Varianz in der Entstehung von A β . So trägt vor allem Presenilin 1 zur Entstehung von A β bei, während Presenilin 2 eine eher geringere Rolle zu spielen scheint (De Strooper, Saftig u. a. 1998; Fränberg u. a. 2011).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich mutmaßen, dass in den Zellen vor al-

lem ein γ -Sekretase-Komplex bestehend aus Nicastrin, Presenilin-Enhancer 2, APH1A und Presenilin 1 vorlag, da diese Gene vermehrt exprimiert waren.

Die Genexpression von APP war deutlich gesteigert. In den STIM1-Knockout-Zellen wurde eine um rund 60 Prozentpunkte höhere Genexpression von APP, als in den STIM2-Knockout-Zellen gemessen. Da auch IDE als A β -degradierendes Protein, zumindest in den STIM1 vermindert exprimiert wurde, ist davon auszugehen, dass mehr A β angefallen ist. Möglicherweise ist die verringerte Aktivität der γ -Sekretase ein Kompensationsmechanismus auf erhöhte APP-Genexpression. Hierfür spricht, dass in den SH-SY5Y-S1 $-/-$ Zellen mit einer stärkeren Reduktion der Aktivität, auch mehr APP exprimiert wurde. Erstaunlich ist, dass in den SH-SY5Y S1 $-/-$ Zellen noch rund 72 % Restaktivität des SOCEs bestand und damit ein deutlich höheren Calciumeinstrom gemessen wurde, als in den SH-SY5Y S2 $-/-$. Die Arbeitsgruppe um Pascual-Caro *et al.* bestätigt allerdings, dass es nicht zwingend einen direkten linearen Zusammenhang zwischen der Expression von STIM und SOCE gibt. In ihrer Arbeit führte die Überexpression von STIM1 nicht zu einem gesteigerten SOCE, sodass angenommen werden kann, dass im vorliegenden Fall ein komplettes Knockout auch nicht zu einer kompletten Reduktion führen muss und die Calciumhomöostase trotzdem beeinträchtigt sein kann.

Die Beeinflussung des SOCE durch Presenilin ist durch die Arbeit mit FAD-Modellen schon länger bekannt. An dieser Stelle soll der aktuelle Wissensstand kurz zusammengefasst werden, da so auch Rückschlüsse auf die Beeinflussung von Presenilin und damit dem katalytischen Zentrum der γ -Sekretase, durch SOCE gezogen werden können.

Die Calciumhomöostase ist bei der familiären Alzheimererkrankung durch eine exzessive Calciumfreisetzung aus dem ER gestört. Beobachtet wurde eine Steigerung von SOCE in Modellzelllinien mit einem Doppelknockout von Presenilin 1 und Presenilin 2, in Mutanten mit inaktivem Presenilin oder Presenilin 1-Knockout sowie in Zellen, die mit einem γ -Sekretase-Inhibitor behandelt wurden (Bojarski u. a. 2009; Shideman u. a. 2009; Yoo u. a. 2000). Bei PS1-überexprimierten Zellen ist SOCE hingegen erniedrigt (Akbari u. a. 2004; Yoo u. a. 2000). SOCE scheint also direkt mit der γ -Sekretase in Verbindung zu stehen. Manche Autoren konnten auch eine Beeinflussung auf Transkriptionsebene beobachten. So wurden eine gesteigerte Genexpression und erhöhtem Proteinlevel von STIM1 in PS1-defizienten Zellen beschrieben, wohingegen STIM2 erniedrigt sein soll (Bojarski u. a. 2009). Der Effekt erfolge indirekt über die Interaktion von Presenilin in verschiedenen transkriptionsregulierenden Signalwegen (Selkoe und M. S. Wolfe 2007).

Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Presenilin und SOCE. Inwieweit die Beeinflussung in beide Richtungen erfolgt, ist noch nicht geklärt. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass STIM1 ein mögliches Substrat der γ -Sekretase sein könnte, da beide Proteine im ER lokalisiert sind. Tong *et al.* beschreiben, dass STIM1, wie auch APP, an einer ähnlichen Sequenz in der Transmembrandomäne geschnitten wird. Die γ -Sekretase würde also über Presenilin1 den SOCE regulieren, in dem sie den Speicher an verfügbaren STIM1 durch Degradation vermindert.

7.5 Einfluss von Calcium über SOCE auf die γ -Sekretase

Thapsigargin wird aus der Pflanze *Thapsia garganica* gewonnen und in Laboren häufig genutzt um die Ca^{2+} -ATPase des Sarkoendoplasmatischen Retikulums in Wirbeltierzellen zu hemmen. Die Vorteile von Thapsigargin sind eine hohe Potenz und eine hohe Affinität für SERCA, also eine gute Selektivität ohne andere Systeme zu beeinträchtigen. Die Effekte auf den Calciumhaushalt erzielt Thapsigargin indirekt. Calcium wird aus dem ER freigesetzt, weil die geblockten Ca^{2+} -ATPasen dem passiven Calcium-

ausstrom nicht mehr entgegenstehen (Treiman u. a. 1998). Aus diesem Grund wurde Thapsigargin auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Durch den sich leerenden Calciumspeicher wurde SOCE zuverlässig aktiviert.

Es wurden die SHSY5Y-Kontrollzellen und SH-SY5Y S1/2 $-/-$ Zellen mit Thapsigargin behandelt und anschließend die Aktivität der γ -Sekretase gemessen. Bei den Kontrollzellen führte die Behandlung mit Thapsigargin zur Steigerung der Aktivität. Durch Thapsigargin entleert sich Calciumspeicher und STIM als Calciumsensor im ER aktiviert dann den SOCE. Die Steigerung der γ -Sekretasenaktivität scheint sich mit den Ergebnissen der Vorversuche zu decken. In Kapitel 7.3.3 war eine Verminderung der γ -Sekretasenaktivität bei Knockout von STIM1/2 beobachtet worden. So führt hier nun folglich, nicht die Überexpression von STIM, aber zumindest die stärkere Aktivierung von STIM, auch zu einer vermehrten Aktivität der γ -Sekretase. Zwar ließ sich eine Steigerung in den SH-SY5Y S1/2 $-/-$ Zellen beobachten, doch bei einer gleichzeitig sehr hohen Standardabweichung muss das Ergebnis als nicht signifikant bewertet werden. Dass es hier keinen wirklichen Effekt gibt, lässt sich des Weiteren dadurch belegen, dass es im Knockout von S1/2 keine Calciumsensoren gibt, die durch die Effekte von Thapsigargin getriggert werden könnten.

Bei der Einzelbetrachtung von STIM1 und STIM2 lassen sich möglicherweise Rückschlüsse auf die unterschiedliche Funktion der homologen Proteine ziehen. Die Zellen, bei welchen nur ein Knockout für STIM1 durchgeführt wurde, zeigen eine deutliche Steigerung der Aktivität der γ -Sekretase. Im Calciumimaging zeigte sich zwar ein Rückgang, aber kein vollständiges Erliegen des SOCEs in den SH-SY5Y S1 $-/-$. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die nun hier gemessene verstärkte γ -Sekretasenaktivität sein. Demnach wären in den STIM1-defizienten Zellen noch STIM-Proteine vorhanden, die auf den sich entleerenden Calciumspeicher reagieren würden. Die stärkere Aktivierung von STIM würde dann zur Aktivitätssteigerung der γ -Sekretase führen. Eine andere Hypothese ist, dass zwar STIM1 ausgeknockt ist, aber STIM2 noch funktionsfähig in den Zellen vorhanden sein muss. STIM2 ist wie in Kapitel 7.2 beschrieben der sensiblere Calciumsensor. Dies würde erklären, warum es im Vergleich zum Doppelknockout und auch im Vergleich zum STIM2-Knockout zu einer stärkeren Aktivierung kommt. Beim STIM2-Knockout kommt es ebenfalls zu einer Steigerung bei Behandlung mit Thapsigargin. Hierfür könnten dann funktionstüchtige STIM1-Proteine die Ursache sein. Diese reagieren ebenfalls auf geringe Calciumkonzentrationen im ER, allerdings mit einer geringeren Sensibilität.

7.6 Genexpression von STIM- und Orai-Proteinen in *post mortem* Gehirnproben von Alzheimerpatienten

Die Genexpression von STIM- und Orai-Proteinen wurde in Gehirnproben von Alzheimerpatienten bestimmt. Untersucht wurden 44 Hirnproben aus der Gewebekbank München. Die Auswertung erfolgte analog zur Auswertung von 228 Hirnproben der niederländischen Gewebekbank durch O. Streidenberger. Die Proben wurden in eine Alzheimergruppe und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Dies erfolgte anhand des Braak-Status. Braak 0-3 wurde als gesund der Kontrollkohorte zugeteilt und Braak 4-6 der Alzheimergruppe. Zusätzlich wurde in den Proben der A β -Gehalt bestimmt. Untersucht wurde, ob die Expression der an SOCE beteiligten Gene vom Alter und dem Braak-Status beeinflusst wurden und ob es einen Zusammenhang mit dem A β -Gehalt gibt.

In den Proben, die der Alzheimergruppe zugeordnet waren, zeigte sich eine Erhöhung der Genexpression von allen an SOCE beteiligten Proteinen.

7.6.1 Einfluss von Alter und Braak-Status auf die Expression von STIM und Orai

Die Alzheimererkrankung betrifft, abgesehen von den seltenen familiären Formen, Personen des höheren Lebensalters. Das Alter ist der Hauptrisikofaktor der Alzheimererkrankung (Guerreiro und Bras 2015) und es wurde daher untersucht, ob die Genexpression von STIM und Orai vom Alter beeinflusst wird.

Es wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Die Grundvoraussetzung der Normalverteilung der Variable Alter in den einzelnen Gruppen und der Gesamtgruppe war gegeben. Für Orai3 wurde eine lineare negative Korrelation festgestellt. Bei der multiplen linearen Regressionsanalyse zeigte sich, dass das Alter als eigenständiger Risikofaktor keinen Einfluss auf die Genexpression hat. Eine Korrelation besteht nur beim gleichzeitigen Vorliegen eines höheren Braak-Status. Hierbei war für alle Gene eine positive Korrelation gegeben.

Pascual-Caro *et al.* bestimmten den STIM1-Proteingehalt in Gehirnproben mit Braak-Status 4 bis 6. Sie stellten fest, dass der STIM1-Gehalt im Vergleich zu Kontrollproben verringert war und negativ mit dem Braak-Status korreliert. Allerdings weist die Arbeitsgruppe selber daraufhin, dass ihre Probenanzahl mit je sechs Proben zu gering war und es weiterer Forschung in diesem Bereich bedarf (Pascual-Caro u. a. 2018).

Ein mögliche Einschränkung der Ergebnisse ist der Einteilung in Kontroll- und Alzhei-

merkohorte geschuldet. In die Kontrollgruppe wurden Proben mit Braak-Status 0-3 aufgenommen. Von den 14 inkludierten Proben wiesen nur zwei den Braak-Status 0 auf, hatten also keinerlei pathologische Beeinträchtigung. Die verbleibenden Proben hatten mit Braak-Status 1-3 zumindest leichtere Pathologien.

In einer Metaanalyse von Stephan *et al.* zeigte sich, dass milde kognitive Beeinträchtigungen bei verschiedenen Braak-Stadien auftreten kann. MCI kann unabhängig oder bei hohem Braak-Status auftreten, eine Studie sah aber auch einen direkten Zusammenhang von MCI mit niedrigem Braak-Status (Stephan u. a. 2012). Bei etwa einem Drittel der Patienten mit MCI entwickelt sich auch eine Demenz. Höchstwahrscheinlich finden die Veränderungen in der Calciumhomöostase aber sogar noch früher, nämlich in der biologischen Phase der Alzheimerkrankheit, die der MCI vorausgeht, statt. Somit ist nicht auszuschließen, dass schon in der Kontrollgruppe mit frühen Braak-Stadien Veränderung in der Genexpression vorkommen können. Besser wäre es somit die Proben der Alzheimergruppe mit Proben von Patienten zu vergleichen, die keinerlei neuronale Pathologien aufweisen. Da die meisten Proben von älteren Patienten stammen, ist es jedoch sehr selten, dass die Proben keinerlei Pathologien aufweisen.

7.6.2 Einfluss von A β auf die Expression von STIM und Orai

A β entsteht bei der amyloidogenen Prozessierung von APP. Die Ablagerungen als Plaques sind die pathologisch sichtbaren Korrelate. Zur Festlegung des Braak-Status wird die Ausbreitung der neurofibrillären Tangles herangezogen. Es zeigt sich eine starke Korrelation zwischen dem Braak-Status und dem A β -Gehalt. Dies kann daraufhin deuten, dass sowohl Tangles als auch A β -Ablagerungen vorlagen. Es sind also nicht nur makroskopisch sichtbare Pathologien vorhanden gewesen, sondern es kam vermutlich auch zur vermehrten A β -Produktion. Die Verbindung von STIM und Orai mit A β ließ sich vor allem in der Betrachtung der Gesamtsumme von A β erkennen. Hierbei ließ sich für Orai1 und Orai3 sowie für die beiden STIM-Proteine eine positive Korrelation zwischen A β und der Genexpression berechnen. Ein lineares Modell zur Regressionsanalyse war hingegen nicht anwendbar. Zusammenfassend kann also nur gesagt werden, dass die Expression von STIM und Orai von der Gesamtmenge an A β beeinflusst wird. In Kapitel 7.3.3 wurde der Zusammenhang im Zellmodell ebenfalls untersucht, wobei eine Erhöhung des A β -Spiegels bei STIM-Knockout vermutet wurde. Wahrscheinlich ist in dieser späten Phase der Demenz, wenn die A β -Produktion schon deutlich gesteigert ist und es bereits zu makroskopischen Veränderungen kommt, der Zellzyklus schon so sehr betroffen, dass keine Regulation mehr über die Genexpression stattfindet.

7.7 SOCE und Gedächtnisbildung

Wurde bisher viel über die zelluläre Ebene und die Auswirkung des STIM-Knockouts auf die Calciumhomöostase berichtet, soll hier noch kurz auf die Funktion von SOCE bei der Gedächtnisbildung eingegangen werden und ein Ausblick auf therapeutische Optionen gegeben werden. SOCE ist für die korrekte Ausbildung von pilzförmigen Spines in Neuronen notwendig (Sun u. a. 2014). Genauer ist die Stabilität der Spines von STIM2-vermitteltem neuronalen speicherabhängigem Calciuminflux (*engl. neuronal store-operated Ca^{2+} -influx nSOC*) abhängig. Die Spines benötigen einen kontinuierlichen Calciumeinstrom um vollständig auszureifen. Über den Calciumeinfluss werden über die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II (*engl. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase, CaMKII*) die zur Ausreifung nötigen Gentranskriptionsfaktoren gesteuert. In Mausmodellen von Alzheimer, sowie in gealterten Neuronen und bei Alzheimerpatienten findet sich ein beeinträchtigter nSOC (Sun u. a. 2014). Eine Überexpression von STIM2 erhöht die Stabilität der pilzförmigen Spines (Popugaeva, Pchitskaya u. a. 2015; H. Zhang, L. Wu u. a. 2015).

Es gibt immer mehr Autoren, die die Calciumdysregulation als ein frühes Ereignis in der Alzheimerpathogenese ansehen. Möglicherweise wäre die Korrektur dieser Dysregulation ein Mechanismus um die Alzheimererkrankung vorzubeugen. Memantin, das als Antagonist am NMDA-Rezeptor wirkt und vor exzessivem Calciumeinstrom schützt, wird bei Patienten mit milder Demenz bereits eingesetzt (De Felice u. a. 2007). Weitere Medikamente befinden sich in verschiedenen Testphasen. Die Calciumkanalblocker Nimodipin, Isradipin, Verapamil, Diltiazem und Nifedipin, die bei schwerer Hypertonie eingesetzt werden, wirken an den VGCCs. Getestet wird aktuell in einer Phase-I-Studie, ob es Effekte bei frontotemporale Demenz gibt (Griffith u. a. 2010). mGluR5 wird ebenfalls als möglicher Angriffspunkt diskutiert. mGluR5 ist vor allem im Kortex und Hippocampus exprimiert und interagiert mit NMDA-Rezeptoren. Wird mGluR5 pharmakologisch mit dem nicht kompetitiven Antagonisten MPEP (2-Methyl-6-Phenylethynyl-Pyridin) geblockt, scheint dies neuroprotektive Effekte zu haben (D'Antoni u. a. 2011, Bruno u. a. 2000).

7.8 Die Expression von FMR1 und FMR2 in Alzheimer-Modellzelllinien

FMRP ist ein RNS-bindendes Protein und findet sich in den neuronalen Dendriten, wo es an der neuronalen Plastizität mitwirkt. Da es darüber hinaus Hinweise gibt, dass FMRP an der Regulierung der APP-Produktion über Interaktion auf genetischer Ebene beteiligt ist, wurde die Expression von FMR1 und FMR2 untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, wie sich die Expression von FMR1 und FMR2 in verschiedenen Alzheimer-Modellzelllinien verhält. FMR1 findet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms auf Position 27.3 (Xq27.3). Es besteht aus 17 Exons mit sich wiederholenden Sequenzen von CGC-Trinukleotiden. FMR2 liegt ungefähr 600 kb distal von FMR1 auf Position 28 (Xq28) und besteht aus 22 Exons. Die CGC-Triplettsequenz liegt auf dem ersten Exon. Beide Genabschnitte codieren für ein FMR-Protein.

Es zeigte sich eine Erhöhung der Expression von FMR2 um mehr als das 20-fache in MEF APP/APLP2 $-/-$ Zellen. MEF APP/APLP2 $-/-$ sind Zellen mit fehlendem APP und APLP2 und zeigen eine gestörte synaptische Plastizität mit unzureichender Synaptogenese. Es kann an dieser Stelle nur die Aussage zur Genexpression von FMR1 und FMR2 getroffen werden. Es ist hier nicht eindeutig geklärt, ob die stark erhöhte Expression von FMR2 gleichbedeutend mit einer CGC-Trinukleotidverlängerung auf über 200 ist. In diesem Falle wäre durch Methylierung des betroffenen Genabschnitts keine Proteinsynthese von FMRP mehr zu erwarten. Gleichzeitig ist die Expression von FMR1 auf 80 % gesunken. Auch hier bleibt unklar, welche Auswirkung dies auf FMRP hat. Zum einen könnte die Produktion unbeeinträchtigt sein, weil es keine Hinweise auf eine Trinukleotidverlängerung gibt. Andererseits könnte eine Verminderung der Genexpression auch zu einer verminderten Proteinproduktion von FMRP führen.

In der Literatur findet sich die Darstellung, dass Wiederholungssequenzen zwischen 55-200 Triplets, dies entspricht dem Prämutationsbereich, zu einer verbesserten FMR1-Transkription führen (R. Hagerman und P. Hagerman 2013). Paradoxiertweise ist die Expression von FMRP in diesem Bereich, trotz vermehrter FMRP-mRNS jedoch verringert, was sich vermutlich auf eine verringerte Translationseffizienz zurückführen lässt (Ludwig, Espinal u. a. 2014; Pretto u. a. 2014). Die verlängerte mRNS bildet Haarnadelstrukturen aus, welche die Proteinbiosynthese beeinträchtigen (Ludwig, Hershey u. a. 2011).

Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch in Zellen mit verkürztem APP. Die Expression von FMR2 war ebenfalls gesteigert, während die Expression von FMR1 kaum verändert war. Die Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen APP und dem FMR-Gen hin. Bei der Prozessierung von APP entsteht AICD, welches im Zellkern die Genexpression vieler Gene moduliert. FMR1 und FMR2 sind Gene die möglicherweise ebenfalls von AICD reguliert werden (Imbimbo u. a. 2007). Im vorliegenden Fall würde dies bedeuten, dass AICD eine hemmende Wirkung auf die Expression von FMR2 ausübt. In den Zelllinien mit fehlendem oder verkürztem APP findet keine APP-Prozessierung mit der Entstehung von AICD statt. Der hemmende Einfluss auf FMR2 fällt weg und es würde vermehrt exprimiert werden.

Um den möglichen Einfluss von AICD genauer zu untersuchen, wurde das Experiment mit der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wiederholt. Es wurden zwei Zellreihen verwendet, die die letzten 83 (β -CTF) beziehungsweise 99 Aminosäuren (α -CTF) exprimieren. In beiden Zellreihen entsteht nach dem γ -Sekretase-Schnitt AICD. Die Erhöhung der Genexpression von FMR1 und FMR2 in den C83-Zellen war nicht signifikant. Bei der Genexpression von FMR2 in den C99-Zellen zeigte sich eine leichte Steigerung. Im Vergleich zu den Zellen mit verkürztem oder fehlendem APP, kann hier von einer Normalisierung der Genexpression gesprochen werden. Dies würde die Hypothese stützen, dass AICD einen regulierenden Einfluss auf die Genexpression ausübt. Allerdings fand der Vergleich nur hypothetisch und auch nicht im gleichen Zellsystem statt. Es wurden deshalb Mef APP/APLP2 $-/-$ Zellen mit AICD retransfiziert und wiederum die Genexpression von FMR1 und FMR2 bestimmt. In den MEF APP/APLP2 $-/-$ Zellen konnte eine Steigerung der Genexpression festgestellt werden. Nach der Retransfektion normalisierte sich die Genexpression von FMR2 wieder auf das Vorniveau. Die Expression von FMR1 war zusätzlich verringert. Die Genexpression von FMR1 und FMR2 würde demnach von AICD gehemmt werden. Des Weiteren wurde in APP-defizienten und APLP2-defizienten Zellen der Einfluss von AICD geprüft. Es zeigte sich, dass die Steigerung der Genexpression von FMR2 bei beiden Zellreihen Bestand hatte, bei dem APLP2-Knockout jedoch fast doppelt so groß war. Somit scheint die Hypothese, der Regulation nur über AICD nicht ausreichend. APLP2 ist ein Homolog von APP. Ähnlich zur AICD, entsteht bei der Prozessierung von APLP2 ebenfalls eine intrazelluläre Domäne (engl. *ALP2-intracellular domain*, AL2ICD). Diese wird wie AICD auch in den Zellkern transportiert. AL2ICD wird an den gleichen Position im Zellkern wie AICD nachgewiesen. Dies deutet daraufhin, dass die gleichen Gene durch die ICDs von APP und APLP2 reguliert werden könnten (Gersbacher u. a. 2013). Die Regulation der Genexpression von FMR könnte also von AICD und AL2ICD gesteuert sein.

Es bietet sich hier, zunächst die Betrachtung des Einfluss von FMR auf APP an. Bei FMR1-Knockout-Mäusen konnten mehrere Arbeitsgruppen einen Anstieg von APP und folgend von A β im Vergleich zu Wildtypmäusen nachweisen (Renoux u. a. 2014; C. J. Westmark und Malter 2007). Sie ergänzen damit die bisherige Beobachtung von erhöhter APP-mRNS im Kortex und Hippocampus von einem Mausmodell mit fragilem X-Syndrom (D'Agata u. a. 2002). Auch bei Patienten mit fragilem X-Syndrom wurden abnorme A β -Spiegel im Plasma und im Gehirn nachgewiesen (C. J. Westmark, P. R. Westmark u. a. 2011). FMRP bindet mRNS über intramolekulare G-Quadruplexe in der Zielstruktur. APP-mRNS enthält ebenfalls eine G-Quadruplex-Struktur und ist eine Zielstruktur von FMRP (E. K. Lee u. a. 2010). Neben der direkten Interaktion von FMRP und APP-mRNS ist vermutlich auch mGluR5 beteiligt. FMRP inhibiert die APP-Translation, bis durch die Aktivierung von mGluR5, die Hemmung wegfällt (Sokol u. a. 2011). Im Alter findet sich ein verminderter FMRP-Spiegel in Mausmodellen (Gaur und Prasad 2014). Eine beeinträchtigte FMRP-Expression bei älteren Personen könnte zu einer erhöhten APP-Translation führen und somit über eine vermehrte A β -Produktion zur Alzheimererkrankung beitragen. Die FMRP-Produktion könnte bei der Alzheimererkrankung durch den zunehmenden Funktionsverlust der Neuronen beeinträchtigt sein und die APP-Produktion würde sich in einer *feed-forward-Reaktion* durch die wegfallende Hemmung selber verstärken. In *post mortem* Analysen von Gehirnproben von Alzheimerpatienten konnte diese Theorie jedoch nicht bestätigt werden. Es zeigte sich keine Veränderung des FMRP-Gehalts (Renoux u. a. 2014). Es besteht jedoch ein Konsens, dass APP von FMRP beeinflusst wird. In der Abbildung 17 ist die mögliche Interaktion von APP und FMRP schematisch dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit gibt es nun auch den Hinweis, dass FMRP oder zumindest die Genexpression von FMR auch von APP oder den Prozessierungsprodukten von APP beeinflusst wird. Die Arbeitsgruppe um Renoux arbeitete mit einer APP/PS1-Knockout-Mauslinie, also ebenfalls einem Alzheimermodell. Sie konnten hingegen keine Veränderung des FMRP-Gehalts im Vergleich zu Kontrollmäusen im Gehirn feststellen (Renoux u. a. 2014). Dies zeigt nochmal die Notwendigkeit, die komplette Proteinbiosynthese zu betrachten. Es findet sich in der Arbeit von Renoux keine Aussage, ob die Genexpression von FMR1 und FMR2 untersucht wurde.

Endogenes FMR2 wird in Neuronen des Hippocampus im Zellkern nachgewiesen. In der Embryonalentwicklung scheint es an der Differenzierung des Neuroepithels zu Neuroblasten und Neuronen beteiligt. FMR2 kann wie FMRP selektiv an Poly-G-Quadruplex-Strukturen binden. Es ist an der Regulation der Transkription im Zellkern beteiligt. Aber auch posttranskriptional scheint das FMR2-Protein mRNS zu modifizieren

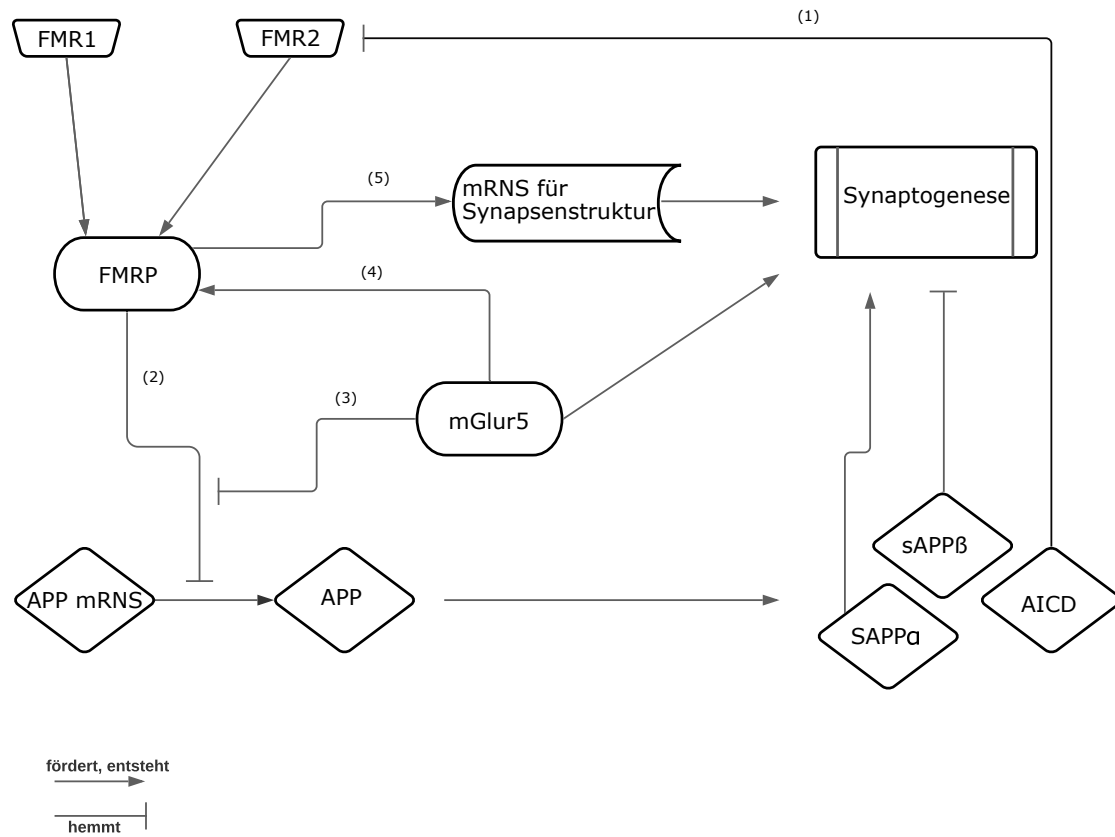


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Interaktion von APP, FMRP und mGluR

Translation der mRNS von APP wird durch die Bindung von FMRP an die G-Quadruplexstruktur gehemmt. FMRP wird von mGluR beeinflusst. FMRP interagiert mit mRNS, die für Strukturproteine in den Synapsen codieren. AICD hemmt die Genexpression von FMR2.

Abbildung abgeändert nach Sokol u. a. 2011

zusätzliche Quellenangaben u.a. (1) in dieser Arbeit gezeigt (2) E. K. Lee u. a. 2010

(3) Sokol u. a. 2011; C. J. Westmark und Malter 2007 (4) Bear u. a. 2004 (5) Pretto u. a. 2014

(Bensaid u. a. 2009). Es ist somit an verschiedenen Signalwegen, wie CaMKII oder RAF/MEK/MAPK beteiligt. In FMR2-Knockoutmäusen wurde abnorm hohe LTPs im Hippocampus nachgewiesen (Gu und Nelson 2003).

FMRP ist sowohl am Transport von mRNS, als auch an der Regulation der lokalen Proteinbiosynthese beteiligt. Es wird in den Dendriten synthetisiert, kann aber auch über Aktivierung von mGluR von anderen Orten in der Zelle in die Synapsen transportiert werden. FMRP wird auch im Zellkern gefunden und bindet dort an mRNS um den Transport zu den Synapsen oder Dendriten zu erleichtern. Damit ist FMRP essentiell für die Gedächtnisbildung. Die Gedächtnisbildung erfolgt über LTP und LTD. Der Auslöser für LTD ist neben der die Aktivierung von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren auch die Aktivierung von mGluR (mGluR-LTD). Im Hippocampus erfolgt die Aktivierung über mGlu5 und die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK). Diese Form der Aktivierung erfordert die schnelle Translation von mRNS in den Dendriten. Neben APP werden viele weitere mRNS durch FMRP gebunden und reguliert. Gefunden wurde eine erhöhte Konzentration von CaMKII. Es sind aber auch mRNS darunter, die für Proteine codieren, die für die Synapsenstruktur benötigt werden. Bei Patienten mit fragilem X-Syndrom sowie bei Mäusen mit FMR1-Knockout werden aufgrund des fehlenden FMRPs abnorme Spinestrukturen gefunden. Da die Spines für das Lernen und die Gedächtnisbildung absolut essentiell sind, geht eine Veränderung der Morphologie mit kognitiven Defiziten einher. Beobachtungen bei FMR1-Knockout-Mäusen legen nahe, dass LTD von der Aktivierung über mGluR entkoppelt ist. Es werden sehr hohe mGluR-LTD gefunden, wenn die Regulation der Proteinbiosynthese über FMRP wegfällt (Huber u. a. 2000). Die in den Dendriten vorhanden mRNS ist nicht an FMRP gebunden und treibt die LTD ohne Regulierung über mGluR5 und FMRP an. Resultat sind die bei fragilen X-Patienten gefunden verlängerten und unausgereiften Spines (Sokol u. a. 2011).

Morphologisch veränderte Spines, Störung der synaptischen Plastizität und Defizite der Gedächtnisbildung finden sich sowohl bei fragilem X-Syndrom, dem FRAXE-Syndrom, als auch bei der Alzheimererkrankung. Die Veränderungen der Spinestruktur ergeben sich durch eine gestörte Calciumregulation, wie auch durch Beeinflussung der Proteinbiosynthese. An beiden Prozessen sind metabotrope Glutamatrezeptoren beteiligt. Die Stimulation von mGluR führt sowohl zu Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, als auch zu dendritischer Proteinbiosynthese. Für die synaptische Plastizität müssen dauerhafte morphologische Veränderungen der dendritischen Spines, die häufig die Postsynapse bilden, stattfinden. Die Langzeitpotenzierung und Langzeitde-

pression erfolgen über lokale Proteinbiosynthese von Strukturproteine (Guzowski u. a. 2000). Die Proteinbiosynthese wird über Calcium induziert und reguliert (Lynch 1998). Hierbei korreliert die Länge der Spines mit dem Ausmaß der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern unter der Aktivierung mit Glutamat (Korkotian und Segal 1999a; Korkotian und Segal 1999b). Metabotrope Glutamatrezeptoren könnten über die Modulation der Calciumfreisetzung an der Synaptogenese und der Ausbildung von LTD und LTP beteiligt sein.

7.9 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der bidirektionale Zusammenhang der Calciumhomöostase und der APP-Prozessierung untersucht werden. Es wurden hierzu mittels CRISPR/cas9 Zelllinien mit einem Knockout von STIM generiert und das Knockout funktionell überprüft. Des Weiteren wurden in *post mortem* Hirnproben die Expression von STIM und Orai in Abhängigkeit des Alters, des Braak-Status und des A β -Gehalts untersucht.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Calciumkonzentration einen Einfluss primär auf die γ -Sekretase zu haben scheint. Limitiert wurde die Interpretation durch die Einschränkung der Ergebnisse auf die Gen- und Aktivitätsebene. Wünschenswert wäre eine Untersuchung auf Proteinebene gewesen. Hierzu sind weitere Experimente notwendig, bei denen untersucht werden sollte, inwieweit die Entstehung und Menge von A β ebenfalls von der Calciumkonzentration beeinflusst wird. Des Weiteren könnte auch die Menge an sAPP α bestimmt werden.

Eine weitere lohnenswerte Aufgabe für die Zukunft ist die Herstellung von Kulturen, die auf einen Einzelklon zurückgehen. Die Versuche der vorliegenden Arbeit beruhen auf Zellkulturen aus Mischklonen. Es sollte in einer Verdünnungsreihe eine Vereinzelung der Zellen angestrebt werden. Alternativ könnten auch Einzelklone pikiert werden. Diese Einzelklone sollten dann ebenfalls funktionell auf das Knockout überprüft werden.

Ein weiteres Kapitel der Arbeit widmet sich der Frage, ob die Expression von FMRP von APP oder Prozessierungsprodukten von APP beeinflusst wird. Das genregulatorische AICD scheint hierbei einen Einfluss auf die Expression von FMR2 auszuüben. Trotz erster vielversprechender Ergebnisse, konnte das Thema in dieser Arbeit nur am Rande behandelt werden. Die Regulation von FMR und FMRP durch Prozessierungsprodukte von APP ist eine Fragestellung die noch weiterer Forschung bedarf. Wurden

in der vorliegenden Arbeit Experimente mit Zellmodellen gearbeitet, wäre zunächst eine Ausweitung auf *in vivo* Material anzustreben. Zusätzlich wäre es auch sinnvoll, die Untersuchung von der Expression auf Transkriptionsebene auf die Proteinebene auszuweiten. Hierzu hätte im Western Blot untersucht werden können, ob das FMR-Protein bei erhöhter Expression auch vermehrt vorliegt. In einem weiteren Schritt hätte dann ein FMR-Knockout generiert werden können. Hiermit hätte analysiert werden können, ob FMR oder FMRP auch Einfluss auf APP oder Prozessierungsprodukte von APP nimmt.

8 Anhang

humane Hirnproben aus der München-Hirngewebebank (Nr.: Nummer, W: weiblich, M:männlich, AD=engl. *Alzheimer's Disease*, Alzheimererkrankung)

Nr.	Geschlecht	Alter	BRAAK-Status	Einteilung
1	W	88	I -II	Kontrolle
2	W	77	II	Kontrolle
3	W	75	II	Kontrolle
4	W	76	III-IV	Kontrolle
5	W	85	I	Kontrolle
6	W	80	III-IV	Kontrolle
7	W	77	II	Kontrolle
8	W	83	II	Kontrolle
9	M	75	II	Kontrolle
10	M	63	I	Kontrolle
11	M	71	0-I	Kontrolle
12	M	85	III-IV	Kontrolle
13	M	87	I -II	Kontrolle
14	M	61	0	Kontrolle
15	W	82	V	AD
16	W	65	V-VI	AD
17	W	67	V-VI	AD
18	W	82	V-VI	AD
19	W	68	VI	AD
20	W	78	V-VI	AD
21	W	85	III	AD
22	W	85	IV	AD
23	W	73	V-VI	AD
24	W	76	V-VI	AD
25	W	88	VI	AD
26	W	78	VI	AD
27	W	78	VI	AD
28	W	88	V	AD
29	W	80	V	AD

Fortsetzung

Nr.	Geschlecht	Alter	BRAAK-Status	Einteilung
30	W	75	VI	AD
31	W	79	V	AD
32	M	80	V	AD
33	M	73	V-VI	AD
34	M	74	V-VI	AD
35	M	75	VI	AD
36	M	83	VI	AD
37	M	62	VI	AD
38	M	87	V	AD
39	M	87	V	AD
40	M	83	V	AD
41	M	76	V	AD
42	M	80	V	AD
43	M	70	VI	AD
44	M	83	VI	AD

Abbildungsverzeichnis

1	Schema der APP-Prozessierung	18
2	Schematische Darstellung von Orai	23
3	Schematische Darstellung von SOCE	25
4	Schema des CRISPR/cas Systems	29
5	funktionelle Überprüfung des Knockouts mittels Calciumimaging	61
6	Genexpression von APP, α -, β -, γ -Sekretase und IDE in SH-SY5Y STIM1/2 -/- Zellen	62
7	Messung der γ -Sekretase Aktivität in lebenden SH-SY5Y	64
8	Genexpression von APP, α -Sekretase, β -Sekretase und IDE in SH-SY5Y S1 -/- und SHSY5Y S2 -/- Zellen	66
9	Einfluss von STIM1 und STIM2 auf die γ -Sekretase	67
10	γ -Sekretase-Aktivität nach Inkubation mit Thapsigargin	69
11	Genexpression von Orai1, Orai2, Orai3, STIM1 und STIM2	70
12	Genexpression von FMR2 und FMR1 in MEF APP/APLP2 -/- und MEF APP Δ CT15 Zellen	75
13	Genexpression von FMR1 und FMR2 in MEF APP- und MEF APLP2- Zellen	76
14	Genexpression von FMR1 und FMR2 in SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Ex- pression der letzten 83 bzw. 99 Aminosäuren	77
15	Schema Calciumdysregulation und Alzheimerkrankheit	79
16	Schematischer Aufbau der γ -Sekretase	91
17	Schema der Interaktion von APP, FMRP und mGluR	101

Tabellenverzeichnis

1	Chemikalien	33
2	Verbrauchsmaterial	35
3	Geräte	36
4	Zelllinien	39
5	Kits	40
6	Plasmide	40
7	humane Hirnproben Übersicht	41
8	Zellkulturmedien	43
9	stabil transfizierte Zelllinien	46
10	Primer-Sequenzen humane Proben	50
11	Primer-Sequenz humane Hirnproben	50
12	Primer-Sequenzen für FMR	51
13	Messparameter für die Sekretase-Aktivitätsmessung	55

Literatur

- Akbari, Y. u. a. (2004) Presenilin regulates capacitative calcium entry dependently and independently of γ -secretase activity. *Biochemical and biophysical research communications* 322:1145–1152
- Alberdi, E. u. a. (2010) Amyloid β oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell calcium* 47:264–272
- Alkon, D. L., Sun, M.-K., Nelson, T. J. (2007) PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences* 28:51–60
- Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*:146–148
- Amador, F. J. u. a. (2013) Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure–function studies. *The FEBS journal* 280:5456–5470
- Amadoro, G. u. a. (2006) NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:2892–2897
- Andersen, K. u. a. (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. *Neurology* 53:1992–1992
- Arispe, N., Rojas, E., Pollard, H. B. (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:567–571
- Baba, A. u. a. (2003) Activity-evoked capacitative Ca^{2+} entry: implications in synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience* 23:7737–7741
- Bagyinszky, E. u. a. (2014) The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging* 9:535
- Bardo, S., Cavazzini, M. G., Emptage, N. (2006) The role of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} store in the plasticity of central neurons. *Trends in pharmacological sciences* 27:78–84
- Barger, S. W. u. a. (1993) β -Amyloid Precursor Protein Mismetabolism and Loss of Calcium Homeostasis in Alzheimer's Disease a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 695:158–164
- Barrangou, R. u. a. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709–1712

- Barthel, H. u. a. (2011) Cerebral amyloid- β PET with florbetaben (18F) in patients with Alzheimer's disease and healthy controls: a multicentre phase 2 diagnostic study. *The Lancet Neurology* 10:424–435
- Bayer, T. A. u. a. (1999) It all sticks together—the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry* 4:524–528
- Bear, M. F., Huber, K. M., Warren, S. T. (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in neurosciences* 27:370–377
- Bennett, B. D. u. a. (2000) Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *Journal of Biological Chemistry* 275:20647–20651
- Bensaid, M. u. a. (2009) FRAXE-associated mental retardation protein (FMR2) is an RNA-binding protein with high affinity for G-quartet RNA forming structure. *Nucleic acids research* 37:1269–1279
- Berna-Erro, A. u. a. (2009) STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Science signaling* 2:ra67–ra67
- Berridge, M. J. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13–26
- Bezprozvanny, I. (2005) The inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. *Cell calcium* 38:261–272
- Bezprozvanny, I., Hiesinger, P. R. (2013) The synaptic maintenance problem: membrane recycling, Ca²⁺ homeostasis and late onset degeneration. *Molecular neurodegeneration* 8:23
- Bojarski, L. u. a. (2009) Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca²⁺ entry in familial Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1793:1050–1057
- Bolotin, A. u. a. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151:2551–2561
- Bourne, J., Harris, K. M. (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current opinion in neurobiology* 17:381–386
- Braak, H., Braak, E. (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of aging* 16:271–278
- Brandman, O. u. a. (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell* 131:1327–1339
- Brouns, S. J. J. u. a. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321:960–964
- Brunello, L. u. a. (2009) Presenilin-2 dampens intracellular Ca²⁺ stores by increasing Ca²⁺ leakage and reducing Ca²⁺ uptake. *Journal of cellular and molecular medicine* 13:3358–3369

- Bruno, V. u. a. (2000) Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective. *Neuropharmacology* 39:2223–2230
- Burg, V. K. u. a. (2013) Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *Journal of Neuroscience* 33:16072–16087
- Burg, V. K. (2014) „Sterine und die molekularen Mechnismen der APP-Prozessierung: Zusammenhänge und Implikationen für die Alzheimer Krankheit“. Diss. Universität des Saarlandes
- Buxbaum, J. D. u. a. (1998) Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *Journal of Biological Chemistry* 273:27765–27767
- Carey, R. M., Blusztajn, J. K., Slack, B. E. (2011) Surface expression and limited proteolysis of ADAM10 are increased by a dominant negative inhibitor of dynamin. *BMC cell biology* 12:1–11
- Chan, S. L. u. a. (2000) Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry* 275:18195–18200
- Chard, P. u. a. (1993) Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *The Journal of physiology* 472:341–357
- Chen, E. u. a. (2014) Fragile X mental retardation protein regulates translation by binding directly to the ribosome. *Molecular cell* 54:407–417
- Chen, G.-f. u. a. (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica* 38:1205–1235
- Cheung, K.-H. u. a. (2008) Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron* 58:871–883
- Cho, H. J. u. a. (2008) Disrupted intracellular calcium regulates BACE1 gene expression via nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT 1) signaling. *Aging cell* 7:137–147
- Christensen, K. A., Myers, J. T., Swanson, J. A. (2002) pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *Journal of cell science* 115:599–607
- Clapham, D. E. (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047–1058
- Clark, C. M. u. a. (2011) Use of florbetapir-PET for imaging β -amyloid pathology. *Jama* 305:275–283
- Clark, R. F. u. a. (1995) The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature genetics* 11:219–222
- Cornejo, V. H., Hetz, C. (2013) „The unfolded protein response in Alzheimer's disease“. In: *Seminars in immunopathology*. Bd. 35. 3. Springer, S. 277–292

- Crawford, D. C., Acuña, J. M., Sherman, S. L. (2001) FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genetics in Medicine* 3:359–371
- D'Agata, V. u. a. (2002) Gene expression profiles in a transgenic animal model of fragile X syndrome. *Neurobiology of disease* 10:211–218
- D'Antoni, S. u. a. (2011) A prolonged pharmacological blockade of type-5 metabotropic glutamate receptors protects cultured spinal cord motor neurons against excitotoxic death. *Neurobiology of disease* 42:252–264
- De Felice, F. G. u. a. (2007) A β oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *Journal of Biological Chemistry* 282:11590–11601
- De Strooper, B., Annaert, W. u. a. (1999) A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518–522
- De Strooper, B., Saftig, P. u. a. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387–390
- DeKosky, S. T., Scheff, S. W. (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 27:457–464
- Deltcheva, E. u. a. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471:602–607
- Derler, I. u. a. (2013) The extended transmembrane Orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for Orai1 activation by STIM1. *Journal of Biological Chemistry* 288:29025–29034
- Deveau, H. u. a. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology* 190:1390–1400
- Diener, C. u. a. (2018) Modulation of intracellular calcium signaling by microRNA-34a-5p. *Cell death & disease* 9:1–13
- Dittmer, P. J. u. a. (2017) STIM1 Ca²⁺ sensor control of L-type Ca²⁺-channel-dependent dendritic spine structural plasticity and nuclear signaling. *Cell reports* 19:321–334
- Dubois, B. u. a. (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. *The Lancet Neurology* 6:734–746
- Dubos, A. u. a. (2015) Conditional depletion of intellectual disability and Parkinsonism candidate gene ATP6AP2 in fly and mouse induces cognitive impairment and neurodegeneration. *Human molecular genetics* 24:6736–6755
- Esteras, N., Abramov, A. Y. (2020) Mitochondrial calcium deregulation in the mechanism of beta-amyloid and tau pathology. *Cells* 9:2135

- Estimating the prevalence of dementia in Europe* (2021). URL: www.alzheimer-europe.org/EN/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe (besucht am 15.01.2021)
- Etcheberrigaray, R. u. a. (1998) Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families. *Neurobiology of disease* 5:37–45
- Fahrner, M. u. a. (Okt. 2013) The STIM1/Orai signaling machinery. *Channels* (Austin, Tex.) 7
- Ferreira, A. (2012) Calpain dysregulation in Alzheimer's disease. *ISNR biochemistry* 2012
- Feske, S. u. a. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179–185
- Frånberg, J. u. a. (2011) Minor contribution of presenilin 2 for γ -secretase activity in mouse embryonic fibroblasts and adult mouse brain. *Biochemical and biophysical research communications* 404:564–568
- Francis, R. u. a. (2002) aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Developmental cell* 3:85–97
- Freshney, R. I. (2015) *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons
- Frischauf, I. u. a. (2015) A calcium-accumulating region, CAR, in the channel Orai1 enhances Ca^{2+} permeation and SOCE-induced gene transcription. *Science signaling* 8:ra131–ra131
- Fukumoto, H. u. a. (2002) β -Secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 59:1381–1389
- Furukawa, K. u. a. (1996) Activation of K^{+} channels and suppression of neuronal activity by secreted β -amyloid-precursor protein. *Nature* 379:74–78
- Garneau, J. E. u. a. (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468:67–71
- Gaur, P., Prasad, S. (2014) Alterations in the Sp1 binding and Fmr-1 gene expression in the cortex of the brain during maturation and aging of mouse. *Molecular biology reports* 41:6855–6863
- Gersbacher, M. T. u. a. (2013) Turnover of amyloid precursor protein family members determines their nuclear signaling capability. *PloS one* 8:e69363
- Glenner, G. G., Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications* 120:885–890

- Goedert, M. (1996) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease*:103–125
- Goussakov, I., Miller, M. B., Stutzmann, G. E. (2010) NMDA-mediated Ca²⁺ influx drives aberrant ryanodine receptor activation in dendrites of young Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience* 30:12128–12137
- Greenfield, J. P. u. a. (1999) Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer β -amyloid peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:742–747
- Griffith, T. u. a. (2010) Neurobiological effects of Hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy. *Current medicinal chemistry* 17:391–406
- Grimm, M. O. u. a. (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Frontiers in aging neuroscience* 7:77
- Groenen, P. M. A. u. a. (1993) Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular microbiology* 10:1057–1065
- Grösgen, S. (2014) „Der Einfluss der intrazellulären APP-Domäne und von Lipiden auf die Alzheimer Krankheit“. Diss. Universität des Saarlandes
- Gruszczynska-Biegala, J., Kuznicki, J. (2013) Native STIM 2 and ORAI 1 proteins form a calcium-sensitive and thapsigargin-insensitive complex in cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 126:727–738
- Gu, Y., Nelson, D. (2003) FMR2 function: insight from a mouse knockout model. *Cytogenetic and genome research* 100:129–139
- Guehne, U., Riedel-Heller, S., Angermeyer, M. C. (2005) Mortality in dementia. *Neuroepidemiology* 25:153–162
- Guerreiro, R., Bras, J. (2015) The age factor in Alzheimer's disease. *Genome medicine* 7:1–3
- Guzowski, J. F. u. a. (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *Journal of Neuroscience* 20:3993–4001
- Haaksma, M. L. u. a. (2020) Survival time tool to guide care planning in people with dementia. *Neurology* 94:e538–e548
- Haass, C. u. a. (1993) Normal Cellular Processing of the β -Amyloid Precursor Protein Results in the Secretion of the Amyloid β Peptide and Related Molecules a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 695:109–116

- Hagenston, A. M., Bading, H. (2011) Calcium signaling in synapse-to-nucleus communication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3:a004564
- Hagerman, R., Hagerman, P. (2013) Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *The Lancet Neurology* 12:786–798
- Harada, R. u. a. (2016) 18F-THK5351: a novel PET radiotracer for imaging neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. *Journal of Nuclear Medicine* 57:208–214
- Hardy, J., Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science* 297:353–356
- Hardy, J. A., Higgins, G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–186
- Hartmann, J. u. a. (2014) STIM1 controls neuronal Ca²⁺ signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and cerebellar motor behavior. *Neuron* 82:635–644
- Hayley, M. u. a. (2009) Calcium Enhances The Proteolytic Activity Of BACE: An In Vitro Biophysical And Biochemical Characterization Of The BACE-Calcium Interaction. *Biophysical Journal* 96:593a–594a
- Heber, S. u. a. (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *Journal of Neuroscience* 20:7951–7963
- Herreman, A. u. a. (2000) Total inactivation of γ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nature cell biology* 2:461–462
- Hippius, H., Müller, N. (2008) The work of Emil Kraepelin and his research group in München. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 258:3–11
- Hogan, P. G., Lewis, R. S., Rao, A. (2009) Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual review of immunology* 28:491–533
- Honarnejad, K., Herms, J. (2012) Presenilins: role in calcium homeostasis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44:1983–1986
- Hoth, M., Niemeyer, B. A. (2013) The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. *Current topics in membranes* 71:237–271
- Hoth, M., Penner, R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353–356
- Hou, X. u. a. (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* 338:1308–1313
- Huber, K. M., Kayser, M. S., Bear, M. F. (2000) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288:1254–1256

- Hung, A. Y. u. a. (1992) Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:9439–9443
- Imbimbo, B. P. u. a. (2007) In vitro and in vivo profiling of CHF5022 and CHF5074: Two β -amyloid1–42 lowering agents. *Pharmacological research* 55:318–328
- Iqbal, K. u. a. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1739:198–210
- Irwin, S. A. u. a. (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *American journal of medical genetics* 98:161–167
- Ishino, Y. u. a. (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology* 169:5429–5433
- Ito, E. u. a. (1994) Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:534–538
- Jansen, R. u. a. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology* 43:1565–1575
- Jarrett, J. T., Lansbury Jr, P. T. (1993) Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? *Cell* 73:1055–1058
- Jinek, M. u. a. (2012) A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science* 337:816–821
- Kang, J., Lemaire, H.-G. u. a. (1987) The precursor of Alzheimer’s disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736
- 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. *Biochemical and biophysical research communications* 166:1192–1200
- Kimberly, W. T. u. a. (2003) γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:6382–6387
- Kopil, C. M. u. a. (2011) Calpain-cleaved typ 1 inositol 1,4,5-triphosphatase receptor has InsP3-independent gating and disrupts intracellular calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* 286:35998–36010
- Korkotian, E., Segal, M. (1999a) Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:12068–12072

- Korkotian, E., Frotscher, M., Segal, M. (2014) Synaptopodin regulates spine plasticity: mediation by calcium stores. *Journal of Neuroscience* 34:11641–11651
- Korkotian, E., Oni-Biton, E., Segal, M. (2017) The role of the store-operated calcium entry channel Orai1 in cultured rat hippocampal synapse formation and plasticity. *The Journal of physiology* 595:125–140
- Korkotian, E., Segal, M. (1999b) Bidirectional regulation of dendritic spine dimensions by glutamate receptors. *Neuroreport* 10:2875–2877
- Kraft, R. (2015) STIM and ORAI proteins in the nervous system. *Channels* 9:245–252
- Kuchibhotla, K. V. u. a. (2008) $A\beta$ plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* 59:214–225
- Kushnireva, L., Korkotian, E., Segal, M. (2020) Calcium sensors STIM1 and STIM2 regulate different calcium functions in cultured hippocampal neurons. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 12
- LaFerla, F. M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 3:862–872
- Lalonde, J., Saia, G., Gill, G. (2014) Store-operated calcium entry promotes the degradation of the transcription factor Sp4 in resting neurons. *Science signaling* 7:ra51–ra51
- Lammich, S. u. a. (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:3922–3927
- Larson, J. u. a. (1999) Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain research* 840:23–35
- Laudon, H. u. a. (2005) A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *Journal of Biological Chemistry* 280:35352–35360
- Lazzari, C. u. a. (2011) Cellular prion protein is implicated in the regulation of local Ca^{2+} movements in cerebellar granule neurons. *Journal of neurochemistry* 116:881–890
- Lee, E. K. u. a. (2010) hnRNP C promotes APP translation by competing with FMRP for APP mRNA recruitment to P bodies. *Nature structural & molecular biology* 17:732
- Lee, J.-H. u. a. (2015) Presenilin 1 maintains lysosomal Ca^{2+} homeostasis via TRPML1 by regulating vATPase-mediated lysosome acidification. *Cell reports* 12:1430–1444
- Leissring, M. A. u. a. (2000) Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *The Journal of cell biology* 149:793–798

- Liang, B. u. a. (2010) Calpain activation promotes BACE1 expression, amyloid precursor protein processing, and amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* 285:27737–27744
- Liou, J., Fivaz, M. u. a. (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:9301–9306
- Liou, J., Kim, M. L. u. a. (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current biology* 15:1235–1241
- Litjens, T. u. a. (2004) Fast Ca(2+)-dependent inactivation of the store-operated Ca²⁺ current (ISOC) in liver cells: a role for calmodulin. *J Physiol*
- Liu, F., Zaidi, T. u. a. (2002) Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* 115:829–837
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I. u. a. (2005) Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *Journal of Biological Chemistry* 280:37755–37762
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25:402–408
- Lopez Sanchez, M. I. G., Wijngaarden, P. van, Trounce, I. A. (2019) Amyloid precursor protein-mediated mitochondrial regulation and Alzheimer's disease. *British journal of pharmacology* 176:3464–3474
- Ludwig, A. L., Espinal, G. M. u. a. (2014) CNS expression of murine fragile X protein (FMRP) as a function of CGG-repeat size. *Human molecular genetics* 23:3228–3238
- Ludwig, A. L., Hershey, J. W. B., Hagerman, P. J. (2011) Initiation of translation of the FMR1 mRNA Occurs predominantly through 5-end-dependent ribosomal scanning. *Journal of molecular biology* 407:21–34
- Luik, R. M. u. a. (2006) The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *The Journal of cell biology* 174:815–825
- Lynch, G. (1998) Memory and the brain: unexpected chemistries and a new pharmacology. *Neurobiol Learn Mem.*82–100
- Ma, G. u. a. (2005) APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in γ -secretase complexes during embryonic development. *Journal of Neuroscience* 25:192–198
- Ma, Z. u. a. (2012) Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the pore-forming subunit of an ion channel that mediates extracellular Ca²⁺ regulation of neuronal excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:E1963–E1971

- Majewski, L., Kuznicki, J. (2015) SOCE in neurons: signaling or just refilling? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1853:1940–1952
- Makarova, K. S. u. a. (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* 13:722–736
- Marlow, L. u. a. (2003) β -secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *Journal of Molecular Neuroscience* 20:233–239
- Masters, J. R., Hrsg. (2000) *Animal cell culture : a practical approach*. 3rd ed. Practical approach series ; 232. Oxford: Oxford University Press
- Matsuzaki, M. (2007) Factors critical for the plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neuroscience research* 57:1–9
- Mattson, M. P., Guo, Q. u. a. (1998) Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 70:1–14
- Mattson, M. P., Mark, R. J. u. a. (1997) Disruption of brain cell ion homeostasis in Alzheimer's disease by oxy radicals, and signaling pathways that protect therefrom. *Chemical research in toxicology* 10:507–517
- Mattson, M. P. (1990) Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Calcium influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 4:105–117
- Mattson, M. P. (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiological reviews* 77:1081–1132
- Mattson, M. P., LaFerla, F. M. u. a. (2000) Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences* 23:222–229
- Mellström, B., Naranjo, J. R. (2001) Mechanisms of Ca²⁺-dependent transcription. *Current opinion in neurobiology* 11:312–319
- Mett, J. (2014) „Die Regulation A β -degradierender Enzyme durch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und die Lipidhomöostase“. Diss. Universität des Saarlandes
- Mitchell, A. J., Shiri-Feshki, M. (2009) Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia—meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 119:252–265
- Moccia, F. u. a. (2015) Stim and Orai proteins in neuronal Ca²⁺ signaling and excitability. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:153
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C. u. a. (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155:733–740
- Mojica, F. J. M., Ferrer, C. u. a. (1995) Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax*

- volcanii and could be involved in replicon partitioning. *Molecular microbiology* 17:85–93
- Mojica, F. J. M., García-Martínez, J., Soria, E. u. a. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution* 60:174–182
- Morales-Corraliza, J. u. a. (2012) Calpastatin modulates APP processing in the brains of β -amyloid depositing but not wild-type mice. *Neurobiology of aging* 33:1125–e9
- Nalavadi, V. C. u. a. (2012) Dephosphorylation-induced ubiquitination and degradation of FMRP in dendrites: a role in immediate early mGluR-stimulated translation. *Journal of Neuroscience* 32:2582–2587
- Nilius, B., Owsianik, G. (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology* 12:218
- Nishiyama, M. u. a. (2000) Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 408:584–588
- Nosyreva, E. D., Huber, K. M. (2006) Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. *Journal of neurophysiology* 95:3291–3295
- O'Donnell, W. T., Warren, S. T. (2002) A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annual review of neuroscience* 25:315–338
- Ong, H. L. u. a. (2015) STIM2 enhances receptor-stimulated Ca²⁺ signaling by promoting recruitment of STIM1 to the endoplasmic reticulum–plasma membrane junctions. *Science signaling* 8:ra3–ra3
- Palty, R., Raveh, A. u. a. (2012) SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* 149:425–438
- Palty, R., Stanley, C., Isacoff, E. Y. (2015) Critical role for Orai1 C-terminal domain and TM4 in CRAC channel gating. *Cell research* 25:963–980
- Parekh, A. B., Putney Jr, J. W. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiological reviews* 85:757–810
- Parks, A. L., Curtis, D. (2007) Presenilin diversifies its portfolio. *Trends in Genetics* 23:140–150
- Parvathy, S. u. a. (1999) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by α -secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* 38:9728–9734
- Pascual-Caro, C. u. a. (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. *Journal of Molecular Medicine* 96:1061–1079

- Peng, X. u. a. (2003) Genus-specific protein binding to the large clusters of DNA repeats (short regularly spaced repeats) present in *Sulfolobus* genomes. *Journal of bacteriology* 185:2410–2417
- Peter Cavanagh, A. G. (2014) *CRISPR Mechanism, CRISPR/Cas9*, Tufts University. URL: <http://sites.tufts.edu/crispr/> (besucht am 19.01.2021)
- Pieretti, M. u. a. (1991) Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66:817–822
- Pierrot, N. u. a. (2004) Intraneuronal amyloid- β 1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *Journal of neurochemistry* 88:1140–1150
- Popugaeva, E., Bezprozvanny, I. (2013) Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Frontiers in molecular neuroscience* 6:29
- Popugaeva, E., Pchitskaya, E. u. a. (2015) STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. *Molecular neurodegeneration* 10:1–13
- Pourcel, C., Salvignol, G., Vergnaud, G. (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151:653–663
- Preto, D. I. u. a. (2014) Reduced excitatory amino acid transporter 1 and metabotropic glutamate receptor 5 expression in the cerebellum of fragile X mental retardation gene 1 premutation carriers with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Neurobiology of aging* 35:1189–1197
- Putney Jr, J. W. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium* 7:1–12
- Ran, F. A. u. a. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system
- Rao, M. V. u. a. (2008) Marked calpastatin (CAST) depletion in Alzheimer's disease accelerates cytoskeleton disruption and neurodegeneration: neuroprotection by CAST overexpression. *Journal of Neuroscience* 28:12241–12254
- Renbaum, P., Levy-Lahad, E. (1998) Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: presenilin-2 mutations. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 54:910–919
- Renoux, A. J. u. a. (2014) Fragile X mental retardation protein expression in Alzheimer's disease. *Frontiers in genetics* 5:360
- Ring, S. u. a. (2007) The secreted β -amyloid precursor protein ectodomain APPs α is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *Journal of Neuroscience* 27:7817–7826

- Roberts, S. B. u. a. (1994) Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 269:3111–3116
- Roos, J. u. a. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *The Journal of cell biology* 169:435–445
- Rothhaar, T. L. u. a. (2012) Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting γ -secretase activity in Alzheimer's disease. *The Scientific World Journal* 2012
- Sabo, S. L. u. a. (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *The Journal of cell biology* 153:1403–1414
- Sabo, S. L. u. a. (2003) The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience* 23:5407–5415
- Saito, K. u. a. (1993) Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Science* 90:2628–2632
- Sala, C., Segal, M. (2014) Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiological reviews* 94:141–188
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. u. a. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press
- Santos, A. N. u. a. (2012) Amyloid- β oligomers in cerebrospinal fluid are associated with cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* 29:171–176
- Sapranaukas, R. u. a. (2011) The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 39:9275–9282
- Sashital, D. G., Wiedenheft, B., Doudna, J. A. (2012) Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Molecular cell* 46:606–615
- Sastre, M. u. a. (2001) Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO reports* 2:835–841
- Scremin, E. u. a. (2020) ORAI2 down-regulation potentiates SOCE and decreases A β 42 accumulation in human neuroglioma cells. *International journal of molecular sciences* 21:5288
- Segal, M., Korkotian, E. (2014) Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines. *Frontiers in neuroanatomy* 8:64

- Selkoe, D. J., Wolfe, M. S. (2007) Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 131:215–221
- Shen, J. u. a. (1997) Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89:629–639
- Shideman, C. R., Reinardy, J. L., Thayer, S. A. (2009) γ -Secretase activity modulates store-operated Ca²⁺ entry into rat sensory neurons. *Neuroscience letters* 451:124–128
- Siman, R., Card, J. P., Davis, L. G. (1990) Proteolytic processing of beta-amyloid precursor by calpain I. *Journal of Neuroscience* 10:2400–2411
- Smith, P. K. e. u. a. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150:76–85
- Sokol, D. K. u. a. (2011) Autism, Alzheimer disease, and fragile X: APP, FMRP, and mGluR5 are molecular links. *Neurology* 76:1344–1352
- Spassova, M. A. u. a. (2006) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:4040–4045
- Stathopoulos, P. B. u. a. (2008) Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell* 135:110–122
- Steinbeck, J. A. u. a. (2011) Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. *Experimental neurology* 232:185–194
- Stephan, B. u. a. (2012) The neuropathological profile of mild cognitive impairment (MCI): a systematic review. *Molecular psychiatry* 17:1056–1076
- Sun, S. u. a. (2014) Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. *Neuron* 82:79–93
- Supnet, C., Bezprozvanny, I. (2010) The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell calcium* 47:183–189
- Sutcliffe, J. S. u. a. (1992) DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Human molecular genetics* 1:397–400
- Takemura, H., Putney Jr, J. W. (1989) Capacitative calcium entry in parotid acinar cells. *Biochemical Journal* 258:409–412
- Takemura, H., Hughes, A. R. u. a. (1989) Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 264:12266–12271

- Tamagno, E. u. a. (2002) Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiology of disease* 10:279–288
- Teixidó, L. u. a. (2011) Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell calcium* 49:184–190
- The Nobel Prize in Chemistry 2020* (2021). URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/> (besucht am 15.01.2021)
- Thibault, O. u. a. (2012) Reduction in neuronal L-type calcium channel activity in a double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1822:546–549
- Treiman, M., Caspersen, C., Christensen, S. B. (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Trends in pharmacological sciences* 19:131–135
- Trinchese, F. u. a. (2008) Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation* 118:2796–2807
- Uhlen, M. (2015) Tissue-based map of the human proteome. *Science*
- Van der Oost, J. u. a. (2009) CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in biochemical sciences* 34:401–407
- Vandenberghe, R. u. a. (2010) ^{18}F -flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Annals of neurology* 68:319–329
- Vassar, R. u. a. (1999) β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *science* 286:735–741
- Vetrivel, K. S. u. a. (2006) Pathological and physiological functions of presenilins. *Molecular neurodegeneration* 1:4
- Vig, M. u. a. (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science* 312:1220–1223
- Vincent, B. (2016) Regulation of the α -secretase ADAM10 at transcriptional, translational and post-translational levels. *Brain research bulletin* 126:154–169
- Visser, P. J. u. a. (2002) Medial temporal lobe atrophy predicts Alzheimer's disease in patients with minor cognitive impairment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 72:491–497
- Wang, H.-Y. u. a. (2000) β -Amyloid $_{1-42}$ binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity: implications for Alzheimer's disease pathology. *Journal of Biological Chemistry* 275:5626–5632

- Wasco, W., Bupp, K. u. a. (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:10758–10762
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S. u. a. (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid β protein precursor. *Nature genetics* 5:95–100
- Weidemann, A. u. a. (2002) A novel -cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41:2825–2835
- Westmark, C. J., Malter, J. S. (2007) FMRP mediates mGluR 5-dependent translation of amyloid precursor protein. *PLoS Biol* 5:e52
- Westmark, C. J., Westmark, P. R. u. a. (2011) Reversal of fragile X phenotypes by manipulation of A β PP/A β levels in Fmr1 KO mice. *PLoS one* 6:e26549
- Williams, R. T. u. a. (2001) Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochemical Journal* 357:673–685
- Williamson, R., Sutherland, C. (2011) Neuronal membranes are key to the pathogenesis of Alzheimer's disease: the role of both raft and non-raft membrane domains. *Current Alzheimer Research* 8:213–221
- Williamson, W. R. u. a. (2010) A dual function of V0-ATPase a1 provides an endolysosomal degradation mechanism in *Drosophila melanogaster* photoreceptors. *Journal of Cell Biology* 189:885–899
- Workgroup, A. A. C. H., Khachaturian, Z. S. (2017) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: a framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimer's & Dementia* 13:178–182
- World Alzheimer Report 2020* (2020). URL: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2020/> (besucht am 13.03.2021)
- Wright, A. V. u. a. (2017) Structures of the CRISPR genome integration complex. *Science* 357:1113–1118
- Wu, J. u. a. (2011) Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment. *Chemistry & biology* 18:777–793
- Yang, X. u. a. (2012) Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:5657–5662. eprint: <https://www.pnas.org/content/109/15/5657.full.pdf>. URL: <https://www.pnas.org/content/109/15/5657>

- Yoo, A. S. u. a. (2000) Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron* 27:561–572
- Yu, G. u. a. (2000) Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature* 407:48–54
- Yuan, J. P. u. a. (2009) SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature cell biology* 11:337–343
- Zaretsky, D. V., Zaretskaia, M. (2020) Degradation Products of Amyloid Protein: Are They The Culprits? *Current Alzheimer Research* 17:869–880
- Zeiger, W. u. a. (2013) Ca^{2+} influx through store-operated Ca^{2+} channels reduces Alzheimer disease β -amyloid peptide secretion. *Journal of Biological Chemistry* 288:26955–26966
- Zhang, H., Sun, S. u. a. (2016) Store-operated calcium channel complex in postsynaptic spines: a new therapeutic target for Alzheimer's disease treatment. *Journal of Neuroscience* 36:11837–11850
- Zhang, H., Wu, L. u. a. (2015) Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in amyloid precursor protein knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 35:13275–13286
- Zhang, S. L. u. a. (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:9357–9362
- Zhao, G. u. a. (2004) Identification of a new presenilin-dependent ζ -cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 279:50647–50650
- Zheng, L. u. a. (2008) Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca^{2+} sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochemical and biophysical research communications* 369:240–246
- Zhou, Y. u. a. (2010) Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:4896–4901
- Zweifach, A., Lewis, R. S. (1995) Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and-independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 270:14445–14451

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung für experimentelle Neurologie an der Universität des Saarlandes angefertigt.

Die Abteilung steht unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Tobias Hartmann. Ich möchte mich bei ihm bedanken, dass er mir mit Aufnahme in die Arbeitsgruppe, der Bereitstellung des Themas und der finanziellen Rahmenbedingungen die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht hat. Darüber hinaus war er mir als mein Doktorvater ein zuverlässiger Ansprechpartner.

PD Dr. Marcus Grimm danke ich für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und fachliche Unterstützung.

Bei unserer Kooperations-AG unter Leitung von Frau Prof. Dr. Barbara Niemeyer möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt auch allen Mitgliedern der experimentellen Neurologie. Insbesondere danke ich Anna Lauer, Daniel Janitschke, Jakob Winkler und Olga Streidenberger für das gute, immer hilfsbereite und angenehme Zusammenarbeiten in freundschaftlicher Atmosphäre. Neben vieler Arbeitsstunden bleiben mir mit euch auch andere Erlebnisse in guter Erinnerung.

Ich bedanke mich bei Carolin Marmulla für die Übersetzung der Zusammenfassung ins Englische. Außerdem möchte ich mich bei Valerie Thalhofer für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Tag der Promotion:	23.01.2023
Dekan:	Prof. Dr. Michael D. Menger
Berichterstatter:	Prof. Dr. Marcus Grimm Prof. Dr. Ulrich Boehm