

**Regulierung des speicherabhängigen Ca^{2+} -Kanals Orai1
und des Ca^{2+} -sensitiven Proteins STIM1 durch die Serum-
und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Anja Eylenstein geb. Kunert

aus Magdeburg

Tübingen 2011

Tag der mündlichen Prüfung:

25.10.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Florian Lang

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Kalzium-Struktur und Funktion in der Zelle.....	1
1.2 <i>Calcium release activated Calcium current</i> (I_{CRAC}).....	2
1.2.1 Molekulare Komponenten des I_{CRAC}	3
1.2.1.1 STIM1	4
1.2.1.2 Orai1	6
1.2.2 Regulierung von I_{CRAC}	8
1.2.2.1 Experimentelle Regulierung.....	8
1.2.2.2 Intrazelluläre Regulierung.....	8
1.3 Serum-und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1	10
1.4 Zielstellung.....	12
2 MATERIAL	14
2.1 Chemikalien.....	14
2.2 Puffer/ Lösungen	15
2.3 Geräte	18
2.4 Vorgefertigte Systeme.....	19
2.5 DNA-Längenstandard und Protein Marker	19
2.6 Enzyme.....	20
2.6.1 Restriktionsendonukleasen.....	20
2.6.2 Polymerasen	20
2.6.3 Sonstige Enzyme	20
2.7 Antikörper	21
2.7.1 Primäre Antikörper.....	21
2.7.2 Sekundäre Antikörper	21
2.8 Oligonukleotide	22
2.8.1 Oligonukleotide Promotorklonierung	22
2.8.2 Oligonukleotide RT-PCR.....	22
2.8.3 Oligonukleotide Sequenzierung	23

2.9	siRNA.....	23
2.10	Vektoren.....	23
3	METHODEN	27
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.1.1	Präparation genomischer DNA	27
3.1.2	RNA-Isolation	27
3.1.3	cDNA-Synthese.....	28
3.1.4	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
3.1.5	Quantitative Real-time PCR (RT-PCR).....	29
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	30
3.1.7	Agarosegel-Elektrophorese	30
3.1.8	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	31
3.1.9	Dephosphorylierung von Vektor.....	31
3.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	31
3.1.11	Hitzeschocktransformation von E.coli DH5 α	32
3.1.12	Plasmidpräparation mittels Macherey-Nagel Kits	32
3.1.13	Sequenzierung von DNA	32
3.1.14	Phenol-Chloroform-Extraktion	33
3.1.15	Alkoholpräzipitation.....	33
3.2	Zellbiologische Methoden.....	33
3.2.1	Kultivierung Humane Embryonale Kidney (HEK293) Zellen	33
3.2.2	Kultivierung Mastzellen.....	34
3.2.3	Transiente Transfektion von HEK293 Zellen	34
3.2.3.1	Transfektion mit Fugene HD Reagenz	34
3.2.3.2	Transfektion mit Interferin Reagenz	34
3.2.4	Immunfluoreszenz-Messung	35
3.3	Bestimmung des Ca ²⁺ -Eintritts.....	35
3.3.1	Ca ²⁺ -Imaging	35
3.3.2	Flusszytometrie (FACS).....	36
3.3.3	Patch-Clamp.....	36
3.4	Proteinchemische Methoden	37
3.4.1	Zelllyse	37
3.4.2	Biotinylierung.....	37
3.4.3	Immunopräzipitation	38

3.4.3.1	Ko-Immunopräzipitation	38
3.4.3.2	Chromatin-Immunopräzipitation.....	38
3.4.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	40
3.4.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.4.6	Western Blot.....	41
3.4.7	Detektion von Proteinen.....	41
3.5	Reportergerneprüfung mittels Luziferase.....	41
4	ERGEBNISSE.....	43
4.1	Regulierung der Orai1-Proteinabundanz durch SGK1.....	43
4.1.1	Bestimmung von SOCE und I_{CRAC} in Mastzellen und HEK293 Zellen mittels Ca^{2+} -Imaging und Patch-Clamp Technik.....	43
4.1.2	Bestimmung der Membran- und Gesamtproteinmenge von Orai1	45
4.1.3	Beeinflussung von SOCE und I_{CRAC} durch Nedd4-2.....	48
4.1.4	Regulierung der Membranlokalisation von Orai1 durch Nedd4-2.....	51
4.2	Regulierung der Transkription von Orai1 und STIM1.....	54
4.2.1	Bestimmung der mRNA-Level von Orai1 und STIM1.....	54
4.2.2	Einfluss der Inhibitoren Lithiumchlorid, Wogonin und Sulfasalazin auf die Orai1- und STIM1 mRNA-Level.....	56
4.2.3	Einfluss von p65/p50 und p65/p52 auf die mRNA- und Protein-Level von STIM1/Orai1	58
4.3	Einfluss von SGK1 auf die nukleäre Translokation von NF- κ B.....	61
4.4	SOCE in Abhängigkeit von NF- κ B.....	62
4.5	Regulierung von Orai1- und STIM1-Promotoren durch NF- κ B.....	65
4.5.1	Klonierung von putativen Promotorsequenzen von Orai1 und STIM1 für Luziferase-Reportergerne.....	65
4.5.2	Luziferase-Reportergerne von Orai1- und STIM1 Promotorfragmenten... ..	68
4.5.3	ChIP-Analyse von NF- κ B in Bezug auf STIM1- und Orai1-Promotorregionen.....	69
5	DISKUSSION.....	71
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
7	ANHANG.....	85
8	LITERATURVERZEICHNIS	87
	DANKSAGUNG.....	99
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	100

LEBENS LAUF 101
VERÖFFENTLICHUNGEN 104

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1 Messung I_{CRAC} mit Hilfe von Ganzzell-Ableitungen der <i>Patch-Clamp</i> -Technik (Abb. nach Putney 2010).....	3
Abb. 1-2 Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Einstroms nach Leerung des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers ER (Abb. nach Hogan <i>et al.</i> , 2010; Yuan <i>et al.</i> , 2009).....	4
Abb. 1-3 Schema der Domänenstruktur von STIM1 (Abb. nach Hogan <i>et al.</i> , 2010; Yuan <i>et al.</i> , 2009).....	5
Abb. 1-4 Model von Orai1 in der Plasmamembran (McNally <i>et al.</i> , 2009).	7
Abb. 2-1 Vektorkarte pcDNA3.1+.....	23
Abb. 2-2 Vektorkarte pGL3-Enhancer.....	24
Abb. 2-3 Vektorkarte cFlag pcDNA3 RelA.....	24
Abb. 2-4 Vektorkarte pIRES2_EGFP.....	25
Abb. 2-5 Vektorkarte mFPR-C2.....	25
Abb. 2-6 Vektorkarte pCMV-Sport6.....	26
Abb. 2-7 Vektorkarte pOTB7.....	26
Abb. 4-1 Intrazelluläres Ca^{2+} - <i>Imaging</i> des SOCE in Mastzellen aus <i>sgk1</i> ^{-/-} - und <i>sgk1</i> ^{+/+} - Mäusen.	43
Abb. 4-2 Intrazelluläres Ca^{2+} - <i>Imaging</i> des SOCE in HEK293-Orai1 Zellen sowie Varianten mit zusätzlichen überexprimierenden STIM1 und konstitutiv aktiver oder inaktiver Mutante von SGK1.	44
Abb. 4-3 Ganzzell-Ableitungen der <i>Patch-Clamp</i> -Technik in STIM1 überexprimierenden HEK293-Orai1 Zellen sowie in STIM1 transient transfizierten HEK293-Orai1 Zellen mit zusätzlich überexprimierter aktiver oder inaktiver Mutante von SGK1.	45
Abb. 4-4 Bestimmung der Orai1-Gesamtproteinmenge in HEK293-Orai1 Zellen, welche mit pIRES2_EGFP_SGK1 ^{S422D} bzw. pIRES2_EGFP_SGK1 ^{K127N} transfiziert wurden.....	46
Abb. 4-5 Bestimmung der membranständigen Orai1-Proteinmenge in HEK293-Orai1 Zellen, welche mit pIRES2_EGFP_SGK1 ^{S422D} bzw. pIRES2_EGFP_SGK1 ^{K127N} transfiziert wurden.	47
Abb. 4-6. Immunfluoreszenz von HEK293-Orai1 Zellen nach Orai1-selektiver FITC-Antikörpermarkierung (grün).	48
Abb. 4-7 Bestimmung von ubiquitiniertem Orai1 in HEK293-Orai1 Zellen nach Transfektion mit pcDNA3.1+, pcDNA3+_HA-Ubiquitin sowie Behandlung mit 50 μ M MG132.	49
Abb. 4-8 FACS-Analyse des Ca^{2+} -Einstroms in HEK293-Orai1 Zellen, welche STIM1 oder STIM1/Nedd4-2 exprimierten.....	50

Abb. 4-9 Ca^{2+} - <i>Imaging</i> zur Analyse des Ca^{2+} -Einstroms in HEK293 Zellen, welche stabil Orai1 und zusätzlich STIM1, STIM1/SGK1 ^{S422D} , STIM1/Nedd4-2 oder STIM1/Nedd4-2 und SGK1 ^{S422D} überexprimierten.	51
Abb. 4-10 Immunfluoreszenz von HEK293-Orai1 Zellen, nach Orai1-selektiver FITC-Antikörpermarkierung (grün).	52
Abb. 4-11 Western Blot-Analyse von Orai1-Protein nach RNA-Interferenz gegen Nedd4-2.	53
Abb. 4-12 Bestimmung der Orai1-Abundanz in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Nedd4-2 und Nedd4-2/SGK1 ^{S422D} mittels Western Blot.	54
Abb. 4-13 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in Mastzellen.	55
Abb. 4-14 RT-PCR Analyse der relativen mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen, welche SGK1 ^{S422D} oder SGK1 ^{K127N} überexprimierten.	55
Abb. 4-15 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen, welche mit dem GSK3 β -Inhibitor LiCl behandelt wurden oder β -Catenin überexprimierten.	57
Abb. 4-16 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen, welche mit den NF- κ B-Inhibitoren Wogonin oder Sulfasalazin behandelt wurden.	58
Abb. 4-17 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen, welche die NF- κ B Untereinheiten p65 und p50 oder p65 und p52 überexprimierten.	59
Abb. 4-18 Western Blot Analyse von HEK293-Zelllysaten, die mit pcDNA3.1+, cFlag pcDNA3_p65/pCMV_Sport6_p50 oder cFlag pcDNA3_p65/pOTB7_p52 transfiziert waren.	60
Abb. 4-19 RT-PCR und Western Blot Analyse von HEK293 Zellen, die mit siRNA gegen RELA, NFKB1 oder NFKB2 transfiziert waren.	61
Abb. 4-20 Immunfluoreszenz von p65 in HEK293 Zellen nach Transfektion mit pcDNA3.1+, pcDNA3.1+_SGK1 ^{S422D} oder pcDNA3.1+_SGK1 ^{K127N}	62
Abb. 4-21 Ca^{2+} - <i>Imaging</i> von SOCE in HEK293 Zellen in Abhängigkeit vom NF- κ B-Inhibitor Wogonin.	63
Abb. 4-22 Ca^{2+} - <i>Imaging</i> Messungen von SOCE in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von den überexprimierten NF- κ B Untereinheiten p65/p50 oder p65/p52 sowie dem NF- κ B-Inhibitor Wogonin und SOCE-Inhibitor 2-APB.	64
Abb. 4-23 Ca^{2+} - <i>Imaging</i> Messungen der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER in HEK293 Zellen, die mit pIRES2_EGFP oder pIRES_STIM1 transfiziert wurden, nach Applikation von 1 μ M Thapsigargin.	65
Abb. 4-24 1%iges Agarosegel der amplifizierten Teilpromotorsequenzen für Orai1 und STIM1.	66
Abb. 4-25 1%iges Agarosegel zur Überprüfung der Linearisierung von pGL3_Enhancer.	66
Abb. 4-26 1%iges Agarosegel des Verbaus der klonierten Promotorfragmente.	67
Abb. 4-27 Luziferase-Reportergentest von Fragmenten aus STIM1- und Orai1-Promotoren nach p65-Stimulierung.	68

Abb. 4-28 1%iges Agarosegel nach PCR der Chromatin-Immunopräzipitation in HEK293 Zellen, die mit pcDNA3.1+ oder cFlag pcDNA_p65 transfiziert waren.	70
Abb. 5-1 Postulierte Regulierung von STIM1/Orai1 über den PI3K-Signalweg.	82
Abb. 7-1 Analyse der DNA Sequenz des Chromosoms 12q24.31 in der Region 2491 bp vor dem Transkriptionsstart für Orai1.	85
Abb. 7-2 Analyse der DNA Sequenz des Chromosoms 12q24.31 in der Region 1831 bp vor dem Transkriptionsstart für Orai1.	85
Abb. 7-3 Analyse der DNA Sequenz des Chromosoms 11p15.5 in der Region 3000 bp vor dem Transkriptionsstart für STIM1.	85

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2-1 Verwendete primäre Antikörper	21
Tab. 2-2 Verwendete sekundäre Antikörper	21
Tab. 2-3 Verwendete Oligonukleotide für die RT-PCR	22
Tab. 2-4 Sequenzen verwendeter siRNA	23
Tab. 4-1 Verwendete Restriktionsenzyme zum Verdau der klonierten Promotorteilsequenzen	67
Tab. 7-1 Transfektionsschema für Luziferase-Reportergentest	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl Borat
BAPTA	1,2-Bis (o-aminophenoxy) ethan-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Ca ²⁺	Kalzium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGTA	Ethylen glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FcεRI	Antigenrezeptor IgE
FCS	Fetales Rinderserum
FITC	Fluoreszin Isothiocyanat
HEK293	Humane Embryonale Kidney Zellen
HRP	<i>Horse raddish peroxidase</i>
I _{CRAC}	<i>Ca²⁺ release activated Ca²⁺-Current</i>
IGF	<i>Insulin like growth factor</i>
IKK	I-κB Kinase
InR	Insulinrezeptor
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
I-κB Proteine	Inhibierende κB Proteine
LBA	Lysogeny Broth Antibiotica
MLCK	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>
Nedd4-2	<i>Neuronal precursor cells developmentally down regulated 4-2</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	<i>3-Phosphoinositide dependent kinase</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RHD	Rel homologe Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
Ry	Ryanodin

SAM	Sterile Alpha Motif
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SERCA	Sarkoplasmatic/Endoplasmatic Retikulum Ca^{2+} ATPase
SGK1	<i>Serum- and glucocorticoid inducible kinase 1</i>
SOC	<i>Super optimal catabolite repression</i>
SOCE	<i>Store Operated Ca^{2+} Entry</i>
STIM	<i>Stromal Interacting Molecule</i>
TAD	Transkriptionsaktivierungsdomäne
TBP	TATA Box Binde-Protein
TM	Transmembrandomäne
TRP	Transiente Rezeptor Proteine
ü.N.	Über Nacht
v/v	Volumen/Volumenprozent
Vol	Volumen
w/v	Gewicht/Volumenprozent

1 EINLEITUNG

1.1 Kalzium-Struktur und Funktion in der Zelle

Kalzium (Ca^{2+}) wird in der Zelle als ubiquitäres und vielseitiges Signalmolekül genutzt. In ruhenden Zellen liegt es in einer Konzentration von etwa 100 nM vor. Ca^{2+} kann vielfältige Prozesse wie Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose, Transkription, Zellzyklus, Hormon- oder Neurotransmitter-Freisetzung beeinflussen (Berridge *et al.*, 2003). Durch verschiedene Stimuli kann die Konzentration auf etwa das Zehnfache ansteigen. In der Zelle reagiert Ca^{2+} mit verschiedenen Ca^{2+} -bindenden Proteinen, die als Ca^{2+} -Puffer oder Effektoren fungieren (Carafoli *et al.*, 2001). Diese Interaktion dient somit der Feinabstimmung räumlicher und zeitlicher Eigenschaften der Ca^{2+} -Signale (Berridge *et al.*, 2003). Die Vielseitigkeit der Ca^{2+} -Signale wird mittels Interaktion mit verschiedenen Signalwegen noch gesteigert (Berridge *et al.*, 2000).

Besonders gut beschrieben ist die Wirkung von Ca^{2+} auf Zellen des Immunsystems. Innerhalb weniger Minuten führt Ca^{2+} zur Degranulierung von Mastzellen, die zur Freisetzung von Histamin und Tumor Nekrose Faktor (TNF) α aus den Mastzellen führt (Di Capite und Parekh, 2009). Die Lyse von infizierten oder krebsartigen Zellen durch zytotoxische T-Zellen wird ebenfalls durch ein Ca^{2+} -Signal angeregt (Pores-Fernando und Zweifach, 2009). Ein anhaltender Ca^{2+} -Einstrom über mehrere Stunden, der durch T-Zell-, B-Zell- und Fc-Rezeptoren ausgelöst werden kann, ist verantwortlich für die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen und naiven T-Zellen sowie die Zytokin-Produktion in T-Zellen, Mastzellen und Natürlichen Killerzellen. Hierbei spielen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) sowie des *nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cells* (NF- κ B) eine wichtige Rolle (Hogan *et al.*, 2010; Klemm und Ruland, 2006).

Die Mobilisierung von Ca^{2+} erfolgt entweder aus internen Speichern, wie dem endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum (ER bzw. SR) oder aus dem Extrazellulärraum. Die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern wird unter anderem über Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3)-Rezeptoren oder Ryanodin (Ry)-Rezeptoren reguliert (Berridge *et al.*, 2000). Nach Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch Oberflächenrezeptoren und anschließender Synthese von IP_3 , wird Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern freigesetzt (Streb *et al.*, 1983). Durch Bindung des PLC-Produkts IP_3 an geeignete Rezeptoren in der Membran des ER gelangt Ca^{2+} in das Zytoplasma und kann dort als sekundärer Botenstoff fungieren (Gill *et al.*, 1989). Die Aktivierung der IP_3 -Rezeptoren

kann bei moderatem Anstieg von Ca^{2+} verstärkt und bei sehr hohen Ca^{2+} -Konzentrationen inhibiert werden (Bootman *et al.*, 2001). Die Ry-Rezeptoren sind sowohl strukturell als auch funktionell den IP_3 -Rezeptoren sehr ähnlich, sie kommen allerdings hauptsächlich in erregbaren Zellen vor, während IP_3 -Rezeptoren ubiquitär exprimiert werden (Bootman *et al.*, 2001).

Weiterhin kann Ca^{2+} über verschiedene spannungsabhängige, rezeptorregulierte oder sekundäre Botenstoff-regulierte Kanäle aus dem Extrazellularraum aufgenommen werden. Zudem kann es mit Hilfe der speicherabhängigen Ca^{2+} (*store operated Ca^{2+}* , SOC)-Kanäle (siehe 1.2) und transienten Rezeptor Protein (TRP)-Ionenkanäle in die Zelle gelangen (Berridge *et al.*, 2003).

Dem Einstrom von Ca^{2+} wirken verschiedene Ca^{2+} -Pumpen und -Austauscher wie die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die SR/ER Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und mitochondriale Uniporter entgegen, die Ca^{2+} aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum oder in interne Speicher transportieren. Im Ruhezustand der Zelle dienen sie zudem der Ca^{2+} -Homöostase und stellen sicher, dass die internen Ca^{2+} -Speicher gefüllt sind (Berridge *et al.*, 2003).

1.2 *Calcium release activated Calcium current* (I_{CRAC})

Aufgrund der begrenzten Speicherkapazitäten des ER ist es notwendig, dass Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum aufgenommen wird, um die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher nach der Freisetzung wieder zu füllen. Bereits vor 25 Jahren wurde von Putney ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die Ca^{2+} -Leerung der internen Speicher selber dazu führt, dass Ca^{2+} wieder in die Zelle aufgenommen wird und die Speicher aufgefüllt werden. Er nannte diesen Mechanismus zunächst kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom (Putney, 1986), später wurde der Mechanismus auch als speicherabhängiger Ca^{2+} -Einstrom (*store-operated Ca^{2+} entry*, SOCE) bekannt (Clapham, 1995).

Erstmalig konnten Hoth und Penner 1992 einen dem SOCE zugrundeliegenden Ionenstrom nachweisen. Durch Kombination von *Patch-Clamp* und *Ca^{2+} -Imaging* Experimenten gelang es ihnen, nach Leerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher in Mastzellen einen für Ca^{2+} -Ionen selektiven, anhaltenden, einwärts gerichteten Strom zu messen. Sie nannten diesen Ca^{2+} -Strom *Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} current* (I_{CRAC}) (Hoth und Penner, 1992). Mittlerweile ist I_{CRAC} wohl der am Besten charakterisierte SOCE, jedoch besteht die Möglichkeit, dass es weitere Membranströme gibt, die durch Leerung intrazellulärer Speicher aktiviert werden (Smyth *et al.*, 2010).

Seit Entdeckung von SOCE und im Speziellen I_{CRAC} wurde intensiv an der Charakterisierung und den molekularen Komponenten des I_{CRAC} geforscht. I_{CRAC} ist hochselektiv für Ca^{2+} gegenüber Ba^{2+} -, Mn^{2+} - und Sr^{2+} -Ionen und nicht über Änderungen des Membranpotential aktivierbar. Weiterhin zeigt I_{CRAC} einen charakteristischen stärker einwärts gerichteten Ca^{2+} -Strom gegenüber dem Auswärtstrom von Ca^{2+} . Dieser Effekt wird als Rektifizierung bezeichnet und bedeutet, dass sich der Kanal nicht wie ein Ohm'scher Widerstand verhält. (Hoth und Penner, 1992). Die Einzelkanal-Leitfähigkeit von I_{CRAC} ist zu gering, um sie direkt messen zu können. Durch Bildung des Quotienten der Leitfähigkeit und dem Mittelwert der Stromstärke in Gegenwart von Ca^{2+} wird sie auf wenige fS geschätzt (Zweifach und Lewis, 1993). Daher wird die Transmembranstromstärke von I_{CRAC} mittels Ganzzell-Ableitungen der *Patch-Clamp*-Technik bestimmt (vgl. Abb. 1-1).

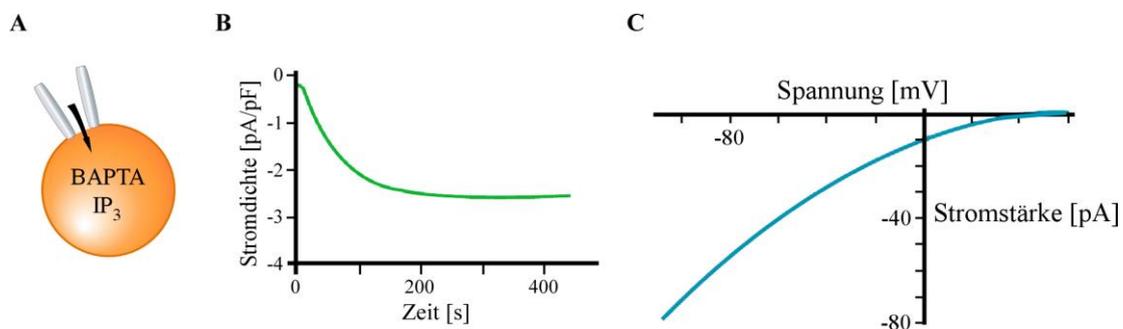


Abb. 1-1 Messung I_{CRAC} mit Hilfe von Ganzzell-Ableitungen der *Patch-Clamp*-Technik (Abb. nach Putney 2010).

A) I_{CRAC} -Messungen erfolgen unter anderem mit einem Ca^{2+} -Chelator wie 1,2-Bis (o-Aminophenoxy) ethan-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (BAPTA) oder Ethylen glykol-bis (2-Aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA) und einem Aktivator für I_{CRAC} wie IP_3 oder Thapsigargin. **B)** Die Leerung der Ca^{2+} -Speicher zeigt einen sich relativ langsam entwickelnden Einwärtsstrom, I_{CRAC} . Je nach Messeinstellung und Zelltyp liegen diese Ströme in einer Spanne zwischen 0,5-3,0 pA/pF. **C)** I_{CRAC} zeigt eine typische einwärts gerichtete Rektifizierung in der Strom-Spannungsbeziehung, da intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen extrem gering sind.

1.2.1 Molekulare Komponenten des I_{CRAC}

Damit I_{CRAC} ausgebildet werden kann, werden zwei Schlüsselkomponenten benötigt: ein Sensor, der die Ca^{2+} -Konzentration im ER misst und ein Kanal, über den nach Aktivierung durch den Ca^{2+} -Sensor Ca^{2+} in die intrazellulären Speicher einströmen kann. Als Ca^{2+} -Sensor in der ER-Membran konnte das *Stromal Interacting Molecule* (STIM) 1 identifiziert werden (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005). Die Proteine, die als Kanal fungieren und in der Plasmamembran lokalisiert sind, werden als Orai1-3 (Feske *et al.*, 2006; Gwack *et al.*, 2007; Vig *et al.*, 2006a) bezeichnet.

STIM1 registriert die Ca^{2+} -Leerung des ER über seine Ca^{2+} -affine EF-Hand/SAM-Domäne (siehe 1.2.1.1), was zu einer Konformationsänderung von STIM1 führt. Als Folge

oligomerisiert STIM1 zu Homodimeren und -tetrameren und wandert in die Nähe der Plasmamembran in sogenannte *Punctae*-Formationen, wo es Orai1 rekrutiert und als Folge Ca^{2+} in das ER gelangt (vgl. Abb. 1-2) (Liou *et al.*, 2007).

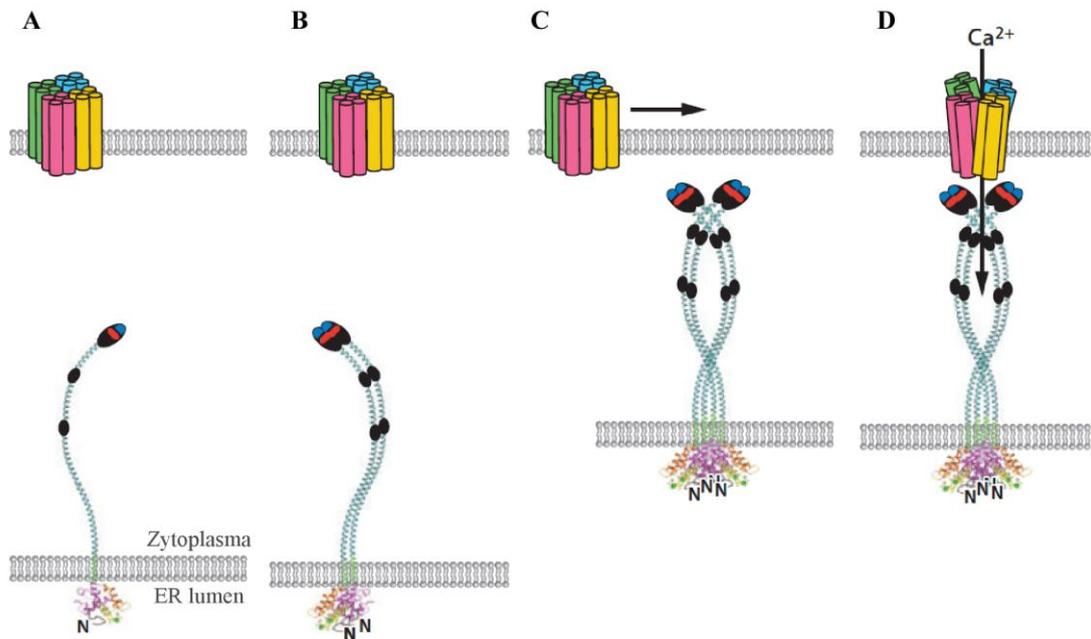


Abb. 1-2 Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Einstroms nach Leerung des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers ER (Abb. nach Hogan *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2009).

A) Ruhezustand in der Zelle, die intrazellulären Speicher sind mit Ca^{2+} gefüllt und STIM1 befindet sich als Monomer in der ER-Membran während Orai1 sich als Oligomer, wahrscheinlich als Tetramer, in der Plasmamembran befindet. **B)** Nach Stimulierung kommt es zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem ER, woraufhin sich STIM1-Dimere und -Tetramere bilden. **C)** Infolge der Ca^{2+} -Entleerung kommt es zur Migration der STIM1-Oligomere in die Nähe der Plasmamembran, wo sie über Interaktionen der C-terminalen Zyklopeptidregion mit Bereichen des N- und C-Terminus von Orai1 interagieren und diese zu Positionen nahe der ER-Membran navigieren. **D)** Dies bewirkt die Aktivierung des Orai1-Kanals, woraufhin Ca^{2+} zum Auffüllen des ER in die Zelle gelangt (Hogan *et al.*, 2010; Kawasaki *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Muik *et al.*, 2009; Muik *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009).

1.2.1.1 STIM1

Das Gen für STIM1 wurde schon lange vor der Identifizierung von Orai1 charakterisiert und zunächst als *GOK* bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt wurde es allerdings nicht als Bestandteil der Homöostase für Ca^{2+} -Signale beschrieben, sondern als mögliches Tumorsuppressor-Gen (Parker *et al.*, 1996).

Erst 2005 wurde durch Roos *et al.* eine Verbindung mit SOCE hergestellt, nachdem er in *Drosophila* S2 Zellen über 170 Gene mittels RNA Interferenz überprüft hatte und nur das *Drosophila stim* (*dstim*) einen Effekt auf SOCE zeigte (Roos *et al.*, 2005). Etwa gleichzeitig konnten Liou *et al.* durch RNA Interferenz Experimente in HeLa Zellen beweisen, dass zwei humane Homologe für *dstim*, nämlich *STIM1* und *STIM2*, existieren (Liou *et al.*, 2005). Die

Rolle, die STIM2 bei I_{CRAC} einnimmt, wird kontrovers diskutiert. Frühe Arbeiten zeigen, dass eine Überexpression von STIM2 sich inhibierend auf STIM1 vermittelten Ca^{2+} -Influx auswirkt (Soboloff *et al.*, 2006a). Soboloff schlug einen Mechanismus vor, bei dem STIM2 an STIM1 bindet und dadurch eine Umlagerung von STIM1 in *Punctae* verhindert (Soboloff *et al.*, 2006a). Bei Expression von STIM2 in physiologischen Konzentrationen konnte allerdings belegt werden, dass STIM2 bereits bei basalen Ca^{2+} -Konzentrationen im ER aktiv ist und darüber hinaus auch bei geringen Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen im ER weiter stimuliert werden kann und damit I_{CRAC} hervorruft (Brandman *et al.*, 2007).

STIM1 besteht aus 685 Aminosäuren und ist mit einer Transmembrandomäne (TM) in der Membran des ER lokalisiert, wo es nach Ca^{2+} -Entleerung des ER-Lumens I_{CRAC} durch die Konformationsänderung seiner Domänen aktiviert (vgl. Abb. 1-3) (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005b).

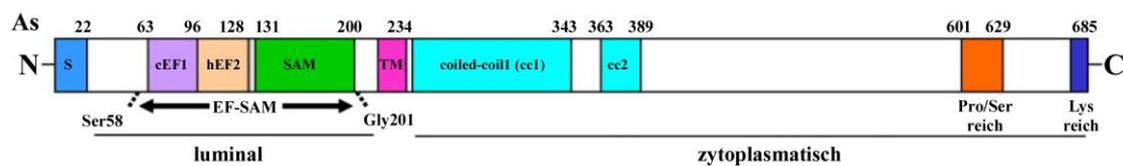


Abb. 1-3 Schema der Domänenstruktur von STIM1 (Abb. nach Hogan *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2009). Auf der extrazellulären luminalen N-terminalen Seite befinden sich eine Standard EF-Hand (lila, cEF1), eine verborgene EF-Hand (beige, hEF2), eine SAM-Domäne (grün, SAM) und ein ER Signal Peptid (blau, S) (Stathopoulos *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2001). Die zytosolische Region wird durch eine kurze Transmembrandomäne (pink, TM) von der luminalen Seite getrennt. Hier befinden sich zwei coiled-coil Domänen (hellblau, cc1, cc2) sowie die Prolin/Serin-reiche (orange) und die Lysin-reiche Region (dunkelblau) (Stathopoulos *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2001).

Die EF-Hand-Domäne fungiert als Ca^{2+} -Sensor, der im Lumen des ER die Ca^{2+} -Konzentration bewertet (Liou *et al.*, 2005; Soboloff *et al.*, 2006b; Stathopoulos *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005b). Die Affinität der EF-Hand zu Ca^{2+} ist vergleichsweise gering ($K_d \sim 0,2-0,6$ mM), befindet sich aber in Übereinstimmung mit den vorherrschenden hohen Ca^{2+} -Konzentrationen im ER ($\sim 0,2-2$ mM) (Stathopoulos *et al.*, 2006). Mutationen in der EF-Hand führen zu einer konstitutiven Aktivierung von STIM1 (Liou *et al.*, 2005; Mercer *et al.*, 2006; Spassova *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005b). Bei Anwesenheit von Ca^{2+} liegt STIM1 als Monomer in einer α -Helix-Struktur vor. Nimmt die Konzentration von Ca^{2+} ab, erfährt STIM1 eine Strukturveränderung. Dies wird durch Konformationsänderungen der EF-Hand/SAM-Domäne ausgelöst und führt zu einer Oligomerisierung mehrerer STIM1-Moleküle. Die Interaktion der STIM1-Moleküle wird dabei durch die SAM-Domäne unterstützt (Stathopoulos *et al.*, 2006; Stathopoulos *et al.*, 2008). Die versteckte EF-Hand bindet zwar kein Ca^{2+} , ist aber für die intramolekulare Assoziation der EF-Hand/SAM-Domäne

sowie die Stabilität der EF-Hand/SAM-Domäne wichtig (Stathopoulos *et al.*, 2008). Über die *coiled-coil*-Domänen sowie die Lysin-reiche Region auf der zytoplasmatischen Seite finden Interaktionen zwischen den STIM1-Molekülen statt und bewirken die Anordnung in den sogenannten *Punctae* (Baba *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009). Weiterhin konnten verschiedene Gruppen eine Region in STIM1 identifizieren, die zur Aktivierung des Orai1-Kanals benötigt wird, welche sie als *STIM Orai activating region* (SOAR) (Yuan *et al.*, 2009), *Orai activating small fragment* (OASF) (Muik *et al.*, 2009) bzw. *CRAC activating domain* (CAD) (Park *et al.*, 2009) bezeichneten. Diese umfasst die zweite *coiled-coil*-Domäne sowie die etwa 50 daran anschließenden Aminosäuren. Innerhalb der ersten ER-Membrannahen *coiled-coil*-Domäne wurde weiterhin eine Region gefunden, welche die SOAR-Region auto-inhibiert, indem sie mit der SOAR-Region interagiert (Korzeniowski *et al.*, 2010). Zudem wurde in STIM1 eine *CRAC modulatory domain* (CMD) zwischen den Aminosäuren 474 und 485 gefunden, die sieben saure Aminosäuren enthält, welche ebenfalls zur Inaktivierung von I_{CRAC} durch negative Rückkopplung bei Ca^{2+} -Einstrom beiträgt (*Ca²⁺ dependent inactivation*, CDI) (Derler *et al.*, 2009; Mullins *et al.*, 2009).

1.2.1.2 Orai1

Feske *et al.* konnten 2006 durch zwei verschiedene Herangehensweisen Orai1 als entscheidenden Ca^{2+} -Kanal für I_{CRAC} identifizieren (Feske *et al.*, 2006). Zum einen führten sie genetische Untersuchungen von Personen durch, deren I_{CRAC} fehlerhaft war und die an schwerem kombiniertem Immundefekt (*severe combined immunodeficiency*, SCID) litten. Hierbei konnten sie Orai1 als Ca^{2+} -Kanal identifizieren, dessen DNA-Sequenz bei den betroffenen Personen eine Punktmutation aufwies. Dies verursachte einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan (R91W), wodurch sich die Hydrophobizität des Kanals erhöht und zu defektem I_{CRAC} führt (Feske *et al.*, 2006). Zum anderen ergaben RNAi-Untersuchungen in *Drosophila*, dass der *knock down* von *dstim* und *dorai* Thapsigargin induzierten I_{CRAC} komplett hemmt (Feske *et al.*, 2006). Weitere Gruppen identifizierten etwa zur selben Zeit *dorai* in *Drosophila* sowie das humane homologe Gen *Orai1* in HEK293 Zellen (Vig *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2006).

Orai1 ist ein relativ kleines Protein mit 301 Aminosäuren und vier Transmembrandomänen (TM), wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert sind (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006b). Orai fungiert als Porenbildner in der Plasmamembran, durch den Ca^{2+} in die Zelle eintreten kann (Peinelt *et al.*, 2006; Prakriya *et al.*, 2006; Soboloff *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2006).

Wie die meisten Ionenkanäle wird auch bei I_{CRAC} der Ca^{2+} -Kanal mittels Multimerisierung durch die porenbildenden Untereinheiten gebildet (Vig *et al.*, 2006a). Es konnte gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Kanal aus einem Orai1-Tetramer besteht (Ji *et al.*, 2008; Mignen *et al.*, 2008; Penna *et al.*, 2008). Obwohl Orai1 eine mögliche N-Glykosylierungsstelle im extrazellulären Bereich zwischen TM3 und TM4 enthält, zeigen Mutationen der Glykosylierungsstelle keinen messbaren Einfluss auf I_{CRAC} (Gwack *et al.*, 2007). Allerdings konnten durch weitere Mutationsexperimente bereits verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, welche die Ionenselektivität von Orai1 beeinflussen (vgl. Abb. 1-4). Die Schleifenregion zwischen TM1 und TM2 ist hoch flexibel und kann somit zur Blockade des Kanals beitragen, während TM1 den Porenkanal flankiert (McNally *et al.*, 2009). Weiterhin weist Orai1 in der Nähe der Plasmamembran N-terminal eine Calmodulin (CaM)-Bindungsdomäne auf, die CaM Ca^{2+} -abhängig binden kann und zur schnellen Inaktivierung von SOCE führt (Mullins *et al.*, 2009).

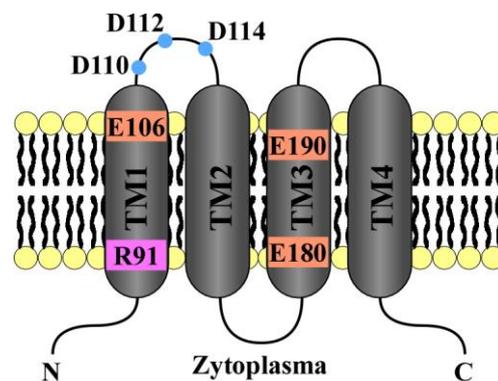


Abb. 1-4 Model von Orai1 in der Plasmamembran (McNally *et al.*, 2009).

Orai1 weist 4 TM-Domänen (grau) auf. Bisher konnte lediglich Glutaminsäure 106 (E106) in TM1 als Ca^{2+} -bindende Aminosäure identifiziert werden (Gwack *et al.*, 2007; McNally *et al.*, 2009; Prakriya *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006a; Zhou *et al.*, 2010). Mögliche weitere an der Interaktion mitwirkende und untersuchte Aminosäuren sind Asparaginsäure 110, 112 sowie 114 (D110, D112, D114) im Extrazellulärraum zwischen TM1 und TM2 (blau). Sie sind hoch flexibel und haben daher einen möglichen Einfluss auf die Öffnung des Kanals (Vig *et al.*, 2006a). Zusätzlich wurden Glutaminsäure 180 und 190 (E180, E190) als notwendige Aminosäuren für die Ca^{2+} -Selektivität identifiziert (orange) (Gwack *et al.*, 2007; Prakriya *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006a; Yeromin *et al.*, 2006). Die vorhergesagte Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit von E190 konnte nicht bestätigt werden (McNally *et al.*, 2009). Arginin (R91) ist bei Patienten mit SCID zu einem Tryptophan mutiert (Feske *et al.*, 2006).

Neben Orai1 wurden zwei weitere Orai-Proteine Orai2 und 3 identifiziert, die eine große Sequenzähnlichkeit zu Orai1 in den TM1-4 aufweisen und ebenfalls als Ca^{2+} -Kanäle im I_{CRAC} fungieren können (Hogan *et al.*, 2010). C-terminal weisen alle Orai-Homologe eine *coiled-coil* Domäne auf (Cahalan *et al.*, 2007), welche der Interaktion mit STIM1 dient (Li *et al.*, 2007; Muik *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2009). Außerdem sind für die Kanalaktivierung hoch konservierte Regionen des N-Terminus von Orai von Bedeutung (Li *et al.*, 2007; Yuan *et al.*,

2009). Orai1-3 wird in fast allen Zelltypen exprimiert und Orai1 bildet sowohl mit Orai2 als auch mit Orai3 Heteromere in der Plasmamembran (Gwack *et al.*, 2007; Lis *et al.*, 2007). Dennoch scheint Orai1 als Ca^{2+} -Kanal die größte Bedeutung für I_{CRAC} zu besitzen. Mercer *et al.* konnten zeigen, dass Koexpression von STIM1 mit Orai1 I_{CRAC} stark erhöht, Koexpression von STIM1 mit Orai2 nur eine leichte Erhöhung von I_{CRAC} bzw. mit Orai3 keinen messbaren Effekt besitzt (Mercer *et al.*, 2006). Nach Überexpression von Orai1 in SCID Fibroblasten und T-Zellen konnte I_{CRAC} wiederhergestellt werden, während die Überexpression von Orai3 I_{CRAC} nur teilweise bzw. nach Überexpression von Orai2 I_{CRAC} nicht wiederhergestellt werden konnte (Gwack *et al.*, 2007).

1.2.2 Regulierung von I_{CRAC}

1.2.2.1 Experimentelle Regulierung

SOCE-Kanäle können durch alle Prozesse, bei denen intrazelluläre Speicher geleert werden, aktiviert werden. Experimentell wird dieser Zustand durch einen der folgenden Mechanismen erreicht: Auf die aktive Leerung der ER-Speicher durch Infusion mit IP_3 folgt eine schnelle Aktivierung von I_{CRAC} , wohingegen eine passive Leerung der ER-Speicher durch Thapsigargin, mit den Ca^{2+} -Chelatoren BAPTA oder EGTA bzw. extrazelluläre Anwendung von Ionomycin eine langsame Aktivierung bewirkt (Bird *et al.*, 2008; Hoth und Penner, 1992; Peinelt *et al.*, 2006; Zweifach und Lewis, 1993).

Der Regulator 2-Aminoethoxydiphenyl Borat (2-APB) kann I_{CRAC} /SOCE sowohl verstärken als auch inhibieren. Bei geringen Konzentration (10 μM) wirkt es aktivierend, während es bei hohen Konzentrationen (50 μM) inhibierend auf I_{CRAC} wirkt (siehe 1.2.2) (Lis *et al.*, 2007; Peinelt *et al.*, 2008; Peinelt *et al.*, 2006). 2-APB inhibiert und löst die *Punctae*-Formationen von STIM1 auf. Koexpression von STIM1 und Orai1 konnte den inhibierenden Effekt von 2-APB auf die *Punctae*-Formationen von STIM1 abschwächen, I_{CRAC} wurde allerdings in demselben Maß inhibiert (Lis *et al.*, 2007; Peinelt *et al.*, 2008). Die Ursache hierfür ist noch nicht bekannt, könnte aber ein Hinweis darauf sein, dass eine starke Interaktion zwischen STIM1 und Orai1 stattfindet, die durch Überexpression in hohem Maße verstärkt wird. Zudem konnte Orai1 durch 2-APB direkt aktiviert werden (DeHaven *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Intrazelluläre Regulierung

I_{CRAC} /SOCE ist ein reversibler Prozess, der durch Auffüllen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher beendet werden kann. Die Termination von I_{CRAC} beruht auf schneller Umwandlung der

Punctae-Formationen der STIM1-Moleküle zu Monomeren nach Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand im ER (Smyth *et al.*, 2008; Varnai *et al.*, 2007).

Inhibitoren der *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK), wie ML-9 und Wortmannin, können I_{CRAC} terminieren. Der Ca^{2+} -Einstrom, hervorgerufen durch Rezeptor-abhängige oder -unabhängige Stimulierung schien zunächst MLCK-sensitiv (Norwood *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1996). Hemmung der MLCK mit anderen Inhibitoren bzw. Behandlung von Zellen mit siRNA zeigte jedoch keinen Einfluss auf SOCE/ I_{CRAC} , sodass ML-9 und Wortmannin eventuell über einen anderen Signalweg wirken (Smyth *et al.*, 2008).

Die Inhibierung von Orai1 erfolgt über ein Peptid $\text{V}^{151}\text{SNV}^{154}$ in der intrazellulären Schleife zwischen TM2 und TM3. Mutation dieser Sequenz zu Alanin (MutA) führten zu einem Verlust der Inaktivierung sowie erhöhtem SOCE und höheren Ca^{2+} -Strömen. Eine direkte Zugabe eines einzigen Wildtyp Monomers führte zu einer Hemmung des I_{CRAC} sowohl in Orai1-Wildtyp- als auch -MutA-Zellen, was darauf hindeutet, dass bereits eine einzige intakte intrazelluläre Schleife genügt, um den gesamten Orai1-Tetramer Komplex zu inhibieren (Srikanth *et al.*, 2010b).

Weiterhin wurde ein *CRAC Regulator 2A* (CRACR2A) im Zytoplasma identifiziert, der mit Orai1 und STIM1 unter Bildung eines ternären Komplexes interagiert und so zur Stabilität von STIM1/Orai1 beiträgt. Steigt die Konzentration an Ca^{2+} bedingt durch SOCE intrazellulär an, so kann Ca^{2+} an die EF-Hand von CRACR2A binden, was zur Dissoziation von CRACR2A vom STIM1/Orai1-Komplex führt und diesen somit destabilisiert (Srikanth *et al.*, 2010a).

Die Regulierung von STIM1 wurde von verschiedenen Gruppen eingehend untersucht. So zeigten Keil *et al.*, dass STIM1 und SOCE über das *Ubiquitin-Proteasom System* (UPS) reguliert werden. Ubiquitinierung von STIM1 und nachfolgender Abbau durch UPS führt zur Abnahme von SOCE (Keil *et al.*, 2010). Die Expression von STIM1 wird durch *Wilms Tumor Suppressor 1* (WT1) sowie *Early Growth Response* (EGR) 1 reguliert. In der Promotorregion finden sich entsprechende putative Bindungsstellen, von denen zwei durch Chromatin Immunopräzipitation bestätigt werden konnten (Ritchie *et al.*, 2010). Im ER scheint STIM1 stark mit den Mikrotubuli assoziiert zu sein, wodurch seine Aktivität beeinflusst werden kann. Eine Störung der Mikrotubuli-Struktur führte zur teilweisen Hemmung von STIM1, die durch Überexpression von STIM1 allerdings wieder aufgehoben werden konnte (Smyth *et al.*, 2007). Dies könnte im Zusammenhang mit der Inhibierung von I_{CRAC} während der Mitose stehen, da hier das Mikrotubuliskelett vom ER dissoziiert, um die

mitotischen Spindeln zu formen. Bereits 1988 wurde die Hemmung von SOCE während der Mitose/Meiose beschrieben (Machaca und Haun, 2000; Preston *et al.*, 1991; Tani *et al.*, 2007; Volpi und Berlin, 1988). Smyth *et al.* zeigten zudem, dass die Expression von Orai1 in mitotischen Zellen um 25-50% reduziert ist. Transfektion von Orai1-Konstrukten konnte I_{CRAC} jedoch nicht wiederherstellen (Smyth *et al.*, 2009). Sie konnten allerdings Phosphorylierungen an Serin 486 und 668 in STIM1 während der Zellteilung nachweisen, wodurch die Anordnung in *Punctae* unterbunden wurde. Phosphorylierung an diesen beiden Aminosäuren allein war hingegen nicht hinreichend, um I_{CRAC} komplett zu inhibieren (Smyth *et al.*, 2009). Auch während der Meiose kommt es zur Phosphorylierung von STIM1 und nachfolgender Inhibierung von I_{CRAC}. Es konnte zudem gezeigt werden, dass während der Meiose die Anordnung von STIM1 in *Punctae* unterdrückt ist und Orai1 internalisiert wird (Yu *et al.*, 2009). Bisher wurden die Kinasen Lyn und Syk identifiziert, die zur Regulierung von I_{CRAC} beitragen. Genetische Deletion jeweils einer der Kinasen zeigte, dass die Regulierung von I_{CRAC} redundant über beide Kinasen verlaufen kann (Chung *et al.*, 2007). Die phosphorylierten Zielproteine konnten bisher nicht gefunden werden, sodass sowohl eine direkte als auch indirekte Phosphorylierung durch Aktivierung weiterer Kinasen möglich ist. Bislang sind keine Kinasen bekannt, welche direkt STIM1 und eventuell auch Orai1 phosphorylieren und somit aktivieren oder inaktivieren.

1.3 Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1

Die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase (SGK) 1 wurde zunächst als Genprodukt nach Stimulierung mit Serum und Glukokortikoiden in einer Brusttumor-Zelllinie bei Ratten gefunden (Webster *et al.*, 1993a; Webster *et al.*, 1993b). Die humane SGK1 wurde später als Regulator des Zellvolumens beschrieben (Waldegger *et al.*, 1997). Die Expression der SGK1 erfolgt ubiquitär, die Transkriptionslevel zwischen den verschiedenen Zelltypen und Geweben können sich jedoch unterscheiden (Waldegger *et al.*, 1997).

Die Transkription der SGK1 kann durch externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Steroidhormone aktiviert werden (Chen *et al.*, 1999; Shelly und Herrera, 2002; Webster *et al.*, 1993a). Außerdem kann die Aktivität der SGK1 von der Phosphoinositid abhängigen Kinase (*phosphoinositide dependent kinase*, PDK) 1 durch Phosphorylierung stimuliert werden und ist somit in den Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K)-Signalweg eingebunden (Alessi *et al.*, 1997; Casamayor *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). Sie zählt zu den Serin/Threonin-Kinasen (Webster *et al.*, 1993b) und reguliert Signalkaskaden, die mit Zellwachstum und -überleben sowie Differenzierung von Zellen zusammenhängen (Pearce, 2001). Die Phosphorylierung

des *forkhead box O3A* FoxO3A (Brunet *et al.*, 2001) und Aktivierung der I κ B Kinase durch SGK1 in Brustkrebszellen (Tai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005a) wirkt anti-apoptotisch und kann somit Tumorwachstum begünstigen. Interleukin-6 induziert die Aktivierung von SGK1 über den p38 MAPK Signalweg (Meng *et al.*, 2005), zudem wird SGK1 durch Dexamethason stimuliert (Wu *et al.*, 2004). Auf diese Weise kann SGK1 das Überleben von Cholangiokarzinom-Zellen (Meng *et al.*, 2005) und die Resistenz von Brusttumorzellen gegenüber Chemotherapie (Wu *et al.*, 2004) beeinflussen. Weiterhin phosphoryliert SGK1 die Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β) (Sakoda *et al.* 2003) und aktiviert somit β -Catenin und den WNT-Signalweg (Cohen und Frame, 2001).

Durch Phosphorylierung und folgender Inaktivierung der Ubiquitin Ligase *neuronal precursor cells expressed developmentally down regulated* (Nedd) 4-2 beeinflusst die SGK1 verschiedene Ionenkanäle, wie ENaC (Alvarez de la Rosa *et al.*, 1999), CIC-Ka (Embark *et al.*, 2004a), CIC-2 (Palmada *et al.*, 2004b) oder SCN5A (Boehmer *et al.*, 2005). SGK1 spielt zudem eine Rolle in der Regulierung weiterer Ionenkanäle wie ROMK1 (Yun *et al.*, 2002), KCNQ4 (Seebohm *et al.*, 2005) oder die Ca²⁺-Kanäle TRPV5 (Palmada *et al.*, 2005) und TRPV6 (Bohmer *et al.*, 2007; Sopjani *et al.*, 2010), indem es weitere Proteine, wie den Na⁺/H⁺-Austauscher Regulations Faktor (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*, NHERF) oder die Kinase PIKfyve reguliert.

SGK1 beeinflusst auf verschiedene Weise die Ca²⁺-Homöostase in der Zelle. Für die Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase ist auch die Ca²⁺-Resorption im Darm und in der Niere von großer Bedeutung. Hier erfolgt die Resorption von Ca²⁺ unter anderem über die Transienten Rezeptor Potential (TRP)-Kanäle. Die Regulierung beider Kanäle kann durch verschiedene Faktoren, wie Vitamin D, Östrogen, pH-Wert sowie Kanal-assoziierte Proteine beeinflusst werden (van de Graaf *et al.*, 2006), wodurch die Aktivität der SGK1 stimuliert werden kann. SGK1 beeinflusst die Ca²⁺-Resorption durch Bindung an die PDZ-Domäne von NHERF2, was zur Stabilisierung von TRPV5 in der Plasmamembran führt (Embark *et al.*, 2004b; Palmada *et al.*, 2005; Sandulache *et al.*, 2006). Der Ca²⁺-Kanal TRPV6 wird ebenfalls durch die SGK1 reguliert (Bohmer *et al.*, 2007). Hierbei aktiviert SGK1 PIKfyve, wodurch die Membranhäufigkeit von TRPV6 erhöht wird (Sopjani *et al.*, 2010).

Verschiedene Kalium-Kanäle werden ebenfalls von SGK1 reguliert. Aktivierung dieser Kanäle führt zur Hyperpolarisierung der Zellmembran, wodurch der Gradient über die Membran für Ca²⁺ verstärkt wird. Dadurch können indirekt weitere Ca²⁺-Kanäle aktiviert werden (Lang *et al.*, 2009; Laufer *et al.*, 2009; Shumilina *et al.*, 2005).

Die Regulierung von Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle konnte auch in Mastzellen von SGK1-defizienten Mäusen (*sgk1*^{-/-}) beobachtet werden. Mastzellen aus SGK1-defizienten Mäusen zeigten einen im Vergleich zu den Mastzellen der Wildtypmäuse verringerten Ca^{2+} -Einstrom. Infolgedessen waren die Antigen-induzierte Degranulierung der Mastzellen, die IL-6 Sekretion, die Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle sowie eine anaphylaktische Reaktion stark reduziert (Sobiesiak *et al.*, 2009).

1.4 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des DFG-geförderten Projekts „Der PI3K-Signalweg bei Tumorwachstum und Diabetes“ (Internationales Graduiertenkolleg 1302) durchgeführt. Das Ziel der Arbeit bestand darin, die Regulierung möglicher an der Entwicklung von Tumorwachstum beteiligter Kanäle, insbesondere die dem $\text{I}_{\text{CRAC}}/\text{SOCE}$ zugrunde liegenden Moleküle STIM1 und Orai1, zu charakterisieren. Entsprechend dem Projekt-Thema sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Molekülen und dem PI3K-Signalweg besteht. Hierbei lag der Fokus vor allem auf die im PI3K-Signalweg vorkommende SGK1 sowie durch sie regulierte Proteine.

Wie bereits in der Einleitung unter Kapitel 1.1 beschrieben, hat Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle vielfältige Funktionen, unter anderem auch die für Tumorentstehung wichtigen Funktionen der Apoptose, Proliferation und Zelldifferenzierung. Neben Spannungs- und Rezeptorpotenzial abhängigen Kanälen spielen die sogenannten speicherabhängigen Ca^{2+} -Kanäle eine wichtige Rolle für den Ca^{2+} -Influx.

Daher sollte zunächst in SGK1-defizienten Mastzellen sowie SGK1-überexprimierenden humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonal kidney*, HEK293) mit Hilfe von Ca^{2+} -*Imaging* Messungen und Ganzzellmessungen der *Patch Clamp* Technik geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen SGK1 und $\text{I}_{\text{CRAC}}/\text{SOCE}$ besteht. Die so erhobenen Daten sollten im Weiteren auf den zugrunde liegenden Regulierungsmechanismus hin untersucht werden. Mögliche Kandidatenmoleküle sollten hierfür auf ihre Auswirkungen auf $\text{I}_{\text{CRAC}}/\text{SOCE}$ mittels verschiedener Methoden analysiert werden. Als Modellzellen dienten zum einen Orai1-stabil transfizierte HEK293 Zellen, in denen die Protein-Expression und -lokalisation von Orai1 nach Transfektion von SGK1 sowie SGK1-regulierten Proteinen mittels Western Blot, Immunfluoreszenz-Messungen sowie durch Immunopräzipitation Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung analysiert werden sollte. Weiterhin standen SGK1-defiziente Mastzellen sowie HEK293 Zellen zur Verfügung, deren mRNA- sowie Protein-Level von Orai1 und STIM1 mittels RT-PCR und Western Blot bestimmt werden sollten. Zur

Validierung von Kandidaten für die Transkriptionsregulierung von Orai1/STIM1 erfolgten Luziferase-Reportergentests sowie Chromatin-Immunopräzipitation. Die funktionelle Analyse des Einflusses der Kandidatenproteine erfolgte zudem jeweils mit Hilfe von Ca^{2+} -*Imaging* und dem Ganzzellverfahren der *Patch Clamp* Technik.

Die erhaltenen Daten sollten zum Grundlagenverständnis der Regulierung des Ca^{2+} -Kanals Orai1 und seines Regulators STIM1 durch den PI3K-Signalweg beitragen.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, soweit nicht in der Tabelle aufgeführt, wurden von Roth, Karlsruhe, in höchster Qualitätsstufe erworben.

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Cäsium-Aspartat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
CäsiumBAPTA	Invitrogen, Darmstadt
Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Cocktail Tabletten	
DMEM 1 g/l Glukose	Gibco, Darmstadt
DMEM 4,5 g/l Glukose	Gibco, Darmstadt
Eisessig/ Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol, reinst. Absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt
EZ-link-Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA
FCS	PAA, Cölbe
Fluo 3	Invitrogen, Darmstadt
Fugene HD	Roche, Mannheim
<i>Fura Red AM</i>	Invitrogen, Darmstadt
Fura-2/AM	Invitrogen, Darmstadt
G418	Gibco, Darmstadt
Glukose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES/Cäsiumhydroxid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES/Natriumhydroxid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Inositol 1,4,5 Trisphosphat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Interferin Polyplus	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA
Interleukin-3	RD Systems, Wiesbaden-Nordstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
<i>iTaq</i> Fast SYBR Green Supermix mit ROX	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kalziumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lumigen TM PS-3 <i>Detection Reagent</i>	GE Healthcare, Freiburg
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Methanol	Merck, Darmstadt
MG132	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
NeutrAvidin® Agarose Resin	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA
NP-40 <i>Alternative Protein Grade Detergent</i> , 10% Lösung	Calbiochem, Darmstadt
Penillizin/Streptavidin	PAA, Cölbe
Phenylmethansulfonyl Fluorid Lösung 0,1 M	Fluka Biochemica, Ulm
ProLong® Gold <i>Antifade Reagent</i>	Invitrogen, Darmstadt
Protein A/G Plus-Agarose	Santa Cruz, CA, USA
RNase/DNase freies Wasser	Invitrogen, Darmstadt
RPMI 1640	Gibco, Darmstadt
SCF	Preptotech, Tebu-bio, Rocky Hill, NJ, USA
Sulfasalazin	Fluka Biochemica, Ulm
Trifast	peqlab, Erlangen
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe
Wogonin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2 Puffer/ Lösungen

RIPA-Puffer

1	% (w/v)	Triton X-100
1	% (w/v)	Natrium-deoxycholat
0,1	% (w/v)	SDS
1	mM	Natriumorthovanadat
1	mM	PMSF
1	Tablette	Protease Inhibitor

Lämmli-puffer 5x

300	mM	Tris/HCl pH 6,8
10	% (w/v)	SDS
2	% (w/v)	Glycerol
5	% (w/v)	β -Mercaptoethanol
Krümel		Bromphenolblau

TAE-Puffer 50x

2	M	Tris/HCl pH 8,8
1	M	Eisessig
100	mM	EDTA

MTT-Lysepuffer

0,6	% (v/v)	Ethanol
10	% (w/v)	SDS
ad 100	ml	DMSO

Lysepuffer Biotinylierung

20 mM	Tris/HCl pH 7,4
5 mM	MgCl ₂
5 mM	Na ₂ HPO ₄
1 mM	EDTA pH 8,0
80 mM	Saccharose
1 mM	PMSF
1 Tablette	Protease Inhibitor

Lysepuffer Zellaufschluss

50 mM	Tris/HCl pH 7,4
150 mM	NaCl
1 % (w/v)	Triton X-100
0,5 % (w/v)	Natrium-deoxycholat
0,1 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
1 Tablette	Protease Inhibitor

PBS 10x

13,7 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

Lysepuffer genomische DNA Isolierung

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
10 mM	EDTA pH 8,0
0,5 % (w/v)	SDS
200 µg/ml	Proteinase K

TE-Puffer

10 mM	Tris/HCl pH 7,8
1 mM	EDTA

TBS 10x

198 mM	Tris
1,38 M	NaCl

TBST

1 x	TBS
0,1 %	Tween-20

Transferpuffer 10x

198 mM	Tris Base
2,3 M	Glyzin

Sammelgel 6%

6 % (v/v)	30% Acrylamid Mix
126 mM	Tris/HCl pH 8,8
0,12 % (w/v)	SDS
0,1 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,1 % (v/v)	TEMED

Trenngel 10%

10 % (v/v)	30% Acrylamid Mix
0,375 mM	Tris/HCl pH 8,8
0,1 % (w/v)	SDS
0,1 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,01 % (v/v)	TEMED

Laufpuffer 10x

4 M	Tris Base
1,92 M	Glyzin
1 % (w/v)	SDS

SDS-Lysepuffer

50 mM	Tris/HCl pH 8,1
1 % (w/v)	SDS
10 mM	EDTA
1 Tablette	Protease Inhibitor

Verdünnungspuffer

16,7 mM	Tris/HCl pH 8,1
1,1 % (v/v)	Triton X-100
1,2 mM	EDTA
0,01 % (w/v)	SDS
300 mM	NaCl
1 Tablette	Protease Inhibitor

Niedrig Salz Waschpuffer

20 mM	Tris/HCl pH 8,1
1 % (v/v)	Triton X-100
2 mM	EDTA
0,1 % (w/v)	SDS
150 mM	NaCl

Swelling Puffer

25 mM	HEPES pH 7,8
1,5 mM	MgCl ₂
10 mM	KCl
1 mM	DTT
0,1 % (v/v)	NP40 Alternativ
0,5 mM	PMSF
1 Tablette	Protease Inhibitor

Hoch Salz Waschpuffer

20 mM	Tris/HCl pH 8,0
1 % (v/v)	Triton X-100
2 mM	EDTA
0,1 % (w/v)	SDS
500 mM	NaCl

LiCl Waschpuffer

10 mM	Tris/HCl-pH 8,1
1 mM	EDTA
1 % (w/v)	Na-DOC
1 % (v/v)	NP-40
250 mM	LiCl

Ringerlösung (pH 7,4)

125 mM	NaCl
5 mM	KCl
1,2 mM	MgSO ₄
2 mM	CaCl ₂
2 mM	Na ₂ HPO ₄
32 mM	HEPES
5 mM	Glukose

Elutionspuffer

1 % (w/v)	SDS
100 mM	NaHCO ₃

Um Ca²⁺-freie Bedingungen zu erreichen wurde statt 2 mM CaCl₂ 0,5 mM EGTA in die Lösung gegeben.

Externe Messlösung (pH 7,4)

140 mM	NaCl
5 mM	KCl
10 mM	CaCl ₂
20 mM	Glukose
10 mM	HEPES/NaOH

Interne Messlösung (pH7,2)

128 mM	Cs-Aspartat
10 mM	CsBAPTA
8 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES/CsOH
0,02 mM	IP ₃

SOC-Medium (pH 7,0)

5 g/l	Hefe-Extrakt
20 g/l	Trypton
10 mM	NaCl
20 mM	Glukose
2,5 mM	KCl

LB-Medium (pH 7,0)

5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Trypton
10 g/l	NaCl

Für Festagarplatten wurden 1,5% (w/v) Agar hinzugefügt.

2.3 Geräte

Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena
Basic pH Meter PB-11	Sartorius Mechatronics, Göttingen
Biofuge Fresco	HERAEUS GmbH, Hanau
Centrifuge 5403	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
CFX96 TM Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
DMZ-Universal Puller	Zeitz, Martinsried
Easy Cast Electrophorese System B2	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA
EPC9 Verstärker	Heka, Lambrecht
EW-A Analysewaage	Kern-Sohn, Balingen
FACSCalibur Flusszytometer	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
ITC-16 Interface	Instrutech, Port Washington, NY, USA
LSM 5 Exciter	Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA Labortechnik Jahnke & Kunkel, Staufen
Magnetrührer R1000	Roth, Karlsruhe
Mini Sub Cell GT	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini Trans-Blot System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MS314 Elektrischer Mikromanipulator	MW, Märzhäuser, Wetzlar
PTC-100 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Waltham, MA, USA

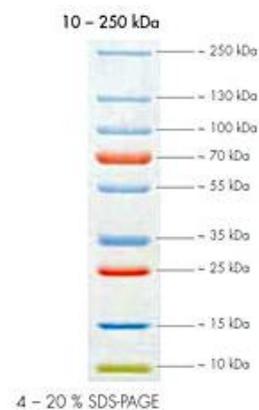
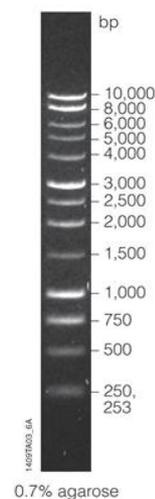
Schwenker EB Swip KL-2	Edmund Bühler, Hechingen
Sonifier 250	Branson, Danbury, CT, USA
Stromversorgung Power Pac Basic	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Power Pac 200	
Power Pac 300	
Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Transsonic Ultraschallgerät 310	Elma, Singen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge mit Vortexer CM-70M	Neolab, Heidelberg

2.4 Vorgefertigte Systeme

Cell Surface Isolation Kit	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Nuclear Extraction Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
NucleoBond Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
RNase free DNase Set (50)	Qiagen, Hilden
RNase Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden

2.5 DNA-Längenstandard und Protein Marker

DNA Marker 1 kbp	Protein Marker V
Promega, Mannheim	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen



2.6 Enzyme

2.6.1 Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA bezogen.

*Bam*HI 5' -G GATCC-3'

*Bsr*GI 5' -T GTACA-3'

*Eco*RI 5' -G AATTC-3'

*Hind*III 5' -A AGCTT-3'

*Kpn*I 5' -GGTAC C-3'

*Not*I 5' -GC GGCCGC-3'

*Sac*I 5' -GAGCT C-3'

*Sal*I 5' -G TCGAC-3'

*Xba*I 5' -T CTAGA-3'

*Xho*I 5' -C TCGAG-3'

2.6.2 Polymerasen

MaximaTM Hot Start *Taq* DNA Polymerase MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase Finnzymes, Espoo, Finnland

2.6.3 Sonstige Enzyme

Proteinase K Promega, Mannheim

Pure Link RNase A Invitrogen, Darmstadt

RNase H Roche, Mannheim

Shrimp Alkaline Phosphatase Promega, Mannheim

Superscript[®] II Reverse Transkriptase Invitrogen, Darmstadt

T4 DNA Ligase MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

Tab. 2-1 Verwendete primäre Antikörper

Spezifität	Anwendung	Spezies	Hersteller
HA High Affinity	WB	Ratte	Roche, Mannheim
IgG	IP	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Nedd4-2	WB, IP	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
NF-κB p50	WB, IF	Maus	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
NF-κB p52	WB	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
NF-κB p65	WB, IF	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
NF-κB p65 (C-20)	IP	Kaninchen	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Orai 1	WB	Kaninchen	Protein Tech Group, Chicago, IL, USA
Orai 1 (H46)	IP	Kaninchen	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Orai 1, intrazellulär	WB, IF	Kaninchen	Millipore, Billerica, MA, USA
Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrat	WB	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
STIM1	WB	Maus	Abnova, Taipei, Taiwan
αβ Tubulin	WB	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 2-2 Verwendete sekundäre Antikörper

Spezifität	Kopplung	Spezies	Hersteller
Kaninchen	HRP	Ziege	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen	Cy3	Affe	Millipore, Billerica, MA, USA
Kaninchen	FITC	Ziege	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Maus	HRP	Schaf	GE Healthcare, Freiburg
Ratte	HRP	Ziege	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA

2.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen, Darmstadt bezogen.

2.8.1 Oligonukleotide Promotorklonierung

Zur vereinfachten Klonierung wurden in die Oligonukleotide spezifische Schnittstellen für Restriktionsenzyme (siehe 2.6.1) eingefügt (rot markiert).

O1_fwd	5'-GTA GGT ACC GGA AAC AAA GCC AGT AG-3'
O1_rev	5'-CGT AAG CTT TTC CAG ACC AGC CTA-3'
O2_fwd	5'-CGT AGG TAC CCC AGA GAC TTC TTG GG-3'
O2_rev	5'-GCT AAG CTT CAG GAC GGC GAG G-3'
S1_fwd	5'-CCT CGG TAC CAT CCA TGT TGT AGC A-3'
S2_rev	5'-GCG AAA GCT TAC GCT AAA ATG GTG TCT-3'

2.8.2 Oligonukleotide RT-PCR

Tab. 2-3 Verwendete Oligonukleotide für die RT-PCR

Humane Oligonukleotide		Murine Oligonukleotide	
Orai1_fwd	5'-CAC CTG TTT GCG CTC ATG AT-3'	Orai1_fwd	5'-GGC GCA AGC TCT ACT TAA GCC-3'
Orai1_rev	5'-GGG ACT CCT TGA CCG AGT TG-3'	Orai1_rev	5'-TCC ACC ATC GCT ACC ATG G-3'
STIM1_fwd	5'-CCT GTG GAA GGC ATG GAA GT-3'	STIM1_fwd	5'-GGA AGG CGT GGA AGT CAT CA-3'
STIM1_rev	5'-CTG AGG CAG CTC CAC ATA TGT-3'	STIM1_rev	5'-TCA TAC TGT GGC AGC TCC ACA-3'
TBP_fwd	5'-GCC CGA AAC GCC GAA TAT-3'	TBP_fwd	5'-CAC TCC TGC CAC ACC AGC TT-3'
TBP_rev	5'-CCG TGG TTC GTG GCT CTC T-3'	TBP_rev	5'-TGG TCT TTA GGT CAA GTT TAC AGC C-3'
p50_fwd	5'-ATA ATG CCT TCC GGC TGA GTC-3'	SGK1_fwd	5'-CTC CAG AGG AGT CCT GTT CCT G-3'
p50_rev	5'-TTG TCT CAG GGC CTC CAC C-3'	SGK1_rev	5'-GGG TCC GGC TTG GTC AG- 3'
p52_fwd	5'-GAA GGG CCG AAA GAC CTA TCC-3'		
p52_rev	5'-GAG CAC GAG GTG GGT CAC TG-3'		
p65_fwd	5'-ATA CCA CCA AGA CCC ACC CC-3'		
p65_rev	5'-TGA GGA GGG TCC TTG GTG AC-3'		

2.8.3 Oligonukleotide Sequenzierung

pGL3_transcript_fwd 5'-TGC CAG AAC ATT TCT CTA TCG ATA-3'

pGL3_luc_rev 5'-CAT CTT CCA GCG GAT AGA ATG G-3'

2.9 siRNA

siRNA wurde von Applied Biosystems Ambion (Foster City, CA, USA) als 5 nmol Pulver bezogen.

Tab. 2-4 Sequenzen verwendeter siRNA

Name	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
Nedd4L	GGA CAU CGC GAG UAC CUA Utt	AUA GGU ACU CGC GAU GUC Cct
RelA	CCC UUU ACG UCA UCC CUG Att	UCA GGG AUG ACG UAA AGG Gat
NFκB1	CCA CCU UCA UUC UCA ACU Utt	AAG UUG AGA AUG AAG GUG Gat
NFκB2	GGU UCU AUG AGG AUG AUG Att	UCA UCA UCC UCA UAG AAC Cga

2.10 Vektoren

pcDNA3.1+

Der Vektor pcDNA3.1+ sowie SGK1^{S422D} und SGK1^{K127N} wurden nach Behandlung mit den Restriktionsnukleasen *Hind*III und *Xho*I kloniert.

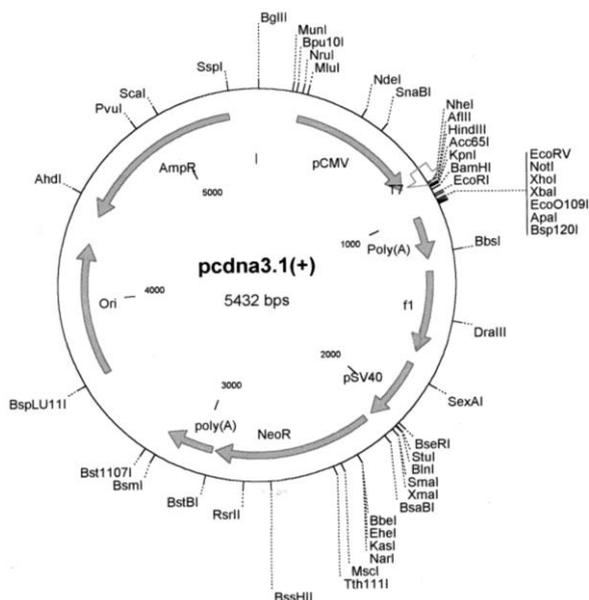


Abb. 2-1 Vektorkarte pcDNA3.1+

pGL3 Enhancer

Nach Restriktion des Vektors mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *HindIII* wurden die durch PCR synthetisierten und mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Promotorsequenzen in den Vektor kloniert.

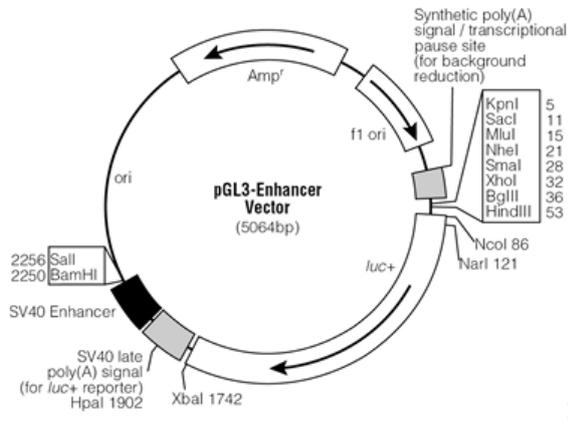


Abb. 2-2 Vektorkarte pGL3-Enhancer

cFlag pcDNA3

Prof. Dr. Greten, Medizinische Klinik und
Poliklinik, TU München

RelA/p65 wurde in cFlag pcDNA3 kloniert, nachdem eine Restriktion mit *HindIII* und *XhoI* durchgeführt wurde.

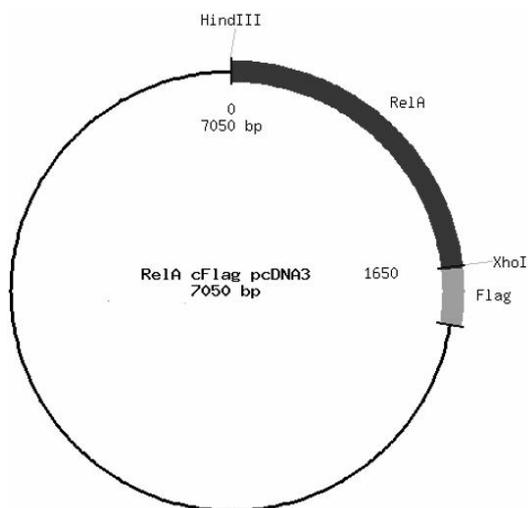


Abb. 2-3 Vektorkarte cFlag pcDNA3 RelA

pIRES2_EGFP

Clontech, Mountain View, CA, USA

Die Ligation von pIRES2_EGFP und SGK1^{S422D} bzw. SGK1^{K127N} erfolgte nach Restriktion mit *SacI* und *EcoRI*.

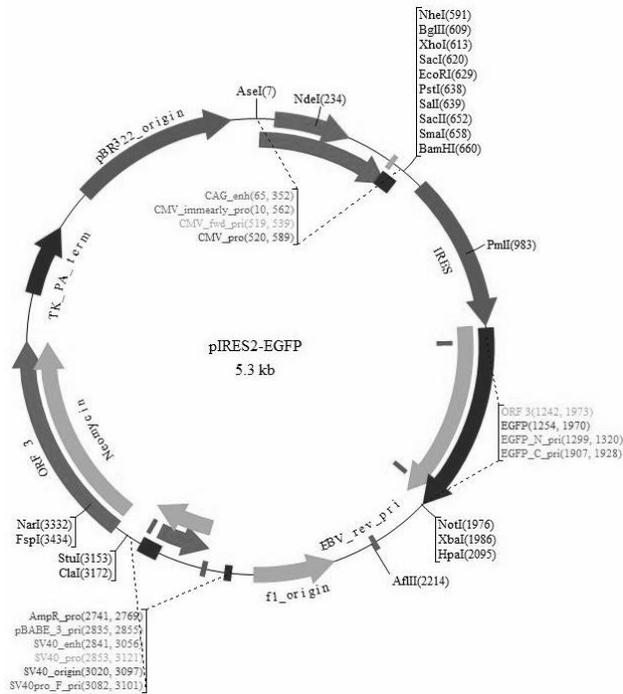


Abb. 2-4 Vektorkarte pIRES2_EGFP

mRFP-C2

Prof. Dr. Ebert, Medizinische Klinik und Poliklinik, TU München

Zur Klonierung von Nedd4-2 wurden sowohl Nedd4-2 als auch der Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *BamHI* inkubiert und anschließend ligiert.

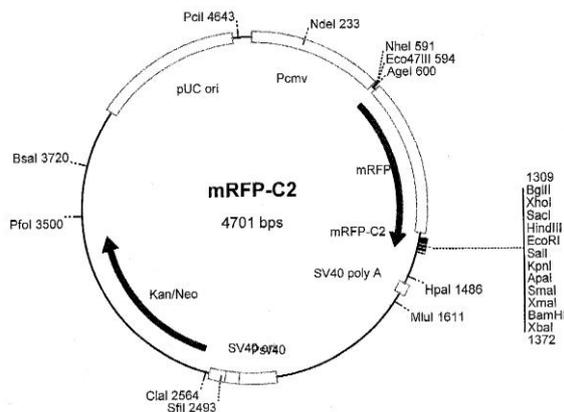


Abb. 2-5 Vektorkarte mRFP-C2

pCMV Sport6

Invitrogen, Darmstadt

Der Vektor wurde mit den Restruktionsnukleasen *SalI* und *NotI* geschnitten und anschließend mit β -Catenin, welches mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt wurde, ligiert.

Zudem wurde der Vektor pCMV_Sport6_p50 von der Firma imagenes erworben. P50 war in diesem Fall durch *SalI* und *NotI* Restriktion in den Vektor kloniert worden.

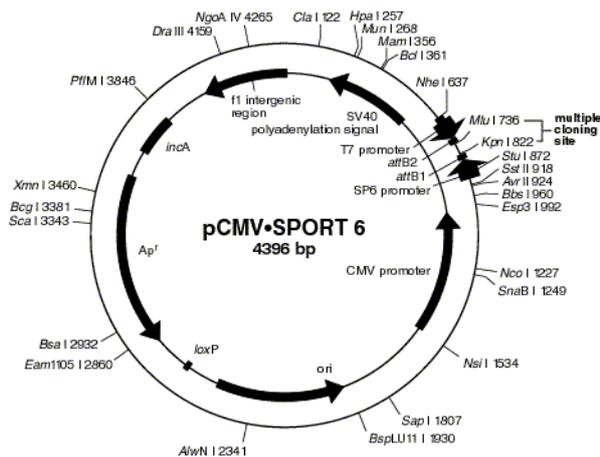


Abb. 2-6 Vektorkarte pCMV-Sport6

pOTB7

Source Bioscience imaGenes, Berlin

Der Vektor wurde von der Firma imagenes mit inseriertem p52, welches durch Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* eingefügt war, erworben.

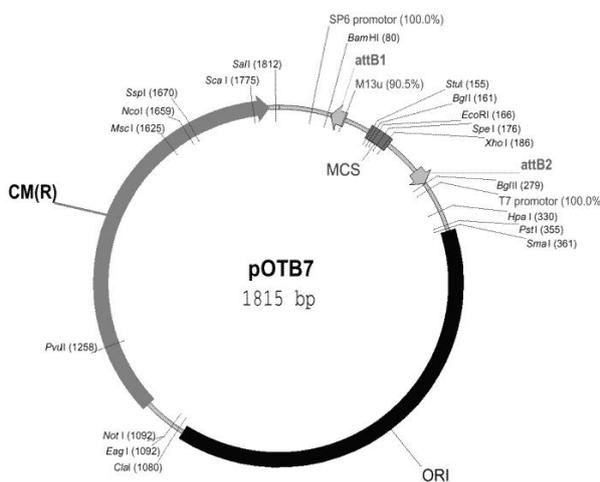


Abb. 2-7 Vektorkarte pOTB7

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 *Präparation genomischer DNA*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus HEK293 Zellen wurden Zellen, die auf 33 mm Zellkulturschalen gewachsen waren, mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Lysepuffer zur genomischen DNA-Extraktion (siehe 2.2) für 3 h bei 55°C lysiert. Um Protein-DNA Interaktionen zu lösen und genomische DNA auszufällen, wurde 200 mM NaCl zugegeben. Nach der Zugabe von 1 Vol Phenol:Chloroform (1:1) und kräftigem Mischen erfolgte die Phasentrennung für 5 min bei 8000 x g und 4°C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die organische Phase erneut mit 1 Vol Phenol:Chloroform (1:1) versetzt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 8000 x g und 4°C wurden die wässrigen Phasen vereinigt. Im Anschluss wurde der Lösung 1 Vol Chloroform hinzupipettiert, kräftig gemischt und für 5 min, bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Überführung der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 2,5 Vol 100%-igem Ethanol für 5 min bei RT. Das hierbei entstandene DNA-Knäuel wurde vorsichtig mit einer Pipette, ohne die DNA aufzuziehen, abgenommen und in 500 µl 70%-igem Ethanol überführt. Die Probe wurde nun für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und danach bei RT getrocknet. Schließlich wurde die gewonnene genomische DNA in einem geeignetem Volumen Wasser aufgenommen und die Konzentration durch ein Photometer bei λ_{260} bestimmt.

3.1.2 *RNA-Isolation*

Humane Embryonale Nieren (*Kidney*, HEK293) Zellen oder Mastzellen wurden in 1 ml TriFast Reagenz lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. Zur Extraktion der RNA wurden im Anschluss 400 µl Chloroform zugegeben, stark durchmischt und für weitere 3 min bei RT inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte bei 12000 x g, 4°C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT erfolgte die Phasentrennung bei 12000 x g, 4°C. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet 30 min bei RT getrocknet. Die gewonnene RNA wurde in 50 µl RNase freies Wasser 15 min bei 55°C gelöst und die Konzentration bestimmt (siehe 3.1.6).

Im Anschluss wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Clean Up Kits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll mit DNase verdaut und aufgereinigt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde zweimal mit jeweils 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA wurden photometrisch bei λ_{260} und λ_{280} bestimmt (siehe 3.1.6).

3.1.3 *cDNA-Synthese*

2 µg DNase verdaute und aufgereinigte RNA wurden mit RNase freiem Wasser auf 7 µl aufgefüllt, 5 µl Random Hexamer Oligonukleotide zugegeben und für 10 min bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurden 4 µl 5 x 1st strand buffer, 2 µl 100 mM DTT sowie 1 µl 2 mM dNTPs zu dem Probenansatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 25°C erfolgte eine weitere Inkubation von 2 min bei 42°C. Zu dem Reaktionsansatz wurden 1 µl Superscript® II Reverse Transkriptase (200 U/µl) pipettiert und für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 70°C für 10 min gestoppt. Die RNA wurde nun durch Behandlung mit 1 µl RNase H (1 U/µl) für 20 min bei 37°C verdaut.

3.1.4 *Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)*

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) beschreibt ein Verfahren zur Vervielfältigung von spezifischen DNA Abschnitten mit Hilfe thermophiler Polymerasen. Auf diese Weise können nicht nur DNA-Abschnitte schnell und spezifisch amplifiziert werden, sondern durch entsprechende, den DNA-Abschnitt flankierende Oligonukleotide sowohl Mutationen als auch Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt werden. Mittels der PCR wurden aus genomischer DNA (siehe 3.1.1) Sequenzen des Promotors für Orai1 und STIM1 amplifiziert sowie die Spezifität der Chromatin Immunopräzipitation (siehe 3.4.3.2) überprüft.

Je nach Anforderung wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt. Hierbei handelte es sich um die Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase, welche sehr prozessiv ist, jedoch keine 3'-5'-Exonuklease Korrektur-Aktivität besitzt. Weiterhin wurde die Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase verwendet. Diese Polymerase weist eine 3'-5'-Exonuklease Korrekturlese-Aktivität auf, d.h. sie zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate aus.

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl für Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase bzw. 50 µl für die Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß durchgeführt. Es wurden laut Hersteller und unter Verwendung der spezifischen Puffer folgende Ansätze zusammenpipettiert:

Ansatz Taq:

2,5	µl	10 x Reaktionspuffer
0,5	µ	dNTPs (10 mM)
50,0	ng	Genomische DNA
1,25	µl	Oligo fwd (10 pmol/µl)
1,25	µl	Oligo rev (10 pmol/µl)
0,2	µl	Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
ad 25,0	µl	AquaMP

Ansatz Phusion:

10,0	µl	5 x HF Puffer
1,0	µ	dNTPs (10 mM)
150,0	ng	Genomische DNA
2,5	µl	Oligo fwd (10 pmol/µl)
2,5	µl	Oligo rev (10 pmol/µl)
0,5	µl	
ad 50,0	µl	AquaMP

Programm Taq:

- 1) 95°C 4 min
- 2) 95°C 1 min
- 3) T_M 1 min 30 s
- 4) 68°C 1 min/kbp
- 5) 68°C 6 min

→35-40 Wiederholungen der Schritte 2-4

Programm Phusion:

- 1) 98°C 30 s
- 2) 98°C 10 s
- 3) T_M 30 s
- 4) 72°C 30 s/kbp
- 5) 72°C 10 min

→35-40 Wiederholungen der Schritte 2-4

Zur Amplifizierung der durch ChIP (siehe 3.4.3.2) isolierten DNA-Sequenzen wurden jeweils gleiche Volumen DNA eingesetzt.

Bei Bedarf wurden die amplifizierten PCR-Produkte mittels des *NucleoSpin ExtractII* Systems von Macherey Nagel gereinigt und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. Sollten bei der Überprüfung der PCR-Reaktion mehrere Produkte festgestellt worden sein, so wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (siehe 3.1.7). Die DNA der gewünschten Länge wurde aus dem Gel ausgeschnitten und nach Protokoll *NucleoSpin ExtractII* (Macherey Nagel) extrahiert.

3.1.5 Quantitative Real-time PCR (RT-PCR)

Mittels quantitativer RT-PCR lassen sich ebenfalls Nukleinsäuren amplifizieren, wobei hierbei gleichzeitig eine genaue Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren möglich ist. Während des Elongationsschrittes interkalieren z.B. fluoreszierende Farbstoffe, in dieser Arbeit SYBR Green, in die neu amplifizierten Transkripte. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert mit der Anzahl der Transkripte und ermöglicht daher eine genaue Quantifizierung der Nukleinsäuren. Entscheidend hierfür ist die Anzahl der Zyklen, die

benötigt werden, um ausreichend Kopien des Transkriptes zu synthetisieren und somit den Fluoreszenzfarbstoff zu detektieren.

<u>Ansatz:</u>	<u>Programm:</u>
10 μ l iTaq Fast SYBR Green Supermix mit ROX	1) 95°C 3 min
1 μ Oligo fwd (10 pmol/ μ l)	2) 95°C 15 s
1 μ l Oligo rev (10 pmol/ μ l)	3) 55°C 15 s
2 μ l cDNA	4) 72°C 20 s
ad 20,0 μ l AquaMP (RNase/DNase frei)	5) 95°C 10 s
	6) 60°C
	7) 95°C
	→40 Wiederholungen der Schritte 2-4
	→Schritte 5-7 zur Erstellung der Schmelzkurve

Die PCR wurde im 96 well Format in einem CFX96TM Real-Time PCR Detection System durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Analyse der Grenzwerte nach Pfaffl (Pfaffl, 2001).

3.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde am Photometer unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung bestimmt (Sambrook und Russell, 2001). Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von λ_{260} . Zur Messung wurden Quarzküvetten der Schichtdicke 10 mm verwendet. Dabei wurden folgende Faktoren zur Berechnung herangezogen: $E_{260} = 1 \approx 50 \mu\text{g/ml}$ ds DNA

$$E_{260} = 1 \approx 40 \mu\text{g/ml}$$
 ss RNA

3.1.7 Agarosegel-Elektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladung können Nukleinsäuren der Größe 50 bp-100 kbp im elektrischen Feld mittels einer Agarosegel-Elektrophorese getrennt werden. Die Konzentration der Agarosegele betrug dabei, je nach Länge der zu trennenden DNA 1-2% Agarose (w/v) in 1 x TAE-Puffer (siehe 2.2). Die Agarose wurde mit TAE-Puffer versetzt und gekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurden 1×10^{-4} Vol SYBR® Safe hinzupipettiert, die Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. SYBR® Safe besitzt, ähnlich wie Ethidiumbromid,

interkalierende Eigenschaften und kann sich somit in die Furchen der Nucleinsäuren einlagern. Dabei verändert sich das Anregungsspektrum von SYBR® *Safe* und die Fluoreszenz der Substanz wird bei Anregung mit UV-Licht stark erhöht. Dadurch werden bei Betrachtung des Gels unter UV-Licht leuchtende Banden sichtbar. Nach Erstarren des Gels wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt.

Nach Versetzen der Proben mit 1/5 Vol Probenpuffer wurden die Proben sowie ein 1 kbp bzw. 100 bp Standard auf das Gel aufgetragen. Die Trennung fand bei konstanter Spannung von 10 V/cm Gelbreite statt.

3.1.8 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für alle Ansätze mit Restriktionsendonukleasen (siehe 2.6.1) wurden die entsprechenden optimalen Reaktionspuffer des Herstellers verwendet.

Die Restriktion wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Restriktionsansatz:

x μ l DNA
2 μ l 10 x Reaktionspuffer
1 μ l Restriktionsendonuklease (20 U/ μ l)
1 μ l 20 x BSA
ad 20 μ l AquaMP

Die Ansätze wurden für 2 h bei enzymespezifischer Temperatur inkubiert und für 15 min bei 70°C inaktiviert.

3.1.9 Dephosphorylierung von Vektor

Nach der Restriktion wurde der Vektor für 15 min mit 5 U SAP bei 37°C behandelt, welche 5'-Phosphorylierungen entfernte und damit die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Vektors ohne Insert verringerte.

3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Nachdem DNA und Vektor erfolgreich durch Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, war es notwendig DNA und Vektor miteinander zu ligieren. Dazu erfolgte mittels einer so genannten *sticky end* Klonierung die Ligation von 300 fmol *Insert* und 100 fmol Vektor. Die Menge der eingesetzten DNA wurde über Gleichung (1) bestimmt.

$$pmol(dsDNA) = \mu g(dsDNA) \times \frac{10^6 pg}{1\mu g} \times \frac{1pmol}{660pg} \times \frac{1}{Nbp} \quad (1)$$

Zur Ligation von PCR-Produkten und Vektor wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ligationsansatz:

300 fmol	PCR-Produkt
100 fmol	Vektor
1 µl	T4 DNA Ligase (5 U/µl)
2 µl	10 x T4 DNA Ligase Puffer
ad 20 µl	<i>AquaMP</i>

Die Reaktion fand für 16 h bei 16°C statt, woran sich ein Hitzeschritt zu Inaktivierung der T4-DNA-Ligase für 15 min bei 65°C anschloss.

3.1.11 Hitzeschocktransformation von *E.coli* DH5α

Für die Transformation von DNA-Konstrukten (siehe 2.10), die zur Selektion eine Antibiotika-Resistenz aufwiesen, wurden *E.coli* DH5α Zellen zunächst für 30 min auf Eis mit der zu transformierenden DNA inkubiert und im Anschluss für 45 s auf 42°C erhitzt. Nachdem die Zellen durch Inkubation auf Eis wieder abgekühlt waren, erfolgte die Aufnahme der Zellen in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium (siehe 2.22.4) und einer anschließenden Inkubation für 1 h bei 37°C zur Ausprägung der Antibiotika-Resistenz. Mit 100 µl der Bakteriensuspension erfolgte ein Ausstrich auf eine LBA-Platte (siehe 2.2), die über Nacht bei 37°C inkubiert wurde.

3.1.12 Plasmidpräparation mittels Macherey-Nagel Kits

Das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde im Minimaßstab mit Hilfe eines Plasmid-DNA-Reinigungs-Nucleo Plasmid Quick Pure von Macherey-Nagel isoliert, wobei nach Herstellerprotokoll verfahren wurde. Ebenso erfolgte die Isolierung von DNA im Midimaßstab mit dem Nucleobond Xtra Midi Kit desselben Herstellers nach Protokoll. Die Aufnahme des Pellets geschah in einem geeigneten Volumen 1 x TE-Puffer (siehe 2.2).

3.1.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde von der Firma Delphi Test GmbH (Regensburg) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Chromas Lite 2.01.

3.1.14 Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine Phenol-Chloroform-Extraktion wird durchgeführt, um Proteine aus wässrigen DNA-Lösungen zu entfernen. Dazu wurde die Lösung mit gleichem Volumen an Phenol versetzt, gut gemischt und für 5 min bei 11000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des wässrigen Überstandes erfolgte die Zugabe von 1 Vol *AquaMP* zur organischen Phase. Im Anschluss erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation für 5 min bei 11000 x g. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, mit gleichem Volumen Chloroform versetzt und für 2 min bei 11000 x g, Raumtemperatur zentrifugiert. Schließlich erfolgte die Überführung des wässrigen Überstandes, in dem sich nun die DNA befand, in ein neues Reaktionsgefäß.

3.1.15 Alkoholpräzipitation

Alkoholpräzipitationen können u.a. mit Ethanol (100%) oder Isopropanol durchgeführt werden und dienen der Konzentrierung von DNA-haltigen Lösungen oder dem Wechseln von Puffern. Das Volumen der DNA-Lösungen wurde bestimmt und die Lösung anschließend mit 0,1 Volumen NaAc (3 M, pH 4,8) sowie 2,5 Volumen eiskaltem 100%-igem Ethanol bzw. 0,2 Vol NaAc (3 M, pH 4,8) sowie 0,8 Vol Isopropanol versetzt und gemischt. Die Fällung fand durch Inkubation für mindestens 30 min bei -20°C bzw. für mindestens 1 h bei 4°C statt. Durch Zentrifugation für 30 min bei 11.000 x g erfolgte die Pelletierung der gefällten DNA, woran sich ein Waschschritt mit 0,7 Vol eiskaltem 70%-igem Ethanol anschloss. Nach Zentrifugation für 15 min bei 11000 x g und 4°C wurde das Pellet für 10-15 min an der Luft getrocknet und schließlich in einem geeignetem Volumen TE-Puffer oder *AquaMP* aufgenommen.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung Humane Embryonale Kidney (HEK293) Zellen

HEK293 Zellen wurden in Dulbecco's MEM (Invitrogen) mit 4,5 g/l Glukose, 10% (v/v) Fetales Kälber (calf) Serum (FCS) und 1% (w/v) Penizillin/Streptavidin bei 37°C in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ angezogen. Zum Passagieren wurden die adhärenenten Zellen bei einer Konfluenz von 90% mit PBS gewaschen und für 2 min mit Trypsin-EDTA behandelt, um sie vom Boden abzulösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DMEM mit 10% FCS gestoppt und die Zellen auf neue Kulturflaschen verteilt. Um Zellen für Transfektion in Kulturschalen auszusäen, wurden 10 µl der trypsinierten Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt, eine entsprechende Anzahl an Zellen in Kulturschalen ausgesät und diese mit frischem Medium aufgefüllt.

Weiterhin wurden HEK293 Zellen, welche stabil mit Orai1 transfiziert waren (Zhou *et al.*, 2009), in DMEM mit 1 g/l Glukose, 10% (v/v) FCS, 1% (w/v) Penizillin/Streptavidin und 250 µg/ml G418 bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert.

3.2.2 *Kultivierung Mastzellen*

Knochenmarkzellen, die aus den Oberschenkeln von 6-8 Wochen alten *sgk1^{+/+}* und *sgk1^{-/-}* Mäusen isoliert waren, wurden für vier Wochen in RPMI 1640 Medium, welches zusätzlich 10% (v/v) FCS, 1% (w/v) Penizillin/Streptavidin, 20 ng/ml Interleukin-3 und 100 ng/ml des c-Kit Ligand Stammzellfaktors (*stem cell factor*, SCF) enthielt, kultiviert. Die abgeschlossene Mastzellreifung wurde mittels Flusszytometrie (FACS Calibur, Becton Dickinson) bestätigt. Reife Mastzellen wurden jeweils für ca. zwei Wochen für Experimente weiterkultiviert.

3.2.3 *Transiente Transfektion von HEK293 Zellen*

3.2.3.1 *Transfektion mit Fugene HD Reagenz*

Um HEK293 Zellen mit DNA zu transfizieren, wurde das auf Lipofektion basierende Transfektionsreagenz Fugene HD verwendet. Negativ geladene DNA wird in positive geladene Liposomen des Fugene HD komplexiert und kann so mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Die Zellen wurden hierfür in Zellkulturschalen geeigneter Größe ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert, sodass sie eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben in einem Verhältnis DNA:Fugene HD = 2:7 durchgeführt.

Zunächst wurde die DNA in DMEM ohne FCS verdünnt, Fugene HD hinzugegeben und durch Vortexen gut gemischt. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit bei RT wurde der Transfektionsmix tropfweise zu den Zellen pipetiert, die Schalen vorsichtig geschwenkt und die Zellen bis Versuchsende bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.3.2 *Transfektion mit Interferin Reagenz*

Zur Transfektion von HEK293 Zellen mit siRNA wurde das ebenfalls auf Lipofektion beruhende Transfektionsreagenz Interferin genutzt. HEK293 Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert, sodass sie eine Konfluenz von ca. 60% aufwiesen. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers Polyplus durchgeführt. Es wurde siRNA in DMEM ohne FCS verdünnt, sodass nach Zugabe zum Medium die Endkonzentration 10-50 nM entsprach. Je 8-12 µl Interferin wurde zu der verdünnten siRNA pipetiert und gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde der Transfektionsmix

tropfweise zu den Zellen gegeben und die Schalen vorsichtig geschwenkt. Bis zum Ende des Versuchs wurden die Zellen weiter bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.4 Immunfluoreszenz-Messung

Zur optischen Darstellung von Proteinen mit einem konfokalen Mikroskop wurden zunächst 5×10^4 HEK293 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert, transfiziert (siehe 3.2.3.1) und 48 h nach Transfektion durch ein Aceton:Methanol Gemisch (1:1) auf der Oberfläche der Kammern fixiert. Um auch intrazelluläre Proteine mit Antikörpern sichtbar zu machen, wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 0,5% Triton-X-100/PBS (v/v) permeabilisiert. Das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte bei RT mit 5% BSA/PBS (w/v). Orail wurde mittels anti-Orail (intrazellulär, 2 µg/ml, Millipore) für 2 h bei RT markiert. Die Markierung von p65 erfolgte mit einem NF-κB p65 Antikörper (1:500, Cell Signaling). Nach dreimaligem Waschen mit 5% BSA/PBS (w/v) wurden die Zellen mit sekundärem Antikörper anti-Kaninchen-Cy3 (5 µg/ml, Millipore) oder anti-Kaninchen-FITC (1:500, Santa Cruz) im Dunkeln für 2 h bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DRAQ5 (1:2000, Biostatus Limited) für 10 min bei RT durchgeführt. Nachdem die Zellen dreimal mit 5% PBS (w/v) gespült wurden, wurde zum Abschluss zweimal mit destilliertem Wasser gespült und die Zellen schließlich mit ProLong® Gold *Antifade Reagent* überschichtet und bis zur Detektion bei 4°C aufbewahrt.

Die Zellen wurden durch einen Laser mit Licht der Wellenlänge λ_{546} (Cy3) bzw. λ_{488} (FITC) angeregt und die Emission mittels Filter bei λ_{560} (Cy3) und λ_{505} (FITC) in einem Zeiss LSM 5 EXCITER Confocal Laser Scanning Microscope (Zeiss) mit einem Wasser Immersions Plan-Neofluar 63_/1.3 NA DIC ausgewertet. Die DRAQ5 gefärbten Zellkerne wurden mittels Licht der Wellenlänge λ_{633} angeregt und die Emission mit einem Filter bei λ_{650} gemessen.

3.3 Bestimmung des Ca^{2+} -Eintritts

3.3.1 Ca^{2+} -Imaging

Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mit Hilfe von Fura-2 Fluoreszenz. HEK293 Zellen oder Mastzellen wurden für 30 min mit 2,5 µM Fura-2/AM bei 37°C mit Fura-2/AM beladen. Anschließend wurde Ringer Lösung (siehe 2.2) zu den Zellen gegeben und die Zellen abwechselnd bei λ_{340} und λ_{380} angeregt und das Licht in einem inversen Phasen-Kontrast Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss) mittels eines dichromatischen Spiegels entweder in eine Kamera oder ein Objektiv (Fluar 40x/1,3 Öl) abgelenkt. Mit der

Kamera wurde die emittierte Fluoreszenzintensität bei λ_{505} aufgezeichnet und die Daten alle 6-10 s mit Hilfe des Programms Metafluor erfasst.

Zur Evaluierung der Daten wurden die Messwerte in Excel exportiert. Als Maß für einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg wurden sowohl Anstieg als auch maximale Ca^{2+} -Konzentration der Änderung im Verhältnis $\lambda_{340}/\lambda_{380}$ als Reaktion zur Modifikation der Messbedingungen für jede Zelle und jedes Experiment bestimmt. Die Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Punkt des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs stellte die maximale Ca^{2+} -Konzentration dar, während die Änderung des Verhältnisses über die Zeit den Anstieg der Reaktion repräsentierte. Zur intrazellulären Kalibrierung wurden am Ende eines jeden Experiments 10 μM Ionomycin zugegeben.

Die Bestimmung von SOCE erfolgte nach Entfernung extrazellulären Ca^{2+} und folgender Zugabe von Ca^{2+} bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Thapsigargin (1 μM) (Bird *et al.*, 2008).

3.3.2 Flusszytometrie (FACS)

HEK293 Zellen wurden 48 h nach Transfektion trypsiniert, in DMEM resuspendiert und mit 2,5 μM *Fura Red* AM für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde 1 μM Fluo3 hinzugegeben. Nach weiteren 30 min wurde die Färbung gestoppt und die Zellen in PBS ohne Ca^{2+} oder Mg^{2+} aufgenommen. Durch Zugabe von Thapsigargin wurde die SERCA inhibiert und die basale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration an einem FACSCalibur Flusszytometer (BD Biosciences) bestimmt. Nach 25 s erfolgte die Zugabe von Ca^{2+} (Endkonzentration 2 mM) und die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für weitere 5 min gemessen. Das Verhältnis von Fluo3 und *Fura Red* wurde mit den Programmen *Cell Quest Pro* (BD Bioscience) und *FlowJo* (Tree star, Inc.) bestimmt.

3.3.3 Patch-Clamp

Die Bestimmung von I_{CRAC} in HEK293 Zellen erfolgte mittels Ganzzell-Ableitungen der *Patch-Clamp*-Technik. Hierfür wurden transfizierte HEK293 Zellen (siehe 3.2.3.1) mit externer Messlösung überschichtet sowie die *Patch-Clamp* Pipetten mit interner Messlösung gefüllt (siehe 2.2). Für die Messungen wurden Borsilikat Glaspipetten (2-4 M Ω Spitzenwiderstand) zusammen mit einem MS314 Elektrischen Mikromanipulator verwendet. Zur Bestimmung von I_{CRAC} wurden Ganzzell-Ströme ausgelöst, indem 200 ms Rechteck-Spannungsimpulse zwischen -120 bis +80 mV in 20 mV Schritten, ausgegeben bei einer Klemmspannung von 0 mV, angelegt wurden. In weiteren Protokollen wurden die Ströme

durch Spannungsrampen zwischen -120 und +100 mV hervorgerufen. Zu Beginn der Messungen wurde jeweils der Leck-Strom bestimmt und von den gemessenen Werten subtrahiert. Zusätzlich wurden alle Spannungen um das *liquid-junction* Potenzial von 15 mV berichtigt. Die Ströme wurden mit einer Frequenz von 10 kHz aufgezeichnet und mit 3 kHz Tiefpass gefiltert.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Zellyse

Um Proteine aus Zellen gewinnen zu können, wurden HEK293 Zellen 48 h nach Transfektion (siehe 3.2.3.1 und 3.2.3.2) einmal mit kaltem PBS (siehe 2.2) gespült und anschließend in einem geeigneten Volumen Zellysepuffer (siehe 2.2) lysiert. Die lysierten Zellen wurden in Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13000 x g, 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

3.4.2 Biotinylierung

Auf 10 cm Zellkulturschalen gewachsene HEK293 Zellen wurden 48 h nach Transfektion (siehe 3.2.3.1) zweimal mit kaltem PBS (siehe 2.2) gewaschen und anschließend für 30 min bei 4°C mit EZ-link-Sulfo-NHS-Biotin (0,5 mg/ml in PBS) behandelt, um Glykosylierungsstellen von Oberflächenproteinen zu biotinylieren. Die Reaktion wurde durch vollständiges Entfernen des EZ-link-Sulfo-NHS-Biotins beendet und die Zellen zweimal mit 0,1% BSA/PBS (w/v) sowie einmal mit divalent-Ionen-freiem PBS (Invitrogen) gespült. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer (siehe 2.2) aufgenommen und für 1 h bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 13000 x g, 4°C, 10 min wurden nichtlösliche Zellbestandteile abgetrennt und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 990 µl der Proben wurden zu 50 µl mit Lysepuffer gewaschenen NeutrAvidin-Agarose *Beads* gegeben. 10% der Probe (*Input*) wurden für eine spätere Analyse zur gleichmäßigen Beladung der *Beads* bei -20°C verwahrt. Die Bindung der Biotin-markierten Proteine an die Oberfläche der Agarose erfolgte ü.N. bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Agarose dreimal mit Lysepuffer gewaschen und die gebundenen Proteine im Anschluss durch Zugabe von 15 µl 2 x Laemmli Puffer (siehe 2.2) und Inkubation für 10 min bei 70°C eluiert. Die eluierten Proteine und *Input* wurden durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe 3.4.5 und 3.4.6).

3.4.3 Immunopräzipitation

3.4.3.1 Ko-Immunopräzipitation

Mittels einer Ko-Immunopräzipitation ist es möglich, Interaktionen zwischen Proteinen zu bestimmen. Hierfür wurden Zellen, die auf Minikulturschalen (35 mm) gewachsen waren, 48 h nach Transfektion (siehe 3.2.3.1) gründlich mit PBS (siehe 2.2) gewaschen, in 500 µl RIPA-Lysepuffer (siehe 2.2) aufgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Zur besseren Lyse der Zellen wurden die Proben im Wasserbad für 5 min sonifiziert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf Tischzentrifuge Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und jeweils mit 25 µl Protein A/G Agarose versetzt und für 1 h bei 4°C rotiert, um später unspezifische Bindungen an der Agarose zu verhindern. Anschließend wurde die Agarose pelletiert und der Überstand abgenommen. Gleiche Volumen an Proben wurden in Reaktionsgefäße überführt und 2 µg Antikörper zugefügt. Die Proben wurden bei 4°C über Nacht auf einem Drehrad rotiert. Zur Validierung der in der Probe enthaltenen Proteine vor der Immunopräzipitation wurden 10% der Probe als *Input* abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C verwahrt.

Am nächsten Tag wurden Proteine, die an den Antikörper gebunden hatten, durch eine zusätzliche Inkubation für 4 h bei 4°C an je 15 µl Protein A/G Agarose gebunden. Anschließend wurde die Agarose dreimal mit Lysepuffer gewaschen und schließlich nach Zugabe von 15 µl 2 x Lämmli-puffer (siehe 2.2) durch Erhitzen der Proben auf 95°C für 5 min die Proteine eluiert.

3.4.3.2 Chromatin-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation können Transkriptionsfaktoren, die an die DNA binden, nachgewiesen werden.

Hierfür wurde zu HEK293 Zellen, die in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert wurden, 48 h nach Transfektion (siehe 3.2.3.1) 1 ml 10%iges Paraformaldehyd (PFA) gegeben. PFA fixiert an das Chromatin gebundene Proteine. Die Zellen wurden für 10 min bei RT vorsichtig geschwenkt und anschließend durch Zugabe von 500 µl 2,5 M Glyzin für 5 min bei RT die Reaktion beendet. Die Zellen wurden danach sofort auf Eis gestellt und zweimal mit PBS (siehe 2.2) gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml PBS, das Proteaseinhibitor enthielt, von den Zellkulturschalen mit Zellschabern gesammelt und in Reaktionsgefäße aufgenommen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g. Anschließend wurden die Zellen für 20 min auf Eis in 1 ml *Swelling* Puffer (siehe 2.2) inkubiert und für 5 min bei 4000 x g pelletiert. Danach wurden die Zellen in 200 µl SDS-Lysepuffer (siehe 2.2)

aufgenommen. Um die DNA zu scheren, wurden die Proben dreimal für 30 s sonifiziert, sodass DNA-Fragmente zwischen 200 bp und 1000 bp entstanden. Anschließend wurden Zelltrümmer bei 10000 x g für 10 min pelletiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Zum Überstand wurden 1,8 ml Verdünnungspuffer (siehe 2.2) und 100 µl Protein A/G Agarose pipettiert und für 1 h bei 4°C rotiert, um unspezifische Bindungen bei der Immunopräzipitation zu vermeiden. Zuvor wurde die Agarose mit 1 µg BSA/10 µl Protein A/G Agarose in SDS-Lysepuffer blockiert.

Die Agarose wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 4000 x g entfernt und 20 µl des Überstandes als *Input* abgenommen. Vom restlichen Überstand wurde jeweils 1 ml in neue Reaktionsgefäße aliquotiert. Zu einem Gefäß wurde nun der für den Transkriptionsfaktor spezifische Antikörper (siehe 2.7.1), zum anderen Gefäß wurde als Negativkontrolle ein Immunglobulin G (siehe 2.7.1) desselben Wirtes gegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde zum Binden des Antikörpers jeweils 60 µl blockierte Protein A/G Agarose hinzugegeben und für 1 h bei 4°C rotiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 4000 x g, der Überstand wurde anschließend verworfen. Die Agarose-Antikörper/Chromatin Komplexe wurden in jeweils 1 ml Puffer, wie nachfolgend aufgeführt, für 3-5 min rotiert und für 1 min bei 4000 x g zentrifugiert.

Niedrig Salz Waschpuffer- einmal gewaschen (siehe 2.2)

Hoch Salz Waschpuffer- einmal gewaschen (siehe 2.2)

LiCl Waschpuffer- einmal gewaschen (siehe 2.2)

TE-Puffer- zweimal gewaschen (siehe 2.2)

Zu den als *Input* abgenommenen Proben wurde jeweils 200 µl Elutionspuffer (siehe 2.2) pipettiert und bis zur reversen Quervernetzung bei RT inkubiert. Zur Elution der Proteine von der Agarose wurden zunächst 100 µl Elutionspuffer zu den Proben gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4000 x g für 1 min wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Nachdem die Agarose erneut mit 100 µl Elutionspuffer versetzt wurde, erfolgte die nochmalige Elution der gebundenen Antikörper/Chromatin-Komplexe für 15 min bei RT. Die Agarose wurde bei 4000 x g für 1 min pelletiert und die Überstände vereinigt. Jetzt wurde zu allen Proben 8 µl 5 M NaCl gegeben und über Nacht bei 65°C inkubiert, um Quervernetzungen zwischen Proteinen und Chromatin zu lösen. Hiernach erfolgte die Zugabe von jeweils 10 µg RNase A zu den Proben und eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Im Anschluss wurden 4 µl 500 mM EDTA, 8 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,0 und 10 µg Proteinase K zu den Proben gegeben und für 1-2 h bei 45°C inkubiert. Schließlich

wurde die DNA durch eine Phenol-Chloroform Extraktion (siehe 3.1.14) isoliert und mittels einer Alkoholpräzipitation (siehe 3.1.15) konzentriert.

3.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 liegt in saurer Lösung vorwiegend protoniert vor und kann mit basischen und aromatischen Seitenketten von Aminosäuren Komplexe bilden. Hierbei entsteht die stabilere anionische Verbindung und das Absorptionsspektrum des Farbstoffes verschiebt sich von λ_{470} zu λ_{595} , was photometrisch bestimmt werden kann (Bradford, 1976).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1 μ l Probe zu 1 ml 1 x Bradford Reagenz gegeben und die Konzentration bei λ_{595} bestimmt. Konzentrationen wurden bis zu einer Absorption von 1 gemessen. Sollte die Absorption der Proben darüber gelegen haben, wurden die Probe entsprechend verdünnt.

3.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine anhand ihres Molekulargewichts getrennt werden (Laemmli, 1970). Hierfür werden die Proteine mit SDS versetzt und durch Zugabe von β -Mercaptoethanol die Disulfidbindungen zwischen Proteinen reduziert. Pro g Protein können 1,4 g SDS gebunden werden, wodurch die Proteine ihre elektrische Eigenladung verlieren und das resultierende Ladungs-/Masseverhältnis für alle Proteine gleich ist. Kleinere Proteine migrieren demnach aufgrund der Porengröße in einem restriktivem Gel schneller als große Proteine (Laemmli, 1970). Die Größe der Proteine wurde mit Hilfe eines vorgefärbten Proteinstandards abgeschätzt.

Die Trennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen SDS-PAGE-System. Hierfür wurde ein 6%-iges Sammelgel (siehe 2.2) und ein 10%-iges Trenngel (siehe 2.2) verwendet. Glyzin, welches sich im Laufpuffer (siehe 2.2) befand, diente zunächst im Sammelgel bei pH 6,8 als Folgeion und somit Konzentrierung der Proteine. Im Trenngel hingegen bei pH 8,8 erhöhte sich die elektrische Mobilität des Glyzins und es wurde zum Leitton.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (siehe 3.4.4) wurden gleiche Mengen an Protein verwendet und mit Laemmli-Puffer (siehe 2.2) versetzt. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95°C inkubiert und für 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Gels gefüllt und die Proteine konnten bei einer konstanten Spannung von 80 V in das Gel einlaufen. Wenn sich die Proteine sichtbar in einem Bereich konzentrierten, wurde die Laufgeschwindigkeit auf 100 V erhöht.

3.4.6 Western Blot

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die im Gel aufgetrennten Proteine mittels des Tank-Blot Verfahrens je nach Anforderung auf eine Nitrozellulose- bzw. eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst durch Inkubation für 5 min in Methanol aktiviert. Der Transfer erfolgte bei 100 V gekühlt für 65 min im Transferpuffer (siehe 2.2).

3.4.7 Detektion von Proteinen

Nach dem Transfer wurde die Membran entweder in 5% Milchpulver/TBST (w/v) oder 5% BSA/TBST (w/v) 1 h bei RT geblockt, um unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu vermeiden. Anschließend wurde die Membran mit primärem Antikörper (siehe 2.7.1), verdünnt nach Herstellerangaben, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST und wurde die Membran mit sekundärem Antikörper (siehe 2.7.2), verdünnt nach Herstellerangaben, für 1 h bei RT inkubiert. Wo es vom Hersteller vorgeschrieben war, wurde der primäre Antikörper für 2 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenz nach Herstellerprotokoll. Die quantitative Beurteilung der Proteinmengen in den einzelnen Proben erfolgte mit der Software Quantity One (Bio-Rad, USA) bzw. *ImageJ*.

Sollte auf einem Blot mehrere Proteine spezifisch nachgewiesen werden, so wurde der Blot nach Detektion des ersten Proteins bei 57°C für 30 min mit Roti®-Free Stripping Puffer behandelt, anschließend kurz gespült und nach oben beschriebenem Protokoll verfahren.

3.5 Reportergenprüfung mittels Luziferase

Die Überprüfung, ob eine Promotorregion durch NF-κB aktiviert wird, fand mit Hilfe des *Dual-Luciferase® Assay SystemsTM* statt. Hierbei wird nacheinander die Aktivität der Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) Luziferase und der Renilla (*Renilla Reniformis*) Luziferase photometrisch bestimmt. Dabei dient die Renilla Luziferase zur Normierung der Transfektionsrate zwischen den unterschiedlichen Gruppen.

Die Aufbereitung und Messung der Proben erfolgte unter leichter Modifikation nach Angaben des Herstellers. HEK293 wurden jeweils mit den pGL3_Enhancer Konstrukten sowie dem Renilla Luziferase kodierenden Vektor pRL-TK (siehe 2.10) transfiziert (siehe 3.2.3.1) und 48 h später mit *Passiv Lysis Buffer* der Firma Promega für 15 min bei RT lysiert. Die Messung erfolgte in einem Turner TD 20-20 Luminometer. Es wurden 50 µl *Luciferase Assay*

ReagentTM mit Luziferin und ATP-CoA in Teströhrchen vorgelegt. Nach Zugabe von Zelllysate wurde die Suspension vermischt und die Emission nach einem kurzen Intervall von 2 s für 10 s gemessen. Im Anschluss wurden 50 µl *Stop & Glow ReagentTM* mit Stoppreagenz und Coelenterazin hinzugegeben und kurz gemischt. Nach 2 s wurde ebenfalls für 10 s die Lichtemission gemessen. Aus beiden Werten wurde das Verhältnis gebildet und so die relative Aktivität der Promotorregion bestimmt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Regulierung der Orai1-Proteinabundanz durch SGK1

4.1.1 Bestimmung von SOCE und I_{CRAC} in Mastzellen und HEK293 Zellen mittels Ca^{2+} -Imaging und Patch-Clamp Technik

Zu Beginn der Arbeit sollte ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen *store operated Ca^{2+} entry* (SOCE) und SGK1 besteht. Hierfür wurden zunächst Mastzellen aus SGK1-defizienten Mäusen (*sgk1*^{-/-}) isoliert und die Zellen für 30 min mit 2 μ M Fura-2/AM beladen. Als Positivkontrolle wurde in gleicher Weise mit Mastzellen aus Wildtyp-Mäusen desselben Wurfes verfahren.

SOCE wurde von N. Heise mittels intrazellulärem Ca^{2+} -Imaging ermittelt (siehe 3.3.1). In Ca^{2+} -freiem Medium wurde zu den Zellen 2 μ M Thapsigargin gegeben, um die SR/ER Ca²⁺-ATPase (SERCA) zu inhibieren. Auf diese Weise wurde der SOCE aktiviert und nach Austausch des Ca^{2+} -freien Mediums gegen Ca^{2+} -haltiges Medium die Fura-2-geladenen Zellen abwechselnd mit Licht der Wellenlänge λ_{340} und λ_{380} angeregt. Die Emmission wurde bei λ_{505} bestimmt. Der Ca^{2+} -Einstrom wurde aufgezeichnet und mit dem Programm Metafluor (Universal Imaging) ausgewertet. Als Maß für die intrazelluläre Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration wurde der Anstieg (Geschwindigkeit) und die Amplitude (Konzentrationszunahme) der Kurve über das Verhältnis $\lambda_{340}/\lambda_{380}$ bestimmt. In Abb. 4-1 wird deutlich, dass sowohl die Geschwindigkeit, als auch die Konzentration des Ca^{2+} in Mastzellen von *sgk1*^{-/-}-Mäusen gegenüber Mastzellen von Wildtyp-Mäusen signifikant verringert ist.

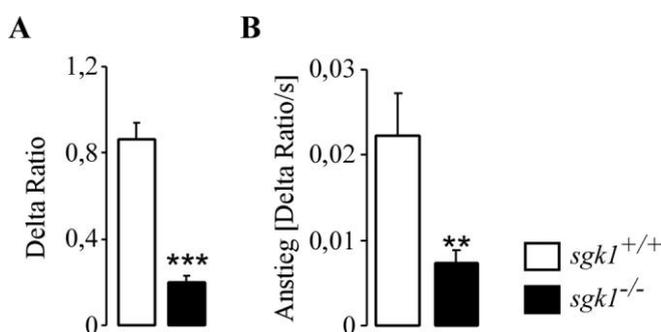


Abb. 4-1 Intrazelluläres Ca^{2+} -Imaging des SOCE in Mastzellen aus *sgk1*^{-/-}- und *sgk1*^{+/+}-Mäusen.

Mittelwerte (\pm SEM) der Messungen von Mastzellen aus *sgk1*^{-/-}-Mäusen (n=9) und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern (n=8). SOCE, bestimmt durch **A**) die Amplitude (Delta Ratio) und **B**) den Anstieg (Delta Ratio/s) ist in *sgk1*^{-/-}-Mastzellen signifikant geringer (**p<0,01, ***p<0,001, Student's t-test).

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf das humane System wurden nun HEK293 Zellen, die bereits stabil mit Orai1 transfiziert waren (HEK293-Orai1) (siehe 3.2.1), zusätzlich mit pIRES_STIM1 (Peinelt *et al.*, 2006) und einer konstitutiv aktiven Mutante von SGK1 (pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D}), sowie pIRES_STIM1 und einer konstitutiv inaktiven Mutante von SGK1 (pIRES2_EGFP_SGK1^{K127N}) kotransfiziert. Als Kontrolle, ob die

Transfektion bereits Auswirkungen auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration hat, wurden die HEK293-Orai1 Zellen zudem mit einem Leervektor (pIRES2_EGFP) oder mit pIRES_STIM1 transfiziert. Die Zellen wurden ebenfalls mit Fura-2/AM behandelt und mittels Ca^{2+} -Imaging die Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Austausch von Ca^{2+} -freiem gegen Ca^{2+} -haltigem Medium verfolgt. Wie in Abb. 4-2 ersichtlich wird, bewirkte die Expression von Orai1 in Verbindung mit STIM1 eine signifikante Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gegenüber den HEK293-Orai1 Kontrollzellen. Eine zusätzliche Expression von SGK1^{S422D} konnte die Ca^{2+} -Konzentration weiter steigern. Die Expression der inaktiven Mutante von SGK1 hingegen hatte keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Konzentration.

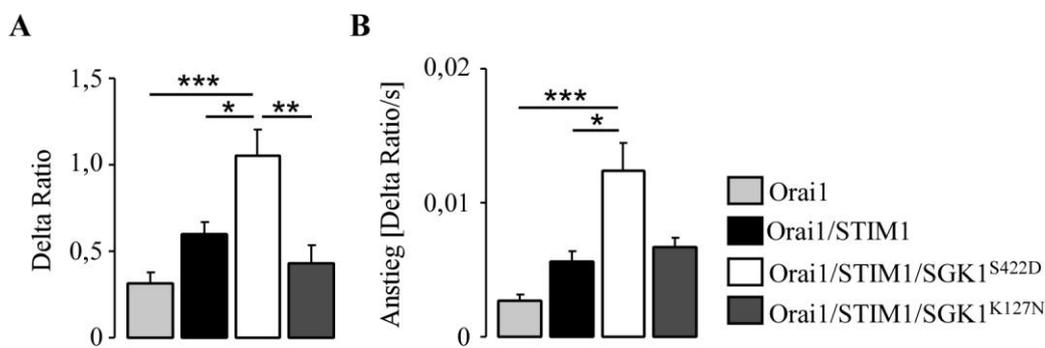


Abb. 4-2 Intrazelluläres Ca^{2+} -Imaging des SOCE in HEK293-Orai1 Zellen sowie Varianten mit zusätzlichen überexprimierenden STIM1 und konstitutiv aktiver oder inaktiver Mutante von SGK1.

Die Mittelwerte (\pm SEM, $n=8-13$) der SOCE-Messungen von Orai1-überexprimierenden und zusätzlich mit pIRES2_EGFP, pIRES_STIM1, pIRES_STIM1/pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} oder pIRES_STIM1/pIRES2_EGFP_SGK1^{K127N} transfizierten Zellen.

Durch Koexpression von Orai1/STIM1/SGK1^{S422D} konnte eine signifikante Zunahme der **A**) Amplitude in und **B**) des Anstiegs von SOCE in HEK293 Zellen im Vergleich zu Orai1 und Orai1/STIM1 überexprimierenden Zellen gemessen werden. Die Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration bei Orai1/STIM1/SGK1^{K127N} war gegenüber Orai1 oder Orai1/STIM1 überexprimierenden Zellen kaum verändert. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, ANOVA).

Es sollte nun verifiziert werden, ob es sich bei der Konzentrationszunahme von Ca^{2+} um I_{CRAC} handelte. Zu diesem Zweck wurde der Strom in transfizierten HEK293-Orai1 Zellen mittels Ganzzell-Ableitungen des Patch-Clamp-Verfahrens gemessen (siehe 3.3.3). Die Aktivierung von I_{CRAC} erfolgte durch Infusion der Zellen mit interner Messlösung, die unter anderem mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA sowie IP_3 gefüllt war, um die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher sicher zu entleeren. Die Messung zeigte eine signifikante Zunahme der Leitfähigkeit in den Orai1/STIM1/SGK1^{S422D} exprimierenden Zellen, während Orai1/STIM1/SGK1^{K127N} exprimierende Zellen keinen erhöhten Stromfluss aufwiesen (vgl. Abb. 4-3).

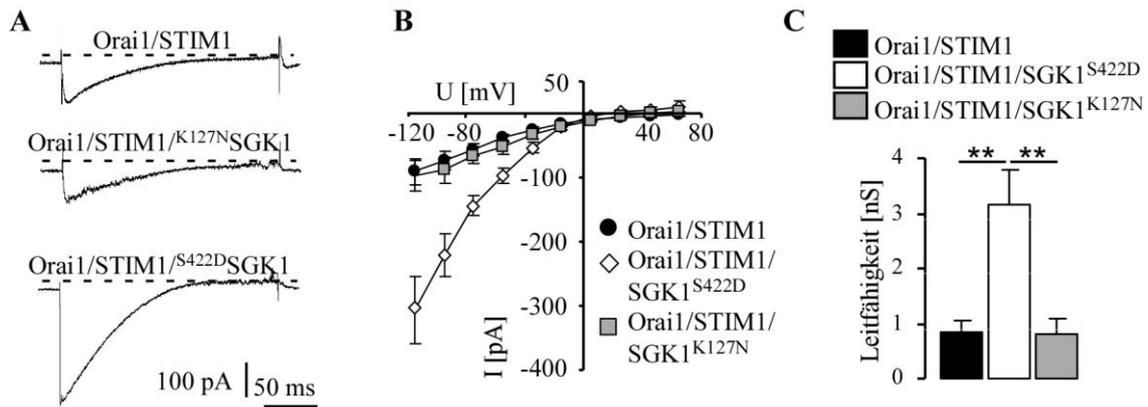


Abb. 4-3 Ganzzell-Ableitungen der *Patch-Clamp*-Technik in *STIM1* überexprimierenden HEK293-*Orai1* Zellen sowie in *STIM1* transient transfizierten HEK293-*Orai1* Zellen mit zusätzlich überexprimierter aktiver oder inaktiver Mutante von *SGK1*.

A) Original Ramp-Stromverläufe in Zellen, die entweder *Orai1/STIM1*, *Orai1/STIM1/SGK1*^{S422D} oder *Orai1/STIM1/SGK1*^{K127N} exprimierten. **B)** Mittelwerte (\pm SEM, $n=5-6$) der Strom-Spannung-Beziehungen (*I/U*-Kurven), ausgelöst durch Spannungsimpulse von -120 bis +80 mV in 20 mV Inkrementen. **C)** Mittelwerte der Leitfähigkeit [nS] nach linearer Regression zwischen -115 bis -35 mV aus den ermittelten *I/U*-Kurven. Die Leitfähigkeit war in den Zellen, welche die aktive Mutante von *SGK1* exprimierten, signifikant erhöht (** $p \leq 0,01$, ANOVA).

4.1.2 Bestimmung der Membran- und Gesamtproteinmenge von *Orai1*

Die vorangegangenen Experimente dienten als Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen, da sie auf einen Zusammenhang zwischen *SGK1* und I_{CRAC} hindeuteten. Im Folgenden sollte nun geklärt werden, wie *SGK1* I_{CRAC} beeinflusst.

Hierfür wurden HEK293-*Orai1* Zellen mit pIRES2_EGFP-*SGK1*^{S422D} oder pIRES2_EGFP-*SGK1*^{K127N} transfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor pIRES2_EGFP. 48 h nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen (siehe 3.4.1), woraufhin die Zelllysate in einem 10%igem SDS-Gel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.4.5) und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen wurden (siehe 3.4.6). Nach Inkubation der Membran mit einem für *Orai1* spezifischen primären Antikörper und darauffolgender Behandlung mit einem sekundären *horse radish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Antikörper wurde die Bande für *Orai1* chemiluminometrisch quantitativ beurteilt (Quantity One, Bio-Rad). Die ermittelte Proteinmenge ergab, dass Zellen, die mit pIRES2-*SGK1*^{S422D} transfiziert wurden, signifikant mehr *Orai1* enthielten als Zellen, die mit dem Kontrollvektor bzw. mit der inaktiven Mutante von *SGK1* transfiziert wurden (vgl. Abb. 4-4).

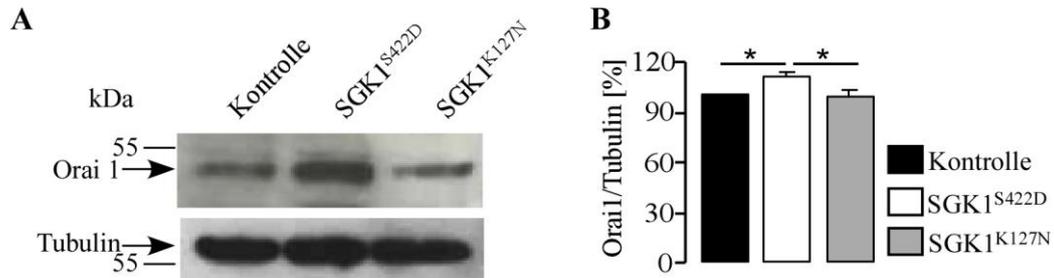


Abb. 4-4 Bestimmung der Orai1-Gesamtproteinmenge in HEK293-Orai1 Zellen, welche mit pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} bzw. pIRES2_EGFP_SGK1^{K127N} transfiziert wurden.

A) Repräsentativer Western Blot von Orai1 (Millipore, 1:1000) in lysierten Zellen. Als Kontrolle wurde pIRES2_EGFP transfiziert. Zur Ladungskontrolle wurde der Blot gestrippt und mit einem anti-Tubulin Antikörper (Cell Signaling, 1:1000) inkubiert. **B)** Mittelwerte (\pm SEM, n=4) des Orai1/Tubulin Verhältnisses, normalisiert auf Kontrollzellen. Es konnte eine signifikante Zunahme der Orai1-Proteinmenge in Zellen bestimmt werden, die mit pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} transfiziert wurden, im Vergleich zu Zellen, die lediglich mit Kontrollvektor oder pIRES2-EGFP_SGK1^{K127N} transfiziert wurden (* $p \leq 0,05$, ANOVA).

Im Anschluss sollte analysiert werden, ob die Zunahme in der Proteinmenge von Orai1 sich auch in einer Zunahme des in der Membran befindlichen Orai1 widerspiegelte. Hierzu wurden HEK293-Orai1 Zellen mit dem Leervektor pIRES2_EGFP, pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} oder pIRES2_EGFP_SGK1^{K127N} transfiziert und 48 h nach Transfektion für 30 min bei 4°C mit EZ-link-Sulfo-NHS-Biotin behandelt. Biotin kann an extrazelluläre Glykosylierungsstellen von Membranproteinen binden und ist somit ein Nachweis für membranständige Proteine. Nach Abstoppen der Reaktionen und Lyse der Zellen konnten durch Präzipitation des Biotins mit Neutravidin-Agarose Membranproteine isoliert werden (siehe 3.4.2). Zusätzlich wurde von jeder Gruppe 10% der Probe abgenommen (*Input*), um später die gleichmäßige Beladung der Neutravidin-Agarose zu überprüfen. Nach Trennung der Proteine über ein SDS-Gel (siehe 3.4.5) und Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Western Blot (siehe 3.4.6) erfolgte die chemiluminometrische Detektion von Orai1. Die Bandenstärken, welche den Proteinmengen der einzelnen Proben entsprechen, wurden mit Hilfe des Quantity One-Programms (Bio-Rad) bestimmt. Außerdem wurden die Proben zur Ladungskontrolle mit einem Antikörper gegen Tubulin inkubiert. Wie in Abb. 4-5 deutlich wird, war die Orai1-Proteinkonzentration in der Zellmembran von den Zellen signifikant erhöht, welche die aktive Mutante von SGK1 exprimierten im Vergleich zu Kontrollzellen und Zellen, welche die inaktive Mutante von SGK1 exprimierten.

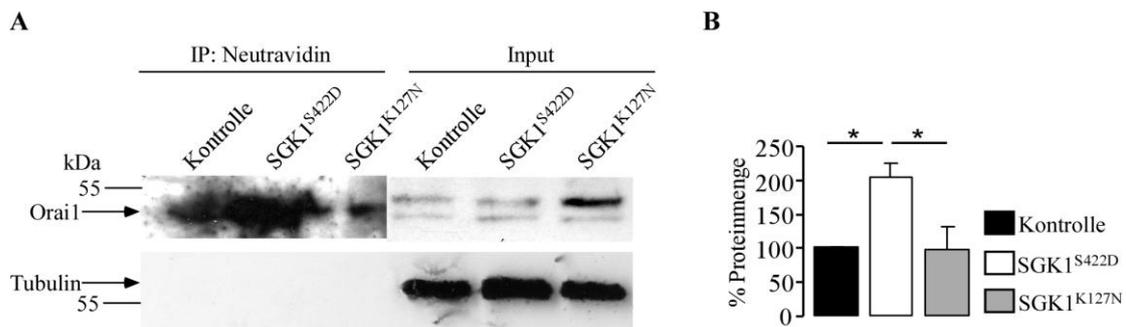


Abb. 4-5 Bestimmung der membranständigen Orai1-Proteinmenge in HEK293-Orai1 Zellen, welche mit pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} bzw. pIRES2_EGFP_SGK1^{K127N} transfiziert wurden.

A) Repräsentativer Western Blot von Zelllysaten. Biotinyliertes Orai1 wurde mittels Neutravidin präzipitiert und im Blot durch einen anti-Orai1 Antikörper (Millipore, 1:1000) nachgewiesen. Tubulin (Cell Signaling, 1:1000) diente als Ladungskontrolle. **B)** Verhältnis der Mittelwerte [%] bezogen auf Kontrollzellen (\pm SEM, $n=6$). Die Transfektion mit der aktiven Mutante von SGK1 führte zu einer signifikant erhöhten Inkorporation von Orai1 in die Plasmamembran im Vergleich zu Zellen, die mit pIRES2_EGFP (Kontrolle) transfiziert wurden. Die Expression der inaktiven Mutante von SGK1 zeigte keinen Effekt auf die Inkorporation von Orai1 in die Membran ($*p \leq 0,05$, ANOVA).

Das erhöhte Vorkommen von Orai1 in der Plasmamembran nach Transfektion der aktiven Mutante von SGK1 sollte mittels Immunfluoreszenz validiert werden. Hierfür wurden HEK293-Orai1 Zellen zusätzlich mit pcDNA3.1+_SGK1^{S422D} oder pcDNA3.1+_SGK1^{K127N} nach Herstellerprotokoll (Fugene HD, Roche) transfiziert. Zur Detektion von Orai1 wurden die Zellen fixiert und nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels 5% BSA/PBS (w/v) mit einem primären Orai1-spezifischem Antikörper behandelt (siehe 3.2.4). Daraufhin wurden die Zellen mit einem sekundären FITC-gekoppeltem Antikörper inkubiert. Der Zellkern wurde mit Hilfe von DRAQ5, das an DNA bindet, gefärbt. Abb. 4-6 zeigt das durch Immunfluoreszenz markierte Orai1 nach Anregung von FITC mit einem Laser bei λ_{488} (grün). Die höchste Fluoreszenzintensität von FITC konnte in der Membran der HEK293-Orai1 Zellen bestimmt werden, die zusätzlich die aktive Mutante von SGK1 exprimierten. Im Vergleich dazu war die Intensität der FITC-Fluoreszenz in der Membran von Zellen, die SGK1^{K127N} exprimierten, mit der Intensität der FITC-Fluoreszenz in den Kontrollzellen vergleichbar.

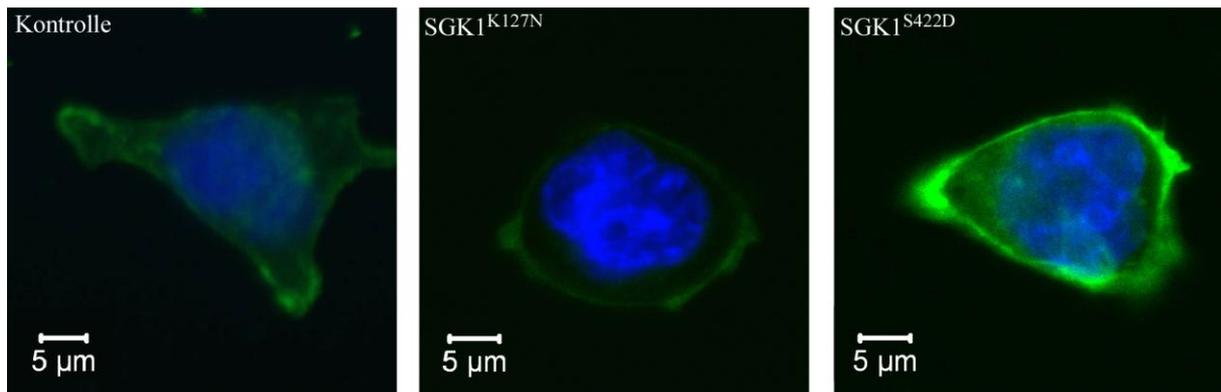


Abb. 4-6. Immunfluoreszenz von HEK293-Orai1 Zellen nach Orai1-selektiver FITC-Antikörpermarkierung (grün).

Repräsentative Abbildungen aus fünf verschiedenen Experimenten, wobei jeweils 13 Zellen untersucht wurden. Die stabil Orai1-transfizierten Zellen waren zusätzlich mit $SGK1^{K127N}$ oder $SGK1^{S422D}$ transfiziert (grün: Orai1, blau: Zellkern). Die Expression der inaktiven Mutante von SGK1 zeigte keine Änderung der FITC-Fluoreszenzintensität gegenüber Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu nahm die Fluoreszenzintensität von FITC in der Membran in Zellen, welche die aktive Mutante von SGK1 exprimierten, zu.

4.1.3 Beeinflussung von SOCE und I_{CRAC} durch Nedd4-2

SGK1 reguliert verschiedene Ionenkanäle wie ENaC, ClC-2 oder TRPV5 und TRPV6, wobei sich die Regulierungsmechanismen unterscheiden (Lang *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2006). Zunächst sollte untersucht werden, ob die Regulierung von Orai1 durch SGK1 mittels direkter Interaktion in Folge von Phosphorylierung stattfindet. Orai1 enthält hierfür eine entsprechende Konsensussequenz, **RXRXXS** (Lang *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2006). Zur Überprüfung, ob eine direkte Phosphorylierung vorlag, wurden HEK293-Orai1 Zellen transient mit pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} oder pIRES2_EGFP_SGK1^{K127N} transfiziert. Kontrollzellen wurden mit dem Leervektor pIRES2_EGFP transfiziert. Anschließend wurde eine Immunopräzipitation gegen Orai1 durchgeführt (siehe 3.4.3.1), die Proben im SDS-Gel getrennt (siehe 3.4.5) und weiterhin auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 3.4.6). Die Detektion der Phosphorylierung von Orai1 erfolgte mit einem Phospho-XSXXS/T Akt Substrat-Antikörper (Cell Signaling, 1:500). Nach Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Antikörper (Cell Signaling, 1:1000) und chemiluminometrischer Auswertung konnten jedoch keine Banden festgestellt werden (Ergebnis nicht gezeigt). Durch Inkubation der Membran mit einem Antikörper gegen Orai1 (Protein Tech, 1:500) konnte allerdings eine erfolgreiche Anreicherung von Orai1 mit Hilfe der Immunopräzipitation nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Aufgrund dieses Ergebnisses sollte nun auf eine indirekte Interaktion zwischen SGK1 und Orai1 hin untersucht werden. Es ist bekannt, dass SGK1 die Ubiquitin Ligase Nedd4-2 durch Phosphorylierung regulieren kann (Bhalla *et al.*, 2005; Debonneville *et al.*, 2001). Hierdurch wird Nedd4-2 inhibiert, wodurch Zielproteine des Nedd4-2 nicht ubiquitiniert werden können.

Die Degradation dieser Zielproteine ist im Weiteren nicht mehr möglich. Ein direkter Zusammenhang zwischen Nedd4-2 und Orai1 war aus der Literatur nicht bekannt. Obwohl Orai1 nicht das für Nedd4-2 bekannte PY-Motif enthält, sollte zunächst mit Hilfe von Immunopräzipitation (siehe 3.4.3.1) untersucht werden, ob eine Ubiquitinierung von Orai1 vorliegt. Hierfür wurden HEK293-Orai1 Zellen mit einem Kontrollplasmid oder Hämagglutinin (HA)-markiertem Ubiquitin transfiziert. Zusätzlich wurden HA-Ubiquitin transfizierte Zellen für 4 h mit dem Proteasominhibitor MG132 (50 μ M) bei 37°C behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde Orai1 mittels eines spezifischen Antikörpers aus dem Lysat isoliert (siehe 3.4.3.1). Von den Proben wurden jeweils 5% für eine spätere Kontrolle abgenommen (*Input*). Nach Elution wurden die immunopräzipitierten Proteine in einem SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 3.4.5 und 3.4.6). Anschließend erfolgte die Detektion von Orai1, HA sowie Tubulin. Wie in Abb. 4-7 deutlich wird, führte die Behandlung der Zellen mit Ubiquitin zu ubiquitiniertem Orai1. Dies wird indirekt durch die Verschiebung des Proteingewichts von Orai1 zu höheren Molekulargewichten sichtbar. Weiterhin konnte im Western Blot nach Inkubation der Membran mit einem Antikörper für HA eine starke Ubiquitinierung des durch Immunopräzipitation angereicherten Orai1 festgestellt werden. Diese wurde nach Hemmung des Proteasomkomplexes mit MG132, wodurch die Degradierung verhindert wird, noch verstärkt.

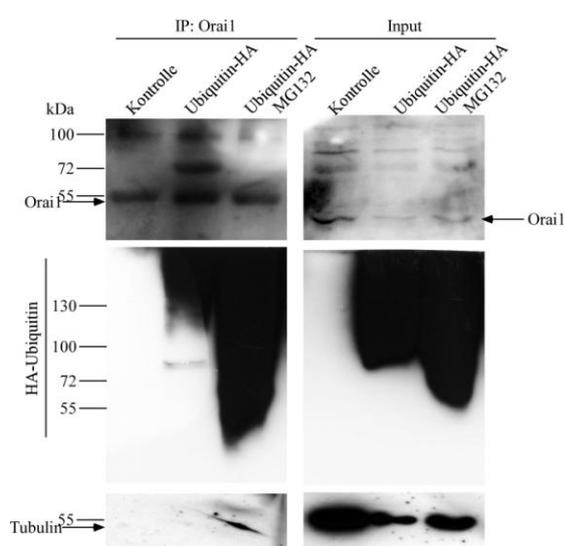


Abb. 4-7 Bestimmung von ubiquitiniertem Orai1 in HEK293-Orai1 Zellen nach Transfektion mit pcDNA3.1+, pcDNA3+_{HA}-Ubiquitin sowie Behandlung mit 50 μ M MG132.

Repräsentativer Western Blot von insgesamt vier Experimenten nach Immunopräzipitation (IP) mit einem Orai1-Antikörper (Santa Cruz, 2,5 μ g) sowie der jeweiligen Proben vor IP (Input). Orai1 wurde mit einem spezifischen Antikörper (Protein Tech, 1:500) detektiert. Die Ubiquitinierung von Orai1 konnte durch einen HA-spezifischen Antikörper (Roche, 1:500) sowohl in HA-Ubiquitin transfizierten Zellen als auch nach Inkubation mit MG132 nachgewiesen werden. Durch Hemmung des Proteasomkomplexes wurde ubiquitiniertes Orai1 in der Zelle akkumuliert. Die Membran wurde gestrippt und mit einem anti-Tubulin Antikörper (Cell Signaling, 1:1000) als Ladungskontrolle inkubiert.

Die Inhibierung von Nedd4-2 durch SGK1 wurde aufgrund dieses Ergebnisses als mögliche Ursache des beobachteten erhöhten Vorkommens von Orai1 in der Plasmamembran in Betracht gezogen.

Für die Überprüfung dieser Annahme sollte zunächst der Ca^{2+} -Einstrom in Zellen untersucht werden, die lediglich Orai1, STIM1 und Nedd4-2 koexprimierten.

Hierfür wurde der Ca^{2+} -Eintritt in HEK293-Orai1 Zellen nach Transfektion mit pIRES_STIM1 oder pIRES_STIM1/pmRFP-C2_Nedd4-2 mittels FACS-Analyse bestimmt (siehe 3.3.2). Wie in Abb. 4-8 dargestellt, zeigten Zellen, die STIM1 überexprimierten einen signifikant erhöhten SOCE gegenüber der Kontrollgruppe. Bei den Zellen, die STIM1 und zusätzlich Nedd4-2 überexprimierten, wurde eine Repression des SOCE nachgewiesen, deren Ca^{2+} -Einstrom vergleichbar zu den Kontrollzellen war.

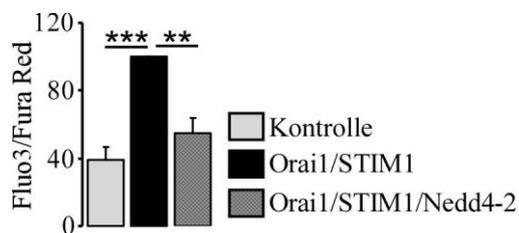


Abb. 4-8 FACS-Analyse des Ca^{2+} -Einstroms in HEK293-Orai1 Zellen, welche STIM1 oder STIM1/Nedd4-2 exprimierten.

Normierte Mittelwerte (\pm SEM, $n=6$) des Verhältnisses von Fluo3 und Fura Red. Die Expression von Orai1/STIM1 führte zu einem signifikanten Anstieg des SOCE, der bei zusätzlicher Expression von Nedd4-2 wiederum signifikant verringert war (** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ ANOVA).

Die erhaltenen Daten der FACS-Analysen bezüglich des Ca^{2+} -Einstroms sollten im Weiteren als Einzelzellverfahren mit Ca^{2+} -Fura2-Messungen validiert werden (siehe 3.3.1). Die Messungen hierzu wurden von N. Heise durchgeführt.

Hierfür wurden HEK293-Orai1 Zellen mit pIRES_STIM1, pIRES_STIM1/pmRFP-C2_Nedd4-2 sowie mit pIRES_STIM1/pmRFP-C2_Nedd4-2/pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} transfiziert. Die zusätzliche Transfektion von SGK1^{S422D} diente der Analyse, inwieweit SOCE wiederhergestellt werden kann, wenn zusätzlich zu Nedd4-2 noch SGK1^{S422D} exprimiert wird. Als Kontrollgruppe für letztere Gruppe wurden außerdem Zellen mit pIRES_STIM1/pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} transfiziert. Die Zellen wurden mit Fura-2/AM beladen und nach Stimulierung von SOCE mit 2 μM Thapsigargin sowie Zugabe von Ca^{2+} wurde der intrazelluläre Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration bestimmt. Es wurde auch hier deutlich, dass der Influx von Ca^{2+} in Orai1/STIM1 exprimierenden Zellen signifikant erhöht war gegenüber Kontrollzellen (vgl. Abb. 4-9). Durch zusätzliche Überexpression von Nedd4-2 zu Orai1 und STIM1 konnte SOCE inhibiert werden. Eine Koexpression von SGK1^{S422D} und Nedd4-2 zu Orai1/STIM1 führte zur Wiederherstellung des Anstieges der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

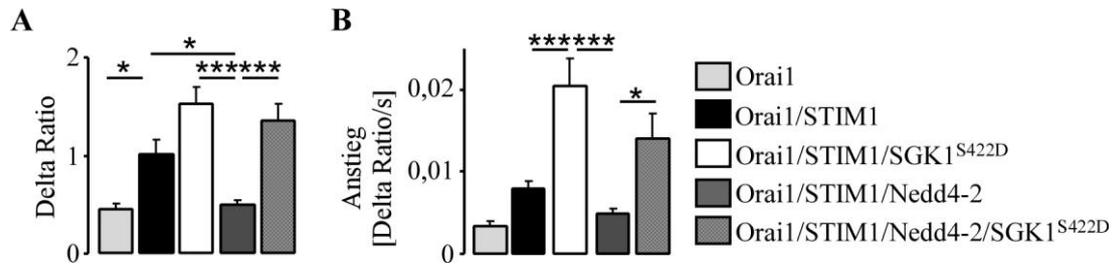


Abb. 4-9 Ca^{2+} -Imaging zur Analyse des Ca^{2+} -Einstroms in HEK293 Zellen, welche stabil Orai1 und zusätzlich STIM1, STIM1/SGK1^{S422D}, STIM1/Nedd4-2 oder STIM1/Nedd4-2 und SGK1^{S422D} überexprimierten.

A) Mittelwerte (\pm SEM, $n=14-27$) des maximalen Ca^{2+} -Einstroms. **B)** Mittelwerte (\pm SEM, $n=14-27$) der Regressionsgeraden, die aus dem Anstieg des Ca^{2+} -Einstroms berechnet wurden. Der Ca^{2+} -Influx in Zellen, die Nedd4-2 exprimierten, war signifikant erniedrigt gegenüber Orai1/STIM1 exprimierenden Zellen. SGK1^{S422D} konnte SOCE trotz Überexpression von Nedd4-2 wiederherstellen (* $p<0,05$, *** $p<0,001$ ANOVA).

Durch das *Patch-Clamp*-Verfahren ist es möglich I_{CRAC} direkt zu messen. Dieses Verfahren ergänzt die bisher gewonnen Daten durch Messungen des Ca^{2+} -Einstroms an Orai1-Kanälen (durchgeführt von E. Shumilina). Hierzu wurden HEK293-Orai1 Zellen mit pIRES_STIM1, pIRES_STIM1/pmRFP-C2_Nedd4-2 bzw. zusätzlich mit pIRES2_EGFP_SGK1^{S422D} transfiziert. Die bei einer Messspannung von -115 mV und -35 mV ermittelten Leitfähigkeiten des zugrundeliegenden I_{CRAC} waren in Nedd4-2 exprimierenden Zellen ($0,83\pm 0,11$ nS, $n=26$) im Vergleich zu Orai1 und STIM1 exprimierenden Zellen ($2,09\pm 0,46$ nS, $n=22$) signifikant verringert ($p<0,002$). Durch zusätzliche Expression der aktiven Mutante von SGK1 konnte die Leitfähigkeit und damit I_{CRAC} zumindest teilweise wieder hergestellt werden ($1,44\pm 0,17$ nS, $n=21$, signifikanter Unterschied zu Orai1, STIM1, Nedd4-2 exprimierenden Zellen, $p<0,004$).

4.1.4 Regulierung der Membranlokalisation von Orai1 durch Nedd4-2

Die Unterschiede in SOCE und I_{CRAC} , verursacht durch Nedd4-2, im Vergleich zu den Kontrollzellen, sollten entsprechend mittels RNA-Interferenz für Nedd4-2 bzw. nach Überexpression von Nedd4-2 im Western Blot (siehe 3.4.5 und 3.4.6) und anhand von Immunfluoreszenzmessungen (siehe 3.2.4) überprüft werden.

Für die Analyse der Orai1-Proteinabundanz mittels Immunfluoreszenz wurden zunächst HEK293-Orai1 Zellen mit pmRFP-C2_Nedd4-2, pmRFP-C2_Nedd4-2 und pcDNA3.1+_SGK1^{S422D} bzw. dem Leervektor pcDNA3.1+ für 48 h transfiziert (siehe 3.2.3.1). Der Nachweis von Orai1 erfolgte mit einem Orai1-spezifischen primären (siehe 3.2.4 und 2.7.1) sowie einem FITC gekoppelten sekundären Antikörper (grün). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DRAQ5 (blau). Es wurde deutlich, dass die Expression von Nedd4-2 zu einer stark verringerten Fluoreszenzintensität des FITC-Chromophors in der Zellmembran

führte, was auf eine verringerte Membraninkorporation von Orai1 schließen lässt, im Gegensatz zu Zellen, die SGK1^{S422D} koexprimierten. Hierbei war eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität von FITC in der Zellmembran zu messen (vgl. Abb. 4-10).

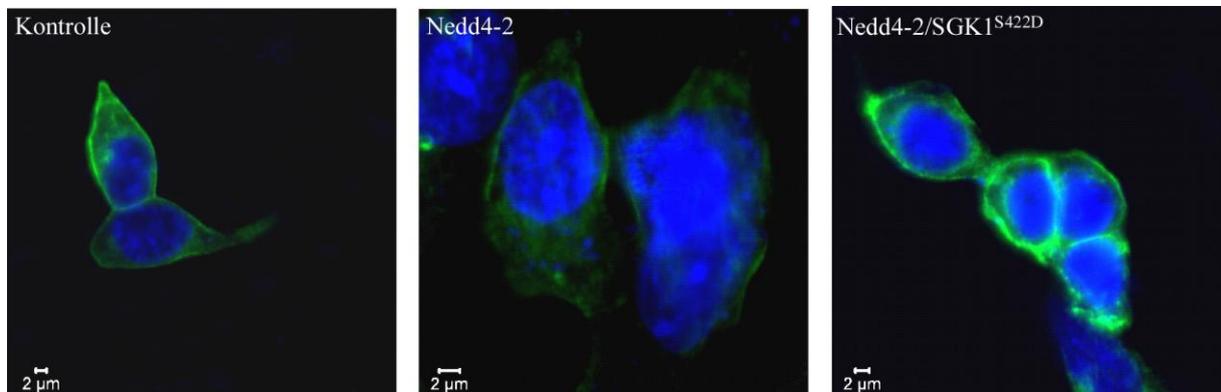


Abb. 4-10 Immunfluoreszenz von HEK293-Orai1 Zellen, nach Orai1-selektiver FITC-Antikörpermarkierung (grün).

Repräsentative Abbildungen aus vier verschiedenen Experimenten, wobei jeweils neun Zellen untersucht wurden. Die HEK293-Orai1 Zellen koexprimierten zusätzlich Nedd4-2 oder Nedd4-2 und SGK1^{S422D}. Die Expression von Nedd4-2 zeigte eine deutliche Verringerung der FITC-Fluoreszenzintensität in der Zellmembran gegenüber Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu nahm die Fluoreszenzintensität von FITC in der Membran in Zellen, die zusätzlich zu Nedd4-2 die aktive Mutante von SGK1 exprimierten, stark zu.

Zur Validierung des in den obigen Ergebnissen ermittelten Einflusses von Nedd4-2 auf Orai1 wurden HEK293 Zellen mit siRNA (10 nmol) gegen Nedd4-2 transfiziert (siehe 2.9 und 3.2.3.2). Als Transfektionskontrolle dienten mit *scrambled* siRNA transfizierte HEK293 Zellen. Die Zellen wurden lysiert und nach Übertragen der im SDS-PAGE (siehe 3.4.5) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (siehe 3.4.6), wurde der *knock down* von Nedd4-2 sowie die Orai1-Proteinexpression chemiluminometrisch bestimmt (siehe 3.4.7). Es wurde eine deutlich verminderte Expression von Nedd4-2 erreicht (bis zu 60%). Gleichzeitig konnte quantitativ mehr Orai1-Protein in den Zellen nachgewiesen werden, die mit siRNA gegen Nedd4-2 behandelt wurden (vgl. Abb. 4-11). Nach *Strippen* des Blots wurde Tubulin mit einem spezifischen Antikörper als Ladungskontrolle detektiert. Wie im Graphen deutlich wird, war signifikant mehr Orai1 in den Zellen vorhanden, die vermindert Nedd4-2 exprimierten.

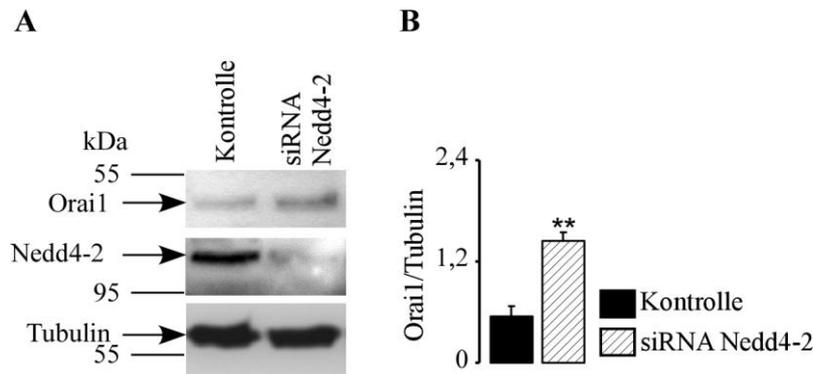


Abb. 4-11 Western Blot-Analyse von Orai1-Protein nach RNA-Interferenz gegen Nedd4-2.

A) Repräsentativer Western Blot von HEK29 Zellen nach Transfektion von siRNA gegen Nedd4-2. Nach der Antikörpermarkierung von Orai1 (Millipore, 1:1000) wurde der Blot gestrippt und Nedd4-2 (Abcam, 1:1000) sowie Tubulin (Cell Signaling, 1:1000) mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. **B)** Mittelwerte der berechneten Verhältnisse von Orai1/Tubulin (\pm SEM, n=4). Die Proteinmenge von Orai1 war in Zellen, die mit siRNA gegen Nedd4-2 transfizierten waren, im Vergleich zu Zellen, die mit scrambled siRNA transfiziert waren, erhöht (** $p < 0,05$ ANOVA).

Der mittels Immunfluoreszenz beobachtete Effekt, dass bei Koexpression von Nedd4-2 und SGK1^{S422D} die Orai1-Abundanz in der Zelle im Vergleich zu Nedd4-2 exprimierenden Zellen vergrößert ist, sollte nun nach Überexpression von Nedd4-2 bzw. Koexpression von Nedd4-2 und SGK1^{S422D} mittels Western Blot validiert werden. Es wurden hierfür HEK293 Zellen mit pmRFP-C2_Nedd4-2 bzw. pmRFP-C2_Nedd4-2 und pcDNA3.1+_SGK1^{S422D} für 48 h transfiziert. Als Kontrolle wurde eine Gruppe HEK293 Zellen mit dem Leervektor pcDNA3.1+ transfiziert (siehe 3.2.3.1). Die Proteinmenge von Orai1 sowie Tubulin als Ladungskontrolle wurde mittels Western Blot bestimmt (siehe 3.4.6). Wie in Abb. 4-12 dargestellt ist, war die quantitativ ermittelte (Quantity One, Biorad) Orai1-Proteinkonzentration in Nedd4-2 exprimierenden Zellen signifikant verringert gegenüber der Kontrollgruppe, während in HEK293 Zellen, die zusätzlich die konstitutiv aktive Mutante von SGK1 exprimierten, die Orai1-Proteinmenge wieder signifikant zunahm.

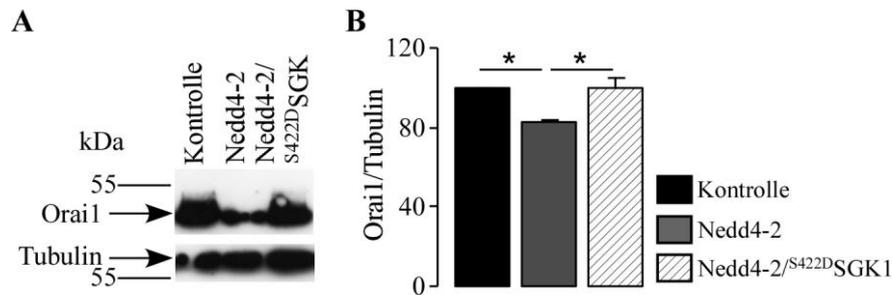


Abb. 4-12 Bestimmung der Orai1-Abundanz in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von Nedd4-2 und Nedd4-2/SGK1^{S422D} mittels Western Blot.

A) Repräsentativer Western Blot von Orai1 (Millipore, 1:1000) in HEK293 Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden bzw. Nedd4-2 oder Nedd4-2 und die aktive Mutante von SGK1 exprimierten. Der Blot wurde gestrippt und mittels Antikörper-Tubulinmarkierung (Cell Signaling, 1:1000) die gleichmäßige Beladung der Geltaschen kontrolliert. **B)** Mittelwert (\pm SEM, n=5) der Verhältnisse der quantifizierten Banden von Orai1/Tubulin. Die Expression von Nedd4-2 verringerte die Orai1-Proteinmenge signifikant gegenüber der Kontrollgruppe, während durch die Koexpression von SGK1^{S422D} die Menge von Orai1 vergleichbar zur Kontrollgruppe war (* p <0,05, ANOVA).

4.2 Regulierung der Transkription von Orai1 und STIM1

4.2.1 Bestimmung der mRNA-Level von Orai1 und STIM1

Die Messung von SOCE in Mastzellen ergab eine signifikante Erniedrigung in SGK1-defizienten Mastzellen (*sgk1*^{-/-}) im Vergleich zu den Mastzellen, die aus Wildtypmäusen isoliert wurden (siehe 4.1.1). Neben der bereits beschriebenen Regulierung der Proteinmenge von Orai1 durch die Ubiquitin Ligase Nedd4-2, die vor allem die Unterschiede der Membraninkorporation von Orai1 in HEK293-Orai1 Zellen bei Anwesenheit von Nedd4-2 erklärt, bestand weiterhin die Möglichkeit einer Regulierung auf Transkriptionsebene, da SGK1 verschiedene Transkriptionsfaktoren wie FoxO3A oder NF- κ B reguliert (Brunet *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005a), welche nach Stimulierung von SGK1 die Transkription von Orai1 oder STIM1 beeinflussen könnten. Zur Überprüfung der Hypothese, ob endogene SGK1 die Transkription von Orai1 oder STIM1 beeinflusst, wurden als Modellzellen Mastzellen aus SGK1-defizienten Mäusen sowie deren Wildtyp-Wurfgeschwistern lysiert und die mRNA-Level von STIM1 und Orai1 mittels RT-PCR (siehe 3.1.5) bestimmt. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die an Exons der Gene für Orai1, STIM1 und SGK1 binden (siehe 2.8.2). Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) mit den entsprechenden Oligonukleotiden verwendet. Die Normierung der Genexpression erfolgte anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Pfaffl (Pfaffl, 2001). Es wurde deutlich, dass in den Mastzellen, die aus *sgk1*^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, die mRNA-Level sowohl für STIM1 als auch für Orai1 im Vergleich zu Mastzellen der Wildtyp-Wurfgeschwister signifikant geringer waren (vgl. Abb. 4-13).

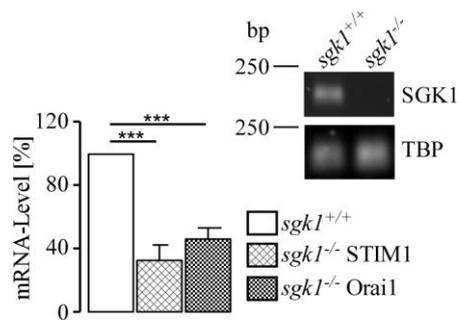


Abb. 4-13 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in Mastzellen.

Normierte Mittelwerte (\pm SEM, $n=15$) der relativen mRNA-Level für *Orai1* und *STIM1* in Mastzellen aus *sgk1*^{+/+}- und *sgk1*^{-/-}-Mäusen. Sowohl *Orai1* als auch *STIM1* wurden in Mastzellen aus *sgk1*^{-/-} Mäusen signifikant weniger exprimiert. Der knock down von *SGK1* in den Mäusen wurde mit spezifischen Oligonukleotiden durch PCR und Gelelektrophorese überprüft (** $p < 0,001$, Student's *t*-test).

Es wurde ebenfalls der *knock down* von *SGK1* in den Mäusen mit spezifischen Oligonukleotiden untersucht, um sicherzustellen, dass es sich bei den ausgewählten *sgk1*^{-/-}-Mäusen tatsächlich um *SGK1*-gendifiziente Tiere handelte. Bei den durchgeführten Versuchen, welche jeweils als Duplikate angefertigt wurden, konnte dies bestätigt werden (siehe Abb. 4-13).

Zur Verifizierung des Ergebnisses wurden im Anschluss die Expressionslevel von *Orai1* und *STIM1* nach Transfektion der aktiven oder inaktiven Mutante von *SGK1* in HEK293 Zellen untersucht. Hierzu wurden zunächst HEK293 Zellen mit pIRES2_EGFP bzw. den *SGK1*-Mutanten pIRES2_EGFP_*SGK1*^{S422D} oder pIRES2_EGFP_*SGK1*^{K127N} für 48 h transfiziert und RNA aus den Zellen isoliert (vgl. 3.1.2) sowie cDNA mit Hilfe der *Superscript*[®] II Reversen Transkriptase synthetisiert (siehe 3.1.3). Nach Normierung auf TBP der gemessenen CT-Werte in der folgenden RT-PCR konnten in Zellen, die mit pIRES2_EGFP_*SGK1*^{S422D} transfiziert waren, signifikant höhere mRNA-Level von *Orai1* und *STIM1* gemessen werden, als in Zellen, die lediglich mit dem Kontrollplasmid oder pIRES2_EGFP_*SGK1*^{K127N} transfiziert waren (vgl. Abb. 4-14).

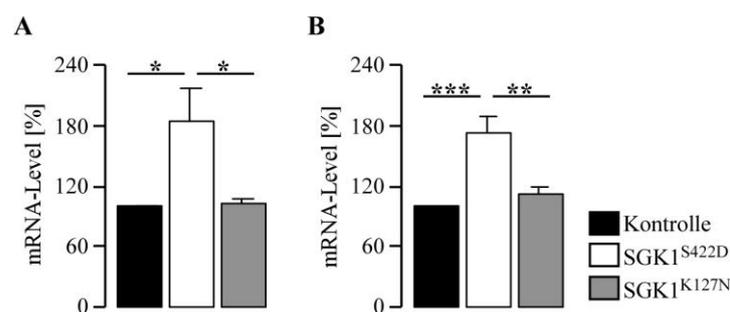


Abb. 4-14 RT-PCR Analyse der relativen mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen, welche *SGK1*^{S422D} oder *SGK1*^{K127N} überexprimierten.

A) Die normierten Mittelwerte (\pm SEM, $n=7$) der relativen mRNA-Level von *STIM1* in Zellen, welche *SGK1*^{S422D} überexprimierten, sind signifikant höher als in Kontrollzellen sowie in Zellen, welche *SGK1*^{K127N} überexprimierten. **B)** Ebenso nahm das mRNA-Level von *Orai1* (normierte Mittelwerte \pm SEM, $n=13$) durch Expression von *SGK1*^{S422D} signifikant gegenüber Kontrollzellen als auch gegenüber Zellen, welche *SGK1*^{K127N} überexprimierten, zu (nach Normierung auf TBP, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ANOVA).

4.2.2 Einfluss der Inhibitoren Lithiumchlorid, Wogonin und Sulfasalazin auf die Orai1- und STIM1 mRNA-Level

Nachdem mit Hilfe der RT-PCR bestätigt werden konnte, dass die Expression von Orai1 und STIM1 durch SGK1 beeinflusst wird, sollte im Folgenden der Mechanismus analysiert werden. Da SGK1 verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren kann (siehe 1.2.2.1), wurde zunächst untersucht, welcher dieser Transkriptionsfaktoren die Regulierung der Transkription von Orai1 und STIM1 beeinflusst. Es sollten im Folgenden drei Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit hin überprüft werden: Lithiumchlorid (LiCl), Wogonin und Sulfasalazin.

LiCl ist ein bekannter Inhibitor der GSK3 β und führt somit zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors β -Catenin (Klein und Melton, 1996; Stambolic *et al.*, 1996), welcher dann vermehrt in den Zellkern migriert und durch Bindung an Promotoren die Transkription verschiedener Gene aktivieren kann. Erfolgt die Regulierung der SGK1 über Inaktivierung der GSK3 β , so sollte nach Stimulierung mit LiCl höhere mRNA-Level von Orai1 und STIM1 messbar sein.

Die Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h erfolgte die Zugabe von LiCl in einer Endkonzentration von 10 mM LiCl. Da LiCl in Wasser gelöst war, wurde eine Kontrollgruppe Zellen mit dem gleichen Volumen an Wasser behandelt und beide Gruppen nochmals für 24 h bei 37°C inkubiert. Extrahierte RNA (siehe 3.1.2) wurde zur Synthese von cDNA genutzt (siehe 3.1.5) und in der folgenden RT-PCR (siehe 3.1.5) spezifische Oligonukleotide für Orai1, STIM1 sowie TBP verwendet (siehe 2.8.2). Wie in Abb. 4-15 A deutlich wird, sind die mRNA-Level von Orai1 und STIM1 nach Behandlung mit LiCl nicht erhöht. Zusätzlich wurden HEK293 Zellen mit pCMV_Sport6_ β -Catenin transfiziert (siehe 2.10 und 3.2.3.1). Da β -Catenin als direkter Transkriptionsfaktor agiert, sollte überprüft werden, ob eine erhöhte Expression von β -Catenin einen Einfluss auf die mRNA-Level von Orai1 oder STIM1 hat. Als Transfektionskontrolle diente der Leervektor pCMV_Sport6. Nach Extraktion der RNA aus den Zellen und reverser Transkription in cDNA (siehe 3.1.2 und 3.1.3) wurde die RT-PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden für Orai1, STIM1 sowie TBP durchgeführt. Die berechneten relativen mRNA-Level aus den CT-Werten nach Pfaffl (Pfaffl, 2001) sind in Abb. 4-15 B dargestellt. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in der Kontrollgruppe und den mit β -Catenin transfizierten Zellen.

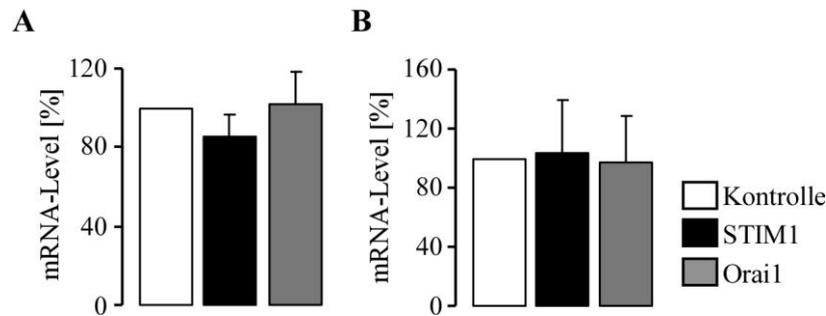


Abb. 4-15 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen, welche mit dem GSK3 β -Inhibitor LiCl behandelt wurden oder β -Catenin überexprimierten.

A) Dargestellt sind die normierten Mittelwerte (\pm SEM, $n=6-7$) der relativen mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen nach Behandlung mit 10 mM LiCl für 24 h. Weder die mRNA-Level von Orai1 noch von STIM1 waren durch die Behandlung beeinflusst. **B)** Normierte Mittelwerte (\pm SEM, $n=4$) der gemessenen mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in HEK293 Zellen, welche β -Catenin überexprimierten. Die mRNA-Level für Orai1 und STIM1 unterschieden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant.

Sulfasalazin und Wogonin (5,7-Dihydroxy-8-methoxyflavon) sind beide Inhibitoren für NF- κ B. Sulfasalazin inhibiert die I κ B Kinasen (IKK) IKK α und IKK β , indem es kompetitiv ATP bindet und somit den NF- κ B Inhibitor I κ B stabilisiert (Wahl *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2000). Mesalamin, ein Metabolit des Sulfasalazins ohne inhibierende Eigenschaften für IKK, hemmt zudem Interleukin-1 induzierte p65 Phosphorylierung und NF- κ B abhängige Transkription in humanen epithelialen kolorektalen Adenokarzinom (Caco-2) Zellen (Egan *et al.*, 1999).

Wogonin inhibiert ebenfalls die Phosphorylierung von I κ B, wodurch die Translokation von NF- κ B in den Zellkern verhindert wird (Zhao *et al.*, 2010).

Zur Überprüfung einer möglichen Inhibierung der Transkription von Orai1 oder STIM1 durch NF- κ B-Inhibitoren wurden HEK293 Zellen, 24 h nachdem sie in Zellkulturschalen ausgesät wurden, mit Sulfasalazin (2,5 mM Endkonzentration) für 30 min bei 37°C nach Protokoll von Liptay und Weber (Liptay *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2000) inkubiert. Außerdem wurden Zellen mit 100 μ M (Endkonzentration) Wogonin behandelt und für weitere 24 h bei 37°C laut Protokoll (Fas *et al.*, 2006) inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit 0,1% DMSO (Endkonzentration) behandelt. Nach den angegebenen Inkubationzeiten wurden die Zellen lysiert, RNA isoliert (siehe 3.1.2) und cDNA synthetisiert (siehe 3.1.5). Zur Detektion der mRNA-Level mit Hilfe von RT-PCR für Orai1, STIM1 und TBP wurden die entsprechenden Oligonukleotide genutzt (siehe 2.8.2 und 3.1.5). In Abb. 4-16 sind die relativen mRNA-Level von Orai1 und STIM1, die mit der $2^{-\Delta\Delta C_P}$ -Methode bestimmt wurden (Pfaffl, 2001), dargestellt. Es wird deutlich, dass bei beiden Inhibitoren die relativen mRNA-Level für STIM1 und Orai1 gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt sind.

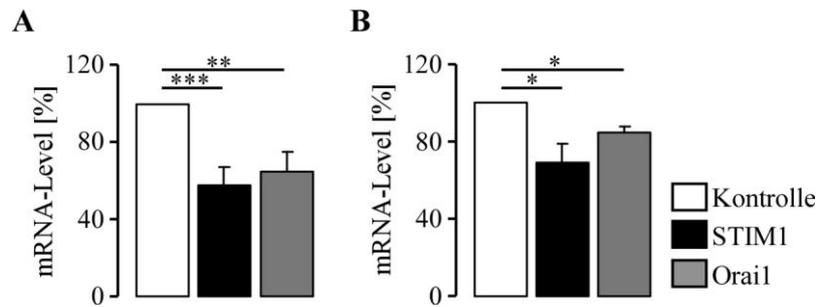


Abb. 4-16 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen, welche mit den NF-κB-Inhibitoren Wogonin oder Sulfasalazin behandelt wurden.

A) Die dargestellten normierten Mittelwerte (\pm SEM, $n=10$) der relativen mRNA-Level von Orai1 und STIM1 zeigen, dass die Behandlung mit 100 μ M Wogonin zu einer reduzierten Expression von STIM1 und Orai1 führte. **B)** Die normierten Mittelwerte (\pm SEM) der relativen mRNA-Level von STIM1 ($n=5$) und Orai1 ($n=8$) nach Behandlung von HEK293 Zellen mit 2,5 mM Sulfasalazin waren signifikant verringert im Vergleich zu den Kontrollzellen (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, Student's *t*-test).

4.2.3 Einfluss von p65/p50 und p65/p52 auf die mRNA- und Protein-Level von STIM1/Orai1

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF-κB die Expression von STIM1 und Orai1 beeinflusst, sollte im Weiteren geklärt werden, ob im Speziellen einzelne Untereinheiten von NF-κB regulatorisch auf die Expression von STIM1/Orai1 wirken.

Die NF-κB-Familie besteht aus fünf Untereinheiten: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel und RelB, die durch die Gene *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *REL* und *RELB* codiert werden. P50 und p52 werden als Vorläufermoleküle p105 bzw. p100 gebildet. Diese Vorläufermoleküle verfügen C-terminal über eine Ankyrin Wiederholungs (*Repeat*) Domäne (ARD), die, ähnlich den inhibierenden κB (I-κB) Proteinen, die Translokation der NF-κB Dimere in den Zellkern verhindert (Basak *et al.*, 2007; Derudder *et al.*, 2003). Von insgesamt 15 möglichen Dimeren sind bisher 12 bekannt, die an die DNA binden (Hoffmann *et al.*, 2006). Das ubiquitär vorkommende Heterodimer p65/p50 ist mit Abstand das am häufigsten vorkommende Dimer (Hoffmann *et al.*, 2006; Siebenlist *et al.*, 1994) und kann sowohl über den klassischen als auch den alternativen Signalweg aktiviert werden (Hoffmann *et al.*, 2006)¹. p100 kann während der Translation zu p52 prozessiert werden und im Folgenden mit p65 dimerisieren

¹ Im klassischen Signalweg führt die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor (z.B. Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1, TNFR1) nach Rekrutierung von Adaptormolekülen (TRAF/RIP Komplex zusammen mit TAK1) zur Aktivierung des I κB Kinase (IKK)-Komplexes (IKKα und/oder IKKβ sowie zwei Molekülen NF-κB *essential modulators*, NEMO). Der IKK-Komplex phosphoryliert IκB Proteine, welche so für den proteasomalen Abbau markiert werden. Auf diese Weise werden NF-κB Dimere (p65/p50, c-Rel/p50 oder p50/p50) freigesetzt und können nach Translokation in den Zellkern κB-sensitive Gene anschalten. Im alternativen Signalweg werden andere Adaptormoleküle (häufig TRAF/NIK) zur Aktivierung des IKKα-Komplexes rekrutiert. Dies führt zur Phosphorylierung der ARD Domäne von p100 und Prozessierung zu p52. Der freigesetzte Dimerkomplex (häufig p52/RelB) kann nun nach Translokation in den Zellkern die Transkription von Zielgenen aktivieren (Hayden und Ghosh, 2008).

(Shih *et al.*, 2011). Um Untereinheiten von NF- κ B zu untersuchen, die dem klassischen als auch dem alternativen Signalweg angehören, wurden in der vorliegenden Arbeit HEK293 Zellen mit den für die Untereinheiten codierende Plasmide cFlag pcDNA3_p65 und pCMV_Sport6_p50 oder mit cFlag pcDNA3_p65 und pOTB7_p52 für 48 h transfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA3.1+. Die aus der extrahierten RNA (siehe 3.1.2) synthetisierte cDNA (siehe 3.1.3) wurde in der nachfolgenden RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Level von Orai1 und STIM1 mit den entsprechenden Oligonukleotiden analysiert (siehe 2.8.2 und 3.1.5). Als Transfektionskontrolle wurden spezifische Oligonukleotide für *RELA*, *NFKB1* und *NFKB2* verwendet. Außerdem wurden zur Normierung der mRNA-Level Oligonukleotide für TBP eingesetzt (siehe 2.8.2). Es konnten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte mRNA-Level für STIM1 und Orai1 in den Zellen bestimmt werden, die mit cFlag pcDNA3_p65 und pCMV_Sport6_p50 bzw. pOTB7_p52 transfiziert waren (vgl. Abb. 4-17).

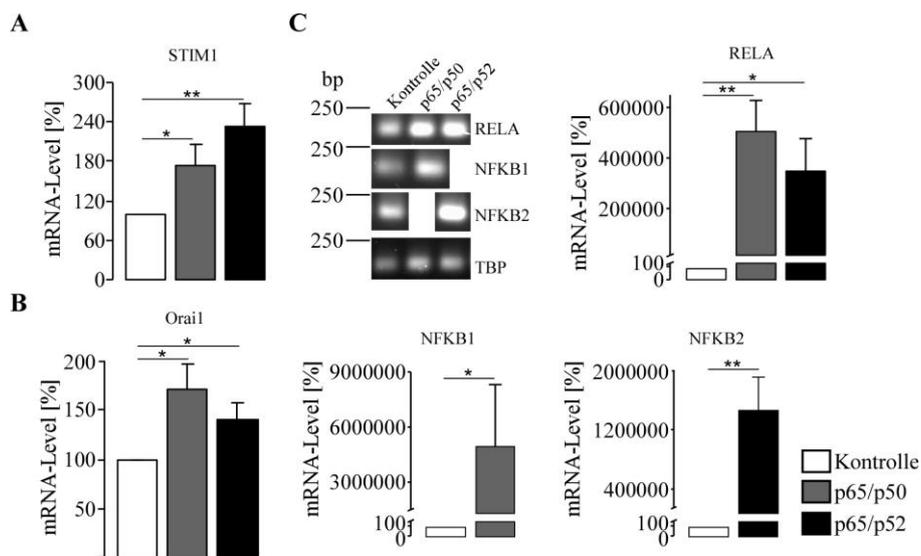


Abb. 4-17 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von STIM1 und Orai1 in HEK293 Zellen, welche die NF- κ B Untereinheiten p65 und p50 oder p65 und p52 überexprimierten.

HEK293 Zellen, die p65 und p50 (grau) bzw. p65 und p52 (schwarz) exprimierten, zeigten signifikant erhöhte mRNA-Level für **A) STIM1** ($n=14-17$) und **B) Orai1** ($n=16$) gegenüber Kontrollzellen (weiß). **C) Repräsentatives Agarose-Gel** (oben mitte) nach RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für *RELA* (p65), *NFKB1* (p50) und *NFKB2* (p52). TBP diente als Referenz-Gen. Als Balkendiagramm dargestellt sind die Mittelwerte der mRNA-Level von *RELA* (oben rechts), *NFKB1* (unten mitte) sowie *NFKB2* (unten rechts). Die Auswertung der RT-PCR ergab eine signifikante Zunahme in den mRNA-Level der NF- κ B Untereinheiten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Student's *t*-test).

Die erhaltenen Daten bezüglich der mRNA-Level von Orai1 und STIM1 nach Überexpression ausgewählter Untereinheiten von NF- κ B, sollten auf Protein-Ebene validiert werden. Hierfür wurden ebenfalls HEK293 Zellen mit cFlag pcDNA_p65 und pCMV_Sport6_p50 bzw. pOTB7_p52 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Proteingemische in

einem SDS-Gel getrennt (siehe 3.4.5). Die Detektion von Orai1 und STIM1 folgte nach Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran (siehe 3.4.6) durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern mittels Chemilumineszenz. Die Quantifizierung der Bandenstärke erfolgte mit *ImageJ* (siehe 3.4.7). Zusätzlich wurde die Überexpression von p65, p50 und p52 sowie Tubulin zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels mit Hilfe entsprechender Antikörper detektiert werden.

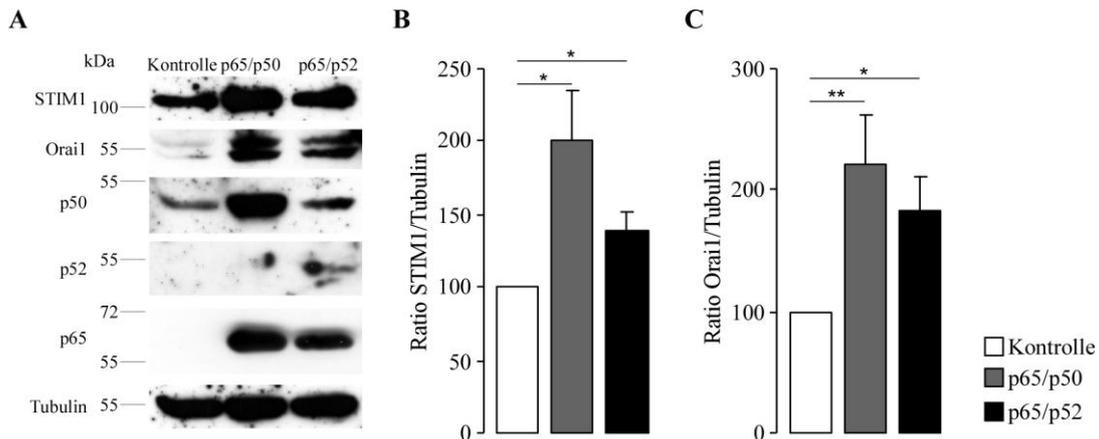


Abb. 4-18 Western Blot Analyse von HEK293-Zelllysaten, die mit pcDNA3.1+, cFlag pcDNA3_p65/pCMV_Sport6_p50 oder cFlag pcDNA3_p65/pOTB7_p52 transfiziert waren.

A) Repräsentativer Western Blot von HEK293 Zellen, die mit einem Kontrollplasmid, p65/p50 oder p65/p52 transfiziert wurden. Die Überexpression von p65 (Cell Signaling, 1:1000), p50 (Santa Cruz, 1:500) und p52 (Cell Signaling, 1:500) wurde mit spezifischen Antikörpern kontrolliert. Die Expression von Orai1 und STIM1 wurde vorher auf demselben Blot mittels spezifischer Antikörper (Orai1: Protein Tech, 1:500 und STIM1: Abnova, 1:500) nachgewiesen und anschließend gestrippt. Zusätzlich wurde mit einem Antikörper gegen Tubulin (Cell Signaling, 1:1000) die gleichmäßige Beladung der Geltaschen kontrolliert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM, n=6) der Verhältnisse der Proteinmengen von **B)** STIM1 zu Tubulin bzw. **C)** Orai1 zu Tubulin. Die Expression von p65/p50 und p65/p52 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Protein-Level sowohl von STIM1 als auch Orai1 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA).

Im Anschluss sollte dieses Ergebnis mit Hilfe von RNA-Interferenz verifiziert werden. Hierfür wurden HEK293 Zellen mit siRNA gegen die Gene von p65 (*RELA*), p50 (*NFKB1*) oder p52 (*NFKB2*) transfiziert (siehe 2.9 und 3.2.3.2). Zum Vergleich der mRNA-Level wurde eine Gruppe HEK293 Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert. Nach Extraktion der RNA und reverser Transkription in cDNA (siehe 3.1.2 und 3.1.3) wurde der *knock down* von *RELA*, *NFKB1* bzw. *NFKB2* mit spezifischen Primern überprüft. Bei einer herabgesetzten Transkription der Gene auf unter 60% im Vergleich zu den entsprechenden mRNA-Leveln in der Kontrollgruppe wurde von einem erfolgreichen *knock down* ausgegangen und die mRNA-Level für Orai1 und STIM1 mittels $2^{-\Delta\Delta C_P}$ -Methode bestimmt (Pfaffl, 2001) (Abb. 4-19 B). In Abb. 4-19 A sind die relativen mRNA-Level der mit siRNA behandelten Zellen sowie der Kontrollgruppe dargestellt. Es wird deutlich, dass die relativen mRNA-Level für Orai1 und STIM1 in den siRNA transfizierten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt sind. Um zu überprüfen, ob die reduzierten mRNA-Level der Unterheiten auch eine

verringerte Proteinmenge der jeweiligen Untereinheit zur Folge hat, wurden Western Blot Analysen durchgeführt (siehe 3.4.1, 3.4.5 und 3.4.6). Die Behandlung der Zellen mit siRNA gegen *RELA*, *NFKB1* und *NFKB2* führte zu einer Verringerung des Protein-Levels der jeweiligen Untereinheiten (Abb. 4-19 C).

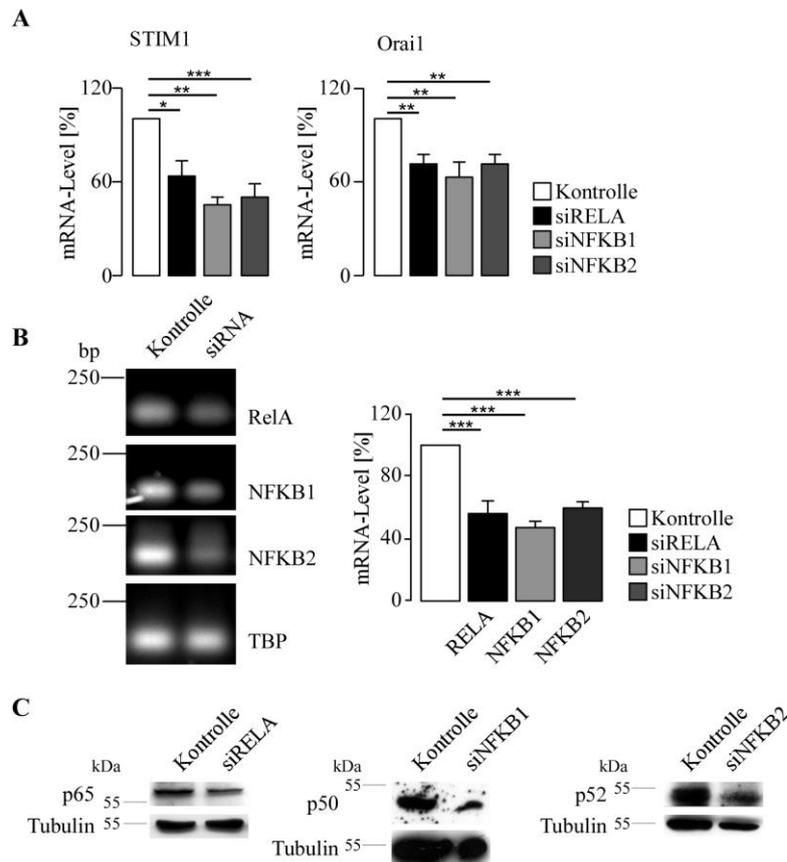


Abb. 4-19 RT-PCR und Western Blot Analyse von HEK293 Zellen, die mit siRNA gegen RELA, NFKB1 oder NFKB2 transfiziert waren.

A) HEK293 Zellen, die mit siRNA gegen RELA, NFKB1 oder NFKB2 transfiziert waren, zeigten signifikant erniedrigte mRNA-Level für STIM1 (links) und Orail (rechts) gegenüber mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte (\pm SEM, $n=3-8$) der relativen mRNA-Level. Der Erfolg des knock down wurde mittels **B)** RT-PCR (links: repräsentatives Agarosegel-Gel, rechts: Mittelwerte \pm SEM, $n=3-8$, der relativen mRNA-Level) und **C)** Western Blot überprüft. Durch RNA-Interferenz waren sowohl die mRNA- als auch die Protein-Level von RELA/p65, NFKB1/p50 und NFKB2/p52 signifikant erniedrigt (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, ANOVA).

4.3 Einfluss von SGK1 auf die nukleäre Translokation von NF- κ B

In verschiedenen Publikationen konnte bereits nachgewiesen werden, dass SGK1 die Aktivität von NF- κ B reguliert (Tai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005a).

Zur Überprüfung, inwieweit auch in diesem Fall SGK1 die nukleäre Translokation von NF- κ B stimuliert, wurde mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie die Lokalisation von p65 in HEK293 Zellen nach Transfektion mit pcDNA3.1+_SGK1^{S422D} bzw. pcDNA3.1+_SGK1^{K127N} bestimmt (durchgeführt von S. Gu). Hierfür wurden die Zellen 48 h nach Transfektion zunächst fixiert, permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5%

Ziegenserum und 0,3% Triton X-100 in PBS blockiert (siehe 3.2.4). Anschließend wurden die Zellen zur Detektion von p65 mit einem Antikörper gegen NF- κ B p65 inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-markierter anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Markierung der Zellkerne erfolgte durch Färbung mit DRAQ5. Wie in Abb. 4-20 dargestellt, ist der nukleäre Anteil an p65 in HEK293 Zellen nach Transfektion mit der aktiven Mutante von SGK1 stark erhöht. Durch Ausmessen der Fluoreszenzintensitäten im Zytoplasma und im Nukleus konnte auf den prozentualen Anteil von p65 im Zellkern geschlossen werden. Hierbei ergab sich eine signifikante Erhöhung des Anteils von p65 im Zellkern von Zellen, die SGK1^{S422D} überexprimierten, im Vergleich zu Kontrollzellen. Durch Überexpression der inaktiven Mutante von SGK1 konnte dieser Effekt nicht erzielt werden.

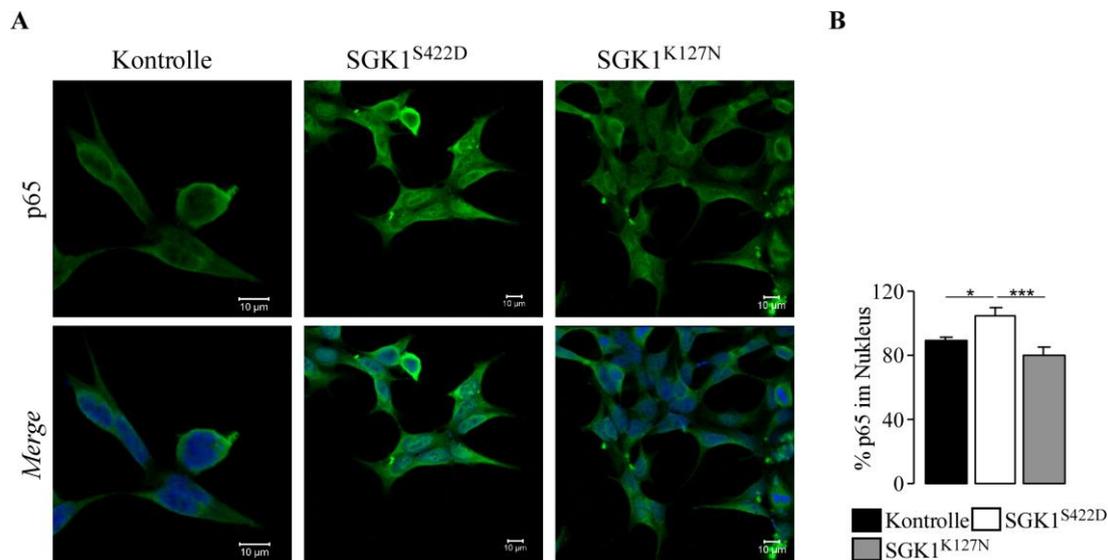


Abb. 4-20 Immunfluoreszenz von p65 in HEK293 Zellen nach Transfektion mit pcDNA3.1+, pcDNA3.1+_SGK1^{S422D} oder pcDNA3.1+_SGK1^{K127N}.

A) Repräsentative Aufnahmen von HEK293 Zellen, die die aktive oder inaktive Mutante von SGK1 exprimierten. Es wurde die Verteilung von p65 (grün) nach Antikörperfärbung in der Zelle dokumentiert. Der Zellkern wurde mit DRAQ5 gefärbt (blau). **B)** Nach Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten wurde deutlich, dass in Zellen, die mit der aktiven SGK1-Mutante transfiziert waren, verstärkt p65 im Zellkern vorlag (n=3 Experimente, jeweils 8-12 Zellen *p<0,05, ***p<0,001, ANOVA).

4.4 SOCE in Abhängigkeit von NF- κ B

Der Einfluss von NF- κ B auf die Expression von Orai1 und STIM1 sollte im Anschluss auch in Hinsicht auf SOCE überprüft werden.

Dazu wurden zunächst HEK293 24 h nach Aussaat in Kulturschalen mit 100 μ M Wogonin (Endkonzentration) für 24 h inkubiert. Als Kontrollgruppe dienten mit DMSO behandelte HEK293 Zellen. Die Zellen wurden mit Fura-2 für 30 min bei 37°C gefärbt und anschließend der Ca²⁺-Einstrom unter dem Mikroskop verfolgt (siehe 3.3.1). Ca²⁺-freies Medium wurde gegen Ca²⁺-haltiges Medium (2 mM) ersetzt und der Kurvenverlauf nach Zugabe von Ca²⁺ hinsichtlich Anstieg und Amplitude analysiert. Wie in Abb. 4-21 dargestellt, unterscheidet

sich der Kurvenverlauf der Kontrollgruppe von dem Kurvenverlauf der mit Wogonin behandelten Zellen ab dem Zeitpunkt der Ca^{2+} -Zugabe signifikant. Der gemessene Ca^{2+} -Einstrom ist in den Zellen, welche mit Wogonin behandelt wurden, signifikant erniedrigt und erfolgt langsamer.

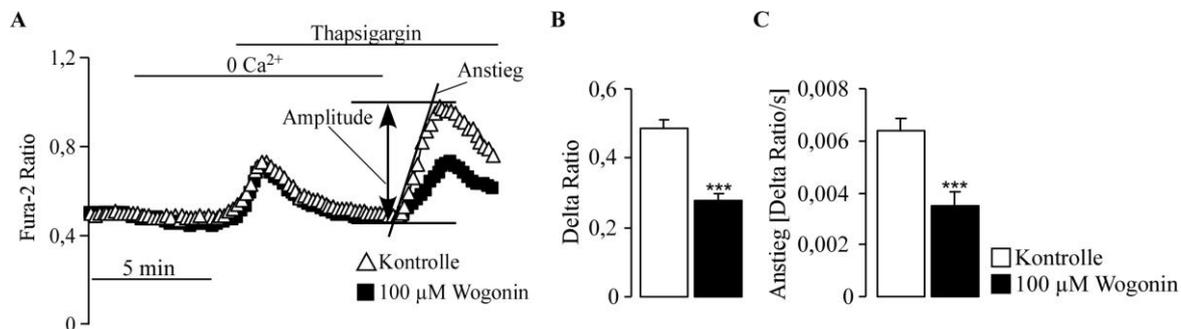


Abb. 4-21 Ca^{2+} -Imaging von SOCE in HEK293 Zellen in Abhängigkeit vom NF- κ B-Inhibitor Wogonin.

A) Typischer Kurvenverlauf von SOCE in Kontrollzellen (leere Dreiecke) und mit Wogonin (schwarze Vierecke) behandelten Zellen. Nach Zugabe von Thapsigargin im Ca^{2+} -freiem Medium wurde intrazelluläres Ca^{2+} aus internen Speichern freigesetzt, was sich in einer Zunahme des Fura-2 Verhältnisses zeigt. Nach Austausch des Mediums gegen Ca^{2+} -haltiges Medium konnte extrazelluläres Ca^{2+} in die Zelle einströmen, sichtbar durch den zweiten Anstieg des Ratios. Zur Bestimmung der Geschwindigkeit und Konzentration des einströmenden Ca^{2+} wurden Amplitude und Anstieg bestimmt. Mittelwerte (\pm SEM, $n=3$, jeweils 14-20 Zellen) für **B)** Amplitude (Δ Ratio) und **C)** Geschwindigkeit (Δ Ratio/s) des Ca^{2+} -Einstroms. Zellen, die mit Wogonin inkubiert wurden, zeigten einen signifikant verringerten und verlangsamten Ca^{2+} -Einstrom gegenüber mit DMSO behandelten Kontrollzellen ($***p<0,001$, Student's t -test).

Da gezeigt werden konnte, dass NF- κ B SOCE beeinflusst, sollte im Weiteren untersucht werden, ob Transfektion der Untereinheiten von NF- κ B zwingend notwendig für eine messbare Änderung von SOCE ist.

Hierfür wurden HEK293 Zellen mit pcDNA3.1+ als Kontrolle oder cFlag pcDNA3_p65 und pCMV_Sport6_p50 bzw. pOTB7_p52 für 48 h transfiziert (siehe 3.2.3.1). Die Zellen wurden für die Messung mit Fura-2/AM gefärbt und anschließend SOCE bestimmt (siehe 3.3.1). Hier zeigten Zellen, die p65 und entweder p50 oder p52 überexprimierten, einen stark erhöhten Ca^{2+} -Einstrom (vgl. Abb. 4-22). Zusätzlich zeigten mit p65/p50 bzw. p65/p52 transfizierte HEK293 Zellen nach Stimulierung mit 1 μM Thapsigargin eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER in das Zytoplasma. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei zusätzlicher Inkubation der transfizierten Zellen mit entweder 100 μM Wogonin oder mit 50 μM des SOCE-Inhibitors 2-Aminoethoxydiphenyl Borat (2-APB) für jeweils 24 h der stimulierende Effekt der Untereinheiten p65/p50 bzw. p65/p52 auf SOCE inhibiert wurde. Zusätzlich wurde die Speicherkapazität des ER durch Inkubation mit Wogonin in p65/p52 exprimierenden Zellen bzw. 2-APB in p65/p50 und p65/p52 exprimierenden Zellen beeinträchtigt, was sich in einer geringeren Ca^{2+} -Freisetzung nach Zugabe von Thapsigargin zeigte (vgl. Abb. 4-22).

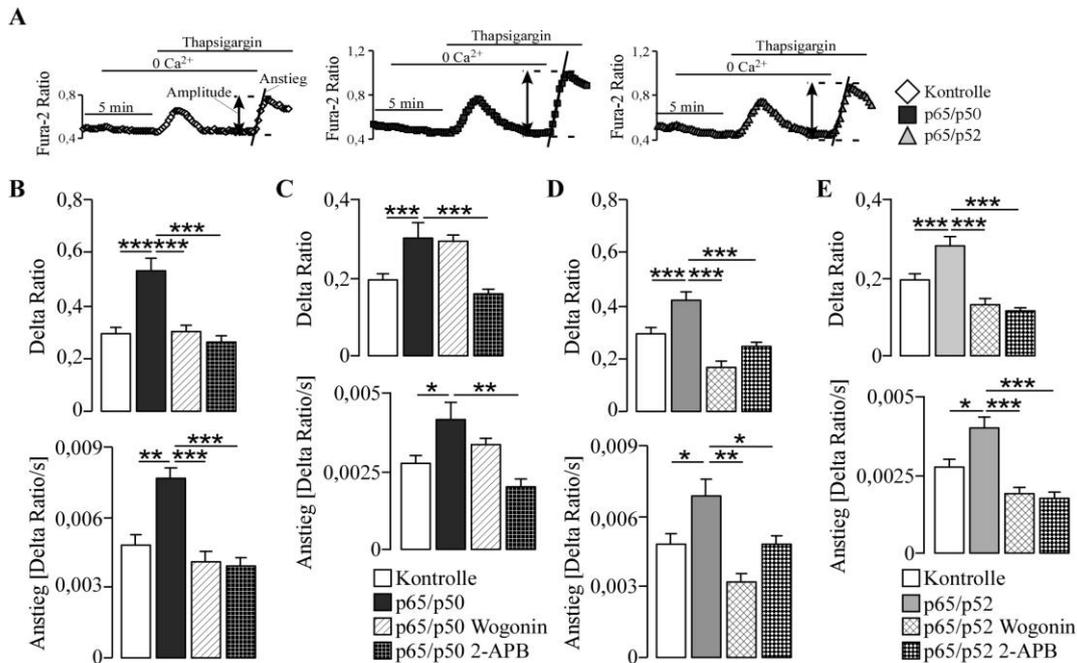


Abb. 4-22 Ca^{2+} -Imaging Messungen von SOCE in HEK293 Zellen in Abhängigkeit von den überexprimierten NF- κ B Untereinheiten p65/p50 oder p65/p52 sowie dem NF- κ B-Inhibitor Wogonin und SOCE-Inhibitor 2-APB.

A) Repräsentativer Original-Kurvenverlauf des Ca^{2+} -Einstroms in HEK293 Zellen nach Transfektion mit pcDNA3.1+ (Links), p65 und p50 (Mitte) bzw. p65 und p52 (Rechts). Nach Aktivierung des SOCE durch Applikation von 1 μ M Thapsigargin und Wechsel des Ca^{2+} -freien Mediums gegen Ca^{2+} -haltiges Medium wurde SOCE bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM, n=3, jeweils 10-33 Zellen) sowohl für die Amplitude (Δ Ratio) als auch für die Geschwindigkeit (Anstieg, Δ Ratio/s) des extra- (**B**, **D**) und intrazellulären (**C**, **E**) Ca^{2+} -Einstroms in HEK293 Zellen, die p65/p50 (**B**, **C**) oder p65/p52 (**D**, **E**) überexprimierten. Es erfolgte eine signifikante Zunahme der Amplitude und Geschwindigkeit in SOCE sowohl nach Überexpression von p65/p50 als auch p65/p52. Durch Behandlung der Zellen mit Wogonin (30 min, 100 μ M) oder 2-APB (24 h, 50 μ M) wurde der Effekt des überexprimierten p65/p50 und p65/p52 aufgehoben (* p < 0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 ANOVA).

Da sowohl in p65/p50 als auch in p65/p52 überexprimierenden HEK293 Zellen die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER nach Zugabe von Thapsigargin gegenüber Kontrollzellen signifikant erhöht war, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob dies auf die erhöhte Expression von STIM1 zurückzuführen ist. Hierfür wurden HEK293 Zellen mit pIRES_STIM1 oder pIRES2_EGFP transfiziert. Im Ca^{2+} -freiem Medium wurde 1 μ M Thapsigargin zu den Zellen gegeben und die Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol beobachtet. Wie in Abb. 4-23 deutlich wird, war der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Zugabe in STIM1 überexprimierenden Zellen signifikant gegenüber Kontrollzellen erhöht.

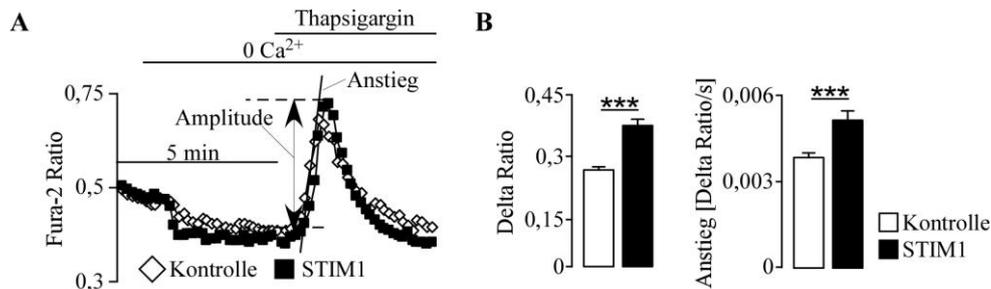


Abb. 4-23 Ca^{2+} -Imaging Messungen der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER in HEK293 Zellen, die mit pIRES2_EGFP oder pIRES_STIM1 transfiziert wurden, nach Applikation von 1 μ M Thapsigargin. **A)** Repräsentativer Original-Kurvenverlauf der Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration in HEK293 Zellen, die mit pIRES2_EGFP oder pIRES_STIM1 transfiziert waren, nach Zugabe von 1 μ M Thapsigargin in Ca^{2+} -freiem Medium. **B)** Mittelwerte (\pm SEM, $n=3$, jeweils 33-40 Zellen) der Amplitude (Delta Ratio) und der Geschwindigkeit (Anstieg, Δ Ratio/s) der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Die Überexpression von STIM1 führte zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung im Vergleich zu Kontrollzellen (***) ($p < 0,001$, Student's *t*-test).

4.5 Regulierung von Orai1- und STIM1-Promotoren durch NF- κ B

4.5.1 Klonierung von putativen Promotorsequenzen von Orai1 und STIM1 für Luziferase-Reportergentests

Da der Einfluss von NF- κ B auf die Expression von Orai1 und STIM1 gezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, welche Sequenzabschnitte in den Promotoren von Orai1 und STIM1 durch NF- κ B aktiviert werden. Hierfür wurde die Sequenz bis etwa 3000 bp vor Transkriptionsstart für Orai1 und STIM1 nach NF- κ B-Bindungsstellen (κ B-Stellen) mit der Konsensussequenz 5'-GGGRNNYYCC-3' ($R \triangleq$ Purin, $N \triangleq$ A, G, T oder C und $Y \triangleq$ Pyrimidin) (Martone *et al.*, 2003) analysiert. Dabei wurden ähnliche Sequenzen zur originären κ B-Sequenz sowohl im Promotor für Orai1 als auch für STIM1 entdeckt, die in Abb. 7-1, Abb. 7-2 und Abb. 7-3 im Anhang dargestellt sind. Zur Identifizierung einer möglichen Bindungsstelle für NF- κ B an die Promotorbereiche von STIM1 und Orai1 wurden Oligonukleotide verwendet, die die entsprechenden Stellen flankierten und zudem Schnittstellen für *KpnI* und *HindIII* enthielten. Zur Amplifikation der gewünschten Sequenzen wurde zunächst genomische DNA aus HEK293 Zellen isoliert (siehe 3.1.1). Im Anschluss wurden die flankierenden Oligonukleotide eingesetzt, um mittels einer PCR-Reaktion die entsprechenden Sequenzen zu amplifizieren (siehe 3.1.4). Daraufhin wurde der Erfolg der PCR-Reaktion mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 3.1.7), dargestellt in Abb. 4-24 abgeschätzt. Nachdem sichergestellt war, dass die gewünschten Sequenzen selektiv amplifiziert waren, wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Systems (Macherey Nagel) gereinigt und zur Verifizierung sequenziert (siehe 3.1.13). Anschließend

wurden die PCR-Produkte durch die Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *HindIII* geschnitten (siehe 3.1.8).

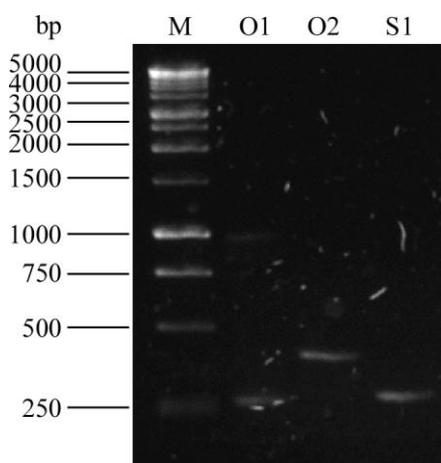


Abb. 4-24 1%iges Agarosegel der amplifizierten Teilpromotorsequenzen für Orail und STIM1.

Aus der Promotorsequenz für *Orail* wurden zwei Teilsequenzen amplifiziert. O1= -2491 bis -2239 bp, O2= -1831 bis -1442 bp. Die Banden erscheinen bei etwa 250 bp (O1) und 390 bp (O2), was der erwarteten Länge der amplifizierten Sequenzen von 252 bp (O1) und 389 bp (O2) entsprach. Aus der Promotorregion für *STIM1* wurde eine Teilsequenz amplifiziert. S1= -3000 bis -2736 bp. Die zu erwartende Bande der theoretischen Länge von 264 bp konnte bei ca. 270 bp (S1) nachgewiesen werden. M=1 kbp Marker.

Außerdem wurde der Vektor pGL3_Enhancer der Firma Promega (siehe 2.10) mit Hilfe derselben Restriktionsendonukleasen wie bei den PCR-Produkten in der *multiple cloning site* geschnitten und mittels *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) dephosphoryliert (siehe 3.1.8 und 3.1.9). Anschließend wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt, um die Linearisierung des Vektors zu überprüfen (siehe Abb. 4-25).

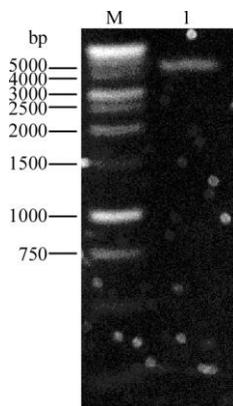


Abb. 4-25 1%iges Agarosegel zur Überprüfung der Linearisierung von pGL3_Enhancer.

Deutlich als Bande sichtbar ist der linearisierte Vektor (I) bei einer Länge von etwa 5000 bp (theoretische Länge: 5064 bp). M=1 kbp Marker.

Die Ligation der geschnittenen PCR-Produkte und des Vektors erfolgte im stöchiometrischen Verhältnis 3:1 (siehe 3.1.10). Im Anschluss erfolgte die Transformation von *E.coli* DH5 α mit dem gesamten Ligationsansatz (siehe 3.1.11). Nach Aufnahme der Transformanden-Suspension in je 1 ml SOC-Medium wurde jeweils der gesamte Ansatz auf eine LB-Agar-Platte (100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Pro Platte wurden am nächsten Tag je zwei Klone gepickt und in Kulturröhrchen mit je 5 ml LB-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C angezogen. Die Präparation der DNA aus den gewachsenen Kulturen erfolgte nach Protokoll mit NucleoPlasmid (Macherey Nagel, siehe 3.1.12). Die DNA wurde mit je 50 μ l TE-Puffer eluiert und die Konzentration bestimmt

(siehe 3.1.6). Zur Überprüfung, ob die Ligation und nachfolgende Transformation die gewünschten Konstrukte hervorgebracht haben, erfolgte nun ein Verdau mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen, deren Schnittstellen zum einen im klonierten Bereich und zum anderen im Vektor lagen (vgl. Tab. 4-1). Da für das Konstrukt pGL3_Enh_O1 kein passendes Enzym zur Verfügung stand, fand hier lediglich der Kontrollverdau mit *KpnI* und *HindIII* statt. Zusätzlich wurden alle Konstrukte nochmals mit *KpnI* und *HindIII* geschnitten (siehe 3.1.8), wobei die zu erwartenden Bandenlängen dem jeweils klonierten Promotorstück sowie dem linearisierten Vektor (5064 bp) entsprachen.

Tab. 4-1 Verwendete Restriktionsenzyme zum Verdau der klonierten Promotorteilsequenzen

Klonierte Promotorsequenz	Restriktionsenzym	Erwartete Fragmentlänge
pGL3_Enh_O2	<i>XbaI</i>	1888 bp + 3520 bp
pGL3_Enh_S1	<i>BsrGI</i>	593 bp + 4654 bp

Die geschnittenen Konstrukte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (siehe 3.1.7). Das Ergebnis ist in Abb. 4-26 dargestellt und zeigt, dass die Klonierung aller ausgewählten Promotorsequenzen in den Vektor pGL3_Enhancer erfolgreich war.

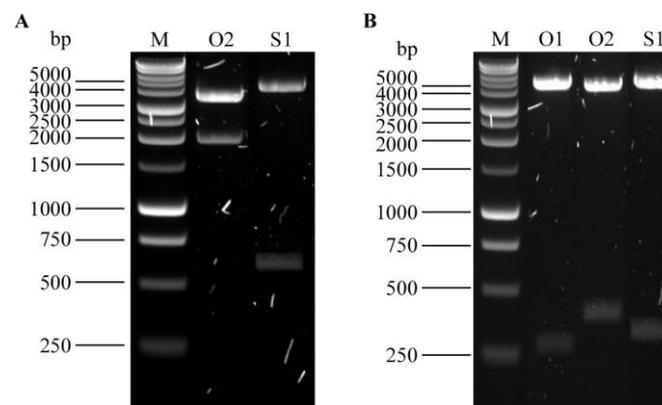


Abb. 4-26 1%iges Agarosegel des Verdau der klonierten Promotorfragmente.

A) Die extrahierte DNA der Konstrukte O2 und S1 wurde mit den in Tab. 4-1 genannten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Es waren deutlich die erwarteten Banden sichtbar. **B)** Zusätzlich wurden alle Konstrukte mit *HindIII* und *KpnI* geschnitten. Hierbei wurden DNA-Fragmente der Länge von ca. 5000 bp, was dem linearisierten Vektor (theoretische Länge: 5064 bp) entsprach, sowie 250 bp (O1, theoretische Länge: 252 bp), 390 bp (O2, theoretische Länge: 389 bp) und 270 bp (S1, theoretische Länge 264 bp) erwartet. Die im 1%igen Agarosegel sichtbaren Banden entsprechen den erwarteten Längen. M=1 kbp Marker.

Zusätzlich wurde die Richtigkeit der Konstrukte mittels Sequenzierung, durchgeführt von der Firma Delphi Test GmbH (siehe 3.1.13), bestätigt.

4.5.2 *Luziferase-Reportergentest von Orai1- und STIM1 Promotorfragmenten*

Nachdem sichergestellt war, dass die Promotorsequenzen richtig in den Vektor pGL3_Enhancer kloniert waren, wurden HEK293 Zellen jeweils mit einem Promotor-Konstrukt (pGL3_Enh_O1, pGL3_Enh_O2 oder pGL3_Enh_S1) sowie einem weiteren Vektor (pRL-TK, Promega), welcher für die basal exprimierte *Renilla* Luziferase kodiert, transfiziert. Der Vektor pRL-TK diente als interner Standard der Transfektionsrate. Mit der Aktivität der *Renilla* Luziferase wurde die Aktivität der Glühwürmchen Luziferase, die unter der Kontrolle der klonierten Promotorregion stand, auf die Transfektionsrate normiert (siehe 3.5). Zusätzlich wurden die Zellen mit cFlag pcDNA3_p65 transfiziert. Auf die zusätzliche Transfektion von pCMV_Sport6_p50 bzw. pOTB7_p52 wurde verzichtet, da die Anzahl der zu transfizierenden Plasmide nicht höher als drei sein sollte, um noch eine ausreichend gute Transfektionsrate zu erzielen. Zur Kontrolle der Basisexpression der Glühwürmchen Luziferase wurden die Zellen mit dem Leervektor pcDNA3.1+ transfiziert. Als weitere Kontrolle dienten HEK293 Zellen, die mit dem Leervektor pGL3_Enhancer transfiziert wurden. Eine Übersicht des Transfektionsschemas ist im Anhang in Tab. 7-1 dargestellt.

Zur Auswertung wurde die gemessene Luziferaseaktivität des Glühwürmchens mit der von *Renilla* ins Verhältnis gesetzt. Ermittelt wurde jeweils die Zunahme der Aktivitätsverhältnisse gegenüber Zellen, welche mit dem Leervektor pcDNA3.1+ transfiziert waren. Zunächst wurden die ermittelten Aktivitätsverhältnisse der p65 überexprimierenden Zellen auf die mit dem Kontrollplasmid pcDNA3.1+ transfizierten Zellen normiert. Die berechnete Promotoraktivitätszunahme der mit p65 stimulierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen wurde schließlich auf Zellen, die mit dem promotorlosen Vektor pGL3_Enhancer transfiziert waren, normiert. Das Aktivitätsverhältnis der mit pGL3_Enhancer transfizierten Zellen wurde auf eins gesetzt. Hierbei wurden die Promotoren als aktivierbar durch p65 gewertet, die in Zellen mit Promotor-Konstrukten eine höhere Luziferaseaktivität aufwiesen als Zellen mit dem promotorlosen Vektor. In Abb. 4-27 wird ersichtlich, dass die Luziferaseaktivität in Zellen mit den Promotorregionen O2 und S1 durch Transfektion mit p65 signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (pGL3_Enhancer) zunahm.

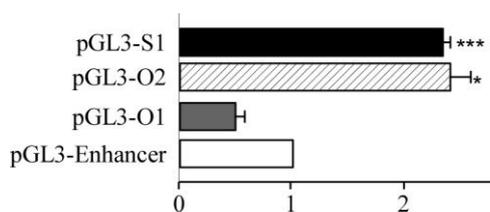


Abb. 4-27 Luziferase-Reportergentest von Fragmenten aus STIM1- und Orai1-Promotoren nach p65-Stimulierung.

Dargestellt sind die normierten Mittelwerte (\pm SEM, $n=14-21$) der Luziferaseaktivität in HEK293 Zellen, die p65 überexprimierten. Die Luziferaseaktivität war in der Promotorregion O2 und S1 um das 2,4 fache bzw. 2,3 fache erhöht gegenüber dem Leervektor pGL3_Enhancer. Die Promotorregion O1 konnte durch p65 hingegen nicht aktiviert werden (* $p<0,05$, *** $p<0,001$, Student's t-test).

4.5.3 ChIP-Analyse von NF- κ B in Bezug auf STIM1- und Orai1-Promotorregionen

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die NF- κ B Untereinheit p65 Promotorfragmente von STIM1 und Orai1 aktiviert. Die gewonnenen Daten sollten nun mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)-Analysen verifiziert werden und zeigen, ob eine direkte Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an Promotorregionen von STIM1 und Orai1 erfolgt. Hierfür wurden HEK293 Zellen mit pcDNA3.1+ oder cFlag pcDNA3_p65 transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1% PFA behandelt, um die zu diesem Zeitpunkt an das Chromatin gebundenen Proteine mit der DNA quervernetzten (siehe 3.4.3.2). Nach Abstoppen der Reaktion und Aufschluss der Zellen wurde die DNA durch Sonifizieren in Fragmente der Länge von etwa 100-1000 bp zerkleinert. Der Erfolg der DNA-Fragmentierung wurde mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Von den mit Protein A/G-Agarose inkubierten und vorgereinigten Proben wurde jeweils 1% als Gesamtlysat aufbewahrt (*Input*), während der restliche Ansatz halbiert und entweder als Negativkontrolle mit anti-IgG-Antikörper oder dem spezifischen p65-Antikörper inkubiert wurde. Die an die Antikörper gebundenen Proteine wurden durch Inkubation mit Protein A/G-Agarose (siehe 3.4.3.2) spezifisch angereichert und durch Erhöhung der Salzkonzentration und Inkubation bei 65°C von der DNA wieder entfernt. Nach Reinigung der Proben erfolgte eine PCR mit Oligonukleotiden, welche an die flankierenden Sequenzen der Promotorregionen O1, O2 oder S1 banden (siehe 3.1.4). Die gewonnenen PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese getrennt. Wie in Abb. 4-28 dargestellt, konnten die Promotorregionen O2 und S1 in DNA aus Zellen, die mit p65 transfiziert und mittels p65-Antikörper angereichert waren, durch PCR amplifiziert werden. Es konnten keine PCR-Produkte in den DNA-Proben aus Kontrollzellen dieser Regionen, die mit p65-Antikörper angereichert wurden oder aus Kontroll- und cFlag pcDNA3_p65 transfizierte Zellen, die mit dem IgG-Antikörper inkubiert wurden, detektiert werden. Die Promotorregion O1 konnte weder in den anti-p65-inkubierten noch in den anti-IgG-inkubierten Proben amplifiziert werden. In den vor der Antikörper-Inkubation abgenommenen Proben (*Input*) konnte bei allen Promotorfragmenten eine Amplifikation beobachtet werden.

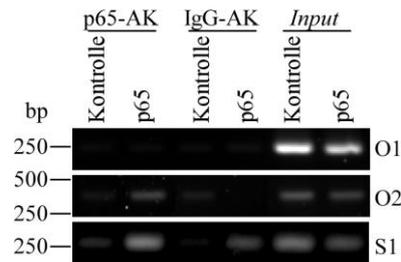


Abb. 4-28 1%iges Agarosegel nach PCR der Chromatin-Immunopräzipitation in HEK293 Zellen, die mit pcDNA3.1+ oder cFlag pcDNA_p65 transfiziert waren.

Die Präzipitation erfolgte mit einem Antikörper gegen p65 (Santa Cruz, 2,5 µg) bzw. als Negativkontrolle gegen IgG (Abcam, 1:1000). Von beiden Proben wurde ein festes Volumen (1%) als Gesamtzelllysat (Input) aufbewahrt. Im Anschluss wurde für alle Proben eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für O1 (theoretische Länge: 252 bp), O2 (theoretische Länge: 389 bp) oder S1 (theoretische Länge: 264 bp) durchgeführt. Es waren die erwarteten Bandenlängen für O2 und S1 im Gel sichtbar, deren DNA aus p65-überexprimierenden Proben und mittels einem Antikörper gegen p65 angereichert wurde. Die Proben des Inputs zeigten die erwarteten Banden. Keine bzw. sehr schwache Banden konnten in den mit einem IgG-Antikörper inkubierten Proben nachgewiesen werden.

5 DISKUSSION

Mastzellen sind an angeborenen und erlernten Immunantworten beteiligt (Galli *et al.*, 2005; Mekori und Metcalfe, 2000), durch Überreaktion können sie jedoch Hypersensitivität und allergische Reaktionen auslösen (Mekori und Metcalfe, 2000; von Bubnoff *et al.*, 2003). Die Stimulierung von Mastzellen durch den hochaffinen Rezeptor für IgE (FcεRI) aktiviert die Phospholipase C, die das für SOCE benötigte IP₃ generiert, in dessen Folge der Ca²⁺-Influx stimuliert wird (Baba *et al.*, 2008). Bereits 1992 zeigten Hoth und Penner, dass dieser Ca²⁺-Einstrom auf I_{CRAC} zurückzuführen ist (Hoth und Penner, 1992). Ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt zur Degranulierung der Mastzellen, in dessen Folge Histamin, Proteasen und Zytokine sekretiert werden (Ali *et al.*, 1994; Ozawa *et al.*, 1993). Die Degranulierung von Mastzellen beruht auf Mikrotubuli-abhängigen Bewegungen sekretorischer Vesikel zur Plasmamembran (Smith *et al.*, 2003), wobei die Reorganisation der Mikrotubuli von STIM1 und SOCE abhängig ist (Baba *et al.*, 2008; Hajkova *et al.*, 2011). Die Degranulierung der Mastzellen wird weiterhin durch eine Reorganisation des Aktin-Skeletts beeinflusst, die ebenfalls durch Ca²⁺-Einstrom reguliert wird (Nishida *et al.*, 2005). Der Antigen hervorgerufene Ca²⁺-Einstrom sowie Aktivierung von Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanälen und Degranulierung war in Mastzellen ohne SGK1 merklich vermindert (Sobiesiak *et al.*, 2009). Somit besteht die Möglichkeit, dass eine SGK1-abhängige Regulierung von SOCE die Degranulierung von Mastzellen beeinflusst.

Zu Beginn der Arbeit wurde mit Hilfe von Ca²⁺-*Imaging* SOCE in Mastzellen von *sgk1*-defizienten Mäusen und deren Wurfgenossen bestimmt. Als Aktivator für SOCE wurde in Ca²⁺-freier Lösung Thapsigargin zu den Zellen gegeben. Thapsigargin wirkt als Inhibitor der SERCA und löst somit eine Leerung des intrazellulären Ca²⁺-Speichers ER aus. Hierbei zeigte sich, dass die Stimulierung der SGK1-defizienten Mastzellen mit Thapsigargin einen geringeren SOCE hervorrief als in Mastzellen mit SGK1. Um die Rolle der SGK1 näher zu bestimmen, wurden Orai1/STIM1 überexprimierende HEK293 Zellen mit der aktiven Mutante SGK1^{S422D} oder der inaktiven Mutante SGK1^{K127N} transfiziert. Anschließend wurden SOCE und I_{CRAC} mittels Ca²⁺-*Imaging* und Ganzzell-Ableitungen der *Patch-Clamp*-Technik bestimmt. Dabei konnte mit der konstitutiv aktiven Mutante von SGK1 SOCE und I_{CRAC} gesteigert werden, während die konstitutiv inaktive Mutante keinen Einfluss hatte bzw. SOCE leicht hemmen konnte (siehe 4.1.1).

Zur Untersuchung, ob eine Regulierung des SOCE auf Proteinebene stattfand, wurden zunächst sowohl die Gesamtproteinmenge als auch die Membranproteinmenge von Orai1

analysiert. Hierfür wurde sowohl Western Blot Analyse als auch Immunfluoreszenz-messungen angewandt. Mit SGK1^{S422D} transfizierte HEK293 Zellen wiesen eine erhöhte Orai1-Gesamtproteinmenge sowie eine erhöhte Inkorporation von Orai1 in die Membran im Vergleich zu Kontrollzellen als auch zu SGK1^{K127N} überexprimierenden Zellen auf (siehe 4.1.2). Es bestand die Möglichkeit, dass SGK1 die Aktivität von Orai1 oder STIM1 durch Phosphorylierung direkt beeinflusst. Daher wurden die Sequenzen von Orai1 und STIM1 nach der Konsensussequenz für SGK1 (**RXRXXS/T**) untersucht (Lang und Cohen, 2001). Orai1 weist an Position 28-33 (²⁸**RSRRRS**³³) eine mögliche Konsensussequenz auf, während STIM1 keine Konsensussequenz für SGK1 enthält. Eine direkte Regulierung von Orai1 durch SGK1 erschien möglich. Daher wurden HEK293-Orai1 Zellen mit SGK1^{S422D} oder SGK1^{K127N} transfiziert und mittels Immunopräzipitation Orai1 spezifisch angereichert. Die Analyse im Western Blot mit einem für die Phosphorylierung der Sequenz spezifischen Antikörper ergab jedoch, dass keine Phosphorylierung von Orai1 durch SGK1^{S422D} stattfand (siehe 4.1.3). Da eine direkte Phosphorylierung von Orai1 durch SGK1 ausgeschlossen werden konnte, wurde die Möglichkeit einer indirekten Regulierung der SGK1 über weitere Mediatoren untersucht. Eine Möglichkeit des hierfür zugrunde liegenden Mechanismus' besteht in der Regulierung der Proteinligase Nedd4-2 durch SGK1. SGK1 reguliert eine Vielzahl von Kanälen durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Nedd4-2 (Asher *et al.*, 2003; Debonneville *et al.*, 2001; Embark *et al.*, 2004a; Embark *et al.*, 2003; Palmada *et al.*, 2004a; Snyder *et al.*, 2004; Snyder *et al.*, 2002). Im aktiven Zustand ubiquitiniert Nedd4-2 seine Zielproteine, welche daraufhin internalisiert und degradiert werden (Snyder, 2009). Die Phosphorylierung ändert die Bindungskapazität der Ligase zu den Zielproteinen und ermöglicht nun die Bindung von 14-3-3 Proteinen an Nedd4-2, wodurch die Aktivität von Nedd4-2 gehemmt wird (Snyder, 2009). Durch Behandlung von HEK293 Zellen mit einem Hämagglutinin (HA) markierten Ubiquitin wurde zunächst überprüft, ob Orai1 ubiquitiniert wird. Durch Immunopräzipitation und folgender Gel-Elektrophorese sowie Western Blot konnte eine Ubiquitinierung von Orai1 festgestellt werden (siehe 4.1.3). Weiterhin wurden HEK293-Orai1 Zellen mit Nedd4-2 transfiziert und SOCE sowie I_{CRAC} bestimmt. Die Expression von Nedd4-2 verminderte SOCE und I_{CRAC} während die Koexpression von Nedd4-2 und SGK1^{S422D} SOCE und I_{CRAC} wiederherstellen konnte (siehe 4.1.3). Ebenso konnte die Membraninkorporation und Gesamtproteinmenge von Orai1 durch Transfektion mit Nedd4-2 vermindert werden. Dieser Effekt konnte jeweils durch zusätzliche Transfektion der konstitutiv aktiven Mutante von SGK1 wieder aufgehoben werden (siehe 4.1.4). Diese Ergebnisse deuten auf eine Regulierung der Degradierung von Orai1 durch Nedd4-2 und

SGK1 hin. Üblicherweise bindet Nedd4-2 mit einer oder mehreren seiner WW-Domänen (Sequenz von etwa 40 Aminosäuren, in denen zwei konservierte Tryptophane enthalten sind) an eine Konsensus (**PPXY**)-Sequenz an seine Zielproteine, wie auch im Fall des Epithialen Natrium-Kanals (ENaC) (Ingham *et al.*, 2004). Zusätzlich werden für Proteine mit WW-Domänen Interaktionen mit weiteren Konsensussequenzen wie **PPPPP**, **PPLP** oder **pS/pTP** vorhergesagt (Otte *et al.*, 2003). Orai1 weist nicht das typische Bindungsmotiv **PPXP** für eine Interaktion mit Nedd4-2 auf. Es existieren Kanäle und Transporter, die trotz fehlender **PPXY**-Sequenz von Nedd4-2 reguliert werden (Miranda und Sorkin, 2007; Shenoy *et al.*, 2008; Vina-Vilaseca und Sorkin, 2010). Orai1 besitzt N-terminal eine prolinreiche Sequenz (⁴³**PPPPPP**⁴⁸). WW-Domänen binden spezifisch an fünf aufeinanderfolgende Proline, denen eine hydrophobe Aminosäure vorausgeht, sodass hier eine Interaktion von Orai1 mit der WW-Domäne von Nedd4-2 möglich wäre. Außerdem besitzt Orai1 verschiedene Serine und Threonine, denen ein Prolin folgt (¹³**SP**¹⁴, ⁶⁴**SP**⁶⁵, ²³¹**TP**²³², ²⁹⁶**TP**²⁹⁷). Bei Phosphorylierung einer dieser Serin-/Threoninreste bestände ebenfalls die Möglichkeit einer direkten Interaktion mit Nedd4-2. Zur Überprüfung dieser Theorie könnten Ko-Immunopräzipitationen mit Teilpeptiden von Orai1 durchgeführt werden. Möglich wäre auch eine Interaktion zwischen Orai1 und Nedd4-2 unabhängig von der WW-Domäne von Nedd4-2. Die Ubiquitinierung von Orai1 könnte demnach auch von Adaptormolekülen wie β -Arrestin2 herbeigeführt werden. Hierbei finden keine Wechselwirkungen der WW-Domäne statt, sondern die Rekrutierung von Nedd4-2 an Orai1 erfolgt aufgrund von Konformationsänderungen des β -Arrestin2, das an der Membran gebunden ist (Shenoy *et al.*, 2008). Schließlich ist es auch denkbar, dass aufgrund von Nedd4-2 weitere Ubiquitin-Ligasen aktiviert werden, die wiederum Orai1 ubiquitinieren, wodurch es für den proteasomalen Abbau markiert wird.

Die Regulierung von I_{CRAC} durch die Hemmung von Nedd4-2 konnte das verstärkte Vorkommen von Orai1 vor allem in der Zellmembran von HEK293-Orai1 Zellen erklären. Zusätzlich konnte jedoch eine signifikante Verringerung der mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in Mastzellen SGK1-defizienter Mäuse im Vergleich zu Mastzellen aus Wildtyp-Mäusen beobachtet werden, ein Effekt, der nicht ausschließlich auf Nedd4-2 zurückgeführt werden kann (siehe 4.2). Dies stimmt mit den vorangegangenen Messungen von SOCE überein, der in Mastzellen SGK1-defizienter Mäuse signifikant verringert war (siehe 4.1.1). Ebenso zeigten HEK293 Zellen nach Transfektion mit konstitutiv aktiver SGK1 signifikant erhöhte mRNA-Level für STIM1 und Orai1 (siehe 4.2). Da SGK1 ebenfalls Transkriptionsfaktoren, wie FoxO3A (Brunet *et al.*, 2001), β -Catenin (Cohen und Frame, 2001; Sakoda *et al.*, 2003) und NF- κ B (Tai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005a) reguliert, wurde

nach Applikation verschiedener Inhibitoren jeweils die mRNA-Level von Orai1 und STIM1 überprüft. Zunächst wurde durch Zugabe von LiCl die Aktivität der GSK3 β gehemmt, um so die nukleäre Translokation von β -Catenin zu stimulieren. Außerdem wurden HEK293 Zellen mit einem Konstrukt für β -Catenin transfiziert und anschließend die mRNA-Level von STIM1 und Orai1 überprüft. In beiden Fällen konnte allerdings keine signifikante Änderung in den mRNA-Level von STIM1 und Orai1 zu Kontrollzellen festgestellt werden (siehe 4.2.2), weshalb eine Regulierung von STIM1 und Orai1 durch β -Catenin ausgeschlossen wurde.

Ein weiterer möglicher Transkriptionsfaktor, der durch SGK1 reguliert wird, ist NF- κ B (Tai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005a). NF- κ B besteht aus insgesamt fünf Untereinheiten: p65, p50, p52, RelB und c-Rel, die durch jeweils eigene Gene kodiert werden. Alle Untereinheiten besitzen eine N-terminale Rel homologe Domäne (RHD), wodurch die einzelnen Untereinheiten zu Homo- oder Heterodimeren oligomerisieren (Hayden und Ghosh, 2008). Zusätzlich enthält die RHD eine Signalsequenz zur nukleären Translokation sowie zur Bindung der Dimere an κ B-Signalsequenzen in Promotoren von Zielgenen, wo die Transkription mittels Aktivierung von Koaktivatoren oder -repressoren reguliert wird (May und Ghosh, 1997). P65, cRel und RelB besitzen außerdem eine TranskriptionaktivierungsDomäne (TAD), durch eine positive Genexpression erfolgen kann (Hayden und Ghosh, 2008). P50 und p52 werden als Vorläufermoleküle p105 bzw. p100 gebildet, welche durch proteosomalen Abbau in ihre aktive Form prozessiert werden (Hayden und Ghosh, 2008). Von insgesamt 15 möglichen Dimerbildungen sind zumindest 12 bekannt, die an die DNA binden (Hoffmann *et al.*, 2006). Das Heterodimer p65/p50 kommt ubiquitär vor und ist mit Abstand das am häufigsten vorkommende Dimer (Hoffmann *et al.*, 2006; Siebenlist *et al.*, 1994). P65/p50 wird durch Stimulierung der I- κ B Kinase (IKK) β über den klassischen Signalweg aktiviert (Hoffmann *et al.* 2006 Oncogene). Die Aktivierung von p52 erfolgt über den alternativen Signalweg, bei dem durch IKK α das als inhibierendes Protein fungierende Vorläufermolekül p100 zu p52 prozessiert wird und die inhibierten Dimere freigesetzt werden (Senftleben *et al.*, 2001). Zusätzlich kann p100 während der Translation zu p52 prozessiert werden und im Folgenden mit p65 dimerisieren (Shih *et al.*, 2011).

NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in Mastzellen (Li und Verma, 2002), wo er die Expression unterschiedlicher proinflammatorischer Zytokine reguliert (Azzolina *et al.*, 2003; Kalesnikoff *et al.*, 2002; Marquardt und Walker, 2000; Peng *et al.*, 2005). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über verschiedene Stimuli wie LPS (Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003), Tumornekrosefaktor (TNF) α (Chen *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2003) oder Ca²⁺-Oszillationen

(Dolmetsch *et al.*, 1998; Lewis, 2003; Quintana *et al.*, 2005). Die Frequenzen der Ca^{2+} -Oszillationen, hervorgerufen durch I_{CRAC} , modulieren die Zellantwort. So kommt es aufgrund einer hohen Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen (NF-AT), NF- κ B und Oct/Oap (Dolmetsch *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu führt eine niedrige Frequenz lediglich zur Aktivierung von NF- κ B (Dolmetsch *et al.*, 1998).

Im Ruhezustand der Zelle wird NF- κ B an inhibierende κ B (I- κ B) Proteine gebunden und somit die Translokation in den Nukleus verhindert. Erst durch Phosphorylierung und folgender Ubiquitinierung von I- κ B erfolgt der Abbau von I- κ B über den Proteasomkomplex und NF- κ B wird freigesetzt, sodass die Translokation in den Nukleus stattfinden kann (May und Ghosh, 1998). Der inhibierende Komplex wird von spezifischen Kinasen phosphoryliert, den IKK α und IKK β sowie einer dritten regulatorischen Untereinheit, IKK γ /NEMO (Israel, 2010). Dies geschieht allerdings erst nach Phosphorylierung an Ser-Resten der IKK α und IKK β , wodurch die Aktivität der Kinasen stimuliert wird (Delhase *et al.*, 1999; Mercurio *et al.*, 1997). Es konnten verschiedene Kinasen, wie TAK1 (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001), MEKK3 (Huang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2001) und SGK1 (Tai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005a) identifiziert werden, die hierbei eine Rolle spielen. Es wurde nachgewiesen, dass IKK β mit SGK1 koimmunopräzipitiert und in SGK1 transfizierten HEK293 Zellen phosphoryliert war (Zhang *et al.*, 2005a). Studien von Tai *et al.* zeigten, dass die Phosphorylierung an IKK α statt an IKK β stattfindet (Tai *et al.*, 2009). Beide Studien konnten jedoch nachweisen, dass sowohl IKK α als auch IKK β zur Aktivierung von NF- κ B benötigt werden (Tai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005a).

Die Überprüfung, ob die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte der SGK1 ebenfalls die nukleäre Translokation von NF- κ B beeinflussen, erfolgte nach Transfektion von HEK293 Zellen mit SGK1^{S422D} oder SGK1^{K127N} durch Immunfluoreszenz. Die Intensität von FITC-markiertem p65 im Zellkern war signifikant erhöht gegenüber Kontrollzellen oder SGK1^{K127N}-überexprimierenden Zellen. Dies diente als Bestätigung der in früheren Arbeiten ausführlich dokumentierten Aktivierung von NF- κ B durch die in dieser Arbeit verwendeten SGK1-Konstrukte.

Weiterhin wurden HEK293 Zellen mit den NF- κ B-Inhibitoren Sulfasalazin und Wogonin behandelt. Sulfasalazin wurde 1942 als antibiotisches und anti-inflammatorisches Reagenz synthetisiert (Lappas *et al.*, 2002) und erfolgreich zur Behandlung von rheumathoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie der *Colitis Ulcerosa* eingesetzt (Travis und Jewell, 1994). Der entzündungshemmende Effekt konnte auf Inhibierung der

I κ B α -Phosphorylierung durch Hemmung der IKK α und IKK β zurückgeführt werden, wodurch spezifisch die Bindung von NF κ B an DNA unterbunden wird (Wahl *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2000). Sulfasalazin zeigte in SW620 Kolonzellen bereits bei einer Behandlung für 30 min ab einer Konzentration von 0,5 mM einen inhibierenden Effekt von ~50%, während bei Zugabe von 5 mM Sulfasalazin die NF- κ B-Hemmung vollständig war (Wahl *et al.*, 1998). Ähnliche Werte konnten bei Untersuchungen an Jurkat T-Zellen erhoben werden (Wahl *et al.*, 1998). Eine andere Studie zeigte ebenfalls in SW620 Kolonzellen und Jurkat T-Zellen einen inhibierenden Effekt von Sulfasalazin auf NF κ B-abhängige Transkription bereits bei einer Konzentration von 2 mM für 30 min (Weber *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu hemmte die vierstündige Behandlung der murinen T-Lymphozyten Zelllinie RBL-5 die NF- κ B-abhängige Transkription mit einem IC₅₀-Wert von 0,625 mM. Eine Konzentration von 2,5 mM für 4 h führte zu 50% apoptotischen Zellen (Liptay *et al.*, 1999). Die genauen Serumkonzentrationen in entzündetem Gewebe sind nicht bekannt. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, denen 3-6 g Sulfasalazin/Tag verabreicht wurde, besaßen eine Serumkonzentration von 0,025-0,038 mM (Das *et al.*, 1973). Interstitielle Konzentrationen können sogar zwischen 0,5 und 1 mM liegen (Peppercorn und Goldman, 1973). Daher wurde in dieser Arbeit bei der Wahl der Konzentration sowie der Inkubationsdauer eine möglichst niedrige Konzentration (2,5 mM) bei kurzer Inkubationsdauer (30 min) gewählt, um die Zahl der apoptotischen Zellen niedrig zu halten sowie möglichst physiologische Bedingungen zu erzeugen. Unter den gewählten Bedingungen zeigte sich eine signifikant geringere Transkription von STIM1 und Orai1 im Vergleich zu Kontrollzellen (siehe 4.2.2).

5,7-dihydroxy-8-methoxyflavon (Wogonin) ist ein Flavenoid, das entzündungshemmende Wirkung besitzt (Chi *et al.*, 2003) und zytotoxisch auf verschiedene Tumorzelllinien *in vitro* wirkt sowie Tumorwachstum *in vivo*, darunter Blasen-tumor (Ikemoto *et al.*, 2000), hepatozelluläres Karzinom (Chang *et al.*, 2002) und Glialtumor (Kim *et al.*, 2001), hemmt. Wogonin hemmt die Phosphorylierung von I- κ B und verhindert somit die nukleäre Translokation von NF κ B (Zhao *et al.*, 2010). In C6 Gliazellen genügte eine Konzentration von 50 μ M, um die Aktivität von NF- κ B herabzusetzen (Kim *et al.*, 2001). Andererseits zeigten Untersuchungen in MGC-803-Zellen, dass die nukleäre Translokation von NF- κ B erst bei einer Konzentration von etwa 100 μ M erfolgreich gehemmt werden konnte (Kim *et al.*, 2001). Jurkat T-Zellen, der Jurkat T-Zell Klon J16, primäre akut myeloide Leukämiezellen sowie humane T-Lymphozyten zeigten bei einer Behandlung mit Wogonin in der Konzentration zwischen 50 bis 100 μ M ebenfalls inhibierende Effekte auf NF- κ B (Fas *et al.*,

2006). Dementsprechend wurde für die Behandlung der HEK293 Zellen eine vergleichbare Konzentration (100 μM) gewählt. Auch Wogonin konnte die mRNA-Level von STIM1 und Orai1 signifikant reduzieren (siehe 4.2.2). Außerdem konnte durch Inkubation der Zellen mit Wogonin SOCE in HEK293 Zellen signifikant reduziert werden (siehe 4.4).

Die dargestellten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass NF- κB bei der Regulierung der Transkription von STIM1 und Orai1 beteiligt ist. Da NF- κB sich aus insgesamt fünf Untereinheiten zusammensetzen kann, wurden für die Arbeit Untereinheiten sowohl des klassischen als auch des alternativen Signalweges gewählt und HEK293 Zellen mit p65/p50 oder p65/p52 kotransfiziert. Die Transfektion von HEK293 Zellen mit NF- κB Untereinheiten führte zu einer Erhöhung der mRNA- und Protein-Level von STIM1 und Orai1. Außerdem konnte durch Behandlung der Zellen mit siRNA für p65, p50 oder p52 eine verminderte Expression von STIM1 und Orai1 bestimmt werden (siehe 4.2.3). Der Erfolg des *knock down* der jeweiligen Untereinheiten wurde sowohl mit RT-PCR als auch mit Western Blot überprüft. Sowohl mRNA als auch Protein-Level waren gegenüber Kontroll-transfizierten Zellen um etwa 50-60% reduziert, sodass von einem hinreichendem *knock down* der entsprechenden Untereinheiten ausgegangen wurde.

Fura-2-*Imaging* Messungen zeigten, dass die Transfektion der NF- κB Untereinheiten p65/p50 bzw. p65/p52 zu einer signifikanten Zunahme von SOCE führten. Dieser Effekt konnte durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem SOCE-Inhibitor 2-APB oder dem NF- κB -Inhibitor Wogonin wieder aufgehoben werden (siehe 4.4). Dies lässt den Schluss zu, dass dem gemessenen Ca^{2+} -Einstrom SOCE zugrunde liegt. Weiterhin scheint die unmittelbare Beteiligung von NF- κB notwendig. Zusätzlich wurde deutlich, dass in HEK293 Zellen, die p65/p50 oder p65/p52 exprimierten, die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER nach Zugabe von Thapsigargin signifikant erhöht war gegenüber den Kontrollzellen. Inkubation mit 2-APB bzw. in p65/p52 überexprimierenden Zellen Inkubation mit dem NF- κB Inhibitor Wogonin führte zu einer Abnahme des im ER gespeicherten Ca^{2+} . Somit kann die erhöhte Ca^{2+} -Speicherfähigkeit zumindest teilweise auf die Aktivität von SOCE zurückgeführt werden, da 2-APB SOCE hemmt. Wogonin hemmt SOCE nicht unmittelbar, sondern verhindert durch Phosphorylierung von I- κB die nukleäre Translokation von NF- κB . Da nur in den HEK293 Zellen, die p65/p52 überexprimierten, SOCE nach Inkubation mit Wogonin gehemmt wurde, besteht die Möglichkeit, dass hier eine Interaktion mit einer endogen exprimierten Untereinheit von NF- κB unterbunden wird. Weiterhin ist es denkbar, dass durch NF- κB die Expression oder Aktivität der SERCA reguliert wird.

Eine erhöhte Expression von STIM1 nach Überexpression von p65/p50 oder p65/p52 könnte ebenfalls die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im ER erklären (siehe 4.4). P65/p50 sowie p65/p52 überexprimierende Zellen zeigten eine Zunahme im mRNA-Level von STIM1 (siehe 4.2.3), während nach Inhibierung von NF- κ B durch RNA-Interferenz oder Behandlung mit einem Inhibitor für NF- κ B eine Abnahme im mRNA-Level von STIM1 beobachtet werden konnte (siehe 4.2.2 und 4.2.3). STIM1 fungiert als Ca^{2+} -Sensor in der Membran des ER und wird durch Leerung der Speicher aktiviert. Je nach Menge des in der ER-Membran inkorporierten STIM1 wird eine höhere oder geringere Konzentration an Ca^{2+} benötigt, um SOCE zu aktivieren. Die Inaktivierung von STIM1 erfolgt über Sättigung der EF-Hand des STIM1 mit Ca^{2+} (siehe 1.2.1.1 und 1.2.2.2). Mastzellen, die aus STIM1 defizienten Mäusen isoliert wurden, zeigten eine beeinträchtigte Ca^{2+} -Freisetzung nach Stimulierung mit Thapsigargin oder IgE (Baba *et al.*, 2008). Wird kein STIM1 mehr exprimiert, kommt es folglich zu fehlerhaftem bzw. beeinträchtigtem SOCE, was zur Folge hat, dass das ER nicht mehr ausreichend mit Ca^{2+} gefüllt ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden HEK293 Zellen mit STIM1 transfiziert und die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung nach Zugabe von Thapsigargin in Ca^{2+} -freier Lösung mittels Ca^{2+} -*Imaging* Messungen beobachtet. Im Vergleich zu Kontrolltransfizierten Zellen zeigten diese Zellen eine signifikant erhöhte Freisetzung von Ca^{2+} nach passiver Leerung des ER. Aufgrund der erhöhten Anzahl von STIM1, das jeweils eine EF-Hand besitzt, wird wahrscheinlich mehr Ca^{2+} benötigt, um STIM1 zu inaktivieren.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob NF- κ B einen direkten Einfluss auf die Expression von STIM1 und Orai1 besitzt. Hierfür wurden Promotorteilsequenzen (O1, O2, S1) in einem Reportergentest auf ihre Aktivierbarkeit durch p65 hin untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die klonierten Promotorsequenzen O2 und S1 durch p65 aktiviert wurden, messbar durch eine Zunahme der Luziferaseaktivität, während im Konstrukt mit der Teilsequenz O1 keine Promotoraktivierung durch p65 erfolgte. Die allgemeine Konsensussequenz für NF- κ B (5'-**GGGRNYYCC**-3', R \triangleq Purin, Y \triangleq Pyrimidin, N \triangleq beliebiges Nukleotid) weicht leicht von der im Reportergentest identifizierten Sequenz ab. Ebenso weist die durch p65 aktivierte Promotorteilsequenz S1 (5'-**AGGATTCC**-3') nur eine teilweise Übereinstimmung mit der Konsensussequenz auf. Allerdings konnte in mehreren Arbeiten auch bei Abweichung von der allgemeinen Konsensussequenz eine Bindung von NF- κ B Dimeren an die DNA beobachtet werden (Busuttill *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2007; Martone *et al.*, 2003; Nishizawa und Nagata, 1990; Parry und Mackman, 1994). So beschreiben Parry und Mackman eine NF- κ B-ähnliche Konsensussequenz für c-Rel/p65 wie folgt: 5'-**HGGARNYYCC**-3' (R \triangleq Purin,

Y \triangle Pyrimidin, H \triangle A, C oder T, N \triangle ein beliebiges Nukleotid) (Parry und Mackman, 1994). Lim *et al.* konnten bei Genomuntersuchung in humanen Monozyten nach Stimulierung mit LPS in 43% der Fälle eine zu Parry ähnliche Konsensussequenz für p65 feststellen (5'-NGGRNTTYCC-3'). Zusätzlich fanden sie in 57% der Fälle p65-gebundene Loci, die kein typisches p65-Bindungsmotiv aufwiesen (Lim *et al.*, 2007). Ähnliche Ergebnisse zeigten bereits Martone *et al.* 2003, die bei p65-Bindungsstudien auf dem Chromosom 22 für 35% p65-Konsensussequenzen vorfanden und die meisten der Fragmente p65-ähnliche Konsensussequenzen aufwiesen. Auch sie fanden p65 gebundene DNA-Fragmente, die keine rel-Konsensussequenz enthielten (Martone *et al.*, 2003). Hoffmann *et al.* zeigten weiter, dass eine stringente Zuordnung von NF- κ B-Konsensussequenzen zu bestimmten NF- κ B-Dimeren nicht möglich war. Vielmehr scheinen die Proteine, die zusätzlich an den Promotor binden, der die κ B-Bindungsstelle aufwies, zusammen mit NF- κ B ergänzend bei der Regulierung der Transkription zu wirken. Hierbei können sowohl weitere Transkriptionsfaktoren, Ko-Aktivatoren und Chromatinbestandteile, die mit an κ B-Stellen gebundenen NF- κ B-Dimeren interagieren, eine Rolle spielen (Hoffmann *et al.*, 2003). Die Abweichung der Sequenzen in den STIM1- und Orai1-Promotoren von der allgemeinen Konsensussequenz für NF- κ B stellt somit kein Ausschlusskriterium dar. Da der Reporter-Test lediglich mit p65 durchgeführt wurde, kann keine Aussage bezüglich der möglichen Dimerbildung getroffen werden. P65 bildet sowohl mit c-Rel, p50 oder p52 Heterodimere als auch mit sich selber Homodimere und kann daher die Transkription von STIM1 und Orai1 auf unterschiedliche Weise stimulieren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass es mit weiteren Transkriptionsfaktoren interagiert, um das jeweilige Gen zu aktivieren.

Zur Bestimmung, ob eine direkte Bindung von p65 auch *in vivo* an die entsprechenden Promotorsequenzen stattfindet, wurde eine Chromatin Immunopräzipitation durchgeführt. Amplifikation des mittels Protein A/G Agarose angereicherten Chromatins durch spezifische Oligonukleotide für O1, O2 und S1 zeigte eine Bande in den mit anti-p65 inkubierten Proben der p65 überexprimierenden Zellen für Oligonukleotide für die Sequenzen S1 und O2, nicht jedoch für O1 (siehe 4.5.3). Somit war p65 zum Zeitpunkt der Quervernetzung an die DNA der Promorteilsequenzen O2 und S1 gebunden. Diese *in vivo* Experimente bestätigen die im Reporter-Test p65-abhängige Genregulierung von STIM1 und Orai1. In den mit einem Kaninchen-IgG Antikörper inkubierten Proben konnten nach PCR keine bzw. sehr schwache Banden detektiert werden, wodurch die Spezifität des eingesetzten p65-Antikörpers bestätigt wurde. Die schwachen Banden könnten ein Hinweis auf leichte Verunreinigung der Protein

A/G Agarose bzw. schwache Bindung des IgG-Antikörpers an p65 sein. Eventuell könnte durch stringenteren Waschschritte diese unspezifische Bindung stärker unterbunden werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NF- κ B die Expression von STIM1 und Orai1 reguliert. Somit stellt sich die Frage, welche Auswirkungen die transkriptionelle Regulierung von STIM1 und Orai1 durch NF- κ B auf die Zelle hat. Es besteht die Möglichkeit, dass die durch NF- κ B stimulierte Expression von STIM1 und Orai1 aufgrund der folgenden Ca^{2+} -Oszillationen zu einer fortgesetzten Aktivierung von NF- κ B führt. Sowohl Ca^{2+} -Einstrom (Feske *et al.*, 2001; Hardingham und Bading, 1999; McKee *et al.*, 2007) als auch NF- κ B (Azzolina *et al.*, 2003; Kalesnikoff *et al.*, 2002; Marquardt und Walker, 2000; Peng *et al.*, 2005) können weitere Gene aktivieren und somit Zellantworten auslösen. In der Zelle kann NF- κ B neben Entzündungsreaktionen (Cai, 2009; Shih *et al.*, 2011) die Differenzierung und Reifung von Immunzellen (Kumar *et al.*, 2004; Perkins, 2007; Shih *et al.*, 2011) sowie Überleben der Zelle, Apoptose und Proliferation beeinflussen. Dabei kann konstitutiv aktiviertes NF- κ B verschiedene pathologische Veränderungen auslösen: Neben Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose (Bonetti *et al.*, 1999; Gveric *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001) oder Diabetes mellitus Typ I (Ho und Bray, 1999; Lamhamedi-Cherradi *et al.*, 2003) kann NF- κ B unter anderem Artherosklerose (Brand *et al.*, 1996; Collins und Cybulsky, 2001; Jandeleit-Dahm und Cooper, 2008), Tumorstadium (Chen *et al.*, 2001; Chow und Chan, 2009; Guttridge *et al.*, 1999; Kasinski und Slack, 2010; Younes *et al.*, 2003), Asthma (Christman *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2002; Poynter *et al.*, 2002), Muskeldystrophie (Monici *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 2003), rheumatoide Arthritis (Bamborough *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Makarov, 2001), Diabetes mellitus Typ II (Yuan *et al.*, 2001) oder verstärkte Knochenresorption (Alles *et al.*, 2010; Krum *et al.*, 2010; O'Brien, 2010; Reid, 2008; Yang *et al.*, 2010) hervorrufen.

STIM1 oder Orai1 defiziente T- und Mastzellen zeigten nach Stimulierung aufgrund defekter Zytokinproduktion eine beeinträchtigte Immunantwort (Baba *et al.*, 2008; Oh-Hora *et al.*, 2008; Vig *et al.*, 2008). Zytokinpromotoren besitzen eine Reihe von Ca^{2+} sensitiven Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, NFAT oder CREB (Johnstone *et al.*, 2010), die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass fehlerhafter Ca^{2+} -Einstrom als Folge von defektem Orai1 (R91W) oder STIM1 zu SCID führt (Feske *et al.*, 2000; Feske *et al.*, 2006; Feske *et al.*, 1996; McCarl *et al.*, 2009; Picard *et al.*, 2009). Nur durch eine erfolgreiche Stammzelltransplantation kann ein Großteil der Symptome, die bis zum Tod innerhalb der ersten zehn Jahre führen können, gelindert werden. Zudem gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen SOCE und Muskelentwicklung

(Darbellay *et al.*, 2009), nicht-progressiver Myopathie (McCarl *et al.*, 2009), Muskeldystrophie (Edwards *et al.*, 2010), Muskelschwäche in alternden Muskeln (Zhao *et al.*, 2008) sowie der Entwicklung von Adipozyten (Graham *et al.*, 2009). Zusätzlich spielen STIM1 und Orai1 eine Rolle bei der Zellproliferation von verschiedenen Zelltypen (Abdullaev *et al.*, 2008; Baryshnikov *et al.*, 2009; Potier *et al.*, 2009), wodurch möglicherweise Tumorwachstum stimuliert wird. Eine weitere Studie zeigte, dass *knock down* von STIM1 und Orai1 die Proliferation und Invasion von Brustkrebszellen MDA-MB-231 stark reduzierte (Yang *et al.*, 2009). Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist zudem für die Migration von Mastzellen notwendig (Jung *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass speziell durch SOCE die Migration von HEK293 Zellen sowie Mastzellen reguliert wird (Eylenstein *et al.*, 2011). Die Vielseitigkeit der Zellfunktionen von NF- κ B sowie STIM1/Orai1 erlauben zu diesem Zeitpunkt keine eindeutige Aussage darüber, welche Rolle hierbei die transkriptionelle Regulierung von STIM1/Orai1 durch NF- κ B spielt.

Experimente mit ML-9 und Wortmannin wiesen ursprünglich auf eine Rolle der *Myosin Light Chain Kinase (MLCK)* hin (Norwood *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1996). Doch Behandlung der Zellen mit siRNA für MLCK hatte keinen Einfluss auf I_{CRAC} (Smyth *et al.*, 2008). Sowohl ML-9 (Smith *et al.*, 2000) als auch Wortmannin (Workman *et al.*, 2010) können den PI3K-Signalweg und somit SGK1 inhibieren, womit der Effekt auf I_{CRAC} erklärt werden könnte. Die Ergebnisse bestätigen somit den Einfluss der SGK1 auf I_{CRAC} , der in dieser Arbeit charakterisiert wurde.

Die Stimulierung von NF- κ B und Nedd4-2 erfolgte nach Aktivierung von SGK1. Somit wird SOCE in diesem Fall durch den PI3K-Signalweg reguliert. SGK1 übt dabei eine duale Rolle aus: Auf der einen Seite reguliert sie die Inkorporation von Orai1 in die Membran durch Inaktivierung von Nedd4-2. Auf der anderen Seite reguliert sie über NF- κ B die Transkription von Orai1 und STIM1 (siehe Abb. 5-1).

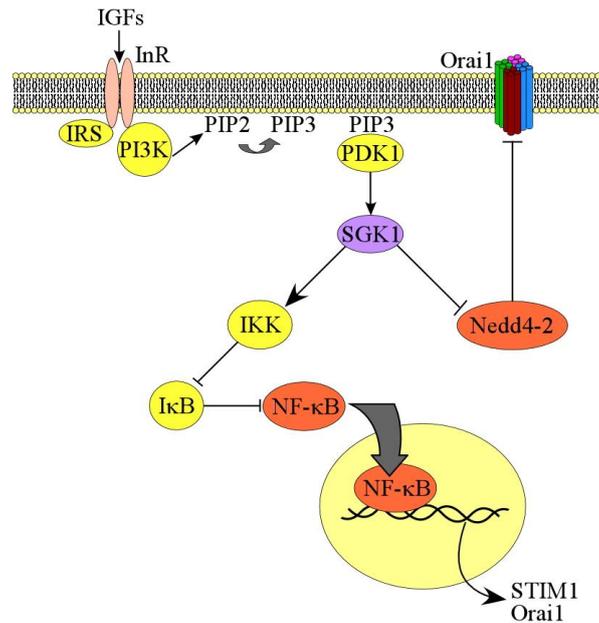


Abb. 5-1 Postulierte Regulierung von STIM1/Orai1 über den PI3K-Signalweg.

Die Aktivierung des PI3K-Signalweges erfolgt unter anderem durch Bindung von Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (insulin like growth factor, IGF) an den Insulinrezeptor (InR). Als Folge wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert, was zur Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) führt. PIP3, welches an der Membran gebunden bleibt, führt zur Translokation der zytosolischen SGK1 in Membrannähe. Die 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (3-phosphoinositide dependent kinase 1, PDK1) bindet PIP3 über eine PH-Domäne, phosphoryliert und aktiviert SGK1 (Lang und Cohen, 2001). SGK1 phosphoryliert Nedd4-2, welches daraufhin von 14-3-3 Proteinen gebunden wird und so in einem phosphorylierten, inaktiven Zustand verharret (Ichimura et al., 2005). So wird die Ubiquitinierung und Degradierung von Orai1 verhindert. Weiterhin phosphoryliert SGK1 die Untereinheiten der IKK. Aktivierte IKK phosphoryliert die I-κB-Proteine, welche an NF-κB gebunden sind, und löst damit eine Ubiquitinierungskaskade aus, die letztendlich zur Degradierung von I-κB führt (Tai et al., 2009; Zhang et al., 2005a). Das freie NF-κB kann nun in den Zellkern wandern und durch Bindung an Promotoren für STIM1 und Orai1 deren Transkription aktivieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation oder Apoptose werden durch Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst. Die Mobilisierung von Ca^{2+} erfolgt aus dem Extrazellularraum oder aus internen Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Leerung des ER aktiviert einen Mechanismus, der als speicherabhängiger Ca^{2+} -Eintritt (*store-operated Ca^{2+} entry*, SOCE) bezeichnet wird. Diesem Ca^{2+} -Eintritt in die Zelle liegt ein für Ca^{2+} -Ionen selektiver, anhaltend einwärts gerichteter Strom, der *Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} current* (I_{CRAC}), zugrunde. Für den Ablauf von SOCE/ I_{CRAC} spielen vor allem die Moleküle *Stromal Interacting Molecule* (STIM) 1 sowie Orai1 eine Rolle.

Eine Zielstellung dieser Arbeit war es, die im PI3K-Signalweg vorkommende SGK1 hinsichtlich ihrer Regulierung des SOCE/ I_{CRAC} zu untersuchen.

Der mit Hilfe der Fura-2-*Imaging* Methode gemessene Ca^{2+} -Einstrom in Mastzellen, isoliert aus *sgk1*^{-/-}-Mäusen, ergab einen signifikant geringeren Ca^{2+} -Einstrom im Vergleich zum Wildtyp. Weiterhin konnte in HEK293 Zellen, die eine konstitutiv aktive Mutante der SGK1 exprimierten, sowohl ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom nach Leerung des ER als auch ein erhöhter I_{CRAC} im Vergleich zu Kontrollzellen oder Zellen mit inaktiver Mutante der SGK1 gemessen werden. Ursächlich hierfür war eine Zunahme der Inkorporation von Orai1 in die Membran, hervorgerufen durch erniedrigte Degradierung des Proteins sowie erhöhtem mRNA-Level.

Nach Bestätigung einer Ubiquitinierung von Orai1 konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinligase Nedd4-2, ein bekanntes negativ-reguliertes Zielprotein der SGK1, die Orai1-Proteinabundanz- und Inkorporation in die Membran erniedrigt, was einen verringerten SOCE/ I_{CRAC} zur Folge hat. Die Koexpression von Nedd4-2 und der aktiven SGK1-Mutante bzw. RNA-Interferenz gegen Nedd4-2 konnte SOCE/ I_{CRAC} durch Zunahme der Orai1-Proteinmenge erhöhen.

Mastzellen aus SGK1-defizienten Mäusen zeigten zudem signifikant erniedrigte mRNA-Level für Orai1 und STIM1 verglichen mit Wildtyp-Mastzellen. Daher wurde der durch SGK1 regulierte Transkriptionsfaktor NF- κ B näher untersucht. Durch Inhibierung von NF- κ B oder -Untereinheiten in HEK293 Zellen mit Sulfasalazin, Wogonin oder nach RNA-Interferenz konnte eine Abnahme der mRNA-Level für Orai1 und STIM1 sowie von SOCE im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet werden. Entsprechend konnte durch Überexpression der NF- κ B Untereinheiten eine Zunahme der mRNA- sowie Protein-Level von Orai1 und STIM1 als auch SOCE bestimmt werden. Tatsächlich wurden mit Hilfe des Reportergerätes sowie Chromatin-Immunopräzipitation NF- κ B-Bindungsstellen in den

Promotoren für Orai1 und STIM1 identifiziert, die eine NF- κ B sensitive Transkriptionsregulierung ermöglichen.

Die SGK1 hat folglich einen wichtigen Einfluss auf den Ca²⁺-Eintritt und kann, wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt wurde, durch zwei unterschiedliche Regulierungsmechanismen SOCE/I_{CRAC} beeinflussen. Zum einen wird die Orai1-Proteinabundanz durch Nedd4-2 reguliert, zum anderen werden sowohl die Orai1- als auch die STIM1-Expression durch NF- κ B beeinflusst.

Die ermittelten Daten geben Aufschluss über die Regulierung von SOCE/I_{CRAC} durch den PI3K-Signalweg, im Besonderen SGK1, und tragen zum Verständnis der Ca²⁺-Homöostase bei. Dies ermöglicht im Weiteren ein besseres Verständnis von Tumorwachstum im Zusammenhang des PI3K-Signalweges und SOCE/I_{CRAC}.

7 ANHANG

Analyse der Promotorsequenzen von *Orai1* (vgl. Abb. 7-1 und Abb. 7-2) und *STIM1* (vgl. Abb. 7-3) etwa 3000 bp vor Transkriptionsstart des jeweiligen Gens.

```
-2491 GGAAACAAGCCAGTAGGGGTGAGATTCAAATTCCAAATTCCAAATTTTTTTCTTTTTTTTTTGAGAGGGACTCTC  
GCTCTGTCGCTCAGGCTGGAGTGCAGTGGCTCGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCCCTCCAAGTTCAAACGATT  
CTCCTGCCTCAGCCTCCCTGGTAAC TGGGACTA GGGAGTCACCATGACTAATTTTTTTAGTAGAGACGGGTTTCAC  
CATGTTGGCTAGGCTGGTCTGGAA -2239
```

Abb. 7-1 Analyse der DNA Sequenz des Chromosoms 12q24.31 in der Region 2491 bp vor dem Transkriptionsstart für *Orai1*.

*In der Region etwa 2500-2200 bp vor Transkriptionsstart für *Orai1* wurden mehrere putative κ B-Bindungsstellen (kursiv, unterstrichen) identifiziert. Die Oligonukleotide (fett), die zur Klonierung in *pGL3_Enhancer* sowie zur ChIP-Analyse genutzt wurden, flankierten eine Region (O1) von 252 bp.*

```
-1831 CCAGAGACTTCTTGGGGGCAGAGGTTTTTCATCCACAACGGTTGGGTGGGGCGCGCCCTCTAGTGGTGACAAGAGT  
TACGTTTCACCCGCCAACCGGCAATGTCACATGCTCGTCACTCATTCTCTCTCCCATAGTTATTTCATTCAACAA  
AAAATTACTGAGGACCGATTGTATGCCGAGGAATATTTAGATGCTGAGGGTAGAGCTGTGAAGCTGATAGTAAAGG  
TCCCTGCCCCGGAGTTTACCTCTTAGGAGACATTCCCTAGCACAGTCTGCATACACCCCCACCTCACCTCTGTCC  
CCAAAATTGGCCTTCCAACGCTCCAACAGCCAATATCCCTGCTTAAAGGCTCTGGCATGAGCAGTTCCCTCGCCGTC  
CTG -1442
```

Abb. 7-2 Analyse der DNA Sequenz des Chromosoms 12q24.31 in der Region 1831 bp vor dem Transkriptionsstart für *Orai1*.

*In der Region etwa 1800-1400 bp vor Transkriptionsstart für *Orai1* wurden mehrere putative κ B-Bindungsstellen (kursiv, unterstrichen) identifiziert. Die Oligonukleotide (fett), die zur Klonierung in *pGL3_Enhancer* sowie zur ChIP-Analyse genutzt wurden, flankierten eine Region (O2) von 389 bp.*

```
-3000 ATCCATGTTGTAGCATGGTCAGGGATTCCTTCTTGGCTTAAGGCTGTGTACTATTTAATTGTACGTATGTACCATA  
TTTTGTTTATCCATTCATCTATCCATGAACAACCTCGGTTGCTTTCACCTTGTGGCTGTTGTAATAATGCTGTT  
ATGAACATGGGTGTACAATTTCAAGACCTGCTTACATTTCTGGGTGTACACCCACCATTGAAATTTGGTGCAT  
CATAGTAACTATTGTTAGTTCTTAGACACCATTTAGCGT -2736
```

Abb. 7-3 Analyse der DNA Sequenz des Chromosoms 11p15.5 in der Region 3000 bp vor dem Transkriptionsstart für *STIM1*.

*In der Region etwa 3000-2700 bp vor dem Transkriptionsstart für *STIM1* wurde eine putative κ B-Bindungsstelle (kursiv, unterstrichen) identifiziert. Die Oligonukleotide (fett), die zur Klonierung in *pGL3_Enhancer* sowie zur ChIP-Analyse genutzt wurden, flankierten eine Region (S1) von 267 bp.*

Zur Überprüfung der Aktivierung der klonierten Promotorsequenzen im Reportergentest durch p65 wurden HEK293 Zellen mit den hergestellten Konstrukten sowie cFlag pcDNA3_p65 oder pcDNA3.1+ sowie pRL-TK transfiziert. Eine Übersicht des Transfektionsschemas ist in Tab. 7-1 dargestellt.

Tab. 7-1 Transfektionsschema für Luziferase-Reportergentest

	pGL3_Enhancer	pGL3_Enh_O1	pGL3_Enh_O2	pGL3_Enh_S1	pcDNA3.1+	cFlag	ncDNA3 n65	pRL-TK
1	+	-	-	-	+	-	+	
2	+	-	-	-	-	+	+	
3	-	+	-	-	+	-	+	
4	-	+	-	-	-	+	+	
5	-	-	+	-	+	-	+	
6	-	-	+	-	-	+	+	
7	-	-	-	+	+	-	+	
8	-	-	-	+	-	+	+	

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdullaev, I.F., Bisaillon, J.M., Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., and Trebak, M. (2008). Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res* 103, 1289-1299.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7, 261-269.
- Ali, H., Maeyama, K., Sagi-Eisenberg, R., and Beaven, M.A. (1994). Antigen and thapsigargin promote influx of Ca²⁺ in rat basophilic RBL-2H3 cells by ostensibly similar mechanisms that allow filling of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and mitochondrial Ca²⁺ stores. *Biochem J* 304 (Pt 2), 431-440.
- Alles, N., Soysa, N.S., Hayashi, J., Khan, M., Shimoda, A., Shimokawa, H., Ritzeler, O., Akiyoshi, K., Aoki, K., and Ohya, K. (2010). Suppression of NF-kappaB increases bone formation and ameliorates osteopenia in ovariectomized mice. *Endocrinology* 151, 4626-4634.
- Alvarez de la Rosa, D., Zhang, P., Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G., and Canessa, C.M. (1999). The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 274, 37834-37839.
- Asher, C., Sinha, I., and Garty, H. (2003). Characterization of the interactions between Nedd4-2, ENaC, and sgk-1 using surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* 1612, 59-64.
- Azzolina, A., Bongiovanni, A., and Lampiasi, N. (2003). Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta* 1643, 75-83.
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., *et al.* (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16704-16709.
- Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2008). Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat Immunol* 9, 81-88.
- Bamborough, P., Morse, M.A., and Ray, K.P. (2010). Targeting IKKbeta for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug News Perspect* 23, 483-490.
- Baryshnikov, S.G., Pulina, M.V., Zulian, A., Linde, C.I., and Golovina, V.A. (2009). Orai1, a critical component of store-operated Ca²⁺ entry, is functionally associated with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and plasma membrane Ca²⁺ pump in proliferating human arterial myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C1103-1112.
- Basak, S., Kim, H., Kearns, J.D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S.L., Benedict, C.A., Ware, C.F., Ghosh, G., Verma, I.M., *et al.* (2007). A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* 128, 369-381.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Bhalla, V., Daidie, D., Li, H., Pao, A.C., LaGrange, L.P., Wang, J., Vandewalle, A., Stockand, J.D., Staub, O., and Pearce, D. (2005). Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3. *Mol Endocrinol* 19, 3073-3084.
- Bird, G.S., DeHaven, W.I., Smyth, J.T., and Putney, J.W., Jr. (2008). Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods* 46, 204-212.
- Boehmer, C., Rajamanickam, J., Schniepp, R., Kohler, K., Wulff, P., Kuhl, D., Palmada, M., and Lang, F. (2005). Regulation of the excitatory amino acid transporter EAAT5 by the serum and glucocorticoid dependent kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 738-742.
- Bohmer, C., Palmada, M., Kenngott, C., Lindner, R., Klaus, F., Laufer, J., and Lang, F. (2007). Regulation of the epithelial calcium channel TRPV6 by the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3. *FEBS Lett* 581, 5586-5590.

- Bonetti, B., Stegagno, C., Cannella, B., Rizzuto, N., Moretto, G., and Raine, C.S. (1999). Activation of NF-kappaB and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. Implications for oligodendrocyte pathology. *Am J Pathol* *155*, 1433-1438.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., *et al.* (2001). Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* *12*, 3-10.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.
- Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A., and Neumeier, D. (1996). Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* *97*, 1715-1722.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W.S., and Meyer, T. (2007). STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell* *131*, 1327-1339.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L.S., Hemmings, B.A., and Greenberg, M.E. (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* *21*, 952-965.
- Busuttill, V., Droin, N., McCormick, L., Bernassola, F., Candi, E., Melino, G., and Green, D.R. (2010). NF-kappaB inhibits T-cell activation-induced, p73-dependent cell death by induction of MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 18061-18066.
- Cahalan, M.D., Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Roos, J., and Stauderman, K.A. (2007). Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium* *42*, 133-144.
- Cai, D. (2009). NFkappaB-mediated metabolic inflammation in peripheral tissues versus central nervous system. *Cell Cycle* *8*, 2542-2548.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *36*, 107-260.
- Casamayor, A., Torrance, P.D., Kobayashi, T., Thorner, J., and Alessi, D.R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* *9*, 186-197.
- Chang, W.H., Chen, C.H., and Lu, F.J. (2002). Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines. *Planta Med* *68*, 128-132.
- Chen, C.C., Chow, M.P., Huang, W.C., Lin, Y.C., and Chang, Y.J. (2004). Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. *Mol Pharmacol* *66*, 683-693.
- Chen, F., Castranova, V., and Shi, X. (2001). New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol* *159*, 387-397.
- Chen, S.Y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O.C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G.L., Verrey, F., and Pearce, D. (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2514-2519.
- Chi, Y.S., Lim, H., Park, H., and Kim, H.P. (2003). Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. *Biochem Pharmacol* *66*, 1271-1278.
- Chow, L.M., and Chan, T.H. (2009). Novel classes of dimer antitumour drug candidates. *Curr Pharm Des* *15*, 659-674.
- Christman, J.W., Sadikot, R.T., and Blackwell, T.S. (2000). The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. *Chest* *117*, 1482-1487.
- Chung, S.C., Limnander, A., Kurosaki, T., Weiss, A., and Korenbrot, J.I. (2007). Coupling Ca²⁺ store release to Icrac channel activation in B lymphocytes requires the activity of Lyn and Syk kinases. *J Cell Biol* *177*, 317-328.
- Clapham, D.E. (1995). Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature* *375*, 634-635.
- Cohen, P., and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 769-776.
- Collins, T., and Cybulsky, M.I. (2001). NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* *107*, 255-264.

- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Konig, S., Jousset, H., Bader, C., Demaurex, N., and Bernheim, L. (2009). STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *J Biol Chem* 284, 5370-5380.
- Das, K.M., Eastwood, M.A., McManus, J.P., and Sircus, W. (1973). The metabolism of salicylazosulphapyridine in ulcerative colitis. I. The relationship between metabolites and the response to treatment in inpatients. *Gut* 14, 631-641.
- Debonneville, C., Flores, S.Y., Kamynina, E., Plant, P.J., Tauxe, C., Thomas, M.A., Munster, C., Chraïbi, A., Pratt, J.H., Horisberger, J.D., *et al.* (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J* 20, 7052-7059.
- DeHaven, W.I., Smyth, J.T., Boyles, R.R., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2008). Complex actions of 2-aminoethyl-diphenyl borate on store-operated calcium entry. *J Biol Chem* 283, 19265-19273.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 284, 309-313.
- Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Lackner, B., Schindl, R., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). A Ca $^{2+}$ -release-activated Ca $^{2+}$ (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca $^{2+}$ -dependent inactivation of ORAI1 channels. *J Biol Chem* 284, 24933-24938.
- Derudder, E., Dejardin, E., Pritchard, L.L., Green, D.R., Korner, M., and Baud, V. (2003). RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor- α and lymphotoxin- β receptor activation: critical roles for p100. *J Biol Chem* 278, 23278-23284.
- Di Capite, J., and Parekh, A.B. (2009). CRAC channels and Ca $^{2+}$ signaling in mast cells. *Immunol Rev* 231, 45-58.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K., and Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933-936.
- Edwards, J.N., Friedrich, O., Cully, T.R., von Wegner, F., Murphy, R.M., and Launikonis, B.S. (2010). Upregulation of store-operated Ca $^{2+}$ entry in dystrophic mdx mouse muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C42-50.
- Egan, L.J., Mays, D.C., Huntoon, C.J., Bell, M.P., Pike, M.G., Sandborn, W.J., Lipsky, J.J., and McKean, D.J. (1999). Inhibition of interleukin-1-stimulated NF- κ B RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity. *J Biol Chem* 274, 26448-26453.
- Embark, H.M., Bohmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Wyatt, A.W., Wallisch, S., Capasso, G., Waldegger, P., Seyberth, H.W., Waldegger, S., *et al.* (2004a). Regulation of CLC-Ka/barttin by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum- and glucocorticoid-dependent kinases. *Kidney Int* 66, 1918-1925.
- Embark, H.M., Bohmer, C., Vallon, V., Luft, F., and Lang, F. (2003). Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. *Pflugers Arch* 445, 601-606.
- Embark, H.M., Setiawan, I., Poppendieck, S., van de Graaf, S.F., Boehmer, C., Palmada, M., Wieder, T., Gerstberger, R., Cohen, P., Yun, C.C., *et al.* (2004b). Regulation of the epithelial Ca $^{2+}$ channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase isoforms SGK1 and SGK3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem* 14, 203-212.
- Eylenstein, A., Gehring, E.M., Heise, N., Shumilina, E., Schmidt, S., Sztejn, K., Munzer, P., Nurbaeva, M.K., Eichenmuller, M., Tyan, L., *et al.* (2011). Stimulation of Ca $^{2+}$ -channel Orai1/STIM1 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1). *FASEB J* 25, 2012-2021.
- Fas, S.C., Baumann, S., Zhu, J.Y., Giaisi, M., Treiber, M.K., Mahlknecht, U., Krammer, P.H., and Li-Weber, M. (2006). Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNF α - and TRAIL-induced apoptosis. *Blood* 108, 3700-3706.
- Feske, S., Draeger, R., Peter, H.H., and Rao, A. (2000). Impaired NFAT regulation and its role in a severe combined immunodeficiency. *Immunobiology* 202, 134-150.
- Feske, S., Giltman, J., Dolmetsch, R., Staudt, L.M., and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2, 316-324.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.

- Feske, S., Muller, J.M., Graf, D., Kroczeck, R.A., Drager, R., Niemeyer, C., Baeuerle, P.A., Peter, H.H., and Schlesier, M. (1996). Severe combined immunodeficiency due to defective binding of the nuclear factor of activated T cells in T lymphocytes of two male siblings. *Eur J Immunol* 26, 2119-2126.
- Galli, S.J., Nakae, S., and Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 135-142.
- Gill, D.L., Ghosh, T.K., and Mullaney, J.M. (1989). Calcium signalling mechanisms in endoplasmic reticulum activated by inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP. *Cell Calcium* 10, 363-374.
- Graham, S.J., Black, M.J., Soboloff, J., Gill, D.L., Dziadek, M.A., and Johnstone, L.S. (2009). Stim1, an endoplasmic reticulum Ca²⁺ sensor, negatively regulates 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *Differentiation* 77, 239-247.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S., Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-5799.
- Gveric, D., Kaltschmidt, C., Cuzner, M.L., and Newcombe, J. (1998). Transcription factor NF-kappaB and inhibitor I kappaBalpha are localized in macrophages in active multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 168-178.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D.S., Hogan, P.G., and Rao, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* 282, 16232-16243.
- Hajkova, Z., Bugajev, V., Draberova, E., Vinopal, S., Draberova, L., Janacek, J., and Draber, P. (2011). STIM1-directed reorganization of microtubules in activated mast cells. *J Immunol* 186, 913-923.
- Hardingham, G.E., and Bading, H. (1999). Calcium as a versatile second messenger in the control of gene expression. *Microsc Res Tech* 46, 348-355.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.
- Henderson, W.R., Jr., Chi, E.Y., Teo, J.L., Nguyen, C., and Kahn, M. (2002). A small molecule inhibitor of redox-regulated NF-kappa B and activator protein-1 transcription blocks allergic airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol* 169, 5294-5299.
- Ho, E., and Bray, T.M. (1999). Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 222, 205-213.
- Hoffmann, A., Leung, T.H., and Baltimore, D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J* 22, 5530-5539.
- Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716.
- Hogan, P.G., Lewis, R.S., and Rao, A. (2010). Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28, 491-533.
- Hoth, M., and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
- Huang, Q., Yang, J., Lin, Y., Walker, C., Cheng, J., Liu, Z.G., and Su, B. (2004). Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* 5, 98-103.
- Huang, W.C., Chen, J.J., Inoue, H., and Chen, C.C. (2003). Tyrosine phosphorylation of I-kappa B kinase alpha/beta by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression. *J Immunol* 170, 4767-4775.
- Ichimura, T., Yamamura, H., Sasamoto, K., Tominaga, Y., Taoka, M., Kakiuchi, K., Shinkawa, T., Takahashi, N., Shimada, S., and Isobe, T. (2005). 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na⁺ channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 280, 13187-13194.
- Ikemoto, S., Sugimura, K., Yoshida, N., Yasumoto, R., Wada, S., Yamamoto, K., and Kishimoto, T. (2000). Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology* 55, 951-955.
- Ingham, R.J., Gish, G., and Pawson, T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23, 1972-1984.
- Israel, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000158.

- Jandeleit-Dahm, K., and Cooper, M.E. (2008). The role of AGEs in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 14, 979-986.
- Ji, W., Xu, P., Li, Z., Lu, J., Liu, L., Zhan, Y., Chen, Y., Hille, B., Xu, T., and Chen, L. (2008). Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13668-13673.
- Johnstone, L.S., Graham, S.J., and Dziadek, M.A. (2010). STIM proteins: integrators of signalling pathways in development, differentiation and disease. *J Cell Mol Med* 14, 1890-1903.
- Jung, I.D., Lee, H.S., Lee, H.Y., and Choi, O.H. (2009). FcepsilonRI-mediated mast cell migration: signaling pathways and dependence on cytosolic free Ca²⁺ concentration. *Cell Signal* 21, 1698-1705.
- Kalesnikoff, J., Baur, N., Leitges, M., Hughes, M.R., Damen, J.E., Huber, M., and Krystal, G. (2002). SHIP negatively regulates IgE + antigen-induced IL-6 production in mast cells by inhibiting NF-kappa B activity. *J Immunol* 168, 4737-4746.
- Kasinski, A.L., and Slack, F.J. (2010). Potential microRNA therapies targeting Ras, NFkappaB and p53 signaling. *Curr Opin Mol Ther* 12, 147-157.
- Kawasaki, T., Lange, I., and Feske, S. (2009). A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. *Biochem Biophys Res Commun* 385, 49-54.
- Keil, J.M., Shen, Z., Briggs, S.P., and Patrick, G.N. (2010). Regulation of STIM1 and SOCE by the ubiquitin-proteasome system (UPS). *PLoS One* 5, e13465.
- Kim, H., Kim, Y.S., Kim, S.Y., and Suk, K. (2001). The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. *Neurosci Lett* 309, 67-71.
- Klein, P.S., and Melton, D.A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8455-8459.
- Klemm, S., and Ruland, J. (2006). Inflammatory signal transduction from the Fc epsilon RI to NF-kappa B. *Immunobiology* 211, 815-820.
- Korzeniowski, M.K., Manjarres, I.M., Varnai, P., and Balla, T. (2010). Activation of STIM1-Orai1 involves an intramolecular switching mechanism. *Sci Signal* 3, ra82.
- Krum, S.A., Chang, J., Miranda-Carboni, G., and Wang, C.Y. (2010). Novel functions for NFkappaB: inhibition of bone formation. *Nat Rev Rheumatol* 6, 607-611.
- Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M., and Aggarwal, B.B. (2004). Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 82, 434-448.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamhamedi-Cherradi, S.E., Zheng, S., Hilliard, B.A., Xu, L., Sun, J., Alshehat, S., Liou, H.C., and Chen, Y.H. (2003). Transcriptional regulation of type I diabetes by NF-kappa B. *J Immunol* 171, 4886-4892.
- Lang, F., Artunc, F., and Vallon, V. (2009). The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18, 439-448.
- Lang, F., Bohmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., and Vallon, V. (2006). (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* 86, 1151-1178.
- Lang, F., and Cohen, P. (2001). Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001, re17.
- Lappas, M., Permezel, M., Georgiou, H.M., and Rice, G.E. (2002). Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. *Biol Reprod* 67, 668-673.
- Laufer, J., Bohmer, C., Jeyaraj, S., Knuwer, M., Klaus, F., Lindner, R., Palmada, M., and Lang, F. (2009). The C-terminal PDZ-binding motif in the Kv1.5 potassium channel governs its modulation by the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2. *Cell Physiol Biochem* 23, 25-36.
- Lewis, R.S. (2003). Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans* 31, 925-929.
- Li, Q., and Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 725-734.

- Li, Q.Q., Bever, C.T., Burt, D.R., Judge, S.I., and Trisler, G.D. (2001). Induction of RANTES chemokine expression in human astrocytic cells is dependent upon activation of NF-kappaB transcription factor. *Int J Mol Med* 7, 527-533.
- Li, R.N., Hung, Y.H., Lin, C.H., Chen, Y.H., and Yen, J.H. (2010). Inhibitor I kappa B alpha promoter functional polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 30, 676-680.
- Li, Z., Lu, J., Xu, P., Xie, X., Chen, L., and Xu, T. (2007). Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation. *J Biol Chem* 282, 29448-29456.
- Lim, C.A., Yao, F., Wong, J.J., George, J., Xu, H., Chiu, K.P., Sung, W.K., Lipovich, L., Vega, V.B., Chen, J., *et al.* (2007). Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation. *Mol Cell* 27, 622-635.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9301-9306.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* 15, 1235-1241.
- Liptay, S., Bachem, M., Hacker, G., Adler, G., Debatin, K.M., and Schmid, R.M. (1999). Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine. *Br J Pharmacol* 128, 1361-1369.
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., and Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol* 17, 794-800.
- Liu, Y.W., Chen, C.C., Tseng, H.P., and Chang, W.C. (2006). Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-kappaB-induced CCAAT/enhancer-binding protein delta in mouse macrophages. *Cell Signal* 18, 1492-1500.
- Liu, Y.W., Tseng, H.P., Chen, L.C., Chen, B.K., and Chang, W.C. (2003). Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages. *J Immunol* 171, 821-828.
- Machaca, K., and Haun, S. (2000). Store-operated calcium entry inactivates at the germinal vesicle breakdown stage of *Xenopus* meiosis. *J Biol Chem* 275, 38710-38715.
- Makarov, S.S. (2001). NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res* 3, 200-206.
- Marquardt, D.L., and Walker, L.L. (2000). Dependence of mast cell IgE-mediated cytokine production on nuclear factor-kappaB activity. *J Allergy Clin Immunol* 105, 500-505.
- Martone, R., Euskirchen, G., Bertone, P., Hartman, S., Royce, T.E., Luscombe, N.M., Rinn, J.L., Nelson, F.K., Miller, P., Gerstein, M., *et al.* (2003). Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12247-12252.
- May, M.J., and Ghosh, S. (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8, 63-73.
- May, M.J., and Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19, 80-88.
- McCarl, C.A., Picard, C., Khalil, S., Kawasaki, T., Rother, J., Papolos, A., Kutok, J., Hivroz, C., Ledeist, F., Plogmann, K., *et al.* (2009). ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca²⁺ entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1311-1318 e1317.
- McKee, A.E., Neretti, N., Carvalho, L.E., Meyer, C.A., Fox, E.A., Brodsky, A.S., and Silver, P.A. (2007). Exon expression profiling reveals stimulus-mediated exon use in neural cells. *Genome Biol* 8, R159.
- McNally, B.A., Yamashita, M., Engh, A., and Prakriya, M. (2009). Structural determinants of ion permeation in CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22516-22521.
- Mekori, Y.A., and Metcalfe, D.D. (2000). Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* 173, 131-140.
- Meng, F., Yamagiwa, Y., Taffetani, S., Han, J., and Patel, T. (2005). IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C971-981.
- Mercer, J.C., Dehaven, W.I., Smyth, J.T., Wedel, B., Boyles, R.R., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem* 281, 24979-24990.

- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., *et al.* (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860-866.
- Mignen, O., Thompson, J.L., and Shuttleworth, T.J. (2008). Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *J Physiol* 586, 419-425.
- Miranda, M., and Sorkin, A. (2007). Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* 7, 157-167.
- Monici, M.C., Aguenouz, M., Mazzeo, A., Messina, C., and Vita, G. (2003). Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 60, 993-997.
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. *J Biol Chem* 284, 8421-8426.
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., *et al.* (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem* 283, 8014-8022.
- Mullins, F.M., Park, C.Y., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15495-15500.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.
- Nishida, K., Yamasaki, S., Ito, Y., Kabu, K., Hattori, K., Tezuka, T., Nishizumi, H., Kitamura, D., Goitsuka, R., Geha, R.S., *et al.* (2005). Fc{epsilon}RI-mediated mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J Cell Biol* 170, 115-126.
- Nishizawa, M., and Nagata, S. (1990). Regulatory elements responsible for inducible expression of the granulocyte colony-stimulating factor gene in macrophages. *Mol Cell Biol* 10, 2002-2011.
- Norwood, N., Moore, T.M., Dean, D.A., Bhattacharjee, R., Li, M., and Stevens, T. (2000). Store-operated calcium entry and increased endothelial cell permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L815-824.
- O'Brien, C.A. (2010). Control of RANKL gene expression. *Bone* 46, 911-919.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P.G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., and Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol* 9, 432-443.
- Otte, L., Wiedemann, U., Schlegel, B., Pires, J.R., Beyermann, M., Schmieder, P., Krause, G., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., and Oschkinat, H. (2003). WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Sci* 12, 491-500.
- Ozawa, K., Szallasi, Z., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Mischak, H., Mushinski, J.F., and Beaven, M.A. (1993). Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. Reconstitution of secretory responses with Ca²⁺ and purified isozymes in washed permeabilized cells. *J Biol Chem* 268, 1749-1756.
- Palmada, M., Dieter, M., Boehmer, C., Waldegger, S., and Lang, F. (2004a). Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate CIC-2 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 1001-1006.
- Palmada, M., Dieter, M., Speil, A., Bohmer, C., Mack, A.F., Wagner, H.J., Klingel, K., Kandolf, R., Murer, H., Biber, J., *et al.* (2004b). Regulation of intestinal phosphate cotransporter NaPi IIb by ubiquitin ligase Nedd4-2 and by serum- and glucocorticoid-dependent kinase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G143-150.
- Palmada, M., Poppendieck, S., Embark, H.M., van de Graaf, S.F., Boehmer, C., Bindels, R.J., and Lang, F. (2005). Requirement of PDZ domains for the stimulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 by the NHE regulating factor NHERF2 and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *Cell Physiol Biochem* 15, 175-182.
- Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 136, 876-890.

- Park, J., Leong, M.L., Buse, P., Maiyar, A.C., Firestone, G.L., and Hemmings, B.A. (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 18, 3024-3033.
- Parker, N.J., Begley, C.G., Smith, P.J., and Fox, R.M. (1996). Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics* 37, 253-256.
- Parry, G.C., and Mackman, N. (1994). A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain kappa B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. *J Biol Chem* 269, 20823-20825.
- Pearce, D. (2001). The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends Endocrinol Metab* 12, 341-347.
- Peinelt, C., Lis, A., Beck, A., Fleig, A., and Penner, R. (2008). 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *J Physiol* 586, 3061-3073.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D.L., Beck, A., Nadler, M.J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 8, 771-773.
- Peng, Y., Power, M.R., Li, B., and Lin, T.J. (2005). Inhibition of IKK down-regulates antigen + IgE-induced TNF production by mast cells: a role for the IKK-IkappaB-NF-kappaB pathway in IgE-dependent mast cell activation. *J Leukoc Biol* 77, 975-983.
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 456, 116-120.
- Peppercorn, M.A., and Goldman, P. (1973). Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites. *Gastroenterology* 64, 240-245.
- Perkins, N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49-62.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Picard, C., McCarl, C.A., Papolos, A., Khalil, S., Luthy, K., Hivroz, C., LeDeist, F., Rieux-Laucat, F., Rechavi, G., Rao, A., *et al.* (2009). STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med* 360, 1971-1980.
- Pores-Fernando, A.T., and Zweifach, A. (2009). Calcium influx and signaling in cytotoxic T-lymphocyte lytic granule exocytosis. *Immunol Rev* 231, 160-173.
- Porter, J.D., Merriam, A.P., Leahy, P., Gong, B., and Khanna, S. (2003). Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. *Hum Mol Genet* 12, 1813-1821.
- Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., Abdullaev, I.F., Bisailon, J.M., Singer, H.A., and Trebak, M. (2009). Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J* 23, 2425-2437.
- Poynter, M.E., Irvin, C.G., and Janssen-Heininger, Y.M. (2002). Rapid activation of nuclear factor-kappaB in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation. *Am J Pathol* 160, 1325-1334.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P.G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443, 230-233.
- Preston, S.F., Sha'afi, R.I., and Berlin, R.D. (1991). Regulation of Ca²⁺ influx during mitosis: Ca²⁺ influx and depletion of intracellular Ca²⁺ stores are coupled in interphase but not mitosis. *Cell Regul* 2, 915-925.
- Putney, J.W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1-12.
- Quintana, A., Griesemer, D., Schwarz, E.C., and Hoth, M. (2005). Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflugers Arch* 450, 1-12.
- Reid, I.R. (2008). Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Semin Cell Dev Biol* 19, 473-478.
- Ritchie, M.F., Yue, C., Zhou, Y., Houghton, P.J., and Soboloff, J. (2010). Wilms tumor suppressor 1 (WT1) and early growth response 1 (EGR1) are regulators of STIM1 expression. *J Biol Chem* 285, 10591-10596.

- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* *169*, 435-445.
- Sakoda, H., Gotoh, Y., Katagiri, H., Kurokawa, M., Ono, H., Onishi, Y., Anai, M., Ogihara, T., Fujishiro, M., Fukushima, Y., *et al.* (2003). Differing roles of Akt and serum- and glucocorticoid-regulated kinase in glucose metabolism, DNA synthesis, and oncogenic activity. *J Biol Chem* *278*, 25802-25807.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandulache, D., Grahammer, F., Artunc, F., Henke, G., Hussain, A., Nasir, O., Mack, A., Friedrich, B., Vallon, V., Wulff, P., *et al.* (2006). Renal Ca²⁺ handling in sgk1 knockout mice. *Pflugers Arch* *452*, 444-452.
- Seeböhm, G., Strutz-Seeböhm, N., Baltaev, R., Korniychuk, G., Knirsch, M., Engel, J., and Lang, F. (2005). Regulation of KCNQ4 potassium channel prepulse dependence and current amplitude by SGK1 in *Xenopus* oocytes. *Cell Physiol Biochem* *16*, 255-262.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., *et al.* (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* *293*, 1495-1499.
- Shelly, C., and Herrera, R. (2002). Activation of SGK1 by HGF, Rac1 and integrin-mediated cell adhesion in MDCK cells: PI-3K-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* *115*, 1985-1993.
- Shenoy, S.K., Xiao, K., Venkataramanan, V., Snyder, P.M., Freedman, N.J., and Weissman, A.M. (2008). Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* *283*, 22166-22176.
- Shih, V.F., Tsui, R., Caldwell, A., and Hoffmann, A. (2011). A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res* *21*, 86-102.
- Shumilina, E., Lampert, A., Lupescu, A., Myssina, S., Strutz-Seeböhm, N., Henke, G., Grahammer, F., Wulff, P., Kuhl, D., and Lang, F. (2005). Deranged Kv channel regulation in fibroblasts from mice lacking the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J Cell Physiol* *204*, 87-98.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* *10*, 405-455.
- Smith, A.J., Pfeiffer, J.R., Zhang, J., Martinez, A.M., Griffiths, G.M., and Wilson, B.S. (2003). Microtubule-dependent transport of secretory vesicles in RBL-2H3 cells. *Traffic* *4*, 302-312.
- Smith, U., Carvalho, E., Mosialou, E., Beguinot, F., Formisano, P., and Rondinone, C. (2000). PKB inhibition prevents the stimulatory effect of insulin on glucose transport and protein translocation but not the antilipolytic effect in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *268*, 315-320.
- Smyth, J.T., DeHaven, W.I., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2007). Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca²⁺ channel activator STIM1. *J Cell Sci* *120*, 3762-3771.
- Smyth, J.T., Dehaven, W.I., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2008). Ca²⁺-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *J Cell Sci* *121*, 762-772.
- Smyth, J.T., Hwang, S.Y., Tomita, T., DeHaven, W.I., Mercer, J.C., and Putney, J.W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med* *14*, 2337-2349.
- Smyth, J.T., Petranka, J.G., Boyles, R.R., DeHaven, W.I., Fukushima, M., Johnson, K.L., Williams, J.G., and Putney, J.W., Jr. (2009). Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol* *11*, 1465-1472.
- Snyder, P.M. (2009). Down-regulating destruction: phosphorylation regulates the E3 ubiquitin ligase Nedd4-2. *Sci Signal* *2*, pe41.
- Snyder, P.M., Olson, D.R., Kabra, R., Zhou, R., and Steines, J.C. (2004). cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na⁽⁺⁾ channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2. *J Biol Chem* *279*, 45753-45758.
- Snyder, P.M., Olson, D.R., and Thomas, B.C. (2002). Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* *277*, 5-8.

- Sobiesiak, M., Shumilina, E., Lam, R.S., Wolbing, F., Matzner, N., Kaesler, S., Zemtsova, I.M., Lupescu, A., Zahir, N., Kuhl, D., *et al.* (2009). Impaired mast cell activation in gene-targeted mice lacking the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *J Immunol* *183*, 4395-4402.
- Soboloff, J., Spassova, M.A., Hewavitharana, T., He, L.P., Xu, W., Johnstone, L.S., Dziadek, M.A., and Gill, D.L. (2006a). STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry. *Curr Biol* *16*, 1465-1470.
- Soboloff, J., Spassova, M.A., Tang, X.D., Hewavitharana, T., Xu, W., and Gill, D.L. (2006b). Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* *281*, 20661-20665.
- Sopjani, M., Kunert, A., Czarkowski, K., Klaus, F., Laufer, J., Foller, M., and Lang, F. (2010). Regulation of the Ca(2+) channel TRPV6 by the kinases SGK1, PKB/Akt, and PIKfyve. *J Membr Biol* *233*, 35-41.
- Spassova, M.A., Soboloff, J., He, L.P., Xu, W., Dziadek, M.A., and Gill, D.L. (2006). STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4040-4045.
- Srikanth, S., Jung, H.J., Kim, K.D., Souda, P., Whitelegge, J., and Gwack, Y. (2010a). A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nat Cell Biol* *12*, 436-446.
- Srikanth, S., Jung, H.J., Ribalet, B., and Gwack, Y. (2010b). The intracellular loop of Orai1 plays a central role in fast inactivation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* *285*, 5066-5075.
- Stambolic, V., Ruel, L., and Woodgett, J.R. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* *6*, 1664-1668.
- Stathopoulos, P.B., Li, G.Y., Plevin, M.J., Ames, J.B., and Ikura, M. (2006). Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* *281*, 35855-35862.
- Stathopoulos, P.B., Zheng, L., Li, G.Y., Plevin, M.J., and Ikura, M. (2008). Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell* *135*, 110-122.
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* *306*, 67-69.
- Tai, D.J., Su, C.C., Ma, Y.L., and Lee, E.H. (2009). SGK1 phosphorylation of IκappaB Kinase alpha and p300 Up-regulates NF-kappaB activity and increases N-Methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression. *J Biol Chem* *284*, 4073-4089.
- Tani, D., Monteilh-Zoller, M.K., Fleig, A., and Penner, R. (2007). Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg²⁺-nucleotide-regulated MagNum (TRPM7) currents. *Cell Calcium* *41*, 249-260.
- Tran, Q.K., Watanabe, H., Le, H.Y., Pan, L., Seto, M., Takeuchi, K., and Ohashi, K. (2001). Myosin light chain kinase regulates capacitative Ca(2+) entry in human monocytes/macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *21*, 509-515.
- Travis, S.P., and Jewell, D.P. (1994). Salicylates for ulcerative colitis--their mode of action. *Pharmacol Ther* *63*, 135-161.
- van de Graaf, S.F., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J. (2006). Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* *290*, F1295-1302.
- Varnai, P., Toth, B., Toth, D.J., Hunyady, L., and Balla, T. (2007). Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *J Biol Chem* *282*, 29678-29690.
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J.M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D.L., Soboloff, J., Gill, D.L., Fleig, A., *et al.* (2006a). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* *16*, 2073-2079.
- Vig, M., DeHaven, W.I., Bird, G.S., Billingsley, J.M., Wang, H., Rao, P.E., Hutchings, A.B., Jouvin, M.H., Putney, J.W., and Kinet, J.P. (2008). Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nat Immunol* *9*, 89-96.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., *et al.* (2006b). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* *312*, 1220-1223.
- Vina-Vilaseca, A., and Sorkin, A. (2010). Lysine 63-linked polyubiquitination of the dopamine transporter requires WW3 and WW4 domains of Nedd4-2 and UBE2D ubiquitin-conjugating enzymes. *J Biol Chem* *285*, 7645-7656.

- Volpi, M., and Berlin, R.D. (1988). Intracellular elevations of free calcium induced by activation of histamine H1 receptors in interphase and mitotic HeLa cells: hormone signal transduction is altered during mitosis. *J Cell Biol* 107, 2533-2539.
- von Bubnoff, D., Novak, N., Kraft, S., and Bieber, T. (2003). The central role of FcepsilonRI in allergy. *Clin Exp Dermatol* 28, 184-187.
- Wahl, C., Liptay, S., Adler, G., and Schmid, R.M. (1998). Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 101, 1163-1174.
- Waldegger, S., Barth, P., Raber, G., and Lang, F. (1997). Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4440-4445.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.
- Watanabe, H., Takahashi, R., Zhang, X.X., Kakizawa, H., Hayashi, H., and Ohno, R. (1996). Inhibition of agonist-induced Ca²⁺ entry in endothelial cells by myosin light-chain kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 777-784.
- Weber, C.K., Liptay, S., Wirth, T., Adler, G., and Schmid, R.M. (2000). Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* 119, 1209-1218.
- Webster, M.K., Goya, L., and Firestone, G.L. (1993a). Immediate-early transcriptional regulation and rapid mRNA turnover of a putative serine/threonine protein kinase. *J Biol Chem* 268, 11482-11485.
- Webster, M.K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A.C., and Firestone, G.L. (1993b). Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* 13, 2031-2040.
- Williams, R.T., Manji, S.S., Parker, N.J., Hancock, M.S., Van Stekelenburg, L., Eid, J.P., Senior, P.V., Kazenwadel, J.S., Shandala, T., Saint, R., *et al.* (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* 357, 673-685.
- Workman, P., Clarke, P.A., Raynaud, F.I., and van Montfort, R.L. (2010). Drugging the PI3 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic. *Cancer Res* 70, 2146-2157.
- Wu, W., Chaudhuri, S., Brickley, D.R., Pang, D., Karrison, T., and Conzen, S.D. (2004). Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* 64, 1757-1764.
- Yang, C., McCoy, K., Davis, J.L., Schmidt-Supprian, M., Sasaki, Y., Faccio, R., and Novack, D.V. (2010). NIK stabilization in osteoclasts results in osteoporosis and enhanced inflammatory osteolysis. *PLoS One* 5, e15383.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., and Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* 2, 620-624.
- Yang, S., Zhang, J.J., and Huang, X.Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* 15, 124-134.
- Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M.D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443, 226-229.
- Younes, A., Garg, A., and Aggarwal, B.B. (2003). Nuclear transcription factor-kappaB in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 44, 929-935.
- Yu, F., Sun, L., and Machaca, K. (2009). Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17401-17406.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Dorwart, M.R., Choi, Y.J., Worley, P.F., and Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* 11, 337-343.
- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M., and Shoelson, S.E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293, 1673-1677.
- Yun, C.C., Palmada, M., Embark, H.M., Fedorenko, O., Feng, Y., Henke, G., Setiawan, I., Boehmer, C., Weinman, E.J., Sandrasagra, S., *et al.* (2002). The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the

- Na⁺/H⁺ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K⁺ channel ROMK1. *J Am Soc Nephrol* 13, 2823-2830.
- Zhang, L., Cui, R., Cheng, X., and Du, J. (2005a). Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{ κ }B kinase. *Cancer Res* 65, 457-464.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9357-9362.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2005b). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902-905.
- Zhao, Q., Wang, J., Zou, M.J., Hu, R., Zhao, L., Qiang, L., Rong, J.J., You, Q.D., and Guo, Q.L. (2010). Wogonin potentiates the antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF- κ B and regulation of its metabolism. *Toxicol Lett* 197, 201-210.
- Zhao, X., Weisleder, N., Thornton, A., Oppong, Y., Campbell, R., Ma, J., and Brotto, M. (2008). Compromised store-operated Ca²⁺ entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell* 7, 561-568.
- Zhou, Y., Mancarella, S., Wang, Y., Yue, C., Ritchie, M., Gill, D.L., and Soboloff, J. (2009). The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels. *J Biol Chem* 284, 19164-19168.
- Zhou, Y., Ramachandran, S., Oh-Hora, M., Rao, A., and Hogan, P.G. (2010). Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4896-4901.
- Zweifach, A., and Lewis, R.S. (1993). Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6295-6299.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Florian Lang, der es mir ermöglichte, am Physiologischen Institut der Universität Tübingen unter exzellenten Bedingungen mein Forschungsprojekt umzusetzen. Ich danke ihm für die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der gesamten Zeit.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff, der es mir ermöglicht hat, an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen zu promovieren und für die Arbeit wertvolle Denkanstöße gab.

Ein weiterer Dank gilt Sebastian Schmidt für sein Engagement während des *Ca²⁺-Imaging* sowie seine fröhliche Art, mit der er für ein positives Arbeitsklima sorgte. Zudem möchte ich mich bei Dr. E. Shumilina, Dr. N. Heise und S. Gu bedanken. Besonderer Dank gilt Dr. E. Shumilina, die mir mit ihrer konstruktiven Kritik immer wieder neue Denkanstöße gegeben hat.

Ich danke Eva-Maria Gehring, Cai Tang, Patrick Münzer, Wenting Yang sowie allen anderen Kollegen am Physiologischen Institut für ihre Kooperation, Hilfsbereitschaft und Kollegialität.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Ivonne Regel, für ihre Diskussionsbereitschaft und Ratschläge.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann für seine bedingungslose Unterstützung und Liebe. Er half mir, auch in schwierigen Zeiten durchzuhalten und nicht den Glauben an mich selbst zu verlieren. Quantillionen Dank dafür!

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich versichere, dass die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde und dass die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken in der Arbeit als solche kenntlich gemacht worden sind. Weiterhin versichere ich, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde und keine weiteren Personen bei der geistigen Herstellung der Arbeit beteiligt waren.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes erstellt worden ist.

Dieses Projekt befasst sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von Ionenkanälen, welche durch die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase reguliert werden. Der wesentliche Anteil der in der vorliegenden Dissertation erhobenen Daten wurde von mir persönlich erhoben. Mittels des Ca^{2+} -*Imaging* erhobene Daten wurden von Dr. N. Heise und S. Schmidt erstellt. Weiterhin wurden Daten mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik von Dr. E. Shumilina erhoben. Die Fluoreszenzbilder, die die Translokation von p65 in den Zellkern demonstrieren (siehe 4.3), wurden von S. Gu erstellt.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Vor- und Zunahme: Anja Eystenstein, geb. Kunert
Geburtstag: 28.09.1983
Geburtsort: Magdeburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

09/2008-10/2011 **Universität Tübingen**
Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Physiologie
Stipendiatin des Internationalen Graduiertenkollegs „PI3 Kinase Pathway in Tumor and Diabetes“ (GRK 1302)
Thema der Doktorarbeit: Regulierung des speicherabhängigen Ca²⁺-Kanals Orai1 und des Ca²⁺-sensitiven Proteins STIM1 durch die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1

09/2005-03/2008 **Universität Leipzig**
Studium der Biochemie
03/2008 Diplom-Biochemie, Abschlussnote: 1,5
Thema der Diplomarbeit: Durchmusterung von metagenomischen Bibliotheken nach neuen Genen für Lipasen

09/2003-08/2005 **Universität Potsdam**
Studium der Biochemie
08/2005 Vordiplom, Note: 1,4

09/1994-07/2003 **Gymnasium Martineum, Halberstadt**
06/2003 Abitur, Abschlussnote: 1,5

Berufserfahrung

06/2008-07/2008 **Universität Leipzig**
Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
Nachwuchsgruppe „Weiße Biotechnologie“
Wissenschaftliche Angestellte für ein Projekt zur Durchmusterung von
Genombibliotheken nach neuen Genen für Lipasen

Studienbegleitende Tätigkeiten

04/2008-05/2008 **Universität Leipzig**
Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
Nachwuchsgruppe „Weiße Biotechnologie“
Studentische Hilfskraft für ein Projekt zur Durchmusterung von
Genombibliotheken nach neuen Genen für Lipasen

11/2006-08/2007 **Universität Leipzig**
Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
Nachwuchsgruppe „Weiße Biotechnologie“
Studentische Hilfskraft für ein Projekt zur Charakterisierung
thermostabiler Exonukleasen

09/2005-06/2006 **Universität Leipzig**
Fakultät für Chemie und Mineralogie
Arbeitsgruppe „Structural Analysis of biopolymers“
Studentische Hilfskraft

05/2005-08/2005 **Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie,**
Potsdam-Golm
Arbeitsgruppe „Metabolomic Analysis“
Studentische Hilfskraft

Praktika

02/2007-04/2007 **Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz**
Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften
Optimierung einer Methode zur Herstellung und Reinigung eines
antimikrobiellen Wirkstoffes

Auslandsaufenthalte

- 08/2000-07/2001 **Franklin High School, Franklin (North Carolina), USA**
Austauschschülerin
- 07/1998-08/1998 **Christchurch, England**
Sprachreise

Sonstige Kenntnisse

- Fremdsprachen: Englisch (fließend)
 Spanisch (Grundkenntnisse)
- EDV: Windows, Word, Excel, Power Point
 Canvas Graphical Software
 ImageJ

VERÖFFENTLICHUNGEN

Eylenstein A, Schmidt S, Gu S, Alesutan I, Schmid E, Szteyn K, Shumilina E, Regel I, Lang F (2011). „NF- κ B dependent expression of the Ca²⁺ channel Orai1 and its activator STIM1” JBC-Revision

Borst O, Schmidt EM, Münzer P, Schönberger T, Towhid ST, Elvers M, Leibrock C, **Eylenstein A**, Kuhl D, May AE, Gawaz M, Lang F (2011). „Role of serum- & glucocorticoid-inducible kinase-1 (SGK1) in the regulation of platelet function” Blood-Revision

Eylenstein A, Gehring EM, Heise N, Shumilina E, Schmidt S, Szteyn K, Münzer P, Nurbaeva MK, Eichenmüller M, Tyan L, Regel I, Föller M, Kuhl D, Soboloff I, Penner R, Lang F (2011). „Stimulation of the Ca²⁺-channel Orai1/STIM1 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1)” FASEB J **25** (6): 2012-2021.

Sopjani M, **Kunert A**, Czarkowski K, Klaus F, Laufer J, Föller M, Lang F (2010). „Regulation of the Ca²⁺ channel TRPV6 by the kinases SGK1, PKB/Akt and PIKfyve” J Membr Biol **233** (1-3): 35-41.

Bayer S, **Kunert A**, Ballschmiter M, Greiner-Stöffele T (2010). „Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library” J Mol Microbiol Biotechnol **18** (3): 181-187.