

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik  
Tübingen

**Die Rolle von Chorein in der Regulierung des  
speicherabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in Tumorzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Zhou, Willi, geb. Yu**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber  
2. Berichterstatter: Professorin Dr. E. Reisinger

Tag der Disputation: 05.11.2021



# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	7
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 Chorein .....	11
1.1.1 Chorea-Akanthozytose (ChAc) .....	11
1.1.2 Funktion und Signalwege von Chorein .....	13
1.2 ZF-Rhabdomyosarkomzellen .....	16
1.2.1 Tumorzellen .....	16
1.2.2 Rhabdomyosarkome.....	17
1.2.3 ZF-Rhabdomyosarkom-Zelllinie .....	18
1.3 Die Rolle von Kalzium in humanem Gewebe .....	19
1.3.1 $Ca^{2+}$ -Bindeproteine .....	20
1.3.2 $Ca^{2+}$ -Kanäle und -Pumpen.....	21
1.3.3 Speicherabhängiger Kalziumeinstrom (SOCE).....	23
1.4 Speicherabhängiger Kalziumeinstrom in Tumorzellen .....	34
1.5 Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1).....	36
1.5.1 Nukleärer Faktor kappa B (NFκB).....	39
1.5.2 Steuerung des speicherabhängigen Kalziumeinstroms .....	40
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	41
2 MATERIAL UND METHODEN.....	43
2.1 Material .....	43
2.1.1 Chemikalien .....	43
2.1.2 Oligonukleotide .....	45
2.1.3 Antikörper .....	46
2.1.4 hergestellte Reagenzien .....	47
2.1.5 Verbrauchsmaterial.....	48
2.1.6 Geräte.....	49
2.1.7 Zelllinie.....	50

2.2	Methoden .....	50
2.2.1	Zellkultur .....	50
2.2.2	Behandlung der Zellen .....	51
2.2.3	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR) .....	52
2.2.4	Western Blotting.....	55
2.2.5	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie .....	57
2.2.6	Durchflusszytometrie (FACS).....	58
2.2.7	Messung des speicherabhängigen Ca <sup>2+</sup> -Einstroms .....	59
3	ERGEBNISSE .....	61
3.1	SOCE in ZF-Rhabdomyosarkomzellen .....	61
3.1.1	SOCE in ZF-Zellen und der Einfluss von 2-APB .....	61
3.1.2	Einfluss von EMD638683 auf SOCE in ZF-Zellen.....	62
3.1.3	Einfluss von Wogonin auf SOCE in ZF-Zellen .....	64
3.2	Gen-Knockdown von VPS13A in ZF-Rhabdomyosarkomzellen.....	65
3.3	Einfluss von Chorein auf SOCE in ZF-Rhabdomyosarkomzellen .....	66
3.3.1	SOCE nach Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen .....	66
3.3.2	Expression von Orai1, STIM1 und STIM2 nach Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen .....	68
3.3.3	Proteinmenge und -Verteilung von Orai1 nach Gen-Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen .....	69
3.3.4	Expression von SGK1 nach Gen-Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen .....	72
3.3.5	Expression von NFκB nach Gen-Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen .....	73
4	DISKUSSION .....	75
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
6	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	85
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	86

8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	114
9	TABELLENVERZEICHNIS .....	115
10	ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL .....	116
	DANKSAGUNG.....	117

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalzium-Ionen Konzentration
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
A549	Zelllinie eines Adenokarzinoms der Lunge
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Units (willkürliche Einheiten)
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death (Bcl-2-Antagonist des Zelltodes)
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BCL-2	B-Zell-Lymphom-2-Protein
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
C2-Domäne	Eine Form Ca <sup>2+</sup> -bindender Domänen
CaCo2	Zelllinie eines Kolonkarzinoms
CAD	CRAC-Aktivierungsdomäne
CC	Coiled coil (Doppelwendelstruktur)
cDNA	komplementäre DNA
ChAc	Chorea-Akanthozytose
CMD	CRAC-modulierende Domäne
CRAC	Calcium release activated channel
C-terminal	Carboxy-terminal
DCV	Dense-Core-Vesikel
DHL-PH	Dbl-homology like / pleckstrin homology domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EF-Hand	Ca <sup>2+</sup> -bindende Domäne mit integrierter E- und F-Helix
EF-SAM	Domäne, die aus EF-Hand und SAM besteht
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EMD638683	SGK1-Inhibitor

ER	Endoplasmatisches Retikulum		
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom des Ösophagus)		
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)		
FAK	Fokale Adhäsionskinase		
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum)		
FFAT	Two phenylalanines (FF) in an acidic tract		
Foxo1	Forkhead Box Protein O1		
Foxo3a	Forkhead-Box-Protein O3		
HEK293	Human embryonic kidney cells (Humane embryonale Nierenzellen)		
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure		
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene)		
ID <sub>STIM</sub>	Inaktivierungsdomäne von STIM		
IKK	I $\kappa$ B-Kinase		
IKK $\alpha$	I $\kappa$ B-Kinase Untereinheit alpha		
IKK $\beta$	I $\kappa$ B-Kinase Untereinheit beta		
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat		
I $\kappa$ B	Inhibitoren der NF $\kappa$ B		
K562	erythroleukämische Zelllinie		
M	Molar		
mAR	Membran-Androgenrezeptor		
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7, Brustkrebszelllinie		
MCU	Mitochondrialer Kalzium Uniporter		
MEG-01	Zelllinie von humanen Megakaryoblasten		
mRNA	Messenger-RNA		
mTOR	mechanistic (mammalian) Target of Rapamycin		
NCKX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -K <sup>+</sup> -Austauscher		
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher		
Nedd4-2	Neural-precursor-cell-expressed regulated (gene) 4-2	developmentally	down-



NFAT	Ca <sup>2+</sup> -Calcineurin-nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (Nukleärer Faktor kappa B)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-terminal	Amino-terminal
PAK1	P21-aktivierte Kinase 1
PAX7	Paired Box 7
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PC12	Phäochromozytom 12 Ziellinie der Ratte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1)
PDK2	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-2 (3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-2)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMCA	Plasmamembran-Ca <sup>2+</sup> -ATPase
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RIPA	Radioimmunoprecipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
S100	Proteinfamilie, die in 100%iger Ammoniumsulfat-Lösung löslich ist
SAM	Steriles-Alpha-Motiv
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SERCA	Sarkoplasmatisches/Endoplasmatisches-Retikulum-Kalzium-ATPase
SGK1	Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1
siNeg	Negativkontrolle durch Gen-Knockdown mit nontargeting siRNA

siRNA	Small interfering RNA (kleine interferierende RNA)
siVPS13A	Versuchsgruppe mit Gen-Knockdown von VPS13A
SOAR	STIM1-Orai-Aktivierungsregion
SOCE	Speicherabhängiger Kalziumeinstrom
SPCA	Secretory pathway $\text{Ca}^{2+}$ ATPase (Sekretionsweg- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase)
STIM	Stromales Interaktionsmolekül
TBST	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung) mit Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC	Transient receptor potential canonical channel (kanonischer transienter Rezeptorpotential-Kanal)
VAMP8	Vesikel-assoziiertes Membranprotein 8
VPS13A	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A
ZF	Zelllinie eines alveolären Rhabdomyosarkoms

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Chorein

Chorein ist ein Protein, das durch das Gen VPS13A (engl. „vacuolar protein sorting-associated protein 13A“) codiert wird, welches auf dem Locus 9q21.2 liegt (Rubio et al. 1997). Es wird in allen bislang untersuchten Geweben, vor allem in Hoden, Niere, Milz und Gehirn exprimiert (Kurano et al. 2007; Velayos-Baeza et al. 2004). Die funktionelle Bedeutung von Chorein zeigt sich insbesondere in der Chorea-Akanthozytose, einer Erkrankung, die auf einem Defekt von Chorein beruht (Ueno et al. 2001; Rampoldi et al. 2001).

### 1.1.1 Chorea-Akanthozytose (ChAc)

Die Chorea-Akanthozytose (ChAc) ist eine hereditäre, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die sich durch ein progredientes Krankheitsbild mit klinisch vorherrschend neurologischer Symptomatik kennzeichnet (Danek et al. 2012). Die ChAc ist auf Mutationen im Gen VPS13A zurückzuführen, die zu einem Fehlen bzw. Mangel an funktionsfähigem Chorein führen (Dobson-Stone et al. 2002; Dobson-Stone et al. 2004; Ueno et al. 2001). Es wird geschätzt, dass ca. 500 - 1000 Menschen weltweit an ChAc erkrankt sind. Die Symptomatik bricht in einem mittleren Alter von 30 Jahren aus und verläuft progredient, bis sie zum frühzeitigen Tod der Betroffenen führt. Die Lebenserwartung variiert von 28 bis 61 Jahren (Velayos Baeza et al. 2002).

#### 1.1.1.1 Symptomatik

Das klinische Erscheinungsbild der ChAc ist durch ihre vielgestaltigen neurologischen Auffälligkeiten geprägt. Typischerweise kommt es zur Chorea (griechisch *choreía* = Reigen(tanz)), einer hyperkinetischen Bewegungsstörung mit unwillkürlichen, ausschweifenden Bewegungen der Extremitäten, aber auch des Gesichts-, Mund- und Pharynxbereiches (Velayos Baeza et al. 2002). Damit verbunden sind unwillkürliche Vokalisationen, Dysarthrie sowie Dysphagie (Aasly et al. 1999; Bader et al. 2010; Saiki et al. 2004). Obwohl die Chorea namensgebend ist, ist sie in der ChAc keinesfalls obligat: In Einzelfällen fehlte sie komplett (Peluso et al. 2017). Alternativ kam es beispielsweise zu einer parkinsonoiden Symptomatik, teilweise als Spätmanifestation der Erkrankung (Nagy

et al. 2015). Myopathien im Sinne von Muskelatrophien, Muskelschwäche und eine Erhöhung der Kreatinkinase im Serum sind gängige Begleiterscheinungen (Velayos Baeza et al. 2002). Darüber hinaus sind epileptische Anfälle zu beobachten (Al-Asmi et al. 2005). Neben neurologischen Erscheinungen treten auch psychopathologische Veränderungen auf. Insbesondere Persönlichkeits- und Verhaltensveränderungen sowie kognitive Veränderungen wurden bei einem Großteil der Patienten beschrieben (Danek et al. 2004, zitiert in Velayos Baeza et al. 2002).

#### *1.1.1.2 Morphologie und Pathophysiologie*

Morphologisch lassen sich Veränderungen feststellen, die zum Verständnis der Pathogenese beitragen. Analog zu den choreatischen Bewegungsstörungen lassen sich im Gehirn betroffener Patienten und im Mausmodell Beeinträchtigungen der Basalganglien feststellen. Es kommt zu einer beidseitigen Atrophie des Nucleus caudatus, Putamen und Pallidum (Huppertz et al. 2008; Tomemori et al. 2005). Histopathologisch korreliert dies mit einem Untergang von Neuronen mit konsekutiver astrozytärer Gliose (Vital et al. 2002; Ishida et al. 2009; Tomemori et al. 2005).

Bei den Betroffenen kommt es zur Myopathie mit elevierten Serumkonzentrationen der Kreatinkinase. Ihre Genese ist nicht abschließend geklärt. In peripheren Nerven wird eine Reduktion an dicken myelinisierten Fasern beschrieben, vereinbar mit einer neurogenen Myopathie (Alonso et al. 1989; Vital et al. 2002). Darüber hinaus wird aufgrund histologisch aberranter Chorein-Verteilungsmuster in Muskelzellen eine primäre Beteiligung des Skelettmuskels diskutiert (Saiki et al. 2007). Eine zusätzliche Beteiligung des Herzmuskels im Sinne einer Kardiomyopathie wurde hingegen nur in einem Einzelfall beschrieben (Kageyama et al. 2007).

Im Blut der Betroffenen zeigen sich typischerweise Akanthozyten, die ausschlaggebend für die Benennung der Erkrankung sind. Sie sind dysforme Erythrozyten, die sich im Blutausschlag durch spikuliert Ausziehungen kennzeichnen. Sie machen einen Anteil von 5 - 50 % an der Gesamt-Erythrozytenzahl

aus, können in einzelnen Fällen jedoch auch fehlen (Velayos Baeza et al. 2002; Bayreuther et al. 2010).

### 1.1.1.3 Klassifikation und Differentialdiagnostik

Obwohl die Chorea namensgebend ist, zeigt sich die neurologische Symptomatik der ChAc insgesamt vielgestaltig (s. 1.1.1.1). Das erschwert die korrekte Diagnose der Erkrankung.

Im Vordergrund der Klinik von ChAc-Patienten steht die Chorea. Erkrankungen, die mit Chorea einhergehen, sind vielfältig, aber insgesamt selten, sodass die Stellung der richtigen Diagnose schwierig sein kann.

Die ChAc ist der Hauptvertreter der Neuroakanthozytosen, einer Gruppe seltener Erkrankungen, die mit neurologischen Symptomen und Akanthozyten in Erscheinung treten (Peikert et al. 2018). Ein Fehlen von Akanthozyten schließt jedoch eine ChAc nicht sicher aus (Bayreuther et al. 2010). Die Unterscheidung zwischen den Neuroakanthozytosen schließt neben Unterschieden des klinischen Auftretens auch die kraniale Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie sowie die spezifische genetische Diagnostik mit ein. Zur Diagnose einer ChAc ist die Untersuchung auf Chorein in Erythrozyten durch Western-Blot-Analysen sowie ggf. der DNA-Analyse von VPS13A von großer Bedeutung (Jung et al. 2011).

### 1.1.2 Funktion und Signalwege von Chorein

In den vergangenen zwei Jahrzehnten konnte Chorein immer weiter charakterisiert werden. Jüngere Untersuchungen zeigen, dass Chorein Lipide binden und diese ohne Beteiligung von Vesikeln zwischen Zellorganellen transportieren kann (Velayos-Baeza et al. 2004; Kumar et al. 2018). Kumar et al. lokalisierten Chorein an Kontaktstellen zwischen dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien und Lipidtropfen (engl. „lipid droplets“). Sie zeigten, dass Chorein eine Amino-terminale (N-terminale) hydrophobe Vertiefung besitzt, die Glycerolipide binden kann. Die Verankerung in der ER-Membran erfolgt durch ein FFAT-Motiv (engl. „two phenylalanines (FF) in an acidic tract“), die Bindung an Mitochondrien und Lipidtropfen durch eine Carboxy-terminal (C-

terminal) gelegene DHL-PH-Domäne (engl. „Dbl-homology like / pleckstrin homology domain“) (Kumar et al. 2018).

Das Krankheitsbild der ChAc zeigt durch die Affektion unterschiedlicher Zellen, dass Chorein für eine Reihe an Zellfunktionen Bedeutung haben muss. Zwar ist der vollständige Verlust von Chorein mit dem Leben vereinbar und in den ersten Lebensjahren oft unauffällig, für das langfristige Zellüberleben ist Chorein jedoch unabdingbar. Insbesondere im zentralen Nervensystem kommt es mit zunehmendem Alter sonst zur Degeneration von Neuronen (Tomemori et al. 2005). Neuronen und Fibroblasten aus ChAc-Patienten wiesen *in vitro* eine signifikant höhere Apoptoserate auf (Pelzl et al. 2017a; Pelzl et al. 2017b), hingegen waren Chorein-überexprimierende embryonale Nierenzellen weniger anfällig gegenüber eines Nährstoffentzugs (Sasaki et al. 2016).

Chorein kann auch das Überleben von Tumorzellen fördern, wobei nicht alle Tumore auf Chorein angewiesen sind. Die Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo2 exprimiert zum Beispiel vergleichsweise wenig Chorein und zeigt bei Chorein-Mangel keine Beeinträchtigung des Überlebens. In anderen Tumorzelllinien wie dem ZF-Rhabdomyosarkom und der K562-Erythroleukämie, führte ein Mangel an Chorein jedoch zu einer eindeutig gesteigerten Apoptose- oder Nekroserate (Honisch et al. 2015a; Föller et al. 2012; Alesutan et al. 2013). Im Mittelpunkt steht dabei die Beeinträchtigung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Weges, wodurch nach Knockdown von Chorein, beispielsweise in ZF-Rhabdomyosarkomzellen, eine Verminderung des antiapoptotischen B-Zell-Lymphom-2-Protein (BCL-2) sowie vermehrter Transkription des proapoptotischen Bcl-2-assoziierten X Proteins (Bax) beobachtet werden konnte. Folglich kam es zur mitochondrialen Depolarisation, Aktivierung der Caspase-3 und Stimulation der Apoptose (Honisch et al. 2015a). In K562-Erythroleukämie-Zellen wurde zusätzlich eine geringere Aktivität der P21-aktivierten Kinase 1 (PAK1) beobachtet, die eine geringere Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bcl-2-Antagonist des Zelltodes (BAD) bewirkte (Föller et al. 2012). In Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene (HUVEC, engl. „human umbilical vein endothelial cells“) führte der Choreinmangel zu einer erhöhten Caspase-3-Aktivität und einer gesteigerten Nekrose (Alesutan et al. 2013).

Chorein stabilisiert das Zytoskelett. Seine Abwesenheit führt zur Bildung von dysformen Erythrozyten (Akanthozyten). Untersuchungen an Erythrozyten und Fibroblasten von ChAc-Patienten zeigten Störungen der Netzwerke der Aktinfilamente, der Desmin- und Zytokeratin-Intermediärfilamente sowie der Mikrotubuli auf (Honisch et al. 2015b). Es bestehen Hinweise auf eine direkte Interaktion von Chorein mit dem Aktin-regulierenden  $\beta$ -Adduzin sowie  $\beta$ -Aktin (Shikawa et al. 2013). Weitere Einflüsse auf das Aktinfilament wurden in Erythrozyten und Thrombozyten von ChAc-Patienten sowie in K562-Erythroleukämie-Zellen, MEG-01-Megakaryoblasten und HUVEC näher untersucht. Das Fehlen von Chorein führt in diesen Zellen zu einer geringeren Aktivität des fokale Adhäsionskinase (FAK) / PI3K Signalweges, unter dessen Einfluss die Aktin-Regulatoren „rat sarcoma (Ras) related C3 botulinum toxin substrate 1“ (Rac1) und PAK1 stehen. Folglich ist eine vermehrte Depolymerisierung der Aktinfilamente und ein überproportionales Vorkommen von globulärem Aktin zu beobachten, wodurch die Stabilität und Steifheit der Zellen deutlich beeinträchtigt wird (Föller et al. 2012; Schmidt et al. 2013; Alesutan et al. 2013; Honisch et al. 2015b). Darüber hinaus ist Aktin mit Zellfunktionen wie der Aktivität von Ionenkanälen, Sekretion, Migration, Apoptose und Überleben assoziiert (Papakonstanti und Stournaras 2008).

Chorein wird im Gehirn ubiquitär exprimiert. In Nervenzellen zeigte sich die vorwiegende Lokalisation in mikrosomalen und synaptosomalen Bereichen, wo Chorein an der Bildung und Ausschüttung synaptischer Vesikel beteiligt ist (Kurano et al. 2007). In differenzierten Phäochromozytom 12 (PC12)-Zellen ist Chorein besonders am Golgi-Apparat sowie an Dense-Core-Vesikeln (DCV) in den Termini der Axone lokalisiert. DCV sind synaptische Vesikel, die Katecholamine und Neuropeptide wie Dopamin enthalten können. Die Überexpression eines C-terminalen Fragments von Chorein förderte in PC12-Zellen die Exozytose der DCV mit der Freisetzung von Dopamin (Hayashi et al. 2012). Ein Choreinmangel führte hingegen zur Verringerung der Anzahl an Vesikeln sowie zu einer reduzierten Dopaminausschüttung, ein Effekt, der mit der Verminderung des Vesikel-assoziierten Membranproteins 8 (VAMP8) assoziiert ist (Honisch et al. 2015c; Hayashi et al. 2012). VAMP8 reguliert Vorgänge der Exozy-

tose und gehört zur Familie der SNARE-Proteine (engl. „soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“), die für die Fusion von Membranen verantwortlich sind (Chen und Scheller 2001; Wang et al. 2007; Cosen-Binker et al. 2008). Auch in nicht-neuronalen Zellen zeigte sich der Einfluss von Chorein auf die Exozytose. So ist die VAMP8-abhängige Degranulierung aktivierter Thrombozyten ebenfalls von Chorein abhängig. Folglich ist auch die Plättchenaggregation gestört (Schmidt et al. 2013; Polgár et al. 2002).

Chorein übt Einfluss auf die Autophagie aus. Diese ist ein zellulärer Prozess, der für den kontrollierten Abbau von intrazellulären Makromolekülen und Organellen sorgt und dadurch den Zellhaushalt aufrechterhält und vor dem Zelltod schützt. Ein Chorein-Mangel beeinträchtigt die Autophagie mit beträchtlicher Akkumulation Autophagie-assoziiierter Proteine. Störungen der Autophagie sind unter anderem stark mit neurodegenerativen Erkrankungen und einer gestörten Erythropoese assoziiert, zwei Eigenschaften, die die ChAc charakterisieren (Petibone et al. 2017; Nixon 2013; Lupo et al. 2016; Muñoz-Braceras et al. 2015).

### 1.2 ZF-Rhabdomyosarkomzellen

Auswirkungen von Chorein wurden in dieser Arbeit anhand der ZF-Rhabdomyosarkom-Zelllinie untersucht. Rhabdomyosarkome gehören zur Familie der Krebserkrankungen. Die grundlegenden Eigenschaften von Krebszellen sind für das weitere Verständnis relevant und werden im Folgenden zusammengefasst.

#### 1.2.1 Tumorzellen

Krebs ist ein Oberbegriff für Krankheiten, die durch bösartige Neubildungen entstehen (DIMDI 2018). Krebs gilt als weltweit führende Todesursache im 21. Jahrhundert und als größtes Hindernis in der Steigerung der Lebenserwartung. Dies macht Krebs zu einem der wichtigsten medizinischen Forschungsthemen unserer Zeit (Bray et al. 2018; Stewart und Wild 2014).

Dem Krebs liegen bösartige (= maligne) Tumorzellen (lat. „tumor“ = Schwellung, Geschwulst) zugrunde, deren Malignität gekennzeichnet ist durch die unkontrollierte Vermehrung, invasives Wachstum und Metastasierung (Sarkar



et al. 2013). Hanahan und Weinberg beschrieben sechs grundlegende Kennzeichen von Krebs: Die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, das Verhindern der Apoptose, das endlose Potential zur Zellteilung, die Aktivierung und Aufrechterhaltung der Angiogenese sowie die Gewebeeinfiltration und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000). Seither kann diese Liste um mindestens zwei weitere Kennzeichen ergänzt werden: Die Tumorzellen erfahren eine Reprogrammierung des energetischen Metabolismus und entkommen der Kontrolle durch das Immunsystem (Hanahan und Weinberg 2011).

Die Proliferation der Tumorzellen wird einerseits durch die Aktivierung von Onkogenen, und/oder andererseits zur Deaktivierung der antiproliferativen oder proapoptotischen Tumorsuppressorgene gefördert (Vogelstein und Kinzler 2004). Die Metastasierung wiederum basiert auf dem Verlust zellulärer Adhäsionsrezeptoren, Steigerung der Zellmotilität und Aktivierung von Membranmetalloproteasen. Sie ist verantwortlich für die meisten Krebs-Todesfälle (Chambers et al. 2002). Ursächlich sind in aller Regel Veränderungen im Genom durch Mutationen, chromosomale Translokation oder Deletion sowie eine fehlregulierte Expression oder Aktivität der korrespondierenden Signalwege (Sarkar et al. 2013). Ihre Entwicklung basiert auf der genomischen Instabilität im Zuge defekter Stabilitäts- und Reparaturgene, wodurch die Mutationsrate gesteigert wird (Hanahan und Weinberg 2000; Hanahan und Weinberg 2011).

### 1.2.2 Rhabdomyosarkome

Rhabdomyosarkome sind maligne Tumore mesenchymalen Ursprungs, die aus Vorläuferzellen quergestreifter Muskulatur hervorgehen (Panda et al. 2017)

Histologisch unterscheidet man im Wesentlichen drei Subtypen: den embryonalen, alveolären und pleomorphen (anaplastischen) Typ. Der embryonale Typ ist mit 70 - 80 % der häufigste und kommt typischerweise in der Kopf-Nacken-Region und im Urogenitaltrakt vor. Der alveoläre Typ ist zu 15 - 20 % vertreten und entsteht häufig in Extremitäten, Rumpf, Perineum und peri-

anal. Anaplastische Rhabdomyosarkome treten vorwiegend im Erwachsenenalter auf (Panda et al. 2017).

Das Rhabdomyosarkom entsteht meist in der ersten Lebensdekade (Sultan et al. 2009). Es ist das häufigste Weichteilsarkom im Kindesalter und macht bei den bis 14-Jährigen 3,5 % aller malignen Tumore aus (Panda et al. 2017). Erkrankungen im Erwachsenenalter sind sehr selten (Sultan et al. 2009). Weniger als ein Viertel der Rhabdomyosarkome sind bereits bei Diagnosestellung metastasiert. Typische Metastasierungsorte sind Lunge (40 - 50 %), Knochenmark (20 - 30 %), Knochen (10 %) und Lymphknoten (bis zu 20 %) (Panda et al. 2017).

Therapeutisch wird so weit wie möglich die chirurgische Exzision angestrebt, gegebenenfalls geht ihr eine neoadjuvante Chemotherapie voraus. Nach der Operation erfolgt eine adjuvante Chemotherapie. Aufgrund der meist strahlensensiblen Tumorzellen wird sie häufig mit einer Radiotherapie kombiniert (Okcu und Hicks 2019).

Die höchste Überlebensrate haben Kinder und Jugendliche mit embryonalem, gefolgt vom alveolärem Rhabdomyosarkom (5-Jahres-Überlebensrate 69 % vs. 47 %). Anaplastische Rhabdomyosarkome weisen die schlechteste Prognose auf (Panda et al. 2017). Allgemein haben Erwachsene ein deutlich schlechteres Outcome (Sultan et al. 2009).

### 1.2.3 ZF-Rhabdomyosarkom-Zelllinie

Die ZF-Zelllinie stammt aus einem wenig differenzierten alveolären Rhabdomyosarkom von einer siebenjährigen Patientin. Zum Diagnosezeitpunkt waren bereits multiple Fernmetastasen vorhanden. Es erfolgte vor der Resektion des Primärtumors in der Wade eine neoadjuvante Therapie des hochresistenten Tumors mit verschiedenen Therapieschemata (Docetaxel und Cyclophosphamid; Ifosfamid, Vincristin und Actinomycin; Ifosfamid, Vincristin und Adriamycin) (Honisch et al. 2015a; Zaborski 2019). Gegenüber anderen Rhabdomyosarkomlinien weisen ZF-Zellen eine besonders hohe Expression von Chorein auf. Die Herunterregulation von Chorein beeinträchtigt das Überleben dieser

Zellen erheblich durch die Hemmung des PI3K-Weges und zeigt, dass ZF-Zellen besonders auf Chorein angewiesen sind (Honisch et al. 2015a).

### 1.3 Die Rolle von Kalzium in humanem Gewebe

Kalzium ist das fünfthäufigste Element im menschlichen Körper und für zahlreiche, grundlegende Vorgänge im Körper essenziell (Kaim und Schwederski 1995; Jaiswal 2001). 99 % des Körperkalziums befinden sich in den Knochen. Dort ist es Voraussetzung für die mechanische Standfestigkeit des Stützgewebes und dient gleichzeitig als Kalziumspeicher. Hierzu bedarf es einer strengen Regulation des Kalziumhaushaltes im Körper, die allen voran durch die Hormone Parathormon, Calcitonin und Dihydroxycalciferol bewerkstelligt wird (Löffler et al. 2007). Kalzium kommt im Organismus nicht nur gebunden an organischen sowie anorganischen Molekülen vor, sondern dient auch als freies  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion einer wichtige Rolle: Die physikochemischen Eigenschaften des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions machen es zu einem essenziellen und vielseitigen Signalträger in der Zelle. Die freie zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) beträgt im Ruhezustand etwa 50 - 100 nM und ist somit um ca.  $10^4$ -fach niedriger als im extrazellulären Raum (Bronner 2001).

Die Zellorganellen tragen wiederum ihrerseits zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und -Signalwegen bei. Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) in Muskelzellen sowie das endoplasmatische Retikulum (ER) in den übrigen Zellen fungiert als wichtigster  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherort, aus dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen rasch freigesetzt werden können und erreicht dabei eine intraluminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Größenordnung von 100 - 400  $\mu\text{M}$  (Berridge et al. 2000; Ziman et al. 2010; Koch 1990). Mitochondrien besitzen nach heutigem Kenntnisstand einen eigenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt und steuern über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zelluläre Vorgänge sowie mitochondriale Funktionen, beispielsweise als Bestandteil der Atmungskette (Stefani et al. 2016).

In erregbaren Zellen wie Nerven- oder Muskelzellen sorgt eine rasche Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  für die erforderliche schnelle Signaltransduktion. In nicht-erregbaren Zellen beobachtet man hingegen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, die durch einen repetitiven Anstieg und Abfall des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gekennzeichnet sind (Woods et al. 1986, zitiert in Dupont et al. 2011). Sie können an Nachbarzellen weitergege-

ben werden und innerhalb eines Zellverbundes eine sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle auslösen (Berridge et al. 2003). Daneben gibt es lokale Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb sogenannter Mikrodomänen als Teil lokal begrenzter Signalvorgänge (Pani und Singh 2009; Pacheco et al. 2016).

Im Gegensatz zu vielen anderen Signalträgern werden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen weder erzeugt noch inaktiviert oder vernichtet, sodass  $\text{Ca}^{2+}$  transportiert oder gepuffert werden muss (Villalobos et al. 2016). Hohe, beständige Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen innerhalb der Zelle führen zum Zelltod (Nicotera und Orrenius 1998). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt befindet sich daher in einem empfindlichen Gleichgewicht, das von einer Vielfalt an Kanälen, Transportern, Bindungs- und Signalproteinen gesteuert wird. Gleichzeitig müssen die vielfältigen  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerten Signalwege adäquat umgesetzt werden. Es folgt eine Übersicht über die bekanntesten involvierten Proteingruppen.

### 1.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteine

$\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteine zeichnen sich durch ein oder mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen aus. Als Sensorproteine können sie  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerte Prozesse vermitteln, indem sie nach Bindung von Kalziumionen durch Konformitätsänderungen Folgereaktionen einleiten. Hierzu zählen beispielsweise G-Protein-gekoppelte membranständige Rezeptoren wie muskarinische Rezeptoren oder lösliche Effektorproteine wie Calmodulin. Darüber hinaus existieren Pufferproteine wie Calbindin D-28, die Schwankungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermindern (Carafoli und Krebs 2016; Berridge et al. 2003).

Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erfolgt auf verschiedene Weisen. Eine gut untersuchte, sehr häufige  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomäne ist die EF-Hand Domäne (benannt nach der integrierten E- und F-Helix). Zu den EF-Hand Proteinen gehören S100-Proteine (benannt aufgrund ihrer Löslichkeit in 100%iger Ammoniumsulfat-Lösung), das Sensorprotein Calmodulin oder auch Neuronale  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorproteine (NCS) (Clapham 2007; Donato 2001).

1.3.2 Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und -Pumpen1.3.2.1 Intrazelluläre Signalprozesse durch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom

Ca<sup>2+</sup>-Kanäle führen bei Öffnung zu einem passiven Ca<sup>2+</sup>-Einstrom entlang des transmembranösen Konzentrationsgefälles in das Zytosol, wodurch zahlreiche Folgereaktionen in Gang gesetzt werden können.

**Tab. 1: Übersicht über die bekanntesten Kanäle, die einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom oder eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung bewirken.**

Kanäle	Ort	Eigenschaften und Funktion
spannungsgesteuerte Ca <sup>2+</sup> -Kanäle <sup>1</sup>	Plasmamembran	Rasche Veränderung des Membranpotentials (insbesondere in Neuronen)
Transiente Rezeptor-Potential-Kanäle (TRP) <sup>2</sup>	Plasmamembran	Heterogene Gruppe an Ca <sup>2+</sup> - sowie unspezifischen Kationenkanälen, heterogenes Funktionsspektrum. Aktivierung z. B. durch Liganden oder sensorische Reize
Transmitter-gesteuerte Kanäle <sup>3</sup>	Plasmamembran	Aktivierung durch Liganden, z. B. N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) oder Acetylcholin
Gap Junctions <sup>4</sup>	Plasmamembran	Zell-Zell-Verbindungen durch Connexine zum Austausch von Ionen und kleinen Moleküle
Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP <sub>3</sub> )-Rezeptor <sup>5</sup>	Endoplasmatisches Retikulum (ER)	Aktivierung durch IP <sub>3</sub> , Beteiligung an zahlreichen zellulären Signalwegen
Ryanodinrezeptor <sup>5</sup>	Sarkoplasmatisches Retikulum (SR)	Ca <sup>2+</sup> -induzierter Ca <sup>2+</sup> -Release
Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Li <sup>+</sup> -permeabler Austauscher (NCLX), 2H <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher <sup>6</sup>	Mitochondrien	Mitochondriale Prozesse, Mitregulation der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
Kalziumfreisetzung-aktivierter Kanal (CRAC)	ER/SR	Ermöglicht den speicherabhängigen Kalziueinstrom (SOCE) aus dem Extrazellularraum, s. Abschnitt 1.3.3.2.

<sup>1</sup>(Clapham 2007; Catterall 2011), <sup>2</sup>(Ramsey et al. 2006), <sup>3</sup>(Clapham 2007), <sup>4</sup>(Nielsen et al. 2012), <sup>5</sup>(Berridge et al. 2000; Berridge 1983; Burgess et al. 1984), <sup>6</sup>(Stefani et al. 2016).

Ca<sup>2+</sup>-Kanäle können periodisch verändernde [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> innerhalb der Zelle bewirken, die als Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen bezeichnet werden. Sie beruhen auf einem repetitiven Ca<sup>2+</sup>-Ein- und -Ausstrom aus dem Zytosol und werden mit einer Reihe von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in Verbindung gebracht. Verschiedene Studien identifizierten unterschiedliche verantwortliche Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, insbesondere IP<sub>3</sub>-Rezeptoren, Ryanodinrezeptoren und Kalziumfreisetzung-aktivierte Kanäle (engl. „Calcium release activated calcium channel“, CRAC) (Berridge et al. 2003; Dupont et al. 2011). Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen sind somit ein sehr heterogen gesteuertes Phänomen (Dupont et al. 2011).

### 1.3.2.2 Elimination von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Intrazellularraum

Durch Signalprozesse und Leckströme kommt es zu einem ständigen Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen nach intrazellulär. Die Aufrechterhaltung der niedrigen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wird daher durch eine konstante Elimination von Ca<sup>2+</sup>-Ionen entgegen des Konzentrationsgradienten bewerkstelligt. Dabei werden Ca<sup>2+</sup>-Ionen sowohl nach extrazellulär als auch in die Zellorganellen transportiert (Carafoli und Krebs 2016).

Unterschiedliche Transporter befördern Ca<sup>2+</sup>-Ionen unter Hydrolyse von Adenosintri-phosphat (ATP) aus dem Intrazellularraum (Tab. 2). Darüber hinaus senken Ionenaustauscher die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, indem Konzentrationsgradienten anderer Ionen genutzt werden. Letztere funktionieren prinzipiell in beide Richtungen (Clapham 2007; Khananshvili 2014; Yang et al. 2013b).

**Tab. 2: Übersicht über die bekanntesten Transporter, die intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> eliminieren.**

Transporter	Ort
Sarkoplasmatisch/Endoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA) <sup>1</sup>	Sarko-/Endoplasmatisches Retikulum (SR/ER)
Sekretionsweg-Ca <sup>2+</sup> -ATPase (engl. secretory pathway Ca <sup>2+</sup> ATPase, SPCA) <sup>2</sup>	Golgi-Apparat
Mitochondrialer Kalzium Uniporter (MCU) Komplex <sup>3</sup>	Mitochondrien
Plasmamembran-Ca <sup>2+</sup> -ATPase (PMCA) <sup>4</sup>	Plasmamembran

<sup>1</sup>(Clapham 2007), <sup>2</sup>(Carafoli und Krebs 2016), <sup>3</sup>(Glitsch et al. 2002; Hoth et al. 1997; Fonteriz et al. 2016), <sup>4</sup>(Clapham 2007).

**Tab. 3: Übersicht über die bekanntesten Ionenaustauscher, die intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  eliminieren.** Sie kommen in der Plasmamembran und in Membranen von Zellorganellen vor.

<b>Ionenaustauscher</b>	<b>Vorgang</b>
$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) <sup>1</sup>	transportiert 1 $\text{Ca}^{2+}$ -Ion im Austausch gegen 3 $\text{Na}^+$ -Ionen
$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - $\text{K}^+$ -Austauscher (NCKX) <sup>1</sup>	transportiert 1 $\text{Ca}^{2+}$ -Ion sowie 1 $\text{K}^+$ -Ion im Austausch gegen 4 $\text{Na}^+$ -Ionen

<sup>1</sup>(Clapham 2007; Khananshvili 2014; Yang et al. 2013b).

### 1.3.3 Speicherabhängiger Kalziumeinstrom (SOCE)

#### 1.3.3.1 Endoplasmatisches und sarkoplasmatisches Retikulum als intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher

J. W. Putney stellte erstmals fest, dass Zellen einen internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher besitzen (Putney 1977). Diese können durch extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wieder befüllt werden (Putney 1986; Streb et al. 1983; Berridge 1983; Burgess et al. 1984; Takemura et al. 1989). Dieses Phänomen zeigte sich zunächst nach Gabe von  $\text{IP}_3$ , das zur Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen des ER und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER in das Zytosol führt (vgl. 1.3.2.1).

Weitere grundlegende Erkenntnisse konnten durch die Nutzung von Thapsigargin, einem Toxin der Pflanze *Thapsia garganica*, gewonnen werden. Thapsigargin führt zur Leerung des ER/SR, indem es die SERCA direkt und unabhängig von  $\text{IP}_3$  inhibiert (Ali et al. 1985; Jackson et al. 1988; Thastrup et al. 1990; Lytton et al. 1991). Der Prozess, der konsekutiv das ER/SR mit extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  wieder befüllt, wird heute als speicherabhängiger Kalziumeinstrom (engl. store-operated calcium entry, SOCE) bezeichnet (Parod und Putney 1978; Prakriya und Lewis 2015). Hoth und Penner nannten den beobachteten Ionenstrom  $\text{I}_{\text{CRAC}}$ , der hochselektiv für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen war und einen geringen Leitwert besaß (Hoth und Penner 1992): Die Leitfähigkeit des CRAC-Kanals ist gegenüber anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen um mehr als 100-fach verringert (Prakriya und Lewis 2006).

Die Protagonisten des SOCE konnten in den letzten zwei Jahrzehnten charakterisiert werden. Das Transmembranprotein Orai1 formt den CRAC-Kanal, der  $I_{CRAC}$  ermöglicht. Um ihn zu aktivieren, ist das  $Ca^{2+}$ -Sensorprotein Stromales Interaktionsmolekül (STIM) erforderlich, welches die Kalziumkonzentration des ER/SR erfasst. Beide Proteine werden im Folgenden näher beleuchtet.

### 1.3.3.2 *Orai1*

Orai1 ist die porenformende Untereinheit des CRAC-Kanals (Gudlur und Hogan 2017). Mittels Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz gelang 2006 erstmals der Nachweis, dass Orai1 essentieller Bestandteil des CRAC-Kanals ist (Feske et al. 2006; Vig et al. 2006a; Zhang et al. 2006; Luik und Lewis 2007). Insgesamt sind drei humane Orai-Homologe (Orai1 - 3) bekannt (Mercer et al. 2006). Alle beteiligen sich am STIM1-vermittelten SOCE (Mercer et al. 2006). Orai1 und Orai2 zeigen ähnliche Eigenschaften, während Orai3 durchschnittlich die geringste Effizienz und Expression aufweist (Mercer et al. 2006).

Orai1 ist das am besten untersuchte Orai-Homolog. Das humane Orai1 ist ein Transmembranprotein, das aus 301 Aminosäuren und vier Transmembrandomänen (TM1 - 4) besteht (Zhu et al. 2017; Cai 2007). Der C- wie auch der N-Terminus liegt im zytoplasmatischen Bereich. Beide sind kritische Bereiche für die STIM1-vermittelte Aktivierung des Kanals (Zhou et al. 2016; Gudlur und Hogan 2017).

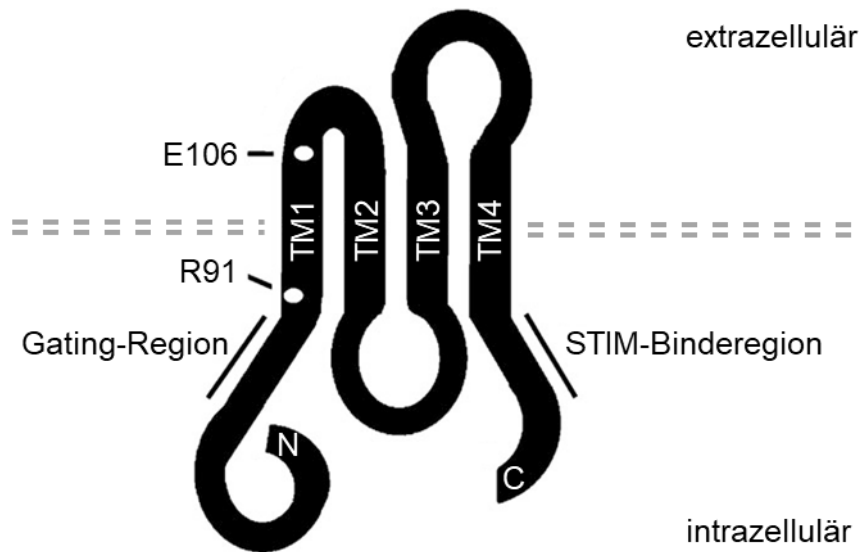
Orai-Moleküle sind Monomere, die durch Zusammenlagerung den spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanal bilden. Man geht davon aus, dass Orai im Ruhezustand in Dimeren vorliegt (Penna et al. 2008). Nachdem zunächst die Vermutung bestand, dass der aktivierte CRAC-Kanal aus einem Tetramer besteht, bilden die aktivierten Orai-Moleküle nach heutigem Kenntnisstand über Cystein-Disulfidbrücken ein Hexamer (Zhou et al. 2010; Yen et al. 2016; Cai et al. 2016). Die zentrale Kanalpore wird dabei durch sechs TM1-Domänen gebildet. Diese wiederum werden von TM2 und TM3 umschlossen. Die TM4-Domänen sind peripher lokalisiert und gehen anschließend an das C-terminale Ende über (Abb. 1) (Hou et al. 2012).



Für die Funktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle E106 in TM1 essentiell (Vig et al. 2006b; Prakriya et al. 2006). Dieser negativ geladene Locus ist nicht nur Ort der Interaktion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, sondern ist auch maßgeblich für die hohe Selektivität des Kanals verantwortlich. Weitere negativ geladene Aminosäuren in dieser Region tragen zur porennahen Akkumulation der positiv geladenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei (Vig et al. 2006b). Im geschlossenen Zustand verhindert eine basenreiche Region der Pore durch eine stark positive Ladung und einen geringen Öffnungsdurchmesser den Durchtritt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Hou et al. 2012).

Zur Aktivierung von Orai1 ist die direkte Interaktion mit STIM erforderlich. Die Bindungsstelle enthält eine Coiled-Coil-Formation und liegt im C-Terminus von Orai1 (Li et al. 2007; Yuan et al. 2009; Stathopoulos et al. 2013). Das C-terminale Ende von Orai2 und Orai3 enthält zusätzlich eine Glutamat-reiche Region, die eine schnelle  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung ermöglicht (Lee et al. 2009).

Auch der N-Terminus ist an der Aktivierung beteiligt. In dieser liegt eine hochkonservierte erweiterte transmembrane Orai1 N-terminale Region (ETON, engl. „extended transmembrane Orai1 N-terminal region“). Versuche mit Mutationen oder Kürzungen dieser Region ergaben, dass auch dieser für die Aktivierung des Kanals essenziell ist, sodass dieser als Steuer-Region (engl. „gating region“) bezeichnet wurde (Derler et al. 2013). Hier zeigte sich zudem eine weitere STIM1-Bindungsstelle mit geringerer Affinität, die aber nicht zwingend für die STIM1-abhängige Aktivierung erforderlich ist (McNally et al. 2013; Zhou et al. 2016; Li et al. 2007; Zheng et al. 2013; Zhou et al. 2017; Gudlur und Hogan 2017; Derler et al. 2013). Interessanterweise konnte N-terminal eine Calmodulin-bindende Domäne gefunden werden. Die Bindung dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorproteins zeigte einen Zusammenhang mit der schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Inaktivierung (Mullins et al. 2009; Litjens et al. 2004).



**Abb. 1: Schematischer Aufbau von Orai1** nach Gudlur und Hogan (2017). Das Orai1 Monomer besitzt vier Transmembranhelices (TM1-TM4). Beide Termini befinden sich intrazellulär. Die bisher bekannte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle ist am C-terminalen Ende der TM1 lokalisiert (E106). Die mutmaßliche STIM-Bindungsregion ist C-terminal der TM4 gelegen. Eine Missense-Mutation in R91 führt zum schweren kombinierten Immundefekt (SCID) (siehe 1.3.3.5). Dieser Locus wird vermutlich für die STIM-abhängige Aktivierung benötigt und Gating-Region genannt (Zhang et al. 2011).

### 1.3.3.3 Stromales Interaktionsmolekül (STIM)

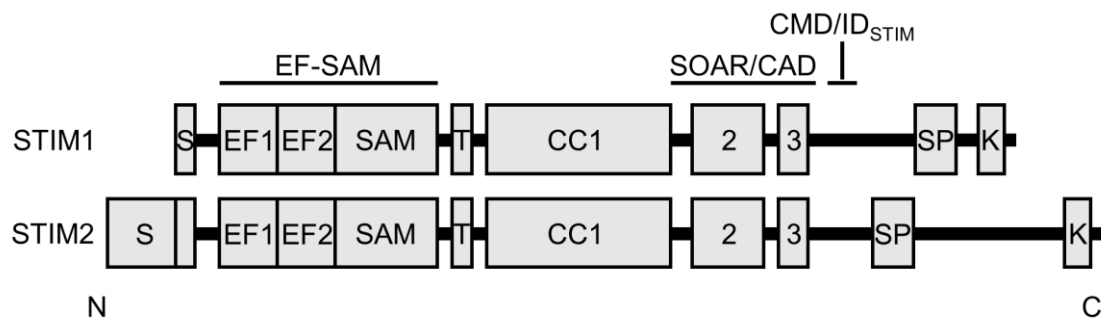
STIM1 ist ein Transmembranprotein des ER/SR, das als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorprotein fungiert und Orai aktiviert (Liou et al. 2005; Roos et al. 2005; Zhang et al. 2005b). Vertebraten exprimieren ebenfalls die Isoform STIM2, die bei einer sequenziellen Ähnlichkeit von 66 % in ihrer Funktion von STIM1 differiert (Cai 2007; Collins und Meyer 2011; Williams et al. 2001). Während STIM1 aus 685 Aminosäuren besteht, ist STIM2 nochmals um 61 Aminosäuren länger (Williams et al. 2001).

Die STIM-Proteine bestehen aus einer Typ I „single pass“ Transmembrandomäne, einem luminalen N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus (Dziadek und Johnstone 2007; Williams et al. 2001). Im Ruhezustand tritt STIM1 regelhaft als Dimer auf (Muik et al. 2009; Covington et al. 2010; Yang et al. 2012). Es bewegt sich entlang von Mikrotubuli fort und verteilt sich im Ruhezustand homogen (Baba et al. 2006).

N-terminal weist es ein Signalpeptid und eine EF-Hand-Domäne auf. Letztere besteht aus einem Helix-Loop-Helix-Motiv und bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Persechini et

al. 1989; Liou et al. 2005). Ihr liegt benachbart eine weitere, atypische EF-Hand an, die keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bindet (Stathopoulos et al. 2008). Darauf folgt ein Steriles-Alpha-Motiv (SAM), an welches sich später die Transmembrandomäne anschließt (Williams et al. 2001). Der Komplex aus EF-Hand und SAM wird als EF-SAM-Domäne bezeichnet und bildet die funktionelle Einheit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensors. Die atypische EF-Hand beeinträchtigt dabei die Stabilität der EF-SAM Domäne. Sie ermöglicht die Funktion als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor, indem sie eine relativ niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität bewirkt, wodurch bereits geringe Abweichungen der hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des ER/SR detektiert werden können (Stathopoulos et al. 2006; Stathopoulos et al. 2008).

Die zytoplasmatische, C-terminale Seite weist in beiden Isoformen drei nahezu identische Doppelwendelstrukturen (engl. „coiled coil“, CC1 - 3) auf (Soboloff et al. 2006b). Mit der STIM1-Orai-Aktivierungsregion (SOAR, Aminosäuren 344 - 442) bzw. der CRAC-Aktivierungsdomäne (CAD, Aminosäuren 342 - 448) charakterisierten Yuan et al. sowie Park et al. Sequenzen der Region, die ausreichen, um Orai vollständig zu aktivieren. SOAR/CAD folgt der CC1-Domäne und schließt CC2 und CC3 ein (Park et al. 2009; Yuan et al. 2009). Nach Mutationen in SOAR war eine Kolo-kalisation von STIM1 mit Orai noch möglich, die Aktivierung von Orai wurde jedoch verhindert (Yuan et al. 2009). CC1 und SOAR sind im Ruhezustand aneinander gebunden und geben bei Aktivierung ihre Bindestellen frei (Ma et al. 2015; Zhou et al. 2013). Weiter C-terminal folgt die CRAC-modulierende Domäne (CMD, AS 474 - 485) bzw. Inaktivierungsdomäne von STIM ( $\text{ID}_{\text{STIM}}$ , AS 470 - 491), die eine schnelle,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung von CRAC-Kanälen ermöglicht (Derler et al. 2009; Lee et al. 2009; Mullins et al. 2009). Im distalen C-terminalen Bereich divergieren die Sequenzen beider Homologe deutlich voneinander (Williams et al. 2001) (Abb. 2).



**Abb. 2: Vergleich der gemeinsamen Domänen in STIM1 und STIM2 (schematisch).** Das N-terminale Ende ist im Lumen des ER lokalisiert und beinhaltet ein Signalpeptid (S). Ihm folgt die EF-SAM-Domäne, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bindet und aus einer typischen (EF1) und atypischen (EF2) EF-Hand-Domäne sowie einer Steriles-Alpha-Motiv (SAM) Domäne besteht. Eine Typ I single pass Transmembrandomäne (T) trennt diese von der zytosolischen Seite. Diese beinhaltet in beiden Isoformen drei coiled-coil Regionen (CC1 - 3). In diesem Bereich befindet sich die STIM1-Orai-Aktivierungsregion (SOAR) bzw. CRAC-Aktivierungsdomäne (CAD). Für die schnelle Inaktivierung ist die CRAC-modulierende-Domäne (CMD) oder Inaktivierungsdomäne von STIM ( $\text{ID}_{\text{STIM}}$ ) verantwortlich. Weiter C-terminal liegen größere strukturelle Abweichungen zwischen den beiden Isoformen. Gemeinsamkeiten sind in jeweils einer Serin/Prolin-reichen (SP) und Lysin-reichen (K) Region zu finden (nach Zhu et al. 2017).

STIM2 besitzt im Gegensatz zu STIM1 eine niedrigere Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und wird somit bereits bei einem geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Abfall aktiviert (Brandman et al. 2007; Zhang et al. 2011). Dadurch ist es vorwiegend an der Erhaltung der basalen zytosolischen und endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beteiligt. Bereits in Ruhe zeigt STIM2 eine messbare basale Aktivität (Soboloff et al. 2006a; Brandman et al. 2007). Ein Ausschalten von STIM2 führte zu verringerten basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im ER und Zytosol (Brandman et al. 2007; Bird et al. 2009). Die Überexpression von STIM2 verminderte STIM1-vermitteltes SOCE erheblich und impliziert, dass STIM2 ein deutlich schwächerer CRAC-Kanal-Aktivator ist (Soboloff et al. 2006b; Dupont et al. 2011; Bird et al. 2009). Während ein geringer Anteil von STIM1 auch in der Plasmamembran nachgewiesen wurde, kommt STIM2 ausschließlich in der endoplasmatischen Membran vor (Stathopoulos et al. 2006; Soboloff et al. 2012; Williams et al. 2001; Manji et al. 2000).

#### 1.3.3.4 Aktivierung des speicherabhängigen Kalziumeinstroms (SOCE)

Werden Orai und STIM überexprimiert, so vervielfacht sich  $I_{\text{CRAC}}$ . Sie stellten sich als die einzigen unmittelbar limitierenden Proteine im SOCE heraus (Peinelt et al. 2006; Soboloff et al. 2006a; Mercer et al. 2006).

STIM fungiert als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorprotein und initialisiert den SOCE. Der Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER/SR führt zur Aktivierung von STIM. Zunächst löst sich dabei die alpha-Helix-reiche Form der endoplasmatischen EF-SAM-Domäne unter Aufspaltung der intramolekularen Interaktion zwischen EF-Hand und SAM-Domäne. Dies führt zur Destabilisierung und partiellen Entfaltung der Domäne und zur ersten Oligomerisierung der STIM-Moleküle (Stathopoulos et al. 2008; Ma et al. 2015; Covington et al. 2010; Stathopoulos et al. 2006). Während die N-Termini sich durch die Aktivierung annähern, erfährt die Transmembrandomäne Konformationsänderungen (Zheng et al. 2013). Sie erhöht, wahrscheinlich durch Bildung einer Coiled-Coil Formation, die Helizität der CC1-Domäne. Dadurch nähern sich die C-Termini der Plasmamembran an (Ma et al. 2015; Zhou et al. 2013). Die Bindung von CC1 mit SOAR löst sich dabei, sodass beide Domänen freigelegt werden (Ma et al. 2015; Zhou et al. 2013). Über die freigelegten Bindungsstellen erfolgt die weitere Aggregation und Stabilisierung der STIM-Oligomere (Stathopoulos et al. 2008; Ma et al. 2015; Covington et al. 2010; Li et al. 2007).

Während STIM1 im Ruhezustand ubiquitär in der Membran des ER verteilt ist, akkumulieren die STIM-Oligomere nach Aktivierung an der juxtamembranären ER-Region unter Bildung von Ansammlungszonen, sogenannten „Puncta“ (Baba et al. 2006; Liou et al. 2005; Liou et al. 2007). Die STIM-Moleküle grenzen damit unmittelbar der Plasmamembran an, ohne in diese einzudringen (Xu et al. 2006; Mercer et al. 2006).

An den STIM1 Puncta werden nachfolgend Orai1 Untereinheiten der Plasmamembran rekrutiert (Liou et al. 2007; Xu et al. 2006). Die Freilegung von SOAR ermöglicht die Bindung mit der CC-Domäne im C-Terminus von Orai1, welches dadurch aktiviert wird. Die CC2-Domänen eines STIM1-Dimers werden voneinander getrennt, wodurch hier die C-terminale CC-Domäne von Orai1 gebunden werden kann (Calloway et al. 2010; Stathopoulos et al. 2013; Korzeniowski et al. 2017). Die Bindung von STIM1 an den C-Terminus von Orai führt zur Konformationsänderung des C-terminalen Bindegliedes von Orai1 und leitet so das Aktivierungssignal an die Transmembranhelices weiter (Zhou et al. 2016).

Zum Öffnungsmechanismus der CRAC-Kanäle gibt es mehrere Theorien. McNally et al. beobachteten, dass die Pore des Kanals durch eine hydrophobe Barriere an der Stelle V102 verschlossen ist. Diese verliert ihre Stabilität nach Aktivierung und gibt die Kanalöffnung frei (McNally et al. 2012). Andere Studien zeigten hingegen, dass sich die Porenöffnung selbst durch Konformitätsänderung weitet, sodass Wassermoleküle in die hydrophobe Pore eindringen können und der Durchtritt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ermöglicht wird. Einige Untersuchungen zeigten Hinweise, dass die Kanalöffnung dabei mit einer Rotationsbewegung verbunden ist (Shim et al. 2015; Dong et al. 2019; Yamashita et al. 2017; Liu et al. 2019; Frischauf et al. 2017). Der exakte Mechanismus der Porenöffnung bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung.

Die Aktivität des SOCE wird durch das Verhältnis von STIM1 zu Orai bestimmt. Der höchste  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ( $I_{\text{CRAC}}$ ) konnte bei einem STIM1-Orai Verhältnis von 2:1 beobachtet werden. Somit schloss man unter der damaligen Annahme eines tetramer aufgebautem CRAC-Kanals auf ein Optimum von acht STIM1-Molekülen pro CRAC-Kanal (Li et al. 2011a; Hoover und Lewis 2011). Bei einem Verhältnis von 1:1 hingegen wurde ein verringerter  $I_{\text{CRAC}}$ , aber auch eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität beobachtet (McNally et al. 2012). Stathopoulos et al. favorisierten jedoch nach Kernspinresonanz-Untersuchungen das Modell einer STIM1-Orai-Interaktion im 1:1 Verhältnis (Stathopoulos et al. 2013). Das genaue Verhältnis bleibt auch nach aktueller Studienlage diskussionswürdig und ist bislang nicht abschließend geklärt (Fahrner et al. 2017; Nwokonko et al. 2017).

STIM und Orai sind die zentralen Bausteine des SOCE. Neuere Forschungsergebnisse weisen zunehmend darauf hin, dass weitere Akteure in Zusammenhang mit dem SOCE stehen. In erster Linie ist das die Familie der kanonischen transienten Rezeptorpotential-Kanäle (engl. „transient receptor potential canonical channel“, TRPC), die ursprünglich mit speicherabhängigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom assoziiert wurden und lange vor Orai bekannt waren (Cheng et al. 2013). Jedoch zeigen TRPC selbst keinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der dem  $I_{\text{CRAC}}$  entspricht. TRPC sind im Gegensatz zu Orai1 relativ unselektive Kationenkanäle. Nur manche Typen wie der TRPC1 werden  $\text{Ca}^{2+}$ -speicherabhängig aktiviert (Venkatchalam und Montell 2007). STIM1 aktiviert TRPC1-Kanäle, nachdem diese

abhängig von Orai1 in die Plasmamembran integriert wurden. Bezüglich ihrer Funktion und molekularen Interaktion bleiben jedoch noch viele Fragen offen (Ong und Ambudkar 2017).

#### 1.3.3.5 Funktion des speicherabhängigen Kalziumeinstroms

Der SOCE ist ein wichtiger Bestandteil physiologischer Prozesse innerhalb der Zelle. Er reguliert den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt und spielt eine Schlüsselrolle in  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerten Signalwegen. Seine Auswirkungen sind vielfältig und von der Art der Zelle abhängig (Hogan und Rao 2015).

Gut untersucht sind die Folgen von defektem SOCE in einer hereditären Form des schweren kombinierten Immundefekts (engl. „severe combined immunodeficiency“, SCID). Durch eine R91W-Mutation in Orai1 kommt es zu einem totalen Ausfall des SOCE in T-Zellen, B-Zellen und Fibroblasten (Feske et al. 2001; Feske et al. 2005; Feske et al. 2006; Rosado 2017). Andere Funktionsverlust-Mutationen von Orai1 oder STIM1 führen ebenfalls zu einem Immundefekt (McCarl et al. 2009; Feske et al. 2010). T-Lymphozyten sind durch ein geringeres Volumen des ER besonders auf den SOCE angewiesen (Srikanth et al. 2017). Charakteristisch sind Signalwege über  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, die infolge einer Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (engl. „T cell receptor“, TCR) unter Beteiligung von CRAC-Kanälen innerhalb lokaler Mikrodomänen ausgelöst werden (Dolmetsch und Lewis 1994; Kar et al. 2011). Abhängig von Amplitude und Dauer der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Veränderungen werden nachfolgend proinflammatorische Transkriptionsfaktoren aktiviert, hierunter vor allem  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT), Nukleärer Faktor Kappa B (engl. „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“, NF $\kappa$ B) und c-Jun N-terminale Kinasen (Dolmetsch et al. 1997). Durch die Verhinderung des SOCE bleiben  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen aus. Dies führt wiederum durch fehlende Aktivierung von NFAT zu erheblichen Störungen der Zytokinproduktion, Zellreifung und -differenzierung, des Zellzyklus-Arrests und Zelltodes (Srikanth et al. 2017; Macian 2005). Das Resultat ist eine schwere Beeinträchtigung der Immunabwehr und Infekte mit letalem Ausgang meist im ersten Lebensjahr, sofern nicht frühzeitig eine Stammzelltransplantation durchgeführt wird. Durch eine gestörte Negativselektion während der Immunzellreifung werden auch vermehrt auto-

immune Prozesse beobachtet. Betroffene Patienten leiden zusätzlich häufig an Muskelschwäche und ektodermalen Dysplasien wie gestörter Zahnschmelzreifeung oder Anhydrose. (Lacruz und Feske 2015).

Störungen im SOCE sind mit Muskelschwäche verbunden. Infolge von Funktionsverlust-Mutationen in STIM1 oder Orai1 kommt es bei Knockout-Mäusen und betroffenen Patienten zu einer verringerten Masse quergestreifter Muskulatur. Ähnlich wie bei Immunzellen ist auch die Myogenese gestört. Durch die effiziente Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im SR ist die Kontraktilität gewährleistet, aufgrund des defekten SOCE jedoch der Muskeltonus herabgesetzt und die Ermüdung erhöht (Lacruz und Feske 2015; Cho et al. 2017; Wei-Lapierre et al. 2013). Kommt es hingegen zu einer Daueraktivität von STIM1 oder Orai1, konnte eine Myopathie mit tubulären Aggregaten beobachtet werden. (Bohm et al. 2013; Endo et al. 2015). Die kardiale Muskulatur wird von STIM1 und Orai1 in ihrer elektromechanischen Aktivität reguliert. Hierbei ist jedoch fraglich, ob STIM1 diese Effekte tatsächlich durch den SOCE steuert (Avila-Medina et al. 2018; Zhang et al. 2015; Zhao et al. 2015). Die glatte Muskulatur zeigt bislang ein sehr heterogenes Bild. Zumindest in einigen Teilen vaskulärer, gastrointestinaler oder genitaler glatter Muskulatur reguliert der SOCE Proliferation, Umbau und/oder Kontraktilität der Zellen (Feldman et al. 2017).

Der SOCE ist ebenfalls an Sekretionsmechanismen von Zellen beteiligt. In Epithelzellen der Atemwege bei zystischer Fibrose ist der SOCE pathologisch gesteigert, wodurch über die Sekretion des Zytokins Interleukin-8 die Inflammation in den Atemwegen erhöht wird (Balghi et al. 2011). Der SOCE fördert zudem die Glukose-stimulierte Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und ist im Typ-2-Diabetes gestört (Sabourin et al. 2015; Kono et al. 2018). Störungen des SOCE beeinträchtigen die Chlorid-Sekretion und Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanals Anoctamin1, mit der Folge einer Anhydrose (Concepcion et al. 2016). Darüber hinaus fördert Orai1 die an der Laktation beteiligten Vorgänge (Davis et al. 2015)

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spielen auch für die Funktion von Thrombozyten eine entscheidende Rolle. STIM1 und Orai1 sind erforderlich für essenzielle Vorgänge in der



Thrombozytenaktivierung einschließlich der Aktivierung von Integrin, der Degranulierung und der Exposition von Phosphatidylserin (Bergmeier et al. 2009; Braun et al. 2009; Varga-Szabo et al. 2008). Störungen der STIM1- oder Orai1-Expression schränken die Plättchenaggregation deutlich ein und führen zu autoimmunbedingter Thrombozytopenie (Galán et al. 2009; Gilio et al. 2010; Picard et al. 2009). Gleichzeitig schützt ein Defekt von STIM1 oder Orai1 vor der Formation thromboembolischer Ereignisse bei nur milder Prolongation der Blutungszeit (Varga-Szabo et al. 2008; Braun et al. 2009). Gain-of-Function-Mutationen (engl., Funktionsgewinn-Mutationen) von STIM1 im Stormoken-Syndrom oder York-Thrombozyten-Syndrom führen über erhöhtes basales  $[Ca^{2+}]_i$  zu vorzeitiger Plättchenaktivierung mit Folge einer Thrombozytopenie und milder Blutungsneigung. (Singh et al. 2015; Misceo et al. 2014; Markello et al. 2015).

Neuronen gehören zu den erregbaren Zellen, in denen spezifische Ionenkanäle für eine schnelle Signaltransduktion sorgen. Daher ging man zunächst davon aus, dass hier, im Gegensatz zu den nicht erregbaren Zellen, der SOCE keine wesentliche Rolle spielt. Es erwies sich jedoch, dass verschiedene Funktionen in Neuronen vom SOCE und seinen Komponenten abhängen (Bollimuntha et al. 2017). Bereits in der Entwicklungsphase zeigt sich ihre besondere Bedeutung. In neuronalen Vorläuferzellen kommt es zur SOCE-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT, welche ihre Genexpression und Proliferation regulieren (Somasundaram et al. 2014). Zusätzlich sind STIM1 und TRPC1 relevante Faktoren bei der axonalen Ausreifung und Steuerung des axonalen Wachstumskegels (Mitchell et al. 2012; Wang und Poo 2005; Shim et al. 2013). Es wird vermutet, dass STIM1 und Orai1 in Zusammenspiel mit Synaptopodin die neuronale Plastizität steuern (Korkotian et al. 2014; Majewski und Kuznicki 2015). Ferner inhibiert STIM1 L-Typ spannungsgesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle über einen direkten Mechanismus unabhängig von Orai (Moreno und Vaca 2011; Park et al. 2010). Verletzte Nervenzellen sind besonders auf den SOCE angewiesen zur Erhaltung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Haushaltes und zu ihrer Regeneration (Gemes et al. 2011).

Der SOCE ist erforderlich bei der Fertilisierung von Oozyten. Eine Dysregulation von Orai1 oder STIM1 beeinträchtigt die notwendigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, die durch das befruchtende Spermium induziert werden. Folglich wird die Entwicklung zu den Blastozysten erheblich gestört (Wang et al. 2012; Lee et al. 2012; Machaty et al. 2017).

Der SOCE fördert das Überleben von Zellen. Die Hemmung des SOCE durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) induziert in humanen Fibroblasten und Neuronen die Apoptose. Defektes Chorein in Fibroblasten und Neuronen von ChAc-Patienten führt zu ähnlichen Ergebnissen (Pelzl et al. 2017b; Pelzl et al. 2017a). Dies trifft auch auf viele Tumorzellen zu (s. 1.4).

#### 1.4 Speicherabhängiger Kalziumeinstrom in Tumorzellen

Viele maligne Tumore weisen eine Erhöhung der STIM1- und Orai1-Expression sowie einer gesteigerten Aktivität des SOCE auf (Wen et al. 2016; Motiani et al. 2013; Schmidt et al. 2014a). Manche Tumore wie einige Brustkrebs-Zelllinien, das klarzellige Nierenzellkarzinom oder das Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (engl. „Esophageal squamous cell carcinoma“, ESCC) überexprimieren Orai1, aber nicht STIM1 (Yang et al. 2009; Zhu et al. 2014). In einigen Tumoren wie dem hepatozellulären Karzinom zeigte sich hingegen eine Überexpression von STIM1 bei unveränderter Orai1-Expression (Yang et al. 2013a).

Der SOCE erweist sich in Tumorzellen als wichtige Voraussetzung für die Kennzeichen von Krebs (Fiorio Pla et al. 2016). Die gesteigerte Aktivität des SOCE und die erhöhte Expression von Orai und/oder STIM korreliert dabei auch direkt mit einem fortgeschritteneren Tumorstadium und einer schlechteren Prognose (Zhu et al. 2014; Chen et al. 2011). Zudem konnte eine gesteigerte Therapieresistenz beobachtet werden (Kondratska et al. 2014; Schmidt et al. 2014a).

Der SOCE fördert die Proliferation. Eine Verringerung von Orai1 und/oder STIM1 in Glioblastom- (Liu et al. 2011; Motiani et al. 2013), Melanom- (Umemura et al. 2014), Rhabdomyosarkom- (Schmid et al. 2016) und ESCC-Zellen (Zhu et al. 2014) führte zu einer signifikanten Einschränkung der Zellproliferation mit Verlängerung der Verdoppelungszeit. Der Knockdown von STIM1 hält den Zell-

zyklus von Zervixkarzinom-Zellen in der S- und G<sub>2</sub>/M-Phase an (Chen et al. 2011). In vivo führte die Hemmung der Orai1-Expression durch RNA-Interferenz zum verlangsamten Wachstum von ESCC in Mäusen (Zhu et al. 2014). Eine Überexpression von STIM1 in Zervixkarzinom-Zellen förderte Tumorwachstum, lokale Ausbreitung und Angiogenese im Mausmodell (Chen et al. 2011).

Der SOCE kann das Überleben von Zellen erhöhen (vgl. 1.3.3.5). So führt in Adenokarzinomzellen des Pankreas die Behandlung mit den Zytostatika 5-Fluorouracil oder Gemcitabin zu einer reaktiven Steigerung des SOCE durch Erhöhung der Orai1- und STIM1-Expression. Die Hemmung des SOCE erhöhte hingegen die Apoptoserate (Kondratska et al. 2014). Auf ähnliche Weise ist die Cisplatin-Resistenz beim A2780 Ovarialkarzinom mit einem gesteigertem SOCE verbunden (Schmidt et al. 2014a). Die Hemmung der Orai1- oder STIM1-Expression zeigte zudem eine gehäufte Apoptose in Glioblastomzellen (Liu et al. 2011). Die antiapoptotische Wirkung des SOCE gilt allerdings nicht uneingeschränkt, in Prostatakarzinom-Zellen wurde beispielsweise der gegenteilige Effekt beobachtet. Dort führte Orai1 zu einer gesteigerten Apoptoserate und höherer Anfälligkeit gegenüber Cisplatin oder Oxaliplatin (Flourakis et al. 2010).

Der SOCE fördert darüber hinaus die Fähigkeit zur Invasion und Migration und damit das invasive Wachstum und die Metastasierung von Tumorzellen. Die verminderte Expression von Orai1 oder STIM1 sowie die pharmakologische Blockade des SOCE inhibierte die Invasion und Migration von Zelllinien des humanen Glioblastoms (Motiani et al. 2013), hepatozellulären Karzinoms (Yang et al. 2013a), Kolonkarzinoms (Sobradillo et al. 2014), Rhabdomyosarkoms (Schmid et al. 2016), Melanoms (Stanisz et al. 2014) und ESCC (Zhu et al. 2014). In vivo reduzierte die Blockade des SOCE die Metastasierung der Zellen des Brustkrebs- und Zervixkarzinoms und des Malignen Melanoms im Mausmodell (Yang et al. 2009; Umemura et al. 2014; Chen et al. 2011). Die Inhibition des SOCE verminderte die Dynamik fokaler Adhäsionen, welche für die Zellmigration erforderlich ist (Webb et al. 2002; Yang et al. 2009; Yang et al. 2013a; Chen et al. 2011). In ESCC-Zellen war die Störung der Invasions- und Migrationsfähigkeit Folge einer Verminderung der migrationsfördernden Proteine Vi-

mentin und Rac1 (engl. „Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1“) sowie Hochregulation des Zelladhäsionsrezeptors E-Cadherin (Jeanes et al. 2008; Margiotta et al. 2017; Zhu et al. 2014).

Der SOCE beteiligt sich zudem an Mechanismen der Angiogenese. STIM1 stimuliert die Angiogenese beim Zervixkarzinom und erhöht die Produktion des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF, engl. „Vascular Endothelial Growth Factor“) (Chen et al. 2011). Interessanterweise fördern Orai1 und STIM1 auch in endothelialen Zellen selbst die Angiogenese und sind in endothelialen Progenitorzellen von Nierenzellkarzinom-Patienten erhöht (Li et al. 2011b; Lodola et al. 2012).

### 1.5 Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1)

Die Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1) ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, die die Expression von STIM1 und Orai1 stimuliert. Sie hat eine Größe von 49 kDa und ähnelt in ihrer katalytischen Domäne zu 45 - 55 % weiteren Kinasen wie der Proteinkinase B (PKB, auch Akt), Proteinkinase C, Ribosomale S6-Kinase und Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängige Proteinkinase (Kobayashi et al. 1999; Waldegger et al. 1997; Webster et al. 1993). Die SGK1 wird in allen getesteten humanen Zellen exprimiert (Lang et al. 2006; Waldegger et al. 1997). Darüber hinaus existieren zwei weitere Isoformen (SGK2 und SGK3), deren katalytische Domäne zu 80 % übereinstimmt (Kobayashi et al. 1999).

Die SGK-Subfamilie wurde erstmals in Brustkrebszellen der Ratte entdeckt. Nach Zugabe von Serum oder eines Glukokortikoids wurde sie vermehrt exprimiert, wonach sie benannt wurde (Webster et al. 1993). In humanen Zellen reagierte die SGK1 zudem auf Veränderungen des Zellvolumens (Waldegger et al. 1997; Lang et al. 2006).

SGK1-Knockout-Mäuse weisen keine schweren Phänotypen auf. Somit ist davon auszugehen, dass SGK1 nicht absolut essenziell ist bzw. ihre Funktion durch ihre Isoformen sowie der PKB zumindest teilweise kompensiert werden kann. Zahlreiche zellphysiologische Untersuchungen zeigen, dass die SGK1

dennoch an einem breiten Spektrum zellulärer Funktionen beteiligt ist (Wulff et al. 2002; Lang et al. 2006).

Die SGK1 reagiert auf zahlreiche Hormone, Mediatoren und Veränderungen des Zellzustandes. Der Einfluss auf die Kinase erfolgt auf den Ebenen der Transkription, der Aktivierung (Phosphorylierung) und des Abbaus (Lang et al. 2006).

Zu den Hormonen und Zytokinen, die die SGK1 stimulieren, gehören die Glukokortikoide (Webster et al. 1993), Mineralokortikoide (Bhargava et al. 2001), Gonadotropine (Gonzalez-Robayna et al. 2000), 1,25-Dihydroxivitamin D3 (Akutsu et al. 2001), Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (engl. „transforming growth factor- $\beta$ “, TGF- $\beta$ ) (Waldegger et al. 1999), Interleukin-6 (Meng et al. 2005), fibroblastäre und thrombozytäre Wachstumsfaktoren (Mizuno und Nishida 2001), Thrombin (BelAiba et al. 2006), Endothelin (Wolf et al. 2006) und weitere (Lang et al. 2006). Sie stimulieren die SGK1 auf der Transkriptionsebene. Die Transkription wird außerdem durch die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und bei Schädigung der Zelle stimuliert. So konnte bei Ischämien (Nishida et al. 2004; Feng et al. 2006), mechanischer Läsion und Wundheilung (Iyer et al. 1999) sowie fibrosierenden Prozessen (Fillon et al. 2002; Klingel et al. 2000; Terada et al. 2008; Vallon et al. 2006) eine deutlich erhöhte SGK1-Menge nachgewiesen werden (Lang et al. 2006; Klingel et al. 2000). Darüber hinaus kommt es bei Belastung der Zelle durch UV-Bestrahlung, oxidativem Stress oder Hitzeschock zu einer reaktiven Überexpression der SGK1, welche die Zellen vor dem stressinduzierten Zelltod schützt (Leong et al. 2003).

Der Abbau der SGK1 erfolgt durch Ubiquitylierung und folglich proteasomaler Degradierung. Die verantwortliche Ubiquitinligase Nedd4-2 (engl. „neural precursor cell expressed developmentally down-regulated (gene) 4-2“) wird unter anderem durch die SGK1 selbst gesteuert, sodass ein negativer Feedback-Mechanismus entsteht (Lang et al. 2006; Zhou und Snyder 2005; Brickley et al. 2002).

Die Aktivierung der SGK1 erfolgt durch Phosphorylierung. Der bekannteste Mechanismus ist die Phosphorylierung an den Stellen Thr256 und Ser422. Diese

erfolgt durch die 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (engl. „3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1“, PDK1) und PDK2 respektive dem mTOR Komplex 2 (mTORC2; mTOR: engl. „mechanistic (mammalian) Target of Rapamycin“) und macht die SGK1 somit zu einem Zielprotein des PI3K-Signalweges (García-Martínez und Alessi 2008; Park et al. 1999; Di Cristofano 2017; Kobayashi und Cohen 1999). Abhängig vom Auslöser transloziert SGK1 nach Aktivierung in den Nucleus oder verbleibt im Zytosol (Brunet et al. 2001; Lang et al. 2006).

Die SGK1 steuert eine Vielzahl an Ionenkanälen, Transportern, Pumpen, Transkriptionsfaktoren und die Aktivität von Enzymen sowie Zellvolumen, -proliferation und Apoptose. Dabei vermittelt sie ihre Effekte durch direkte Bindung oder über weitere nachgeschaltete Proteine. Durch das weite Spektrum beeinflusst sie verschiedenste physiologische Vorgänge wie den Metabolismus sowie das renale, gastrointestinale, kardiovaskuläre, bronchopulmonale, neuromuskuläre und sensorische System (Lang et al. 2006; Fillon et al. 2001; Lang et al. 2005; Lang et al. 2003).

In Tumorzellen konnte eine onkogene Wirkung der SGK1 gezeigt werden. Sie ist insbesondere im fortgeschrittenen Stadium einiger Tumorzellen deutlich erhöht, beispielsweise im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Abbruzzese et al. 2012), Glioblastom (Talarico et al. 2016b), Mamma- (Zhang et al. 2005a), Prostata- (Isikbay et al. 2014), hepatozellulärem (Chung et al. 2002) oder kolorektalem Karzinom (Liang et al. 2017). Die Hochregulierung der SGK1 fördert das Überleben und die Proliferation der Zellen sowie die epitheliale Entdifferenzierung und Migration (Amato et al. 2009; Liang et al. 2017; Lang und Stournaras 2013). Sie vermindert die Sensibilität gegenüber oxidativem Stress und ist beteiligt an Resistenzmechanismen gegenüber Krebstherapien (Talarico et al. 2016b; Conza et al. 2017; Talarico et al. 2016a). So senkt die SGK1 beispielsweise in Glioblastomzellen die Strahlensensibilität (Talarico et al. 2016b). In Nierenkarzinomzellen ist sie für die Interleukin-2-vermittelte Doxorubicin-Resistenz erforderlich (Amato et al. 2007). Zudem hemmt sie die 5-Fluoruracil-induzierte Apoptose in Zellen des kolorektalen Karzinoms (Liang et al. 2017). In MCF-7 (engl. „Michigan Cancer Foundation - 7“) Brustkrebszellen erhöhte die

Inhibition von SGK1 die funktionale Membran-Androgenrezeptor (mAR)-getriggerte Apoptose (Liu et al. 2015). Auch in nicht-tumoralem Gewebe hat die SGK1 eine überlebensfördernde Funktion und wird bei Ischämien in Gehirn oder Nieren reaktiv vermehrt gebildet (Nishida et al. 2004). Bei renaler Ischämie wirkt sie nephroprotektiv durch die Aktivierung der Autophagie als Reparaturmechanismus (Xie et al. 2018). SGK1 fördert die Resistenz gegenüber äußerer Einflüsse wie UV-Strahlung, oxidativem Stress und Überwärmung (Leong et al. 2003). Die antiapoptotische Wirkung der SGK1 erfolgt über zahlreiche Mechanismen, darunter die Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren Forkhead-Box-Protein O3 (Foxo3a) und p53. Darüber hinaus aktiviert sie den Nukleären Faktor kappa B (engl. „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“, NFκB) (Liu et al. 2017; Endo et al. 2011; Zhang et al. 2005a; Lang et al. 2010).

#### 1.5.1 Nukleärer Faktor kappa B (NFκB)

NFκB ist eine Familie homo- und heterodimerer Transkriptionsfaktoren, zu welcher fünf Proteine gehören: p65/RelA, RelB, cRel, p50/p105 (NFκB1) und p52/p100 (NFκB2) (Hayden und Ghosh 2004). Ihnen ist die N-terminale Rel-Homologie-Domäne gemein, die für die Dimerisierung verantwortlich ist (Hayden und Ghosh 2008). Die am häufigsten anzutreffende Form ist das p50/65 Heterodimer (Siebenlist et al. 1994). Im Ruhezustand liegen die NFκB-Dimere an Inhibitoren von NFκB (IκB) gebunden im Zytosol vor. Die IκB verhindern die Translokation in den Zellkern bzw. die Bindung an Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Huxford et al. 1998). Klassischerweise erfolgt die Aktivierung durch Phosphorylierung der IκB-Proteine durch die IκB-Kinase (IKK), welche die Ubiquitylierung der IκB und den Abbau durch Proteasome zur Folge hat. Folglich wird die Translokation von NFκB in den Zellkern ermöglicht, wo sie die Transkription von Zielgenen aktiviert (Oeckinghaus und Ghosh 2009). Durch reaktive Transkription und Stabilisierung von IκBα wird ein negativer Feedbackmechanismus sichergestellt (Place et al. 2001; Hoffmann et al. 2002).

NFκB steuert eine immer länger werdende Liste an Genen, die vitale zelluläre Funktionen wie die Immunantwort, inflammatorische Prozesse, Apoptose,

Proliferation, das Zellwachstum und Überleben steuert (Mitchell et al. 2016; Pahl 1999; Oeckinghaus und Ghosh 2009).

Die SGK1 aktiviert NFκB mittels direkter und indirekter Phosphorylierung von IKKα/β und IκBα (Borst et al. 2012; Leroy et al. 2009). Ein Mechanismus ist die Phosphorylierung von IKKβ an der Stelle Ser-177/181 (Zhang et al. 2005a). Zusätzlich kann SGK1 auch IKKα direkt an Thr-23 und indirekt an Ser-180 phosphorylieren. Darüber hinaus erhöht sie die Acetylierung von NFκB, welche ebenfalls die Aktivierung zur Folge hat (Tai et al. 2009).

#### 1.5.2 Steuerung des speicherabhängigen Kalziumeinstroms

SGK1 beeinflusst den SOCE. Dauerhaft aktive SGK1 fördert den SOCE durch vermehrte Transkription von Orai1 und STIM1, während sie in *sgk1(-/-)* Knockout-Mäusen und nach Behandlung mit dem SGK1-Inhibitor GSK650394 vermindert ausfällt (Borst et al. 2012; Eylestein et al. 2012; Eylestein et al. 2011). NFκB ist hieran maßgeblich beteiligt. So wurden die positiven Effekte von SGK1 auf den SOCE durch den NFκB-Inhibitor Wogonin oder den IKK-Inhibitor BMS-345541 verhindert. Eine Überexpression der NFκB-Dimere p65/p50 oder p65/p52 alleine führte hingegen zur Erhöhung der Orai1- und STIM1-Transkripte sowie des SOCE und imitierte damit die durch SGK1 induzierte Wirkung (Eylestein et al. 2012; Borst et al. 2012). Zusätzlich verhindert die SGK1 die Ubiquitylierung und Abbau von Orai1 durch eine negative Regulation der Ubiquitinligase Nedd4-2 (Eylestein et al. 2011).



## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Chorein auf den speicherabhängigen Kalziumeinstrom (SOCE) in Krebszellen zu untersuchen.

Es war bekannt, dass Chorein für Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt: Das Fehlen von Chorein kann das Überleben von Tumorzellen verringern und beeinträchtigt damit eine der grundlegenden Voraussetzungen für Krebszellen (Honisch et al. 2015a; Föllner et al. 2012). Hierbei beeinflusst Chorein die Proteine PI3K, BCL-2 und Bax. Über die PI3K reguliert Chorein zudem das Zytoskelett (vgl. Abschnitt 1.1.2). Wir postulierten, dass Chorein, möglicherweise ebenfalls durch die PI3K, auf weitere Krebs-assoziierte Funktionen Einfluss nimmt.

Für die Entwicklung von Krebszellen ist die Veränderung grundlegender Zellprozesse erforderlich. Unter ihnen ist der SOCE, ein wichtiger Bestandteil des fein regulierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes, der das Überleben, die Proliferation, Invasion, Migration und Angiogenese von Tumorzellen fördern kann. Die Hauptbestandteile des SOCE sind das  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorprotein Stromales Interaktionsmolekül (STIM) und das  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalprotein Orai1. Eine Beeinträchtigung dieser Proteine kann die Tumor-assoziierten Funktionen substantiell beeinflussen.

Ein bekannter Regulator von STIM1 und Orai1 ist die Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1). SGK1 ist ein Zielprotein des PI3K-Signalweges. Sie stimuliert über den nukleären Faktor kappa B (NF $\kappa$ B) die Expression von STIM1 und Orai1. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass Chorein, ein Aktivator der PI3K, einen Einfluss auf SGK1 und den SOCE ausüben könnte.

Die Expression und der Stellenwert von Chorein ist in verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlich, sodass ein geeignetes Zellmodell gewählt werden musste. Verglichen zu anderen untersuchten Tumorzellen weist die ZF-Rhabdomyosarkom-Zelllinie eine gesteigerte Chorein-Expression auf (Honisch et al. 2015a; Yu et al. 2016). Sie ist in besonders hohem Maße auf Chorein angewiesen, da eine Verminderung von Chorein die Apoptoserate dieser Zellen deutlich erhöht (Honisch et al. 2015a). Zusätzlich konnte bereits in anderen

Rhabdomyosarkom-Zelllinien (embryonale RD- und alveoläre RH30-Zellen) die Notwendigkeit des SOCE für die Migration, Invasion und Proliferation gezeigt werden (Schmid et al. 2016). Daher bot das ZF-Rhabdomyosarkom gute Voraussetzungen, um einen Einfluss von Chorein auf den SOCE zu untersuchen.

Die Effekte von Chorein wurden, wie in den vergangenen Studien des Physiologischen Institutes unter Prof. Dr. Florian Lang (Honisch et al. 2015a; Alesutan et al. 2013; Föller et al. 2012; Honisch et al. 2015c; Schmidt et al. 2013), durch den Knockdown von Chorein mittels Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz untersucht. Der SOCE wurde anhand der Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) fluoreszenzmikroskopisch gemessen.

Zunächst sollte überprüft werden, ob der Knockdown von Chorein einen Effekt auf die Funktion des SOCE sowie die Proteine STIM1 und Orai1 hat. Anschließend wurde eruiert, ob Chorein die SGK1 und NF $\kappa$ B beeinflusst. Dabei sollte auch der funktionelle Zusammenhang zwischen den potenziellen Signalproteinen und dem SOCE dargestellt werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tab. 4: erworbene Reagenzien.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
Ammoniumpersulfat (APS)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free EASYpack Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
DRAQ5™	Biostatus, Shepshed, Großbritannien
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose	Gibco, Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Carlsbad, USA
EMD638683	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS, engl. „Fetal Bovine Serum“)	Gibco, Carlsbad, USA
Fura-2/AM	Invitrogen, Göttingen, Deutschland
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GoScript™ Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
GoTaq® Sybr Green Master Mix	Promega, Mannheim, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

---

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Natriumchlorid	VWR International, Leuven, Belgien
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nuclease-Free Water (Nuklease-freies Wasser)	Promega, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
peqGOLD Protein Marker VI	Peqlab, Erlangen, Deutschland
peqGOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PhosSTOP™	Roche, Basel, Schweiz
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Hercules, USA
Rinderserumalbumin (BSA, Bovines Serumalbumin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Radioimmunoprecipitationsassay (RIPA) Lysepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roti®-Free Stripping-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Load 1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid 30 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 1N	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silikon	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
siPORT™ Amine Transfection Agent	Ambion, Darmstadt, Deutschland
Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thapsigargin	Invitrogen, Göttingen, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

---

(TRIS)

Triton X-100	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau	Gibco, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA	Gibco, Carlsbad, USA
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wogonin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

## 2.1.2 Oligonukleotide

**Tab. 5: small interfering RNA (siRNA).**

Bezeichnung	Hersteller
Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA #4390843	Ambion, Darmstadt, Deutschland
VPS13A Human Silencer® Select siRNA #s23342	Ambion, Darmstadt, Deutschland

**Tab. 6: verwendete Primer für die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).** fw = vorwärts (forward), rev = rückwärts (reversed).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
VPS13A fw	AGTTCTCATCTTCTGGCTTCAG
VPS13A rev	AGTGGGACGACGTCTGTACAC
SGK1 fw	AGATTCACAGGGACACATTGTCC
SGK1 rev	TCGTACATTTTCAGCTGTGTTTCG
ORAI1 fw	AGCCTCAACGAGCACTCCAT
ORAI1 rev	CTGATCATGAGCGCAAACAGG
NFκB1 fw	GCCCGAAACGCCGAATAT
NFκB1 rev	CCGTGGTTCGTGGCTCTC
GAPDH fw	TGAGTACGTCGTGGAGTCCACTG
GAPDH rev	GGTGCTAAGCAGTTGGTGGTG

## 2.1.3 Antikörper

**Tab. 7: verwendete Antikörper.** HRP = Meerrettichperoxidase.

<b>Antigen</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Produkt Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Orai1 (D90B10) (Mensch, Maus, Ratte, Affe)	Kaninchen	#3280	Cell Signaling Technol- ogy, Danvers, USA
GAPDH (D16H11) (Mensch, Maus, Ratte, Affe)	Kaninchen	#5174S	Cell Signaling Technol- ogy, Danvers, USA
IgG (Kaninchen)	Ziege	18772, CF™ 488A- gekoppelt	Sigma Aldrich, St. Lou- is, USA
IgG (Kaninchen)	Ziege	#7074, HRP- gekoppelt	Cell Signaling Technol- ogy, Danvers, USA

## 2.1.4 hergestellte Reagenzien

**Tab. 8: Laufpuffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**, 10-fach konzentriert. Vor der Anwendung wurde die Lösung 1:10 verdünnt.

Bezeichnung	Menge
Glycin	144 g
TRIS	30,2 g
SDS	10 g
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 1 l

**Tab. 9: Transferpuffer für Western Blot**, 10-fach konzentriert. Vor der Anwendung wurden 100 ml mit 200 ml Methanol vermischt und auf 1 l aufgefüllt.

Bezeichnung	Menge
Glycin	173 g
TRIS	21 g
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 1 l

**Tab. 10: Tris-Cl für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele, 1,5 M.**

Bezeichnung	Menge
TRIS	181,65 g
ddH <sub>2</sub> O	Endvolumen 1 l
Salzsäure	auf pH 8,8

**Tab. 11: Tris-Cl für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele, 1,0 M.**

Bezeichnung	Menge
TRIS	121,1 g
ddH <sub>2</sub> O	Endvolumen 1 l
Salzsäure	auf pH 6,8

**Tab. 12: Herstellung des Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Trenngels (10 %)** nach Sambrook et al. 1989

Bezeichnung	Menge
H <sub>2</sub> O	7,9 ml
Acrylamid 30 %	6,7 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	5,0 ml
SDS 10 %	0,2 ml
Ammoniumpersulfat 10 %	0,2 ml
TEMED	0,008 ml

**Tab. 13: Herstellung des Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Sammelgels (5 %)** nach Sambrook et al. 1989

Bezeichnung	Menge
H <sub>2</sub> O	3,4 ml
Acrylamid 30 %	0,83 ml
Tris 1,0 M (pH 6,8)	0,63 ml
SDS 10 %	0,05 ml
Ammoniumpersulfat 10 %	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

**Tab. 14: Ringerlösung.**

Bezeichnung	Menge
NaCl	125 mM

**Tab. 15: Kalzium-freie Ringerlösung.**

Bezeichnung	Menge
NaCl	125 mM

KCl	5 mM	KCl	5 mM
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM
HEPES	32,2 mM	HEPES	32,2 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2 mM
Glucose	5 mM	Glucose	5 mM
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2 mM	EGTA	0,5 mM
NaOH	auf pH 7,4	NaOH	auf pH 7,4

**Tab. 16: Waschpuffer für Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), 10-fach konzentriert.** Vor der Anwendung wurde die Lösung 1:10 verdünnt und 1 ml Tween 20 hinzugefügt.

Bezeichnung	Menge
Natriumchlorid	87,7 g
TRIS	24,3 g
ddH <sub>2</sub> O	Endvolumen 1 l
Salzsäure	auf pH 7,6

### 2.1.5 Verbrauchsmaterial

**Tab. 17: verwendetes Verbrauchsmaterial.**

Bezeichnung	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL 18x24 cm	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
ROTILABO® Blottingpapier	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser	VWR, Darmstadt, Deutschland
Falcon® konische Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon® Multiwell-Zellkulturplatten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Low Profile 96-Well-Platte	Peqlab, Erlangen, Deutschland



<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF Transfer Membran 0,45 µM	Thermo Scientific, Rockford, USA
RT-PCR Folie	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenkassette	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-NC 0,2 µM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten	VWR, Darmstadt, Deutschland
UVette®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen T75	TPP, Trasadingen, Schweiz

#### 2.1.6 Geräte

**Tab. 18: verwendete Geräte und Zubehör.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Biophotometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Basic pH Meter PB-11	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, USA
Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Fluar 40/1.30 Öl	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Heraeus™ Labofuge™ 200	Thermo Scientific, Rockford, USA
Inkubationsschüttler Swip TH25	Edmund Bühler, Bodelshausen, Deutschland
LSM 5 Exciter Laserscan-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer R1000	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Mini Trans-Blot® Module	Bio-Rad, Hercules, USA
Mini-Zentrifuge	neoLab, Heidelberg, Deutschland
PIPETBOY pro	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, USA
Präzisionswaage EW	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
PTC-100 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Waltham, USA
Rotina 38R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments, Mainz, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

### 2.1.7 Zelllinie

Die ZF-Zelllinie ist eine humane alveoläre Rhabdomyosarkom-Zelllinie, die in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen charakterisiert und etabliert wurde. Die Zellen stammen aus dem Primärtumor in der Wade einer siebenjährigen Patientin (siehe auch 1.2.3). In der Genanalyse zeigte sich eine t(1;13) Chromosomentranslokation und die Expression des Fusionsproteins Paired Box 7 (PAX7) / Forkhead Box O1 (Foxo1) (Zaborski 2019).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die ZF-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Nährmedium kultiviert, welches sich aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin zusammensetzte. Die Zellen sind adhärent und wurden, wenn eine Zellsuspension nötig war, mittels Trypsins (37°C, 5 min) von der Gefäßwand gelöst. Trypsin

wurde durch die Zugabe des Nährmediums inaktiviert. Die Zellen wurden etwa alle 3 Tage, bei einer Konfluenz von ca. 90 %, 1:10 verdünnt und neu ausgesät. Für die Quantifizierung der Zellen wurden Zellsuspensionen mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Für die weitere Behandlung wurden je 300 000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert, um eine adäquate Adhärenz zu gewährleisten.

### 2.2.2 Behandlung der Zellen

#### 2.2.2.1 *Gen-Knockdown*

Zur Hemmung der Biosynthese von Chorein erfolgte der Gen-Knockdown (auch engl. „Silencing“) mittels RNA-Interferenz. Hierbei werden die ZF-Zellen mit Oligonukleotiden, sogenannter kleiner interferierender Ribonukleinsäure (engl. „small interfering RNA“, siRNA), transfiziert. Die Sequenz der siRNA ist komplementär zur Messenger-RNA (mRNA) des Gens VPS13A, sodass sie an diese bindet. Es kommt zur Aktivierung eines RNA-induzierten Knockdown-Komplex (engl. „RNA induced silencing complex“, RISC), der die mRNA an dem gebundenen Abschnitt schneidet. Die mRNA-Fragmente werden anschließend weiter abgebaut und die Translation verhindert. Dieser Vorgang ist epigenetisch und verändert nicht das Genom (Agrawal et al. 2003).

Als spezifische siRNA kam Silencer Select VPS13A siRNA zum Einsatz. Die siRNA wurde mit Hilfe eines Polyamin-basierten Transfektionsverfahrens (siPORT Amine Transfection Agent) eingebracht (Ambion 2009). Polyamine und siRNA bilden Komplexe, die von der Zelle endozytotisch aufgenommen und nach Endosomolyse in das Zytosol freigesetzt werden (Wu et al. 2012). Zur Negativkontrolle wurden weitere Zellen auf die gleiche Weise behandelt, jedoch mit nontargeting siRNA (Silencer Select Negative Control No. 1) transfiziert.

Die Zellen wurden 24 Stunden vor Behandlung in 6-Well-Platten ausgesät (siehe 2.2.1). Entsprechend des Protokolls des Herstellers wurden pro Well 6 µl siPORT Amine Reagenz in 94 µl Opti-Mem Medium verdünnt. Anschließend wurden 10 µl siRNA zugegeben, um die finale siRNA-Konzentration von 5 nM zu erreichen. Die Mischung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert

und den Zellen vorsichtig zugegeben. Die Effektivität des Gen-Knockdowns wurde mittels RT-PCR überprüft (siehe 2.2.3.3).

### 2.2.2.2 Inkubation mit Inhibitoren

Der SOCE ist ein komplexer Vorgang, der vielfältigen Kontrollmechanismen unterliegt. Um die Bedeutung verschiedener Proteine für die Funktion des SOCE zu ermitteln, wurde die Funktion der jeweiligen Proteine gehemmt. Hierzu wurden ZF-Zellen mit spezifischen Inhibitoren inkubiert und im Anschluss der SOCE gemessen. Die Eigenschaften der behandelten ZF-Zellen konnten dann mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen werden.

Der Einfluss von Orai1 auf den SOCE wurde mit 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) untersucht. 2-APB wirkt bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  inhibierend auf Orai1 Kanäle und ist hierdurch ein starker Inhibitor des SOCE (Wei et al. 2016). 2-APB wurde unmittelbar während der Messung zu den Zellen gegeben (siehe auch 2.2.7).

Für die Untersuchung des Einflusses von SGK1 auf den SOCE wurden die Zellen mit dem hochselektiven SGK1-Blocker EMD638683 ( $\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$ ) vorbehandelt (Ackermann et al. 2011; Towhid et al. 2013). Hierzu wurden dem Medium EMD638683 in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  beigefügt (Schmidt et al. 2014b) und die Zellen 10 Stunden inkubiert (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ).

Ebenfalls wurde der Einfluss von NF $\kappa$ B auf den SOCE untersucht. Die Zellen wurden dazu 24 Stunden vor der Messung mit 50  $\mu\text{M}$  Wogonin behandelt (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ). Wogonin blockiert die Aktivierung von NF $\kappa$ B ( $\text{IC}_{50} = 39 \mu\text{M}$ ) (Lee et al. 2006; Li et al. 2009).

### 2.2.3 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR)

Um die Expression von Genen von zu bestimmen, wurde die Menge der mRNA durch die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. „real-time polymerase chain reaction“, RT-PCR) ermittelt. Dafür muss zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase aus RNA eine komplementäre cDNA hergestellt werden. Daher

fasst man die Methode als engl. „reverse transcription PCR“ (RT-PCR) zusammen (Bustin et al. 2009).

Untersucht wurden die mRNA von VPS13A, Orai1, SGK1, NFκB und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH diente als Referenz als sogenanntes Haushaltsgen (Mori et al. 2008). Um einen Einfluss durch enzymatischen Abbau der RNA zu verhindern, wurden sämtliche Arbeitsschritte mit sterilen, RNase-freien Materialien durchgeführt.

### *2.2.3.1 Isolation der Ribonukleinsäure (RNA)*

Zur Extraktion der RNA wurden die ZF-Zellen zunächst lysiert. Dies erfolgte durch peqGOLD TriFast, einem Lysepuffer auf Basis von Phenol und Guanidinisothiocyanat, das die Isolation von RNA, DNA und Proteinen ermöglicht (Peqlab 2012). Gemäß des Protokolls des Herstellers wurden die Zellen zwei Mal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. „Phosphate Buffered Saline“, PBS) gewaschen (37 °C). Sodann erfolgte die Lysierung in 1 ml TriFast über 5 min bei Raumtemperatur (RT) und Überführung in ein Reaktionsgefäß. Nach Zugabe von 400 µl Chloroform wurden die Proben gut durchmischt und für 3 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 12 000 g (4 °C), um eine Phasentrennung zu erreichen: Die obere, klare Phase enthielt die RNA und wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Zur Fällung der gelösten RNA wurden die Proben mit Isopronanol im Verhältnis 1:1 aufgefüllt und für 10 min inkubiert (RT). Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 12 000 g, 4 °C) und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in Ethanol (70 %, 4 °C) gewaschen und nochmals zentrifugiert (5 min, 7 500 g, 4 °C). Das RNA-Pellet wurde bei RT luftgetrocknet und anschließend in 30 µl Nuklease-freiem Wasser (15 min, 55 °C) gelöst.

Die Konzentration der Lösung wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden in einer Halb-Mikro-Küvette je 2 µl Lösung mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl verdünnt und im Photometer gegen eine RNA-freie Probe gemessen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.3.2 *Synthese der komplementären DNA (cDNA)*

Die für die RT-PCR benötigte komplementäre DNA (engl. „complementary DNA“, cDNA) wurde aus jeweils 2 µg RNA mittels einer reversen Transkriptase hergestellt. Dies erfolgte mit dem GoScript Reverse Transcriptase Kit (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers. Hierzu wurden zunächst 2 µg RNA in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt. Nach Hinzufügen von je 1 µl Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer wurden die Proben für 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Sodann wurden je 4 µl GoScript 5x Reaktionspuffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol, 1 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat, 1,5 µl H<sub>2</sub>O und 0,5 µl GoScript Reverse Transkriptase hinzugefügt und die Ansätze nach folgendem Schema im Thermocycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler) inkubiert: 25 °C für 5 min (Primerhybridisierung), 42 °C für 1 h (Polymerisation), 70 °C für 15 min (Inaktivierung). Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.3.3 *Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)*

Die PCR wird verwendet, um DNA in vitro mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase zu vervielfältigen. Eine Weiterentwicklung der PCR ist die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. „real-time PCR“, RT-PCR), die durch Fluoreszenzmessungen eine Quantifizierung der DNA ermöglicht.

Um bestimmte Sequenzen zu untersuchen, kamen spezifische Primer zum Einsatz (siehe 2.1.2). Ebenso wurde ein Doppelstrang-DNA-abhängiger Fluoreszenzfarbstoff beigefügt. In jedem Amplifikationszyklus stellte die Taq-Polymerase neue Doppelstrang-DNA-Abschnitte her, wodurch die Intensität der Fluoreszenz anstieg (Giulietti et al. 2001; Kubista et al. 2006).

In eine 96-Well-Platte wurden gemäß des Herstellerprotokolls 10 µl GoTaq qPCR Master Mix (Promega) und 6 µl nukleasefreies Wasser mit je 1 µl Primer (vorwärts und rückwärts) und 2 µl der zu untersuchenden cDNA gemischt (Gesamtvolumen 20 µl). Dies wurde für jede Probe doppelt durchgeführt. In einem PCR-Thermocycler (iCycler iQ Real-Time PCR Detection System) wurden die Proben initial für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die anschließende Amplifikation

umfasste 40 Zyklen nach folgendem Schema: 15 s bei 95 °C (Denaturierung), 20 s bei 59 °C (Amplifikation), 30 s bei 72 °C (Dissoziation) (Promega 2014).

Für die Auswertung wurden die Messergebnisse in eine Microsoft Excel Kalkulationstabelle übertragen. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001; Pfaffl 2001). Dargestellt werden die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (engl. standard error of the mean, SEM). Die Zahlenwerte wurden mittels zweiseitigem Einstichproben-t-Test oder zweiseitigen, ungepaarten t-Tests überprüft (Student 1908). Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

### 2.2.4 Western Blotting

Zur Bestimmung der Menge an Orai1 in den Zellen wurde das Western Blot-Verfahren genutzt. Die extrahierten Proteine wurden zunächst elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt, auf einer Membran fixiert, mit Antikörpern markiert und anschließend durch Chemolumineszenz visualisiert. Als Referenz diente das Haushaltsgen GAPDH.

#### 2.2.4.1 Proteinextraktion

Die Extraktion der zellulären Proteine gelang mit Hilfe des RIPA Lysepuffers. Diesem war ein Protease- (cOmplete ULTRA) und Phosphataseinhibitor (PhosSTOP) beigefügt. Die adhärennten ZF-Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen (4 °C) und anschließend in 200  $\mu$ l RIPA Lysepuffer (4 °C) inkubiert. Durch Zentrifugation bei 13 000 g (10 min, 4 °C) wurden unlösliche Zellbestandteile (Pellet) eliminiert und die gelösten Proteine (Überstand) abpipettiert. Die Lagerung von Proteinproben erfolgte bei -80 °C.

Für die folgenden Untersuchungen ist die Verwendung gleicher Proteinmengen nötig. Dazu wurde die Konzentration des Gesamtproteins photometrisch nach M. M. Bradford bestimmt. Der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 ändert sein Absorptionsmaximum in Abhängigkeit zur Proteinbindung von 465 zu 595 nm (Bradford 1976). Hierzu wurden je 1 ml Bradford Reagenz und 2  $\mu$ l der Proteinprobe in einer Halb-Mikro-Küvette gründlich gemixt und 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Photometer (Biophotometer plus) bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen.

### 2.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinelektrophorese erfolgte nach dem Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Proteine erhalten durch Natriumdodecylsulfat (SDS) negative Ladungen und wandern entlang eines elektrischen Feldes. Im Gel wird dabei eine Auftrennung nach der Proteingröße erreicht. 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach Sambrook et al. (1989) für jedes Experiment frisch hergestellt. Je 30 µg Protein wurden in Probenpuffer (Roti-Load 1) gelöst (95 °C, 5 min, Gesamtvolumen 20 µl) und auf das Gel aufgetragen. Als Laufkontrolle wurde der peqGOLD Protein-Marker VI verwendet. Die Gelkassetten wurden in eine Wanne (Mini-PROTEAN) eingebracht und mit Laufpuffer befüllt. Die SDS-PAGE erfolgte bei einer Spannung von 80 V (Sammelgel) bzw. 110 V (Trenngel) und dauerte, abhängig von der gesuchten Proteingröße, etwa zwei Stunden.

### 2.2.4.3 Blotting

Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran) übertragen (engl. „Blotting“). Dies erfolgte im Nass-Transfer-Verfahren. Zur Vorbereitung wurden die trockenen Membranen zunächst in Methanol, anschließend in Wasser, dann in Transferpuffer (4 °C) eingelegt. In eine Kassette (Mini Trans-Blot) wurden nacheinander Schwammpolster, Filterpapier, SDS-PAGE Gel, PVDF-Membran, Filterpapier und Schwammpolster in Transferpuffer luftfrei übereinandergelegt und die geschlossene Kassette in eine mit Transferpuffer gefüllte Wanne gesetzt. Das Blotting erfolgte bei einem elektrischen Strom von 300 mA (90 min) und wurde mittels Kühlakku unter ständigem Rühren gekühlt.

### 2.2.4.4 Proteindetektion

Die geblotteten Membranen wurden anschließend aus den Kassetten entnommen und für 60 min in 5 % Rinderserumalbumin (engl. „Bovine serum albumin“, BSA) in Tris-buffered saline mit Tween20 (TBST) bei RT unter ständigem Schwenken geblockt. Anschließend wurden die Membranen mit Orai1-Antikörper (1:1000) oder GAPDH-Antikörper (1:1000) in 5 % BSA in TBST über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Membranen in TBST gewaschen (3x 10 min) und mit einem mit Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxi-



dase, HRP) verknüpften Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen, 1:2000) in 5 % BSA in TBST inkubiert (60 min, RT). Nach nochmaligem Waschen (3x 10 min) wurden die Membranen in einer Chemolumineszenzlösung (Amersham ECL Reagent) inkubiert. Unter der enzymatischen Aktivität der Meerrettichperoxidase kam es zur signalverstärkten Chemolumineszenz (engl. enhanced chemiluminescence, ECL) der Proteinbanden. Zur Visualisierung dieser Banden wurden die Membranen mit einem lichtsensitiven Film (Amersham Hyperfilm) in einer Filmkassette belichtet und anschließend entwickelt und fixiert. Die Filme wurden gescannt und mit Hilfe der Software ImageJ (Version 1.4.3, Wayne Rasband) und Quantity One (Bio-Rad) analysiert und mit Microsoft Excel ausgewertet. Die Zahlenwerte wurden mittels zweiseitigem Einstichproben-t-Test oder zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanz untersucht (Student 1908). p-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet.

### 2.2.4.5 Stripping

Um eine adäquate Aussage über die Proteinmenge machen zu können, musste ein Referenzwert ermittelt werden. Die Menge von Orai1 wurde gegen das Haushaltsgen GAPDH verglichen. Hierzu musste die Proteindetektion derselben Membran nacheinander für Orai1 und GAPDH erfolgen. Zu diesem Zweck mussten nach der ersten Proteindetektion die alten Antikörper entfernt werden (engl. Stripping). Hierzu wurden die Membranen in Stripping-Puffer für 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend dreimal je 10 min in TBST gewaschen. Anschließend wurden die Membranen analog zu Abschnitt 2.2.4.4 geblockt und die weitere Proteindetektion durchgeführt.

### 2.2.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie, in der das Präparat Punkt für Punkt rasterartig beleuchtet und von einer Kamera detektiert wird. So werden Streulicht eliminiert und scharfe, kontrastreiche Bilder produziert (Nwaneshiudu et al. 2012). In dieser Arbeit wird die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie fluoreszenzmikroskopisch genutzt zur subzellulären Lokalisation der markierten Proteine.

Hierfür wurden die ZF-Zellen nach erfolgtem Gen-Knockdown bzw. Behandlung mit unspezifischer, engl. „nontargeting“ RNA in runden Deckgläsern in 6-Well-Platten für 24 Stunden kultiviert. Für die Konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS durch 4 % Paraformaldehyd (15 min) fixiert. Für die Darstellung intrazellulärer Strukturen wurden die Zellen mit 0,3 % Triton X-100 (10 min) permeabilisiert. Nach Blocken mit 3 % BSA in PBS (1 h, RT) erfolgte die Inkubation mit dem Orai1-Antikörper (1:200) über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem CF™ 488A-verknüpften Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen, 1:250) inkubiert. Gleichzeitig erfolgte auch die Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes DRAQ5™ (1:3000), der die DNA bindet (60 min, RT). Nach nochmaligem Waschen wurde ProLong® Gold Antifade Mountant appliziert und die Präparate im Zeiss LSM 5 Exciter Laserscan-Mikroskop untersucht.

### 2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (engl. „fluorescence-activated cell sorting“, FACS) ist eine Methode, in der einzelne Zellen durch einen Messapparat fließen. Hierbei werden die einzelnen Zellen von Laserstrahlen beleuchtet und die Lichtstreuung und Fluoreszenz erfasst (McKinnon 2018). In dieser Arbeit wurde durch Immunfluoreszenz die Menge an Orai1-Kanälen in der Plasmamembran der ZF-Zellen bestimmt.

ZF-Zellen wurden nach erfolgtem Knockdown bzw. Behandlung mit nontargeting RNA mit Trypsin von der 6-Well-Platte gelöst, mit Medium geblockt und, jeweils nach Zentrifugation, zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixation der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (20 min, RT). Nach Blocken der Zellen mit 3 % BSA in PBS wurden sie mit dem Orai1-Antikörper (1:100) inkubiert (30 min, 37 °C). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem CF™ 488A-verknüpften Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen, 1:200) inkubiert (30 min, 37 °C). Nach zwei weiteren Waschzyklen wurden die Zellen im FACS Calibur Durchflusszytometer gemessen. Für die Messung von Orai1 Kanälen wurde die Anregungswellenlänge von 488 nm und Emissionswellenlänge von 530 nm gewählt (FL-1).

### 2.2.7 Messung des speicherabhängigen $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms

Die Vorbereitung und Messung des speicherabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms erfolgte an vitalen Zellen bei 37 °C nach Bird et al. (2008). Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden mittels des Farbstoffes Fura-2 fluoreszenzmikroskopisch erfasst. Der verwendete Fura-2 Acetoxymethyl-Ester (AM) ist unpolar und gelangt so über die Zellmembran nach intrazellulär. Durch Anregung mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm kommt es zur Fluoreszenz, die bei 505 nm gemessen werden kann (Grynkiewicz et al. 1985). Aus dem Quotienten der beiden Fluoreszenzstärken wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnet.

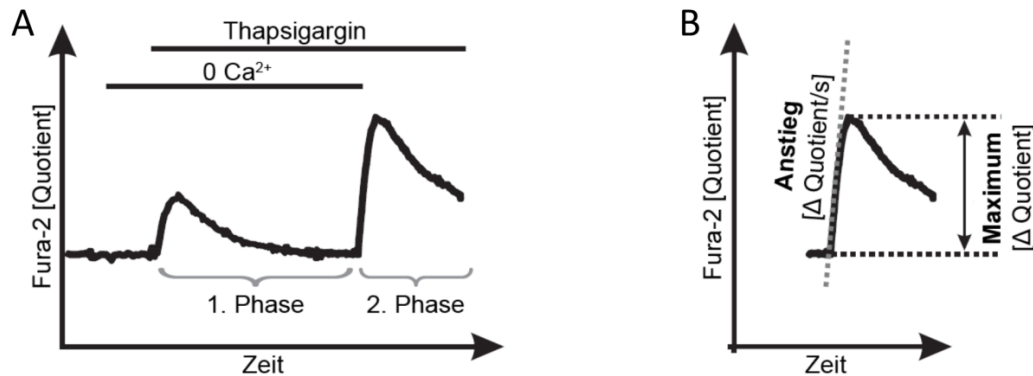
Die ZF-Zellen wurden auf runden Deckgläsern in 6-Well-Platten kultiviert und behandelt. Um ein gespülbares Gefäß zu schaffen, wurde ein Kunststoffring mittels Silikon auf das Deckglas fixiert. Nun wurden die Zellen in Medium mit 2  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM für 15 min inkubiert. Anschließend wurde das Gefäß vorsichtig mit Ringerlösung gespült und in ein invertiertes Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 100) eingespannt. Hier wurden die Zellen alle zwei Sekunden nacheinander mit Licht der Wellenlänge 340 und 380 nm angeregt und die Fluoreszenz mit einer Kamera erfasst.

Zur Messung des SOCE wurde mittels Umspülung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Umgebung geschaffen. EGTA (500  $\mu\text{M}$ ) fängt hierbei als  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator minimale Restkonzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ab.

Nach etwa 2 min wurde Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) hinzugegeben. Thapsigargin inhibiert die SERCA (siehe 1.3.3.1). Folglich kommt es zur Leerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und zu einem transienten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). In diesem Arbeitsschritt erfolgte ggf. auch die Gabe von 2-APB (siehe auch 2.2.2.2).

Die Leerung des ER/SR triggert die Öffnung der Orai1-Kanäle. Solange das extrazelluläre Medium  $\text{Ca}^{2+}$ -frei ist, kann kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgen. In einer zweiten Phase wurde den Zellen daher eine  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige Ringerlösung zugeführt. Dadurch kommt es zum SOCE, der einen raschen, hohen Anstieg des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aufweist (Abb. 3A). Ausgewertet wurden Anstieg und Maximum des

Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (Abb. 3B). Steuerung und Datenerfassung erfolgten mit der Software Metafluor (Universal Imaging, Downingtown, USA). Sie generierte Datentabellen, die mit Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Redmond, USA) ausgewertet wurden. Die Prüfung auf Signifikanz geschah mittels des zweiseitigen, ungepaarten t-Tests (Student 1908). Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.



**Abb. 3: Messung des speicherabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (SOCE)** (nach Bird et al. 2008). Der Quotient der Fura-2 Fluoreszenzen korreliert mit der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. **A:** Nach Zugabe von Thapsigargin (1 μM) in Ca<sup>2+</sup>-freier Ringerlösung (0 Ca<sup>2+</sup>) kam es in der 1. Phase zu einem temporären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg mit Leerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher. In der 2. Phase wurden Ca<sup>2+</sup>-Ionen wieder dem Extrazellulärraum zugeführt, hierbei kam es zum speicherabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom. **B:** Die Auswertung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms erfolgte anhand des Anstiegs und des Maximums im Vergleich zum Ruhezustand.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 SOCE in ZF-Rhabdomyosarkomzellen

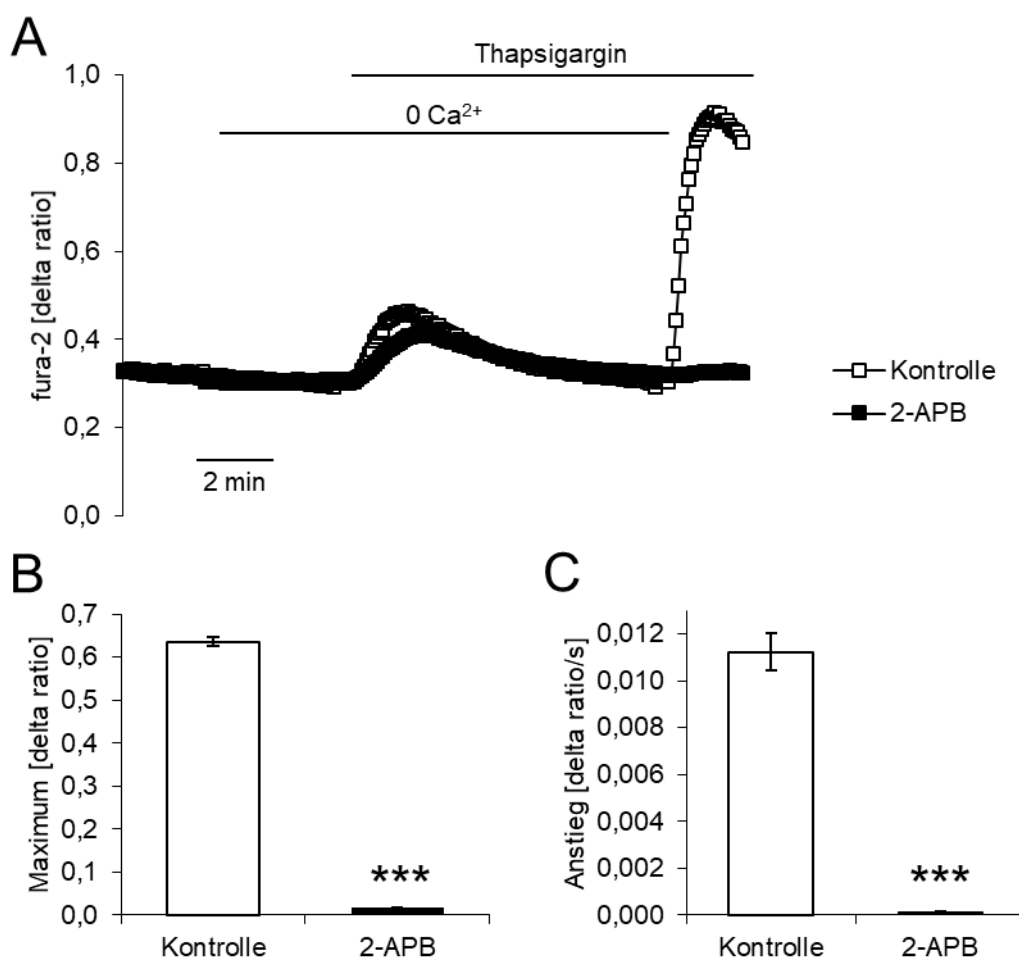
##### 3.1.1 SOCE in ZF-Zellen und der Einfluss von 2-APB

Um Einflüsse auf den SOCE in ZF-Rhabdomyosarkomzellen zu untersuchen, musste zunächst sichergestellt werden, dass der SOCE in ZF-Zellen gemäß den bekannten Mechanismen agiert. Klassischerweise erfolgt der speicherabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch sich öffnende CRAC-Kanäle, die wiederum aus Einheiten des Orai1 gebildet werden (siehe 1.3.3).

Eine unbehandelte Kontrollgruppe zeigte, ob der SOCE in ZF-Zellen auslösbar ist. Um zu untersuchen, ob Orai1 für SOCE in ZF-Zellen verantwortlich ist, erfolgte die Behandlung einer Vergleichsgruppe mit 2-APB, der Orai1-Kanäle bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  blockiert (Wei et al. 2016).

ZF-Zellen wurden in 6-Well-Platten mit eingelegten Deckgläsern ausgesät. Die nach 24 Stunden adhärirten Zellen wurden anschließend in einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Durch Einsatz des Farbstoffes Fura-2 ließ sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) bestimmen. 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) wurde während der Messung hinzugegeben, während die Kontrollgruppe unbehandelt blieb. Die Hinzugabe des SERCA-Inhibitors Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung führte durch Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das ER/SR, zu einem transienten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in beiden Gruppen. Die Leerung der intrazellulären Speicher wiederum triggert die Öffnung von CRAC-Kanälen (siehe 1.3.3). Durch Umspülung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Ringerlösung wurde der SOCE in Gang gesetzt: Die nun verfügbaren extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können rasch nach intrazellulär strömen. Für die Quantifizierung wurden in beiden Phasen sowohl Anstieg als auch Maximum von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ausgewertet.

Unbehandelte ZF-Zellen zeigten einen adäquaten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg als Zeichen eines funktionsfähigen SOCE (Kontrolle, Abb. 4). Eine Behandlung mit 2-APB hingegen unterdrückte den SOCE praktisch vollständig ( $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ).



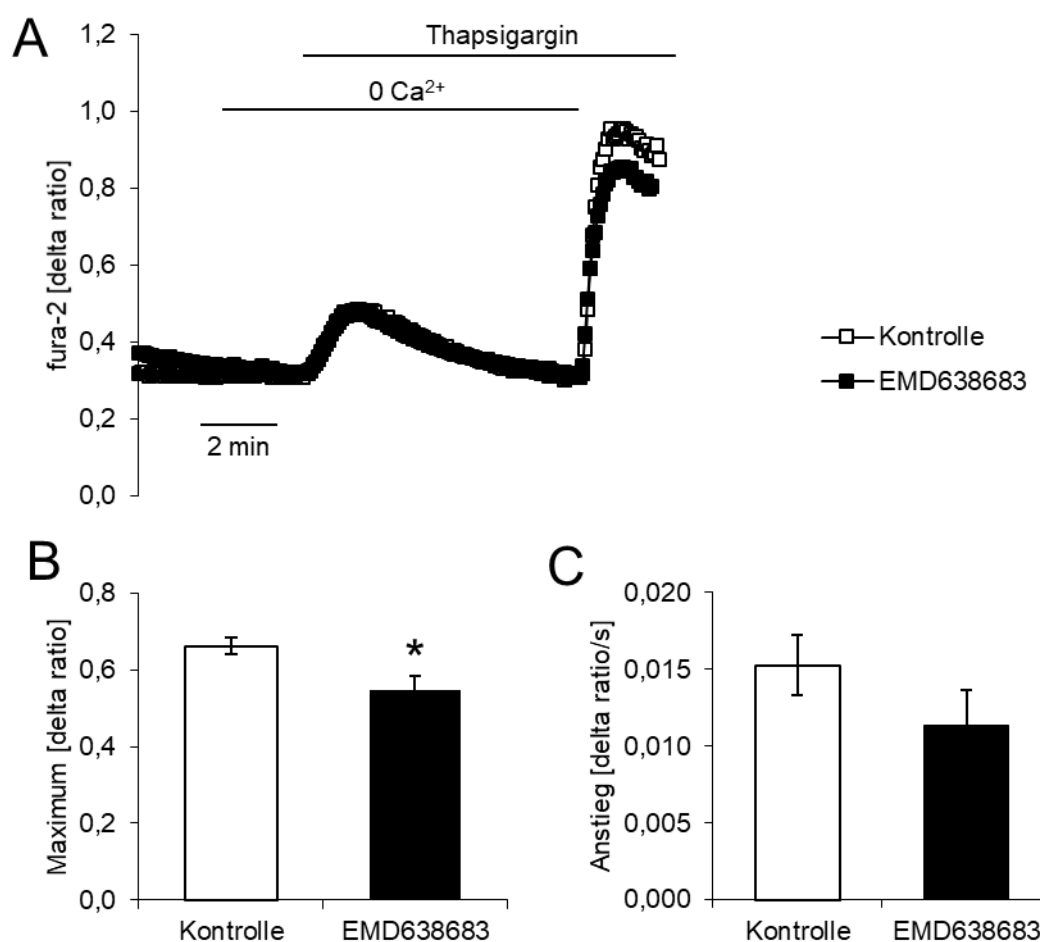
**Abb. 4: Messung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms nach Behandlung mit 2-APB.** ZF-Rhabdomyosarkomzellen wurden mit 2-APB (50 μM) behandelt (schwarz) oder blieben unbehandelt (Kontrolle, weiß). Der Quotient (delta ratio) der Fura-2 Fluoreszenz spiegelt die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wider. **A:** Gemittelter Fura-2 Quotient im zeitlichen Verlauf (n = 6). Die Inhibition der SERCA durch Thapsigargin (1 μM) in Ca<sup>2+</sup>-freier Ringerlösung (0 Ca<sup>2+</sup>) führte zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern (1. Anstieg). Readdition von Ca<sup>2+</sup>-haltiger Ringerlösung führte zum speicherabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom (SOCE) (2. Anstieg). **B, C:** Arithmetische Mittelwerte ± SEM des Maximums und Anstiegs des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (n = 6). 2-APB verhinderte den SOCE praktisch vollständig. (\*\*\*) p < 0,001; zweiseitiger ungepaarter T-Test). (Publiziert in Yu et al. 2016)

### 3.1.2 Einfluss von EMD638683 auf SOCE in ZF-Zellen

Die Serin/Threonin-Proteinkinase SGK1 ist Teil des PI3K-Signalweges und kann den SOCE wesentlich beeinflussen (siehe 1.5). Ob SGK1 auch in ZF-Zellen für SOCE eine Rolle spielt, wurde mit Hilfe des SGK1-Inhibitors EMD638683 untersucht.

Hierzu wurden die Zellen auf runden Deckgläsern in 6-well-Platten ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde EMD638683 (50 μM) hinzu-

gegeben und die Zellen für 10 Stunden inkubiert, während die Kontrolle unbehandelt blieb. Die Messung des  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte mittels eines invertierten Fluoreszenzmikroskops und dem Farbstoff Fura-2/AM. Thapsigargin ( $1 \mu\text{M}$ ) führte in  $Ca^{2+}$ -freier Ringerlösung zu einem temporären  $Ca^{2+}$ -Anstieg. Die anschließende Umspülung der Zellen mit  $Ca^{2+}$ -haltiger Ringerlösung führte zum SOCE (siehe 1.3.3). Für die Quantifizierung wurden in beiden Phasen sowohl Anstieg als auch Maximum von  $[Ca^{2+}]_i$  ausgewertet. Abb. 5 zeigt, dass die Inhibition der SGK1 mit EMD638683 zu einem signifikant geringeren Maximum von  $[Ca^{2+}]_i$  führte und somit den SOCE verminderte ( $p = 0,020$ , Abb. 5).



**Abb. 5: Einfluss des SGK1-Inhibitors EMD638683 auf den SOCE.**  $Ca^{2+}$ -Einstrom in ZF-Rhabdomyosarkomzellen mit (EMD638683, schwarz) und ohne (Kontrolle, weiß) Vorbehandlung mit EMD638683 ( $50 \mu\text{M}$ , 10 h). Der Quotient (delta ratio) der Fura-2 Fluoreszenz spiegelt die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  wider. **A**: Gemittelter Fura-2 Quotient im zeitlichen Verlauf ( $n = 8$ ). Die Inhibition der SERCA durch Thapsigargin ( $1 \mu\text{M}$ ) in  $Ca^{2+}$ -freier Ringerlösung ( $0 Ca^{2+}$ ) führte zur  $Ca^{2+}$ -Freisetzung und Entleerung der Speicher. Readdition von  $Ca^{2+}$ -haltiger Ringerlösung löste den  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus. **B**, **C**: Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM

des Maximums und Anstiegs des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms ( $n = 8$ ). EMD638683 verminderte das Maximum des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms signifikant (\*  $p < 0,05$ ; zweiseitiger ungepaarter T-Test). (Publiziert in Yu et al. 2016)

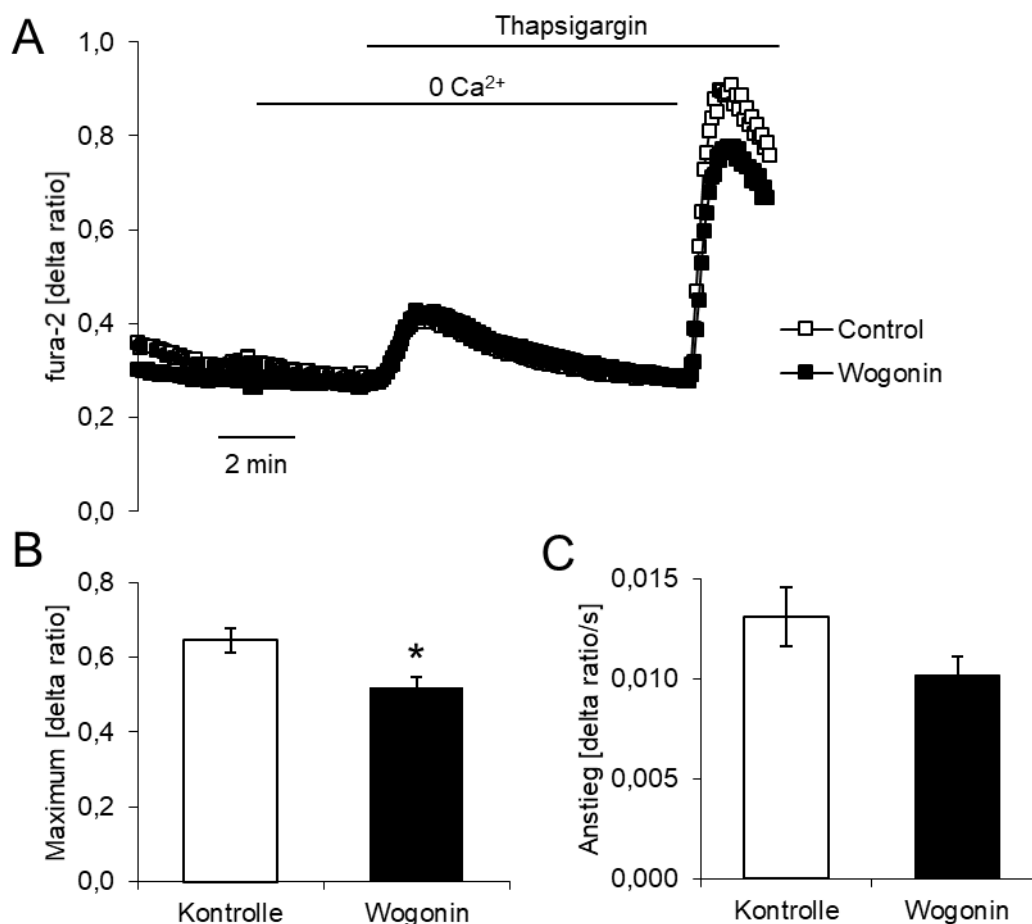
### 3.1.3 Einfluss von Wogonin auf SOCE in ZF-Zellen

SGK1 übt seinen Einfluss auf den SOCE klassischerweise über die Steuerung auf Transkriptionsebene aus. Hierbei ist NF $\kappa$ B ein wichtiger Faktor. Um festzustellen, ob die Verminderung von NF $\kappa$ B tatsächlich Einfluss auf den SOCE hat, wurde NF $\kappa$ B mit dem Inhibitor Wogonin gehemmt. Wogonin hemmt die nukleäre Translokation von NF $\kappa$ B und verhindert die Phosphorylierung der I $\kappa$ B (Zhao et al. 2010).

ZF-Zellen wurden auf runden Deckgläsern in 6-well-Platten ausgesät und für 24 Stunden inkubiert, bevor sie mit Wogonin (50  $\mu\text{M}$ , 24 h) behandelt wurden. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Die Messung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erfolgte mittels eines invertierten Fluoreszenzmikroskops und dem Farbstoff Fura-2/AM. Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) führte in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung zu einem temporären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Die Leerung der intrazellulären Speicher triggerte eine Öffnung der CRAC-Kanäle (siehe 1.3.3). Durch Umspülung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Ringerlösung wurde der SOCE ausgelöst. Für die Quantifizierung wurden in beiden Phasen sowohl Anstieg als auch Maximum von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ausgewertet.

Abb. 6 zeigt, dass die Inhibition von NF $\kappa$ B mit Wogonin zu einem signifikant geringeren Maximum von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während des Kalziueinstroms führte und den SOCE somit reduzierte ( $n = 4$ ;  $p = 0,023$ ) (Abb. 6).





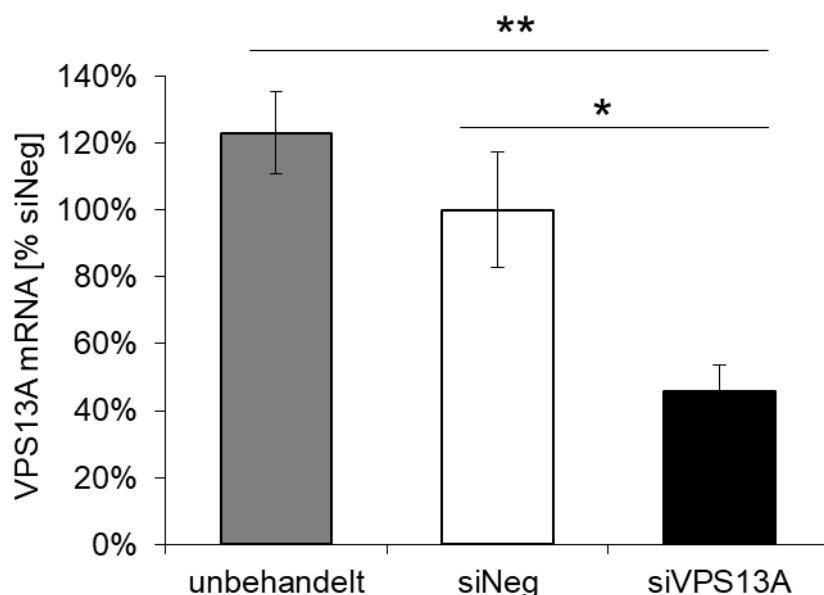
**Abb. 6: Einfluss von NFκB-Inhibitor Wogonin auf den SOCE.** Verhalten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in ZF-Rhabdomyosarkomzellen mit (Wogonin, schwarz) und ohne (Kontrolle, weiß) Vorbehandlung mit Wogonin ( $50 \mu\text{M}$ , 24 h). Der Quotient (delta ratio) der Fura-2 Fluoreszenz spiegelt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wider. **A:** Gemittelter Fura-2 Quotient im zeitlichen Verlauf ( $n = 4$ ). Die Inhibition der SERCA durch Thapsigargin ( $1 \mu\text{M}$ ) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung ( $0 \text{Ca}^{2+}$ ) führte zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und Entleerung der Speicher. Readdition von  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Ringerlösung löste den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus. **B, C:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM des Maximums und Anstiegs des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms ( $n = 4$ ). Vorbehandlung mit Wogonin verminderte das Maximum des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms signifikant (\*  $p < 0,05$ ; zweiseitiger ungepaarter T-Test). (Publiziert in Yu et al. 2016)

### 3.2 Gen-Knockdown von VPS13A in ZF-Rhabdomyosarkomzellen

Um einen Zusammenhang zwischen Chorein und den SOCE zu untersuchen, mussten ZF-Rhabdomyosarkomzellen mit regulärer und mit gehemmter Expression von Chorein miteinander verglichen werden. Um dies zu erreichen, erfolgte der Knockdown mittels RNA-Interferenz. Die Expression von Chorein wurde durch Transfektion mit siRNA, die zu VPS13A-mRNA komplementär war, unterdrückt. Als Vergleich diente eine Negativkontrolle, die mit nontargeting

siRNA transfiziert wurde. Zusätzlich wurden parallel unbehandelte Zellen mitgeführt, um den Einfluss der zur Transfektion verwendeten Reagenzien zu prüfen.

Abb. 7 zeigt die Effektivität des Knockdowns mittels RT-PCR. mRNA-Level wurden für VPS13A und das Haushaltsgen GAPDH bestimmt. Nach 48 h Transfektion zeigte sich im Vergleich zu GAPDH eine signifikante Verminderung der mRNA für VPS13A gegenüber der Negativkontrolle ( $n = 4$ ,  $p = 0,016$ ). Die mit nontargeting siRNA transfizierte Negativkontrolle und die unbehandelten Zellen wiesen in der RT-PCR keinen signifikanten Unterschied in der Transkription von VPS13A auf ( $p = 0,26$ ).



**Abb. 7: RT-PCR von VPS13A nach dem Knockdown von VPS13A in ZF-Rhabdomyosarkomzellen.** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Menge von VPS13A in Relation zu GAPDH ( $n = 4$ ). ZF-Rhabdomyosarkomzellen wurden mit siRNA gegen VPS13A (siVPS13A, schwarz) oder nontargeting siRNA (siNeg, weiß) transfiziert oder blieben unbehandelt (grau). Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Menge von VPS13A überprüft. Es zeigte sich eine deutliche Verminderung der VPS13A-mRNA nach Knockdown von VPS13A gegenüber siNeg. Im Gegensatz dazu war die VPS13A-mRNA durch die Transfektion mit nontargeting siRNA nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; Bonferroni-korrigierter zweiseitiger ungepaarter T-Test)

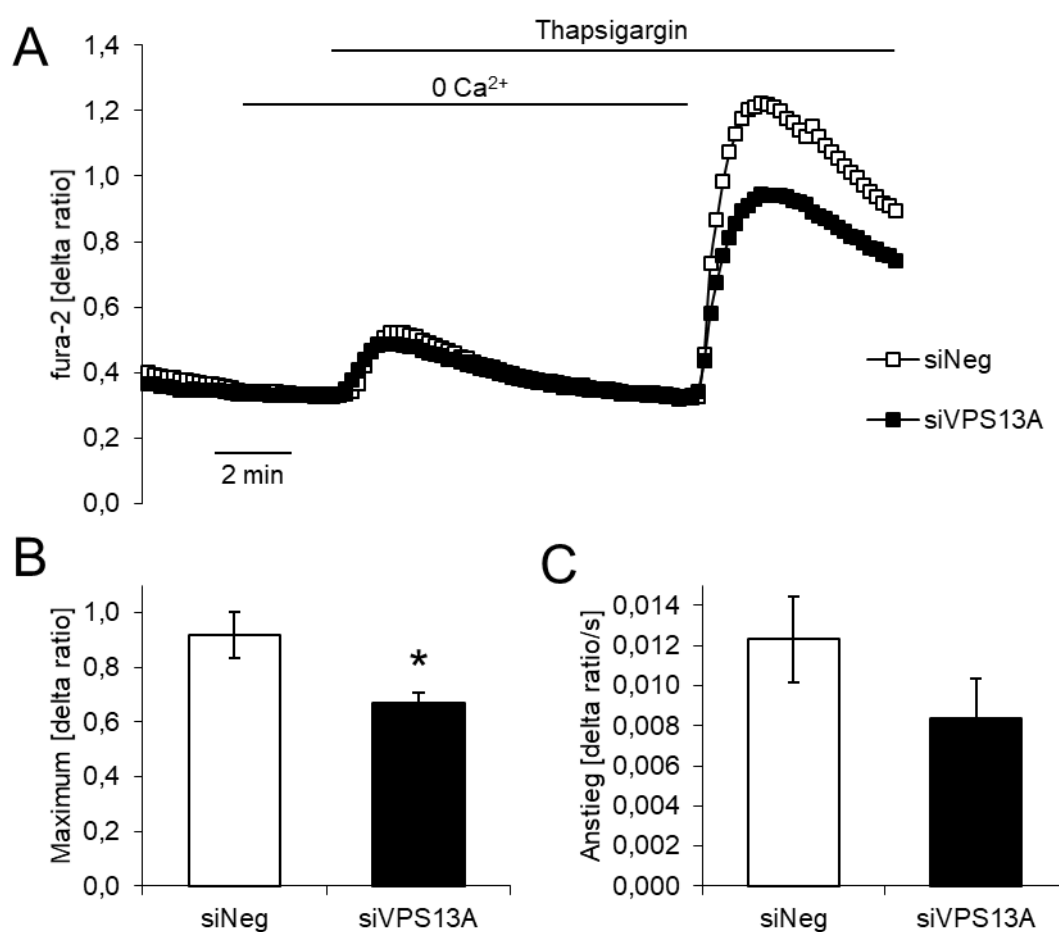
### 3.3 Einfluss von Chorein auf SOCE in ZF-Rhabdomyosarkomzellen

#### 3.3.1 SOCE nach Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen

Im Folgenden wurde der Einfluss von Chorein auf den SOCE untersucht. Dazu erfolgte die Messung von ZF-Zellen nach Knockdown von VPS13A (siVPS13A) oder Behandlung mit nontargeting siRNA (siNeg). Der Knockdown wurde an

Zellen in 6-Well-Platten mit eingelegten runden Deckgläsern durchgeführt. Der SOCE wurde fluoreszenzmikroskopisch gemessen. Mittels des Farbstoffes Fura-2 ließ sich hierbei die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) bestimmen. Die Hinzugabe des SERCA-Inhibitors Thapsigargin ( $1 \mu\text{M}$ ) in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung führte durch Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das ER/SR, zu einem temporären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Die Leerung der intrazellulären Speicher wiederum triggerte die Öffnung von CRAC-Kanälen (siehe 1.3.3). Durch Umspülung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Ringerlösung wurde der SOCE in Gang gesetzt:  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen strömten rasch nach intrazellulär. Für die Quantifizierung wurden in beiden Phasen sowohl Anstieg als auch Maximum von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ausgewertet.

Abb. 8 zeigt, dass der Gen-Knockdown von VPS13A zu einem signifikant geringeren Maximum von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führte ( $n = 6$ ,  $p = 0,023$ ).



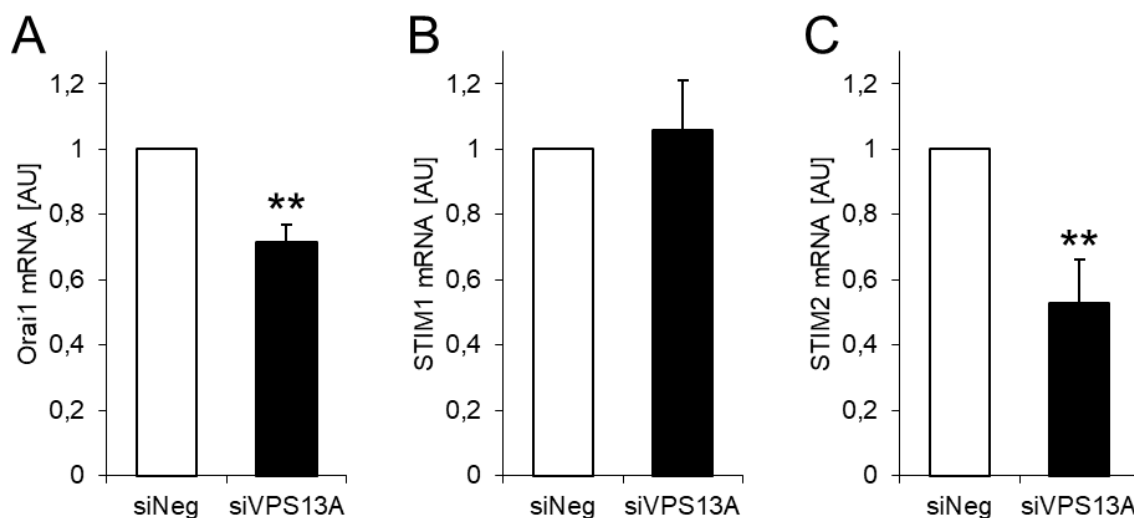
**Abb. 8: Messung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms nach Knockdown von VPS13A in ZF-Rhabdomyosarkomzellen.** ZF-Rhabdomyosarkomzellen wurden mit siRNA gegen VPS13A (siVPS13A, schwarz) oder nontargeting siRNA (siNeg, weiß) transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Quotient (delta ratio) der Fura-2-Fluoreszenz korreliert mit der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration [ $Ca^{2+}$ ]. **A:** Gemittelter Fura-2 Quotient im zeitlichen Verlauf ( $n = 6$ ). Die Inhibition der SERCA durch Thapsigargin ( $1 \mu M$ ) in  $Ca^{2+}$ -freier Ringerlösung ( $0 Ca^{2+}$ ) führte zur  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern (1. Anstieg). Readdition von  $Ca^{2+}$ -haltiger Ringerlösung führte zum speicherabhängigen  $Ca^{2+}$ -Einstrom (SOCE) (2. Anstieg). **B, C:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM des Maximums und Anstiegs des  $Ca^{2+}$ -Einstroms ( $n = 6$ ). siVPS13A wies ein signifikant niedrigeres Maximum im  $Ca^{2+}$ -Einstrom auf. (\*  $p < 0,05$ ; zweiseitiger ungepaarter T-Test) (Publiziert in Yu et al. 2016)

### 3.3.2 Expression von Orai1, STIM1 und STIM2 nach Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen

Orai und STIM sind die Protagonisten des SOCE. Ihre Konzentration wie auch ihr Verhältnis zueinander beeinflussen den SOCE maßgeblich. Da der SOCE durch Chorein beeinflusst wird, war die Frage, ob die Menge an Orai1 und STIM1 durch Chorein verändert werden.

Zunächst erfolgte die Untersuchung auf Transkriptionsebene durch RT-PCR. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden nach der Aussaat mit siRNA für VPS13A (siVPS13A) oder Kontroll-siRNA (siNeg) transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit TriFast lysiert, die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese in der RT-PCR quantifiziert (s. 2.2.3). Die RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für Orai1, STIM1 und das Haushaltsgen GAPDH durchgeführt. Relativ zu GAPDH zeigte sich eine signifikante Reduktion von Orai1-mRNA nach Gen-Knockdown von VPS13A ( $n = 6$ ,  $p = 0,0044$ ). STIM1 hingegen war unverändert exprimiert ( $n = 6$ ,  $p = 0,16$ ). Somit wird Orai1 Chorein-abhängig auf Transkriptionsebene reguliert (Abb. 9 A).

Da STIM1 nicht von Chorein beeinflusst wurde, erfolgte ergänzend die Untersuchung des STIM1-Homologs STIM2. Interessanterweise war im Gegensatz zu STIM1 eine deutliche Verminderung der STIM2-Transkripte nach der Gen-Knockdown von Chorein festzustellen ( $n = 6$ ,  $p = 0,0087$ ) (Abb. 9 B,C).

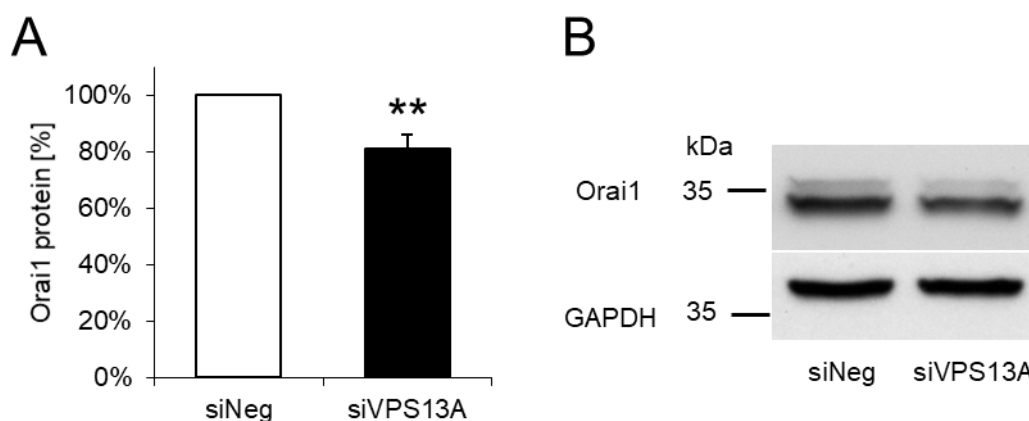


**Abb. 9: RT-PCR von Orai1, STIM1 und STIM2 nach Gen-Knockdown von VPS13A.** ZF-Rhabdomyosarkomzellen wurden mit siRNA gegen VPS13A (siVPS13A, schwarz) oder nontargeting siRNA (siNeg, weiß) transfiziert. Die Diagramme zeigen die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM der Orai1 (A), STIM1 (B) und STIM2 (C) mRNA-Menge relativ zu GAPDH. **A:** Die Zahl der Orai1-Transkripte ist nach Gen-Knockdown von VPS13A signifikant vermindert ( $n = 6$ , \*\*  $p < 0,01$ ; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 1,0). **B:** Unveränderte mRNA-Menge von STIM1 nach dem Gen-Knockdown ( $n = 6$ ; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 1,0). **C:** Im Gegensatz zu STIM1 nahm die Zahl der STIM2-Transkripte nach dem Gen-Knockdown von VPS13A deutlich ab ( $n = 6$ , \*\*  $p < 0,01$ ; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 1,0). (A,B: Publiziert in Yu et al. 2016)

### 3.3.3 Proteinmenge und -Verteilung von Orai1 nach Gen-Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen

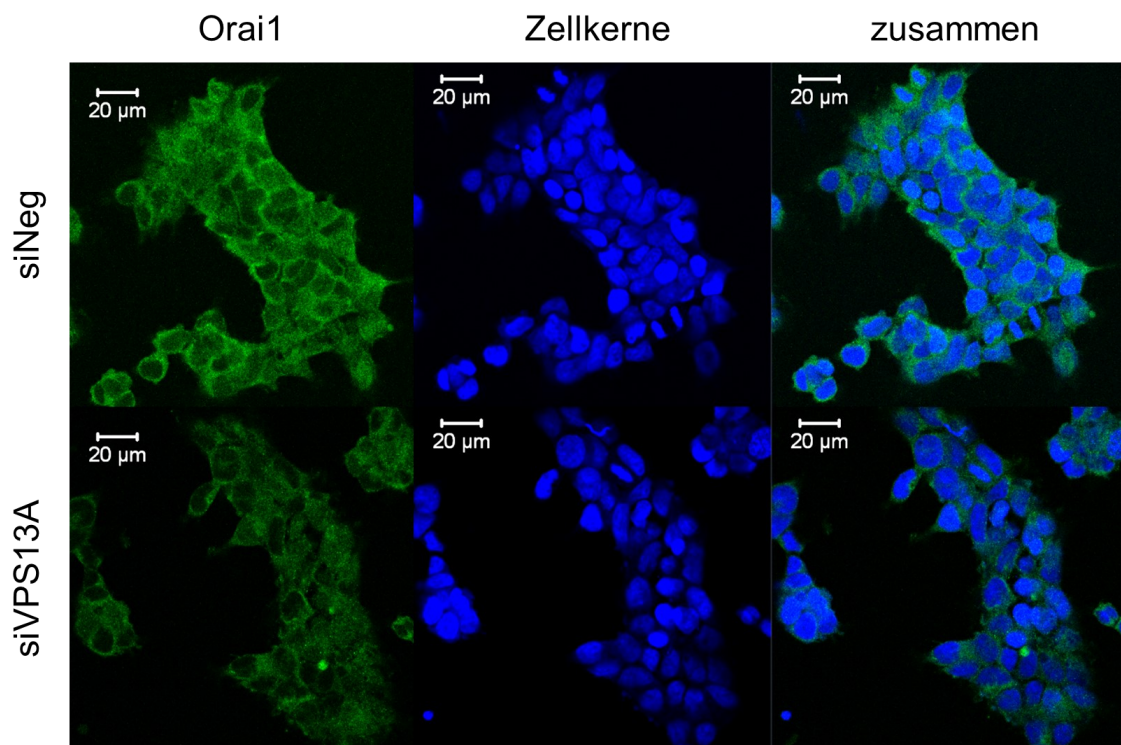
Nachdem festgestellt wurde, dass der Gen-Knockdown von Chorein zur Verminderung der Orai1-Transkripte führt, sollten die Auswirkungen auf Proteinebene untersucht werden.

Dazu erfolgte zunächst der Proteinnachweis mittels Western Blot. siVPS13A oder siNeg ZF-Zellen wurden mit RIPA Puffer lysiert und die gewonnenen Proteine auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran überführt und mit spezifischen Antikörpern für Orai1 oder GAPDH und einem sekundären, Meerrettichperoxidase-beladenen Antikörper inkubiert (s. 2.2.4). Die anschließend durch Chemolumineszenz detektierten Proteinbanden zeigten in siVPS13A einen signifikanten Rückgang der Proteinmenge von Orai1 im Gegensatz zu siNeg und bestätigten die Erkenntnis aus der RT-PCR ( $n = 8$ ,  $p = 0,0016$ ; Abb. 10).



**Abb. 10: Orai1-Proteinmenge in ZF-Zellen nach Gen-Knockdown von VPS13A** (siVPS13A, schwarz) und der Negativkontrolle (siNeg, weiß). **A:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der Proteinmenge an Orai1 in Relation zu GAPDH (n = 8). Es zeigte sich ein Abfall in der Orai1-Proteinmenge nach Gen-Knockdown von VPS13A. (\*\* p < 0,01; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 1,0). **B:** Repräsentatives Original-Western Blot für Orai1 und GAPDH. Nach der Auswertung von Orai1 wurden die Orai1-Antikörper durch Stripping entfernt und die Membranen auf GAPDH untersucht (siehe 2.2.4). (Publiziert in Yu et al. 2016)

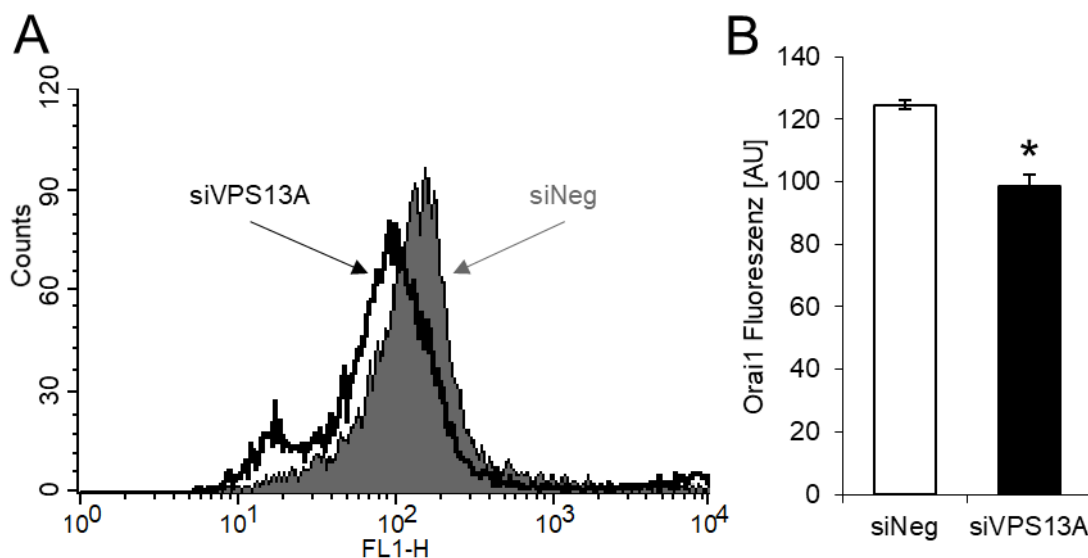
In einem weiteren Versuch wurde Orai1 in den Zellen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. siVPS13A oder siNeg Zellen wurden nach Fixation in Paraformaldehyd mit Triton X-100 permeabilisiert, um eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen. Hierfür wurden sie mit einem spezifischen Orai1-Primär- und einem CF 488A-verknüpften Sekundärantikörper inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Darstellung der Zellkerne mittels des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes DRAQ5. Abb. 11 zeigt eine deutliche Reduktion der Orai1-Proteine in der gesamten Zelle.



**Abb. 11: Visualisierung von Orai1 mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.** ZF-Rhabdomyosarkomzellen wurden mit siRNA gegen VPS13A (siVPS13A) oder nontargetingRNA (siNeg) transfiziert. Nach Fixation wurden die Zellen permeabilisiert, um eine Markierung von intrazellulären Strukturen zu ermöglichen. Die Färbung von Orai1 erfolgte mittels Antikörper (grün). Zusätzlich wurden die Zellkerne durch den Fluoreszenzfarbstoff DRAQ5 sichtbar gemacht (blau). Die Aufnahmen zeigen eine deutlich verminderte Antikörperfluoreszenz nach Knockdown von Chorein. (Publiziert in Yu et al. 2016)

Für einen funktionsfähigen SOCE wird Orai1 in der Plasmamembran benötigt. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen, dass Orai1 auch im Zytoplasma nachweisbar ist. Um die Menge von Orai1 in der Zelloberfläche zu ermitteln, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

Hierzu wurden siVPS13A oder siNeg Zellen nach Trypsinierung sowie Fixation in Paraformaldehyd mit einem spezifischen Orai1-Primär- und einem CF 488A-verknüpften Sekundärantikörper inkubiert. In der durchflusszytometrischen Messung zeigte sich das membranständige Orai1 in siVPS13A Zellen deutlich vermindert ( $n = 6$ ,  $p = 0,024$ ) (Abb. 12).



**Abb. 12: Ermittlung von Orai1 auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (FACS).** ZF-Rhabdomyosarkomzellen wurden mit siRNA gegen VPS13A (siVPS13A) oder nontargeting siRNA (siNeg) transfiziert (n = 6). Für die Messung wurden die Zellen in Paraformaldehyd fixiert. Die Markierung von Orai1 erfolgte mittels fluoreszierender Antikörper. **A:** Das Histogramm zeigt die Anzahl der Detektionen (Counts) abhängig von der Intensität der anti-Orai1 Fluoreszenz (FL1-H). Insgesamt zeigt sich nach Gen-Knockdown von VPS13A eine Verschiebung nach links (geringere Fluoreszenz). **B:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der anti-Orai1 Fluoreszenz. Nach Gen-Knockdown von VPS13A ist der Nachweis von oberflächlichem Orai1 signifikant vermindert (\*  $p < 0,05$ ; zweiseitiger ungepaarter T-Test). (Publiziert in Yu et al. 2016)

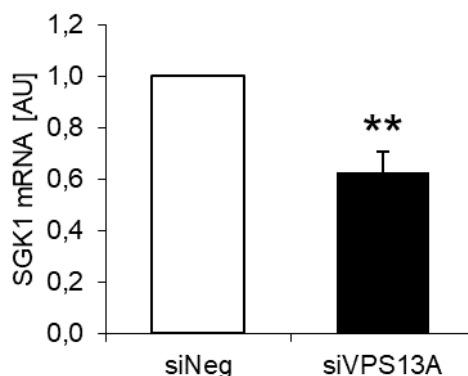
### 3.3.4 Expression von SGK1 nach Gen-Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen

Die Serin/Threonin-Proteinkinase SGK1 ein starker Aktivator des SOCE (siehe 1.5). In 3.1.2 wurde gezeigt, dass dies auch in ZF-Zellen zutrifft. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob der Einfluss von Chorein auf SOCE über SGK1 erfolgt.

Dazu wurden ZF-Zellen 24 Stunden nach der Aussaat mit siRNA für VPS13A (siVPS13A) oder Kontroll-siRNA (siNeg) transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit TriFast lysiert, die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese in der RT-PCR quantifiziert (s. 2.2.3). Die RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für SGK1 und das Haushaltsgen GAPDH durchgeführt.

Relativ zu GAPDH zeigte sich eine signifikante Reduktion von SGK1-mRNA nach Gen-Knockdown von VPS13A ( $p = 0,0052$ ; Abb. 13). Somit reduzierte ein Mangel an Chorein die Transkription der SGK1 deutlich.



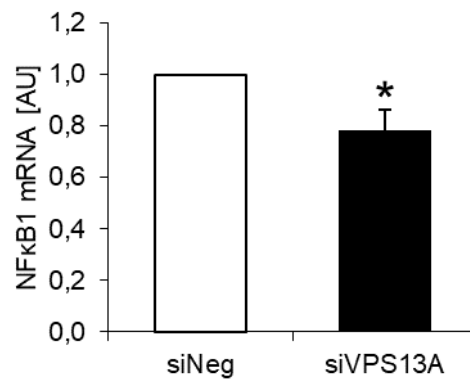


**Abb. 13: Einfluss von Chorein auf die Expression von SGK1** nach Knockdown von VPS13A in ZF-Rhabdomyosarkomzellen (siVPS13A, schwarzer Balken) und der Negativkontrolle (siNeg, weißer Balken). Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Menge an SGK1 in Relation zum Haushaltsgen GAPDH (n = 6). Es zeigte sich in der RT-PCR eine deutliche Verminderung der SGK1-mRNA nach Gen-Knockdown von VPS13A. (\*\* p < 0,01; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 1,0). (Publiziert in Yu et al. 2016)

### 3.3.5 Expression von NF $\kappa$ B nach Gen-Knockdown von VPS13A in ZF-Zellen

Es ist bekannt, dass die SGK1 den SOCE über NF $\kappa$ B steuern kann (siehe 1.5.2). In 3.1.3 wurde gezeigt, dass der SOCE von NF $\kappa$ B abhängig ist. Daher sollte untersucht werden, ob Chorein NF $\kappa$ B beeinflusst. Hierzu wurde die Transkription von NF $\kappa$ B1 als Bestandteil des gängigsten p50/65 Heterodimers untersucht. Zu diesem Zweck wurden ZF-Zellen 24 Stunden nach der Aussaat mit siRNA für VPS13A (siVPS13A) oder Kontroll-siRNA (siNeg) für 48 Stunden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit TriFast lysiert, die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese in der RT-PCR quantifiziert (s. 2.2.3). Die RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für NF $\kappa$ B1 und das Haushaltsgen GAPDH durchgeführt.

Relativ zu GAPDH zeigte sich eine signifikante Reduktion der NF $\kappa$ B1-Transkripte nach Gen-Knockdown von VPS13A (n = 6, p = 0,048) (Abb. 14). Folglich verminderte der Chorein-Mangel die Transkription der NF $\kappa$ B1.



**Abb. 14: Einfluss von Chorein auf die Expression von NFκB** nach Knockdown von VPS13A in ZF-Rhabdomyosarkomzellen (siVPS13A, schwarzer Balken) und der Negativkontrolle (siNeg, weißer Balken). Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Menge an NFκB1 in Relation zu GAPDH (n = 6). Es zeigte sich in der RT-PCR eine signifikante Verminderung der NFκB1-mRNA nach Gen-Knockdown von VPS13A. (\*  $p < 0,05$ ; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 1,0). (Publiziert in Yu et al. 2016)

## 4 DISKUSSION

Krebs entwickelt sich im 21. Jahrhundert durch die steigende Lebenserwartung unter den Errungenschaften der modernen Medizin zur führenden Todesursache weltweit. Dadurch ist Krebs eines der wichtigsten medizinischen Forschungsthemen unserer Zeit (Bray et al. 2018). Krebs besitzt grundlegende Eigenschaften, die von Hanahan und Weinberg charakterisiert wurden. Zu ihren Kennzeichen gehören die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Invasion und Metastasierung, unbegrenzte Teilungsfähigkeit, Förderung der Angiogenese, Modulation des Zellmetabolismus, Umgehung der Immunreaktion und das Entgehen der Apoptose (Hanahan und Weinberg 2011; Fouad und Aanei 2017; Hanahan und Weinberg 2000).

Einige Krebszellen weisen eine hohe Abhängigkeit von bestimmten Proteinen auf. In den Fokus gelang in den letzten Jahren zunehmend das Protein Chorein, das als Lipidtransporter zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und anderen Zellorganellen fungiert (Kumar et al. 2018). Bekannt wurde Chorein zunächst als Gendefekt in der Chorea-Akanthozytose (ChAc), einer Krankheit, die mit Neurodegeneration, Myopathie und Akanthozytose verbunden ist (Velayos Baeza et al. 2002). Bisherige Untersuchungen ergaben, dass Chorein das Überleben von Tumorzellen durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) beeinflussen kann (Honisch et al. 2015a). Daneben unterstützt Chorein die Autophagie (Lupo et al. 2016; Muñoz-Braceras et al. 2015; Nixon 2013; Petibone et al. 2017). Zudem beeinträchtigt ein Mangel an Chorein die Stabilität des Zytoskeletts, welches zelluläre Funktionen wie die Zellmotilität und das Überleben beeinflusst (Papakonstanti und Stournaras 2008; Infante und Ridley 2013; Chen et al. 2014; Honisch et al. 2015b; Franklin-Tong und Gourlay 2008). Aufgrund seiner vielfältigen, bereits bekannten Funktionen liegt es nahe, dass Chorein neben der Steigerung des Überlebens weitere tumorfördernde Eigenschaften besitzt (siehe 1.1.2).

Zahlreiche Gene und Signalwege sind für die Entstehung und Aggressivität von Tumoren verantwortlich. Unter ihnen ist der speicherabhängige Kalzium-

einstrom (SOCE), ein bedeutender Bestandteil des zellulären Kalziumhaushaltes, dessen Funktion auf dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorprotein Stromales Interaktionsmolekül 1 (STIM1) und dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalprotein Orai1 beruht. Der SOCE aktiviert in vielen Krebsarten wichtige Krebseigenschaften wie das Überleben und die Therapieresistenz, Invasion und Metastasierung (siehe 1.4). Ein wichtiger Regulator des SOCE ist SGK1, ein Zielprotein des PI3K-Weges, der den SOCE über die Stimulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (engl. „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“) steuern kann (Borst et al. 2012; Eysten et al. 2012; García-Martínez und Alessi 2008; Kobayashi und Cohen 1999; Park et al. 1999). Da Chorein die PI3K durch Phosphorylierung und Aktivierung beeinflusst, bestand der Verdacht, dass Chorein die SGK1 und damit auch den SOCE steuert.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Chorein den SOCE beeinflusst. Die Untersuchungen erfolgten in der ZF-Zelllinie eines fortgeschrittenen resistenten humanen Rhabdomyosarkoms, das Chorein zum Überleben benötigt und es in besonders hohem Maße exprimiert.

Der SOCE in ZF-Zellen wurde durch die Leerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher aktiviert und fluoreszenzmikroskopisch gemessen. Die vorliegenden Experimente verifizierten, dass die ZF-Zellen einen funktionsfähigen SOCE besitzen. Durch 2-APB wurde der beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nahezu vollständig gehemmt (siehe 3.1.1). Des Weiteren konnte durch den SGK1-Inhibitor EMD638683 sowie dem NF $\kappa$ B-Inhibitor Wogonin gezeigt werden, dass SGK1 und NF $\kappa$ B den SOCE in ZF-Zellen fördern.

Grundlage für die Untersuchung der Auswirkungen von Chorein bildete der Gen-Knockdown des kodierenden Gens VPS13A durch die Transfektion mit komplementärer „Small interfering RNA“ (siRNA) (Honisch et al. 2015a; Föller et al. 2012; Schmidt et al. 2013; Alesutan et al. 2013; Honisch et al. 2015c). Folglich war die Menge der Chorein-Transkripte in den behandelten ZF-Zellen vermindert.

Der Gen-Knockdown von Chorein beeinträchtigte den SOCE signifikant (3.3.1). Ursächlich dafür war die Affektion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalbildners Orai1 auf Transkripti-

onsebene. Als Konsequenz zeigte sich der zelluläre Orai1-Gesamtgehalt im Western Blot und in der konfokalen Mikroskopie vermindert. Mittels FACS-Analyse wurde darüber hinaus eine signifikante Verminderung von Orai1 auf der Zelloberfläche nachgewiesen (3.3.3).

STIM1 und Orai1 gelten als klassische Akteure im SOCE. Hoover und Lewis zeigten in humanen embryonalen Nierenzellen (engl. „Human embryonic kidney cells“, HEK293), dass ein stöchiometrisches STIM1-Orai1-Optimum existiert und Unter- oder Überexpressionen von Orai1 den SOCE beeinträchtigen (Hoover und Lewis 2011). Eine experimentelle Überexpression von Orai1 führte in Lungenkrebs-Zellen zu einer deutlichen Hemmung des SOCE (Hou et al. 2011). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu der Erkenntnis, dass in vielen Tumorzellen mit erhöhtem SOCE Orai1 und STIM1 nicht gleichermaßen überexprimiert werden. So konnte in einigen Krebsarten wie dem Brustkrebs, klarzelligem Nierenzellkarzinom oder Ösophaguskarzinom eine Überexpression von Orai1 beobachtet werden, ohne dass sich die STIM1-Expression veränderte. Die Orai1-Überexpression ging dennoch mit einer erhöhten Aktivität des SOCE einher (Villalobos et al. 2016; Yang et al. 2009; Zhu et al. 2014). Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Mangel an Cholesterin Orai1 verringert, hingegen STIM1 nicht beeinflusst (3.3.2). Eine Ursache der Diskrepanz zwischen den Studien könnte sein, dass die Vorläufer mancher Tumorzellen eine ungünstige Stim1-Orai1-Stöchiometrie aufwiesen, die erst in der Tumorentstehung ausgeglichen wird. Da die Natur nach einem effizienten Zellhaushalt strebt, wäre dies für den SOCE jedoch wenig sinnvoll. Denkbar ist stattdessen, dass die Funktion des konstant exprimierten Proteins durch ein zusätzliches Analogon kompensiert wird. Hinsichtlich der Orai-Proteine etwa können in Einzelfällen, wie beim Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebs, Orai-Homologe die Orai1-Funktion übernehmen (Motiani et al. 2010).

Die Austauschbarkeit der STIM-Proteine ist hingegen prinzipiell nicht ohne weiteres gegeben, da dem Homolog STIM2 aufgrund der zu STIM1 geminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität eher die Aufrechterhaltung der basalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zugeschrieben wird. Zudem ist sein Wirkungspotential geringer (Liou et al. 2005; Brandman et al. 2007). Eine Gen-Ausschaltung von STIM2 wirkt sich somit kaum auf den

SOCE aus (Peel et al. 2006), während eine Überexpression von STIM2 sogar den STIM1-vermittelten SOCE kompetitiv behindern kann (Soboloff et al. 2006b). Beachtlich ist jedoch, dass in humanen embryonalen Nierenzellen und humanen Melanomzellen eine simultane Mehrexpression von STIM2 und Orai1 einer Steigerung des SOCE verursacht (Soboloff et al. 2006a; Stanisz et al. 2014). Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zeigte sich eine markante Rolle von STIM2 und Orai1 für den SOCE, nicht zuletzt da ein Gen-Knockdown von STIM1 den SOCE nicht beeinflusst (Zhu et al. 2014).

Tatsächlich zeigt sich in dieser Arbeit, dass der Gen-Knockdown von Chorein die Expression der STIM2, nicht aber der STIM1, hemmt. Die funktionelle Rolle von STIM2 im SOCE wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und könnte beispielsweise mit einem Gen-Knockdown von STIM2 und nachfolgender Messung des SOCE erfolgen. Es ist nach den Erkenntnissen aus der Literatur daher anzunehmen, hier jedoch nicht bewiesen, dass Chorein durch die simultane Überexpression von Orai1- und STIM2 die Aktivität des SOCE fördert.

Es stellte sich ferner die Frage, auf welche Weise Chorein den Einfluss auf Orai1 und STIM2 bewirkt. Da Chorein die PI3K bekannterweise beeinflusst, lag es nahe, dass die Effekte über SGK1 vermittelt werden. PI3K führt zur Phosphorylierung der SGK1 an den Stellen Thr256 und Ser422 durch Aktivierung der 3-Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1), PDK2 und dem „mechanistic Target of Rapamycin“ (mTOR) Komplex 2 (Park et al. 1999; Kobayashi und Cohen 1999). Die Aktivierung der SGK1 wiederum führt in embryonalen Nierenzellen, Mastzellen und Megakaryoblasten zu einer Steigerung des SOCE durch eine vermehrte Orai1-Transkription (Borst et al. 2012; Eylestein et al. 2011; Eylestein et al. 2012).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, beeinträchtigt die Inhibition von SGK1 den SOCE in ZF-Zellen. Weiterhin konnte hier nachgewiesen werden, dass Chorein die SGK1 bereits auf Transkriptionsebene stimuliert: Der Gen-Knockdown von Chorein vermindert die SGK1 Messenger-RNA deutlich (siehe 3.3.4).

Es war bekannt, dass die SGK1 die Ubiquitylierung von Orai1 durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 verhindern kann, um den SOCE zu erhöhen (Eyle-

stein et al. 2011). Zudem kann die SGK1 in Mastzellen und embryonalen Nierenzellen über die Stimulation von NFκB die Transkription der Proteine STIM1 und Orai1 steigern (Eylenstein et al. 2012). In dieser Arbeit wurde unter Einsatz von Wogonin gezeigt, dass NFκB den SOCE in ZF-Zellen beeinflusst. In einem zweiten Schritt wurde nachgewiesen, dass Chorein NFκB reguliert: Der Gen-Knockdown von Chorein führt zur Verminderung der NFκB1 (p50)-Transkripte (3.3.5). Dieses ist Bestandteil des am Häufigsten anzutreffenden NFκB-Dimers (Siebenlist et al. 1994).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern das Spektrum der bekannten Funktionen von Chorein. Durch diese Versuchsreihe wurde erstmals gezeigt, dass Chorein den SOCE beeinflusst. Ein Mangel an funktionsfähigem Chorein beeinträchtigt den SOCE und vermittelt diesen Effekt über die SGK1 sowie NFκB und führt zur verminderten Transkription von Orai1.

Der Einfluss auf SGK1 unterstreicht die vielfältigen Funktionen von Chorein. SGK1 wird vielfach auf endo- und parakrinem Wege durch zahlreiche Hormone und Zytokine stimuliert und wird bei schädigenden äußeren Einflüssen wie Hypoxie, UV-Strahlung, oxidativem Stress oder Überwärmung vermehrt exprimiert, wodurch der stressinduzierte Zelltod und Gewebeischämien vermindert werden (Leong et al. 2003; Nishida et al. 2004; Xie et al. 2018; Lang et al. 2006). Die Regulation der SGK1-Transkription ist Grundlage vieler relevanter Zellfunktionen, ihre Überexpression schützt vor den Folgen vital bedrohlicher Einflüsse, fördert das Überleben und die Therapieresistenz von Tumoren (s. 1.5).

Die neue Erkenntnis, dass Chorein den SOCE reguliert, öffnet ein breites Feld weiterer tumorrelevanter Funktionen. Der SOCE spielt eine Schlüsselrolle im intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalwegen und ist an vielen Kennzeichen von Krebs beteiligt (Hogan und Rao 2015; Fiorio Pla et al. 2016). Zahlreiche Krebsarten sind im Hinblick auf die Invasion, Migration, Proliferation und das Überleben auf eine gesteigerte Aktivität des SOCE angewiesen (s. 1.4).

Chorein fördert das Überleben in ZF-Zellen. Dies ist, mindestens zum Teil, auf die Aktivierung der PI3K sowie BCL-2 und Hemmung von Bax zurückzuführen

(Honisch et al. 2015a). Mit den hier vorliegenden Ergebnissen ist davon auszugehen, dass ebenfalls der SOCE an der antiapoptotischen Wirkung von Chorein beteiligt ist. Der SOCE vermindert die Anfälligkeit von Tumorzellen gegenüber Radiotherapien sowie Zytostatika wie 5-Fluorouracil, Gemcitabin oder Cisplatin (Kondratska et al. 2014; Schmidt et al. 2014a). Zusätzlich steigert es insgesamt das Überleben von Glioblastomzellen (Liu et al. 2011). Darüber hinaus ist bekannt, dass der SOCE die Migration, Invasion und Proliferation in Rhabdomyosarkomen und anderen Tumoren fördert (Schmid et al. 2016). Der SOCE stimuliert die Angiogenese, indem er die Produktion der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren fördert und in den Endothelzellen selbst an der Gefäßformation beteiligt ist (Li et al. 2011b). Eine gesteigerte Aktivität des SOCE korreliert in vivo mit einem fortgeschrittenerem Tumorstadium, einer gesteigerten Therapieresistenz und einer schlechteren Prognose (Chen et al. 2011; Zhu et al. 2014). Es ist daher zu erwarten, dass Chorein-überexprimierende Tumore wie das ZF-Rhabdomyosarkom durch die Steigerung des SOCE klinisch besonders aggressiv auftreten. Tatsächlich stammt die ZF-Zelllinie aus einem fortgeschrittenen, wenig differenzierten Rhabdomyosarkom, das multipel metastasiert und bereits mit zahlreichen Chemotherapeutika vortherapiert war (Zaborski 2019).

Im Kampf gegen den Krebs werden Eigenschaften gesucht, die Krebszellen von gesunden Zellen unterscheidet. Hierzu zählen tumorrelevante Proteine und Zellfunktionen, die als therapeutisches Angriffsziel dienen können. Der SOCE ist auf verschiedenen Ebenen wichtig für Tumorzellen. Gleichzeitig ist er ein Hauptbestandteil  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerter Signalwege in gesunden wie in malignen Zellen. Defekte im SOCE sind daher mit schwerwiegenden Folgen verbunden. Vor allem kommt es durch die Störung der T-Zellen, aber auch anderen Immunzellen, zu schweren Immundefekten, die die Lebenserwartung massiv einschränken (Feske et al. 2010). Ein Mangel an Chorein schränkt den SOCE ein, ein Defekt von Chorein hingegen ist nicht mit einer frühen Letalität verbunden. Der klinische Verlauf der Chorea-Akanthozytose beim Menschen verdeutlicht, dass selbst der vollständige Funktionsverlust von Chorein mit dem Leben vereinbar ist. Die klinisch relevante Symptomatik, obwohl progressiv bis hin zum



Tod, beginnt beim Menschen im Mittel erst um das 30. Lebensjahr (siehe 1.1.1). Bei einer spezifischen Hemmung von Chorein *in vivo* wären somit keine akut relevanten, Chorein-assoziierten Nebenwirkungen zu erwarten. Chorein ist daher aus funktioneller Sicht ein potenziell geeignetes Zielprotein in der Krebstherapie. Ein Ausschalten von Chorein könnte durch die Hemmung des SOCE nicht nur die Sterberate von Tumorzellen erhöhen, sondern sie gleichzeitig für Chemo- und Radiotherapien sensibilisieren. Darüber hinaus ist aufgrund bereits der genannten Wirkungen des SOCE die Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung zu erwarten. Voraussetzung für die Wirkung einer Chorein-Hemmung ist jedoch eine gesteigerte Chorein-Expression der Tumorzellen (Honisch et al. 2015a).

Die Steuerung des SOCE durch Chorein hat nicht nur Bedeutung in Tumorzellen. Als ein zentraler Bestandteil des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes erfüllt der SOCE vielfältige Zellfunktionen. Er ist beteiligt an Signalwegen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, die innerhalb subzellulärer Mikrodomänen stattfinden, und kontrolliert zahlreiche zellspezifische Funktionen, wie der Aktivierung von Immunzellen und Thrombozyten, Myogenese und Muskelkontraktilität, axonale Ausreifung und neuronale Plastizität, oder unterschiedlicher Sekretionsmechanismen (Kar et al. 2011) (siehe 1.3.3.5). Teilweise korrelieren die Folgen eines gestörten SOCE mit der Klinik der Chorea-Akanthozytose (ChAc), sodass ein Zusammenhang zu vermuten ist. So sind Störungen des SOCE mit Myopathien verbunden (Cho et al. 2017; Lacruz und Feske 2015; Wei-Lapierre et al. 2013), welche auch bei der Chorea-Akanthozytose zu beobachten sind (Saiki et al. 2007). Zudem führt ein Defekt von Chorein ebenso wie ein Defekt des SOCE zum Untergang von Neuronen. Die Wiederherstellung des SOCE konnte das Zellüberleben von ChAc-Neuronen verbessern, eine vielversprechende Erkenntnis für betroffene Patienten (Pelzl et al. 2017a).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass der speicherabhängige Kalziumeinstrom abhängig von Chorein ist. In ZF-Rhabdomyosarkom-Zellen, die besonders viel Chorein exprimieren, verringert der Gen-Knockdown von Chorein den speicherabhängigen Kalziumeinstrom signifikant. Somit fördert Chorein mutmaßlich den SOCE. Ein Mangel an Chorein verringert die Expres-

sion des Kanalproteins Orai1 sowie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorproteins STIM2, bei jedoch unveränderter Expression von STIM1. Die Effekte erreicht Chorein durch die Stimulation der Expression der Serum- und Glukokortikoid-regulierten Kinase 1, einem Zielprotein des Phosphoinositid-3-Kinase-Weges, sowie des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Chorein einen beachtlich höheren Einfluss auf die grundlegenden Eigenschaften von Tumorzellen haben kann als bislang angenommen. Chorein beeinflusst den SOCE, welcher ein bedeutsamer Bestandteil des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes ist und zahlreiche Zellfunktionen steuert. Der SOCE ist ein bedeutsamer Förderer Krebsdefinierender Eigenschaften wie der Invasion, Migration, Proliferation, dem Überleben und der Stimulation der Angiogenese und ist mit einer gesteigerten Therapieresistenz sowie einer schlechteren Krankheitsprognose verbunden. Ein Funktionsverlust von Chorein wirkt sich auf den restlichen Organismus zunächst kaum aus, erst mit einer Latenz von im Mittel etwa 30 Lebensjahren kommt es zu einer klinischen Relevanz mit dem vorherrschenden Bild der Neurodegeneration. Funktionsverluste des SOCE sind hingegen mit erheblich schwereren, früh einsetzenden Folgen verbunden. Chorein besitzt daher ein hohes Potenzial als Zielprotein einer Krebstherapie in Chorein-überexprimierenden Tumoren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Chorein ist ein Protein, das durch das Gen VPS13A (Vesikel-assoziiertes Membranprotein 8) codiert wird. Ein Defekt in diesem Gen führt zur Chorea-Akanthozytose, einer Erkrankung, die durch eine progrediente Neurodegeneration sowie Akanthozytose gekennzeichnet ist. Chorein ist an Vorgängen der Exozytose und des intrazellulären Lipidtransportes beteiligt und stabilisiert das Zytoskelett. Zudem kann Chorein durch die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) das Überleben von Tumorzellen fördern. Das Überleben sowie weitere Tumor-definierende Eigenschaften wie die Proliferation, Migration und Invasion werden wesentlich durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalvorgänge beeinflusst. Leeren sich die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, werden sie durch den Speicherabhängigen Kalziumeinstrom (SOCE) wiederbefüllt. Die Hauptaktuere des SOCE, das  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensorprotein Stromales Interaktionsmolekül 1 (STIM1) und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalprotein Orai1, werden in ihrer Transkription durch die Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1) und den Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NF $\kappa$ B) reguliert. SGK1 wiederum ist ein Zielprotein des PI3K-Weges. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Chorein SOCE und seine Komponenten beeinflusst und dieser Effekt auf die Veränderung der SGK1 zurückzuführen ist. Die alveoläre Rhabdomyosarkomzelllinie ZF weist eine hohe Expression und Abhängigkeit von Chorein auf und diente als Modell für die Untersuchungen.

Um die Wirkung von Chorein zu untersuchen, wurde die Chorein-Expression in ZF-Zellen mittels Knockdown des Gens VPS13A vermindert. SOCE wurde durch die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit dem Farbstoff Fura-2 nach Leerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher mittels Thapsigargin fluoreszenzmikroskopisch erfasst. Die Transkription von Chorein, SGK1, NF $\kappa$ B, STIM1, STIM2 und Orai1 wurden mit Hilfe der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR) quantifiziert. Die Orai1 Proteinmenge wurde mittels Western Blot, Durchflusszytometrie (FACS) und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

Nach dem Gen-Knockdown von VPS13A konnte ein geringerer SOCE beobachtet werden. Diese basierte auf einer Verminderung der Orai1-Expression mit Reduktion der Orai1-Proteinmenge in der gesamten Zelle sowie auf der Zelloberfläche. Zusätzlich zeigte sich eine verminderte Expression von STIM2, nicht aber von STIM1. Der Gen-Knockdown von VPS13A führte zu einem Rückgang der SGK1- und NFκB1-Transkription. Versuche mit dem Orai1-Inhibitor 2-Aminoethoxydiphenylborat, SGK1-Inhibitor EMD638683 und NFκB-Inhibitor Wogonin resultierten ebenfalls in einer Verminderung des SOCE.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Chorein SOCE in ZF-Rhabdomyosarkomzellen beeinflusst. Dies erfolgt durch die Steuerung der Orai1- und STIM2-Expression, ein Effekt, der mindestens zum Teil auf die Aktivierung von SGK1 und NFκB zurückzuführen ist. Die Ergebnisse bekräftigen die Rolle von Chorein in Tumorzellen und ihr therapeutisches Potenzial in der Krebstherapie.

## 6 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

**Yu W**, Honisch S, Schmidt S, Yan J, Schmid E, Alkahtani S, AlKahtane AA, Alarifi S, Stournaras C, Lang F (2016) Chorein Sensitive Orai1 Expression and Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Rhabdomyosarcoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 40:1141–1152. doi:10.1159/000453168

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aasly J, Skandsen T, Ro M (1999) Neuroacanthocytosis--the variability of presenting symptoms in two siblings. *Acta Neurol Scand* 100:322–325
- Abbruzzese C, Mattarocci S, Pizzuti L, Mileo AM, Visca P, Antoniani B, Alessandrini G, Facciolo F, Amato R, D'Antona L, Rinaldi M, Felsani A, Perrotti N, Paggi MG (2012) Determination of SGK1 mRNA in non-small cell lung cancer samples underlines high expression in squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 31:4. doi:10.1186/1756-9966-31-4
- Ackermann TF, Boini KM, Beier N, Scholz W, Fuchss T, Lang F (2011) EMD638683, a novel SGK inhibitor with antihypertensive potency. *Cell Physiol Biochem* 28:137–146. doi:10.1159/000331722
- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:657–685. doi:10.1128/mubr.67.4.657-685.2003
- Akutsu N, Lin R, Bastien Y, Bestawros A, Enepekides DJ, Black MJ, White JH (2001) Regulation of gene Expression by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and Its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma Cells. *Mol Endocrinol* 15:1127–1139. doi:10.1210/mend.15.7.0655
- Al-Asmi A, Jansen AC, Badhwar A, Dubeau F, Tampieri D, Shustik C, Mercho S, Savard G, Dobson-Stone C, Monaco AP, Andermann F, Andermann E (2005) Familial temporal lobe epilepsy as a presenting feature of choreoacanthocytosis. *Epilepsia* 46:1256–1263. doi:10.1111/j.1528-1167.2005.65804.x
- Alesutan I, Seifert J, Pakladok T, Rheinlaender J, Lebedeva A, Towhid ST, Stournaras C, Voelkl J, Schaffer TE, Lang F (2013) Chorein sensitivity of actin polymerization, cell shape and mechanical stiffness of vascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 32:728–742. doi:10.1159/000354475
- Ali H, Christensen SB, Foreman JC, Pearce FL, Piotrowski W, Thastrup O (1985) The ability of thapsigargin and thapsigargin to activate cells involved in the inflammatory response. *Br J Pharmacol* 85:705–712
- Alonso ME, Teixeira F, Jimenez G, Escobar A (1989) Chorea-acanthocytosis: report of a family and neuropathological study of two cases. *Can J Neurol Sci* 16:426–431
- Amato R, Menniti M, Agosti V, Boito R, Costa N, Bond HM, Barbieri V, Tagliaferri P, Venuta S, Perrotti N (2007) IL-2 signals through Sgk1 and inhibits proliferation and apoptosis in kidney cancer cells. *J Mol Med* 85:707–721. doi:10.1007/s00109-007-0205-2
- Amato R, D'Antona L, Porciatti G, Agosti V, Menniti M, Rinaldo C, Costa N, Bellacchio E, Mattarocci S, Fuiano G, Soddu S, Paggi MG, Lang F, Perrotti N (2009) Sgk1 activates MDM2-dependent p53 degradation and affects cell proliferation, survival, and differentiation. *J Mol Med* 87:1221–1239. doi:10.1007/s00109-009-0525-5

- Ambion (2009) siPORT™ Amine Transfection Agent; Polyamine-Based Transfection Agent
- Avila-Medina J, Mayoral-Gonzalez I, Dominguez-Rodriguez A, Gallardo-Castillo I, Ribas J, Ordoñez A, Rosado JA, Smani T (2018) The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells. *Front Physiol* 9. doi:10.3389/fphys.2018.00257
- Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, Wakamori M, Numaga T, Mori Y, Iino M, Hikida M, Kurosaki T (2006) Coupling of STIM1 to store-operated Ca<sup>2+</sup> entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16704–16709. doi:10.1073/pnas.0608358103
- Bader B, Walker RH, Vogel M, Prosiegel M, McIntosh J, Danek A (2010) Tongue protrusion and feeding dystonia; A hallmark of chorea-acanthocytosis. *Mov Disord* 25:127–129. doi:10.1002/mds.22863
- Balghi H, Robert R, Rappaz B, Zhang X, Wohlhuter-Haddad A, Evagelidis A, Luo Y, Goepp J, Ferraro P, Romeo P, Trebak M, Wiseman PW, Thomas DY, Hanrahan JW (2011) Enhanced Ca<sup>2+</sup> entry due to Orai1 plasma membrane insertion increases IL-8 secretion by cystic fibrosis airways. *FASEB J* 25:4274–4291. doi:10.1096/fj.11-187682
- Bayreuther C, Borg M, Ferrero-Vacher C, Chaussenot A, Lebrun C (2010) Chorea-acanthocytosis without acanthocytes. *Rev Neurol (Paris)* 166:100–103. doi:10.1016/j.neurol.2009.03.005
- BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, Artunc F, Lang F, Hess J, Gorlach A (2006) The serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk-1 is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. *Circ Res* 98:828–836. doi:10.1161/01.RES.0000210539.54861.27
- Bergmeier W, Oh-Hora M, McCarl C-A, Roden RC, Bray PF, Feske S (2009) R93W mutation in Orai1 causes impaired calcium influx in platelets. *Blood* 113:675–678. doi:10.1182/blood-2008-08-174516
- Berridge MJ (1983) Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J* 212:849–858
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21. doi:10.1038/35036035
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517–529. doi:10.1038/nrm1155
- Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ (2001) The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* 142:1587–1594. doi:10.1210/endo.142.4.8095

- Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney JW (2008) Methods for Studying Store-Operated Calcium Entry. *Methods (San Diego, Calif.)* 46:204–212. doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.009
- Bird GS, Hwang S-Y, Smyth JT, Fukushima M, Boyles RR, Putney JW (2009) STIM1 is a calcium sensor specialized for digital signaling. *Curr Biol* 19:1724–1729. doi:10.1016/j.cub.2009.08.022
- Bohm J, Chevessier F, Maues De Paula A, Koch C, Attarian S, Feger C, Hantai D, Laforet P, Ghorab K, Vallat J-M, Fardeau M, Figarella-Branger D, Pouget J, Romero NB, Koch M, Ebel C, Levy N, Krahn M, Eymard B, Bartoli M, Laporte J (2013) Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy. *Am J Hum Genet* 92:271–278. doi:10.1016/j.ajhg.2012.12.007
- Bollimuntha S, Pani B, Singh BB (2017) Neurological and Motor Disorders: Neuronal Store-Operated Ca(2+) Signaling: An Overview and Its Function. *Adv Exp Med Biol* 993:535–556. doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_27
- Borst O, Schmidt EM, Munzer P, Schonberger T, Towhid ST, Elvers M, Leibrock C, Schmid E, Eylenestein A, Kuhl D, May AE, Gawaz M, Lang F (2012) The serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) influences platelet calcium signaling and function by regulation of Orai1 expression in megakaryocytes. *Blood* 119:251–261. doi:10.1182/blood-2011-06-359976
- Bradford MM (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. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brandman O, Liou J, Park WS, Meyer T (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels. *Cell* 131:1327–1339. doi:10.1016/j.cell.2007.11.039
- Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bösl M, Stoll G, Nieswandt B (2009) Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood* 113:2056–2063. doi:10.1182/blood-2008-07-171611
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Brickley DR, Mikosz CA, Hagan CR, Conzen SD (2002) Ubiquitin Modification of Serum and Glucocorticoid-induced Protein Kinase-1 (SGK-1). *J. Biol. Chem.* 277:43064–43070. doi:10.1074/jbc.M207604200
- Bronner F (2001) Extracellular and Intracellular Regulation of Calcium Homeostasis. *ScientificWorldJournal* 1:919–925. doi:10.1100/tsw.2001.489
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME (2001) Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 21:952–965. doi:10.1128/MCB.21.3.952-965.2001



- Burgess GM, Godfrey PP, McKinney JS, Berridge MJ, Irvine RF, Putney JW (1984) The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature* 309:63–66
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Cai X (2007) Molecular evolution and functional divergence of the Ca(2+) sensor protein in store-operated Ca(2+) entry; Stromal interaction molecule. *PLoS ONE* 2:e609. doi:10.1371/journal.pone.0000609
- Cai X, Zhou Y, Nwokonko RM, Loktionova NA, Wang X, Xin P, Trebak M, Wang Y, Gill DL (2016) The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer. *The Journal of Biological Chemistry* 291:25764–25775. doi:10.1074/jbc.M116.758813
- Calloway N, Holowka D, Baird B (2010) A Basic Sequence In STIM1 Promotes Ca<sup>2+</sup> Influx By Interacting With The C-Terminal Acidic Coiled-Coil Of Orai1†. *Biochemistry* 49:1067–1071. doi:10.1021/bi901936q
- Carafoli E, Krebs J (2016) Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *The Journal of Biological Chemistry* 291:20849–20857. doi:10.1074/jbc.R116.735894
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947. doi:10.1101/cshperspect.a003947
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2:563–572. doi:10.1038/nrc865
- Chen Y-F, Chiu W-T, Chen Y-T, Lin P-Y, Huang H-J, Chou C-Y, Chang H-C, Tang M-J, Shen M-R (2011) Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15225–15230. doi:10.1073/pnas.1103315108
- Chen Y, Chou W-C, Ding Y-M, Wu Y-C (2014) Caffeine inhibits migration in glioma cells through the ROCK-FAK pathway. *Cell Physiol Biochem* 33:1888–1898. doi:10.1159/000362966
- Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:98–106. doi:10.1038/35052017
- Cheng KT, Ong HL, Liu X, Ambudkar IS (2013) Chapter Seven - Contribution and Regulation of TRPC Channels in Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. In: Prakriya M (Hrsg) *Current Topics in Membranes : Store-Operated Calcium Channels*. Academic Press, S 149–179
- Cho C-H, Woo JS, Perez CF, Lee EH (2017) A focus on extracellular Ca<sup>2+</sup> entry into skeletal muscle. *emm* 49:e378. doi:10.1038/emm.2017.208

- Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim J-C, Kim MK (2002) Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* 14:382–387
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047–1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
- Collins SR, Meyer T (2011) Evolutionary Origins of STIM1 and STIM2 within Ancient Ca<sup>2+</sup> Signaling Systems. *Trends Cell Biol* 21:202–211. doi:10.1016/j.tcb.2011.01.002
- Concepcion AR, Vaeth M, Wagner LE2, Eckstein M, Hecht L, Yang J, Crottes D, Seidl M, Shin HP, Weidinger C, Cameron S, Turvey SE, Issekutz T, Meyts I, Lacruz RS, Cuk M, Yule DI, Feske S (2016) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry regulates Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels and eccrine sweat gland function. *J Clin Invest* 126:4303–4318. doi:10.1172/JCI89056
- Conza D, Mirra P, Cali G, Tortora T, Insabato L, Fiory F, Schenone S, Amato R, Beguinot F, Perrotti N, Ulianich L (2017) The SGK1 inhibitor SI113 induces autophagy, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in endometrial cancer cells. *J Cell Physiol* 232:3735–3743. doi:10.1002/jcp.25850
- Cosen-Binker LI, Binker MG, Wang C-C, Hong W, Gaisano HY (2008) VAMP8 is the v-SNARE that mediates basolateral exocytosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *J Clin Invest* 118:2535–2551. doi:10.1172/JCI34672
- Covington ED, Wu MM, Lewis RS (2010) Essential role for the CRAC activation domain in store-dependent oligomerization of STIM1. *Mol Biol Cell* 21:1897–1907. doi:10.1091/mbc.e10-02-0145
- Danek A, Sheesley L, Tierney M, Uttner I, Grafman J (2004) Cognitive and neuropsychiatric findings in McLeod syndrome and in chorea-acanthocytosis. In: Danek A (Hrsg) Neuroacanthocytosis Syndromes. Springer, Dordrecht, The Netherlands, S 95–115
- Danek A, Bader B, Velayos-Baeza A, Walker RH (2012) Autosomal recessive transmission of chorea-acanthocytosis confirmed. *Acta neuropathologica* 123:905–906. doi:10.1007/s00401-012-0971-y
- Davis FM, Janoshazi A, Janardhan KS, Steinckwich N, D’Agostin DM, Petranka JG, Desai PN, Roberts-Thomson SJ, Bird GS, Tucker DK, Fenton SE, Feske S, Monteith GR, Putney JW (2015) Essential role of Orai1 store-operated calcium channels in lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:5827–5832. doi:10.1073/pnas.1502264112
- Derler I, Fahrner M, Muik M, Lackner B, Schindl R, Groschner K, Romanin C (2009) A Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of ORAI1 channels. *The Journal of Biological Chemistry* 284:24933–24938. doi:10.1074/jbc.C109.024083
- Derler I, Plenck P, Fahrner M, Muik M, Jardin I, Schindl R, Gruber HJ, Groschner K, Romanin C (2013) The extended transmembrane Orai1 N-terminal (E-TON) region combines binding interface and gate for Orai1 activation by

- STIM1. *The Journal of Biological Chemistry* 288:29025–29034.  
doi:10.1074/jbc.M113.501510
- Di Cristofano A (2017) SGK1: The Dark Side of PI3K Signaling. *Curr Top Dev Biol* 123:49–71. doi:10.1016/bs.ctdb.2016.11.006
- DIMDI (2018) ICD-10-GM Version 2019; Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision - German modification. Deutsche Krankenhaus Verlagsgesellschaft mbH, Düsseldorf
- Dobson-Stone C, Danek A, Rampoldi L et al (2002) Mutational spectrum of the CHAC gene in patients with chorea-acanthocytosis. *Eur J Hum Genet* 10:773–781. doi:10.1038/sj.ejhg.5200866
- Dobson-Stone C, Velayos-Baeza A, Filippone LA, Westbury S, Storch A, Erdmann T, Wroe SJ, Leenders KL, Lang AE, Dotti MT, Federico A, Mohiddin SA, Fananapazir L, Daniels G, Danek A, Monaco AP (2004) Chorein detection for the diagnosis of chorea-acanthocytosis. *Ann Neurol* 56:299–302. doi:10.1002/ana.20200
- Dolmetsch RE, Lewis RS (1994) Signaling between intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and depletion-activated Ca<sup>2+</sup> channels generates Ca<sup>2+</sup> oscillations in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 103:365–388. doi:10.1085/jgp.103.3.365
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386:855–858. doi:10.1038/386855a0
- Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637–668
- Dong H, Zhang Y, Song R, Xu J, Yuan Y, Liu J, Li J, Zheng S, Liu T, Lu B, Wang Y, Klein ML (2019) Toward a Model for Activation of Orai Channel. *iScience* 16:356–367. doi:10.1016/j.isci.2019.05.041
- Dupont G, Combettes L, Bird GS, Putney JW (2011) Calcium Oscillations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. doi:10.1101/cshperspect.a004226
- Dziadek MA, Johnstone LS (2007) Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell Calcium* 42:123–132. doi:10.1016/j.ceca.2007.02.006
- Endo T, Kusakabe M, Sunadome K, Yamamoto T, Nishida E (2011) The kinase SGK1 in the endoderm and mesoderm promotes ectodermal survival by down-regulating components of the death-inducing signaling complex. *Sci Signal* 4:ra2. doi:10.1126/scisignal.2001211
- Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y-I, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I (2015) Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca<sup>2+</sup>(+) channels. *Hum Mol Genet* 24:637–648. doi:10.1093/hmg/ddu477

- Eylenstein A, Gehring EM, Heise N, Shumilina E, Schmidt S, Szteyn K, Munzer P, Nurbaeva MK, Eichenmuller M, Tyan L, Regel I, Foller M, Kuhl D, Soboloff J, Penner R, Lang F (2011) Stimulation of Ca<sup>2+</sup>-channel Orai1/STIM1 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1). *FASEB J* 25:2012–2021. doi:10.1096/fj.10-178210
- Eylenstein A, Schmidt S, Gu S, Yang W, Schmid E, Schmidt EM, Alesutan I, Szteyn K, Regel I, Shumilina E, Lang F (2012) Transcription factor NF- $\kappa$ B regulates expression of pore-forming Ca<sup>2+</sup> channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca<sup>2+</sup> entry and affect cellular functions. *The Journal of biological chemistry* 287:2719–2730. doi:10.1074/jbc.M111.275925
- Fahrner M, Schindl R, Muik M, Derler I, Romanin C (2017) The STIM-Orai Pathway; The Interactions Between STIM and Orai. *Adv Exp Med Biol* 993:59–81. doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_4
- Feldman CH, Grotegut CA, Rosenberg PB (2017) The role of STIM1 and SOCE in smooth muscle contractility. *Cell Calcium* 63:60–65. doi:10.1016/j.ceca.2017.02.007
- Feng Y, Wang Y, Xiong J, Liu Z, Yard B, Lang F (2006) Enhanced expression of serum and glucocorticoid-inducible kinase-1 in kidneys of L-NAME-treated rats. *Kidney Blood Press Res* 29:94–99. doi:10.1159/000093461
- Feske S, Giltzane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2:316–324. doi:10.1038/86318
- Feske S, Prakriya M, Rao A, Lewis RS (2005) A severe defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> channel activation and altered K<sup>+</sup> channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* 202:651–662. doi:10.1084/jem.20050687
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S-H, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179–185. doi:10.1038/nature04702
- Feske S, Picard C, Fischer A (2010) Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1. *Clin Immunol* 135:169–182. doi:10.1016/j.clim.2010.01.011
- Fillon S, Wärntges S, Matskevitch J, Moschen I, Setiawan I, Gamper N, Feng YX, Stegen C, Friedrich B, Waldegger S, Bröer S, Wagner CA, Huber SM, Klingel K, Vereninov A, Lang F (2001) Serum- and glucocorticoid-dependent kinase, cell volume, and the regulation of epithelial transport. *Comp Biochem Physiol , Part A Mol Integr Physiol* 130:367–376
- Fillon S, Klingel K, Wärntges S, Sauter M, Gabrysch S, Pestel S, Tanneur V, Waldegger S, Zipfel A, Viebahn R, Häussinger D, Bröer S, Kandolf R, Lang F (2002) Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. *Cell Physiol Biochem* 12:47–54. doi:10.1159/000047826

- Fiorio Pla A, Kondratska K, Prevarskaya N (2016) STIM and ORAI proteins: crucial roles in hallmarks of cancer. *Am J Physiol , Cell Physiol* 310:C509-19. doi:10.1152/ajpcell.00364.2015
- Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphaël M, Vandenberghe M, Abeele FV, Roudbaraki M, Lepage G, Mauroy B, Romanin C, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2010) Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 1:e75. doi:10.1038/cddis.2010.52
- Föllner M, Hermann A, Gu S, Alesutan I, Qadri SM, Borst O, Schmidt EM, Schiele F, Vom Hagen JM, Saft C, Schols L, Lerche H, Stournaras C, Storch A, Lang F (2012) Chorein-sensitive polymerization of cortical actin and suicidal cell death in chorea-acanthocytosis. *FASEB J* 26:1526–1534. doi:10.1096/fj.11-198317
- Fonteriz R, Matesanz-Isabel J, Arias-Del-Val J, Alvarez-Illera P, Montero M, Alvarez J (2016) Modulation of Calcium Entry by Mitochondria. *Adv Exp Med Biol* 898:405–421. doi:10.1007/978-3-319-26974-0\_17
- Fouad YA, Aanei C (2017) Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 7:1016–1036
- Franklin-Tong VE, Gourlay CW (2008) A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochem J* 413:389–404. doi:10.1042/BJ20080320
- Frischauf I, Litviňuková M, Schober R, Zayats V, Svobodová B, Bonhenry D, Lunz V, Cappello S, Tociu L, Reha D, Stallinger A, Hochreiter A, Pammer T, Butorac C, Muik M, Groschner K, Bogeski I, Ettrich RH, Romanin C, Schindl R (2017) Transmembrane helix connectivity in Orai1 controls two gates for calcium-dependent transcription. *Sci Signal* 10. doi:10.1126/scisignal.aao0358
- Galán C, Zbidi H, Bartegi A, Salido GM, Rosado JA (2009) STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 490:137–144. doi:10.1016/j.abb.2009.08.007
- García-Martínez JM, Alessi DR (2008) mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416:375–385. doi:10.1042/BJ20081668
- Gemes G, Bangaru MLY, Wu H-E, Tang Q, Weihrauch D, Koopmeiners AS, Cruikshank JM, Kwok W-M, Hogan QH (2011) Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Sensory Neurons: Functional Role and the Effect of Painful Nerve Injury. *J. Neurosci.* 31:3536–3549. doi:10.1523/JNEUROSCI.5053-10.2011
- Gilio K, van Kruchten R, Braun A, Berna-Erro A, Feijge MAH, Stegner D, van der Meijden, Paola E J, Kuijpers MJE, Varga-Szabo D, Heemskerk JWM, Nieswandt B (2010) Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation. *The*

- Journal of Biological Chemistry* 285:23629–23638.  
doi:10.1074/jbc.M110.108696
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods (San Diego, Calif.)* 25:386–401.  
doi:10.1006/meth.2001.1261
- Glitsch MD, Bakowski D, Parekh AB (2002) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry depends on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *The EMBO Journal* 21:6744–6754.  
doi:10.1093/emboj/cdf675
- Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS (2000) Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14:1283–1300.  
doi:10.1210/mend.14.8.0500
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260:3440–3450
- Gudlur A, Hogan PG (2017) The STIM-Orai Pathway; Orai, the Pore-Forming Subunit of the CRAC Channel. *Adv Exp Med Biol* 993:39–57.  
doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_3
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57–70.  
doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hayashi T, Kishida M, Nishizawa Y, Iijima M, Koriyama C, Nakamura M, Sano A, Kishida S (2012) Subcellular localization and putative role of VPS13A/chorein in dopaminergic neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419:511–516.  
doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.047
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18:2195–2224. doi:10.1101/gad.1228704
- Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132:344–362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020
- Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D (2002) The I kappa B-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298:1241–1245. doi:10.1126/science.1071914
- Hogan PG, Rao A (2015) Store-operated calcium entry; Mechanisms and modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460:40–49. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.110
- Honisch S, Yu W, Liu G, Alesutan I, Towhid ST, Tsapara A, Schleicher S, Handgretinger R, Stournaras C, Lang F (2015a) Chorein addiction in

- VPS13A overexpressing rhabdomyosarcoma cells. *Oncotarget* 6:10309–10319
- Honisch S, Gu S, Vom Hagen JM, Alkahtani S, Al Kahtane AA, Tsapara A, Hermann A, Storch A, Schöls L, Lang F, Stournaras C (2015b) Chorein Sensitive Arrangement of Cytoskeletal Architecture. *Cell Physiol Biochem* 37:399–408
- Honisch S, Fehrenbacher B, Lebedeva A, Alesutan I, Castor T, Alkahtani S, Alarifi S, Schaller M, Stournaras C, Lang F (2015c) Chorein Sensitive Dopamine Release from Pheochromocytoma (PC12) Cells. *Neurosignals* 23:1–10
- Hoover PJ, Lewis RS (2011) Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13299–13304. doi:10.1073/pnas.1101664108
- Hoth M, Penner R (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353–356. doi:10.1038/355353a0
- Hoth M, Fanger CM, Lewis RS (1997) Mitochondrial Regulation of Store-operated Calcium Signaling in T Lymphocytes. *J Cell Biol* 137:633–648
- Hou M-F, Kuo H-C, Li J-H, Wang Y-S, Chang C-C, Chen K-C, Chen W-C, Chiu C-C, Yang S, Chang W-C (2011) Orai1/CRACM1 overexpression suppresses cell proliferation via attenuation of the store-operated calcium influx-mediated signalling pathway in A549 lung cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1810:1278–1284. doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.001
- Hou X, Pedi L, Diver MM, Long SB (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* 338:1308–1313. doi:10.1126/science.1228757
- Huppertz H-J, Kröll-Seger J, Danek A, Weber B, Dorn T, Kassubek J (2008) Automatic striatal volumetry allows for identification of patients with chorea-acanthocytosis at single subject level. *J Neural Transm (Vienna)* 115:1393–1400. doi:10.1007/s00702-008-0094-8
- Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G (1998) The crystal structure of the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B complex reveals mechanisms of NF- $\kappa$ B inactivation. *Cell* 95:759–770. doi:10.1016/s0092-8674(00)81699-2
- Infante E, Ridley AJ (2013) Roles of Rho GTPases in leucocyte and leukaemia cell transendothelial migration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368. doi:10.1098/rstb.2013.0013
- Ishida C, Makifuchi T, Saiki S, Hirose G, Yamada M (2009) A neuropathological study of autosomal-dominant chorea-acanthocytosis with a mutation of VPS13A. *Acta neuropathologica* 117:85–94. doi:10.1007/s00401-008-0403-1
- Isikbay M, Otto K, Kregel S, Kach J, Cai Y, Vander Griend DJ, Conzen SD, Szmulewitz RZ (2014) Glucocorticoid receptor activity contributes to re-

- sistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. *Horm Cancer* 5:72–89. doi:10.1007/s12672-014-0173-2
- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, JR, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO (1999) The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283:83–87. doi:10.1126/science.283.5398.83
- Jackson TR, Patterson SI, Thastrup O, Hanley MR (1988) A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem J* 253:81–86. doi:10.1042/bj2530081
- Jaiswal JK (2001) Calcium — how and why? *J Biosci* 26:357–363. doi:10.1007/BF02703745
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27:6920–6929. doi:10.1038/onc.2008.343
- Jung HH, Danek A, Walker RH (2011) Neuroacanthocytosis syndromes. *Orphanet J Rare Dis* 6:68. doi:10.1186/1750-1172-6-68
- Kageyama Y, Matsumoto K, Ichikawa K, Ueno S-i, Ichiba M, Nakamura M, Sano A (2007) A new phenotype of chorea-acanthocytosis with dilated cardiomyopathy and myopathy. *Mov Disord* 22:1669–1670. doi:10.1002/mds.21556
- Kaim W, Schwederski B (1995) Bioinorganic chemistry; Inorganic elements in the chemistry of life ; an introduction and guide. Wiley, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore
- Kar P, Nelson C, Parekh AB (2011) Selective activation of the transcription factor NFAT1 by calcium microdomains near Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) channels. *The Journal of Biological Chemistry* 286:14795–14803. doi:10.1074/jbc.M111.220582
- Khananshvili D (2014) Sodium-calcium exchangers (NCX): molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions. *Pflugers Arch* 466:43–60. doi:10.1007/s00424-013-1405-y
- Klingel K, Wärntges S, Bock J, Wagner CA, Sauter M, Waldegger S, Kandolf R, Lang F (2000) Expression of cell volume-regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G998-G1002. doi:10.1152/ajpgi.2000.279.5.G998
- Kobayashi T, Cohen P (1999) Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* 339 (Pt 2):319–328
- Kobayashi T, Deak M, Morrice N, Cohen P (1999) Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem J* 344 Pt 1:189–197



- Koch GL (1990) The endoplasmic reticulum and calcium storage. *Bioessays* 12:527–531. doi:10.1002/bies.950121105
- Kondratska K, Kondratskyi A, Yassine M, Lemonnier L, Lepage G, Morabito A, Skryma R, Prevarskaya N (2014) Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1843:2263–2269. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.02.012
- Kono T, Tong X, Taleb S, Bone RN, Iida H, Lee C-C, Sohn P, Gilon P, Roe MW, Evans-Molina C (2018) Impaired Store-Operated Calcium Entry and STIM1 Loss Lead to Reduced Insulin Secretion and Increased Endoplasmic Reticulum Stress in the Diabetic  $\beta$ -Cell. *Diabetes* 67:2293–2304. doi:10.2337/db17-1351
- Korkotian E, Frotscher M, Segal M (2014) Synaptopodin Regulates Spine Plasticity: Mediation by Calcium Stores. *J. Neurosci.* 34:11641–11651. doi:10.1523/JNEUROSCI.0381-14.2014
- Korzeniowski MK, Wisniewski E, Baird B, Holowka DA, Balla T (2017) Molecular anatomy of the early events in STIM1 activation - oligomerization or conformational change? *J Cell Sci* 130:2821–2832. doi:10.1242/jcs.205583
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95–125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- Kumar N, Leonzino M, Hancock-Cerutti W, Horenkamp FA, Li P, Lees JA, Wheeler H, Reinisch KM, Camilli P de (2018) VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J Cell Biol* 217:3625–3639. doi:10.1083/jcb.201807019
- Kurano Y, Nakamura M, Ichiba M, Matsuda M, Mizuno E, Kato M, Agemura A, Izumo S, Sano A (2007) In vivo distribution and localization of chorein. *Biochemical and biophysical research communications* 353:431–435. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.059
- Lacruz RS, Feske S (2015) Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann N Y Acad Sci* 1356:45–79. doi:10.1111/nyas.12938
- Lang F, Vallon V, Grahmmer F, Palmada M, Böhmer C (2005) Transport regulation by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Biochem Soc Trans* 33:213–215. doi:10.1042/BST0330213
- Lang F, Stournaras C (2013) Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens)* 12:160–171. doi:10.14310/horm.2002.1401
- Lang F, Henke G, Embark HM, Waldegger S, Palmada M, Böhmer C, Vallon V (2003) Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell Physiol Biochem* 13:41–50. doi:10.1159/000070248

- Lang F, Böhmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V (2006) (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiological Reviews* 86:1151–1178. doi:10.1152/physrev.00050.2005
- Lang F, Perrotti N, Stournaras C (2010) Colorectal carcinoma cells--regulation of survival and growth by SGK1. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1571–1575. doi:10.1016/j.biocel.2010.05.016
- Lee S-O, Jeong Y-J, Yu MH, Lee J-W, Hwangbo MH, Kim C-H, Lee I-S (2006) Wogonin suppresses TNF-alpha-induced MMP-9 expression by blocking the NF-kappaB activation via MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351:118–125. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.006
- Lee K, Wang C, Machaty Z (2012) STIM1 is required for Ca<sup>2+</sup> signaling during mammalian fertilization. *Dev Biol* 367:154–162. doi:10.1016/j.ydbio.2012.04.028
- Lee KP, Yuan JP, Zeng W, So I, Worley PF, Muallem S (2009) Molecular determinants of fast Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14687–14692. doi:10.1073/pnas.0904664106
- Leong MLL, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA, Firestone GL (2003) Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278:5871–5882. doi:10.1074/jbc.M211649200
- Leroy V, Seigneux S de, Agassiz V, Hasler U, Rafestin-Oblin M-E, Vinciguerra M, Martin P-Y, Féraillé E (2009) Aldosterone activates NF-kappaB in the collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 20:131–144. doi:10.1681/ASN.2008020232
- Li Z, Lu J, Xu P, Xie X, Chen L, Xu T (2007) Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activation. *The Journal of biological chemistry* 282:29448–29456. doi:10.1074/jbc.M703573200
- Li J, Ding Y, Li X-C, Ferreira D, Khan S, Smillie T, Khan IA (2009) Scuteflorins A and B, dihydropyranocoumarins from *Scutellaria lateriflora*. *J Nat Prod (Gorakhpur)* 72:983–987. doi:10.1021/np900068t
- Li Z, Liu L, Deng Y, Ji W, Du W, Xu P, Chen L, Xu T (2011a) Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell Res* 21:305–315. doi:10.1038/cr.2010.131
- Li J, Cubbon RM, Wilson LA, Amer MS, McKeown L, Hou B, Majeed Y, Tumova S, Seymour VAL, Taylor H, Stacey M, O'Regan D, Foster R, Porter KE, Kearney MT, Beech DJ (2011b) Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca<sup>2+</sup> entry and endothelial tube formation. *Circ Res* 108:1190–1198. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243352

- Liang X, Lan C, Jiao G, Fu W, Long X, An Y, Wang K, Zhou J, Chen T, Li Y, Xu J, Huang Q, Xu B, Xiao J (2017) Therapeutic inhibition of SGK1 suppresses colorectal cancer. *Exp Mol Med* 49:e399. doi:10.1038/emm.2017.184
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Meyer T (2005) STIM Is a Ca<sup>2+</sup> Sensor Essential for Ca<sup>2+</sup>-Store-Depletion-Triggered Ca<sup>2+</sup> Influx. *Curr Biol* 15:1235–1241. doi:10.1016/j.cub.2005.05.055
- Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca<sup>2+</sup> store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9301–9306. doi:10.1073/pnas.0702866104
- Litjens T, Harland ML, Roberts ML, Barritt GJ, Rychkov GY (2004) Fast Ca(2+)-dependent inactivation of the store-operated Ca<sup>2+</sup> current (ISOC) in liver cells: a role for calmodulin. *J Physiol (Lond)* 558:85–97. doi:10.1113/jphysiol.2004.065870
- Liu H, Hughes JD, Rollins S, Chen B, Perkins E (2011) Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 91:753–760. doi:10.1016/j.yexmp.2011.09.005
- Liu G, Honisch S, Liu G, Schmidt S, Pantelakos S, Alkahtani S, Toulany M, Lang F, Stournaras C (2015) Inhibition of SGK1 enhances mAR-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 16:52–59. doi:10.4161/15384047.2014.986982
- Liu W, Wang X, Liu Z, Wang Y, Yin B, Yu P, Duan X, Liao Z, Chen Y, Liu C, Li X, Dai Y, Tao Z (2017) SGK1 inhibition induces autophagy-dependent apoptosis via the mTOR-Foxo3a pathway. *Br J Cancer* 117:1139–1153. doi:10.1038/bjc.2017.293
- Liu X, Wu G, Yu Y, Chen X, Ji R, Lu J, Li X, Zhang X, Yang X, Shen Y (2019) Molecular understanding of calcium permeation through the open Orai channel. *PLoS Biol* 17:e3000096. doi:10.1371/journal.pbio.3000096
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lodola F, Laforenza U, Bonetti E, Lim D, Dragoni S, Bottino C, Ong HL, Guerra G, Ganini C, Massa M, Manzoni M, Ambudkar IS, Genazzani AA, Rosti V, Pedrazzoli P, Tanzi F, Moccia F, Porta C (2012) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PLoS ONE* 7:e42541. doi:10.1371/journal.pone.0042541
- Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE (2007) Biochemie und Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Luik RM, Lewis RS (2007) New insights into the molecular mechanisms of store-operated Ca<sup>2+</sup> signaling in T cells. *Trends Mol Med* 13:103–107. doi:10.1016/j.molmed.2007.01.004

- Lupo F, Tibaldi E, Matte A, Sharma AK, Brunati AM, Alper SL, Zancanaro C, Benati D, Siciliano A, Bertoldi M, Zonta F, Storch A, Walker RH, Danek A, Bader B, Hermann A, Franceschi L de (2016) A new molecular link between defective autophagy and erythroid abnormalities in chorea-acanthocytosis. *Blood* 128:2976–2987. doi:10.1182/blood-2016-07-727321
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of biological chemistry* 266:17067–17071
- Ma G, Wei M, He L, Liu C, Wu B, Zhang SL, Jing J, Liang X, Senes A, Tan P, Li S, Sun A, Bi Y, Zhong L, Si H, Shen Y, Li M, Lee M-S, Zhou W, Wang J, Wang Y, Zhou Y (2015) Inside-out Ca(2+) signalling prompted by STIM1 conformational switch. *Nat Commun* 6:7826. doi:10.1038/ncomms8826
- Machaty Z, Wang C, Lee K, Zhang L (2017) Fertility: Store-Operated Ca(2+) Entry in Germ Cells: Role in Egg Activation. *Adv Exp Med Biol* 993:577–593. doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_29
- Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5:472–484. doi:10.1038/nri1632
- Majewski L, Kuznicki J (2015) SOCE in neurons; Signaling or just refilling? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853:1940–1952. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.019
- Manji SS, Parker NJ, Williams RT, van Stekelenburg L, Pearson RB, Dziadek M, Smith PJ (2000) STIM1; A novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 1481:147–155
- Margiotta A, Progida C, Bakke O, Bucci C (2017) Rab7a regulates cell migration through Rac1 and vimentin. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864:367–381. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.11.020
- Markello T, Chen D, Kwan JY, Horkayne-Szakaly I, Morrison A, Simakova O, Maric I, Lozier J, Cullinane AR, Kilo T, Meister L, Pakzad K, Bone W, Chainani S, Lee E, Links A, Boerkoel C, Fischer R, Toro C, White JG, Gahl WA, Gunay-Aygun M (2015) York platelet syndrome is a CRAC channelopathy due to gain-of-function mutations in STIM1. *Mol Genet Metab* 114:474–482. doi:10.1016/j.ymgme.2014.12.307
- McCarl C-A, Picard C, Khalil S, Kawasaki T, Rother J, Papolos A, Kutok J, Hivroz C, Ledest F, Plogmann K, Ehl S, Notheis G, Albert MH, Belohradsky BH, Kirschner J, Rao A, Fischer A, Feske S (2009) ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 124:1311-1318.e7. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.007
- McKinnon KM (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 120:5.1.1-5.1.11. doi:10.1002/cpim.40
- McNally BA, Somasundaram A, Yamashita M, Prakriya M (2012) Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1. *Nature* 482:241–245. doi:10.1038/nature10752

- McNally BA, Somasundaram A, Jairaman A, Yamashita M, Prakriya M (2013) The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. *J Physiol (Lond)* 591:2833–2850. doi:10.1113/jphysiol.2012.250456
- Meng F, Yamagiwa Y, Taffetani S, Han J, Patel T (2005) IL-6 activates serum and glucocorticoid kinase via p38alpha mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Physiol, Cell Physiol* 289:C971-81. doi:10.1152/ajpcell.00081.2005
- Mercer JC, DeHaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS, Putney JW (2006) Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *The Journal of biological chemistry* 281:24979–24990. doi:10.1074/jbc.M604589200
- Misceo D, Holmgren A, Louch WE, Holme PA, Mizobuchi M, Morales RJ, Paula AM de, Stray-Pedersen A, Lyle R, Dalhus B, Christensen G, Stormorken H, Tjonnfjord GE, Frengen E (2014) A dominant STIM1 mutation causes Stormorken syndrome. *Hum Mutat* 35:556–564. doi:10.1002/humu.22544
- Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A (2016) Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 8:227–241. doi:10.1002/wsbm.1331
- Mitchell CB, Gasperini RJ, Small DH, Foa L (2012) STIM1 is necessary for store-operated calcium entry in turning growth cones. *J Neurochem* 122:1155–1166. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07840.x
- Mizuno H, Nishida E (2001) The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors. *Genes Cells* 6:261–268. doi:10.1046/j.1365-2443.2001.00418.x
- Moreno C, Vaca L (2011) SOC and now also SIC: Store-operated and store-inhibited channels. *IUBMB Life* 63:856–863. doi:10.1002/iub.547
- Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV (2008) Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68:1555–1560. doi:10.1002/pros.20815
- Motiani RK, Abdullaev IF, Trebak M (2010) A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 285:19173–19183. doi:10.1074/jbc.M110.102582
- Motiani RK, Hyzinski-Garcia MC, Zhang X, Henkel MM, Abdullaev IF, Kuo Y-H, Matrougui K, Mongin AA, Trebak M (2013) STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch* 465:1249–1260. doi:10.1007/s00424-013-1254-8
- Muik M, Fahrner M, Derler I, Schindl R, Bergsmann J, Frischauf I, Groschner K, Romanin C (2009) A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. *The*

- Journal of Biological Chemistry* 284:8421–8426.  
doi:10.1074/jbc.C800229200
- Mullins FM, Park CY, Dolmetsch RE, Lewis RS (2009) STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15495–15500.  
doi:10.1073/pnas.0906781106
- Muñoz-Braceras S, Calvo R, Escalante R (2015) TipC and the chorea-acanthocytosis protein VPS13A regulate autophagy in Dictyostelium and human HeLa cells. *Autophagy* 11:918–927.  
doi:10.1080/15548627.2015.1034413
- Nagy A, Noyce A, Velayos-Baeza A, Lees AJ, Warner TT, Ling H (2015) Late Emergence of Parkinsonian Phenotype and Abnormal Dopamine Transporter Scan in Chorea-Acanthocytosis. *Mov Disord Clin Pract* 2:182–186.  
doi:10.1002/mdc3.12138
- Nicotera P, Orrenius S (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23:173–180. doi:10.1016/s0143-4160(98)90116-6
- Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou N-H (2012) Gap junctions. *Compr Physiol* 2:1981–2035.  
doi:10.1002/cphy.c110051
- Nishida Y, Nagata T, Takahashi Y, Sugahara-Kobayashi M, Murata A, Asai S (2004) Alteration of serum/glucocorticoid regulated kinase-1 (sgk-1) gene expression in rat hippocampus after transient global ischemia. *Molecular Brain Research* 123:121–125. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.01.008
- Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 19:983–997. doi:10.1038/nm.3232
- Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC (2012) Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 132:e3. doi:10.1038/jid.2012.429
- Nwokonko RM, Cai X, Loktionova NA, Wang Y, Zhou Y, Gill DL (2017) The STIM-Orai Pathway: Conformational Coupling Between STIM and Orai in the Activation of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Adv Exp Med Biol* 993:83–98.  
doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_5
- Oeckinghaus A, Ghosh S (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a000034.  
doi:10.1101/cshperspect.a000034
- Okcu MF, Hicks J (2019) Rhabdomyosarcoma in childhood, adolescence, and adulthood: Treatment. UpToDate Inc.  
<https://www.uptodate.com/contents/rhabdomyosarcoma-in-childhood-adolescence-and-adulthood-treatment>. Letzter Zugriff am: 23. September 2019
- Ong HL, Ambudkar IS (2017) STIM-TRP Pathways and Microdomain Organization: Contribution of TRPC1 in Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry: Impact on Ca<sup>2+</sup>

- Signaling and Cell Function. *Adv Exp Med Biol* 993:159–188. doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_9
- Pacheco J, Ramírez-Jarquín JO, Vaca L (2016) Microdomains Associated to Lipid Rafts. *Adv Exp Med Biol* 898:353–378. doi:10.1007/978-3-319-26974-0\_15
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853–6866. doi:10.1038/sj.onc.1203239
- Panda SP, Chinnaswamy G, Vora T, Prasad M, Bansal D, Kapoor G, Radhakrishnan V, Agarwala S, Laskar S, Arora B, Kaur T, Rath GK, Bakhshi S (2017) Diagnosis and Management of Rhabdomyosarcoma in Children and Adolescents: ICMR Consensus Document. *Indian J Pediatr* 84:393–402. doi:10.1007/s12098-017-2315-3
- Pani B, Singh BB (2009) Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium* 45:625–633. doi:10.1016/j.ceca.2009.02.009
- Papakonstanti EA, Stournaras C (2008) Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Letters* 582:2120–2127. doi:10.1016/j.febslet.2008.02.064
- Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA (1999) Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *The EMBO Journal* 18:3024–3033. doi:10.1093/emboj/18.11.3024
- Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC, Dolmetsch RE, Lewis RS (2009) STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell* 136:876–890. doi:10.1016/j.cell.2009.02.014
- Park CY, Shcheglovitov A, Dolmetsch R (2010) The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science* 330:101–105. doi:10.1126/science.1191027
- Parod RJ, Putney JW (1978) The role of calcium in the receptor mediated control of potassium permeability in the rat lacrimal gland. *J Physiol (Lond)* 281:371–381
- Peel SE, Liu B, Hall IP (2006) A key role for STIM1 in store operated calcium channel activation in airway smooth muscle. *Respir Res* 7:119. doi:10.1186/1465-9921-7-119
- Peikert K, Danek A, Hermann A (2018) Current state of knowledge in Chorea-Acanthocytosis as core Neuroacanthocytosis syndrome. *Eur J Med Genet* 61:699–705. doi:10.1016/j.ejmg.2017.12.007
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJS, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet J-P (2006) Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 8:771–773. doi:10.1038/ncb1435
- Peluso S, Bilo L, Esposito M, Antenora A, Rosa A de, Pappatà S, Michele G de (2017) Chorea-acanthocytosis without chorea: Expanding the clinical phe-

- notype. *Parkinsonism Relat Disord* 41:124–126.  
doi:10.1016/j.parkreldis.2017.05.013
- Pelzl L, Hauser S, Elsir B, Sukkar B, Sahu I, Singh Y, Höflinger P, Bissinger R, Jemaà M, Stournaras C, Schöls L, Lang F (2017a) Lithium Sensitive ORAI1 Expression, Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry and Suicidal Death of Neurons in Chorea-Acanthocytosis. *Scientific Reports* 7:6457. doi:10.1038/s41598-017-06451-1
- Pelzl L, Elsir B, Sahu I, Bissinger R, Singh Y, Sukkar B, Honisch S, Schoels L, Jemaà M, Lang E, Storch A, Hermann A, Stournaras C, Lang F (2017b) Lithium Sensitivity of Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry and Survival of Fibroblasts Isolated from Chorea-Acanthocytosis Patients. *Cell Physiol Biochem* 42:2066–2077. doi:10.1159/000479901
- Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, Cahalan MD (2008) The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 456:116–120. doi:10.1038/nature07338
- Peqlab (2012) peqGOLD TriFast™; Datenblatt
- Persechini A, Moncrief ND, Kretsinger RH (1989) The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends Neurosci* 12:462–467
- Petibone DM, Majeed W, Casciano DA (2017) Autophagy function and its relationship to pathology, clinical applications, drug metabolism and toxicity. *J Appl Toxicol* 37:23–37. doi:10.1002/jat.3393
- Pfaffl MW (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, Lüthy K, Hivroz C, Ledest F, Rieux-Laucat F, Rechavi G, Rao A, Fischer A, Feske S (2009) STIM1 Mutation Associated with a Syndrome of Immunodeficiency and Autoimmunity. *N Engl J Med* 360:1971–1980. doi:10.1056/NEJMoa0900082
- Place RF, Haspeslagh D, Hubbard AK, Giardina C (2001) Cytokine-induced stabilization of newly synthesized I(kappa)B-alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283:813–820. doi:10.1006/bbrc.2001.4883
- Polgár J, Chung S-H, Reed GL (2002) Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood* 100:1081–1083. doi:10.1182/blood.v100.3.1081
- Prakriya M, Lewis RS (2006) Regulation of CRAC channel activity by recruitment of silent channels to a high open-probability gating mode. *J Gen Physiol* 128:373–386. doi:10.1085/jgp.200609588
- Prakriya M, Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews* 95:1383. doi:10.1152/physrev.00020.2014
- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443:230–233. doi:10.1038/nature05122



- Promega (2014) GoTaq® qPCR Master Mix; Instructions for Use of Products
- Putney JW (1977) Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. *J Physiol (Lond)* 268:139–149
- Putney JW (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1–12
- Rampoldi L, Dobson-Stone C, Rubio JP, Danek A, Chalmers RM, Wood NW, Verellen C, Ferrer X, Malandrini A, Fabrizi GM, Brown R, Vance J, Pericak-Vance M, Rudolf G, Carrè S, Alonso E, Manfredi M, Németh AH, Monaco AP (2001) A conserved sorting-associated protein is mutant in chorea-acanthocytosis. *Nat Genet* 28:119–120. doi:10.1038/88821
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619–647. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velichelebi G, Stauderman KA (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* 169:435–445. doi:10.1083/jcb.200502019
- Rosado JA (2017) Introduction: Overview of the Pathophysiological Implications of Store-Operated Calcium Entry in Mammalian Cells. *Adv Exp Med Biol* 993:391–395. doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_20
- Rubio JP, Danek A, Stone C, Chalmers R, Wood N, Verellen C, Ferrer X, Malandrini A, Fabrizi GM, Manfredi M, Vance J, Pericak-Vance M, Brown R, Rudolf G, Picard F, Alonso E, Brin M, Németh AH, Farrall M, Monaco AP (1997) Chorea-acanthocytosis: genetic linkage to chromosome 9q21. *Am J Hum Genet* 61:899–908. doi:10.1086/514876
- Sabourin J, Le Gal L, Saurwein L, Haefliger J-A, Raddatz E, Allagnat F (2015) Store-operated Ca<sup>2+</sup> Entry Mediated by Orai1 and TRPC1 Participates to Insulin Secretion in Rat beta-Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 290:30530–30539. doi:10.1074/jbc.M115.682583
- Saiki S, Hirose G, Sakai K, Matsunari I, Higashi K, Saiki M, Kataoka S, Hori A, Shimazaki K (2004) Chorea-acanthocytosis associated with Tourettism. *Mov Disord* 19:833–836. doi:10.1002/mds.20050
- Saiki S, Sakai K, Murata K-y, Saiki M, Nakanishi M, Kitagawa Y, Kaito M, Gondo Y, Kumamoto T, Matsui M, Hattori N, Hirose G (2007) Primary skeletal muscle involvement in chorea-acanthocytosis. *Mov Disord* 22:848–852. doi:10.1002/mds.21437
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning; A laboratory manual : Vol. 2. Cold Spring Harbor, S.I.
- Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, Longacre M (2013) Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int J Mol Sci* 14:21087–21113. doi:10.3390/ijms141021087

- Sasaki N, Nakamura M, Kodama A, Urata Y, Shiokawa N, Hayashi T, Sano A (2016) Chorein interacts with  $\alpha$ -tubulin and histone deacetylase 6, and overexpression preserves cell viability during nutrient deprivation in human embryonic kidney 293 cells. *FASEB J* 30:3726–3732. doi:10.1096/fj.201500191RR
- Schmid E, Stagno MJ, Yan J, Stournaras C, Lang F, Fuchs J, Seitz G (2016) Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in rhabdomyosarcoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 477:129–136. doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.032
- Schmidt S, Liu G, Yang W, Honisch S, Pantelakos S, Stournaras C, Honig A, Lang F (2014a) Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in therapy resistant ovary carcinoma cells. *Oncotarget* 5:4799–4810
- Schmidt S, Schneider S, Yang W, Liu G, Schmidt EM, Schmid E, Mia S, Brucker S, Stournaras C, Wallwiener D, Brosens JJ, Lang F (2014b) TGFbeta1 and SGK1-sensitive store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry and Orai1 expression in endometrial Ishikawa cells. *Mol Hum Reprod* 20:139–147. doi:10.1093/molehr/gat066
- Schmidt EM, Schmid E, Munzer P, Hermann A, Eyrich AK, Russo A, Walker B, Gu S, Vom Hagen JM, Faggio C, Schaller M, Foller M, Schols L, Gawaz M, Borst O, Storch A, Stournaras C, Lang F (2013) Chorein sensitivity of cytoskeletal organization and degranulation of platelets. *FASEB J* 27:2799–2806. doi:10.1096/fj.13-229286
- Shim S, Zheng JQ, Ming G-I (2013) A critical role for STIM1 in filopodial calcium entry and axon guidance. *Mol Brain* 6:1–14. doi:10.1186/1756-6606-6-51
- Shim AH-R, Tirado-Lee L, Prakriya M (2015) Structural and functional mechanisms of CRAC channel regulation. *J Mol Biol* 427:77–93. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.021
- Shiokawa N, Nakamura M, Sameshima M, Deguchi A, Hayashi T, Sasaki N, Sano A (2013) Chorein, the protein responsible for chorea-acanthocytosis, interacts with beta-adducin and beta-actin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441:96–101. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.011
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10:405–455. doi:10.1146/annurev.cb.10.110194.002201
- Singh AR, Morin G, Rochette J (2015) Stormorken syndrome or York platelet syndrome: A clinician's dilemma. *Mol Genet Metab Rep* 2:80. doi:10.1016/j.ymgmr.2015.01.003
- Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL (2006a) Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *The Journal of biological chemistry* 281:20661–20665. doi:10.1074/jbc.C600126200

- Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T, He L-P, Xu W, Johnstone LS, Dziadek MA, Gill DL (2006b) STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Curr Biol* 16:1465–1470. doi:10.1016/j.cub.2006.05.051
- Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL (2012) STIM proteins; Dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:549–565. doi:10.1038/nrm3414
- Sobradillo D, Hernández-Morales M, Ubierna D, Moyer MP, Núñez L, Villalobos C (2014) A Reciprocal Shift in Transient Receptor Potential Channel 1 (TRPC1) and Stromal Interaction Molecule 2 (STIM2) Contributes to Ca<sup>2+</sup> Remodeling and Cancer Hallmarks in Colorectal Carcinoma Cells\*. *The Journal of Biological Chemistry* 289:28765–28782. doi:10.1074/jbc.M114.581678
- Somasundaram A, Shum AK, McBride HJ, Kessler JA, Feske S, Miller RJ, Prakriya M (2014) Store-Operated CRAC Channels Regulate Gene Expression and Proliferation in Neural Progenitor Cells. *J. Neurosci.* 34:9107–9123. doi:10.1523/JNEUROSCI.0263-14.2014
- Srikanth S, Woo JS, Sun Z, Gwack Y (2017) Immunological Disorders: Regulation of Ca(2+) Signaling in T Lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 993:397–424. doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_21
- Stanisz H, Saul S, Müller CSL, Kappl R, Niemeyer BA, Vogt T, Hoth M, Roesch A, Bogeski I (2014) Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry. *Pigment Cell Melanoma Res* 27:442–453. doi:10.1111/pcmr.12222
- Stathopoulos PB, Li G-Y, Plevin MJ, Ames JB, Ikura M (2006) Stored Ca<sup>2+</sup> depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region; An initiation mechanism for capacitive Ca<sup>2+</sup> entry. *The Journal of biological chemistry* 281:35855–35862. doi:10.1074/jbc.M608247200
- Stathopoulos PB, Le Zheng, Li G-Y, Plevin MJ, Ikura M (2008) Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell* 135:110–122. doi:10.1016/j.cell.2008.08.006
- Stathopoulos PB, Schindl R, Fahrner M, Le Zheng, Gasmi-Seabrook GM, Muik M, Romanin C, Ikura M (2013) STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nat Commun* 4:2963. doi:10.1038/ncomms3963
- Stefani D de, Rizzuto R, Pozzan T (2016) Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annu Rev Biochem* 85:161–192. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034216
- Stewart BW, Wild CP (Hrsg) (2014) World cancer report 2014. International Agency for Research on Cancer; Distributed by WHO Press, World Health Organization, Lyon, France, Geneva, Switzerland

- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983) Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306:67–69
- Student (1908) The probable Error of a Mean. *Biometrika* 6:1–25. doi:10.1093/biomet/6.1.1
- Sultan I, Qaddoumi I, Yaser S, Rodriguez-Galindo C, Ferrari A (2009) Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: an analysis of 2,600 patients. *J Clin Oncol* 27:3391–3397. doi:10.1200/JCO.2008.19.7483
- Tai DJC, Su C-C, Ma Y-L, Lee EHY (2009) SGK1 phosphorylation of I $\kappa$ B Kinase alpha and p300 Up-regulates NF- $\kappa$ B activity and increases N-Methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression. *The Journal of biological chemistry* 284:4073–4089. doi:10.1074/jbc.M805055200
- Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW (1989) Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 264:12266–12271
- Talarico C, Dattilo V, D'Antona L, Menniti M, Bianco C, Ortuso F, Alcaro S, Schenone S, Perrotti N, Amato R (2016a) SGK1, the New Player in the Game of Resistance: Chemo-Radio Molecular Target and Strategy for Inhibition. *Cell Physiol Biochem* 39:1863–1876. doi:10.1159/000447885
- Talarico C, Dattilo V, D'Antona L, Barone A, Amodio N, Belviso S, Musumeci F, Abbruzzese C, Bianco C, Trapasso F, Schenone S, Alcaro S, Ortuso F, Florio T, Paggi MG, Perrotti N, Amato R (2016b) SI113, a SGK1 inhibitor, potentiates the effects of radiotherapy, modulates the response to oxidative stress and induces cytotoxic autophagy in human glioblastoma multiforme cells. *Oncotarget* 7:15868–15884. doi:10.18632/oncotarget.7520
- Terada Y, Kuwana H, Kobayashi T, Okado T, Suzuki N, Yoshimoto T, Hirata Y, Sasaki S (2008) Aldosterone-Stimulated SGK1 Activity Mediates Profibrotic Signaling in the Mesangium. *J Am Soc Nephrol* 19:298–309. doi:10.1681/ASN.2007050531
- Thastrup O, Cullen PJ, Drøbak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2466–2470
- Tomemori Y, Ichiba M, Kusumoto A, Mizuno E, Sato D, Muroya S, Nakamura M, Kawaguchi H, Yoshida H, Ueno S-i, Nakao K, Nakamura K, Aiba A, Katsuki M, Sano A (2005) A gene-targeted mouse model for chorea-acanthocytosis. *J Neurochem* 92:759–766. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02924.x
- Towhid ST, Liu G-L, Ackermann TF, Beier N, Scholz W, Fuchß T, Toulany M, Rodemann H-P, Lang F (2013) Inhibition of colonic tumor growth by the sel-

- ective SGK inhibitor EMD638683. *Cell Physiol Biochem* 32:838–848. doi:10.1159/000354486
- Ueno S, Maruki Y, Nakamura M, Tomemori Y, Kamae K, Tanabe H, Yamashita Y, Matsuda S, Kaneko S, Sano A (2001) The gene encoding a newly discovered protein, chorein, is mutated in chorea-acanthocytosis. *Nat Genet* 28:121–122. doi:10.1038/88825
- Umemura M, Baljinnyam E, Feske S, Lorenzo MS de, Xie L-H, Feng X, Oda K, Makino A, Fujita T, Yokoyama U, Iwatsubo M, Chen S, Goydos JS, Ishikawa Y, Iwatsubo K (2014) Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry (SOCE) Regulates Melanoma Proliferation and Cell Migration. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0089292
- Vallon V, Wyatt AW, Klingel K, Huang DY, Hussain A, Berchtold S, Friedrich B, Grammer F, BelAiba RS, Gorlach A, Wulff P, Daut J, Dalton ND, Ross J, JR, Fogel U, Schrader J, Osswald H, Kandolf R, Kuhl D, Lang F (2006) SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment. *J Mol Med* 84:396–404. doi:10.1007/s00109-005-0027-z
- Varga-Szabo D, Braun A, Kleinschnitz C, Bender M, Pleines I, Pham M, Renné T, Stoll G, Nieswandt B (2008) The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction. *J Exp Med* 205:1583–1591. doi:10.1084/jem.20080302
- Velayos Baeza A, Dobson-Stone C, Rampoldi L, Bader B, Walker RH, Danek A, Monaco AP (2002) Chorea-Acanthocytosis. In: Pagon, Roberta A.; Adam, Margaret P.; Ardinger, Holly H.; Wallace, Stephanie E.; Amemiya, Anne; Bean, Lora J. H. et al. (Hg.) (1993-2017): GeneReviews(R). University of Washington, Seattle. Seattle (WA). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1387/>. Letzter Zugriff am: 14. September 2017
- Velayos-Baeza A, Vettori A, Copley RR, Dobson-Stone C, Monaco AP (2004) Analysis of the human VPS13 gene family. *Genomics* 84:536–549. doi:10.1016/j.ygeno.2004.04.012
- Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76:387–417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet J-P (2006a) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 312:1220–1223. doi:10.1126/science.1127883
- Vig M, Beck A, Billingsley JM, Lis A, Parvez S, Peinelt C, Koomoa DL, Soboloff J, Gill DL, Fleig A, Kinet J-P, Penner R (2006b) CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* 16:2073–2079. doi:10.1016/j.cub.2006.08.085
- Villalobos C, Sobradillo D, Hernández-Morales M, Núñez L (2016) Remodeling of Calcium Entry Pathways in Cancer. *Adv Exp Med Biol* 898:449–466. doi:10.1007/978-3-319-26974-0\_19

- Vital A, Bouillot S, Burbaud P, Ferrer X, Vital C (2002) Chorea-acanthocytosis: neuropathology of brain and peripheral nerve. *Clin Neuropathol* 21:77–81
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789–799. doi:10.1038/nm1087
- Waldegger S, Barth P, Raber G, 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
- Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R, Lang F (1999) h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology* 116:1081–1088. doi:10.1016/s0016-5085(99)70011-9
- Wang C-C, Shi H, Guo K, Ng CP, Li J, Gan BQ, Chien Liew H, Leinonen J, Rajaniemi H, Zhou ZH, Zeng Q, Hong W (2007) VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. *Mol Biol Cell* 18:1056–1063. doi:10.1091/mbc.e06-10-0974
- Wang C, Lee K, Gajdócsi E, Papp AB, Machaty Z (2012) Orai1 mediates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry during fertilization in mammalian oocytes. *Dev Biol* 365:414–423. doi:10.1016/j.ydbio.2012.03.007
- Wang GX, Poo M-m (2005) Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 434:898–904. doi:10.1038/nature03478
- Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol* 4:E97-100. doi:10.1038/ncb0402-e97
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL (1993) 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. doi:10.1128/mcb.13.4.2031
- Wei M, Zhou Y, Sun A, Ma G, He L, Zhou L, Zhang S, Liu J, Zhang SL, Gill DL, Wang Y (2016) Molecular mechanisms underlying inhibition of STIM1-Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry induced by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Pflugers Arch* 468:2061–2074. doi:10.1007/s00424-016-1880-z
- Wei-Lapierre L, Carrell EM, Boncompagni S, Protasi F, Dirksen RT (2013) Orai1-dependent calcium entry promotes skeletal muscle growth and limits fatigue. *Nat Commun* 4:2805. doi:10.1038/ncomms3805
- Wen J, Huang Y-C, Xiu H-H, Shan Z-M, Xu K-Q (2016) Altered expression of stromal interaction molecule (STIM)-calcium release-activated calcium channel protein (ORAI) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) in cancer: will they become a new battlefield for oncotherapy? *Chin J Cancer* 35. doi:10.1186/s40880-016-0094-2
- Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, Dziadek MA

- (2001) Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family; Coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* 357:673–685
- Wolf SC, Schultze M, Risler T, Rieg T, Lang F, Schulze-Osthoff K, Brehm BR (2006) Stimulation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 gene expression by endothelin-1. *Biochem Pharmacol* 71:1175–1183. doi:10.1016/j.bcp.2006.01.001
- Woods NM, Cuthbertson KS, Cobbold PH (1986) Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* 319:600–602. doi:10.1038/319600a0
- Wu Z-W, Chien C-T, Liu C-Y, Yan J-Y, Lin S-Y (2012) Recent progress in copolymer-mediated siRNA delivery. *J Drug Target* 20:551–560. doi:10.3109/1061186X.2012.699057
- Wulff P, Vallon V, Huang DY, Völkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlünz M, Klingel K, Loffing J, Kauselmann G, Bösl MR, Lang F, Kuhl D (2002) Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest* 110:1263–1268. doi:10.1172/JCI15696
- Xie Y, Jiang D, Xiao J, Fu C, Zhang Z, Ye Z, Zhang X (2018) Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion-induced kidney injury by activating autophagy via the SGK1 signaling pathway. *Cell Death Dis* 9:1–14. doi:10.1038/s41419-018-0358-7
- Xu P, Lu J, Li Z, Yu X, Chen L, Xu T (2006) Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350:969–976. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.134
- Yamashita M, Yeung PS-W, Ing CE, McNally BA, Pomès R, Prakriya M (2017) STIM1 activates CRAC channels through rotation of the pore helix to open a hydrophobic gate. *Nat Commun* 8:14512. doi:10.1038/ncomms14512
- Yang S, Zhang JJ, Huang X-Y (2009) Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* 15:124–134. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.019
- Yang X, Jin H, Cai X, Li S, Shen Y (2012) Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5657–5662. doi:10.1073/pnas.1118947109
- Yang N, Tang Y, Wang F, Zhang H, Xu D, Shen Y, Sun S, Yang G (2013a) Blockade of store-operated Ca(2+) entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Lett* 330:163–169. doi:10.1016/j.canlet.2012.11.040
- Yang H, Choi K-C, Jung E-M, An B-S, Hyun S-H, Jeung E-B (2013b) Expression and regulation of sodium/calcium exchangers, NCX and NCKX, in reproductive tissues: do they play a critical role in calcium transport for reproduction and development? *Adv Exp Med Biol* 961:109–121. doi:10.1007/978-1-4614-4756-6\_10

- Yen M, Lokteva LA, Lewis RS (2016) Functional Analysis of Orai1 Concatemers Supports a Hexameric Stoichiometry for the CRAC Channel. *Biophys J* 111:1897–1907. doi:10.1016/j.bpj.2016.09.020
- Yu W, Honisch S, Schmidt S, Yan J, Schmid E, Alkahtani S, AlKahtane AA, Alarifi S, Stournaras C, Lang F (2016) Chorein Sensitive Orai1 Expression and Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Rhabdomyosarcoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 40:1141–1152. doi:10.1159/000453168
- Yuan JP, Zeng W, Dorwart MR, Choi Y-J, Worley PF, Muallem S (2009) SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* 11:337–343. doi:10.1038/ncb1842
- Zaborski JJ (2019) Kombination von LiCl mit Hedgehog-Inhibitoren als neuer Ansatz für die Rhabdomyosarkom Therapie. Universität Tübingen. [https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/10900/90140/1/diss\\_Zaborski.pdf](https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/10900/90140/1/diss_Zaborski.pdf). Letzter Zugriff am: 08. März 2020
- Zhang L, Cui R, Cheng X, Du J (2005a) Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{ $\kappa$ }B kinase. *Cancer Res* 65:457–464
- Zhang H, Sun AY, Kim JJ, Graham V, Finch EA, Nepliouev I, Zhao G, Li T, Lederer WJ, Stiber JA, Pitt GS, Bursac N, Rosenberg PB (2015) STIM1–Ca<sup>2+</sup> signaling modulates automaticity of the mouse sinoatrial node. *PNAS* 112:E5618–E5627. doi:10.1073/pnas.1503847112
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD (2005b) STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 437:902–905. doi:10.1038/nature04147
- Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH-F, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD (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. doi:10.1073/pnas.0603161103
- Zhang SL, Yeromin AV, Hu J, Amcheslavsky A, Zheng H, Cahalan MD (2011) Mutations in Orai1 transmembrane segment 1 cause STIM1-independent activation of Orai1 channels at glycine 98 and channel closure at arginine 91. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17838–17843. doi:10.1073/pnas.1114821108
- Zhao Q, Wang J, Zou M-J, Hu R, Zhao L, Qiang L, Rong J-J, You Q-D, 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-kappaB and regulation of its metabolism. *Toxicol Lett* 197:201–210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.05.019
- Zhao G, Li T, Brochet DXP, Rosenberg PB, Lederer WJ (2015) STIM1 enhances SR Ca<sup>2+</sup> content through binding phospholamban in rat ventricular myocytes. *PNAS* 112:E4792–E4801. doi:10.1073/pnas.1423295112



- Zheng H, Zhou M-H, Hu C, Kuo E, Peng X, Hu J, Kuo L, Zhang SL (2013) Differential roles of the C and N termini of Orai1 protein in interacting with stromal interaction molecule 1 (STIM1) for Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) channel activation. *The Journal of Biological Chemistry* 288:11263–11272. doi:10.1074/jbc.M113.450254
- Zhou R, Snyder PM (2005) Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *The Journal of biological chemistry* 280:4518–4523. doi:10.1074/jbc.M411053200
- Zhou Y, Ramachandran S, Oh-Hora M, Rao A, Hogan PG (2010) Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4896–4901. doi:10.1073/pnas.1001169107
- Zhou Y, Srinivasan P, Razavi S, Seymour S, Meraner P, Gudlur A, Stathopoulos PB, Ikura M, Rao A, Hogan PG (2013) Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nat Struct Mol Biol* 20:973–981. doi:10.1038/nsmb.2625
- Zhou Y, Cai X, Loktionova NA, Wang X, Nwokonko RM, Wang X, Wang Y, Rotberg BS, Trebak M, Gill DL (2016) The STIM1-binding site nexus remotely controls Orai1 channel gating. *Nat Commun* 7:13725. doi:10.1038/ncomms13725
- Zhou Y, Cai X, Nwokonko RM, Loktionova NA, Wang Y, Gill DL (2017) The STIM-Orai coupling interface and gating of the Orai1 channel. *Cell Calcium* 63:8–13. doi:10.1016/j.ceca.2017.01.001
- Zhu H, Zhang H, Jin F, Fang M, Huang M, Yang CS, Chen T, Fu L, Pan Z (2014) Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 5:3455–3471. doi:10.18632/oncotarget.1903
- Zhu J, Feng Q, Stathopoulos PB (2017) The STIM-Orai Pathway; STIM-Orai Structures: Isolated and in Complex. *Adv Exp Med Biol* 993:15–38. doi:10.1007/978-3-319-57732-6\_2
- Ziman AP, Ward CW, Rodney GG, Lederer WJ, Bloch RJ (2010) Quantitative Measurement of Ca<sup>2+</sup> in the Sarcoplasmic Reticulum Lumen of Mammalian Skeletal Muscle. *Biophys J* 99:2705–2714. doi:10.1016/j.bpj.2010.08.032

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematischer Aufbau von Orai1 .....	26
Abb. 2: Vergleich der gemeinsamen Domänen in STIM1 und STIM2 (schematisch). .....	28
Abb. 3: Messung des speicherabhängigen Ca <sup>2+</sup> -Einstroms (SOCE).....	60
Abb. 4: Messung des Ca <sup>2+</sup> -Einstroms nach Behandlung mit 2-APB .....	62
Abb. 5: Einfluss des SGK1-Inhibitors EMD638683 auf den SOCE.....	63
Abb. 6: Einfluss von NFκB-Inhibitor Wogonin auf den SOCE.....	65
Abb. 7: RT-PCR von VPS13A nach dem Knockdown von VPS13A in ZF- Rhabdomyosarkomzellen. ....	66
Abb. 8: Messung des Ca <sup>2+</sup> -Einstroms nach Knockdown von VPS13A in ZF- Rhabdomyosarkomzellen. ....	68
Abb. 9: RT-PCR von Orai1, STIM1 und STIM2 nach Gen-Knockdown von VPS13A.....	69
Abb. 10: Orai1-Proteinmenge in ZF-Zellen nach Gen-Knockdown von VPS13A .....	70
Abb. 11: Visualisierung von Orai1 mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.	71
Abb. 12: Ermittlung von Orai1 auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (FACS). ....	72
Abb. 13: Einfluss von Chorein auf die Expression von SGK1.....	73
Abb. 14: Einfluss von Chorein auf die Expression von NFκB .....	74

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Übersicht über die bekanntesten Kanäle, die einen $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom oder eine $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bewirken. ....	21
Tab. 2: Übersicht über die bekanntesten Transporter, die intrazelluläres $\text{Ca}^{2+}$ eliminieren. ....	22
Tab. 3: Übersicht über die bekanntesten Ionenaustauscher, die intrazelluläres $\text{Ca}^{2+}$ eliminieren. ....	23
Tab. 4: erworbene Reagenzien. ....	43
Tab. 5: small interfering RNA (siRNA). ....	45
Tab. 6: verwendete Primer für die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). ....	45
Tab. 7: verwendete Antikörper. ....	46
Tab. 8: Laufpuffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). ....	47
Tab. 9: Transferpuffer für Western Blot. ....	47
Tab. 10: Tris-Cl für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele, 1,5 M. ....	47
Tab. 11: Tris-Cl für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele, 1,0 M. ....	47
Tab. 12: Herstellung des Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Trenngels (10 %) .....	47
Tab. 13: Herstellung des Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Sammelgels (5 %) .....	47
Tab. 14: Ringerlösung .....	47
Tab. 15: Kalzium-freie Ringerlösung .....	47
Tab. 16: Waschpuffer für Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), 10-fach konzentriert. ....	48
Tab. 17: verwendetes Verbrauchsmaterial. ....	48
Tab. 18: verwendete Geräte und Zubehör. ....	49

## 10 ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde in dem Institut für Physiologie der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Florian Lang durchgeführt. 2021 wurde die Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Stephan Huber der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen übernommen. Zusätzlich erfolgte die laborseitige Betreuung durch Frau Dr. rer. nat. Sabina Honisch.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Sabina Honisch, Prof. Dr. Christos Stournaras und Prof. Dr. Florian Lang.

Die Zellkultur, Gen-Knockdown, FACS-Versuche und Konfokale Fluoreszenzmikroskopie erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Sabina Honisch.

Die Behandlung der Zellen, das Western Blotting, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen und der Großteil der RT-PCR Experimente wurden, nach Einarbeitung durch Dr. Sabina Honisch, Dr. Sebastian Schmidt, Dr. Guoxing Liu, Dr. Evi Schmid und Dr. Jing Yan, eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung führte ich, nach erfolgter Anleitung durch Dr. Sabina Honisch und Dr. Jing Yan, eigenständig durch.

Ein Teil der hier vorliegenden Ergebnisse wurde in folgendem wissenschaftlichen Artikel veröffentlicht und entsprechende Stellen im Ergebnisteil gekennzeichnet:

Yu W, Honisch S, Schmidt S, Yan J, Schmid E, Alkahtani S, AlKahtane AA, Alarifi S, Stournaras C, Lang F (2016) Chorein Sensitive Orai1 Expression and Store Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry in Rhabdomyosarcoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 40:1141–1152. doi:10.1159/000453168

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 07.04.2021

Willi Zhou

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit hätte ohne die besondere Unterstützung vieler Menschen nicht entstehen können, denen ich hiermit danken möchte.

Zunächst gilt mein Dank meinen Betreuern Prof. Dr. Florian Lang aus dem Physiologischen Institut I der Universität Tübingen und Prof. Dr. Stephan Huber aus der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen. Herr Prof. Lang gab mir die Möglichkeit, dieses Forschungsprojekt in seinem Institut unter exzellenten Voraussetzungen durchzuführen. Seine fachliche Unterstützung und wissenschaftliche Begeisterung habe ich stets als Motivation empfunden. Herrn Prof. Dr. Huber danke ich für die Weiterbetreuung der Arbeit und Unterstützung in allen Fragen.

Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Christos Stournaras als Mitbetreuer der Arbeitsgruppe für die wissenschaftliche Begleitung und den konstruktiven Austausch.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sabina Honisch, die mich mit fachlichem Rat, regelmäßigen Besprechungen und konstruktiven Diskussionen während der ganzen Arbeit unterstützte und stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Ebenso danke ich Dr. Sabina Honisch sowie Dr. Sebastian Schmidt, Dr. Guoxing Liu und Dr. Jing Yan für ihre Anleitung und kompetenten Rat bei den erfolgten Experimenten und die geduldige Beantwortung sämtlicher Fragen, die mir als „Mediziner“ im Labor aufkamen. Ihnen und allen weiteren Mitarbeitern des Institutes bin ich dankbar für die positive Arbeitsatmosphäre und für die Hilfsbereitschaft, die ich erfahren durfte.

Zu guter Letzt gilt mein herzlicher Dank meiner Familie sowie meiner Ehefrau Hanna Zhou, die mich jederzeit unterstützten und mir Rückhalt gaben.