

**Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. Hans-Peter Hartung**

**Charakterisierung der Bax inhibitor-1 Familie hinsichtlich ihrer
Wirkung auf die intrazelluläre Kalziumhomöostase und Zelltod**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christian Vitalij Enders

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Axel Methner

Zweitgutachter: PD Dr. Philipp Albrecht

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Dmitrij A. Lisak, Teresa Schacht, Vitalij Enders, Jörn Habicht, Santeri Kiviluoto, Julia Schneider, Nadine Henke, Geert Bultynck, Axel Methner. The transmembrane Bax inhibitor motif (TMBIM) containing protein family: Tissue expression, intracellular localization and effects on the ER Ca^{2+} -filling state. *BBA Molecular Cell Research*.

Nadine Nickel, Astrid Cleven, Vitalij Enders, Dmitrij Lisak, Lars Schneider, Axel Methner. Androgen-inducible gene 1 increases the ER Ca (2+) content and cell death susceptibility against oxidative stress. *Gene*.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Klassifizierung der Bax inhibitor-1 Proteinfamilie TMBIM1-6 (Transmembrane BAX inhibitor motif containing) hinsichtlich ihres Einflusses auf den Zelltod und die intrazelluläre Kalziumhomöostase. Als *in vitro* Modell dienten murine Zellen hippocampalen Ursprungs (HT22). Die HT22 Zellen wurden transient mit TMBIM1-6 oder Leervektor transfiziert. Der Vektor enthielt neben der kodierenden cDNA einen N-terminalen HA-tag (Human influenza hemagglutinin) und ein bicistronisches Fluoreszenzprotein (IRES VENUS). Mittels durchflusszytometrischer Sortierung wurden die Zellen angereichert, die das spezifische Signal des eingebrachten Fluoreszenzproteins emittierten. Der HA-tag diente dem Nachweis der Genprodukte im Western Blot. Mit den so stabil transfizierten Zellen wurden Zytotoxizitätstests mit Glutamat und Thapsigargin durchgeführt, um den Einfluss der eingebrachten Proteine auf den Zelltod zu untersuchen. Mittels Fura2-AM Einzelzellimaging wurden Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentrationen nach Inhibition der sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase durch Thapsigargin gemessen. Die Messungen lieferten quantitative Aussagen über den Kalziumgehalt des ER und den anschließenden speicherabhängigen Kalziumeinstrom (SOCE). Die Messungen ergaben, dass die Proteine TMBIM1-6 einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase und die Zelltodrate der transfizierten Zellen haben. Mit Ausnahme von TMBIM2 schützten alle Proteine dieser Familie die transfizierten Zellen gegen thapsigargininduzierten Zelltod. Besonders deutlich war dieser Effekt bei den phylogenetisch sehr ähnlichen Proteinen TMBIM3, 5 und 6. Jedoch schützte nur BI-1 (TMBIM6) die murinen Zellen gegen glutamatinduzierten Zelltod. Die Messungen des zytosolischen Kalziumspiegels ergaben eine verminderte Kalziumfreisetzung und einen geringeren SOCE der mit TMBIM3, 5 und 6 transfizierten Zellen.

Abstract

Aim of this piece of work was the classification of Bax inhibitor-1 protein family TMBIM1 - 6 (transmembrane Bax inhibitor motif containing) with reference to its influence onto cellular death and the intracellular calciumhomeostasis. Murine cells with hippocampal origin (HT22) were used as an in vitro model. The HT22 cells were transient with TMBIM1 - 6 or transfected with empty vector. The vector contained, next to the coding cDNA, one N-terminal HA-tag (Human influenza hemagglutinin) and a bicistronic fluorescenceprotein (IRES VENUS). The cells were enriched through flow cytometrical sorting, which emitted the special signal of the applied fluorescenceprotein. The HA-tag served as proof of the genetical product in the Western Blot. With the so stable transfected cells, cytotoxic tests with Glutamat and Thapsigargin were performed to examine the influence of the applied proteins onto the cellular death. Through Fura2-AM single images, changes of cytosolic calciumconcentration after inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase through Thapsigargin were measured. The measurements shown quantitative statements on the amount of calcium of the ER and the following storage related calcium stream (SOCE). The measurements also shown that the proteins TMBIM1 - 6 have got an influence onto the calciumhomeostase and the cell death rate of the transfected cells. Apart from TMBIM2, all proteins of this family do protect the transfected cells against thapsigargininduced death of cells. Especially obvious was this effect with the phylogenetically very similar Protein TMBIM3, -5 und -6. But only the BI-1 (TMBIM6) protected the murine cells against glutamatinduced death of cells. The measurements of the cytosolic calcium level shown a reduced calciumrelease und a lower SOCE of the with TMBIM3, -5, and - 6 transfected cells.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	IRE-1	Inositol-requiring- enzyme 1
AIF	Apoptosis-inducing factor	kD.	Kilodalton
AMPA	2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl- isoxazol-4-yl) propanoic acid	KO	Knock out
ATF6	Activating-transcription factor 6	LFG	Lifeguard
ATP	Adenosine triphosphate	LGCC	Ligand-gated Ca ²⁺ channels
AUC	Area under the curve	MCS	Multiple cloning site
Bad	Bcl-2-associated death promoter	MEF	Mouse embryonic fibroblast
BAX	Bcl-2-associated X protein	mGluR	Metabotropic glutamate receptor
BCA	Bicinchoninic acid	NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
BCL-2	B-cell lymphoma 2	NMDA	N-Methyl-D-aspartate
BCL- XL	BCL2-like 1	P450	Cytochrom P450
Bfl-1	Bcl-2 Related Protein A1	PBS	Phosphate-Buffered Saline
BI-1	Bax Inhibitor-1	PERK	Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat	PIP2	Phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate
CHO	Chinese hamster ovary	PLC	Phospholipase C
CRAC	Ca ²⁺ -release activated Ca ²⁺ channel	ROS	Reactive oxygen species
DAG	Diacylglycerol	SDS	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	SEM	Standard error of the mean
DMSO	Dimethylsulfoxid	SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	cGC	Soluble guanylyl cyclase
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid	SOCE	Store operated Ca ²⁺ entry
ER	Endoplasmatisches Retikulum	SOD	Superoxide dismutase

EV	Empty vector	SSC	Side Scatter
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	STIM1	Stromal interaction molecule 1
FAIM2	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	TMBIM	Transmembrane BAX inhibitor motif containing
FasL	Fas ligand	TNFα	Tumor necrosis factor α
FCS	Fetal Calf Serum	TRP	Transient receptor potential channels
FSC	Forward Scatter	ü.N.	Über Nacht
GAAP	Golgi anti-apoptotic protein	UPR	Unfolded protein response
GC	Guanylatzyklasen	VDCC	Voltage-dependent Ca ²⁺ channel
GCL	Glutamylcysteine ligase		
GSH	Glutathione		
GSSG	GSH disulfide		
GTP	Guanosintriphosphat		
h.	Hour		
HA	Human influenza hemagglutinin		
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution		
HUGO	Human Genome Organisation		
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate		
IP₃-R	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor		

Inhalt

Einleitung.....	1
Zelluläre Kalziumfunktionen	1
Klassifizierung der Kalziumkanäle.....	2
Speichergesteuerter Ca ²⁺ -Einstrom (SOCE)	3
Kalzium und Zelltod	4
Oxidativer Stress durch Glutamat.....	6
ER-Stress durch Thapsigargin	7
BAX-Inhibitor-1 (BI-1).....	8
BI-1-Funktionen.....	9
BI-1 und die Ca ²⁺ -Homöostase	10
BI-1-ähnlichen Proteine	10
TMBIM1/RECS1	11
TMBIM2/FAIM2.....	12
TMBIM3/GRINA	12
TMBIM4/GAAP	12
TMBIM5/GHITM.....	13
Ziele der Arbeit.....	14
Materialien und Methoden.....	15
HT22 Zellkultur	15
Geräte und Verbrauchs-Materialien	15
Zubereitung des Nährmediums für HT22 Zellen.....	16
Erhaltung der HT22 Zellkultur	17
Zellkulturreagenzien	17
Bestimmung der Zellzahl.....	18
Das PiggyBac Transposon System	18
Transfektion eukaryotischer Zellen	18
Transfektionsreagentien.....	20
Durchflusszytometrie (FACS)	20
Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	20
Proteinbiochemische Techniken	21
Extraktion von Proteinlysaten.....	21

Quantitative Proteinbestimmung	22
SDS–Polyacrilamid Gelelektrophorese (SDS–PAGE)	22
Immunoblot.....	23
Zytotoxizitätstest.....	25
Kalziumimaging.....	26
Fura2-AM	28
Fura2-AM Kalibrierung mit HT22	28
Statistische Analyse	29
Versuchsreagenzien	30
Software	30
Ergebnisse.....	31
Erfolgreiche Generierung stabiler TMBIM1-6 exprimierender HT22 Zellen.....	31
Durchflusszytometrie TMBIM	32
Nachweis der HA–getaggtten TMBIM-Proteine durch Immunoblot.....	33
Nachweis von Aktin durch Immunoblot.....	34
TMBIM1/RECS1	36
TMBIM1/RECS1 Zytotoxizitätstest mit Glutamat.....	36
TMBIM1 Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin.....	38
TMBIM1 Kalziumimaging	39
TMBIM2/FAIM2	41
TMBIM2 /FAIM2 Zytotoxizitätstest mit Glutamat.....	41
TMBIM2 /FAIM2 Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin.....	43
TMBIM2 /FAIM2 Kalziumimaging	44
TMBIM3/GRINA	46
TMBIM3/GRINA Zytotoxizitätstest mit Glutamat	46
TMBIM3/GRINA Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin.....	48
TMBIM3/GRINA Kalziumimaging	49
TMBIM4/GAAP	51
TMBIM4/GAAP Zytotoxizitätstest durch Glutamat	51
TMBIM4/GAAP Zytotoxizitätstest mitThapsigargin.....	53
TMBIM4/GAAP Kalziumimaging	54
TMBIM5/GHITM.....	56
TMBIM5/GHITM Zytotoxizitätstest mit Glutamat.....	56
TMBIM5/GHITM Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin.....	58
TMBIM5/GHITM Kalziumimaging.....	59

TMBIM6/BI-1.....	61
TMBIM6/BI-1 Zytotoxizitätstest mit Glutamat.....	61
TMBIM6/BI-1 Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin	63
TMBIM6/BI-1 Kalziumimaging.....	65
Diskussion	67
TMBIM1/RECS1.....	67
TMBIM2/FAIM2.....	68
TMBIM3/GRINA	69
TMBIM4/GAAP	70
TMBIM5/GHITM.....	71
TMBIM6/BI-1.....	73
Rolle von mitochondrialem Ca ²⁺	74
Schlussfolgerungen und Aussichten	76
Kritik an der Arbeit.....	78
Anhang.....	71

Einleitung

Zelluläre Kalziumfunktionen

Kalziumionen sind zentrale Mediatoren zahlreicher zellulärer Stoffwechselfunktionen. Ca^{2+} ist maßgeblich beteiligt an der Regulation der Proteinbiosynthese, der Bildung des Membranpotentials, der Signaltransduktion in neuronalen Geweben, der Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) und vielem mehr (1). Folglich sind Störungen des äußerst sensiblen Kalziumhaushalts an zahlreichen neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Epilepsien, Amyotrophe Lateralsklerose, Schizophrenie und den Folgen eines ischämischen cerebralen Insults beteiligt (2). Der Kalziumspiegel muss daher sensibel in einem engen Rahmen reguliert werden, um die fundamentalen zellphysiologischen Vorgänge aufrechtzuerhalten (3). Die Kalziumkonzentrationen des Extrazellulärraumes und die der intrazellulären Speicher, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), sind um etwa das 1000-fache höher als die zytosolische Kalziumkonzentration, die mit etwa 100 nM sehr gering ist. Es besteht somit ein starkes Ca^{2+} -Konzentrationsgefälle von extra- nach intrazellulär, sowie aus den intrazellulären Speichern in das Zytosol (3). Die Permeabilität der Zellmembran ist für Ca^{2+} Ionen unter Ruhebedingungen sehr gering. Die Regulation des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels wird durch aktive, sekundär aktive und passive Transportvorgänge aufrechterhalten. Bei Bedarf kann die Zelle Kalzium aus dem Extrazellulärraum und/oder aus den intrazellulären Speichern beziehen. Um Ca^{2+} nach extrazellulär oder in die intrazellulären Speicher gegen das Konzentrationsgefälle zu befördern sind ATP-verbrauchende Transportvorgänge (Ca^{2+} -ATPasen) notwendig. Der Kalziueinstrom in das Zytosol erfolgt hingegen weitestgehend passiv entlang des Konzentrationsgefälles durch zahlreiche Kalziumkanäle an der Zelloberfläche und dem ER. Um die Regulation der Kalziumkonzentrationen zu verstehen, ist eine Kenntnis der Transportmöglichkeiten durch die Zellmembran und innerhalb der Zelle notwendig.

Klassifizierung der Kalziumkanäle

Um den Kalziumtransport zwischen Extrazellulärraum und Zytosol zu kontrollieren, sind an der Zellmembran zahlreiche Kanäle vorhanden, die entsprechend ihrer Physiologie eingeteilt werden können. Für die Kalziumzufuhr aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol sind die spannungsabhängigen (voltage-dependent Ca^{2+} channels, VDCC) und die ligandenabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (ligand-gated Ca^{2+} channels, LGCC) beschrieben. Die VDCCs ändern ihre Permeabilität in Abhängigkeit von dem Membranpotential und werden nach ihrer Leitfähigkeit, Aktivierungsgeschwindigkeit und Aktivierungsspannung in L-, N-, P-Q, R und T-Kanäle untergliedert (4). VDCCs verändern ihre Öffnungswahrscheinlichkeit während der zellulären Depolarisation, sodass extrazelluläres Kalzium in das Zytosol strömt und somit unter anderem die präsynaptische Vesikelexozytose ermöglicht wird. Die kalziumabhängige Vesikelexozytose ist für die neuronale Signaltransduktion unerlässlich. Die ligandenabhängigen Ca^{2+} -Kanäle ändern ihre Permeabilität für Ca^{2+} durch die Bindung eines spezifischen Liganden. So werden beispielsweise die NMDA (n-Methyl-D-Aspartat)-, AMPA(α -Methyl-D-Aspartat)- und Kainat-Rezeptoren durch die Bindung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat permeabel für Kalzium (5) (6). Alternativ lassen sich Kalziumkanäle durch second Messenger wie das intrazelluläre Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP_3) nach Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren oder anderen G_q -gekoppelten Rezeptoren öffnen. Durch die Aktivierung G_q -gekoppelter Rezeptoren entsteht intrazellulär IP_3 , welches ein zentraler second Messenger ist, der an den IP_3 -Rezeptor (IP_3 -R) des ER bindet und somit die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER aktiviert (7). Die Kalziumfreisetzung aus dem ER kann auch durch die Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors ausgelöst werden, welcher durch einen zytosolischen Kalziumanstieg aktiviert wird und somit rasch weiteres Kalzium aus dem ER freisetzt (8). Das freie Ca^{2+} aus dem Zytosol wird anschließend aus der Zelle heraus oder in die intrazellulären Speicher gegen das Konzentrationsgefälle befördert. Der Transport aus der Zelle erfolgt einerseits primär aktiv unter ATP-Verbrauch über die Ca^{2+} -ATPasen und andererseits sekundär aktiv über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher befördert Natrium entlang des Konzentrationsgefälles in die Zelle und Kalzium gegen das Konzentrationsgefälle nach extrazellulär. Der Transport des freien Ca^{2+} aus dem Zytosol in das ER erfolgt aktiv über die Kalziumpumpe (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase,

SERCA). Die Funktion der SERCA ist unentbehrlich, um die intrazellulären Speicher des ER nach einer Entleerung wieder zu füllen.

Speichergesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (SOCE)

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration kann auch durch Kalziumdepletion aus intrazellulären Speichern erhöht werden, hier vor allem aus dem endoplasmatischen Retikulum (9). Dieser zytosolische Ca^{2+} -Anstieg spiegelt den Kalziumgehalt der intrazellulären Speicher wieder (10). Die Leerung dieser intrazellulären Speicher ist durch zweierlei unterschiedliche second Messenger auslösbar. Dies ist zum einen Inositol 1,4,5-Triphosphat und zum andern das Ca^{2+} selbst (11). Durch die Leerung des ER wird ein gesteigerter Ca^{2+} -Influx in das Zytosol aus dem Extrazellulärraum beobachtet. Dieser Anstieg wird als speichergesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (store-operated calcium entry, SOCE) bezeichnet (12). Der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom resultiert aus der Aktivierung der CRAC-Kanäle (calcium release-activated Ca^{2+} channel, CRAC) an der Zellmembran (12). Der Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels, in Abhängigkeit von dem Füllungsstand des ER, wird durch das im ER lokalisierte kalziumbindende Protein mit der Bezeichnung STIM1 (stromal interaction molecule 1) und einen Ca^{2+} -Kanal namens Orai1 an der Zellmembran ermöglicht (13) (14) (15). Orai1 ist ein Bestandteil der CRAC-Kanäle und wird seinerseits durch STIM1 aktiviert (14). STIM1 ist ein Transmembranprotein des ER, welches nach der Entleerung des ER an Orai1 an der Zellmembran bindet und somit Orai1 aktiviert (16). Die Aktivierung der Orai1-Kanäle führt schließlich zu einem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels (16). Dieser speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom ist notwendig, um das ER nach einer Entleerung, wieder mit Kalzium zu füllen und somit die physiologischen Funktionen dieser Organelle aufrechtzuerhalten. Studien zeigten, dass die Überexpression von STIM1 und Orai1 zu einem gesteigerten SOCE führen und das Fehlen von STIM1 einen entgegengesetzten Effekt auf das SOCE hat (17). Der spannungsunabhängige Transportweg über SOCE spielt eine wesentliche Rolle bei dem Kalziumhaushalt der neuronalen Zellen und hat damit einen dirigierenden Einfluss auf die Proteinbiosynthese, die Signaltransduktion und die Apoptose der Zellen (18). Eine dauerhaft erhöhte zyttoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration führt zu dem Untergang der betroffenen Zelle (19).

Kalzium und Zelltod

Es besteht ein enger und komplexer Zusammenhang zwischen Zellsterben und dem Kalziumhaushalt (20). Der Zelltod spielt eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Entwicklung, der Immunabwehr und der Aufrechterhaltung der lebensnotwendigen Homöostase zwischen der Proliferation und dem Absterben von Geweben (21). Es werden im Wesentlichen zwei Arten des Zelltodes anhand der biochemischen und morphologischen Unterschiede im Ablauf des Zellsterbens beschrieben. Der programmierte Zelltod durch Apoptose und die durch Infektionen oder Traumata ausgelöste Nekrose (22). Das Endresultat der Apoptose ist die Fragmentierung der Zellorganellen und der DNA durch die Caspasen (Cysteinyl-aspartate specific protease). Die Caspasen sind die Hauptmediatoren der Apoptose. Sie gehören zu der Enzymklasse der Cystein-Proteasen und sind für die geordnete „Exekution“ der Zelle verantwortlich (23). Nach der Fragmentierung der DNA verlässt die Zelle den Zellverband und zerfällt in kleine Vesikel (Apoptosekörper). Diese Apoptosekörper werden vor allem durch Makrophagen phagozytiert, sodass keine zellulären Bestandteile extrazellulär vorliegen und somit keine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird (24). Zahlreiche physikalische und chemische Noxen können zum Auslösen der Apoptose führen (21). Dabei wird eine intrinsische von einer extrinsischen Aktivierung unterschieden. Der extrinsische (rezeptorabhängige) Signalweg erfolgt durch eine Reihe von Liganden, wie Zytokine, TNF α (Tumornekrosefaktor α) und den Fas-Ligand (FasL), die an Todesrezeptoren der Zellmembran binden (25). Die durch die Bindung von CD95/Fas an den Fas-Rezeptor der Zellmembran verursachte Signalkaskade induziert eine erhöhte Kalziumfreisetzung aus dem ER und damit eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration (26). Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der Überexpression des Androgen-induzierten Gens 1 (AIG1) und dem damit verbundenen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, welche zu einer Überempfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress führte gezeigt werden (27). Der intrinsische (mitochondrienabhängige) Signalweg ist häufig eine Folge von DNA-Schädigungen, oxidativen Stress, aber auch Energiemangel in Folge mangelnder ATP-Neusynthese. Das Entscheidende bei der intrinsischen Aktivierung ist die Freisetzung des Cytochrom c aus den Mitochondrien (28). Dabei wird die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration durch einen Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum über die membranständigen Kanäle und/oder durch die Kalziumdepletion aus dem ER erhöht (29). Die dauerhafte

Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels führt zu einer Anreicherung der Ionen in den Mitochondrien. Die Überladung der Mitochondrien mit Kalzium führt zur Schwellung der Organellen und letztlich zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran (30). Durch die Ruptur der äußeren Membran werden proapoptotische Faktoren wie Cytochrom c, Apoptose induzierender Faktor (AIF) und Procaspase-9 in das Zytosol freigesetzt (30). Die Proteine der Bcl-2-Familie spielen bei der Regulation der Apoptose eine wesentliche Rolle (31) (32). Die intrazelluläre Lokalisation der Bcl-2-Proteine ist die mitochondriale Membran und das ER (31). Charakteristisch für den Aufbau dieser Proteine sind die Bcl-2-homologen Domänen BH1–BH4 (33). Die Proteine der Bcl-2-Familie werden anhand ihrer Funktion und des Vorliegens der homologen Domänen BH1-4 in proapoptotische und antiapoptotische Unterfamilien unterteilt (34). Zu den antiapoptotischen Proteinen gehören Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, CED-9, A1 und Bfl-1 (23). Diese besitzen alle die Domänen BH1-4. Die proapoptotischen Proteine werden anhand ihrer Struktur in zwei Unterklassen eingeteilt. Den Proteinen Bax und Bak fehlt die BH4-Domäne. Die andere Gruppe der proapoptotischen Proteine, zu der die Proteine Bad, Bid, Bim, PUMA und Noxa gehören, besitzt nur die BH3 Domäne. Sie werden daher auch als BH3-only Proteine bezeichnet (35). Demnach scheint die BH3 Domäne ein notwendiger Bestandteil der proapoptotischen Bcl-2-Proteine zu sein. Unter physiologischen Bedingungen liegen die pro- und antiapoptotischen Proteine in einem Gleichgewicht vor und inaktivieren sich möglicherweise durch Bindung von Bax und Bak an Bcl-2 gegenseitig (36). Die BH3-only Proteine wie Bid, Bad und PUMA scheinen nach der Apoptoseinduktion die Proteine Bax und Bad durch Bindung zu aktivieren. Der genaue Prozess der Interaktion zwischen den Proteinen der Bcl-2-Familie ist jedoch noch nicht geklärt. Durch die Hemmung der antiapoptotischen und Aktivierung der proapoptotischen Proteine kommt es zu einer vermehrten Abgabe von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol (37). Cytochrom c ist ein zentraler Mediator der intrinsischen Apoptose (28). Neben dem Einfluss auf die mitochondriale Membran, und damit die Cytochrom c Freisetzung, haben die Proteine der Bcl-2-Familie einen Einfluss auf den Kalziumhaushalt (31). Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 senken nachweislich den Kalziumgehalt des ER und den SOCE (38) (39). Bcl-2 und Bcl-XL senken signifikant die IP_3 -induzierte Kalziumfreisetzung aus dem ER durch Interaktion mit dem IP_3 -Rezeptor (32).

Oxidativer Stress durch Glutamat

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter und spielt unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der neuronalen Signaltransduktion. Dauerhaft erhöhte Glutamatkonzentrationen sind jedoch zytotoxisch (40). Die Aktivierung der glutaminergen Rezeptoren führt sowohl über die ionotropen als auch über metabotropen Rezeptoren zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Der Anstieg des intrazellulären Kalziums führt zu einem erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom in die Mitochondrien (21). Der erhöhte mitochondriale Ca^{2+} führt zu Störungen der ATP-Synthese, welches unter anderem notwendig ist um überflüssiges Kalzium aus der Zelle zu transportieren. Es kommt zu einer Schwellung der Mitochondrien und schließlich zur Ruptur der äußeren Membran und Freisetzung von Cytochrom c, welches die Apoptose induziert (20) (28). Neben der erhöhten zytoplasmatischen Kalziumkonzentration führt Glutamat zu gesteigertem oxidativen Stress (40). Oxidativer Stress entsteht in allen atmenden Zellen an den Komplexen I und III der mitochondrialen Atmungskette (41) (42). Die Cytochrom P450 Reduktase ist ein Enzym des ERs, welches unter physiologischen Bedingungen Elektronen überträgt und wasserunlösliche Stoffe oxidiert. Eine übermäßige Induktion der Cytochrom P450 Reduktase führt ebenfalls zu einer gesteigerten Produktion von ROS (reactive oxygen species, ROS) (43). Die reaktiven Sauerstoffspezies wie Hyperoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und die daraus entstehenden Sauerstoffradikale, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal sind zytotoxisch (44) (45). Diese reaktiven Sauerstoffspezies oxidieren Proteine, Lipide und die Nukleinsäuren was die Zelle dramatisch beschädigen und letztlich zur Apoptose führen kann. Somit sind antioxidative Mechanismen für die Zelle überlebenswichtig. Zu diesen antioxidativen Mechanismen gehören neben Superoxiddismutase (SOD) das Glutathion (GSH). Das Glutathion ist ein Tripeptid und besteht aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin (46). Die Synthese von GSH erfolgt aktiv im Zytosol unter ATP-Verbrauch und kann anschließend in die verschiedenen Organellen oder nach extrazellulär diffundieren (47). GSH ist in der Lage direkt oder enzymatisch als Kofaktor der Glutathionperoxidase ROS zu eliminieren. Dabei entstehen aus zwei GSH unter Bildung einer kovalenten Disulfidbrücke das GSH-Disulfid (GSSG). Die GSH-Reductase reduziert das GSSG unter Verbrauch von NADPH wieder zu GSH (48).

Eine ausreichende Menge an GSH sollte aufrechterhalten werden, um die entstehenden Sauerstoffradikale unschädlich zu machen (47). Glutamat blockiert den Cystin/Glutamat–Antiporter an der Zellmembran, sodass die Zelle nicht mehr genügend Cystin, welches ein Substrat für Cystein ist, für die Synthese von GSH bekommt (49). Der Mangel an GSH führt zu einem langsamen Anstieg der ROS und damit zum Zelltod (49). Letztlich kommt es zur Aktivierung des Enzyms Guanylatcyclase (GC), welches das Guanosintriphosphat (GTP) in das zyklische Guanosin-Monophosphat (cGMP) katalysiert. Das cGMP führt zu einer Öffnung von Kalziumkanälen, die derzeit noch nicht identifiziert wurden und somit zu einem weiteren apoptotischen Stimulus durch exzessiven Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} (50). Oxidativer Stress wird ursächlich für eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Amyotrophe Lateralsklerose angesehen (51) (52).

ER-Stress durch Thapsigargin

Thapsigargin wird aus der Wurzel von *Thapsia garganica* gewonnen und ist ein spezifischer Inhibitor der SERCA–Pumpe des ER (53). Die SERCA befördert zytosolisches Kalzium unter ATP–Verbrauch in das ER und hält so den Konzentrationsgradienten zwischen dem ER–Lumen und dem Zytosol aufrecht. Die Hemmung der SERCA führt zu einer Ca^{2+} -Depletion aus dem ER und damit zu einem lokalen Ca^{2+} -Anstieg im Zytosol (54). Dieser Anstieg der Kalziumkonzentration kann zu Apoptoseinduktion führen. Thapsigargin ist in der Lage durch Störungen der Ca^{2+} -Homöostase ER-Stress zu induzieren (53). Eine der wichtigsten Funktionen des ER's ist die Biosynthese und korrekte Faltung der neuen Genprodukte. Um diese Aufgaben erfüllen zu können müssen in dem ER bestimmte Bedingungen gegeben sein. So liegt im ER–Lumen eine erhöhte Kalzium- und ATP-Konzentration vor. Um die Bildung von Verbindungen wie Disulfidbrücken zu ermöglichen ist eine oxidierende Umgebung notwendig (53). Auf Grund dieser speziellen Bedingungen ist das ER besonders anfällig für intrazelluläre Änderungen des ATP- und Ca^{2+} -Spiegels sowie des Redox-Status. Veränderungen dieser Parameter führen zur Akkumulation ungefalteter Proteine im ER–Lumen und induzieren somit den ER–Stress. Als Folge von ER–Stress wird eine Signalkaskade induziert, die als unfolded protein response (UPR) bezeichnet wird. Die UPR wird durch die drei ER–Transmembranproteine PERK (pancreatic ER–kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) und IRE-1 (inositol-running enzyme 1)

induziert. Die UPR soll das Überleben der Zelle durch die Verminderung der falsch gefalteten Proteine sichern. Gelingt es der Zelle durch die UPR nicht die physiologischen Bedingungen wiederherzustellen, oder dauert der ER-Stress lange an, wird die Apoptose eingeleitet. Unter physiologischen Bedingungen sind die UPR-Proteine durch das ER-Chaperon GP78 (Glucose-Regulated Protein) inhibiert. Durch die Akkumulation ungefalteter Proteine kommt es zur Desinhibition von PERK, ATF6 und IRE-1. Das Ziel der UPR ist die Wiederherstellung der physiologischen Bedingungen im ER-Lumen, damit die Faltung und Neu-Synthese von Proteinen wieder fortgesetzt werden kann. Ist das nicht der Fall, so kommt es durch vermehrte Synthese von proapoptotischen Proteinen zur Induktion der Apoptose (53). Proteine der Bcl-2-Familie sind vermutlich an dem Prozess der Apoptose durch die UPR beteiligt. Die Übertragung von apoptotischen Signalen von dem ER zu den Mitochondrien durch Bcl-2 wäre denkbar, da die Proteine Bak, Bax, Bcl-2 und Bcl-XL in dem ER lokalisiert sind (55) (56). ER-Stress wird unter anderem als Ursache für die Entstehung von Morbus Alzheimer diskutiert (57).

BAX-Inhibitor-1 (BI-1)

BAX-Inhibitor (BI-1) ist ein antiapoptotisches Protein, welches in der Lage ist in der Hefe die Bax-induzierte Apoptose durch Interaktion mit Bcl-2 zu verhindern (58) (59). Die Ähnlichkeit der BI-1 Proteine von Pflanzen und Säugetierzellen belegt seinen evolutionär hohen Konservierungsgrad. BI-1 besteht aus sechs bis sieben Transmembrandomänen und ist in jedem Fall kein Typ I Transmembran Protein (60). Untersuchungen in BI-1 überexprimierenden Zellen zeigten, dass sich das Protein vermutlich in dem Golgi-Apparat und in dem ER befindet (58) (61). Der C-Terminus des Proteins ist im Zytosol lokalisiert. BI-1 interagiert in seiner Funktion mit den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-XL der Bcl-2-Familie (62). Entsprechend der Funktion der von Bcl-2 und Bcl-XL hat auch BI-1 einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Depletion aus dem ER (58). Neben der Senkung der ER-Stress bedingten Ca^{2+} -Depletion ist BI-1 auch ein Inhibitor der IRE-1, welches ein ER-Stresssensor ist (63). Desweiteren reduziert BI-1 den oxidativen Stress durch direkte Interaktion mit der NADPH-P450 Reductase (64). Als antiapoptotisches Protein spielt BI-1 auch eine Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen. So wurde eine gesteigerte BI-1

Synthese in Gliomen (65), Prostatakarzinomen (66) und bei der akuten myeloischen Leukämie (67) festgestellt.

BI-1-Funktionen

Seit der Entdeckung von BI-1 1998 (58) befassten sich eine Vielzahl von Studien mit der Funktion dieses hoch konservierten Proteins. Klar ist, dass BI-1 den Zelltod durch Überexpression von humanem Bax in Hefezellen schützt (58). Ebenfalls wurde gezeigt, dass BI-1 humane HEK293 Zellen gegen Überexpression von Bax, nicht jedoch durch TNF, FAS und GM701-induzierten Zelltod, schützt (58). Primäre kortikale Neurone von BI-1 Knockout-Mäusen zeigten eine signifikante Steigerung der reperfusionsbedingten Schädigung der Neurone (68). Im Verlauf der Studien wurde zunehmend klar, dass BI-1 gegen ER-induzierten Stress schützt (64). Über die antiapoptotische Funktion hinaus beeinflusst BI-1 den mitotischen Zellzyklus und reguliert damit die Proliferationsgeschwindigkeit von Geweben. So zeigten BI-1-defiziente Mäuse eine deutlich gesteigerte Regenerationsgeschwindigkeit der murinen Hepatozyten im Vergleich zu den BI-1-überexprimierenden Mäusen (69). Transient BI-1 transfizierte HT1080 Zellen zeigten eine verminderte Zelltodrate durch ER-Stress durch die SERCA-Inhibitor Thapsigargin und Tunicamycin (68). Diese Studien unterstreichen die antiapoptotische Funktion des BI-1 in verschiedenen Zelllinien. Diese Funktion des Bax-Inhibitors-1 ist eventuell auf eine Interaktion mit den apoptoseregulierenden Proteinen der Bcl-2-Familie zurückzuführen. So wurde die Interaktion von BI-1 und Bcl-2 in Abwesenheit der BH4-Domäne des Bcl-2 aufgehoben (58). Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL haben beide durch ihre Lage an dem ER einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase, sodass BI-1 mit beiden Proteinen interagiert und so den Ca^{2+} -Spiegel beeinflusst. Eine Senkung der Kalziumkonzentration des endoplasmatischen Retikulums ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) wurde im Zusammenhang mit Bcl-2 und Bcl-XL gezeigt (32). Ebenso phosphoryliert Bcl-2 den IP_3 -Rezeptor und erhöht somit die passive Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem ER in das Zytosol und senkt damit die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ und folglich auch die stressinduzierte Ca^{2+} -Ausschüttung (70). BI-1 ist in der Lage den ER-Stress durch die Hemmung des IRE-1 und damit die Apoptoseinduktion zu vermindern (71). Die aktivierte IRE-1 ist eine Endonuklease, deren Aktivität bei BI-1 KO Mäusen dauerhaft gesteigert ist. Der Effekt

der Apoptoseinduktion durch die UPR, sowie die Auswirkungen von BI-1 über die Interaktion mit IRE-1 auf den Kalziumhaushalt, ist noch unklar.

Die Überexpression von BI-1 senkt signifikant die Rate der ROS und damit die Lipidperoxidation des ER (64). Das Cytochrom P450 spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von ROS (45). In BI-1 überexprimierenden Zellen ist die Aktivität dieses Enzyms herabreguliert und verhindert so die Bildung von Sauerstoffradikalen (64). Auf welchem Wege sich diese Interaktionen auf den Kalziumspiegel auswirken ist ebenfalls noch unklar.

BI-1 und die Ca²⁺-Homöostase

Verschiedene Studien zeigten, dass BI-1 in der Lage ist BAX-induzierten Zelltod vorzubeugen und stellten einen Zusammenhang zu der intrazellulären Ca²⁺ fest (72) (36) (58). BI-1 Knockout-Mäuse zeigten eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ER-Stress. Bei einem durch Thapsigargin induzierten ER-Stress zeigten diese Mäuse eine erhöhte Ca²⁺-Ausschüttung aus dem ER (68). Das somit vermehrt aus dem ER ausgeschüttete Ca²⁺ induzierte die Apoptose. Mit dem spezifischen SERCA-Inhibitor Thapsigargin lässt sich der Ca²⁺-Gehalt des ER ermitteln (54). BI-1 überexprimierende Zellen zeigten einen verminderten Ca²⁺-Gehalt des ER im Vergleich zu nativen Zellen (58). So zeigten transient mit BI-1 transfizierten CHO (Chinese hamster ovary) Zellen eine dramatisch gesenkte Ca²⁺-Ausschüttung aus dem ER nach Behandlung mit ATP. ATP führt über die IP₃-Kaskade zu einer vermehrten Ca²⁺-Ausschüttung aus dem ER (61). Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von BI-1 zu einer Hemmung des IP₃-Rezeptors und damit zu einer geringeren Kalziumfreisetzung aus dem ER und so zu einer geringeren Zelltodrate führt (73). Neben der Senkung der [Ca²⁺]_{ER} senkten BI-1 überexprimierende Zellen auch die [Ca²⁺] der Mitochondrien (74).

BI-1-ähnlichen Proteine

Die phylogenetische Analyse von BI-1 in verschiedenen Spezies ergab die Existenz von fünf BI-1-ähnlichen Proteinen. Diese evolutionär verwandten Proteine und deren Funktion im Organismus wurden bereits in einigen Studien untersucht, sodass eine Vielzahl an deskriptiven Namen für diese Proteine entstanden. Es ist nur wenig über den Aufbau, die intrazelluläre Lokalisation und die Funktion dieser Proteine im Zusammenhang mit Zellsterben und deren Einfluss auf den Kalziumhaushalt bekannt.

Die von HUGO (Human Genome Organisation) gene nomenclature committee akzeptierte Nomenklatur für diese Proteine ist TMBIM (transmembrane BAX inhibitor motif containing) 1–6, wobei BI-1 TMBIM6 entspricht. TMBIM1-6 enthalten alle eine hydrophobe Aminosäuresequenz (UPF0005-motif), die durch ihren Einfluss auf die Kalziumhomöostase antiapoptotisch wirkt (75) (76).

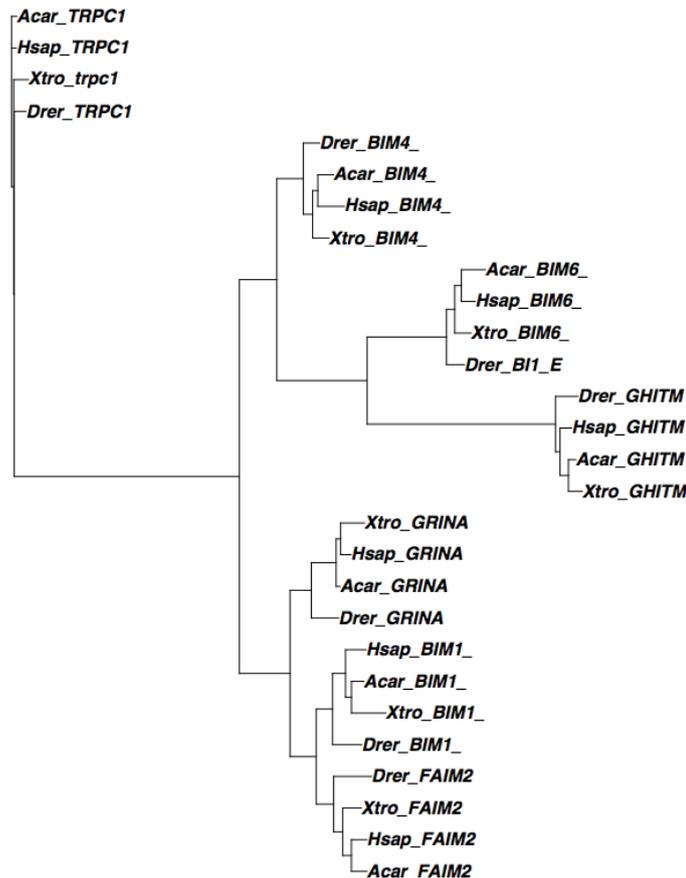


Abb. 1: Die Abbildung verdeutlicht die phylogenetische Abstammung der BI-1-ähnlichen Proteine. Dabei zeigen einerseits die Proteine BIM4 (TMBIM4), BIM6 (TMBIM6) und GHITM (TMBIM5) und andererseits die Proteine GRINA (TMBIM3), BIM1 (TMBIM1), FAIM2 (TMBIM2) untereinander eine engere phylogenetische Beziehung. Das nicht verwandte Kanalprotein TRPC1 diente als Wurzel (Outlier) des Baumes.

TMBIM1/RECS1

TMBIM1 (auch als RECS1, PP1201, LFG3, MST100, MSTP100 bezeichnet) ist ein 35 kDa Protein. Das Protein besitzt vermutlich sieben Transmembrandomänen. TMBIM1 ist in endosomalen und lysosomalen Membranen vorhanden und wird ubiquitär in sämtlichen Organsystemen synthetisiert. Untersuchungen zeigten eine Expression in Organen wie Herz, Lunge, Gehirn, Leber, Niere, Ovarien, Skelettmuskulatur, Haut und

Fettgewebe (77). TMBIM1 spielt scheinbar eine protektive Rolle bei der Entstehung von vaskulären Erkrankungen. Das Fehlen von TMBIM1 verursachte bei Mäusen eine zystische Mediadegeneration (77). Ebenfalls wurde eine schützende Funktion von TMBIM1 gegenüber der Fas-induzierten Apoptose durch verminderte Biosynthese des Fas-Rezeptors an der Zelloberfläche gezeigt (78). TMBIM1 defiziente Mäuse entwickelten ein Aortenaneurysma (79).

TMBIM2/FAIM2

TMBIM2 (auch als NMP35, LFG, LFG2, FAIM2, NGP35 und KIAA0950 bezeichnet) ist ebenfalls ein 35 kDa Protein und besteht vermutlich aus sieben Transmembrandomänen. Die intrazellulären Lokalisationen von FAIM2 (Fas apoptotic inhibitory molecule 2) sind das ER, der Golgi-Apparat und die Plasmamembran (78). Die Transkription findet vor allem im Nervensystem vermehrt statt (80), speziell an dendritischen Fortsätzen und der subsynaptischen Membran. Im Gegensatz zu BI-1 schützt TMBIM2 vor Fas-induzierter Apoptose und nicht gegen TNF α . FAIM2-Defizienz verursacht eine erhöhte Fas- und Caspasen-induzierte Zelltodrate in neuronalen Geweben (80).

TMBIM3/GRINA

TMBIM3 (auch als HNRGW, NMDARA1, LFG1 und GRINA bezeichnet) ist ein 41 kDa Protein und besteht aus sieben Transmembrandomänen. Intrazellulär ist TMBIM3 in dem ER und dem Golgi-Apparat lokalisiert und schützt murine Fibroblasten (MEFs) vor ER-Stress-induzierter Apoptose (73). GRINA ist ein antiapoptotisches Protein, welches mit TMBIM6 eng interagiert und einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase hat (73). GRINA verändert die Kalziumfreisetzung aus dem ER durch seinen Einfluss auf den IP3-Rezeptor (73).

TMBIM4/GAAP

TMBIM4 (auch als GAAP, LFG4, ZPRO, CG1-119 bezeichnet) ist ein 27 kDa Protein, welches aus sechs (81) Transmembrandomänen besteht. Die Expression von TMBIM4 wurde in zahlreichen Geweben wie Herz, Leber, Lunge, Ovarien, Testis, Pankreas, Milz und Skelettmuskulatur nachgewiesen. Intrazelluläre Lokalisationen sind das ER und der Golgi-Apparat. Überexpression von TMBIM4 schützt von extrinsisch- und intrinsisch -

induzierter Apoptose (82). TMBIM4 vermindert die Histamin-induzierte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem ER (83).

TMBIM5/GHITM

TMBIM5 (auch als GHITM, DERP2, My021, PTD010, HSPC282, FLJ26584 und DKFZp566C0746 bezeichnet) ist ein 37 kDa Protein mit vermutlich acht Transmembrandomänen. TMBIM5 ist ubiquitär synthetisiert. TMBIM5 befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran (84). Das Fehlen dieses Proteins verursacht eine mitochondriale Funktionsstörung. Ebenfalls führt der Mangel an TMBIM5 zu einer frühen Freigabe von proapoptischen Proteinen aus der Mitochondrienmembran. Die Überexpression stabilisiert jedoch Cytochrom c in der inneren Mitochondrienmembran und beugt so dessen Freisetzung nach apoptotischem Stimulus vor (85).

Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Klassifizierung von BI-1 (TMBIM6) und der BI-1-ähnlichen Proteine (TMBIM1-5) hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Zelltodrate und Veränderungen des intrazellulären Kalziumhaushalts. BI-1 ist das am besten klassifizierte Protein dieser Familie. Über die Funktionen der BI-1-ähnlichen Proteine TMBIM1-5 und deren Auswirkungen auf die Kalziumhomöostase ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Als In-vitro-Modell sollten stabil überexprimierende, murine Zellen hippocampalen Ursprungs (hippocampal neuronal cell line, HT22) dienen. Als Vergleich sollten ebenfalls HT22 Zellen untersucht werden, die nur den leeren Vektor exprimieren (empty vector, EV). Zunächst sollten stabile Zelllinien hergestellt werden, die jeweils eines der BI-1 ähnlichen Proteine überexprimieren. Für Selektionszwecke sollte in den eingebrachten Vektor ein Fluoreszenzprotein (IRES VENUS) und ein HA-tag (Human influenza hemagglutinin) eingebunden werden. Das Fluoreszenzprotein sollte für das Aussortieren der transfizierten Zellen durch die Durchflusszytometrie (FACS) genutzt werden. Der HA-tag wird bei der Transkription des DNA-Abschnittes für TMBIM1-6 mitsynthetisiert und sollte dem Nachweis der Genprodukte im Western Blot dienen. An den so hergestellten, stabilen Zellen sollten Zelltodversuche mit Thapsigargin und Glutamat durchgeführt werden. Es sollten die Auswirkungen der jeweiligen Transmembranproteine auf die Sterblichkeitsrate bei thapsigargininduziertem ER-Stress und bei glutamatinduzierter Exzitotoxizität untersucht werden, um die Frage zu klären, ob diese Proteine in der Lage seien Zellen vor Apoptose zu schützen. Diese Schutzfunktion wurde für BI-1 bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen, jedoch ist bisher wenig über die BI-1 ähnlichen Proteine TMBIM1-5 bekannt. Durch Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen nach thapsigargininduzierter ER-Depletion und des anschließenden SOCE sollte die Frage geklärt werden, ob diese Proteine einen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration haben. Die Ergebnisse der Zelltodversuche, der $[Ca^{2+}]_{ER}$ und des SOCE Messungen sollten eine eventuelle Schutzfunktion dieser Proteine aufdecken und gegebenenfalls den Zusammenhang zwischen der Schutzfunktion und den Veränderungen im Kalziumhaushalt erklären.

Materialien und Methoden

HT22 Zellkultur

HT22 Zellen sind immortalisierte, murine Neurone hippocampalen Ursprungs. Es handelte sich um eine permanente Dauerkultur mit stabil transfizierten Zellen. Das adhärenente Wachstum erfolgte in 10 cm Zellkulturschalen in dem Zellkulturinkubator bei 37°C und 5% CO₂. Als Wachstumsmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High-Glucose 4,5 g/L (PAA) mit 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen®) und 5% fetales Kälberserum (Gibco®) verwendet. Die murinen Zellen sollten als in vitro Modell für alle im Rahmen dieser Arbeit stattfindenden Versuche dienen.

Geräte und Verbrauchs-Materialien

Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Katalognummer
Zellkulturschalen 100 mm	SARSTEDT AG & Co	83.1802
Stripetten 5 ml	COSTAR®	4487
Stripetten 10 ml	COSTAR®	4488
Stripetten 10 ml	COSTAR®	4489
Mikrotiterplatten 6,12, 96 Napf	CELLSTAR®	655180
Aspirationsstripetten	SARSTEDT AG & Co	86.1252.011
Einwegspritzen 20 ml	BRAUN, Injekt®	
Tubes 15–50 ml	CELLSTAR®	18827
Sterilfilter	SARSTEDT AG & Co	83.1826.001
Zählkammern	BIO-RAD	145-0011

Geräte

Gerät	Hersteller
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	WILOVERT HUND WETZLAR Lichtmikroskop
TC10TM automat cell counter	Bio-Rad®
Sterilbank, HERA Safe	Kendro®, Scwerte
Pipetten 10 µl – 1000 µl	Thermo
GENios Pro Multifunctionel Microplate Reader	Tecan, Männedorf
Inkubator Heracell 150	Kendro®, Schwerte
Durchflusszytometer FACS Calibur	Beckton Dickinson®, Heidelberg
pH-Meter	Hanna Instruments®, Kehl am Rhein
Grobwaage	Kern® EW
Biofuge Strato	Heraeus®, Osterode
iBlot Dry Blotting Device	Invitrogen®, Karlsruhe
MoFlo XDP	Beckman-Coulter®
FACS Calibur	Becton Dickinson®, Heidelberg
BD-Pathway 855, High-content Bioimaging System	BD Biosciences® Becton Dickinson, Heidelberg

Zubereitung des Nährmediums für HT22 Zellen

Die Zubereitung des Nährmediums erfolgte unter der Sterilbank HERA Safe. Als Grundmedium wurde DMEM High Glucose 4,5 g/l (+ L-Glutamin, +Sodium Pyruvate) verwendet. Zu den 500 ml Grundmedium wurden 25 ml (5%) fetales Kälberserum (FCS) als Wachstumsfaktor sterilfiltriert hinzugegeben. Desweiteren wurden 5 ml (1%) Penicillin/Streptomycin zugefügt.

Erhaltung der HT22 Zellkultur

Das Splitten der adhärennten HT22 Zellen erfolgte je nach Wachstumsrate etwa alle drei Tage, stets unter sterilen Bedingungen bei einer Konfluenz von 70-80% in der Zellkulturschale. Vor jedem Passagieren erfolgte eine mikroskopische Sichtkontrolle der Zellkultur, um etwaige Wachstumsanomalien auszuschließen. Unter der Sterilbank HERA Safe wurde das Grundmedium mit einer Aspirationsstripette abgesaugt. Es folgte eine Spülung mit 10 ml Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), um Zelltrümmer und Mediumreste zu entfernen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin (0,05%) EDTA Phenolrot wurde die Zellkultur bei 37°C bei 5% CO₂ im Brutschrank für ca. 2 min inkubiert. Der Zellrasen ließ sich so enzymatisch von dem Boden der Kulturplatte lösen. Der Trypsin-Stopp erfolgte nach optischer Kontrolle mit 9 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Die Zellen wurden mehrmals resuspendiert. In der Regel erfolgte das Passagieren in einem Verhältnis von 1:10. Von der so gelösten Zellsuspension wurde 1 ml in eine vorgefertigte Zellkulturschale mit 9 ml DMEM-Medium gegeben. Die restlichen 9 ml wurden, falls nicht mehr benötigt, verworfen. Nach drei Tagen wurde die Kultur erneut passagiert.

Zellkulturreagenzien

Reagenz	Hersteller	Spezifikation	Katalognummer
DMEM Medium		High Glucose (4,5 g/L)	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PAA	+ L-Glutamin + Sodium Pyruvate	E15-843
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS)	PAA	Without Ca & Mg	H15-002
Trypsin (0,05%)	Gibco®	+ EDTA, Phenolrot	25300-054
Fetales Kälberserum	Gibco®		16010-159
Penicillin, Streptomycin	Invitrogen®, Gibco®		15070-063

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl in einer Zellkultur erfolgte mit dem Zellzähler Bio-Rad® TC10. Dazu wurden 10 µl in DMEM-Medium gelöster Zellen auf eine entsprechende Zählkammer überführt und in den Zellzähler gegeben. Der Zellzähler Bio-Rad® TC10 gab die Zellzahl pro ml Lösung an.

Das PiggyBac Transposon System

Als Vektor für die DNA-Sequenzen der Proteine TMBIM1–6 wurde das PiggyBac Transposon System von System Biosciences verwendet. In der MCS (Multiple cloning site) wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen eingebracht. Zum indirekten Identifizieren und Sorten der transfizierten Zellen befand sich nach der Basenabfolge der DNA ein Fluoreszenzprotein, IRES VENUS.

Das IRES VENUS fluorescence protein ist eine Variante des yellow fluorescent protein (YFP). Das VENUS-Protein zeigt jedoch gegenüber dem YFP einige Vorteile, wie eine verbesserte Detektierbarkeit bei 37°C [86]. Desweiteren befand sich vor der eingebrachten DNA-Abfolge ein Human influenza hemagglutinin (HA-tag). Das Hemmagglutinin tag sollte zu indirektem immunhistochemischen Nachweis der Transkripte in dem Immunoblot dienen.

Transfektion eukaryotischer Zellen

Ziel der stabilen, überexprimierenden Transfektion war das dauerhafte Einbringen einer Fremd-DNA in das eukaryotische Genom. Das Genprodukt sollte dauerhaft überexprimiert werden. Die Transfektion wurde mit dem Attractene-Reagenz (Qiagen®) nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Gentransfermethode benutzt kationische Lipidmoleküle, die in wässriger Lösung positiv geladene Liposomen bilden. Diese Liposomen bilden Komplexe mit der negativ geladenen DNA. Der Liposom-DNA-Komplex fusioniert mit der Zellmembran und gelangt so in das Zytoplasma. Für die Transfektion wurden die HT22 Zellen in Mikrotiterplatten mit 6 Näpfen bei einer Zelldichte von 200.000 Zellen ausplattiert und ü.N. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Morgen darauf folgte die Transfektion. Es wurden je 1,4 µl entsprechender DNA und 4,5 µl Attractene-Reagenz in 100 µl Opti-MEM®-Medium in sieben separaten 1ml-Tubes angesetzt. Als Vektor diente das PiggyBac Transposon

System, welches die Plasmid-DNA für TMBIM1–6 enthielt. Desweiteren wurde eine siebte Zelllinie mit ausschließlich dem PiggyBac Transposon System ohne zusätzliche DNA als Empty Vector erzeugt. Die jeweiligen Gemische wurden gründlich durchmischt und bei Raumtemperatur genau 15 min lang zwecks Liposom–DNA–Komplexbildung inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das DMEM-Medium in den Sechs–Napf Mikrotiterplatten gegen neues DMEM–Medium ausgewechselt. Nach der Inkubationszeit wurde die komplexierte DNA mit je 110 µl pro Ansatz tröpfchenweise auf die HT22 Zellen gegeben und vorsichtig durch Schwenken gemischt. Die so transfizierten Zelllinien wurden ü.N. im Brutschrank inkubiert und nach Bedarf passagiert.

Transfektionsreagentien

Opti-MEM® I Reduced Serum Media	Invitrogen®	31985-062
Attractene Transfection Reagent	Qiagen®	301005
Plasmid		
PiggyBac Inducible All-in-one Vector	SBI; System Biosciences, Inc.	

Durchflusszytometrie (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie mittels eines fluorescence activated cell sorting (FACS) wurden die Zellen einzeln durch eine Durchflusszelle geschleust und wurden dabei seitlich von einem Argon-Laser erfasst. Dabei konnten die fluoreszenzmarkierten Zellen je nach der Wellenlänge des Fluoreszenzmoleküls identifiziert werden. Je nachdem ob eine Zelle das spezifische Fluoreszenzsignal enthielt, wurde sie positiv oder negativ geladen und anschließend in einem elektrischen Feld ladungsabhängig abgelenkt. Um ausschließlich die HT22 Zellen zu gewinnen, die die Plasmid-DNA stabil in ihr Genom aufgenommen hatten, wurden ein Mehrfaches sortieren der Zellen notwendig. Das Sortieren erfolgte insgesamt dreimal am Universitätsklinikum-Düsseldorf mittels MOFlo® High Performance Cell Sorter. Der Sorter detektierte das spezifische Fluoreszenzsignal des IRES VENUS fluorescence proteins. Die VENU-positiven Zellen wurden aussortiert und in einem separaten Behälter mit HBSS++ (Hank's Balanced Salt Solution) aufgefangen. Anschließend wurden die Zellen weiter wie üblich bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Die transfizierten Zellen wurden durch das Einfrieren in flüssigem Stickstoff für einige Zeit haltbar gemacht und konnten bei Bedarf wiederverwendet werden. Die transfizierten Zellen wurden in 500 ml-Kulturflaschen mit 40ml DMEM-Medium bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank inkubiert bis eine Konfluenz von ca. 90% erreicht worden war. Die Zellkulturflaschen wurden dreimal mit DPBS unter sterilen Bedingungen gewaschen. Mit 2 ml Trypsin 0,05% wurden die Zellen im Brutschrank für einige Minuten inkubiert und somit enzymatisch von dem Behälterboden gelöst. Der

Enzym-Stopp erfolgte mit 20 ml DMEM-Medium. Die Zellsuspension wurde in einem 50ml-Tube aufgenommen und für 3 min bei 1300 U/min pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und jeweils wieder pelletiert. Um eine innere Eisbildung der Zellen beim Gefrierprozess zu vermeiden, enthielt das Gefriermedium neben 90% FCS auch 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). Bei Raumtemperatur ist DMSO zelltoxisch. Seine Wirkung als Gefrierschutzmittel beruht auf der vollständigen Penetration in die Zelle. Das ist die wichtigste Eigenschaft des DMSO, denn allein im extrazellulären Raum kann es seine kryoprotektive Wirkung nicht entfalten. Nach gründlichem Resuspendieren wurden die im Gefriermedium gelösten Zellen mit einer Dichte von 3×10^6 Zellen/ml in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Da das im Gefriermedium enthaltene DMSO zytotoxisch ist, sollte die Kontaktzeit bei Raumtemperatur minimiert werden. Die Kryoröhrchen wurden schnellstmöglich in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter ü.N. bei -80°C gelagert. Am Tag darauf wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C gelagert. Beim Auftauen war es wichtig, dass bei beginnender Verflüssigung des Gefriermediums in dem Kryoröhrchen dieses umgehend in mindestens 15 ml DMEM-Medium überführt wurde. Die Zytotoxizität des DMSO würde bei längerem Verweilen der Zellen die Überlebensrate deutlich senken. Nach 24 h musste das DMEM-Medium gewechselt werden. Um die in den transfizierten Zellen überexprimierten Proteine TMBIM1–6 nachweisen zu können, wurden immunhistochemische Verfahren wie das Western Blotting bzw. Immunoblot und die Durchflusszytometrie (FACS), angewandt.

Proteinbiochemische Techniken

Extraktion von Proteinlysaten

Für die Extraktion von Gesamt-Protein aus adhärennten HT22 Zellen wurden die beim Passagieren gewonnen Zellen verwendet. Die Zelllösung in DMEM-Medium wurde in 15 ml-Tubes überführt und bei 1400 g 5 min lang pelettiert. Die Peletts wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die so gewonnenen Zellen wurden in 2 ml-Eppendorf tubes überführt und lysiert. Die Zellyse erfolgte mit dem Zellysepuffer Ripa™ (Invitrogen®) und CompleteMini (Roche®) Protease-Inhibitor. Pro Zelllinie und 2 ml-Tube wurden 250 µl Lyse-Lösung zugegeben und auf Eis für 15 min lysiert. Diese Lyse-Lösung ermöglicht durch den Protease-Inhibitor das Gewinnen der zytosolischen Proteine unter physiologischen Bedingungen. Es folgte eine Zentrifugation bei 16,1 g

und 4°C für 30 min. Nach dem Fugen wurde der proteinhaltige Überstand in vorgekühlte 2 ml Eppendorf tubes überführt.

Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte photometrisch mit dem BCA-Protein Assay Kit (Pierce). Diese Methode beruht auf der Biuretraktion, wobei zweiwertiges Kupfer der Peptidbindungen (Cu^{2+}) in alkalischer Lösung zu einwertigem Kupfer (Cu^{1+}) reduziert wird. Die Bicinchoninsäure (BCA) reagiert mit dem einwertigen Kupfer zu einem violett bis blaufarbenen Komplex. Dieser Kupferbiuretkomplex hat sein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Der dadurch erhaltene Farbumschlag der Probe korreliert positiv mit der Proteinmenge der Probe. Diese Tatsache ermöglichte die quantitative Bestimmung der Proteinmenge mittels einer Standardreihe. Um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, wurde auf einer 96-Lochnapfschale eine Proteinstandardreihe aus Rinderserumalbumin mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Die eigentlichen Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit Wasser verdünnt und als Triplikate auf die Platte pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 20–30 min. bei 60°C. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Absorption bei 560 nm mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes (Tecan). Mit der Magellan™ Software wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt.

SDS-Polyacrilamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung des Gesamt-Proteinlysats wurde mittels SDS-Page durchgeführt. Bei der SDS-PGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wurden die zuvor gewonnenen Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Prinzip beruht darauf, dass das Detergenz (SDS) die Proteine umhüllt und somit deren elektrische Eigenladung abschirmt und eine negative Ladung hinzufügt. Die Menge der hinzugefügten negativen Ladung korreliert positiv mit der Proteinmasse. Die der Gelkammer angelegte positive Spannung bewirkt eine Migration der Proteine in Richtung der Anode. Die Proteine können so ihrer Molekulargröße nach entsprechend elektrophoretisch aufgetrennt werden. Zu diesem Zweck wurden die Proteinlysate mit dem NuPAGE® Sample Reducing Agent 10x (Invitrogen®) und Urea-Buffer zunächst für 10 min bei 37°C und anschließend bei 99°C für 10 min erhitzt. Äquivalente Mengen an Proteinen und Molekulargewichtstandard MagicMark™ XP Western Protein

Standard™ (Invitrogen®) wurden in die Taschen des denaturierenden NuPAGE® NOVEX 8–16% Gradientengel gegeben. Als Running Buffer diente NuPAGE® MOPS SDS (20X). Die Laufzeit in der Gelelektrophoresekammer bei einer Spannung von 140 V betrug 45 min.

Immunoblot

Diese Methode ermöglichte es ein spezifisches Protein bzw. dessen Menge in einer Probe immunochemisch nachzuweisen. Die zuvor in dem SDS–Gel der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden mittels dem iBlot™ Dry Blotting Device (Invitrogen®) auf eine Nitrozellulose–Membran übertragen. Das SDS–Gel wurde zwischen zwei elektrisch leitenden Membranen eingelegt, von denen die untere mit der Kathode und die obere mit der Anode des Gerätes verbunden waren. Der Gleichstrom floss so über die beiden Elektroden und als Ionenstrom durch das SDS–Gel. Durch die hohe Spannung und den geringen Abstand der beiden Elektroden wurden die Proteinbanden nach 10 min aus dem Gel auf die Nitrozellulose–Membran übertragen. Anschließend wurde die Nitrozellulose–Membran für eine Stunde in einer 3% Magermilch–PBS–Lösung auf einem Schüttler behandelt, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Nach einer Stunde wurden die entsprechend verdünnten Primärantikörper Anti-Actin (ms), monoclonar (Millipore®) in einem Verhältnis von 1:4000 und Anti-HA–Tag (rb), monoclonar (Abcam®) in einer Verdünnung von 1:3000 zugefügt. Beide Primärantikörper wurden ebenfalls in 3% Magermilch–PBS–Lösung verdünnt. Diese Primärantikörper bindeten spezifisch an das Aktin, welches bei jeder Spezies gleich ist und an den HA–tag, der für den indirekten Proteinnachweis in das Plasmid vor das überexprimierte Protein integriert wurde. Die Nitrozellulosemembran wurde ü.N. bei 4°C auf einem Schüttler mit den Primärantikörpern behandelt. Am nächsten Tag wurde die Membran mehrfach mit PBS gewaschen und mit dem Zweitantikörper IR Dye® Anti–Rabbit, grün, 800 nm und für Actin mit dem Anti–Mouse 680 nm behandelt. Der Zweitantikörper ist an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und bindet spezifisch an den Erstantikörper. Die Behandlung bei Raumtemperatur dauerte 1 h. Durch das Odyssey Lesegerät wurde die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers detektiert und sichtbar gemacht.

MagicMark™ XP Western Protein Standard (20-220 kDa)

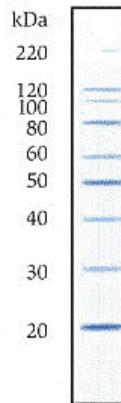


Abb. 2: Die Abbildung zeigt den MagicMark™ XP Western Protein Standard von 20 bis 220 kDa. Mithilfe des Proteinstandards lassen sich die Proteingrößen nach einem Western Blot einordnen.

Reagenzien proteinbiochemische Techniken

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
RIPA-Buffer (Zellysepuffer)	Invitrogen®	R0278-50 ML
Urea Buffer	Invitrogen®	LC6876
Protease-Inhibitor	Roche®	11836153001
CompleteMini		
BCA-Protein Assay Kit	Pierce®	23225
NuPAGE® Sample Reducing Agent 10x	Invitrogen®	NP0004
NuPAGE NOVEX 4-12% Gradientengel	Invitrogen®	NP0321BOX
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen®	LC5602

Antikörper

Primär-Antikörper	Hersteller	Katalognummer
Anti-Actin (ms), monoclonar	Millipore®, Schwalbach/Ts. 1:4000 verdünnt	MAB1501
Anti-HA-Tag (rb), monoclonar	Abcam®, Cambridge 1:3000 verdünnt	ab13834
Sekundär-Antikörper		
IR Dye® Anti-Rabbit, grün, 800 nm	Li-Cor® 1:30000 verdünnt	926-3221
IR Dye® Anti-Mouse, rot, 680 nm	Li-Cor® 1:30000 verdünnt	926-68070

Zytotoxizitätstest

Celltiterblue®-Test

Der Celltiterblue® Überlebenstest dient dazu die Zytotoxizität zu bestimmen. Das Celltiterblue® Reagenz enthält den blauen Redoxfarbstoff Resazurin. Resazurin wird in metabolisch aktiven Zellen zu Resorufin reduziert und verfärbt sich pink. Das Farbsignal entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die transfizierten HT22 Zellen wurden wie beschrieben passagiert und der Überstand für den Überlebenstest verwendet. Grundsätzlich wurde der Empty Vector als Kontrolle auf jeder Platte mitgemessen. Es wurden immer mindestens 2 Platten angesetzt, je eine für die Behandlung mit Glutamat und eine für Thapsigargin. Mit einer Zellzahl von 5000 Zellen pro Napf in 100 µl DMEM-Medium gelöst wurden diese auf eine 96-Mikrotiterplatte in Triplets pro Zellgiftkonzentration ausplattiert. Die obere Reihe der 96-Lochnapfplatte wurde als Kontrolle nur mit 100 µl DMEM-Medium gefüllt. Die Ränder der Mikrotiterplatte wurden mit je 100 µl PBS gefüllt, um ein Austrocknen der Zellen bei der Inkubation zu vermeiden. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit den Zytotoxinen Glutamat und Thapsigargin behandelt. Das Glutamat wurde mit Endkonzentrationen von 0,625, 1,25, 2,5, 5 und 10 mmol/ml für 24 h und das Thapsigargin wurde in den Endkonzentrationen von 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1

mmol/ml für 48 h zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Zellinkubator. Nach 24 h bzw. 48 h Einwirkzeit der Zytotoxine wurde das Celltiterblue® Reagenz in einem Verhältnis von 1:5, also 20 µl pro Napf hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von 3 h im Zellinkubator. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Messung der Absorption durch das Mikrotiterplatten-Lesegerät GENios Pro Multifunctionel Microplate Reader (TECAN). Die Wellenlänge betrug 562 nm bzw. 612 nm bei dem Referenzwert. Der Referenzwert diente zur Ermittlung der Differenz des zugegebenen blauen Farbstoffes zu dem umgesetzten pink-farbenen Farbstoff, welcher die metabolische Aktivität der lebenden Zellen spiegelte.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	
0										PBS	
0,625										PBS	
1,25		Empty Vektor			Zelllinie 1			Zelllinie 2		PBS	
2,5										PBS	
5										PBS	
10										PBS	
mmol/ml	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	

Abb. 3: Die Tabelle zeigt das Schema für das Ausplattieren der HT22 Zellen auf einer 96-Loch Mikrotiterplatte für den Überlebenstest mit Glutamat. In der Spalte 1 sind die Glutamatkonzentrationen von 0 bis 10 mmol/ml angegeben. In dem Randbereich der Platte befand sich PBS. Die Kontrolle (KT) enthielt nur DMEM-Medium und keine HT22 Zellen. Die Kontrolle diente der späteren Kalibrierung des GENios Pro Multifunctionel Microplate Reader. Neben dem EV enthielt jede Platte zwei weitere transfizierte Zelllinien der TMBIM1-6 Proteinfamilie (Zelllinie 1,2).

Kalziumimaging

Das Kalziumimaging ist ein Messverfahren zur Bestimmung des zytosolischen Kalziumgehaltes einer Zellkultur. Für die Messung wurden Indikatoren benötigt, die in der Lage sind die Kalzium-Ionen spezifisch zu binden. Im Rahmen dieser Messungen wurde Fura-2AM Invitrogen® eingesetzt, welches Chelatkomplexe mit dem intrazellulären Ca²⁺-Ionen ausbildete und dabei seine Absorptionseigenschaften änderte.

Für das Kalziumimaging wurden die HT22 Zellen am Vortag in Triplets auf 96-Napf Mikrotiterplatten mit je 5000 Zellen pro Napf in 100 μ l DMEM-Medium ausplattiert und ü.N. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde das DMEM-Medium entfernt und die Zellen mit HBSS++ gewaschen. Es wurden je Napf 100 μ l 2 μ M Fura-2AM in HBSS++ gelöst zugegeben und für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das 2 μ M Fura-2AM entfernt und 75 μ l HBSS++ auf die Zellen gegeben. Es folgte die Messung der Emissionen des Fura-2AM bei 510 nm am BD Pathway 855 High Content Imaging System.

Das BD Pathway 855 war ein computergesteuerter, programmierbarer Pipettierroboter mit einer integrierten hochsensitiven Kamera zur Detektion von spezifischen Fluoreszenzsignalen wie das des Fura2-AM. Der Ablauf der Reagenzzugabe und Messpunkte waren damit streng standardisiert und liefen bei jeder Messung nahezu identisch ab. Die Software BD AttoVision™ stellte die Messergebnisse als Datensatz und graphisch bereit. Im Rahmen dieses Kalziumimaging sollte der Pipettierroboter nacheinander drei Reagenzien auf die Fura2-AM behandelten Zellen geben. Zunächst wurden 75 μ l in HBSS ++ (Gibco®) gelöster Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA, Sigma-Aldrich®) 4 mM zugegeben. Das EGTA ist ein Chelator und bindete das extrazelluläre Ca²⁺, sodass eine kalziumfreie extrazelluläre Lösung vorlag. Nach mehreren Aufnahmen folgte die Zugabe von Thapsigargin 2 μ M in 2 mM EGTA. Thapsigargin (Molecular Probes®) ist ein nicht kompetitiver Inhibitor der SERCA-Pumpe (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase). Die SERCA-Pumpe transportiert das zytosolische Kalzium in die intrazellulären Speicher wie das ER und sarkoplasmatische Retikulum. Durch die Inhibition der Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums kam es zu einem Ausstrom des Kalziums aus den intrazellulären Speichern in das Zytosol, wo es durch das 2 mM EGTA gebunden wurde. Die Kalziumdepletion wurde mittels des Fura2 Signal detektiert. Als drittes Reagenz wurde CaCl₂ 20 mM zugegeben. Diese externe Zugabe von hochkonzentriertem Kalzium ermöglichte die Untersuchung des store-operated calcium entry (SOCE). SOCE ist ein Prozess, bei dem die Leerung des intrazellulären Kalziumspeichers den Einstrom von extrazellulärem Kalzium durch die Aktivierung von SOCs induziert. Die intrazellulären Speicher wurden hier in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ mittels Thapsigargin induzierter Hemmung der SERCA entleert. Die SOCE-Messung erlaubte eine Aussage über den Zusammenhang zwischen

Entleerung der intrazellulären Speicher und SOCs-induziertem Kalziumeinstrom in das Zytoplasma.

Fura2-AM

Fura-2AM ist ein Ca^{2+} -sensitiver Indikator, der zur intrazellulären Bestimmung der Kalziumkonzentration eingesetzt wird. Das Fura-2AM ist ein Chelator, welcher das Kalzium mit 4 Carboxylgruppen bindet. Die Substanz ist sehr selektiv für Ca^{2+} und fast unempfindlich für pH-Schwankungen im physiologischen Bereich (87). Die AM-Modifikation ermöglicht die Passage durch die Zellmembran. Fura2 ist ein ratiometrischer Ca^{2+} -Indikator. Die Fluoreszenz ändert sich sowohl mit der Wellenlänge des Anregungslichts als auch mit der Kalziumkonzentration. Fura2 wird bei 340 nm und 380 nm angeregt. Die Emissionsmessung erfolgt bei 510 nm, worauf eine 340/380 Ratio gebildet wird. Die Kalziummenge kann aus dieser Ratio abgeleitet werden. Durch die Messung der Ratio ist die Messung unempfindlicher gegenüber eventueller Unterschiede der einzelnen Messungen im Bezug auf die Beladung mit FURA2-AM.

Fura2-AM Kalibrierung mit HT22

Um aus der ermittelten 340 nm/380 nm Ratio des Fura2-AM letztendlich die Ca^{2+} -Konzentrationen errechnen zu können, müssen die maximalen und minimalen (R_{\min} , R_{\max}) Grenzwerte der Fura2-Ratio bestimmt werden. Die Kalibrierung wurde am BD Pathway 855 System durchgeführt. Für die Kalibrierung wurden HT22 Zellen in eine 96-Napf Mikrotiterplatte mit einer Zelldichte von 5000 Zellen pro Napf in DMEM-Medium ü.N bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am folgenden Tag wurde das DMEM-Medium abgenommen und die Zellen mit 100 μl 2 μM Fura-2AM in HBSS++ gelöst zugegeben und für 30 min in dem Zellkulturinkubator inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das 2 μM Fura-2AM abgesaugt und 75 μl HBSS++ auf die Zellen gegeben. Um die intrazellulären Kalziumspeicher vollständig zu leeren, wird von dem Pipettierroboter zunächst 10 μM Ionomycin, welches in 5 mM EGTA gelöst wurde, auf die Zellen gegeben. Ionomycin gehört zu der Gruppe der Ionophore und wird von dem Bakterium *Streptomyces globatus* gebildet. Ionophore ermöglichen den Transport von Ionen durch biologische Membranen. Ionomycin als solches ermöglichte den Kalziumtransport durch die Zellmembranen. Das so frei gewordene Ca^{2+} wurde von

dem EGTA gebunden, sodass ein kalziumfreies Medium vorlag und die minimale Ratio ermittelt werden konnte (Ratio im EGTA, Rmin). Nach dem die Kalziumspeicher durch das Ionomycin geleert worden waren, wurden die Zellen mit 20 mM CaCl₂ beladen. Das hochkonzentrierte Ca²⁺ strömte in die Zelle und die maximale Ratio (Ratio im Ca²⁺, Rmax) konnte gemessen werden. Die Kalziumkonzentration wurde mit den aus der Kalibrierung ermittelten Werten errechnet. Die Werte Sf2 und Sb2 sind die maximalen bzw. minimalen Werte, die bei 380 nm gemessen wurden. Sie ließen sich aus dem Datensatz der Software BD AttoVision™ entnehmen.

$$[\text{Ca}^{2+}] = k_d * \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} * \frac{(Sf_2)}{(Sb_2)}$$

Zur Errechnung der Kalziumkonzentrationen aus dem Fura2-AM Ratio wurde die obenstehende Formel mit den folgenden Werten verwendet: Kd = 224 nm (Bindungskonstante von Fura2-AM), R = Ratio 340/380 des Fura2-AM, Rmin = 0,172, Rmax = 2,025, Sf2 = 3051,052, Sb2 = 1285,341

Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Messungen wurden mit Microsoft Excel und Graph Pad Prism 5.0 ermittelt. Die Resultate wurden stets über den Standardfehler des Mittelwerts (+/- Standard Error of Means, SEM) berechnet und mit dem Mann-Whitney-U-Test auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Für die Ermittlung der Ergebnisse des Kalziumimaging und die Zelltodversuche wurde die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) bestimmt.

Versuchsreagenzien

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
Glutamat	Sigma-Aldrich®	G1251-100 g
Thapsigargin	Molecular Probes® Invitrogen®	T7459
CellTiter-Blue®	Promega®	G808B
Ethylenglykoltetraessigsäure EGTA	Sigma-Aldrich®	34596-25G
Calcium chloride	Fluka, Sigma-Aldrich®	C8106-1 kg
Fura-2, AM, cell permeant	Invitrogen®	F1221
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich®	D5879-500 ml
HBSS ++ Hank's Balanced Salt Solution	Gibco®	14025-050 500 ml
Ionomycin	Molecular Probes®	I-24222

Software

BD AttoVision™

Graphpad Prism 5.0

Magellan™

Microsoft Office

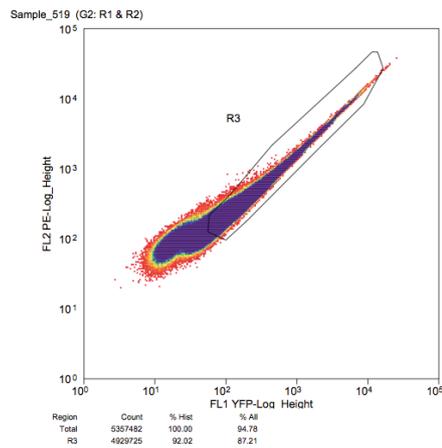
Summit Software

Ergebnisse

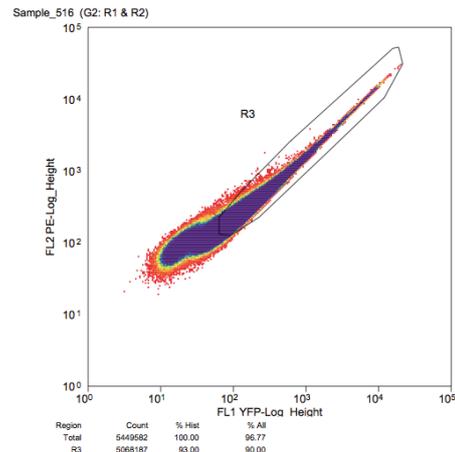
Erfolgreiche Generierung stabiler TMBIM1-6 exprimierender HT22 Zellen

Um diejenigen Zellen zu identifizieren, die bei der Transfektion stabil das PiggyBac Transposon System, inklusive des Gene of Interest, in ihr Genom aufgenommen haben, wurde die Durchflusszytometrie angewandt. Die Durchflusszytometrie ermöglicht das schnelle Sortieren von Zellen anhand von verschiedenen Parametern wie Zellgröße, Granuladichte und enthaltenen Fluoreszenzproteinen. Dabei werden die zu messenden Zellen von verschiedenen Lasern zwischen 488 nm und 633 nm angeregt. Detektoren messen Lichtstreuung und bei spezifischen Wellenlängen detektiertes Licht. Anhand des Vorwärtsstreulichts (Forward Scatter, FSC) kann so auf die ungefähre Zellgröße geschlossen werden. Das Seitenstreulicht (Side (90°) Scatter, SSC) gibt Auskunft über die Komplexität und Dichte der Granula. Desweiteren ist die Detektion verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe anhand deren spezifischen Wellenlängen möglich. Die mit den Transmembranproteinen TMBIM1-6 transfizierten HT22 Zelllinien wurden mittels Durchflusszytometrie auf das spezifische Signal des gelb fluoreszierenden Venus-Proteins, welches eine Variante des yellow fluorescent protein (YFP) darstellt, sortiert. Die Emissionswerte des IRES VENUS bei Anregung mit einem 488 nm Laser liegen zwischen 519 und 534 nm. Nur die Zellen, die das spezifische Signal des IRES VENUS emittieren, enthalten das PiggyBac Transposon System und sind potentiell in der Lage die eingebrachte DNA zu exprimieren.

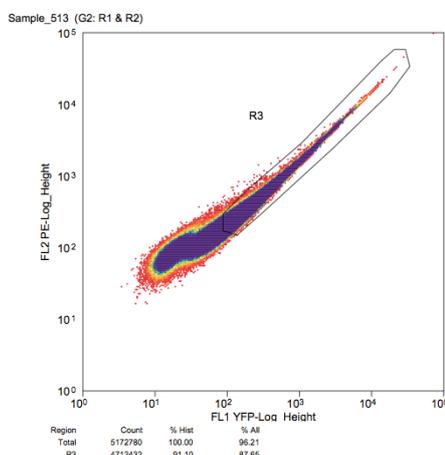
Durchflusszytometrie TMBIM



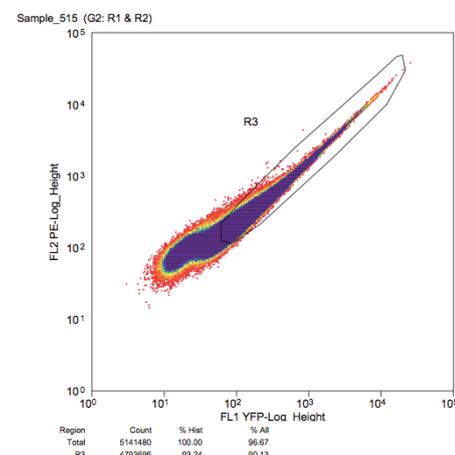
TMBIM1



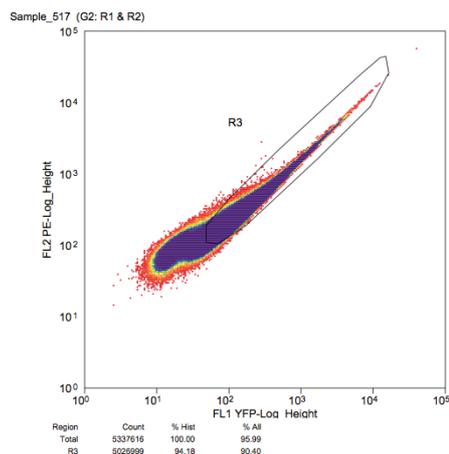
TMBIM2



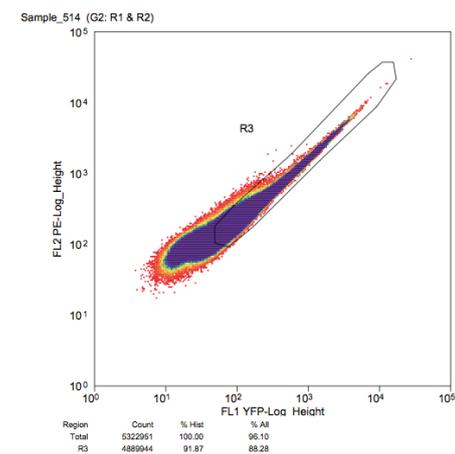
TMBIM3



TMBIM4



TMBIM5



TMBIM6

Abb. 4: Die Abbildung zeigt die Bilder des letzten Sortings. Jeder Punkt auf der Abbildung entspricht einer Zelle. Auf der x-Achse ist die FL1 YFP-Log Heigh dargestellt. Dieser Parameter stellt die Intensität des durch das YFP/IRES emittierten Lichtsignals einer spezifischen Wellenlänge dar. Auf der y-Achse ist die FL2PE-Log Heigh dargestellt. Dieser Parameter stellt die Eigenfluoreszenz der HT22 Zellen dar. Nur Zellen mit einer ausreichend hohen Emission

des YFP/IRES VENUS spezifischen Signals werden durch das elektromagnetische Feld abgelenkt und somit selektiert.

Durch die Durchflusszytometrie wurden nur Zellen aussortiert, die bestimmte morphologische Kriterien wie Zellgröße und Granuladichte erfüllten. Desweiteren wurden nur die Zellen mit einem ausreichend hohen Fluoreszenzsignal des YFP/IRES VENUS aussortiert. Als Resultat der Durchflusszytometrie wurden nur Zellen, die das PiggyBac Transposon System mit dem Fluoreszenzprotein IRES VENUS enthielten, selektiert. Zellen, die den morphologischen Kriterien nicht entsprachen und/oder kein Fluoreszenzsignal emittierten, wurden verworfen. Die Durchflusszytometrie der transfizierten Zellen erfolgte insgesamt dreimal, wobei nach dem dritten Sorten etwa 98% der Zellen das spezifische Signal des IRES VENUS emittierten. Die YFP-positiven Zellen wurden in eine separate Küvette aufgefangen und weiter kultiviert.

Nachweis der HA-getaggen TMBIM-Proteine durch Immunoblot

Da keine spezifischen Antikörper gegen die Proteine TMBIM1-6 vorhanden waren, mussten die Genprodukte indirekt nachgewiesen werden. Dazu wurden hinter die Gensequenz der BI-1 Proteine ein IRES VENUS fluorescence protein und vor der Gensequenz der TMBIM1-6 ein HA-tag in den Vektor eingebracht. Das von dem Fluoreszenzprotein IRES VENUS emittierte Signal wurde als Auswahlkriterium bei dem Sorten der transfizierten HT22 Zellen verwendet. Der HA-tag ist Teil eines viralen Glykoproteins, welches für den indirekten immunhistochemischen Nachweis der TMBIM1-6 Genprodukte in das PiggyBac Transposon System eingebunden wurde. Der HA-tag lag jeweils vor der eingebrachten Gensequenz und wird mit dem Protein als Fusionsprotein exprimiert. Die zuvor durch die Durchflusszytometrie selektierten YFP-positiven Zellen wurden zusätzlich immunochemisch auf das Vorliegen des HA-tags untersucht. Zellen, die ein positives IRES VENUS Signal emittierten und ein HA-positives Protein der richtigen Größe exprimieren, enthalten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die eingebrachte DNA-Sequenzen für die Proteine TMBIM1-6. Vor dem HA-tag Immunoblot wurde noch ein Nachweis von Aktin durchgeführt, um das Vorhandensein von ausreichender Mengen Proteins in den Proben nachzuweisen. Aktin wird in allen eukaryotischen Zellen synthetisiert und dient hier als Kontrolle. Als Primärantikörper wurde der Anti-Actin (ms), monoclonar (Millipore®), 1:4000 verwendet. Der sekundäre Antikörper war IR Dye® Anti-Mouse, rot, 680 nm.

Nachweis von Aktin durch Immunoblot

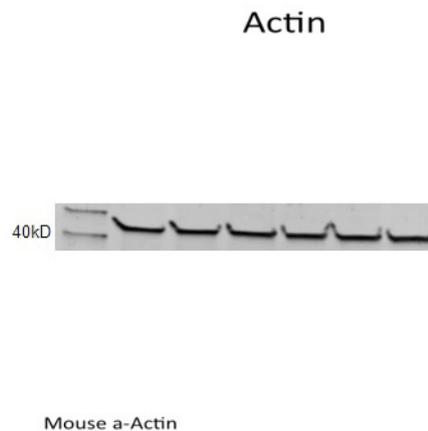


Abb. 5: Die Proteinlysate der HT22 Zellen wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper auf die Positivkontrolle untersucht. Als Positivkontrolle diente Aktin. Die Abbildung zeigt, dass Aktin und damit ausreichende Mengen Proteinlysate in allen sieben Proben enthalten waren. Das Molekulargewicht von Aktin beträgt etwa 40 kD. Die Proteinlysate stammen von den TMBIM1-6 überexprimierenden HT22 Zellen. Der Immunoblot auf Aktin zeigte, dass in allen zu untersuchenden Proben Aktin und damit Proteinlysate der zu untersuchenden Zellen vorlagen.

Die Proben, die ausreichend Proteine enthielten und in denen Aktin nachgewiesen wurde, sollten anschließend auf das Vorhandensein des HA-tags untersucht werden. Für den Nachweis wurden als Primärantikörper Anti-HA-tag (rb), monoclonar, Abcam®, Cambridge 1:3000 verdünnt verwendet. Als Sekundärantikörper wurde IR Dye® Anti-Rabbit, grün, 800 nm von Li-Cor® 1:30000 verdünnt verwendet.

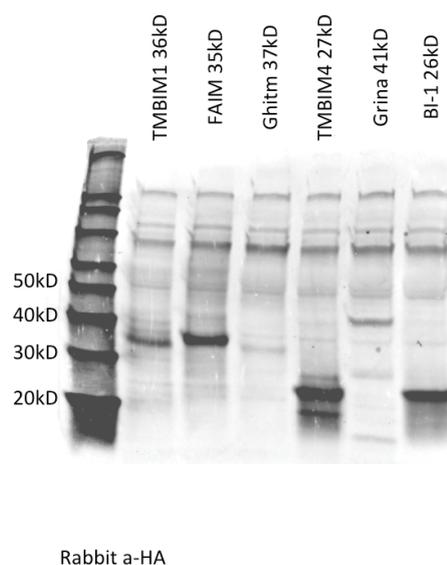


Abb. 6: Proteinlysate der HT22 Zellen wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper auf das Vorliegen des HA-tags untersucht. Die linke Spalte stellt den MagicMark™ XP Western Protein Standard (20-220 kDa) dar. Der Proteinstandard dient als Richtmarke für das

Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine. Rechts neben dem Protein Standard (20-220 kDa) sind von links nach rechts die Western Blots der HT22 Zellen dargestellt, die jeweils eins der Proteine TMBIM1-6 überexprimieren. In den jeweiligen Säulen sind die gewichtsspezifischen Banden der zugehörigen Proteine TMBIM1-6 zu erkennen. Der Immunoblot des zuvor in die Zellen eingebrachten HA-tags, welches an die jeweiligen Proteine TMBIM1-6 gekoppelt wurde, zeigt indirekt, dass in allen Proben die jeweiligen Proteine mit dem HA-tag überexprimiert werden.

Bei der Transfektion der HT22 Zellen wurde jeweils vor die integrierte DNA-Sequenz für die TMBIM1-6 Proteinfamilie ein Human influenza hemagglutinin (HA-tag) miteingebracht. Dieses HA-tag wurde bei der jeweiligen Transkription der Proteine TMBIM1-6 mit transkribiert und an das jeweilige Protein gekoppelt, sodass jedes der überexprimierten Proteine ein HA-tag tragen sollte. In dem hier dargestellten Western Blot in Abb. 6 wurde das Vorliegen eines HA-tags und damit auch indirekt das Vorliegen eines der Proteine TMBIM1-6 mittels spezifischer fluoreszierender Antikörper gegen das HA-tag untersucht. In Abb. 6 ist zu erkennen, dass in jeder Säule ein Fluoreszenzsignal des jeweiligen HA-tags bei den proteinspezifischen Gewichten der Proteine TMBIM1-6 vorliegt. Mit dem Ergebnis des Western Blots wurde die Überexpression jeweils eines der Proteine TMBIM1-6 in den transfizierten HT22 Zellen gezeigt.

Die Zelltodversuche mit Glutamat und Thapsigargin an den mit TMBIM1-6 transfizierten HT22 Zellen sollten Veränderungen im Zellüberleben durch die Überexpression von einem der Transmembranproteine TMBIM1-6 aufdecken. Als Vergleichswert wurden empty vector HT22 Zellen verwendet. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

TMBIM1/RECS1

TMBIM1/RECS1 Zytotoxizitätstest mit Glutamat

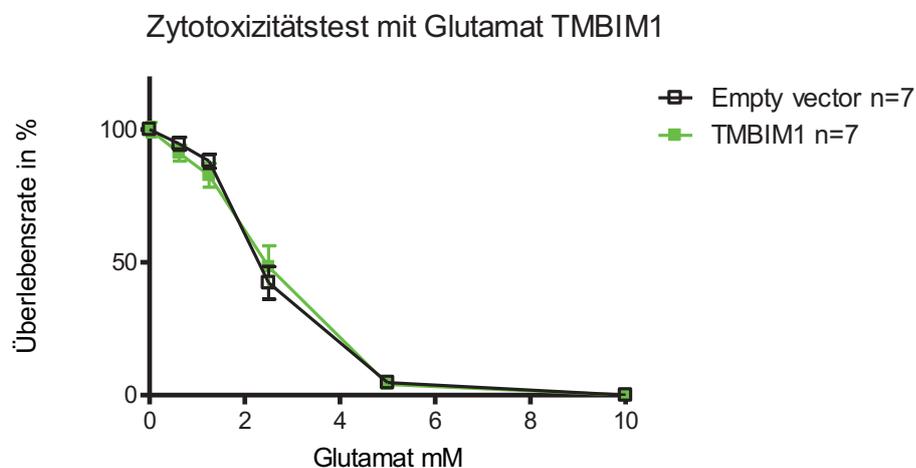


Abb. 7: Die Abbildung zeigt die Resultate des Zytotoxizitätstest mit Glutamat über 24 Stunden. Auf der y-Achse ist die Überlebensrate in Prozent von TMBIM1 überexprimierenden HT22 Zellen (grün) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration in mM auf der x-Achse dargestellt. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutamat behandelt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Das Glutamat wurde mit den Endkonzentrationen von 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Kästchen stellen die jeweiligen Messpunkte mit den angegebenen Glutamatkonzentrationen dar. Die Messung wurde insgesamt siebenmal durchgeführt. Alle Datenpunkte wurden aus den Mittelwerten der sieben unabhängigen Experimente erhoben und spiegeln in den Fehlerbalken den +/- Standardfehler wieder.

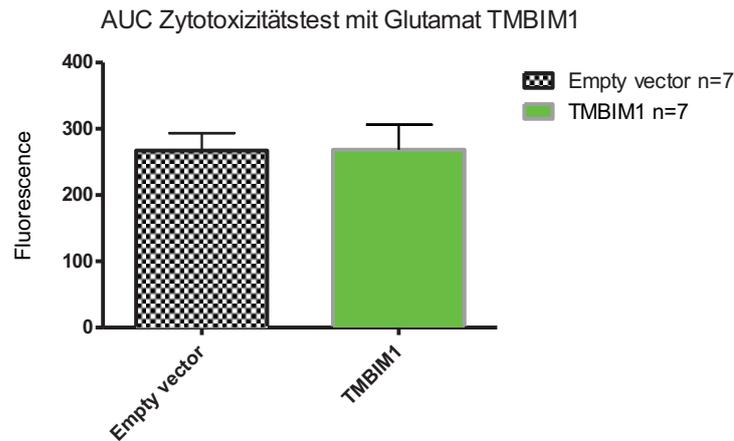
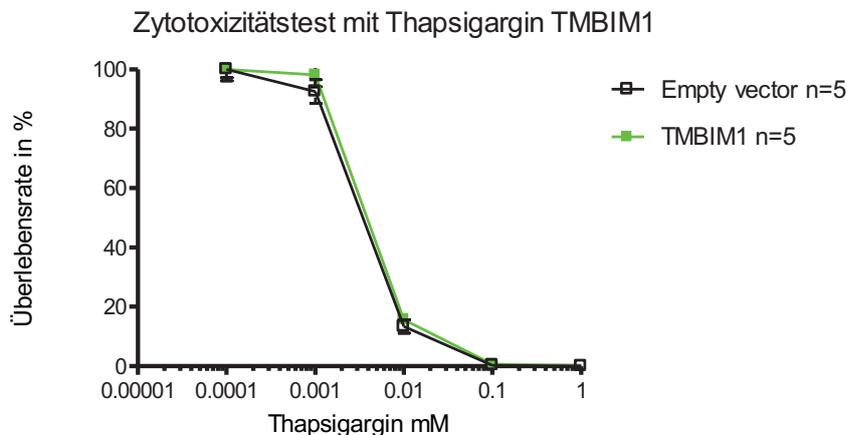


Abb. 8: Die Abbildung zeigt den Zytotoxizitätstest mit Glutamat über 24 Stunden. Das Balkendiagramm stellt die area under the curve (AUC) aus Abb. 7 dar. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von sieben unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Abbildung zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM1 überexprimierenden Zellen (grün) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) auf der y-Achse entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt siebenmal durchgeführt. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Aus den Zytotoxizitätstests mit Glutamat über 24 Stunden ging hervor, dass die TMBIM1 überexprimierenden HT22 Zellen keinen signifikant protektiven Effekt gegenüber glutamatinduzierter Exzitotoxizität im Vergleich zu den EV-Zellen aufwiesen. Es ergab sich jedoch auch kein Nachteil für die Überlebensrate der transfizierten Zellen, sodass die Überlebensrate etwa der der EV-HT22 Zellen entsprach.

TMBIM1 Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin



m

Abb. 9: Dargestellt sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Die Abbildung zeigt auf der y-Achse die Überlebensrate in Prozent von TMBIM1 überexprimierenden HT22 Zellen (grün) im Vergleich zu empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Thapsigarginkonzentration in mM auf der x-Achse. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von fünf unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem zytotoxischen Thapsigargin behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Das Thapsigargin wurde mit den Endkonzentrationen von 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Messung wurde insgesamt fünfmal wiederholt.

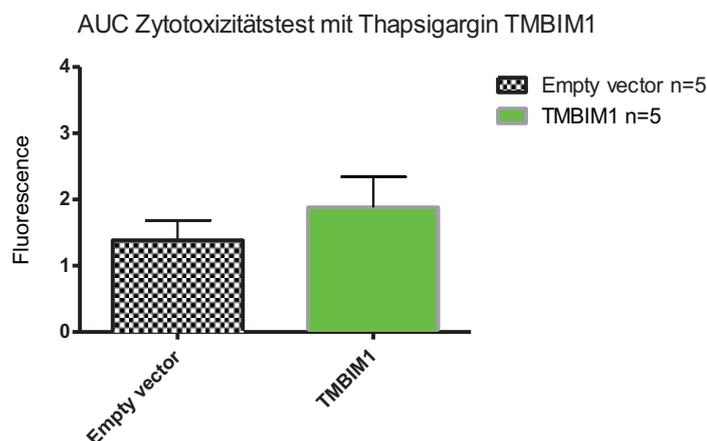


Abb. 10: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Das Balkendiagramm ist aus Abb. 9 abgeleitet und stellt die AUC dar. Das Diagramm zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM1 überexprimierenden Zellen (grün) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von fünf unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Aus dem Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin über 48 Stunden ging ein protektiver Effekt der TMBIM1 überexprimierenden HT22 Zellen im Vergleich zu den EV-Zellen hervor. Dieser Effekt wurde besonders bei niedrigen Konzentrationen von TG deutlich. Es bestand ein protektiver Effekt von TMBIM1 gegenüber thapsigargininduziertem ER-Stress.

TMBIM1 Kalziumimaging

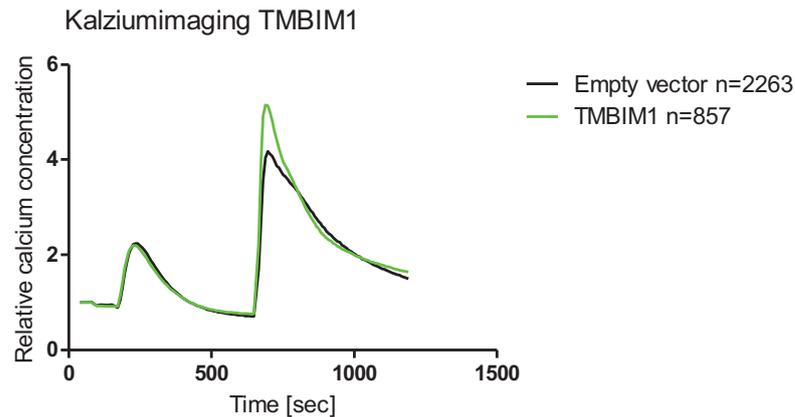


Abb. 11: Die Abbildung zeigt die Konzentrationsänderungen des zytosolischen Ca^{2+} von transfizierten HT22 Zellen. Gemessen wurden TMBIM1 überexprimierende Zellen (grün) im Vergleich zu den EV-Zellen (schwarz). Die relative Fura-Intensität wurde aus der Fura2-AM-Ratio $[F/F_0]$ errechnet und ist auf der y-Achse dargestellt. Der zeitliche Verlauf wurde in Sekunden angegeben (x-Achse). Der erste Peak der Messung stellt den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Hemmung der SERCA-Pumpe mit Thapsigargin dar. Der zweite Peak stellt den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg infolge des SOCE nach extrazellulärer Zugabe von CaCl_2 20 mM dar. Der Versuch wurde viermal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 857 mit TMBIM1 transfizierte Zellen.

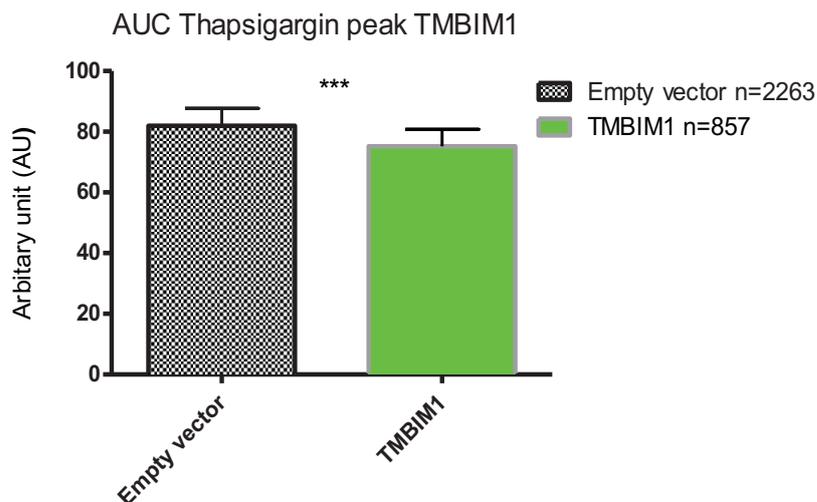


Abb. 12: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des Thapsigarginpeaks von TMBIM1 überexprimierenden Zellen (grün) und EV-HT22 (schwarz). Die Einheit der y-Achse wurde willkürlich festgelegt. Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 11 errechnet. Der Versuch wurde viermal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 857 mit TMBIM1 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

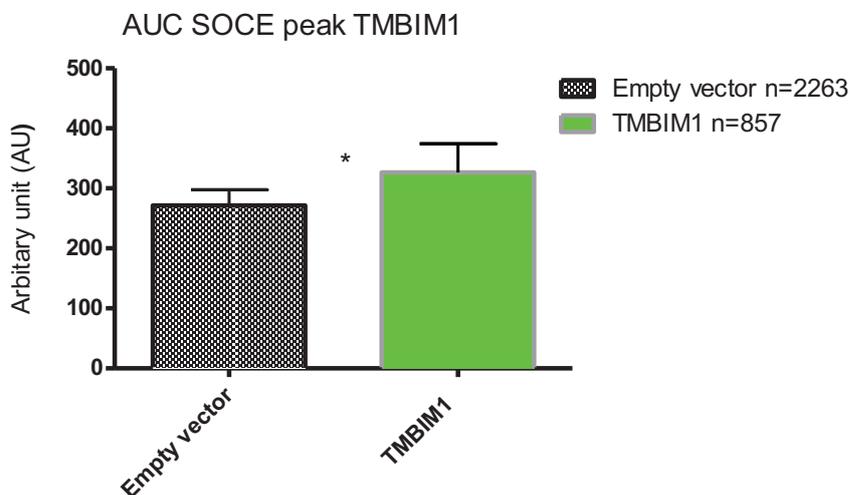
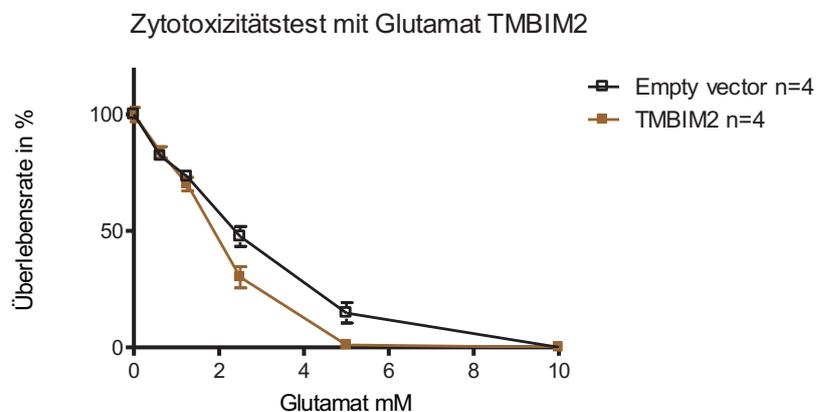


Abb. 13: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des SOCE-induzierten Kalziumeinstroms in das Zytosol von TMBIM1 überexprimierenden Zellen (grün) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 11 errechnet. Der Versuch wurde viermal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 857 mit TMBIM1 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen des Kalziumimaging ableiten, dass die Überexpression von TMBIM1 in HT22 Zellen einen senkenden Effekt auf den Kalziumgehalt des ERs hatte. Die speicherabhängige Kalziumkonzentration (SOCE) wurde hingegen gesteigert.

TMBIM2/FAIM2

TMBIM2 /FAIM2 Zytotoxizitätstest mit Glutamat



4

Abb. 14: Die Abbildung zeigt die Resultate des Zytotoxizitätstests mit Glutamat über 24 Stunden. Auf der y-Achse ist die Überlebensrate in Prozent von TMBIM2 überexprimierenden HT22 Zellen (braun) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration in mM auf der x-Achse dargestellt. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutamat behandelt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Das Glutamat wurde mit den Endkonzentrationen von 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Kästchen stellen die jeweiligen Messpunkte mit den angegebenen Glutamatkonzentrationen dar. Die Messung wurde insgesamt viermal durchgeführt. Alle Datenpunkte wurden aus den Mittelwerten der vier unabhängigen Experimente erhoben und spiegeln in den Fehlerbalken den +/- Standardfehler wieder.

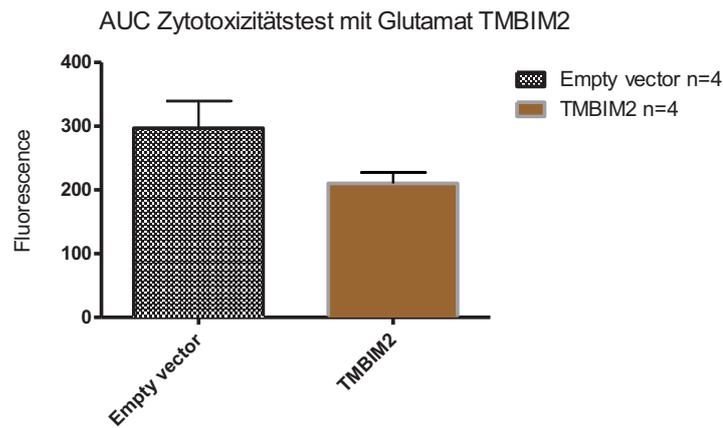


Abb. 15: Die Abbildung zeigt den Zytotoxizitätstest mit Glutamat über 24 Stunden. Das Balkendiagramm stellt die AUC aus Abb.14 dar. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Abbildung zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM2 überexprimierenden Zellen (braun) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) auf der y-Achse entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt viermal durchgeführt. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Aus den Ergebnissen der Überlebensversuche mit Glutamat ergab sich eine erhöhte Sterberate von TMBIM2 überexprimierenden HT22 Zellen im Vergleich zu den EV HT22 Zellen. Die Überexpression von TMBIM2 scheint einen zelltoxfördernden Effekt bei glutamatinduzierter Exzitotoxizität zu haben.

TMBIM2 /FAIM2 Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin

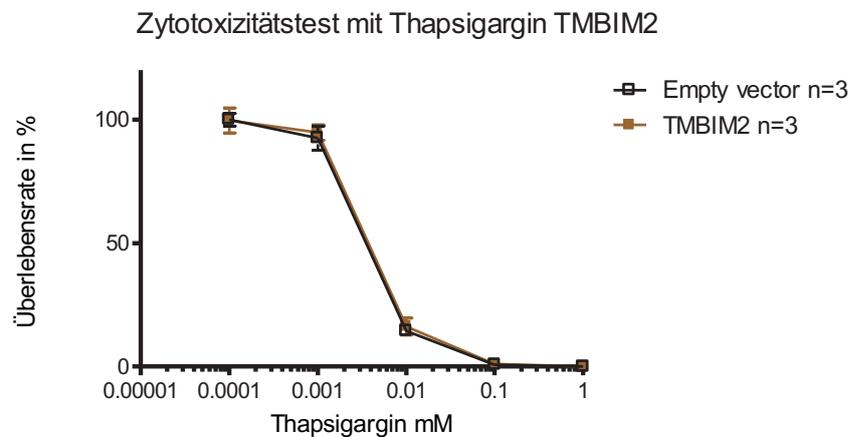


Abb. 16: Dargestellt sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Die Abbildung zeigt auf der y-Achse die Überlebensrate in Prozent von TMBIM2 überexprimierenden HT22 Zellen (braun) im Vergleich zu empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Thapsigarginkonzentration in mM auf der x-Achse. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem zytotoxischen Thapsigargin behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Das Thapsigargin wurde mit den Endkonzentrationen von 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt.

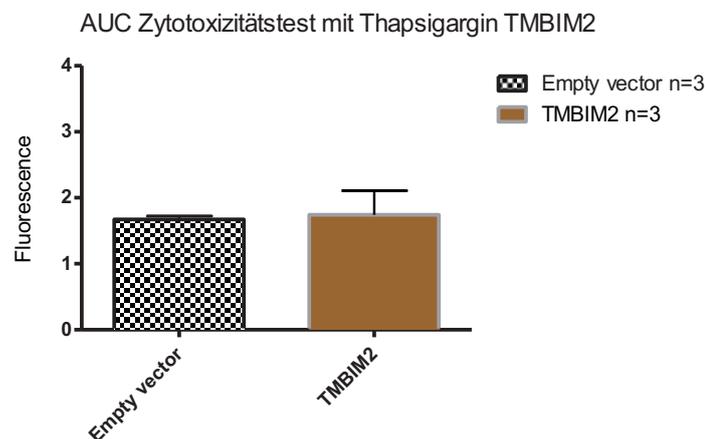


Abb. 17: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Das Balkendiagramm ist aus Abb. 16 abgeleitet und stellt die AUC dar. Das Diagramm zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM2 überexprimierenden Zellen (braun) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte des Zellüberlebens von drei unabhängigen Experimenten und geben den +/- Standardfehler an. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Die Ergebnisse der Zelltodversuche mit Thapsigargin an TMBIM2 überexprimierenden Zellen zeigten, dass es keinen eindeutigen Effekt durch die Überexpression von TMBIM2 auf die Zelltodrate der transfizierten Zellen im Vergleich zu den EV HT22 Zellen gibt.

TMBIM2 /FAIM2 Kalziumimaging

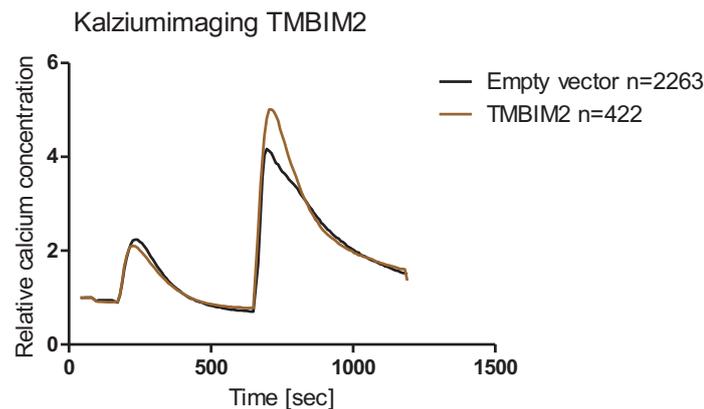


Abb. 18: Die Abbildung zeigt die Konzentrationsänderungen des zytosolischen Ca^{2+} von transfizierten HT22 Zellen. Gemessen wurden TMBIM2 überexprimierende Zellen (braun) im Vergleich zu den EV-Zellen (schwarz). Die relative Fura-Intensität wurde aus der Fura2-AM-Ratio $[F/F_0]$ errechnet und ist auf der y-Achse dargestellt. Der zeitliche Verlauf wurde in Sekunden angegeben (x-Achse). Der erste Peak der Messung stellt den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Hemmung der SERCA-Pumpe mit Thapsigargin dar. Der zweite Peak stellt den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg infolge des SOCE nach extrazellulärer Zugabe von CaCl_2 20 mM dar. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 422 mit TMBIM2 transfizierte Zellen.

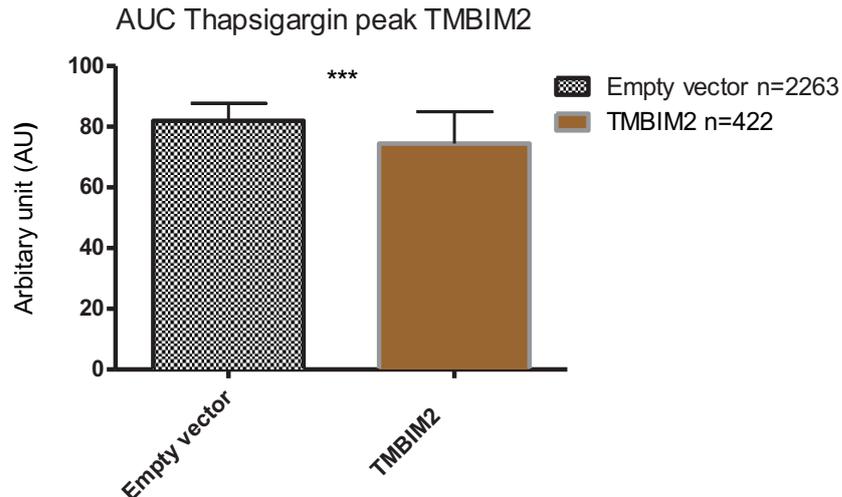


Abb. 19: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des Thapsigarginpeaks von TMBIM2 überexprimierenden Zellen (braun) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 18 errechnet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 422 mit TMBIM2 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

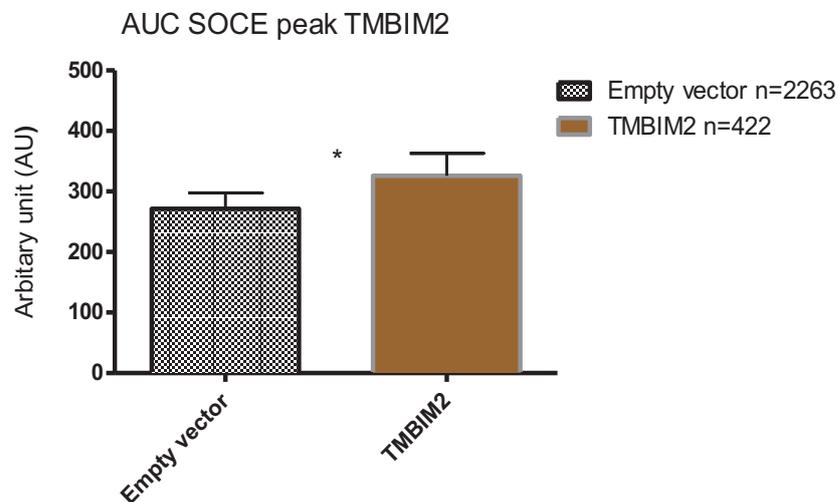


Abb. 20: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des SOCE-induzierten Kalziueinstroms in das Zytosol von TMBIM2 überexprimierenden Zellen (braun) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 18 errechnet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 422 mit TMBIM2 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Die Überexpression von TMBIM2 senkte laut den Ergebnissen den Kalziumgehalt der ER im Vergleich zu den EV HT22 Zellen. Der SOCE der TMBIM2 überexprimierenden Zellen wurde im Vergleich zu der Kontrolle erhöht.

TMBIM3/GRINA

TMBIM3/GRINA Zytotoxizitätstest mit Glutamat

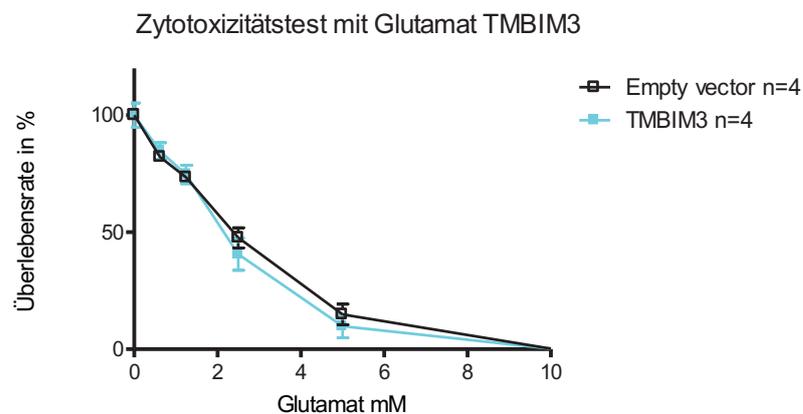


Abb. 21: Die Abbildung zeigt die Resultate des Zytotoxizitätstests mit Glutamat über 24 Stunden. Auf der y-Achse ist die Überlebensrate in Prozent von TMBIM3 überexprimierenden HT22 Zellen (türkis) im Vergleich zu den empty vector HT22 (schwarz) Zellen in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration in mM auf der x-Achse dargestellt. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutamat behandelt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Das Glutamat wurde mit den Endkonzentrationen von 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Kästchen stellen die jeweiligen Messpunkte mit den angegebenen Glutamatkonzentrationen dar. Die Messung wurde insgesamt viermal durchgeführt. Alle Datenpunkte wurden aus den Mittelwerten der vier unabhängigen Experimente erhoben und spiegeln in den Fehlerbalken den +/- Standardfehler wieder.

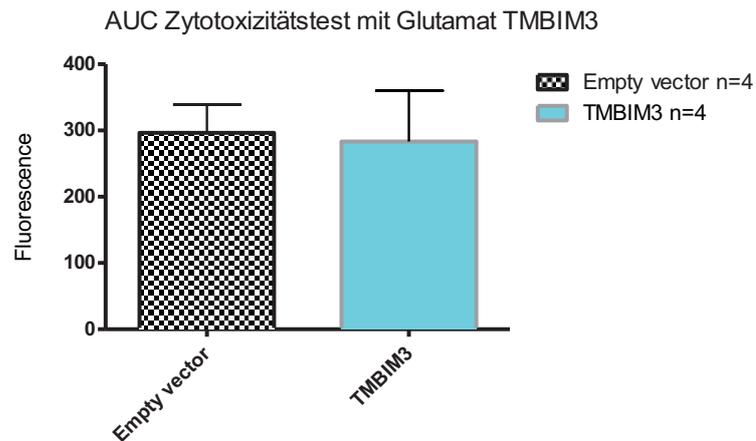


Abb. 22: Die Abbildung zeigt dem Zytotoxizitätstest mit Glutamat über 24 Stunden. Das Balkendiagramm stellt die AUC aus Abb. 21 dar. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Abbildung zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM3 überexprimierenden Zellen (türkis) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) auf der y-Achse entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt viermal durchgeführt. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Der Überlebenstest mit Glutamat über 24 Stunden ergab keinen Überlebensvorteil für die TMBIM3 überexprimierenden HT22 Zellen im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen. TMBIM3-Überexpression wirkte sich nicht protektiv auf die Überlebensrate der transfizierten Zellen aus.

TMBIM3/GRINA Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin

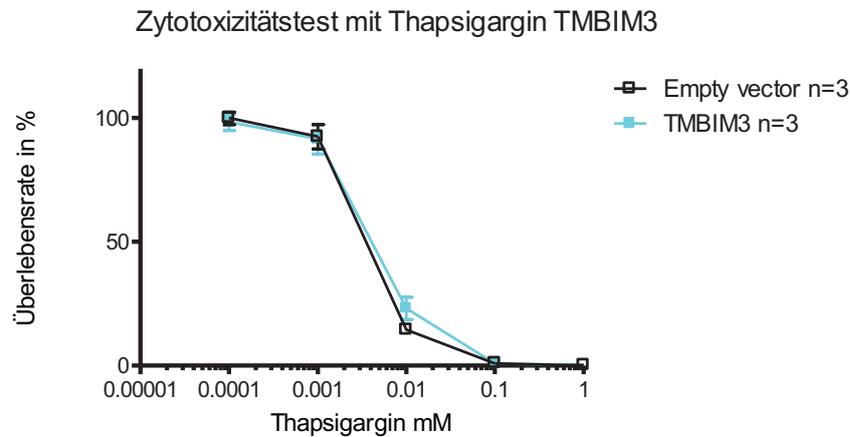


Abb. 23: Dargestellt sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Die Abbildung zeigt auf der y-Achse die Überlebensrate in Prozent von TMBIM3 überexprimierenden HT22 Zellen (türkis) im Vergleich zu empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Thapsigarginkonzentration in mM auf der x-Achse. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem zytotoxischen Thapsigargin behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Das Thapsigargin wurde mit den Endkonzentrationen von 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt.

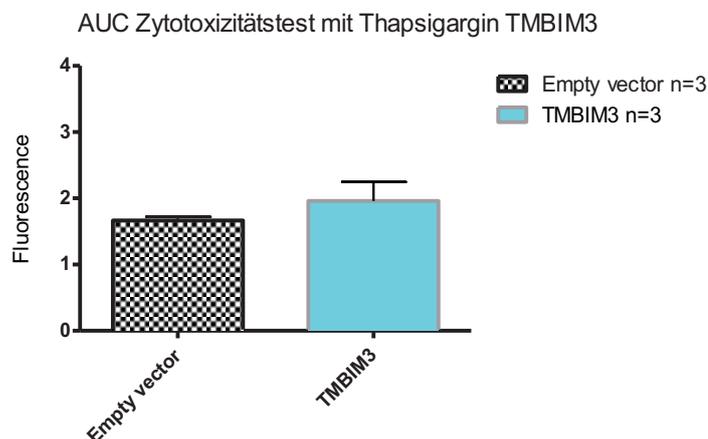


Abb. 24: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Das Balkendiagramm ist aus Abb. 23 abgeleitet und stellt die AUC dar. Das Diagramm zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM3 überexprimierenden Zellen (türkis) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

TMBIM3 überexprimierende HT22 Zellen hatten einen geringen Überlebensvorteil gegenüber thapsigargininduziertem Zellsterben im Vergleich zu den EV HT22 Zellen.

TMBIM3/GRINA Kalziumimaging

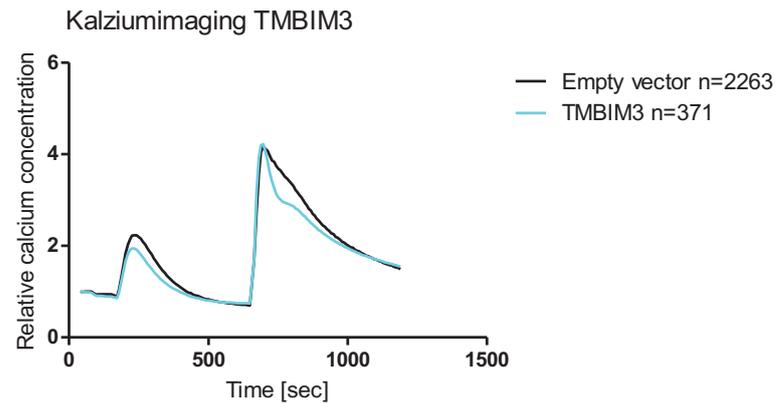


Abb. 25: Die Abbildung zeigt die Konzentrationsänderungen des zytosolischen Ca^{2+} von transfizierten HT22 Zellen. Gemessen wurden TMBIM3 überexprimierende Zellen (türkis) im Vergleich zu den EV-Zellen (schwarz). Die relative Fura-Intensität wurde aus der Fura2-AM-Ratio $[F/F_0]$ errechnet und ist auf der y-Achse dargestellt. Der zeitliche Verlauf wurde in Sekunden angegeben (x-Achse). Der erste Peak der Messung stellt den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Hemmung der SERCA-Pumpe mit Thapsigargin dar. Der zweite Peak stellt den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg infolge des SOCE nach extrazellulärer Zugabe von CaCl_2 20 mM dar. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 371 mit TMBIM3 transfizierte Zellen.

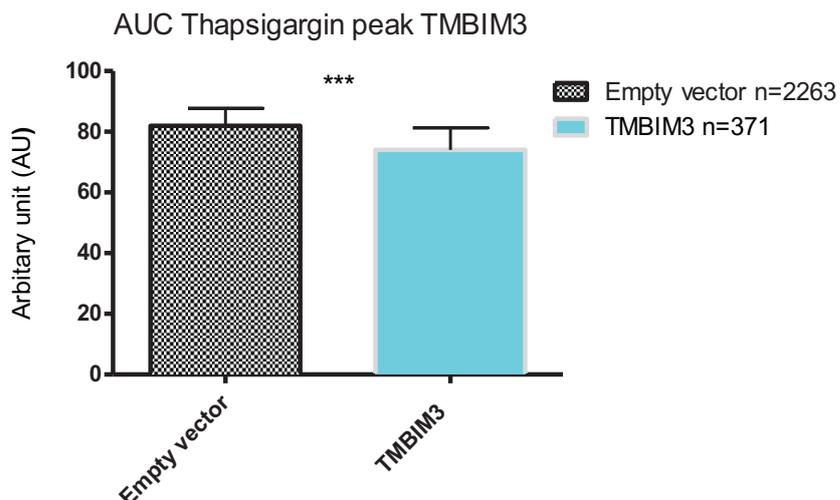


Abb. 26: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des Thapsigarginpeaks von TMBIM3 überexprimierenden Zellen (türkis) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 25 errechnet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 371 mit TMBIM3 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

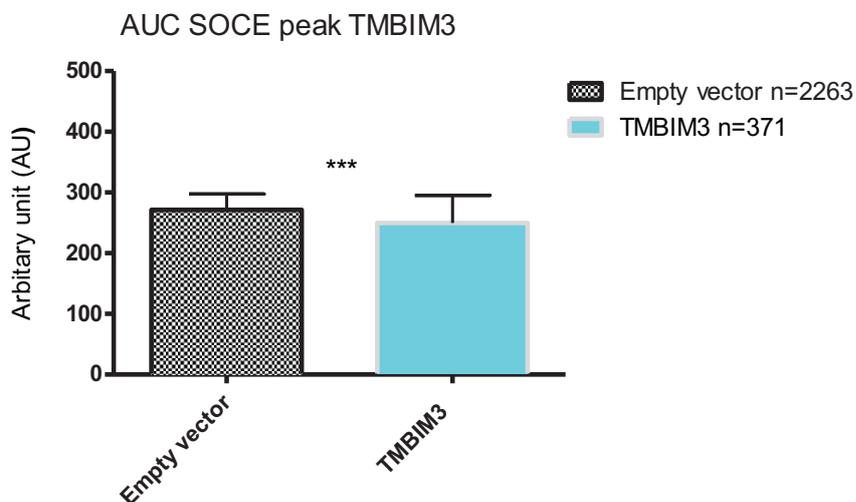


Abb. 27: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des SOCE-induzierten Kalziumeinstroms in das Zytosol von TMBIM3 überexprimierenden Zellen (türkis) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 25 errechnet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 371 mit TMBIM3 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Die Messungen der Kalziumdepletion aus dem ER mittels Thapsigargin ergaben eine geringe Senkung des Kalziumgehaltes im ER in TMBIM3 überexprimierenden HT22 Zellen im Vergleich zu EV HT22. Auch die speicherabhängige Öffnung der SOCs wurde den Ergebnissen zufolge im Vergleich zu den EV HT22 Zellen herabgesetzt. TMBIM3 Überexpression hatte einen senkenden Einfluss auf den zytosolischen Kalziumspiegel von HT22 Zellen.

TMBIM4/GAAP

TMBIM4/GAAP Zytotoxizitätstest durch Glutamat

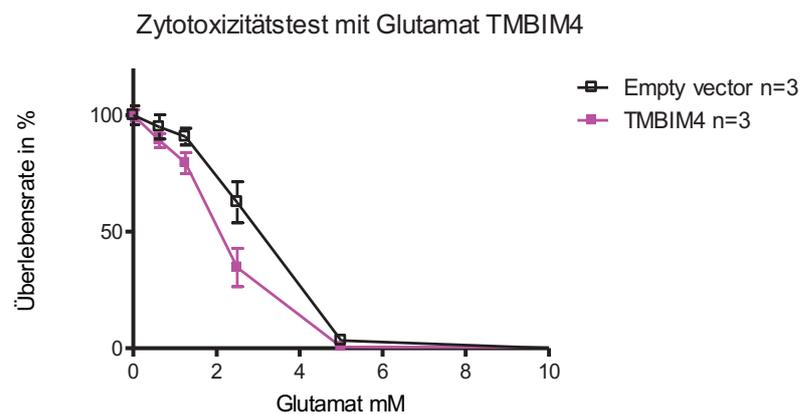


Abb. 28: Die Abbildung zeigt die Resultate des Zytotoxizitätstests mit Glutamat über 24 Stunden. Auf der y-Achse ist die Überlebensrate in Prozent von TMBIM4 überexprimierenden HT22 Zellen (lila) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration in mM auf der x-Achse dargestellt. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutamat behandelt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Das Glutamat wurde mit den Endkonzentrationen von 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Kästchen stellen die jeweiligen Messpunkte mit den angegebenen Glutamatkonzentrationen dar. Die Messung wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Alle Datenpunkte wurden aus den Mittelwerten der drei unabhängigen Experimente erhoben und spiegeln in den Fehlerbalken den +/- Standardfehler wieder.

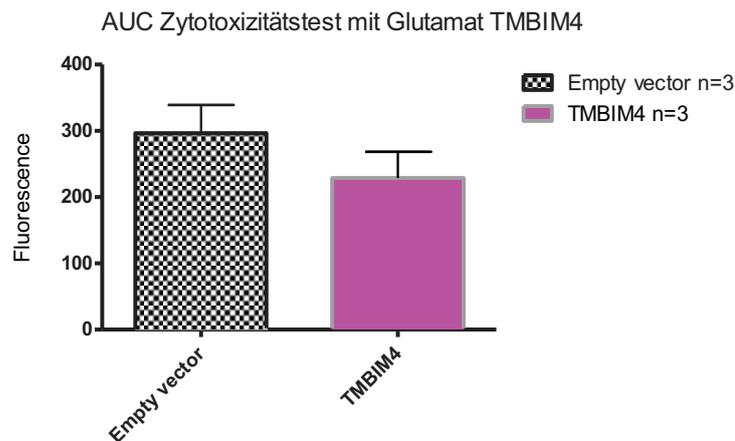


Abb. 29: Die Abbildung zeigt den Zytotoxizitätstest mit Glutamat über 24 Stunden. Das Balkendiagramm stellt die AUC aus Abb. 28 dar. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Abbildung zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM4 überexprimierenden Zellen (lila) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) auf der y-Achse entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Laut den Ergebnissen des Überlebensstests mit Glutamat über 24 Stunden ergab sich kein schützender Effekt durch die Überexpression von TMBIM4 in HT22 Zellen. Im Vergleich zu den EV HT22 Zellen war die Sterberate der TMBIM4 überexprimierenden Zellen erhöht.

TMBIM4/GAAP Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin

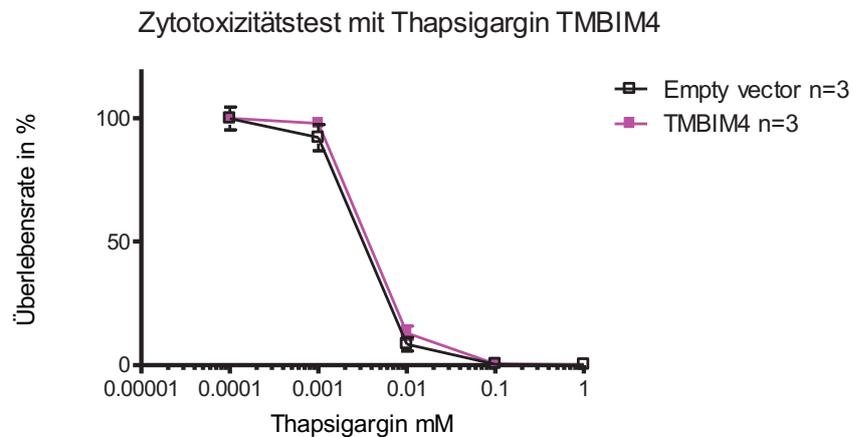


Abb. 30: Dargestellt sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Die Abbildung zeigt auf der y-Achse die Überlebensrate in Prozent von TMBIM4 überexprimierenden HT22 Zellen (lila) im Vergleich zu empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Thapsigarginkonzentration in mM auf der x-Achse. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem zytotoxischen Thapsigargin behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Das Thapsigargin wurde mit den Endkonzentrationen von 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt.

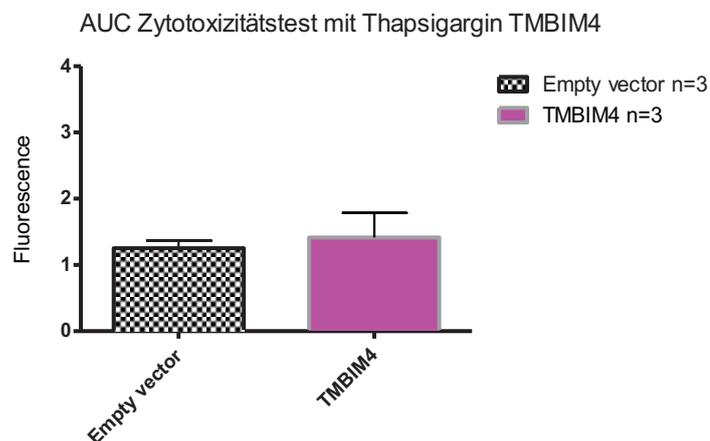


Abb. 31: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Das Balkendiagramm ist aus Abb. 30 abgeleitet und stellt die AUC dar. Das Diagramm zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM4 überexprimierenden Zellen (lila) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Die TMBIM4 überexprimierenden HT22 Zellen zeigten eine geringere Zelltodrate im Vergleich zu den EV HT22 Zellen. Die TMBIM4 Überexpression schützte die HT22 Zellen gegen die thapsigargininduzierten Zelltod durch ER-Stress.

TMBIM4/GAAP Kalziumimaging

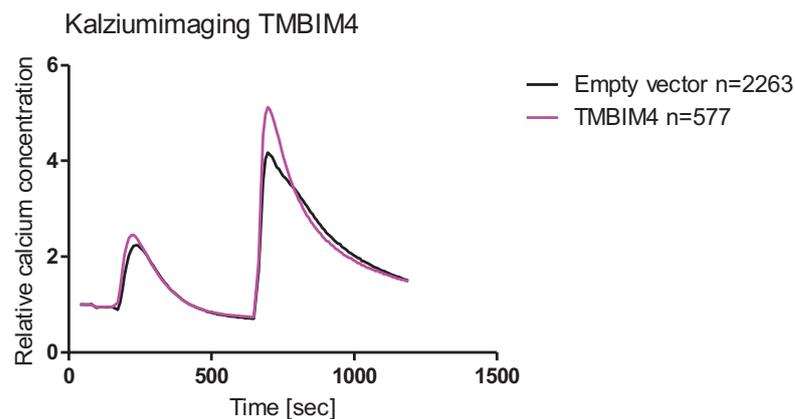


Abb. 32: Die Abbildung zeigt die Konzentrationsänderungen des zytosolischen Ca^{2+} von transfizierten HT22 Zellen. Gemessen wurden TMBIM4 überexprimierende Zellen (lila) im Vergleich zu den EV-Zellen (schwarz). Die relative Fura-Intensität wurde aus der Fura2-AM-Ratio $[F/F_0]$ errechnet und ist auf der y-Achse dargestellt. Der zeitliche Verlauf wurde in Sekunden angegeben (x-Achse). Der erste Peak der Messung stellt den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Hemmung der SERCA-Pumpe mit Thapsigargin dar. Der zweite Peak stellt den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg infolge des SOCE nach extrazellulärer Zugabe von CaCl_2 20 mM dar. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 577 mit TMBIM4 transfizierte Zellen.

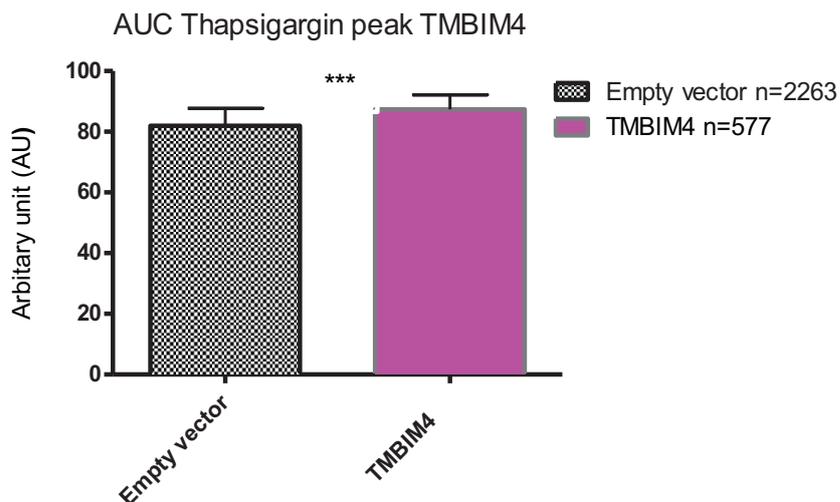


Abb. 33: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des Thapsigarginpeaks von TMBIM4 überexprimierenden Zellen (lila) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 32 errechnet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 577 mit TMBIM4 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

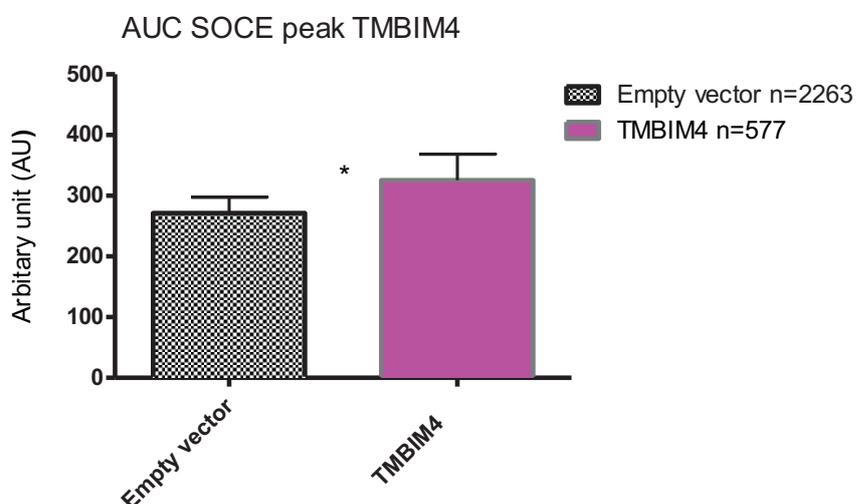


Abb. 34: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des SOCE-induzierten Kalziumeinstroms in das Zytosol von TMBIM4 überexprimierenden Zellen (lila) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 32 errechnet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 577 mit TMBIM4 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Das Kalziumimaging an stabil TMBIM4 überexprimierenden HT22 Zellen ergab eine Erhöhung des Ca^{2+} -Gehaltes des ER durch TMBIM4 Überexpression. Der speicherabhängige Kalziumeinstrom (SOCE) wurde durch die Überexpression von TMBIM4 im Vergleich zu den EV HT22 Zellen ebenfalls erhöht. Die absolute peak-Konzentration wurde deutlich erhöht (Abb.33)

TMBIM5/GHITM

TMBIM5/GHITM Zytotoxizitätstest mit Glutamat

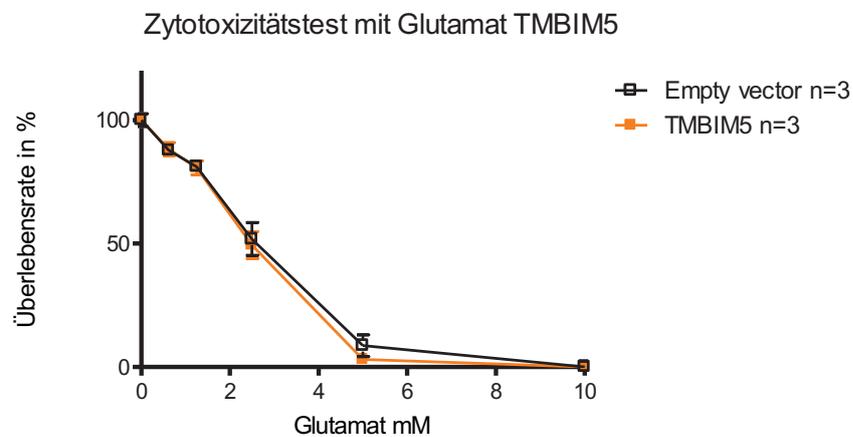


Abb. 35: Die Abbildung zeigt die Resultate des Zytotoxizitätstests mit Glutamat über 24 Stunden. Auf der y-Achse ist die Überlebensrate in Prozent von TMBIM5 überexprimierenden HT22 Zellen (orange) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration in mM auf der x-Achse dargestellt. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO_2 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutamat behandelt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Das Glutamat wurde mit den Endkonzentrationen von 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Kästchen stellen die jeweiligen Messpunkte mit den angegebenen Glutamatkonzentrationen dar. Die Messung wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Alle Datenpunkte wurden aus den Mittelwerten der drei unabhängigen Experimente erhoben und spiegeln in den Fehlerbalken den +/- Standardfehler wieder.

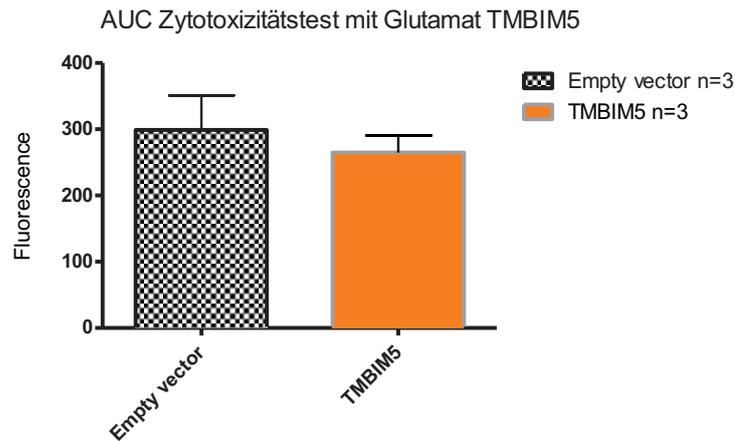


Abb. 36: Die Abbildung zeigt den Zytotoxizitätstest mit Glutamat über 24 Stunden. Das Balkendiagramm stellt die AUC aus Abb. 35 dar. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Abbildung zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM5 überexprimierenden Zellen (orange) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) auf der y-Achse entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Der Überlebenstest an stabilen, TMBIM5 überexprimierenden HT22 Zellen zeigte keinen protektiven Effekt gegen glutamatinduzierten Zelltod. Im Vergleich zu den EV HT22 Zellen war die Zelltodrate der TMBIM5 überexprimierenden HT22 gesteigert.

TMBIM5/GHITM Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin

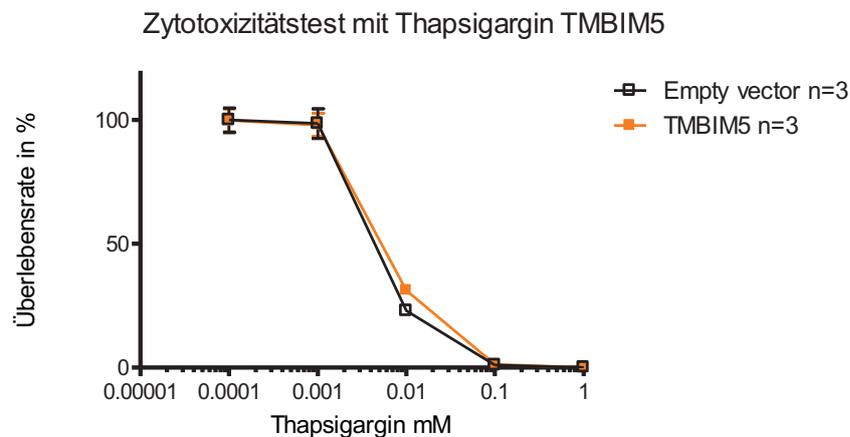


Abb. 37: Dargestellt sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Die Abbildung zeigt auf der y-Achse die Überlebensrate in Prozent von TMBIM5 überexprimierenden HT22 Zellen (orange) im Vergleich zu empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Thapsigarginkonzentration in mM auf der x-Achse. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der Standardfehler SEM +/- wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem zytotoxischen Thapsigargin behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Das Thapsigargin wurde mit den Endkonzentrationen von 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt.

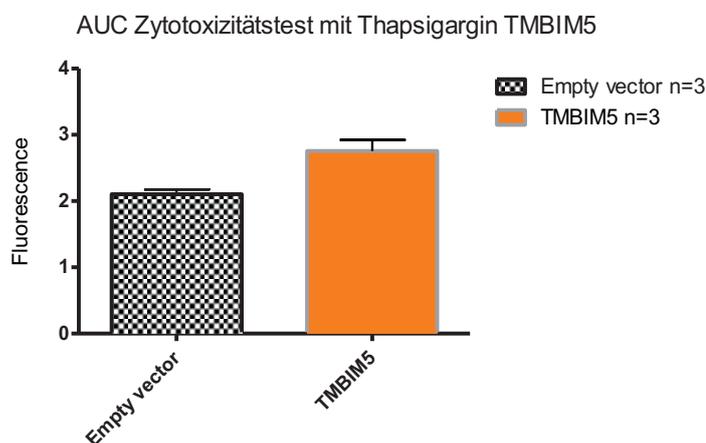


Abb. 38: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Das Balkendiagramm ist aus Abb. 37 abgeleitet und stellt die AUC dar. Das Diagramm zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM5 überexprimierenden Zellen (orange) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

In dem Überlebenstest mit Thapsigargin über 48 Stunden zeigten die mit TMBIM5 transfizierten HT22 Zellen eine herabgesetzte Zelltodrate als die empty vector HT22 Zellen.

TMBIM5/GHITM Kalziumimaging

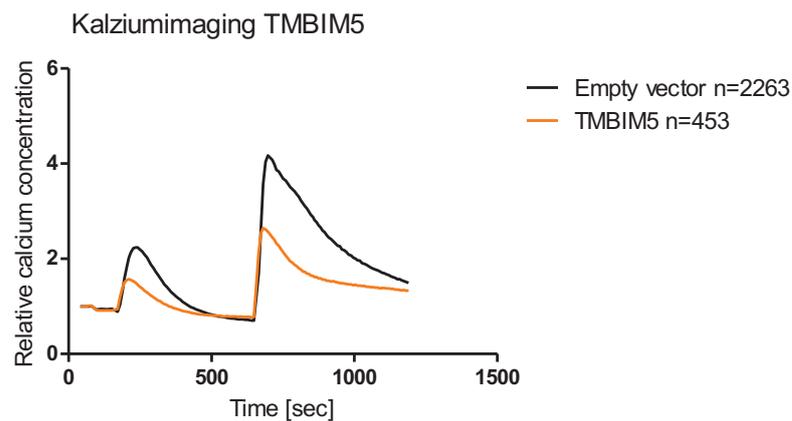


Abb. 39: Die Abbildung zeigt die Konzentrationsänderungen des zytosolischen Ca^{2+} von transfizierten HT22 Zellen. Gemessen wurden TMBIM5 überexprimierende Zellen (orange) im Vergleich zu den EV-Zellen (schwarz). Die relative Fura-Intensität wurde aus der Fura2-AM-Ratio $[F/F_0]$ errechnet und ist auf der y-Achse dargestellt. Der zeitliche Verlauf wurde in Sekunden angegeben (x-Achse). Der erste Peak der Messung stellt den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Hemmung der SERCA-Pumpe mit Thapsigargin dar. Der zweite Peak stellt den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg infolge des SOCE nach extrazellulärer Zugabe von CaCl_2 20 mM dar. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 453 mit TMBIM5 transfizierte Zellen.



Abb. 40: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des Thapsigarginpeaks von TMBIM5 überexprimierenden Zellen (orange) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 39 errechnet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 453 mit TMBIM5 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

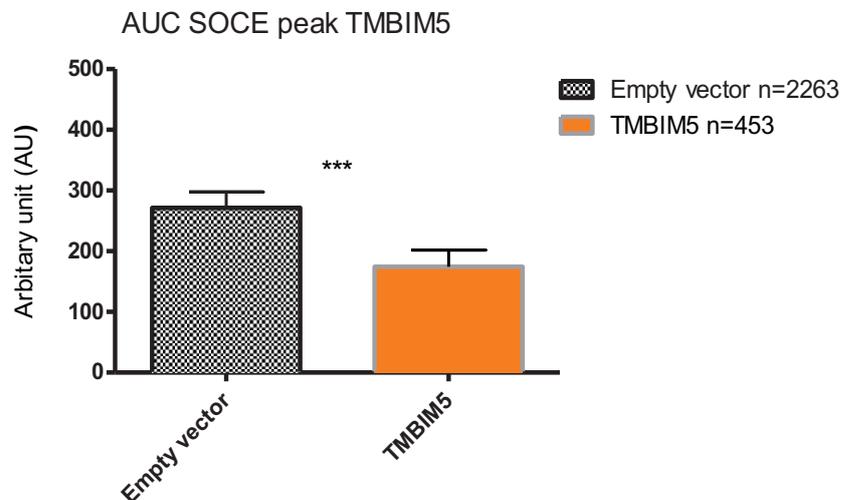


Abb. 41: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des SOCE-induzierten Kalziueinstroms in das Zytosol von TMBIM5 überexprimierenden Zellen (orange) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 39 errechnet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 453 mit TMBIM5 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Die Überexpression von TMBIM5 veränderte die Kalziumhomöostase der HT22 Zellen. Sowohl der Kalziumgehalt des endoplasmatischen Retikulums als auch der durch die Leerung der intrazellulären Speicher bedingte Kalziumeinstrom (SOCE) wurden herabgesetzt.

TMBIM6/BI-1

TMBIM6/BI-1 Zytotoxizitätstest mit Glutamat

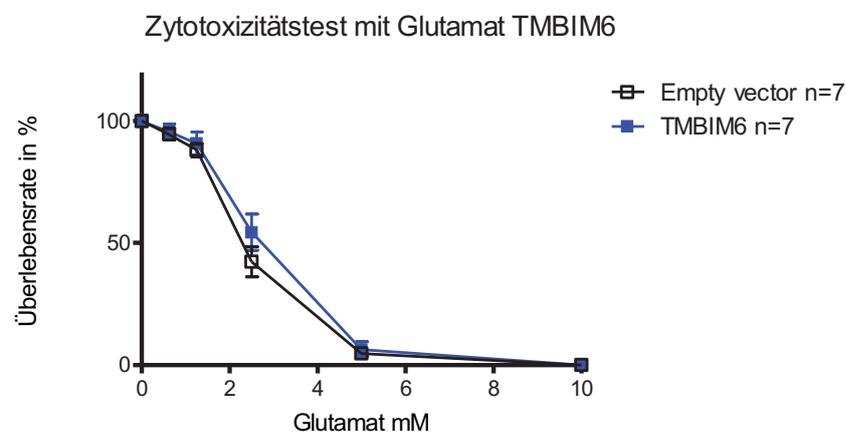


Abb. 42: Die Abbildung zeigt die Resultate des Zytotoxizitätstests mit Glutamat über 24 Stunden. Auf der y-Achse ist die Überlebensrate in Prozent von TMBIM6 überexprimierenden HT22 Zellen (blau) im Vergleich zu den empty vector HT22 (schwarz) Zellen in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration in mM auf der x-Achse dargestellt. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutamat behandelt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Das Glutamat wurde mit den Endkonzentrationen von 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Kästchen stellen die jeweiligen Messpunkte mit den angegebenen Glutamatkonzentrationen dar. Die Messung wurde insgesamt siebenmal durchgeführt. Alle Datenpunkte wurden aus den Mittelwerten der sieben unabhängigen Experimente erhoben und spiegeln in den Fehlerbalken den +/- Standardfehler wieder.

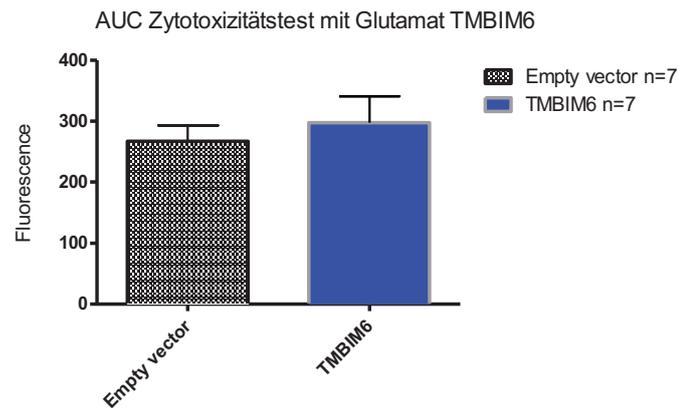


Abb. 43: Die Abbildung zeigt den Zytotoxizitätstest mit Glutamat über 24 Stunden. Das Balkendiagramm stellt die AUC aus Abb. 42. dar. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von sieben unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Abbildung zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM6 überexprimierenden Zellen (blau) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) auf der y-Achse entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Messung wurde insgesamt siebenmal durchgeführt. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Die Überexpression von TMBIM6 (BI-1) in HT22 Zellen zeigte als einziges Protein der BI-1-Familie eine schützende Wirkung gegenüber glutamatinduziertem Zelltod.

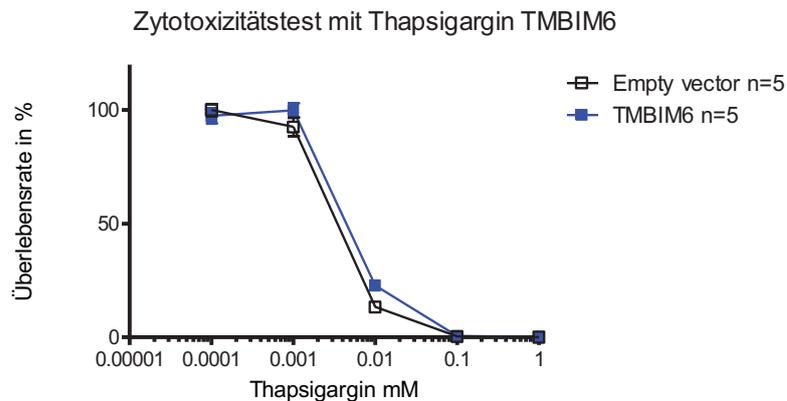
TMBIM6/BI-1 Zytotoxizitätstest mit Thapsigargin

Abb. 44: Dargestellt sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Die Abbildung zeigt auf der y-Achse die Überlebensrate in Prozent von TMBIM6 überexprimierenden HT22 Zellen (blau) im Vergleich zu empty vector HT22 Zellen (schwarz) in Abhängigkeit von der Thapsigarginkonzentration in mM auf der x-Achse. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von fünf unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Zellen wurden im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 h lang inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem zytotoxischen Thapsigargin behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Das Thapsigargin wurde mit den Endkonzentrationen von 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 mmol/ml auf die Zellen gegeben. Die Messung wurde insgesamt fünfmal wiederholt.

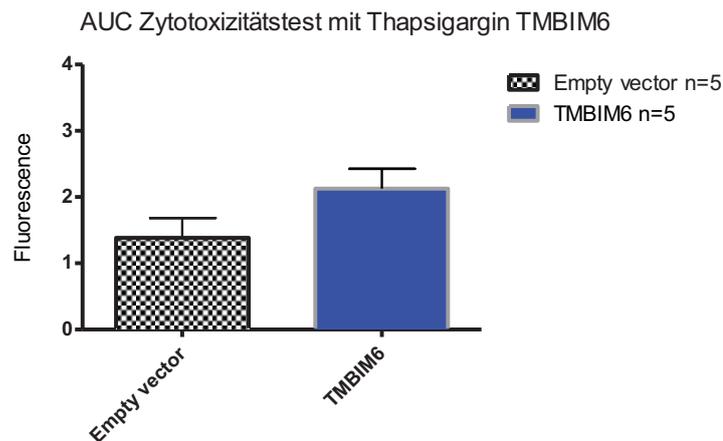


Abb. 45: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mit Thapsigargin über 48 Stunden. Das Balkendiagramm ist aus Abb. 44 abgeleitet und stellt die AUC dar. Das Diagramm zeigt die Überlebensrate von stabil TMBIM6 überexprimierenden Zellen (blau) im Vergleich zu den empty vector HT22 Zellen (schwarz). Das Farbsignal (Fluoreszenz) entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist damit proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Die Daten wurden aus den Mittelwerten von fünf unabhängigen Experimenten erhoben. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

BI-1 überexprimierende HT22 Zellen waren im Vergleich zu den EV-HT22 Zellen resistenter gegenüber thapsigargininduziertem Zelltod durch ER-Stress. BI-1 schützte als einziges Protein der BI-1-Familien gegen glutamat- und thapsigargininduzierten Zelltod.

TMBIM6/BI-1 Kalziumimaging

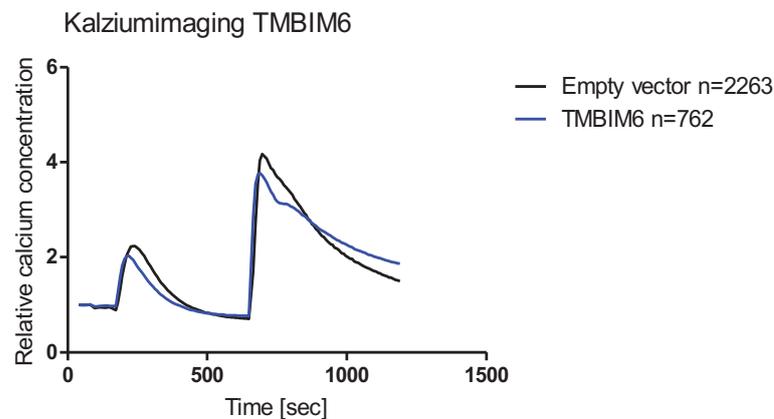


Abb. 46: Die Abbildung zeigt die Konzentrationsänderungen des zytosolischen Ca^{2+} von transfizierten HT22 Zellen. Gemessen wurden TMBIM6 überexprimierende Zellen (blau) im Vergleich zu den EV-Zellen (schwarz). Die relative Fura-Intensität wurde aus der Fura2-AM-Ratio $[F/F_0]$ errechnet und ist auf der y-Achse dargestellt. Der zeitliche Verlauf wurde in Sekunden angegeben (x-Achse). Der erste Peak der Messung stellt den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Hemmung der SERCA-Pumpe mit Thapsigargin dar. Der zweite Peak stellt den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg infolge des SOCE nach extrazellulärer Zugabe von CaCl_2 20 mM dar. Der Versuch wurde viermal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 762 mit TMBIM6 transfizierte Zellen.

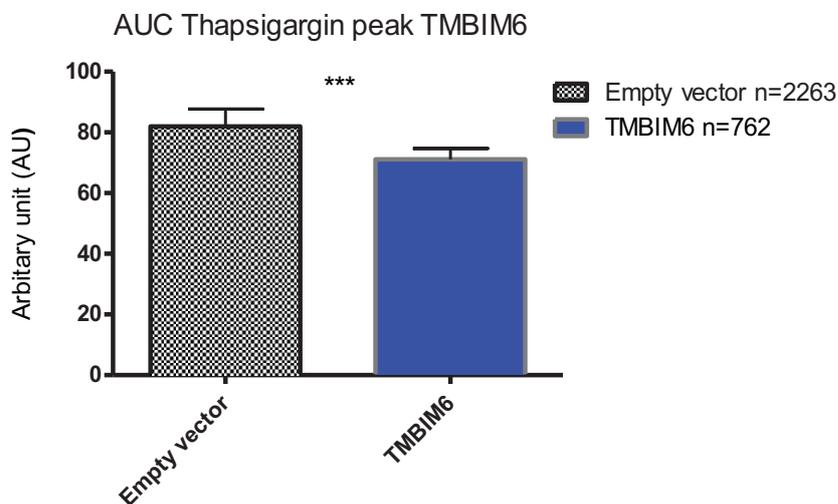


Abb. 47: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des Thapsigarginpeaks von TMBIM6 überexprimierenden Zellen (blau) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 46 errechnet. Der Versuch wurde viermal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 762 mit TMBIM6 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

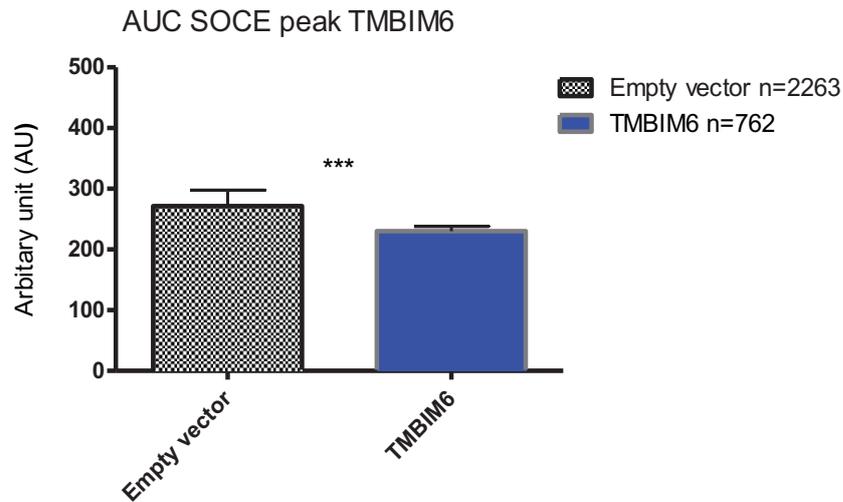


Abb. 48: Die Abbildung zeigt vergleichend die AUC (der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration des SOCE-induzierten Kalziumeinstroms in das Zytosol von TMBIM6 überexprimierenden Zellen (blau) und EV-HT22 (schwarz). Die AUC wurde aus dem Kurvenverlauf in Abb. 46 errechnet. Der Versuch wurde viermal wiederholt und umfasste 2263 Zellen die mit dem Empty vector transfiziert waren und 762 mit TMBIM6 transfizierte Zellen. Der +/- Standardfehler wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Der Vergleich der beiden Area under the curve (AUC) zeigte einen Signifikanzwert von $P < 0,05$ bei einem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

BI-1 Überexpression beeinflusste die Kalziumhomöostase in überexprimierenden HT22 Zellen. BI-1 reduzierte die thapsigargininduzierte Kalziumfreisetzung aus dem ER und den speicherabhängigen Kalziumeinstrom über die SOCs.

Diskussion

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit war die Charakterisierung von BI-1 und der BI-1-ähnlichen Proteine TMBIM1-5 hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Zellsterben und die Kalziumhomöostase in stabil überexprimierenden HT22 Zellen. In anderen Studien wurden bereits Untersuchungen dieser Proteine bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation und ihrer Expressionsmuster in verschiedenen Organen durchgeführt. Jedoch ist die Untersuchung der Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt und das Zellsterben bei den BI-1-ähnlichen Proteinen noch weitgehend ein Neugebiet. Die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit gewonnenen Resultate zeigen einen Einfluss dieser Proteine auf den Kalziumhaushalt und Auswirkungen auf die Zelltodrate durch induzierten ER-Stress und durch Glutamat gesteigerte ROS. In Abhängigkeit von der Senkung des intrazellulären Kalziumgehaltes wurde auch die Zelltodrate der transfizierten Zellen beeinflusst. In dem folgenden Abschnitt werden die Resultate der Messungen zusammenfassend im Bezug auf die phylogenetischen Ähnlichkeiten und die intrazelluläre Lokalisation der BI-1-ähnlichen Proteine diskutiert.

TMBIM1/RECS1

Der phylogenetische Baum, welcher mittels PhyML 3.0 erstellt wurde, zeigt, dass TMBIM1/RECS1 die entfernteste Beziehung zu BI-1/TMBIM6 hat. Der höchste Verwandtschaftsgrad besteht jedoch zu TMBIM2 und TMBIM3. Die intrazellulären Lokalisationen von TMBIM1 sind das endoplasmatische Retikulum, die Endosomen, die Lysosomen und der Golgi-Apparat, jedoch nicht die Mitochondrien (79). Die stabile Überexpression von TMBIM1 in HT22 Zellen zeigte keine Senkung der Zelltodrate bei der Induktion von oxidativem Stress (ROS) durch Glutamat gegenüber dem empty vector. Somit konnte ein schützender Mechanismus gegen ROS, wie er bei TMBIM6 beschrieben wurde, für TMBIM1 nicht beobachtet werden (64). Allerdings schützte TMBIM1 die HT22 Zellen gegenüber dem thapsigargininduzierten Zelltod durch ER-Stress. Dieser Schutzmechanismus wäre möglicherweise durch eine Interaktion von TMBIM1 mit IRE1, welche für BI-1 bereits gezeigt wurde, erklärbar (63). Durch TMBIM1 wurde der thapsigargininduzierte Kalziumausstrom aus dem ER gesenkt. Naheliegender wäre hierbei ein Einfluss von TMBIM1 auf die SERCA-Pumpe durch eine Interaktion mit den Proteinen der Bcl2-Familie, wodurch die

Kalziumausschüttung aus dem ER vermindert wurde und somit die thapsigargininduzierte Zelltodrate herabgesetzt wurde. Die Senkung der zytosolischen Kalziumkonzentration konnte bei TMBIM3 durch einen Einfluss auf die Proteine der Bcl2 Familie und dem IP₃ Rezeptor gezeigt werden (73). RECS1 ist mit TMBIM3 phylogenetisch nah verwandt, sodass auch bei diesem Protein ein Einfluss auf den IP₃ Rezeptor einer Rolle spielen könnte. Diese Senkung des zytosolischen Kalziumgehaltes durch TMBIM1 wäre ebenfalls eine mögliche Erklärung für die schützende Wirkung von TMBIM1 gegen ER-Stress. In anderen Studien wurde gezeigt, dass TMBIM1 gegen Fas-induzierten Zelltod durch verminderte Synthese des Fas-Rezeptors an der Zelloberfläche schützt (79). Im Rahmen dieser Studie wurden keine Untersuchungen der Fas-induzierten Apoptose an TMBIM1 durchgeführt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von TMBIM1 in HT22 Zellen einen senkenden Einfluss auf die zytosolische Kalziumkonzentration und die Zelltodrate bei ER Stress hatte.

TMBIM2/FAIM2

TMBIM2/FAIM2 (Fas apoptotic inhibitory molecule 2) zeigt die größte phylogenetische Ähnlichkeit mit TMBIM1 und TMBIM3 auf. Die intrazellulären Lokalisationen von FAIM2 sind wie auch bei TMBIM1 das ER, der Golgi-Apparat und die Plasmamembran (78). Das Expressionsmuster zeigt eine erhöhte Syntheserate im zentralen Nervensystem (78) und dort besonders in den Purkinje-Zellen des Zerebellums, in dem Hippocampus und den Pyramidenzellen (88). Wie auch TMBIM1 ist FAIM2 in der Lage Zellen vor Fas-induzierter Apoptose zu schützen (88)(89). Die Ergebnisse des Kalziumimaging von FAIM2 zeigten, dass der Kalziumgehalt des ER gesenkt wurde und der SOCE-bedingte Kalziumstrom durch die Überexpression von FAIM2 erhöht wurde. Bei dem glutamatinduzierten Zelltod durch ROS zeigten die FAIM2 überexprimierenden Zellen eine höhere Sterblichkeitsrate als die Kontrolle. Es wäre denkbar, dass die Überexpression von TMBIM2 die ER-Membranen destabilisierte und somit eine frühzeitige Ausschüttung des ER-Kalziums bewirkte. Andere Studien zeigten, dass das Fehlen von TMBIM2 in FAIM2 Knockout Mäusen eine erhöhte Zelltodrate nach einer transienten zerebralen Ischämie nach sich zieht im Vergleich zu TMBIM2 überexprimierenden Mäusen (90). In vivo Studien belegten einen positiven Einfluss von TMBIM2 auf das klinische Outcome nach einem ischämischen Hirninfarkt bei TMBIM2 überexprimierenden Mäusen (90). Aus diesen

Studien lässt sich jedoch kein Einfluss auf die Kalziumhomöostase der untersuchten Neurone ableiten. Im Gegensatz zu der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen fanden die Studien von Reich et al. in vivo statt und lassen somit nur begrenzt einen Vergleich zu. Studien, die eine Aussage über den Einfluss von TMBIM2 auf die Kalziumhomöostase liefern, liegen derzeit nicht vor (90). Ebenfalls wurde im Rahmen dieser Studie keine Fas-induzierte Apoptose untersucht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von TMBIM2 in HT22 Zellen zu einer Verstärkung des zytotoxischen Effekts des Glutamats und damit zu einer erhöhten Zelltodrate führte. Desweiteren senkte die Überexpression die $[Ca^{2+}]_{ER}$ und erhöhte die SOCE nach ER-Depletion.

TMBIM3/GRINA

TMBIM3/GRINA (glutamate receptor ionotropic NMDA protein 1) (91) zeigt die größten phylogenetischen Ähnlichkeiten zu TMBIM1 und TMBIM2. Es sind nur wenige Informationen über die intrazellulären Lokalisationen dieses 41 kD Proteins vorhanden. Die wahrscheinlichsten intrazellulären Lokalisationen sind jedoch das ER und der Golgi-Apparat (73). Die Expressionsmuster zeigten eine erhöhte Transkriptionsrate im Kortex von Mäusen (92). Die Resultate des Zytotoxizitätstests mit Glutamat deckten keine protektive Wirkung von GRINA auf die überexprimierenden murinen HT22 Zellen gegenüber glutamatinduziertem oxidativen Stress auf. Untersuchungen von Rojas-Rivera, D. et al zeigten jedoch einen signifikanten Schutz vor H_2O_2 -induzierter Zytotoxizität in GRINA überexprimierenden MEFs (Mouse embryonic fibroblasts) (73). In dem Überlebenstest mit Glutamat resultierte eine geringfügig erhöhte Zelltoderate der GRINA überexprimierenden HT22 Zellen im Vergleich zu der Kontrolle (EV), sodass ein möglicher Schutz gegen glutamatinduziertem oxidativen Stress nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Der Überlebenstest mit Thapsigargin hingegen zeigte eine deutlich geringere Sterberate von GRINA überexprimierenden HT22 Zellen im Vergleich zu dem EV. Dieses Ergebnis lässt auf eine mögliche protektive Funktion von TMBIM3 gegenüber ER-Stress schließen. Die Untersuchungen von Rojas-Rivera, D. et al. verdeutlichten eine signifikante Schutzfunktion von TMBIM3 vor ER-Stress in MEFs (73), was die in dieser Arbeit produzierten Ergebnisse untermauert. Die Ergebnisse des Kalziumimaging zeigten eine geringere Kalziumausschüttung aus der ER nach der

Behandlung mit Thapsigargin als die EV HT22 Zellen. Diese Tatsache passt zu der geringeren Sterblichkeitsrate der transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle (EV). Rojas-Rivera, D. et al. bestätigten mit ihren Untersuchungen die signifikant geringere Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER durch TMBIM3 Überexpression in MEFs. Es wurde nachgewiesen, dass TMBIM3 mit dem IP_3 -Rezeptor interagiert und somit die Kalziumfreisetzung aus dem ER verringert ohne den Kalziumgehalt des ER herabzusetzen (73). In einer engen Interaktion mit TMBIM6 führt TMBIM3 zu einer Hemmung des IP_3 -Rezeptors und damit zu einer geringeren Kalziumfreisetzung aus dem ER und so zu einer geringeren Zelltodrate (73). Die Resultate dieser experimentellen Arbeit verdeutlichten ebenfalls eine geringere Zelltodrate der HT22 Zellen und eine herabgesetzte Kalziumfreisetzung aus dem ER nach Thapsigarginbehandlung. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse des Kalziumimaging einen reduzierten speicherabhängigen Kalziumeinstrom nach ER-Depletion durch TMBIM3 Überexpression im Vergleich zu dem EV. Das reduzierte SOCE ist eine denkbare Folge der geringeren Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von TMBIM3 einen Einfluss auf den Kalziumgehalt des endoplasmatischen Retikulums und den SOCE der HT22 Zellen hatte und die ER-Stress-induzierte Zelltodrate dieser Zellen senkte. Ein vor glutamatinduzierter ROS-schützender Effekt von GRINA konnte nicht eindeutig belegt werden.

TMBIM4/GAAP

TMBIM4/GAAP (Golgi antiapoptotic protein) ist ein 27 kDa Protein, welches aus sechs oder sieben Transmembrandomänen besteht (81). GAAP hat eine hohe phylogenetische Ähnlichkeit mit TMBIM6/BI-1. Die Expression von TMBIM4 ist ubiquitär in allen Organen nachgewiesen (82)(81). Intrazellulär ist GAAP in dem ER aber auch vor allem in dem Golgi-Apparat lokalisiert. In anderen Studien wurde gezeigt, dass die Überexpression von TMBIM4 den Kalziumgehalt der intrazellulären Speicher verringert (83). Weitere Studien belegten einen schützenden Effekt von TMBIM4 vor extrinsisch- und intrinsisch-induzierter Apoptose (81). Mattia, F de et al. verdeutlichten, dass TMBIM4 die histamininduzierte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem ER verminderte (83)(81). Die Resultate des Zytotoxizitätstests mit Glutamat

im Rahmen dieser Studie ergaben keinen protektiven Effekt durch die Überexpression von TMBIM4 in HT22 Zellen. Die transfizierten Zellen zeigten eine erhöhte Zelltodrate durch die Behandlung mit Glutamat als die EV HT22 Zellen. In den Zelltodversuchen mittels thapsigargininduziertem ER–Stress hatten die mit GAAP transfizierten HT22 Zellen eine geringere Zelltodrate im Vergleich zu der Kontrolle. Diese gesteigerte Resistenz der Zellen lässt sich mit den Ergebnissen des Kalziumimaging nicht eindeutig erklären. Die Kalziummessungen zeigten, dass die mit GAAP transfizierten Zellen eine erhöhte Kalziumfreisetzung aus dem ER hatten. Diese Ergebnisse widersprechen den Resultaten von Mattia, F. de et al.. Dabei wurde eine topographische Beziehung von GAAP und dem IP₃-Rezeptor des ER nachgewiesen. Durch eine mögliche Interaktion von TMBIM4 und dem IP₃-Rezeptor kommt es zu einer geringeren Kalziumfreisetzung aus dem ER (83). Neben der Steigerung des Ca²⁺-Gehaltes des ER, erhöhte TMBIM4 auch den speicherabhängigen Kalziumeinstrom nach der Leerung des ER im Vergleich zu der EV–Kontrolle. Die Minderung des extrazellulären Kalziumeinstroms durch GAAP wurde auch durch Mattia, F. de et al. in einem ähnlichen Versuchsaufbau nachgewiesen (83). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GAAP einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase der murinen Zellen hatte. TMBIM4 steigerte den intrazellulären Kalziumgehalt des ER und den über die Zellmembran regulierten SOCE. Durch den erhöhten Kalziumeinstrom wurde die Zelltodrate dieser Zellen im Vergleich zu der Kontrolle durch glutamat-induzierten oxidativen Stress erhöht. Die Resultate der Studien von Mattia, F. de et al. werden dadurch nicht bestätigt. Diese haben gezeigt, dass GAAP den Kalziumgehalt des ER senkte und die überexprimierenden Zellen durch eine mögliche Interaktion mit dem IP₃-Rezeptor vor ER–Stress und damit vor dem Zellsterben schützte.

TMBIM5/GHITM

TMBIM5/GHITM (growth-hormone inducible transmembrane protein) hat die größte phylogenetische Ähnlichkeit zu TMBIM6/BI-1 der untersuchten Proteine der TMBIM–Familie und zeigt ähnliche Expressionsmuster wie BI-1 (84). TMBIM5 besteht aus sieben Transmembrandomänen und ist intrazellulär in dem ER, aber auch in den Mitochondrien, lokalisiert (85). Oka, T. et al. zeigten 2008, dass GHITM/MICS1 (mitochondrial morphology and cristae structure) sich in der inneren

Mitochondrienmembran befand und dort die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol beeinflusste (85). Über die Funktionen von TMBIM5 im Zusammenhang mit Apoptosevorgängen und den Einfluss auf die Kalziumhomöostase ist bisher jedoch nur wenig bekannt. TMBIM5 zeigte in dem Überlebenstest mit Glutamat über 24 Stunden keine protektive Wirkung auf die überexprimierenden HT22 Zellen. Keines der bisher untersuchten Proteine der BI-1 Familie einschließlich TMBIM5 war in der Lage die murinen Zellen vor glutamatinduziertem oxidativen Stress zu schützen. Jedoch zeigte die Überexpression von GHITM einen schützenden Effekt auf die HT22 Zellen bei einem mittels thapsigargininduziertem ER-Stress. Keines der bisher untersuchten Proteine schützte die HT22 Zellen so vor Zelltod durch Thapsigargin. Diese Tatsache lässt sich aus den Messungen des Kalziumimaging erklären. Die mit TMBIM5 transfizierten HT22 Zellen wiesen eine deutlich gesenkte Kalziumfreisetzung aus dem ER nach Hemmung der SERCA im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf. Über den Mechanismus, der bei der Senkung der Kalziumfreisetzung aus dem ER eine Rolle spielt, ist jedoch derzeit nichts bekannt. Anhand der Untersuchungen von TMBIM3 und TMBIM4 lässt sich eine Interaktion mit dem IP_3 -Rezeptor vermuten. Über die Interaktion mit dem IP_3 -Rezeptor kann möglicherweise die verminderte Kalziumfreisetzung aus dem ER begründet werden. Ebenfalls sehr deutlich wurde der speicherabhängige Kalziumeinstrom (SOCE) über die Zellmembran gesenkt. Der Kalziumeinstrom über die Kanäle der Zellmembran wurde im Vergleich zu den EV HT22 Zellen annähernd halbiert. Damit zeigte TMBIM5 einen sehr deutlichen Einfluss auf die Kalziumhomöostase und damit auf die kalziumabhängigen Stoffwechselfvorgänge der Zellen. TMBIM5 war in der Lage Zellen vor ER-Stress-induziertem Zelltod durch zweierlei unterschiedliche Mechanismen zu schützen. Einerseits senkte die Überexpression die Freisetzung des intrazellulären Kalziums aus dem ER und minimierte stark den SOCE. Damit wurde die Zelle durch apoptotische Reize weniger mit Kalzium überflutet, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Kalziumüberladung der Mitochondrien vergleichsweise gesenkt wurde. Andererseits stabilisierte TMBIM5 durch seine Lage in der inneren Mitochondrienmembran das Cytochrom c, welches ein zentraler Mediator der Apoptose ist (85). Eine Interaktion mit den Proteinen der Bcl2-Familie, IRE1 und dem IP_3 -Rezeptor wäre aufgrund der phylogenetischen Ähnlichkeit zu BI-1 ebenfalls denkbar.

TMBIM6/BI-1

TMBIM6 ist das am besten charakterisierte Protein der BI-1 Familie. In zahlreichen Publikationen wurden die antiapoptotischen Funktionen dieses Proteins beschrieben (58)(59)(64)(93). Das aus sieben Transmembrandomänen bestehende Protein ist intrazellulär in dem ER (58) und in dem Zytosol lokalisiert. Die wichtigsten Funktionen von BI-1 ist die Reduktion des Kalziumgehaltes des ER (68) und die negative Regulation von IRE1 während der UPR (63). Desweiteren interagiert BI-1 direkt mit Cytochrom P450 und ist damit in der Lage oxidativen Stress zu mindern (64). Durch komplexe Interaktionen mit den Proteinen der Bcl2-Familie reguliert BI-1 den Kalziumhaushalt und damit auch zahlreiche stoffwechselphysiologische Vorgänge, wie auch die Apoptose (94). Die TMBIM6 überexprimierenden HT22 Zellen zeigten als einzige der BI-1-Familie, im Rahmen dieser Arbeit, eine gesteigerte Resistenz gegenüber glutamatinduziertem oxidativen Stress. Diese gesteigerte Überlebensrate ist möglicherweise mit der Interaktion von BI-1 und der NADPH-P450 Reductase (64) zu erklären. Im Überlebenstest mit Thapsigargin wiesen die BI-1- transfizierten Zellen eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber thapsigargininduziertem ER-Stress als die Kontrolle (EV) auf. Diese gesteigerte Resistenz ist zum einem mit der negativen Regulation von IRE1 (63) und zum anderen mit der Interaktion mit den antiapoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie zu erklären (94). Das Kalziumimaging ergab eine herabgesetzte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER nach Behandlung mit Thapsigargin. Dieses Ergebnis wurde bereits in zahlreichen Studien belegt (94) (68). Durch die Senkung des SOCE wurde eine Kalziumüberflutung der Zelle vermieden und somit die TMBIM6 transfizierten Zellen vor dem Zelltod geschützt. Zusammenfassend lässt sich für BI-1 eine antiapoptotische Funktion durch komplexe Interaktionen mit den Proteinen der Bcl-2-Familie, der NADPH P 450 Reductase und der IRE-1 postulieren. Sowohl die Wirkung von BI-1 gegen glutamat- und thapsigargininduzierten Zelltod als auch die Senkung des Kalziumgehaltes des ER konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Desweiteren wurde ein mindernder Einfluss von BI-1 auf den speicherabhängigen Kalziumstrom gezeigt. Aufgrund der phylogenetischen Ähnlichkeit zu TMBIM5 wäre auch bei BI-1 eine mitochondriale Lokalisation naheliegend. Diese wurde bisher jedoch nicht für BI-1 nachgewiesen.

Rolle von mitochondrialem Ca^{2+}

Die Mitochondrien sind neben ihrer zentralen Stellung in der ATP-Synthese entscheidende Regulatoren der Apoptose (95). Die Mitochondrien enthalten in ihrem intramembranösen Raum zahlreiche apoptoseinduzierende Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören das Cytochrom c, der AIF, die Procaspase 9 sowie Smac/DIABLO (96) (28). Geringe Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase können die Apoptose induzieren (97). Die Überladung der Mitochondrien mit Kalzium führt zur Schwellung der Zellorganellen und letztlich zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran (98) (99). Durch die Ruptur der Mitochondrienmembran werden die proapoptotischen Faktoren wie das Cytochrom c freigesetzt (30). Das Cytochrom c seinerseits induziert die Apoptose durch die Aktivierung der Procaspasen (98). Desweiteren führt die Überladung mit Kalzium zu Störungen der ATP-Synthese, sodass zahlreiche energieabhängige Prozesse zum Erliegen kommen (98). Durch den Mangel an ATP können physiologische Konzentrationen von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} nicht aufrechterhalten werden, sodass es zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials kommt und letztlich zum Zelltod. Durch die mitochondriale Funktionsstörung und die Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt (98). Es besteht ein enges Zusammenspiel zwischen den Mitochondrien, dem ER und den Proteinen der Bcl2-Familie (98). Die Überexpression von Bcl2 führt durch die Interaktion mit dem IP_3 -Rezeptor des ER zu einer geringeren Kalziumfreisetzung und damit zu einer geringeren Kalziumbelastung der Mitochondrien (38). Eine Interaktion zwischen der BH4-Domäne des Bcl2 und dem IP_3 -Rezeptor wurde bereits nachgewiesen (100). Auch das antiapoptotische Bcl-XL senkt die Kalziumfreisetzung aus dem ER durch die Interaktion mit dem IP_3 -Rezeptor (101). Das proapoptotische Mitglied der Bcl2-Familie BAX bewirkt jedoch das Gegenteil und fördert die Kalziumfreisetzung aus dem ER und so die Überladung der Mitochondrien (102). BI-1 ist in der Lage mit dem antiapoptotischen Protein Bcl2 zu interagieren und senkt so die Kalziumfreisetzung aus dem ER (58). Weder BI-1 noch eins der BI-1-ähnlichen Proteine TMBIM1-4 konnten bisher in den Mitochondrien nachgewiesen werden (94). TMBIM5 ist das einzige BI-1-ähnliche Protein, welches unmittelbar im Zusammenhang mit den Mitochondrien intrazellulär nachgewiesen wurde (85). Obwohl eine enge phylogenetische Ähnlichkeit zwischen BI-1 und

GHITM besteht, scheinen die intrazellulären Lokalisationen unterschiedlich zu sein. Die funktionelle Bedeutung von GHITM an den Mitochondrien ist noch weitestgehend ungeklärt. Weitere dahingehende Untersuchungen sollten die Funktion von GHITM an den Mitochondrien aufdecken. Ebenfalls besteht Forschungsbedarf bei der differenzierteren Klärung der intrazellulären Lokalisation aller Mitglieder der BI-1-Familie um die funktionellen Vorgänge und die Interaktionen mit den Proteinen der Bcl2-Familie und den Mitochondrien besser verstehen zu können.

Schlussfolgerungen und Aussichten

Die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit durchgeführten Untersuchungen von TMBIM1-6 lassen Schlussfolgerungen zu, dass BI-1 und die BI-1-ähnlichen Proteine, TMBIM1-5, einen Einfluss sowohl auf die Zelltodrate als auch auf die intrazelluläre Kalziumhomöostase haben. Mit der Ausnahme von TMBIM2/FAIM2 schützten alle Proteine dieser Familie vor dem durch Thapsigargin verursachten Zelltod durch ER-Stress. Dabei waren besonders deutlich die Messergebnisse von TMBIM1,3,5,6. Für BI-1 wurde eine Interaktion mit dem Protein der UPR IRE1 gezeigt (63), wodurch BI-1 vor UPR-induzierter Apoptose schützt. Studien über das Zusammenwirken der BI-1-ähnlichen Proteine mit IRE1 liegen nicht vor. Die Messungen der zytosolischen Kalziumkonzentrationen mittels Fura2-AM zeigten, dass die BI-1-ähnlichen Proteine die Kalziumfreisetzung aus dem ER nach Hemmung der SERCA durch Thapsigargin und den speicherabhängigen Kalziumstrom (SOCE) senkten. Der genaue Mechanismus der Senkung des aus dem ER freigesetzten Kalziums ist für die BI-1-ähnlichen Proteine jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Eine Interaktion zwischen BI-1 und den antiapoptotischen Proteinen der Bcl2-Familie und damit mit dem IP₃-Rezeptor wurde bereits in anderen Studien gezeigt (93). Es wäre denkbar, dass auch die anderen Mitglieder dieser Familie somit die Kalziumfreisetzung aus dem ER verringern. Eine Ausnahme stellt auch hier TMBIM2/FAIM dar. Die mit TMBIM2 transfizierten HT22 Zellen zeigten keinen eindeutigen Schutz gegen das thapsigargininduzierte Zellsterben. Die Überexpression von FAIM2 führte zu einer geringen Steigerung des SOCE. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche mit Glutamat demonstrierten, dass BI-1 als einziges Protein dieser Familie in der Lage ist die Zellen vor glutamatinduziertem Zelltod durch ROS zu schützen. TMBIM2 und TMBIM4 hatten hingegen eine gesteigerte Zelltodrate durch Glutamat als die Kontrolle (EV). Diese Tatsache ist möglicherweise mit der fehlenden Interaktion zwischen TMBIM1-5 mit der Cytochrom P450 Oxidase zu erklären. Diese Interaktion wurde für BI-1 in anderen Studien (103) nachgewiesen. Durch die Interaktion mit P450 senkt BI-1 den oxidativen Stress. Oxidativer Stress ist die Ursache für die Apoptoseauslösung bei erhöhter Glutamatkonzentration. Die Proteine der BI-1-Familie haben einen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumhomöostase und das Zellsterben. Das Verständnis für die physiologischen Funktionen dieser Proteinfamilie könnte von medizinischer Relevanz

hinsichtlich der Diagnostik und Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson sein. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass BI-1 auch bei onkologischen Erkrankungen eine Rolle spielt und in Tumorzellen vermehrt exprimiert wird (65) (66) (66). Diese Hochregulation von BI-1 bewirkt eine geringere Zelltodrate dieser Zellen. Damit könnte BI-1 einen neuen diagnostischen und pharmakologischen Ansatz für die Therapie neoplastischer Erkrankungen liefern. Ebenfalls könnte auch die weitere Forschung an den BI-1-ähnlichen Proteinen zu neuen diagnostischen Verfahren und zu neuen pharmakologischen Ansätzen in der Onkologie und Neurologie beitragen.

Kritik an der Arbeit

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurde stets auf einen standardisierten Ablauf bei der Vorbereitung und Durchführung der einzelnen Versuche geachtet. Trotz aller Sorgfalt ließen sich die einzelnen Experimente nicht unter vollständig reproduzierbaren Voraussetzungen durchführen. So konnte die Zellzahl bei dem Ausplattieren der HT22 Zellen nur annähernd gleich sein, sodass die Zelldichte bei der Durchführung der Experimente nicht immer absolut identisch war. Die Gleichheit der Zellzahl konnte auch aufgrund der unterschiedlichen mitotischen Stadien der ausplattierten Zellen nicht vollständig gleich sein. Hinzu kam eine Vielzahl von schwer kontrollierbaren physikalischen Einflüssen wie die Lichteinstrahlung, die Temperatur, der Luftdruck und mechanischen Einwirkungen bei dem Transport der Zellen. Ebenfalls muss bedacht werden, dass die Transfektion der eukariotischen Zellen ein gravierender Eingriff in die Stoffwechselphysiologie der Zellen darstellte. Die transfizierten Zellen mussten bei der Überexpression der Proteine eine gewisse „Mehrarbeit“ im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen leisten und waren dadurch in ihrer Stoffwechselsituation nur bedingt mit nativen Zellen vergleichbar. In vitro Versuche stellen immer nur ein Modell dar und können nur teilweise mit den In vivo Experimenten verglichen werden. Desweiteren ist zu erwähnen, dass eine höhere Versuchszahl der einzelnen Experimente zu möglicherweise aussagekräftigeren Ergebnissen führen würde. Es müssten weiterführende Experimente mit den überexprimierenden Zellen durchgeführt werden, um die genauen intrazellulären Lokalisationen der BI-1-Familie zu bestimmen und so deren Funktion besser erklären zu können.

Anhang

Literatur und Quellenverzeichnis

1. Clapham DE. Calcium Signaling. *Cell*. 14. Dezember 2007;131(6):1047–58.
2. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*. 2008;60(9):575–590.
3. Iino M. Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci*. 2010;86(3):244–56.
4. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*. 1. August 1985;316(6027):440–3.
5. Bading H, Segal MM, Sucher NJ, Dudek H, Lipton SA, Greenberg ME. N-methyl-d-aspartate receptors are critical for mediating the effects of glutamate on intracellular calcium concentration and immediate early gene expression in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*. Februar 1995;64(3):653–64.
6. Jonas P, Burnashev N. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron*. November 1995;15(5):987–90.
7. Decrock E, De Bock M, Wang N, Gadicherla AK, Bol M, Delvaeye T, u. a. IP₃, a small molecule with a powerful message. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [Internet]. [zitiert 16. März 2013]; Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488912003941>
8. Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends in Neurosciences*. 1. Februar 2000;23(2):80–8.
9. Putney JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. Februar 1986;7(1):1–12.
10. Targos B, Barańska J, Pomorski P. Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(2):397–409.
11. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 28. Januar 1993;361(6410):315–25.
12. Putney JW Jr. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol*. 9. Mai 2005;169(3):381–2.
13. Matsumoto M, Baba Y. Role of STIM-dependent Ca²⁺ Influx in Regulatory B Cells. *Yakugaku Zasshi*. 2013;133(4):419–25.
14. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23. August 2012;13(9):549–65.
15. Cheng KT, Liu X, Ong HL, Swaim W, Ambudkar IS. Local Ca²⁺ Entry Via Orail1 Regulates Plasma Membrane Recruitment of TRPC1 and Controls Cytosolic Ca²⁺

- Signals Required for Specific Cell Functions. PLoS Biol [Internet]. März 2011 [zitiert 11. April 2013];9(3). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3050638/>
16. Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, u. a. STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell*. 6. März 2009;136(5):876–90.
 17. Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM Reconstitute Store-operated Calcium Channel Function. *J Biol Chem*. 28. Juli 2006;281(30):20661–5.
 18. Karlstad J, Sun Y, Singh BB. Ca²⁺ Signaling: An Outlook on the Characterization of Ca²⁺ Channels and Their Importance in Cellular Functions. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:143–57.
 19. Sammels E, Parys JB, Missiaen L, De Smedt H, Bultynck G. Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: A dynamic equilibrium. *Cell Calcium*. April 2010;47(4):297–314.
 20. Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol*. Dezember 2003;5(12):1041–3.
 21. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. August 1972;26(4):239–57.
 22. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol*. 1990;181(3):195–213.
 23. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 12. Oktober 2000;407(6805):770–6.
 24. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*. 1991;7:663–98.
 25. Peixoto PM, Lue JK, Ryu S-Y, Wroble BN, Sible JC, Kinnally KW. Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel (MAC) Function Triggers a Bax/Bak-Dependent Bystander Effect. *The American Journal of Pathology*. Januar 2011;178(1):48–54.
 26. Wozniak AL, Wang X, Stieren ES, Scarbrough SG, Elferink CJ, Boehning D. Requirement of biphasic calcium release from the endoplasmic reticulum for Fas-mediated apoptosis. *J Cell Biol*. 12. April 2006;175(5):709–14.
 27. Nickel N, Cleven A, Enders V, Lisak D, Schneider L, Methner A. Androgen-inducible gene 1 increases the ER Ca²⁺ content and cell death susceptibility against oxidative stress. *Gene*. 15. Juli 2016;586(1):62–8.
 28. Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol*. März 2000;2(3):E41–43.

29. Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium*. September 2011;50(3):211–21.
30. Pinton P, Romagnoli A, Rizzuto R, Giorgi C. Ca²⁺ Signaling, Mitochondria and Cell Death. *Current Molecular Medicine*. 1. März 2008;8(2):119–30.
31. Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14. Dezember 2004;101(50):17404–9.
32. Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl KS, Roderick HL, Bootman MD, u. a. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol*. 19. Juli 2004;166(2):193–203.
33. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Letters*. 21. Januar 2000;466(1):6–10.
34. Cory S, Huang DCS, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 2003;22(53):8590–607.
35. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*. 1. Januar 2001;26(1):61–6.
36. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, u. a. BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. *Science*. 4. April 2003;300(5616):135–9.
37. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 30. November 1984;226(4678):1097–9.
38. Pinton P, Ferrari D, Magalhães P, Schulze-Osthoff K, Virgilio FD, Pozzan T, u. a. Reduced Loading of Intracellular Ca²⁺ Stores and Downregulation of Capacitative Ca²⁺Influx in Bcl-2–Overexpressing Cells. *J Cell Biol*. 3. Juni 2000;148(5):857–62.
39. Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, u. a. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23. Mai 2000;97(11):5723–8.
40. Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF, u. a. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 5. Januar 2006;290(5):C1399–410.
41. Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*. Dezember 2000;32(6):609–15.

42. Demin OV, Kholodenko BN, Skulachev VP. A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol Cell Biochem.* Juli 1998;184(1–2):21–33.
43. Pappolla MA, Omar RA, Chyan YJ, Ghiso J, Hsiao K, Bozner P, u. a. Induction of NADPH cytochrome P450 reductase by the Alzheimer beta-protein. Amyloid as a „foreign body“. *J Neurochem.* Juli 2001;78(1):121–8.
44. Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohé L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Letters.* 15. Mai 1974;42(1):68–72.
45. Radosavljević T, Mladenović D, Vučević D. [The role of oxidative stress in alcoholic liver injury]. *Med Pregl.* Dezember 2009;62(11–12):547–53.
46. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews.* Mai 2005;4(2):288–314.
47. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine.* 1. Juni 2001;30(11):1191–212.
48. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine.* Februar 2009;30(1–2):1–12.
49. Albrecht P, Lewerenz J, Dittmer S, Noack R, Maher P, Methner A. Mechanisms of Oxidative Glutamate Toxicity: The Glutamate/Cystine Antiporter System xc⁻ as a Neuroprotective Drug Target. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 1. Juli 2010;9(3):373–82.
50. Li Y, Maher P, Schubert D. Requirement for cGMP in Nerve Cell Death Caused by Glutathione Depletion. *J Cell Biol.* 12. Januar 1997;139(5):1317–24.
51. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007;39(1):44–84.
52. Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine.* 1. März 2010;48(5):629–41.
53. Rasmussen U, Brøgger Christensen S, Sandberg F. Thapsigargin and thapsigargin, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta Pharm Suec.* 1978;15(2):133–40.
54. Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drøbak BK, u. a. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions.* April 1989;27(1–2):17–23.
55. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in

- the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1. Oktober 1993;53(19):4701–14.
56. Zong W-X, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu Q-C, Yuan J, u. a. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 7. Juli 2003;162(1):59–69.
 57. Viana RJS, Nunes AF, Rodrigues CMP. Endoplasmic reticulum enrollment in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* Oktober 2012;46(2):522–34.
 58. Xu Q, Reed JC. Bax Inhibitor-1, a Mammalian Apoptosis Suppressor Identified by Functional Screening in Yeast. *Molecular Cell.* Februar 1998;1(3):337–46.
 59. Robinson KS, Clements A, Williams AC, Berger CN, Frankel G. Bax inhibitor 1 in apoptosis and disease. *Oncogene.* 26. Mai 2011;30(21):2391–400.
 60. Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* Oktober 1990;9(10):3153–62.
 61. Westphalen BC, Wessig J, Leyboldt F, Arnold S, Methner A. BI-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* 14. Januar 2005;12(3):304–6.
 62. Chae H-J, Ke N, Kim H-R, Chen S, Godzik A, Dickman M, u. a. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene.* 24. Dezember 2003;323:101–13.
 63. Lisbona F, Rojas-Rivera D, Thielen P, Zamorano S, Todd D, Martinon F, u. a. BAX Inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1? *Mol Cell.* 27. März 2009;33(6):679–91.
 64. Kim H-R, Lee G-H, Cho EY, Chae S-W, Ahn T, Chae H-J. Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. *J Cell Sci.* 15. April 2009;122(8):1126–33.
 65. Schmits R, Cochlovius B, Treitz G, Regitz E, Ketter R, Preuss K-D, u. a. Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer.* 1. März 2002;98(1):73–7.
 66. Grzmil M, Thelen P, Hemmerlein B, Schweyer S, Voigt S, Mury D, u. a. Bax Inhibitor-1 Is Overexpressed in Prostate Cancer and Its Specific Down-Regulation by RNA Interference Leads to Cell Death in Human Prostate Carcinoma Cells. *The American Journal of Pathology.* August 2003;163(2):543–52.
 67. Schmidt SM, König T, Bringmann A, Held S, von Schwarzenberg K, Heine A, u. a. Characterization of BAX inhibitor-1 as a novel leukemia-associated antigen. *Leukemia.* 16. Juli 2009;23(10):1818–24.
 68. Chae H-J, Kim H-R, Xu C, Bailly-Maitre B, Krajewska M, Krajewski S, u. a. BI-1 Regulates an Apoptosis Pathway Linked to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Cell.* 13. August 2004;15(3):355–66.

69. Bailly-Maitre B, Bard-Chapeau E, Luciano F, Droin N, Bruey J-M, Faustin B, u. a. Mice Lacking bi-1 Gene Show Accelerated Liver Regeneration. *Cancer Res.* 15. Februar 2007;67(4):1442–50.
70. Monaco G, Beckers M, Ivanova H, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, u. a. Profiling of the Bcl-2/Bcl-XL-binding sites on type 1 IP3 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 9. November 2012;428(1):31–5.
71. Bailly-Maitre B, Fondevila C, Kaldas F, Droin N, Luciano F, Ricci J-E, u. a. Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 21. Februar 2006;103(8):2809–14.
72. Bultynck G, Kiviluoto S, Henke N, Ivanova H, Schneider L, Rybalchenko V, u. a. The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca²⁺-permeable channel pore. *J Biol Chem.* 20. Januar 2012;287(4):2544–57.
73. Rojas-Rivera D, Armisén R, Colombo A, Martínez G, Eguiguren AL, Díaz A, u. a. TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis. *Cell Death Differ.* Juni 2012;19(6):1013–26.
74. Stables J, Green A, Marshall F, Fraser N, Knight E, Sautel M, u. a. A Bioluminescent Assay for Agonist Activity at Potentially Any G-Protein-Coupled Receptor. *Analytical Biochemistry.* 1. Oktober 1997;252(1):115–26.
75. Kiviluoto S, Luyten T, Schneider L, Lisak D, Rojas-Rivera D, Welkenhuyzen K, u. a. Bax Inhibitor-1-mediated Ca²⁺ leak is decreased by cytosolic acidosis. *Cell Calcium.* September 2013;54(3):186–92.
76. Yamaji T, Nishikawa K, Hanada K. Transmembrane BAX Inhibitor Motif Containing (TMBIM) Family Proteins Perturbs a trans-Golgi Network Enzyme, Gb3 Synthase, and Reduces Gb3 Biosynthesis. *J Biol Chem.* 12. November 2010;285(46):35505–18.
77. Zhao H, Ito A, Kimura SH, Yabuta N, Sakai N, Ikawa M, u. a. RECS1 deficiency in mice induces susceptibility to cystic medial degeneration. *Genes & Genetic Systems.* 2006;81(1):41–50.
78. Fernández M, Segura MF, Solé C, Colino A, Comella JX, Ceña V. Lifeguard/neuronal membrane protein 35 regulates Fas ligand-mediated apoptosis in neurons via microdomain recruitment. *Journal of Neurochemistry.* 2007;103(1):190–203.
79. Shukla S, Fujita K, Xiao Q, Liao Z, Garfield S, Srinivasula SM. A shear stress responsive gene product PP1201 protects against Fas-mediated apoptosis by reducing Fas expression on the cell surface. *Apoptosis.* 1. Februar 2011;16(2):162–73.
80. Schweitzer B, Taylor V, Welcher AA, McClelland M, Suter U. Neural Membrane Protein 35 (NMP35): A Novel Member of a Gene Family Which Is Highly

- Expressed in the Adult Nervous System. *Molecular and Cellular Neuroscience*. August 1998;11(5–6):260–73.
81. Carrara G, Saraiva N, Gubser C, Johnson BF, Smith GL. Six-transmembrane Topology for Golgi Anti-apoptotic Protein (GAAP) and Bax Inhibitor 1 (BI-1) Provides Model for the Transmembrane Bax Inhibitor-containing Motif (TMBIM) Family. *J Biol Chem*. 5. April 2012;287(19):15896–905.
 82. Gubser C, Bergamaschi D, Hollinshead M, Lu X, van Kuppeveld FJM, Smith GL. A New Inhibitor of Apoptosis from Vaccinia Virus and Eukaryotes. *PLoS Pathog*. 23. Februar 2007;3(2):e17.
 83. Mattia F de, Gubser C, Dommelen MMT van, Visch H-J, Distelmaier F, Postigo A, u. a. Human Golgi Antiapoptotic Protein Modulates Intracellular Calcium Fluxes. *Mol Biol Cell*. 15. August 2009;20(16):3638–45.
 84. Reimers K. The Growth-hormone inducible transmembrane protein (Ghitm) belongs to the Bax inhibitory protein-like family. *International Journal of Biological Sciences*. 2007;471–6.
 85. Oka T, Sayano T, Tamai S, Yokota S, Kato H, Fujii G, u. a. Identification of a Novel Protein MICS1 that is Involved in Maintenance of Mitochondrial Morphology and Apoptotic Release of Cytochrome c. *Mol Biol Cell*. 6. Januar 2008;19(6):2597–608.
 86. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*. Januar 2002;20(1):87–90.
 87. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 25. März 1985;260(6):3440–50.
 88. Somia NV, Schmitt MJ, Vetter DE, Van Antwerp D, Heinemann SF, Verma IM. LFG: an anti-apoptotic gene that provides protection from Fas-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 26. Oktober 1999;96(22):12667–72.
 89. Besirli CG, Zheng Q-D, Reed DM, Zacks DN. ERK-Mediated Activation of Fas Apoptotic Inhibitory Molecule 2 (Faim2) Prevents Apoptosis of 661W Cells in a Model of Detachment-Induced Photoreceptor Cell Death. *PLoS ONE*. 28. September 2012;7(9):e46664.
 90. Reich A, Spering C, Gertz K, Harms C, Gerhardt E, Kronenberg G, u. a. Fas/CD95 Regulatory Protein Faim2 Is Neuroprotective after Transient Brain Ischemia. *J Neurosci*. 1. Mai 2011;31(1):225–33.
 91. Kumar KN, Tilakaratne N, Johnson PS, Allen AE, Michaelis EK. Cloning of cDNA for the glutamate-binding subunit of an NMDA receptor complex. *Nature*. 7. November 1991;354(6348):70–3.

92. Tachikawa K, Sasaki S, Maeda T, Nakajima K. Identification of molecules preferentially expressed beneath the marginal zone in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res.* Februar 2008;60(2):135–46.
93. Kiviluoto S, Schneider L, Luyten T, Vervliet T, Missiaen L, De Smedt H, u. a. Bax Inhibitor-1 is a novel IP3 receptor-interacting and -sensitizing protein. *Cell Death Dis.* August 2012;3(8):e367.
94. Henke N, Lisak DA, Schneider L, Habicht J, Pergande M, Methner A. The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell Calcium.* September 2011;50(3):251–60.
95. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* Mai 2000;6(5):513–9.
96. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* November 2001;3(11):E255–63.
97. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* Mai 2000;6(5):513–9.
98. Giorgi C, Baldassari F, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, u. a. Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis. *Cell Calcium.* Juli 2012;52(1):36–43.
99. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* September 2010;11(9):621–32.
100. Monaco G, Decrock E, Akl H, Ponsaerts R, Vervliet T, Luyten T, u. a. Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-Xl. *Cell Death Differ.* Februar 2012;19(2):295–309.
101. Li C, Wang X, Vais H, Thompson CB, Foskett JK, White C. Apoptosis regulation by Bcl-xL modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24. Juli 2007;104(30):12565–70.
102. Nutt LK, Chandra J, Pataer A, Fang B, Roth JA, Swisher SG, u. a. Bax-mediated Ca²⁺ Mobilization Promotes Cytochrome c Release during Apoptosis. *J Biol Chem.* 6. Juli 2002;277(23):20301–8.
103. Bultynck G, Kiviluoto S, Methner A. Bax Inhibitor-1 Is Likely a pH-Sensitive Calcium Leak Channel, Not a H⁺/Ca²⁺ Exchanger. *Sci Signal.* 16. September 2014;7(343):pe22-pe22.

Mein besonderer Dank für die kompetente und freundliche Unterstützung während der Laborarbeit geht an Andrea Isberner, die keine Zeit und Mühe gescheut hat, mir den Umgang mit den Zellkulturen und den Chemikalien zu lehren. Weiterhin ein großer Dank für die Einführung in die Arbeit mit dem BD-Pathway und den erhobenen Datensätzen geht an meinen Betreuer Dr. rer. nat. Dmitrij Lisak. Für die spezielle biochemische Anleitung bei der Transfektion von Zellen möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Theresa Schacht bedanken.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Prof. Dr. med. Axel Methner für die Vergabe und Betreuung meiner Doktorarbeit.

Danke auch an meine liebe Ehefrau Sandra für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die moralische Unterstützung.

Danke an meine liebe Familie für die Unterstützung während des gesamten Medizinstudiums!