

SGK1 und Akt abhängige Stimulation des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms in Tumorzellen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Sebastian Schmidt
aus Gera

Tübingen
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

17.11.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Florian Lang

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
1 EINLEITUNG.....	12
1.1 KALZIUM	12
1.2 Ca^{2+} -HOMÖOSTASE.....	15
1.2.1 Ca^{2+} -Einstrom („An“-Prozesse).....	15
1.2.2 Ca^{2+} -Ausstrom („Aus“-Prozesse).....	16
1.3 SPEICHERABHÄNGIGER Ca^{2+} -EINSTROM (SOCE).....	17
1.3.1 Funktionsweise	19
1.3.2 STIM	21
1.3.3 Orai.....	22
1.4 SGK1	24
1.5 TGF-B	26
1.6 AKT/PKB.....	27
1.7 APOPTOSE.....	29
1.8 ZIELSETZUNG	31
2 MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 MATERIAL	32
2.1.1 Chemikalien und Gebrauchslösungen	32
2.1.2 Gebrauchsgüter.....	33
2.1.3 Geräte	34
2.1.4 Software.....	35
2.1.5 Fertigsets	35
2.1.6 Zellkulturmedien und -lösungen.....	35
2.1.7 Antikörper	35
2.1.7.1 Primäre Antikörper.....	35
2.1.7.2 Sekundäre Antikörper	36
2.1.8 Oligonukleotide	36
2.1.9 Lösungen/Puffer	37
2.2 METHODEN	39
2.2.1 Zell- und molekularbiologische Methoden	39
2.2.1.1 Zellkultur.....	39
2.2.1.2 Zelllyse.....	39
2.2.1.3 Transfektion	39

2.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	40
2.2.1.5	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.1.6	Western Blot.....	41
2.2.1.7	Proteindetektion	41
2.2.1.8	Immunfluoreszenz-Messung	41
2.2.1.9	RNA-Isolation	42
2.2.1.10	cDNA-Synthese.....	43
2.2.1.11	Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	43
2.2.2	Funktionelle Methoden.....	44
2.2.2.1	Ca ²⁺ -Messung.....	44
2.2.2.2	Durchflusszytometrie (FACS) / Apoptose	45
2.2.3	Statistische Auswertung	45
3	ERGEBNISSE.....	46
3.1	AKT-ABHÄNGIGE REGULATION DES SPEICHERABHÄNGIGEM CA ²⁺ - EINSTROMS (SOCE) IN OVARIALKARZINOMZELLEN	46
3.1.1	Bestimmung der SGK1 und Akt/PKB Proteinlevel	46
3.1.2	Bestimmung der mRNA-Level von Orai1 und STIM1	47
3.1.3	Bestimmung der Proteinlevel von Orai1 und STIM1.....	48
3.1.4	Untersuchung von Orai1 in der Plasmamembran.....	49
3.1.5	Bestimmung von SOCE und I _{CRAC}	50
3.1.6	Einfluss des Orai1-Inhibitors 2-APB und des Akt/PKB-Inhibitors SH-6 auf SOCE und I _{CRAC}	52
3.1.7	Einfluss des SGK1-Inhibitors EMD638683 auf SOCE und I _{CRAC}	53
3.1.8	Einfluss der Transfektion therapiesensitiver A2780 Ovarialkarzinomzellen mit aktiver – und inaktiver Akt/PKB auf den speicherabhängigen Ca ²⁺ -Einstrom....	55
3.1.9	Einfluss des Orai1-Inhibitors 2-APB und des Akt/PKB-Inhibitors SH-6 auf die Behandlung mit cis-Platin	56
3.1.10	Bestimmung der NCKX-Aktivität und Einfluss des Akt-Inhibitors SH-6.....	59
3.1.11	Einfluss des NF-κB-Inhibitors Wogonin auf SOCE und I _{CRAC}	60
3.2	SGK1-ABHÄNGIGE REGULATION DES SPEICHERABHÄNGIGEM CA ²⁺ - EINSTROMS (SOCE) IN HUMANEN ENDOMETRIUM ISHIKAWA-ZELLEN.	62
3.2.1	Proteinlevel von Orai1 in humanem Endometrium.....	62
3.2.2	Einfluss der Transfektion mit einer konsequent aktiven SGK1 Isoform und einer dominant negativen SGK1 Isoform auf die Proteinlevel von Orai1	64
3.2.3	Einfluss von 2-APB auf SOCE und I _{CRAC} in transfizierten Zellen	65
3.2.4	Einfluss von Dexamethason auf SOCE und I _{CRAC}	67
3.2.5	Einfluss von TGFβ1 auf die mRNA-Level von SGK1	68
3.2.6	Einfluss von TGFβ1 auf die Orai1-Proteinlevel.....	68
3.2.7	Einfluss von TGFβ1 auf SOCE und I _{CRAC}	69
3.2.8	Einfluss des SGK1-Inhibitors EMD638683 auf den SOCE und I _{CRAC} von mit TGFβ1 behandelten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen	70

4 DISKUSSION	72
4.1 AKT/PKB-ABHÄNGIGE THERAPIERESISTENZ VON A2780CIS OVARIALKARZINOMZELLEN.....	72
4.2 TGFB-ABHÄNGIGE SGK1-SENSITIVE REGULATION DES SPEICHERABHÄNGIGEM CA ²⁺ -EINSTROMS IN HUMANEN ENDOMETRIUM ISHIKAWA-ZELLEN.....	76
5 ZUSAMMENFASSUNG	79
6 LITERATURVERZEICHNIS	81
ERKLÄRUNG	XCVII
PUBLIKATIONEN	XCVIII
DANKSAGUNG	C

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1 Die Regulation von zellulären Ca²⁺-Ionen (modifiziert nach Carafoli 2003)..... 14

Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Aktivierung des CRAC-Kanals (Hogan et al. 2010; J. P. Yuan, Zeng, et al. 2009b) 20

Abb. 1-3 Domänenarchitektur von humanem STIM1 (Stathopoulos et al. 2013) 21

Abb. 1-4 Modell von Orai1 in der Plasmamembran (Putney 2010) 23

Abb. 1-5 2D Darstellung einer hexamerischen Orai1 Pore (Fahrner et al. 2014)..... 24

Abb. 1-6 NF-κB Signaling Pathways (Hayden & Ghosh 2008) 26

Abb. 1-7 TGF-β Signaltransduktion (Massagué 2008)..... 27

Abb. 1-8 Extrinsisch und intrinsisch ausgelöste Apoptose (Chipuk & Green 2005)..... 29

Abb. 2-1 Messung des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms 44

Abb. 2-2 Messung der NCKX-Aktivität 45

Abb. 3-1 Proteinlevel von SGK1 und phospho-SGK1 sowie Akt/PKB und phospho-Akt/PKB in therapiesensitiven und therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen 47

Abb. 3-2 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in therapieresistenten- und therapiesensitiven Ovarialkarzinomzellen 48

Abb. 3-3 Bestimmung der Proteinlevel von Orai1 und STIM1 in therapiesensitiven und therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen 49

Abb. 3-4 Immunfluoreszenz von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (links) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (rechts) nach Orai1-selektiver FITC- Antikörpermarkierung (grün). 50

Abb. 3-5 Intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung und speicherabhängiger Ca²⁺-Einstrom (SOCE) in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen 51

Abb. 3-6 Effekt des Orai1-Inhibitors 2-APB und des Akt/PKB-Inhibitors SH-6 auf die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung und den speicherabhängiger Ca²⁺-Einstrom von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen 53

Abb. 3-7 Effekt des SGK1-Inhibitors EMD638683 auf die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung und den speicherabhängiger Ca²⁺- Einstrom (SOCE) in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen . 54

Abb. 3-8 Intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung und speicherabhängiger Ca²⁺-Einstrom (SOCE) in mit aktiver Akt-Isoform oder inaktiver Akt-Isoform transfizierten therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen 55

Abb. 3-9 Effekt des SOCE-Inhibitors 2-APB auf die cis-Platin induzierte Apoptose von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen 57

Abb. 3-10 Effekt des Akt-Inhibitors SH-6 auf die cis-Platin induzierte Apoptose von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen 58

Abb. 3-11 NCKX-Aktivität von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen und Effekt des Akt-Inhibitors SH-6 auf therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen	60
Abb. 3-12 Effekt des NF-κB-Inhibitors Wogonin auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung und speicherabhängiger Ca ²⁺ -Einstrom (SOCE) in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen .	61
Abb. 3-13 Proteinlevel von Orail in humanem Endometrium	63
Abb. 3-14 Proteinlevel von Orail in transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa Zellen	64
Abb. 3-15 Intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung, SGK1 sensitiver speicherabhängiger Ca ²⁺ -Einstrom (SOCE) und dessen Inhibierung durch 2-APB in transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen.....	66
Abb. 3-16 Dexamethason-sensitive intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung und speicherabhängiger Ca ²⁺ -Einstrom (SOCE) in humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen.....	67
Abb. 3-17 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von SGK1 in mit TGFβ1 behandelten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen.....	68
Abb. 3-18 TGFβ1 sensitive Orail Proteinexpression in humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen.....	69
Abb. 3-19 TGFβ1-sensitive intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung und speicherabhängiger Ca ²⁺ -Einstrom (SOCE) in humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen	70
Abb. 3-20 Effekt der Behandlung mit dem SGK1-Inhibitor EMD 638683 auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Freisetzung und den TGFβ1 sensitiven speicherabhängiger Ca ²⁺ -Einstrom (SOCE)	71
Abb. 4-1 Regulierung des speicherabhängigen Ca ²⁺ -Einstroms (SOCE) in a) humanen Endometrium Ishikawa und b) humanen Ovarialkarzinom Zellen	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose induzierender Faktor
ANT	Adenin Nukleotid Translokator
Apaf-1	Apoptose Protease aktivierenden Faktor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauelement (engl.: charge-coupled device)
CRAC	Ca ²⁺ -Freisetzung aktiviertes Ca ²⁺ (engl.: Ca ²⁺ -release activated Ca ²⁺)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)
InsP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
NC(K)X	Na ⁺ /Ca ²⁺ -(K ⁺)-Austauscher (engl.: exchanger)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaktion)
PI3	Phosphatidylinositol 3
PKB	Protein-Kinase B
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PTP	Permeabilitäts-Durchgangspore (engl.: permeability transition pore)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RKI	Robert Koch-Institut

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt (engl.: severe combined immune deficiency)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SERCA	Sarcoplasmatische/Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase
SGK	Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase
SOCE	Speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (engl.: store operated Ca^{2+} -entry)
SR	Sarcoplasmatisches Retikulum
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (engl.: tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
WHO	Weltgesundheitsorganisation (eng.: world health organisation)

1 EINLEITUNG

*„Wenn eine Krankheit zum Verzweifeln wuchs,
Kann ein verzweifelt Mittel nur noch retten
Und weiter keins.“ (Hamlet, William Shakespeare)*

Im Jahr 2015 werden mehr als acht Millionen Menschen auf der Erde an Krebs sterben. In Deutschland wird eine von drei Frauen und einer von zwei Männern in seinem Leben eine Krebserkrankung erleiden. Ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland und circa 15 Prozent weltweit werden die Folge von Krebserkrankungen sein (WHO und RKI).

Wir wissen heute, dass Krebs eine Krankheit ist, die durch spezifische DNA-Mutationen entsteht, und durch unkontrolliertes und ungehindertes Wachstum einer einzelnen Zelle entfacht und vorangetrieben wird. In einer gesunden Zelle regulieren kontrollierte, genetische Mechanismen die Zellteilung und erlauben unserem Organismus zu wachsen, sich anzupassen, sich zu erholen und sich zu reparieren. In Krebszellen hingegen sind diese Abläufe gestört. Krebszellen passen sich besser an, sie erholen und reparieren sich schneller und wachsen unaufhaltsam. Krebszellen sind auf eine abnorme Art und Weise, die bessere Version einer gesunden Zelle. Es ist eine Ironie des Schicksals, dass eines der größten Bestrebungen des Menschen, das Streben nach einem möglichst langen Leben bis hin zur Unsterblichkeit so sehr den Bestrebungen einer Krebszelle gleicht. Deren Auftreten quasi intrinsisch mit dem Alter verbunden ist, welches mit zunehmenden Jahren die größte Determinante für malignes Zellwachstum darstellt. Die Abgrenzung zwischen malignem und physiologischem Wachstum, die beide genetisch eng miteinander verbunden sind, ist eine der entscheidenden wissenschaftlichen Aufgaben der Zukunft, und Signaltransduktion über Ca^{2+} -Ionen eine der wichtigsten Ansatzpunkte diese Verflechtung zu entwirren.

1.1 KALZIUM

Kontrolle ist das Prinzip des Lebens. Die Möglichkeit Kompartimente in Form einer Membran voneinander abzugrenzen war die Geburtsstunde der Zelle und der erste Schritt in der unendlich währenden Geschichte der biologischen Evolution. Diese ersten Vertreter des „Lebens“ entstanden im Ur-Ozean zu einer Zeit, in welcher die Ca^{2+} -Konzentration im Wasser zwar nicht mit Sicherheit bekannt ist, nach Stand des heutigen Wissens allerdings sehr niedrig vermutet wird, in etwa im Bereich von 100 nM (Kazmierczak et al. 2013). Ein

Wert, der ziemlich genau die Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) der heutigen Zelle widerspiegelt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration pro- und eukaryotischer Zellen in etwa der Ca^{2+} -Konzentration der Ursuppe entspricht. Das Auswaschen von Ca^{2+} -Ionen aus der Erdkruste führte anschließend zu einem kontinuierlichen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Meerwasser und initiierte die Evolution eines Ca^{2+} -Homöostase-Systems mit Kanälen, Transportern und Ca^{2+} -bindenden Proteinen. Da hohe Ca^{2+} -Konzentrationen Phosphat präzipitieren, welches für die Energieversorgung der Zelle lebensnotwendig ist, muss der Ca^{2+} -Spiegel im Gegensatz zur intrazellulären Konzentrationen anderer bivalenter Ionen stets niedrig gehalten werden. Die Evolution hat aus der Not eine Tugend gemacht und die Zelle nutzt die hohe Ca^{2+} -Konzentration der Umgebung heute in unterschiedlichen Ausprägungen zur Signaltransduktion. Ionisiertes Kalzium ist der am weitesten verbreitete Signalgeber in Zellen und doch so einzigartig und vielseitig wie kein zweites Signalmolekül. Es kontrolliert die Entstehung von Zellen bei der Befruchtung, leitet sie von der Jugend bis zum Alter und unterstützt sie bei ihrem Tod. Neben Phosphat-Ionen (PO_4^-) sind Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) der entscheidende Faktor für zahlreiche zelluläre Prozesse wie Zellteilung, Proliferation, Migration, Sekretion, Muskelkontraktion, Metabolismus, neuronale Erregbarkeit und Apoptose (Berridge et al. 2003). Von circa 1400 Gramm Kalzium in unserem Körper, befinden sich dabei nur 10 Gramm nicht in unseren Zähnen oder Knochen und doch ist gerade dieser Teil von außerordentlicher Bedeutung. Die Eigenschaften von positiv geladenen Kalzium- und negativ geladenen Phosphat-Ionen, lokale, elektrostatische Felder und Proteinkonformationen zu ändern, sind die beiden universellen Werkzeuge der Signaltransduktion (Clapham 2007). Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ruhender Zellen beträgt etwa 50-100 nM und ist damit circa um den Faktor 2×10^4 niedriger als die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von rund 2 mM (Clapham 2007). Da ionisiertes Kalzium im Gegensatz zu komplexen Molekülen nicht chemisch verändert werden kann, bindet, kompartimentalisiert und entfernt es die Zelle über zahlreiche Puffer, Pumpen und Austauscher. Dadurch wird der enorme Konzentrationsgradient aufrecht erhalten, den es benötigt die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der Zelle in kürzester Zeit bis auf das 10fache (1 μM) ansteigen zu lassen (Berridge et al. 2003). Das allerdings allein der Anstieg der Konzentration eines einzigen Ions in der Lage ist eine derartige Menge unterschiedlicher Prozesse zu steuern, ist erstaunlich. Dieses Phänomen fußt auf der Vielseitigkeit der Ca^{2+} -Signaltransduktion. Unterschiede in Geschwindigkeit, Amplitude, Dauer, Frequenz und räumlicher Ausdehnung des $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstiegs führen zu unterschiedlicher Signalverarbeitung. Dabei ist die Sende- und Empfängerausstattung der Zelle ihren physiologischen Aufgaben

angepasst. Herzmuskelzellen zum Beispiel bedürfen eines schnellen (ms) und globalen Anstiegs der Ca^{2+} -Konzentration, um Kontraktionen auszulösen (Bers 2002). Elektrisch nicht erregbare Zellen hingegen können Ca^{2+} -Oszillationen aufweisen, die mehrere Sekunden dauern und periodisch im Abstand von Minuten auftreten, um so Gen-Expression und Zellmetabolismus zu steuern (Dupont et al. 2011). Die gesamte Ca^{2+} -Signaltransduktion besteht im Wesentlichen aus dem Zusammenspiel zweier gegensätzlicher Mechanismen. Auf der einen Seite befinden sich alle Prozesse, welche die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöhen („An“-Prozesse) und auf der anderen alle die, die freie Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma entfernen („Aus“-Prozesse) (Berridge et al. 2000) (siehe Abb. 1-1).

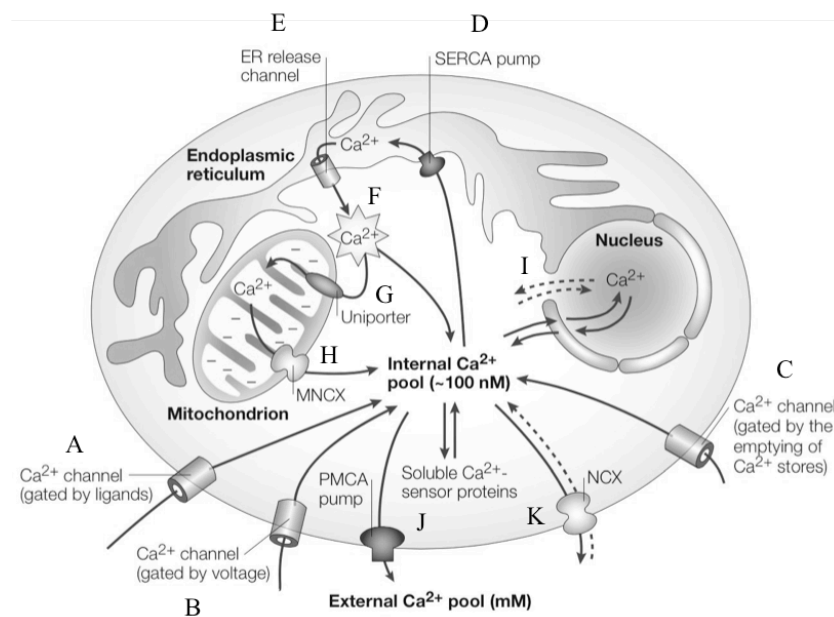


Abb. 1-1 Die Regulation von zellulären Ca^{2+} -Ionen (modifiziert nach Carafoli 2003)

Die Aufgabe Ca^{2+} -Ionen von außen über die Zellmembran ins Zellinnere zu transportieren bewerkstelligen in erster Linie drei verschiedene Arten von Kanälen. Je nach Öffnungsmechanismus unterscheidet man Ca^{2+} -Einstrom über Ionenkanal-Rezeptoren (A) (engl.: receptor operated channel, ROC), spannungsgesteuerte Kanäle (B) (engl.: voltage gated (operated) channels, VG(O)C) und speicherabhängige Ca^{2+} -Kanäle (C) (engl.: store operated Ca^{2+} -channel, SOC). In der Zelle wird die Ca^{2+} -Konzentration durch verschiedene Sensoren, Puffer und durch Ca^{2+} -Einstrom in unterschiedliche Organellen reguliert. In das endoplasmatische Retikulum (ER) oder sarko(endo)plasmatisches Retikulum (SR) (Muskelzellen), den wichtigsten intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, gelangen die Ca^{2+} -Ionen aktiv über die sarko(endo)plasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (D) (SERCA). Gesteuert durch Ca^{2+} -Ionen selbst oder andere sekundäre Botenstoffe wie InsP_3 , werden Ca^{2+} -Ionen vor allem über InsP_3 - und RyR-Kanäle (E) wieder aus dem ER entlassen. Die so entstehenden lokal begrenzten Regionen mit hoher Ca^{2+} -Konzentration (F) bewirken eine Signaltransduktion über nahegelegene Sensor- und Empfänger-moleküle und aktivieren einen Ca^{2+} -Einstrom in benachbarte Mitochondrien. Als wichtiges Puffersystem mit vermuteter Signalfunktion können diese hohe Konzentrationen an Ca^{2+} -Ionen schnell über einen Uniporter (G) aufnehmen und anschließend relativ langsam über den mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (H) (engl.: mitochondrial N a^+/C a^{2+} -exchanger, MNCX) wieder freisetzen. Auch über den Zellkern (I) können Ca^{2+} -Ionen ausgetauscht werden. Die Kernhülle teilt sich als natürliches Ca^{2+} -Reservoir Transporter und Kanäle mit dem ER. Zusätzlich wird auch ein Ca^{2+} -Austausch über Kernporen diskutiert (gepunktete Linien). Ca^{2+} -Ionen verlassen die Zelle über membranständige Ca^{2+} -ATPasen (J) (PMCA) mit hoher Affinität und niedriger Kapazität und über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (K) (NCX) mit niedriger Affinität und hoher Kapazität. Unter bestimmten Umständen können über diesen Austauscher auch Ca^{2+} -Ionen in die Zelle gelangen (gepunktete Linie).

1.2 Ca^{2+} -HOMÖOSTASE

1.2.1 Ca^{2+} -Einstrom („An“ Prozesse)

In der Zellmembran und den Membranen verschiedener Organellen finden sich mehrere Ca^{2+} -Kanäle, die für den Transport über Membranen verantwortlich sind. Dabei wird zwischen dem Transport aus dem Extrazellularraum und dem Transport aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern unterschieden.

Kanäle, die für den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum verantwortlich sind, lassen sich nach ihrem Aktivierungsmechanismus charakterisieren (Berridge et al. 2000; Berridge et al. 2003). Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (engl.: voltage operated Ca²⁺-channels, VOCCs) kommen vor allem in erregbaren Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen vor und werden durch Depolarisation der Zellmembran aktiviert. Rezeptor-gesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (engl.: receptor operated Ca²⁺-channels, ROCCs) werden durch verschiedene Agonisten (z.B. ATP, Glutamat oder Acetylcholin) aktiviert und kommen vor allem in sekretorischen Zellen vor. Ca^{2+} -Kanäle die durch interne, sekundäre Signalmoleküle (z.B. Arachidonsäure) aktiviert werden, bezeichnet man als SMOCs (engl.: second messenger operated channels) (Meldolesi & Pozzan 1987). Mechanisch aktivierte Ca^{2+} -Kanäle, wie in den Epithelzellen der Trachea, reagieren auf Deformation der Zelle (Boitano et al. 1992) und speicherabhängige Ca^{2+} -Kanäle (engl.: sore operated Ca²⁺-channels, SOCCs) werden als Antwort auf die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher aktiviert (siehe Kapitel 1.3).

Die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern wird durch verschiedene Botenstoff-aktivierte Kanäle vermittelt. Aus heutiger Sicht stellt das endoplasmatische Retikulum (ER) bzw. in Muskelzellen das sarkoplasmatische Retikulum (SR) den wichtigsten intrazellulären Ca^{2+} -Speicher dar. Eine für die Signaltransduktion bisher untergeordnete bzw. weitestgehend unbekannt, für die Ca^{2+} -Homöostase dennoch wichtige Rolle spielen daneben die Mitochondrien.

Mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), existiert eine große Anzahl von zellmembranständigen Rezeptoren, die durch verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Dies führt zur Aktivierung verschiedener Isoformen der Phospholipase C (PLC), welche wiederum die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3) und Diacylglycerol (DAG) katalysieren. Als Ca^{2+} -mobilisierender, sekundärer Signalgeber ist InsP_3 in der Lage durch das Zytoplasma zu diffundieren und spezifische InsP_3 -Rezeptoren auf

dem ER/SR zu aktivieren. Die durch die Bindung ausgelöste Konformationsänderung führt zur Öffnung eines integrierten, nicht-selektiven Kationen-Kanals und erlaubt den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER/SR ins Zytoplasma (Streb et al. 1983; Gill et al. 1989). Die Aktivierung der InsP_3 -Rezeptoren kann bei moderatem $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg (0,5-1 μM) verstärkt, und bei sehr hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ($>1 \mu\text{M}$) inhibiert werden (Bootman et al. 2001). Während InsP_3 -Rezeptoren ubiquitär exprimiert werden, kommen die strukturell und funktionell ähnlichen Ryanodin Rezeptoren (RyR) vor allem in erregbaren Zellen wie Muskel- und Nervenzellen vor. Sie haben eine höhere Leitfähigkeit und werden bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert (1-10 μM) und inhibiert ($>10 \mu\text{M}$) (Bootman et al. 2001). Beide Rezeptoren sind als Knotenpunkt für zahlreiche Signalkaskaden von entscheidender Bedeutung und spielen durch ihre Positionierung auf dem ER/SR eine entscheidende Rolle bei der räumlichen und zeitlichen Kontrolle des $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstiegs. So besteht durch Öffnung einzelner InsP_3 -Kanäle („blips“) / RyR-Kanäle („quarks“) oder mehrerer InsP_3 -Kanäle („puffs“) / RyR-Kanäle („sparks“) die Möglichkeit eines räumlich diskriminierten $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstiegs (Berridge et al. 2000).

1.2.2 Ca^{2+} -Ausstrom („Aus“-Prozesse)

Alle freien Ca^{2+} -Ionen, die keine Funktion auslösen oder bekleiden, werden umgehend und unter großer Anstrengung aus der Zelle oder in intrazelluläre Speicher transportiert. Nur so lässt sich die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration niedrig und der hohe Gradient, der diese Signaltransduktion erst möglich macht, aufrechterhalten. Für die Beförderung sind in erster Linie membranständige ATPasen verantwortlich, die Ca^{2+} -Ionen unter Energieaufwand entweder aus der Zelle (engl.: plasma membrane Ca^{2+} -ATPases, PMCA pumps) oder ins ER/SR (engl.: sarco/endoplasmatic reticular Ca^{2+} -ATPases, SERCA pumps) pumpen. Als zweiter Mechanismus stehen die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - (K^+)-Austauscher (engl.: exchanger) (NCX und NCKX) zur Verfügung. Beide Varianten ergänzen einander. Die PMCA haben eine hohe Affinität zu Ca^{2+} -Ionen aber eine niedrige Kapazität. Sie sind für die dauerhafte Erhaltung des Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten verantwortlich. NCX und NCKX hingegen haben eine hohe Kapazität bei niedriger Affinität. Sie sind für den schnellen Konzentrationsausgleich verantwortlich, wie er bei der Erzeugung von Aktionspotentialen in Nervenzellen notwendig ist (Hilgemann et al. 2006).

Neben den zahlreichen Kanälen, Austauschern, Pumpen et cetera stehen eine große Anzahl an Ca^{2+} -Puffern zur Verfügung. Hauptsächlich handelt es sich dabei um Ca^{2+} -bindende Proteine

im Zytoplasma (Parvalbumin, Calbindin D-28k und Calretinin) und im ER/SR (Calsequestrin, Calreticulin, Glukose-reguliertes Protein), die das Ca^{2+} -Signal nach Bedarf zeitlich und räumlich formen können. Durch sie kann die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, sowohl erhöht („An“) als auch erniedrigt („Aus“) werden.

Die Möglichkeit des räumlich diskriminierten $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg brachte auch die Mitochondrien als Funktionseinheit der Ca^{2+} - Signaltransduktion wieder ins Blickfeld. Diese gruppieren sich oft in Regionen mit hoher Kanalaktivität. Unter anderem beteiligen sich Mitochondrien an der Regulation des Ca^{2+} -Einstroms, der durch die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus internen Speichern aktiviert und über CRAC-Kanäle realisiert wird (engl.: Ca²⁺ release activated Ca²⁺-current, I_{CRAC}) (Hoth et al. 2000). Bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen können Mitochondrien Ca^{2+} -Ionen mit hoher Geschwindigkeit über einen Uniporter mit niedriger Ca^{2+} -Affinität aufnehmen und speichern (Montero et al. 2000). Anschließend kann es unter anderem über einen Na^+ -abhängigen Ca^{2+} -Austauscher mit bedeutend geringerer Geschwindigkeit wieder abgeben werden. Die genauen Funktionen der Mitochondrien im Rahmen der Ca^{2+} -Signaltransduktion sind zu großen Teilen noch unbekannt. Sie fungieren definitiv als Ca^{2+} -Puffer mit hoher Aufnahmekapazität. Daneben wird vermutet, dass hohe Ca^{2+} -Konzentrationen die mitochondriale ATP-Produktion aktivieren (Clapham 2007). Eine Überladung der Ca^{2+} -Speicher führt jedoch zur Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Durchgangs-Pore (engl.: mitochondrial permeability transition pore, MTP), zur Freisetzung von Proteinen wie Cytochrome C und letztlich zur Ca^{2+} -abhängigen Apoptose (Ichas & Mazat 1998).

1.3 SPEICHERABHÄNGIGER Ca^{2+} -EINSTROM (SOCE)

Die erste Idee des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms, später korrekt als speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (engl.: store operated Ca²⁺-entry, SOCE) bezeichnet (Clapham 1995), entstand nach einem Experiment, das die Beziehungen zwischen Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran und dem Wiederauffüllen der Speicher untersucht hat (Putney 1986). Die Beobachtungen ließen vermuten, dass in nicht erregbaren Zellen, die Ca^{2+} -Konzentration in intrazellulären Speichern im umgekehrten Verhältnis zum Ausmaß des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle steht, und beide funktional verbunden sind. Wenn der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom direkt durch Ca^{2+} -durchlässige Kanäle erfolgt, sollte ein elektrischer Strom messbar sein. Der Beweis für diese Theorie ließ sich kurze Zeit später elektrophysiologisch finden. Mit Hilfe von Patch-Clamp Experimenten konnte in Mastzellen

ein für Ca^{2+} -Ionen selektiver, anhaltender und einwärts gerichteter Strom gemessen werden (Hoth & Penner 1992), welcher von den Autoren der Studie als durch Ca^{2+} -Freisetzung aktivierter Ca^{2+} -Strom bezeichnet wurde (Ca²⁺ release activated Ca²⁺ current, I_{CRAC}). Dieser ist für eine Vielzahl biologisch wichtiger Prozesse verantwortlich. Der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom steuert unter anderem die Migration und Proliferation von Brustkrebszellen (S. Yang et al. 2009), die Proliferation von Endothel-Zellen (Abdullaev et al. 2008) und die Kontraktion der Skelettmuskulatur (Stiber et al. 2008). Die physiologische Bedeutung des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms zeigt sich allerdings am bedrückendsten und beeindruckendsten bei Funktionsausfällen. Vor allem Mutationen in den Genen für Orai1 und STIM1 führen zu angeborenen Defekten. Einen besonders deutlichen Phänotyp zeigen dabei Defekte, die das Immunsystem beeinträchtigen. So führt eine spezifische Mutation von Orai, bei der an Position 91 Arginin gegen Tryptophan (R91W) ausgetauscht ist, zum so genannten SCID Syndrom (engl.: severe combined immune deficiency). Patienten mit dieser Mutation besitzen so gut wie keine T-Zellen und T-Zell Aktivierung (Feske et al. 2005; Feske et al. 2006). Die Entschlüsselung der Funktionsweise des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms und das genaue Zusammenspiel der beteiligten Komponenten halten dabei bis heute an. Bis 2005 hatte man vermutet, dass InsP_3 , dessen Signalmolekülwirkung und der entsprechende Rezeptor (InsP_3R) hauptverantwortlich für die Funktionsweise sind. Injektion von InsP_3 in Zellen führte sowohl zu intrazellulärer Ca^{2+} -Freisetzung als auch zu erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom (Bird et al. 1991). Durch Membranfraktionierung wusste man allerdings, dass nach Behandlung mit InsP_3 , Ca^{2+} -Ionen von ER-Vesikeln, aber nicht von Plasmamembran (PM)-Vesikeln freigesetzt werden (Ueda et al. 1986). Was bedeutete, dass auch wenn InsP_3 verantwortlich erscheint, kein direkter Effekt auf Rezeptoren in der PM vorliegt. Die Bezeichnung kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom rührt von einem Model, bei dem der intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher als Kondensator und der Ca^{2+} -Kanal (CRACC) als Widerstand fungieren. Es wurde vermutet, dass durch Protein-Protein-Interaktion mit auf dem ER lokalisierten InsP_3 -Rezeptoren der Kanal geöffnet wird, der Widerstand sinkt und Strom (Ca^{2+}) fließt (Berridge 1995). Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist man ebenfalls davon ausgegangen, dass der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom vor allem für die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Konzentration in den intrazellulären Speichern verantwortlich ist, und damit durch zytoplasmatische Ca^{2+} -Oszillationen Gen-Expression und andere pfadabwärts befindliche Ziele (engl.: downstream targets) aktiviert werden können. Zu Teilen ist das sicherlich korrekt, und viele wichtige Prozesse sind von der globalen Ca^{2+} -Freisetzung durch InsP_3 -Rezeptoren abhängig. Neuere Ergebnisse allerdings legen die Vermutung nahe, dass der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom

wohlmöglich eher für direkte Ca^{2+} -Signaltransduktion auf Empfänger verantwortlich ist, die sich auf engem Raum und nahe der Ca^{2+} -Einstromstellen befinden, ohne dass es zu einem Anstieg der globalen Ca^{2+} -Konzentration kommt (Ng et al. 2008; Ng et al. 2009).

1.3.1 Funktionsweise

Durch RNA Interferenz Screenings mit eingegrenzten siRNA Bibliotheken in HeLa-Zellen und Drosophila S2 Insektzellen gelang es 2005 das Stromal Interaction Molecule (STIM) 1 und 2 als eine der molekularen Schlüsselkomponenten für die Ausbildung von CRAC-Kanälen zu identifizieren (Roos et al. 2005; Liou et al. 2005). Beide sind vor allem in der Membran des ER/SR lokalisiert, und dort als Ca^{2+} -Sensoren verantwortlich für die Aktivierung des CRAC-Kanals nach Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. STIM besitzt dafür eine Transmembrandomäne (TMD), deren N-Terminus mit einem Ca^{2+} -bindenden EF-Hand-Motiv zur luminalen Seite des ER/SR zeigt. Durch Absinken der Ca^{2+} -Konzentration im ER/SR dissoziieren Ca^{2+} -Ionen aus dem EF-Hand-Motiv. Die Folge ist eine Konformationsänderung von STIM, welche eine Assoziation mit weiteren STIM-Molekülen und eine Migration zu nah beieinander liegenden ER-PM Verbindungszonen auslöst (Liou et al. 2007). An diesen Punkten interagieren die STIM-Oligomere mit der zweiten molekularen Schlüsselkomponente des CRAC-Kanals, den Molekülen der Orai-Familie. Benannt nach den Wächtern der Himmelpforten in der griechischen Mythologie, konnte Orai 2006 durch SNP (engl.: single nucleotide polymorphism)-Analysen von SCID-Patienten und siRNA-Screenings in Drosophila identifiziert werden (Feske et al. 2006). Die Orai-Familie besteht aus drei homologen Proteinen, Orai1, Orai2 und Orai3. Im Gegensatz zu STIM besitzen sie vier Transmembrandomänen mit 3 zytosolischen Strängen, die sowohl C- als auch N-Terminus enthalten. Durch elektrophysiologische Charakterisierung konnte der Beweis erbracht werden, dass Orai die porenformende Einheit des CRAC-Kanal-Komplexes ist. Es besitzt eine hohe Ca^{2+} -Selektivität und eine niedrige Einzelkanal-Leitfähigkeit (Prakriya et al. 2006; Vig et al. 2006; Yeromin et al. 2006). Über eine spezifische C-terminale Domäne in der Zytoplasmaregion von STIM und spezifischen Domänen in N- und C-Terminus von Orai interagieren die Moleküle und formen den CRAC-Kanal (Kawasaki et al. 2009; Muik et al. 2009; C. Y. Park et al. 2009; J. P. Yuan, Kim, et al. 2009a) (siehe Abb. 1-2). Die exakte Stöchiometrie des STIM/Orai-Komplexes ist noch nicht bekannt. Biochemische- und Fluoreszenz-Experimente haben hauptsächlich Orai-Tetramere identifiziert (Penna et al. 2008; Ji et al. 2008; Thompson et al. 2010), wohingegen neuere Kristallstrukturanalysen

einen hexamerischen Komplex propagieren (Hou et al. 2012). Auch wenn nur ein oder zwei STIM1-Moleküle notwendig sind, um Orai-Kanäle an den ER-PM Verbindungszone zu binden, konnte durch Patch-Clamp Experimente mit Orai1-STIM1 C-Term Fusionsproteinen gezeigt werden, dass acht STIM1-Moleküle notwendig sind um den CRAC-Strom vollständig zu aktivieren oder inaktivieren (Hoover & Lewis 2011; Li et al. 2011). Dabei ist das Ausmaß der Aktivierung/Inaktivierung abhängig von der Anzahl der STIM1-Moleküle. Je mehr STIM1-Moleküle an den Orai-Kanal-Komplex binden, desto stärker ist die Aktivierung/Inaktivierung (Scrimgeour et al. 2009; Li et al. 2011). Dieses Phänomen ließ sich auch auf die Ca^{2+} -Selektivität übertragen, die umso ausgeprägter ist, je mehr STIM1-Moleküle mit Orai1-Molekülen interagieren (McNally et al. 2009; McNally et al. 2012). Für einen potentiellen tetramerischen Orai-Komplex wird eine STIM1:Orai1 Stöchiometrie von 2:1 vorgeschlagen (Fahrner et al. 2014).

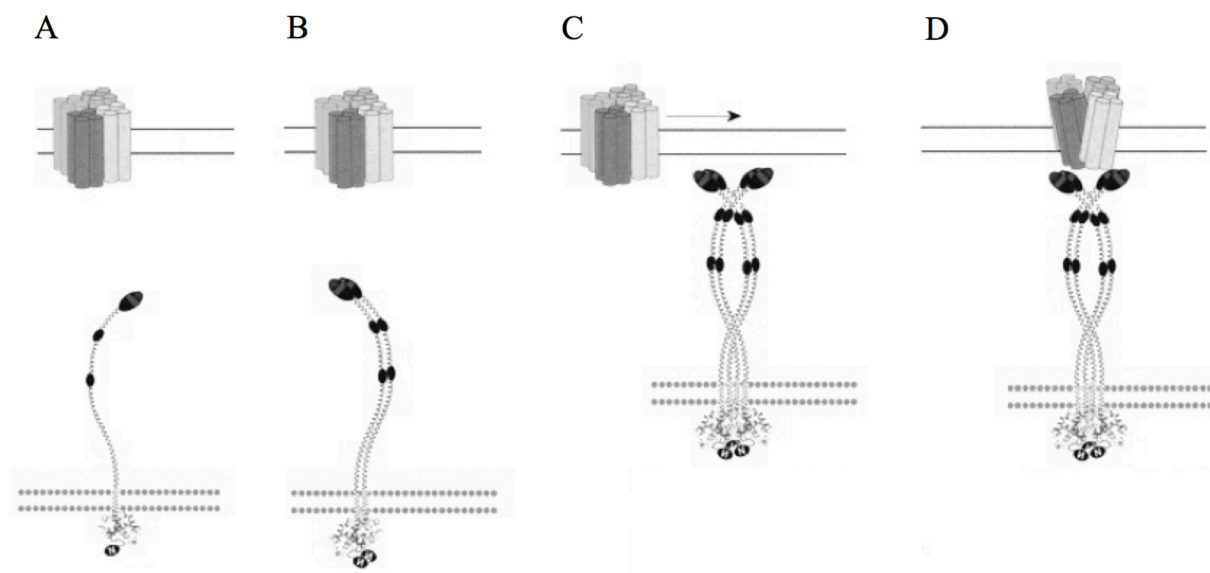


Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Aktivierung des CRAC-Kanals (Hogan et al. 2010; J. P. Yuan, Zeng, et al. 2009b)

A) Die Ca^{2+} -Speicher des ER/SR sind gefüllt. STIM und Orai bewegen sich homogen verteilt entlang von Mikrotubuli in der ER- und Plasmamembran.

B) Die Ca^{2+} -Konzentration im ER/SR sinkt. STIM verlangsamt seine Bewegung, multimerisiert und wandert in Richtung der ER-PM Verbindungszone.

C) STIM-Di- und/oder Tetramere binden an Orai-Tetramere (und/oder Hexamere), stoppen deren Bewegung und binden sie innerhalb der ER-PM Verbindungszone.

D) STIM und Orai bilden den CRAC-Kanal. Ca^{2+} -Ionen strömen in die Zelle.

(Hogan et al. 2010; J. P. Yuan, Zeng, et al. 2009b; Hou et al. 2012; Ong et al. 2015)

1.3.2 STIM

Um als Sensor den Ca^{2+} -Konzentrationsabfall im ER/SR detektieren zu können, besitzt das STIM-Molekül ein EF-Hand-Motiv, welches durch ein Helix-Loop-Helix Motiv charakterisiert ist, und mit Hilfe negativ geladener Aspartat- und Glutamat-Aminosäuren, Ca^{2+} -Ionen bei gefüllten Speichern binden kann ($K_D \approx 200\text{-}600 \mu\text{M}$) (Stathopoulos et al. 2006; Stathopoulos et al. 2008). Die niedrige Ca^{2+} -Bindungsaffinität entspricht dabei dem Konzentrationsbereich ($\approx 400\text{-}800 \mu\text{M}$), in welchem die Sensorproteine im ER/SR in der Lage sind akkurat auf Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen zu reagieren (Stathopoulos et al. 2008). Im Gegensatz zu STIM1 reagiert STIM2 schon auf geringe Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration im ER/SR. Vermutet wird in diesem Zusammenhang, dass STIM2 als Teil eines Rückmeldesystems die Ca^{2+} -Konzentration im ER/SR innerhalb enger Grenzen halten soll (Brandman et al. 2007). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre ein Unterschied in der Strukturstabilität des luminalen Teils von STIM1 und STIM2 (Zheng et al. 2008; Zheng et al. 2011). Neue Daten konnten zeigen, dass STIM2 die CRAC-Kanal-Aktivität sensitiviert, indem es bei geringem Ca^{2+} -Konzentrationsabfall mit STIM1 Heteromere bildet und dieses zu den ER-PM Verbindungszonen transportiert (Ong et al. 2015).

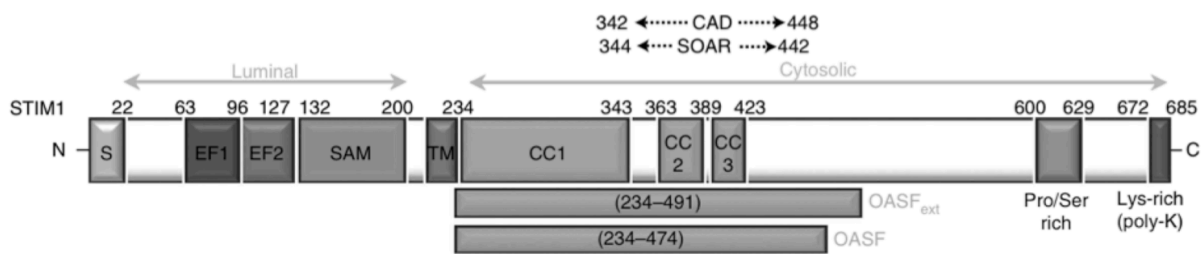


Abb. 1-3 Domänenarchitektur von humanem STIM1 (Stathopoulos et al. 2013)

N-Terminus (N), EF-Hand (EF1), Transmembrandomäne (TM), mutmaßliche Doppelwundenregionen (CC1, CC2, CC3), C-Terminus (C)

Solange sich die Zelle im Ruhezustand befindet und die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher gefüllt sind, bewegt sich STIM1 homogen verteilt und zügig entlang von Mikrotubuli. Mit Entleerung der Speicher und der Dissoziation von Ca^{2+} -Ionen aus dem EF-Hand-Motiv kommt es zur Konformationsänderung und zur Verzweigung einzelner STIM-Monomere auf der luminalen Seite des ER/SR. Die Di- und Oligomerisierung führt zur Verlangsamung der Bewegung und zur Wanderung und Akkumulierung in ER-PM Verbindungszonen („Punctae“) (Smyth et al. 2008; Baba et al. 2006; Baba et al. 2008; Luik et al. 2006; Luik et al. 2008). Um anschließend CRAC-Kanäle zu aktivieren, reicht der C-Terminus von STIM1

aus (Huang et al. 2006; Muik et al. 2009). Der zytosolische Strang des STIM-Moleküls enthält drei mutmaßliche Doppelwendel-Regionen (engl.: coiled-coil; CC1, CC2, CC3), die CRAC-modulierende Domäne, eine Serin/Prolin- und eine Lysin-reiche Region. Als Schlüsseldomänen, ausreichend um Orai-Kanäle zu aktivieren, wurden OASF (engl.: Orai activating small fragment; 233-450), CAD (engl.: CRAC activating domain; 342-448), SOAR (engl.: STIM Orai activating region; 344-442) und Ccb9 (339-444) identifiziert (Muik et al. 2009; C. Y. Park et al. 2009; J. P. Yuan, Zeng, et al. 2009b; Kawasaki et al. 2009). Alle diese Fragmente haben die CC2 (363-389), die CC3 (399-423) und 19 weitere Aminosäuren (424-442) gemeinsam und enthalten sowohl eine Orai-Bindungs- und Aktivierungsdomäne als auch eine STIM1 Homomerisierungsdomäne (SHD) (Muik et al. 2009). Die nicht enthaltene CC1-Domäne (238-343) ist unter anderem dafür verantwortlich die luminale Di- und Oligomerisierung auf den zytosolischen Strang zu transformieren (N. Yang et al. 2013; Muik et al. 2011; Soboloff et al. 2011). Zum Beenden der Interaktion zwischen STIM und Orai findet sich unterhalb der SOAR-Domäne eine kurze saure Aminosäure-Sequenz (474-485). Diese als CRAC-modulierende Domäne (CMD) bezeichnete Region scheint für die Ca^{2+} -abhängige schnelle Inaktivierung des I_{CRAC} verantwortlich zu sein (Derler et al. 2009; Mullins et al. 2009). Daneben existieren weitere Abschnitte (S486 und S468), die unter anderem während der Zellteilung phosphoryliert sind und die Anordnung von STIM1 in den ER-PM Verbindungszonen unterbinden (Smyth et al. 2009) (siehe Abb. 1-3).

1.3.3 Orai

Die einzelne Orai-Untereinheit besteht aus vier Transmembrandomänen, den zytosolischen N- und C-Termina, einer intrazellulären- und zwei extrazellulären Schleifen (siehe Abb. 1-4). Es existieren drei Isoformen, Orai1, Orai2 und Orai3, welche alle als porenformende Untereinheit für den CRAC-Kanal infrage kommen (Mercer et al. 2006; Zhang et al. 2006). Für den funktionsfähigen CRAC-Kanal-Komplex bedarf es mehrerer homo- oder heterogen zusammengesetzter Orai-Untereinheiten (Lis et al. 2007; Schindl et al. 2009; Gwack et al. 2007). Mit Hilfe von Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass durch STIM1 aktivierte CRAC-Kanäle aus Orai-Tetrameren bestehen (Penna et al. 2008; Ji et al. 2008; Thompson et al. 2010). In Widerspruch beziehungsweise Ergänzung dazu zeigen neuere Kristallstrukturanalysen des Orai-Kanals von *Drosophila melanogaster* eine hexamerische Anordnung (Hou et al. 2012). Annähernd sicher ist, dass Orai-Kanäle Ca^{2+} -Ionen mit einer bis zu 1000fach höheren Selektivität leiten als Na^{+} -Ionen (Hoth et al. 1993)

und ihre Leitfähigkeit durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert wird. Hohe Ca^{2+} -Konzentrationen inaktivieren den Orai-Kanal dabei je nach Isoform, basierend auf Sequenzunterschieden im N-Terminus der zytosolischen Schleife 2 (zwischen TMD 2 und 3) und dem C-Terminus, unterschiedlich schnell und mit unterschiedlichem Profil (Lis et al. 2007; Frischauf et al. 2011). Im Gegensatz zu anderen Ca^{2+} -Kanälen scheint der CRAC-Kanal auf Grund seiner außergewöhnlichen Aminosäure-Sequenz und seinen Permeabilitätseigenschaften einen einzigartigen Selektivitätsfilter zu besitzen (Penna et al. 2008; Mignen et al. 2007; Ji et al. 2008). Durch negativ geladene Aminosäuren (D110, D112 und D114) in der ersten extrazellulären Schleife von Orai1 werden Ca^{2+} -Ionen angezogen und konzentriert (Vig et al. 2006; Derler et al. 2009). Dabei unterscheiden sich die Sequenzen der einzelnen Orai-Isoformen und eröffnen über heterogene Kombinationen eine Regulation der Ca^{2+} -Selektivität des CRAC-Kanals (Yeromin et al. 2006; McNally et al. 2009; Yamashita et al. 2007).

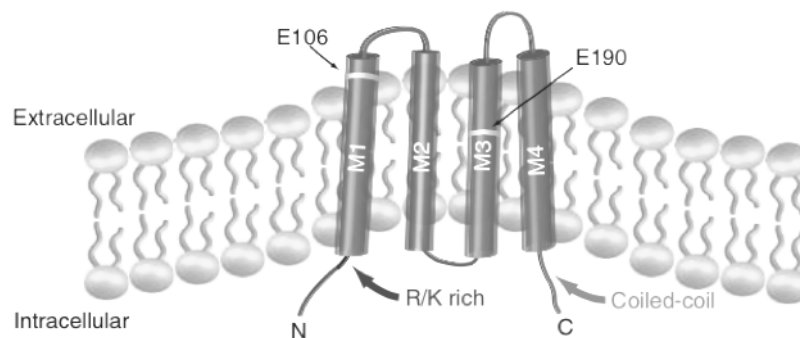


Abb. 1-4 Modell von Orai1 in der Plasmamembran (Putney 2010)

Orai1 besitzt vier Transmembrandomänen mit zum Zytoplasma gerichteten C- und N-Terminus. Die Arginin/Lysin-reiche Region (R/K rich) im N-Terminus und die Doppelwundenregion (coiled-coil) im C-Terminus sind bei der Bindung an STIM1 beteiligt (Li et al. 2007; Muik et al. 2008). Die Positionen E106 und E190 sind funktionskritisch. Mutationen an diesen Stellen führen zu einer Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Selektivität.

Durch diesen flexiblen Korridor betreten die Ca^{2+} -Ionen, die über helikale TMD1-Segmente geformte Pore (McNally et al. 2009) und treffen auf negativ geladenes Glutamat (E106). In Abhängigkeit der Stöchiometrie des CRAC-Kanals sehen sich die Ca^{2+} -Ionen hier 4-6 Glutamat-Molekülen gegenüber. Es wird angenommen, dass dieser Abschnitt einen maßgeblichen Beitrag zur Ca^{2+} -Selektivität leistet, indem er unter anderem die minimale Porengröße determiniert (Yeromin et al. 2006; Lis et al. 2007). Die helikale Struktur der TMD1 reicht dabei bis ins Zytoplasma (Hou et al. 2012). Dieser letzte Porenabschnitt wird als ETON-Region (engl.: extended TM1 Orai1 N-terminal) bezeichnet und fungiert als elektrostatische Barriere (Rothberg et al. 2013). Hier treffen die Ca^{2+} -Ionen auf drei positiv

geladene Aminosäuren (R91, K87 und R83), diese für einen Kationen-Kanal ungewöhnliche Struktur verhindert durch gebundene Anionen oder elektrostatische Abstoßung einen Ca^{2+} -Einstrom in den geschlossenen Kanal (Hou et al. 2012). Die mit SCID assoziierte Punktmutation (R91W) des Orai Proteins führt, vermutlich durch gesteigerte Hydrophobizität, zu einem Verschluss des Kanals und verhindert den Ca^{2+} -Einstrom (Hou et al. 2012). Auch wenn die TMD3 kein Bestandteil des Poreninneren ist, hat sie, vermutlich durch Veränderung der intramolekularen Transmembran-Interaktionen, einen allosterischen Effekt auf die Poreneigenschaften (Zhou et al. 2010; McNally et al. 2009). Diese werden durch Punktmutationen von E190 innerhalb der TMD3, die mit einem Anstieg des Porendurchmessers einhergehen, dramatisch verändert (Prakriya et al. 2006; Vig et al. 2006; Yamashita et al. 2007). Damit Ca^{2+} -Ionen letztlich ins Zytosol entlassen werden können, bedarf es der Bindung und Aktivierung von Orai durch STIM. Hierdurch kommt es zur Konformationsänderung der verlängerten, die Orai-Pore umgebenden, Helix-Struktur der TMD 1, wodurch die elektrostatische Barriere der ETON-Region aufgehoben wird (Derler et al. 2013; Fahrner et al. 2014) (siehe Abb. 1-5).

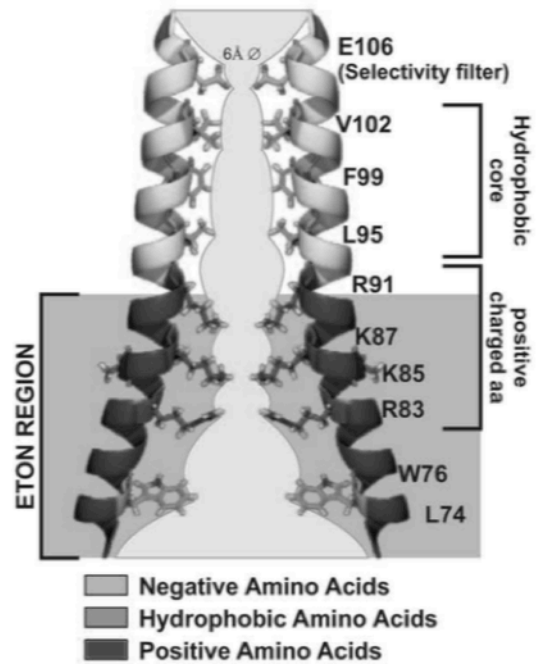


Abb. 1-5 2D Darstellung einer hexamerischen Orai1 Pore (Fahrner et al. 2014)

Abgebildet sind zwei, sich gegenüberliegende TMD1 Stränge, der Selektivitätsfilter E106 und die zytosolische ETON-Region mit den positiv geladenen AS R91, K87 und R83.

1.4 SGK1

Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase (SGK) 1 zählt zu den Serin/Threonin-Kinasen und wurde ursprünglich als Gen aus Brusttumorzellen von Ratten geklont, dessen Transkription sich durch Serum und Glukokortikoide stimulieren ließ (Webster et al. 1993). Die humane Form der SGK wurde wenige Jahre später als Zellvolumen regulierendes Gen entdeckt (Waldegger et al. 1997), dessen Expression bisher in allen darauffolgend getesteten Geweben nachgewiesen werden konnte (Kobayashi et al. 1999; Waldegger et al. 1997). Die Expression und Konzentration der SGK1 wird durch eine Vielzahl von Hormonen, Mediatoren und Stressfaktoren reguliert (Lang & Stournaras 2013). Sobald sie gebildet ist,

wird die SGK1 durch Phosphorylierung über die Phosphatidylinositol 3 (PI3) Kinase und die Phosphoinositid-abhängige Kinase (engl.: phosphoinositide dependent kinase, PDK) 1 aktiviert (Alessi et al. 1997; J. Park et al. 1999). Die SGK1 selbst scheint aufgrund des relativen milden Phänotyps einer Maus mit global deaktivierten SGK1 keine lebensnotwendigen Funktionen zu erfüllen (Lang & Stournaras 2013). Sie ist durch die Regulierung von Ionenkanälen (Yun et al. 2002; Seebohm et al. 2005; Palmada et al. 2005), Ionentransportern (Lang et al. 2006; Lang et al. 2009; Rotte et al. 2011) und Transkriptionsfaktoren (Reiter et al. 2011; Eysten et al. 2012; Sahin et al. 2013) allerdings an entscheidenden Funktionen der Zelle aktiv beteiligt, und eine steigende Anzahl von Erkrankungen sind mit einer erhöhten Konzentration von SGK1 assoziiert (Lang et al. 2010; Borst et al. 2012). Da in verschiedenen Tumoren eine erhöhte SGK1-Konzentration gefunden werden konnte, steht sie im Verdacht das Überleben von Krebszellen zu unterstützen (Lang et al. 2010; Fagerli et al. 2011; Yoon et al. 2009). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die SGK1, durch Phosphorylierung der Ubiquitin Ligase MDM2 (engl.: mouse double minute 2), die Degradation des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors p53 auslöst und so an der Proliferation, dem Überleben und der Differenzierung von Zellen beteiligt ist (Amato et al. 2009). Auch die durch den Kolonie-stimulierenden Faktor (engl.: colony-stimulating factor, CSF) 1 ausgelöste gesteigerte Invasivität, Beweglichkeit und Adhäsivität von Prostatakrebszellen wird durch die SGK1 begünstigt (Lang et al. 2006; Lang et al. 2010). Als weitere Beispiele für anti-apoptotische und das Tumorwachstum unterstützende Eigenschaften der SGK1 lassen sich die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Forkhead Box O3a (FoxO3a) (Dehner et al. 2008) und die Aktivierung der Translokation von NF- κ B (Lang et al. 2010; Hayden & Ghosh 2008) anführen (siehe Abb. 1-6). Auch wenn die Inhibierung der SGK1 vermutlich nicht ausreicht, um Tumorwachstum zu stoppen, bietet sie doch einen interessanten Ansatzpunkt zur Steigerung der Effektivität zukünftiger Therapien. Ein besonders starker Stimulator der SGK1 ist der transformierende Wachstumsfaktor β (engl.: transforming growth factor β , TGF β) (Kumar et al. 1999; Lang et al. 2000; Waldegger et al. 1999), welcher in hohem Maß im Endometrium gebildet und freigesetzt wird (Omwandho et al. 2010). Die TGF β 3 Proteinexpression ist nach der Menstruation besonders hoch, was den Verdacht nahe legt, dass es an der Regulation der postmenstruellen Endometriumregeneration beteiligt ist (Omwandho et al. 2010). SGK1 wird in menschlichem Endometrium exprimiert und ist bei Frauen mit nicht-erklärbarer Infertilität heraufreguliert (Feroze-Zaidi et al. 2007; Salker et al. 2011). Im Gegensatz dazu ist die SGK1 in dezidualisierenden Stromazellen von Patientinnen mit habituellem Abort (engl.: reccurent

pregnancy loss, RPL) herabreguliert (Salker et al. 2011). Allgemein ist allerdings immer noch wenig bekannt über Angriffspunkte der SGK1 in Endometrium-Zellen. Neue Untersuchungen konnten zeigen, dass eine SGK1-sensitive Regulation des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms existiert (Eylenstein et al. 2011). Die SGK1 aktiviert den SOCE unter anderem in Mastzellen

(Eylenstein et al. 2011) und Thrombozyten (Borst et al. 2012). Zum einen arbeitet die SGK1 indem sie die Ubiquitin Ligase Nedd4-2 inhibiert und so der proteasomalen Degradation von Orai1 entgegen wirkt (Eylenstein et al. 2011), und zum anderen stimuliert sie die NF- κ B abhängige Orai1 Transkription (Eylenstein et al. 2012).

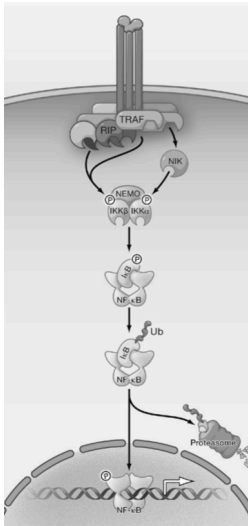


Abb. 1-6 NF- κ B Signaling Pathways (Hayden & Ghosh 2008)

Über den klassischen Signalweg führt die Rezeptorbindung zur Rekrutierung von Adapter-Proteinen wie TRAF (engl.: tumor necrosis factor receptor-associated factor) / RIP (Rezeptor-Interaktion Proteine). Gemeinsam mit TAK1 (TGF β -activated kinase-1) aktivieren diese IKK, was zur Phosphorylierung und Degradation von I κ B und zur NF- κ B induzierten Transkription führt. Ein alternativer Signalweg mit ungleichen Zielgenen führt über die Adapter-Proteine TRAF/NIK (NF- κ B-inducing kinase) und resultiert in der Prozessierung von p100 zu p52.

1.5 TGF-B

Der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β) existiert in drei bekannten Isoformen (TGF β -1, 2 und 3) und reguliert ein breites Spektrum an zellulären Prozessen wie Zelldifferenzierung, Zellalterung, Wundheilung, Apoptose und Immunreaktionen (Massagué 1998; Leivonen & Kähäri 2007). Ebenfalls beteiligt ist er an der Entwicklung und dem Wachstum während der frühen Embryogenese (Schmierer & Hill 2007; Leivonen & Kähäri 2007). Ausdifferenzierte Zellen reagieren auf eine Aktivierung durch TGF- β häufig mit Zytostase, Differenzierung oder Apoptose (Massagué 2008). Der TGF- β Rezeptor ist ein heteromerischer Komplex bestehend aus den beiden Serin/Threonin Kinasen TGF- β Rezeptor Typ 1 und 2 (TGF- β R1/2) (Attisano et al. 1993). Durch Bindung von TGF- β wird der TGF- β R2 phosphoryliert, welcher anschließend den TGF- β R1 rekrutiert und wiederum aktiviert (Schmierer & Hill 2007; Massagué 2008). Durch den aktivierten TGF- β R1 werden spezifische Smad- (engl.: small mothers against decapentaplegic) Proteine phosphoryliert, die in Rezeptor-aktivierte Smads (R-Smads), Co-Mediator Smads und inhibierendee Smads (I-Smads) unterteilt werden und ein breites Spektrum an unterschiedlichen Funktionen beeinflussen (Ross & Hill 2008; Massagué 2008; Pennison & Pasche 2007). Über sie fungiert TGF- β nicht nur als Wachstumsinhibitor und Tumorsuppressor, sondern unterstützt auch

gegenteilige Funktionen, wie Metastasierung und Invasion von Krebszellen (Massagué 2008; Padua et al. 2008). Verschiedene Schlüsselproteine die zur Metastasierung von Tumoren beitragen, wie Snail, Slug und Smad- interagierendes Protein 1 (SiP1), werden durch TGF- β positiv reguliert (Massagué 2008). Wodurch jede Störung der TGF- β Signaltransduktion durch inaktivierende Mutationen oder verminderte Expression der an der Signalübertragung beteiligten Proteine zu einer Tumorentwicklung führen kann (Leivonen & Kähäri 2007; Massagué 2008).

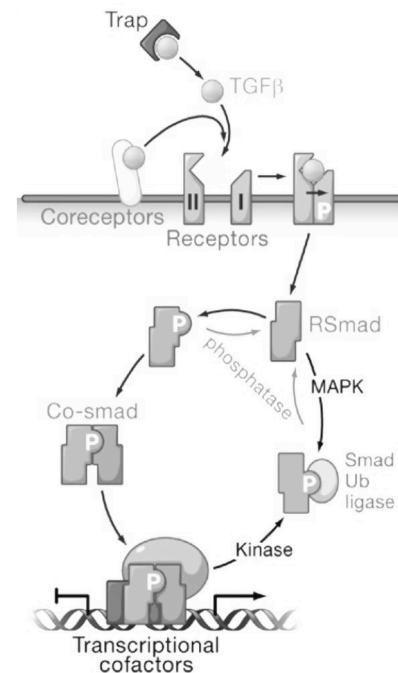


Abb. 1-7 TGF- β Signaltransduktion (Massagué 2008)

Liganden-Fallen und Co-Rezeptoren kontrollieren den Rezeptorzugang des TGF- β Dimers. Durch die Bindung von TGF- β wird der TGF- β R2 phosphoryliert, und aktiviert den TGF- β R1. Dieser phosphoryliert seinerseits R-Smads, die im Anschluss an Smad4 binden. Dadurch werden weitere Smad-Komplexe gebildet, welche die Transkription von hunderten Zielgenen beeinflussen.

1.6 AKT/PKB

Das Akt-Gen kodiert eine Serin/Threonin Kinase mit einer N-terminalen PH- (engl.: pleckstrin homology) Domäne, einer zentralen katalytischen Domäne und einer kurzen C-terminalen regulatorischen Domäne. Es existieren drei verschiedene Isoformen der Akt-Proteine (Akt1/2/3), welche mitunter auch als Protein-Kinase B (PKB $\alpha/\beta/\gamma$) bezeichnet werden und ubiquitär zu finden sind. In nichtstimulierten Zellen sind die Aminosäuren S124, zwischen PH- und katalytischer Domäne und T450 in der C-terminalen Region konstitutiv phosphoryliert. Ausgelöst wird die Akt-Signaltransduktion durch die Bindung von Signalmolekülen (z.B. Wachstumsfaktoren) an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und die resultierende Aktivierung der PI3-Kinase (Manning & Cantley 2007), welche im Anschluss membrangebundenes PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert. PIP₃ bindet an die PH-Domäne von Akt, bindet es so an die Plasmamembran und ermöglicht die Phosphorylierung von T308 in der katalytischen Domäne durch die PDK1 (Klippel et al. 1997). Diese bedingt eine ladungsinduzierte Konformationsänderung und ist essentiell für eine funktionelle Aktivierung von Akt. Die maximale Aktivierung wird allerdings erst durch eine weitere Phosphorylierung von S473 über den rictor-mTOR (engl.: rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin-mechanistic target of rapamycin) Komplex erreicht (Sarbasov et al. 2005). Hierdurch wird die Katalyse-Rate und die Stabilität des Proteins maßgeblich gesteigert

und eine Translokation zu anderen Regionen oder dem Zellkern erst ermöglicht (Feng et al. 2004). Negativ reguliert wird Akt über die PIP₃-spezifische Phosphatase PTEN (engl.: phosphatase and tensin homolog) (Choi et al. 2002), PP2 (engl.: protein phosphatase 2) und PHLPP (engl.: PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) (Andjelković et al. 1996; Brognard et al. 2007). Die entscheidenden Aufgaben von Akt sind Proliferation (Zellzahl), Wachstum (Größe) und Überleben der Zelle (Vivanco & Sawyers 2002). Erreicht wird dies unter anderem durch die Phosphorylierung und Inaktivierung von pro-apoptotischen Faktoren wie Bad, Caspase-9 und Forkhead Transkriptionsfaktoren (AFX, Daf-16, FKHR) (Datta et al. 1997; Cardone et al. 1998; Tran et al. 2003). Die Phosphorylierung von IKK α an T23 und deren Aktivierung durch Akt resultiert in der Phosphorylierung von I κ B und dessen proteasomaler Degradation. Dies führt zur Aktivierung und nuklearen Translokation von NF- κ B und der Transkription NF- κ B-abhängiger überlebensfreundlicher Gene wie Bcl-x_L und Caspase-Inhibitoren (Ozes et al. 1999). Da zahlreiche Onko- und Tumorsuppressor-Gene oberhalb des Akt-Signalfads angreifen und über diesen wirken, nimmt Akt als ein Schlüssel-Regulator des Zell-Überlebens entscheidenden Einfluss auf die Onkogenese. So ist die Akt-Aktivität während der G2/M Phase des Zellzyklus erhöht und fördert auch bei vorhandenen DNS-Schäden (Desoxyribonukleinsäure) das Voranschreiten der Mitose (Kandel et al. 2002). Erklären lässt sich dies über die Phosphorylierung von S280 der DNS-Kontrollpunkt Kinase Chk1 (engl.: checkpoint kinase 1) durch Akt. Die dadurch erfolgende Translokation der Kinase vom Zellkern ins Zytoplasma führt zu genomischer Instabilität (Puc et al. 2005). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Standardbehandlung von Ovarialkarzinomzellen mit cis-Platin zu Therapieresistenzen führen bzw. diese verstärken kann. Indem die durch die Behandlung aktivierten Caspasen vorhandenes PTEN proteolytisch spalten und degradieren, fehlt die negative Regulation von Akt durch PTEN, wodurch Zellwachstum und Überleben weiter gefördert werden (Singh et al. 2013). Eine weitere Arbeit konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Therapieresistenz von Ovarialkarzinomzellen gegenüber cis-Platin durch Transfektion mit einem Akt-Antisense Plasmid aufgehoben werden kann (Hahne et al. 2012). Daneben resultierte die Behandlung von multiplem Myelom-Zellen mit einem Akt-Inhibitor in vermindertem Überleben von sowohl therapiesensitiven- als auch therapieresistenten Zellen (Mitsiades et al. 2002).

1.7 APOPTOSE

Apoptose ist ein stark regulierter physiologischer Prozess der Entwicklung und Morphogenese. Als Antwort auf spezifische Signale leitet die Zelle ein Programm bestimmter biochemischer und morphologischer Veränderung ein (siehe Abb. 1-8).

Ohne Entzündungsreaktionen hervorzurufen kommt es zu genomischer Degradation. Die Zelle schrumpft und bildet bläschenförmige Membranprotrusionen (Williams &

Henkart 1994). Versagt diese sensible Steuerung, kann es zu verschiedenen, teils schweren autoimmun und neurodegenerativen Erkrankungen, sowie Krebs kommen. Ein wichtiger Auslöser für diesen Zelltod ist die Bindung von Signalmolekülen an Zellmembranrezeptoren wie Fas/Apo-1 (engl.: apoptosis inducing protein 1) und den Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 (TNFR1) (Nagata 1997; Daniel et al. 2001). In beiden Fällen endet die Signalkaskade in der Aktivierung verschiedener Caspasen. Ab hier gibt es kein Zurück mehr. Die aktivierten Caspasen spalten zahlreiche Schlüsselproteine und unterbinden die normale Zellfunktion (Salvesen & Riedl 2008). Eines ihrer Hauptsubstrate ist dabei die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), ohne deren Funktion die DNS-Reparaturmechanismen eingestellt werden. Immer mehr Bedeutung am apoptotischen Prozess gewinnen die Mitochondrien (Finkel 2001; Hail 2005). Bax und andere pro-apoptotische Proteine, der Bcl-2 Familie zeigen verwandtschaftliche Strukturen mit Poren-formenden Proteinen. Es wird vermutet, dass Bax (engl.: Bcl2-associated X protein) transmembrane Poren über die äußere Mitochondrienmembran bildet und darüber einen Verlust des Membranpotentials herbeiführen kann (Kuwana et al. 2002; Wei et al. 2001). Um diesem Prozess entgegenzuwirken, befinden sich, vor allem da, wo sie der inneren Membran besonders nahe kommt, anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie in der äußeren Mitochondrienmembran (Kluck et al. 1997). Auch hohe Ca^{2+} - und ROS- (reaktive O_2 Spezies) Konzentrationen depolarisieren die Mitochondrien indem sie zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Durchgangs-Pore (engl.: permeability transition pore, PTP) beitragen. Als wesentliche

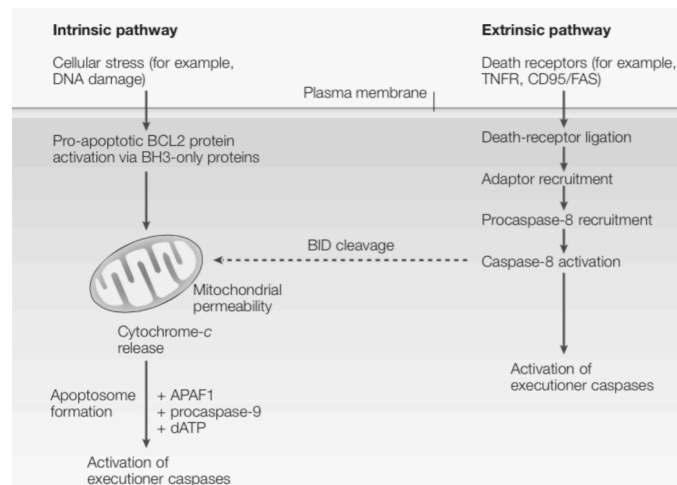


Abb. 1-8 Extrinsisch und intrinsisch ausgelöste Apoptose (Chipuk & Green 2005)

Bestandteile der PTP sind der Adenin Nukleotid Translokator (ANT) und der spannungsabhängige Anionen Kanal (engl.: voltage-dependent anion channel, VDAC) an der Regulation des pH-Werts, des Volumens und der Ca^{2+} -Konzentration der Matrix beteiligt (Kroemer et al. 2007). Die Öffnung des VDAC in der inneren Membran führt zu einem Ionen-Gleichgewicht zwischen der Matrix und dem Membranzwischenraum. Dadurch verbraucht sich der elektrochemische Gradient ($\Delta\psi_m$) und die Entkopplung der Atmungskette resultiert im Abbruch der ATP-Produktion (Morales et al. 2004; Green & Kroemer 2004). Für die PTP existieren zwei Zustände, einen mit niedriger Leitfähigkeit, in welchem die Pore, pH-Wert abhängig, nur kleine Ionen passieren lässt und sich spontan verschließt, sowie einen Zustand mit hoher Leitfähigkeit, in welchem der Kanal im offenen Zustand stabilisiert, und für Wasser und größere Moleküle passierbar wird. Der Durchtritt von Wasser und die dadurch resultierende Entfaltung der inneren Membran mit ihrer wesentlich größeren Oberfläche üben Druck auf die äußere Membran aus. Letztlich rupturiert die äußere Membran, wodurch proapoptotische Faktoren wie der Apoptose induzierende Faktor (AIF) und Cytochrom c ins Zytosol gelangen (engl.: mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP). Vor allem die Freisetzung von Cytochrom c wird als Schlüsselsignal für die Initiierung des irreversiblen Zelltods angenommen. Im Zytosol bindet Cytochrom c zusammen mit dATP an den Apoptose Protease aktivierenden Faktor-1 (Apaf-1) (Kluck et al. 1997; X. Liu et al. 1996). Die dadurch erfolgende Konformationsänderung führt zur Freilegung der Caspasen-rekrutierenden Domäne (CARD) im N-Terminus des Apaf-1 und zur Bindung der Pro-Caspase-9. In diesem auch als Apoptosom bezeichneten Komplex wird die Pro-Caspase-9 über Autokatalyse aktiviert (Chu et al. 2001; Danial & Korsmeyer 2004).

1.8 ZIELSETZUNG

Die ideale Pharmakotherapie ist gekennzeichnet durch hohe Spezifität bei maximaler Sensitivität. Leider ist die Umsetzung dieser Prämisse zur Behandlung zahlreicher Tumore aufgrund der großen genetischen Übereinstimmung maligner Zellen gegenüber physiologisch wachsenden Zellen ausgenommen schwierig. Die vielfach eingesetzten Zytostatika machen sich vor allem die höhere Teilungsrate von Krebszellen als Angriffspunkt zunutze, ihr globaler Effekt und die daraus resultierende Beeinträchtigung gesunder Zellen führen zu einer geringen therapeutischen Breite und limitieren stark ihren Einsatz. Für die Zukunft der Krebstherapie ist es daher wichtig, Mechanismen, die für die gesteigerte Proliferation und Migration, sowie die verminderte Apoptose und Therapieresistenz von Krebszellen verantwortlich sind, zu identifizieren und Strategien zu entwickeln diese zu unterdrücken.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Mechanismen aufzudecken über welche Krebszellen charakterisiert und untereinander abgrenzt werden können, sowie diese durch Stimulation auszulösen und durch Inhibierung zu unterdrücken.

Über ihre entscheidende Rolle bei der Apoptose, der Proliferation und der Zelldifferenzierung repräsentiert die Signaltransduktion über Ca^{2+} -Ionen einen entscheidenden Faktor für die charakteristischen Eigenschaften von Tumoren. Der Ca^{2+} -Ein- und Ausstrom aus internen Speichern und dem Extrazellularraum, sowie deren Regulation über Akt und SGK1, sind dabei entscheidende Elemente.

Mit Hilfe funktioneller und molekularbiologischer Methoden wurden in dieser Arbeit speziell der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom und seine Regulation in Tumorzellen untersucht. Dabei sollte geklärt werden:

- Ob die, den CRAC-Kanal darstellenden Proteine, STIM1 und Orai1, in humanen Ovarialkarzinomzellen und humanen Endometrium Ishikawa-Zellen exprimiert werden.
- Inwieweit die cis-Platin Therapieresistenz von resistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen gegenüber sensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen Akt-abhängig über den SOCE zustande kommt und sich durch Inhibierung von Akt wieder aufheben lässt,
- und ob sich der SOCE in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen SGK1-abhängig über die Stimulation mit TGF β 1 heraufregulieren und durch Inhibierung der SGK1 wieder herabregulieren lässt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien und Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Herkunft
2-APB	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
2x GoTaq [®] qPCR Master Mix	Promega, Madison, USA
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Annexin V-FITC	MabTag, Friesoythe, Deutschland
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
cis-Platin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Basel, Schweiz
DEPC Wasser	Promega, Madison, USA
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Mix	Promega, Madison, USA
DRAQ5 [™]	Biostatus, Leicestershire, England
EGTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EMD 638683	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FuGENE HD	Roche, Basel, Schweiz
Fura-2/AM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immersionsöl	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Meglumin (NMDG)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD TriFast™	VWR International, Erlangen, Deutschland
ProLong® Gold	Invitrogen, Carlsbad, USA
Propidiumiodid	MabTag, Friesoythe, Deutschland
Proteinmarker IV und V	VWR International, Erlangen, Deutschland
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SH-6	Merck, Darmstadt, Deutschland
Silikon	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TGFβ1	Biomol, Hamburg, Deutschland
Thapsigargin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Wasserstoffchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wogonin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
X-tremeGENE 9	Roche, Basel, Schweiz
X-tremeGENE HP	Roche, Basel, Schweiz

2.1.2 Gebrauchsgüter

Bezeichnung	Herkunft
4-Kammer-Objektträger	Becton Dickinson, Franklin Lakes USA
Amersham ECL™	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Amersham Hyperfilm™ ECL™	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
BD Falcon® Multiwell™ Platten	Becton Dickinson, Franklin Lakes USA
BD Falcon® Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes USA
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland

Pasteurpipetten	Wilhelm Ulbrich, Bamberg, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	Corning, Corning, USA
Zellkulturflaschen T75	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Geräte

Bezeichnung	Herkunft
Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Basic pH Meter PB-11	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, USA
ChemiDoc MP Densitometer	Bio-Rad, Hercules, USA
CO ₂ Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Elektronisches Vorschaltgerät XBO 75	Leistungselektronik Jena, Jena, Deutschland
EW-A Analysenwaage	Kern-Sohn, Balingen, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes USA
Lambda 10-2	Sutter Instrument, Novato, USA
Lampenhaus mit 75 W Xenon Lampe	Leistungselektronik Jena, Jena, Deutschland
LSM 5 Exciter	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Magnetrührer R1000	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mini Trans-Blot System	Bio-Rad, Hercules, USA
Objektiv Fluor 40/1.30 Öl	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ProxiCAM HL mit digitaler Kontrolleinheit	Proxitronic, Bensheim, Deutschland
PTC-100® Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Rotina 38R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Vortex-Genie 2 Scientific Industries, Bohemia, USA

2.1.4 Software

Bezeichnung	Herkunft
MetaFluor [®]	Universal Imaging, Downingtown, USA
Quantity One [®]	Bio-Rad, Hercules, USA

2.1.5 Fertigsets

Bezeichnung	Herkunft
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche, Basel, Schweiz

2.1.6 Zellkulturmedien und -lösungen

Bezeichnung	Herkunft
DMEM/F-12	Invitrogen, Carlsbad, USA
FCS	Invitrogen, Carlsbad, USA
L-Glutamin	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
PBS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, Frankreich
Poly-L-Lysine	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
Akt	Cell Signaling, Danvers, USA
GAPDH	Cell Signaling, Danvers, USA
Orai1	Millipore, Billerica, USA

Orai1	ProteinTech, Chicago, USA
Phospho-Akt ^{Thr308}	Cell Signaling, Danvers, USA
Phospho-SGK1 ^{Ser422}	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
SGK1	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
STIM1	Cell Signaling, Danvers, USA
β-Actin	Cell Signaling, Danvers, USA

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
Anti-Kaninchen-FITC	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-Kaninchen-HRP	Cell Signalling, Danvers, USA

2.1.8 Oligonukleotide

(von Invitrogen, Carlsbad, USA)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
GAPDH_fwd	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
GAPDH_rev	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA
Orai1_fwd	CACCTGTTTGCGCTCATGAT
Orai1_rev	GGGACTCCTTCACCGAGTTG
SGK1_fwd	CTTGTATGAGATGCTGTATGGCC
SGK1_rev	CAGCTGGAGAGGCTTGTTTCAG
STIM1_fwd	CCTCGGTACCATCCATGTTGTAGCA
STIM1_rev	GCGAAAGCTTACGCTAAAATGGTGTCT
TBP_fwd	GCCCGAAACGCCGAATAT
TBP_rev	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT

2.1.9 Lösungen/Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Laufpuffer 10x	1,9 M Glycin 250 mM Tris 35 mM SDS
Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 1% (v/v) Triton X-100 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat 0,4% (w/v) β -Mercaptoethanol 1 Tablette Protease-Inhibitor
Ringerlösung pH 7,4 (CRACC)	125 mM NaCl 5 mM KCl 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 2 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 32 mM HEPES 5 mM Glukose (zur Herstellung der Ca^{2+} -freien Ringerlösung wurden die 2 mM CaCl_2 gegen 0,5 mM EGTA ausgetauscht)
Ringerlösung pH 7,4 (NCKX)	90 mM NaCl 40 mM KCl 2 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 2 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM HEPES 10 mM Glukose (zur Herstellung der Na^+ -freien Ringerlösung wurden die 90 mM NaCl gegen 90 mM NMDG ausgetauscht)
Sammelgel (5 ml)	6% (v/v) Acrylamid/Bis-Lösung 30% 630 μl 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
TBS 10x	1,4 M NaCl 200 mM Tris
TBST	10% (v/v) TBS 10x 0,1% (v/v) Tween-20
Transferpuffer	10% (v/v) Transferpuffer 10x 20% (v/v) Methanol

MATERIAL UND METHODEN

Transferpuffer 10x	2,3 M Glycin 200 mM Tris
Trenngel (10 ml)	10% (v/v) Acrylamid/Bis-Lösung 30% 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,01% (v/v) TEMED

2.2 METHODEN

2.2.1 Zell- und molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Die humanen Endometrium Ishikawa-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (1:1, DMEM/F-12) mit und ohne Phenolrot kultiviert. Die therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und die therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert. Zusätzlich wurde den Medien 10% (v/v) fetales Kälber(calf)-serum (FCS) und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S, 10000 Einheiten / 10 mg/ml) Lösung zugesetzt. Ausschließlich die therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen wurden zur Aufrechterhaltung der Resistenz bei jeder dritten Passage mit 1 μ M cis-Platin behandelt. Herangezogen wurden die Zellen in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂. Nach Erreichen einer Konfluenz von circa 90% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Wachstumsmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für circa 2-5 min mit Trypsin-EDTA behandelt (37 °C, 5% CO₂), bis die adhären Zellen durch leichtes Klopfen gegen den Flaschenboden abgelöst werden konnten. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von Wachstumsmedium gestoppt und die Zellen auf neue Kulturflaschen verteilt.

2.2.1.2 Zellyse

Zur möglichst verlustfreien Gewinnung von Proteinen wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit einem geeigneten Volumen an Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde das Lysat in Reaktionsgefäße überführt, bei 4 °C zuerst 10 min inkubiert und danach für 15 min bei 13000 g zentrifugiert. Die durch die Lyse entstandenen Zelltrümmer ließen sich so vom Überstand trennen. Dieser wurde abgenommen, in neue Reaktionsgefäße überführt und zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Transfektion

Um sowohl humane Endometrium Ishikawa-Zellen als auch therapiesensitive A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistente A2780cis Ovarialkarzinomzellen zu transfizieren, wurden die Transfektionsreagenzien FuGENE HD, X-tremeGENE 9 und X-

tremeGENE HP verwendet. Dabei werden die negativ geladenen Nukleinsäure Moleküle (hSGK1^{SD} und hSGK1^{KN} in pcDNA 3.1(+) oder pIRES-EGFP; hAkt^{DD} und hAkt^{AA} in pcDNA 3.1(+)) mit Hilfe eines nicht liposomalen, urheberrechtlich geschützten Cocktails aus Lipiden und nicht näher bezeichneten weiteren Komponenten über die elektrostatische Barriere der negativ geladenen Zellmembran transportiert. Hierfür wurden die Zellen in Kulturschalen geeigneter Größe ausgesät, und für circa 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bis der Zellrasen eine Konfluenz von 50-80% aufwies. Anschließend wurde die DNA mit FCS- und P/S –freiem Wachstumsmedium verdünnt und mit dem Transfektionsreagenz nach entsprechenden Herstellerangaben im Verhältnis DNA:Transfektionsreagenz von 1:2 bis 2:6 vermischt. Nach 15-25 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsmix tropfenweise zu den Zellen pipettiert und die Zellen für 24 bis 96 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Um die Proteinkonzentration von Zellysaten zu bestimmen wurden 2 µl des Lysats zu 1 ml 1fach Bradfordreagenz (M. M. Bradford 1976) gegeben, stark vermischt und spektrometrisch untersucht. Durch den im Reagenz enthaltenen Triphenylmethanfarbstoff, Coomassie-Brilliant-Blau G-250, welcher in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bilden kann, kommt es zu einer Verschiebung des Maximums im Absorptionsspektrums des Farbstoffes von der Wellenlänge λ_{470} zu λ_{595} . Der Anstieg der Absorption bei der Wellenlänge λ_{595} ist dabei proportional zur Menge an Protein.

2.2.1.5 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen (Porengröße und pH-Wert) Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden zunächst ein 10%iges Trenn-Gel mit aufgesetztem 6%igem Sammel-Gel gegossen. Bevor die Proteinproben mit möglichst gleicher Konzentration oder gleichen Volumina auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden, wurden sie zunächst mit Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Um später die Größe bzw. das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurde in mindestens einer Bahn des Gels ein Proteinmarker mit entsprechenden Größenstandards mitlaufen gelassen. Die eigentliche Trennung erfolgte schließlich durch Wanderung der durch SDS denaturierten und gleichmäßig negativ geladenen Proteine (konstantes Ladungs/Gewichts-Verhältnis) im elektrischen Feld, einer mit

Laufpuffer gefüllten Elektrophorese-Kammer (Laemmli 1970). Die Proben wurden dafür zunächst bei einer angelegten Spannung von 70 V für circa 30 min durch das Sammel-Gel und anschließend mit 120 V durch das Trenn-Gel geleitet.

2.2.1.6 Western Blot

Die Übertragung der Proteine im sogenannten Tank-Blot-Verfahren erfolgte erneut durch Elektrophorese. Dabei wurden die einzelnen Banden auf eine zur Weiterbearbeitung geeignetere PVDF- oder Nitrozellulose-Membran „geblottet“. Nachdem das Trenn-Gel in circa 4-8 °C kaltem Transfer-Puffer für 5 min äquilibriert wurde, erfolgte der Elektrotransfer der Proteine bei einer Stromstärke von 300 mA für circa 90 min im senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feld.

2.2.1.7 Proteindetektion

Zur Detektion von „geblotteten“ Proteinen wurde die Membran zunächst mit einer 5%igen Milchpulver/TBST-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde sie mit primärem Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert (Orai1 (1:1000 und 1:500), STIM1 (1:1000), Akt (1:1000), phospho-Akt^{Thr308} (1:1000), SGK1 (1:1000), phospho-SGK1 (1:1000) GAPDH (1:1000) und β -Actin (1:1000)), im nächsten Schritt dreimalig für 10 min mit TBST gewaschen und danach für 1 h bei Raumtemperatur mit HRP (Meerrettich-Peroxidase, engl.: horseradish peroxidase) -gekoppelten sekundärem Antikörper inkubiert (1:2000). Bevor die Membran für 5 min bei Raumtemperatur mit ECL-Detektionsreagenz behandelt wurde, wurde sie erneut gründlich, sechsmalig für 10 min mit TBST gewaschen. Die durch Reaktion der HRP mit dem Detektionsreagenz auftretende Chemilumineszenz wurde zur Belichtung von speziellen Foto-Folien genutzt. Die daraus resultierende Farbdichte des Bildes ist proportional zur Proteinkonzentration. Die belichteten und entwickelten Filme wurden anschließend mit einem speziellen Scanner aufgenommen und die Proteinbanden/Konzentration mit Hilfe der Quantity One[®] Software densitometrisch ausgewertet.

2.2.1.8 Immunfluoreszenz-Messung

Um Proteine optisch darzustellen wurden 5×10^4 therapiesensitive A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistente A2780cis Ovarialkarzinomzellen in Zellkulturkammern ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch ein Aceton:Methanol Gemisch (1:1) fixiert und zusätzlich mit 0,5%

Triton-X-100/PBS (v/v) für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Dieser letzte Schritt eröffnet die Möglichkeit intrazelluläre Proteine für Antikörper zugänglich und damit sichtbar zu machen. Die Markierung von Orail erfolgte mit einem primären anti-Orail Antikörper (2 µg/ml) für 2 h bei Raumtemperatur, nachdem zuvor die unspezifischen Bindungsstellen bei Raumtemperatur mit 5% BSA/PBS (w/v) blockiert wurden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen dreimal mit 5% BSA/PBS (w/v) gewaschen, und mit dem sekundären Antikörper anti-Kaninchen-FITC (1:500) im Dunkeln für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DRAQ5™ (1:2000) für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 5% PBS (w/v), zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich mit ProLong® Gold Einbettmedium fixiert, und bis zur Detektion bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Zur Untersuchung wurden die Zellen durch einen Laser mit Licht der Wellenlänge λ_{488} (FITC) und λ_{633} (DRAQ5) angeregt und die Emission bei λ_{505} und λ_{650} mit einem LSM 5 EXCITER Laserscan Mikroskop ermittelt.

2.2.1.9 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA wurden humane Endometrium Ishikawa-Zellen, therapiesensitive A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistente A2780cis Ovarialkarzinomzellen in 1 ml TriFast Reagenz lysiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Chloroform zugegeben, das Gemisch stark durchmischt und für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Extraktion der RNA wurde das Gemisch zur Auftrennung der Phasen bei 4 °C und 12000 g für 15 min zentrifugiert. Die resultierende, obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zu gleichen Teilen mit Isopropanol vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 15 min. Der so entstandene Überstand wurde vollständig entfernt, das zurückgebliebene Pellet für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss mit 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert, für 15 min bei 55 °C gelöst und die RNA-Konzentration bestimmt. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Ansatz danach mit Hilfe des RNeasy Mini Clean Up Kits nach Herstellerprotokoll behandelt, und zur Erhöhung der Ausbeute zweimal mit jeweils 30 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die finale Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte wie zuvor photometrisch bei den Wellenlängen λ_{260} und λ_{280} .

2.2.1.10 cDNA-Synthese

Zur Gewinnung der cDNA wurden 2 µg RNA mit 7 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt, mit 5 µl Random Hexamer Oligonukleotid (50 ng/µl) versetzt und bei 70 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 5fach Erst-Strang-Puffer, 2 µl DTT (100 mM) und 1 µl dNTPs (10 mM) dazu gegeben und zunächst 10 min bei 25 °C und danach 2 min bei 42 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 1 µl Superscript Reverse Transkriptase (200 U/ml) zum Probenansatz pipettiert und für 60 min bei 42 °C inkubiert. Zum Stoppen der Synthese und Aufreinigung des Produkts wurde die Temperatur für 10 min auf 70 °C erhöht und der Probenansatz mit 1 µl RNase H (1 U/µl) für 20 min bei 37 °C verdaut.

2.2.1.11 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur Bestimmung der mRNA-Expressionslevel wurde folgender Ansatz verwendet:

10	µl	2x GoTaq® qPCR Master Mix
x	µl	vorwärts Primer (finale Konzentration 500 nM)
y	µl	rückwärts Primer (finale Konzentration 500 nM)
4	µl	cDNA
ad 20	µl	Nuklease-freies Wasser.

Die PCR wurde mit einer 96-Wannen-Reaktionsplatte in einem CFX96 Echtzeit PCR Detektionssystem durchgeführt und ein Programm gefahren, bei dem auf die initiale Denaturierung für 2 min bei 95°C, 39 Zyklen mit jeweils 15-sekündiger Denaturierung bei 95°C und zwei weitere Temperaturschritte mit 15 Sekunden bei 58°C und 20 Sekunden bei 68°C folgten. Die anschließende Auswertung erfolgte durch Analyse der Grenzwerte nach Pfaffl (Pfaffl 2001).

2.2.2 Funktionelle Methoden

2.2.2.1 Ca²⁺-Messung

Die Fura-2¹ Fluoreszenzmessung, zur Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erfolgte mit einem Phasen-Kontrast Mikroskop. Dazu wurden 100000-300000 der jeweiligen Zellen am Vortag der Messung auf einem runden Deckglas (30 mm Durchmesser) in einer Petrischale (35 mm Durchmesser) ausgesät und über Nacht in Medium inkubiert. Das Deckglas mit den adhärennten Zellen wurde nach circa 24 h vorsichtig entnommen und durch Silikonpaste mit der Messkammer verbunden. Innerhalb der Messkammer wurden die Zellen darauf für 30 min bei 37 °C und 15 min bei Raumtemperatur (ca. 20-25 °C) mit 2 µM Fura-2/AM inkubiert und anschließend auf das Mikroskop montiert. Darauf wurden die Zellen kontinuierlich mit temperierter (37 °C) Ringerlösung überströmt, und mit Beginn der Messung alle 10 s abwechselnd, in direkter Folge mit Licht der Wellenlängen λ_{340} und λ_{380} angeregt wurden. Das Anregungslicht wird dabei von einer (Xe)-Lampe emittiert, in deren Strahlengang ein Filtrerrad montiert ist, welches die Fura-2 Anregungswellenlängen aus dem kontinuierlichen UV-Spektrum herausfiltert. An einem dichroitischen Spiegel wird das Licht reflektiert und durch die Zellen in der Messkammer geleitet, worauf das von den, mit Fura-2 beladenen Zellen emittierte Fluoreszenzlicht λ_{505} in entgegengesetzter Richtung den Spiegel passiert und von einer CCD Kamera (engl.: charge-coupled device) detektiert wird. Das so

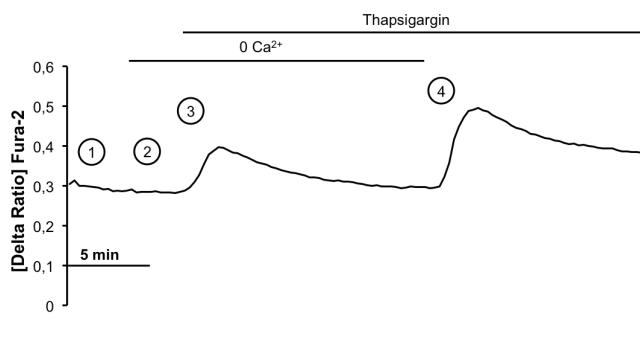


Abb. 2-1 Messung des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms

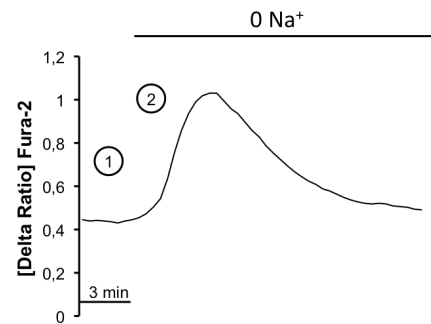
Um den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom (SOCE) zu bestimmen wurden die Zellen zunächst mit Ca²⁺-haltiger Standard-Ringerlösung überströmt (Phase 1), welche anschließend gegen Ca²⁺-freie Ringerlösung ausgetauscht wurde (Phase 2). Im weiteren Messverlauf wurde eine 1µM Thapsigargin¹ haltige Ca²⁺-freien Ringerlösung verwendet (Phase 3), die wiederum von einer Ca²⁺-haltigen Standard-Ringerlösung abgelöst wurde (Phase 4) (Bird et al. 2008).

¹ **Fura-2** ist ein Ca²⁺-sensitiver Fluoreszenz-Farbstoff mit dessen Hilfe die freie Ca²⁺-Konzentration bzw. deren relative Änderung innerhalb von Zellen bestimmt werden kann. Es handelt sich dabei um einen „Doppel-Wellenlängen-Indikator“, der durch Ca²⁺-Bindung einen Wechsel der Anregungswellenlänge durchmacht. Die maximale Absorption der Ca²⁺-freien Form wird bei λ_{363} erreicht, die der Ca²⁺-beladenen Form bei λ_{335} . Beide Konformationen emittieren Licht der Wellenlänge λ_{500} . Dadurch lassen sich Verhältnismessung durchführen und der Verlauf des intrazellulären Ca²⁺-Status bei sich ändernden äußeren Bedingungen verfolgen. Da das Absorptionsmaximum der Ca²⁺-freien Form (λ_{363}) sehr nah am Isosbestischen-Punkt (λ_{360}) der Verbindung liegt und Ca²⁺-freies Fura-2 bei Wellenlängen $\lambda > 370\text{nm}$ besser Licht emittiert als Ca²⁺-beladenes Fura-2, werden für die eigentliche Messung λ_{340} und λ_{380} bevorzugt.

entstandene Signal wird über eine spezielle Software (MetaFluor[®]) abgebildet, und die Daten anschließend in Excel exportiert und ausgewertet.

Abb. 2-2 Messung der NCKX-Aktivität

Zur Bestimmung der NCKX-Aktivität wurden die Zellen zunächst mit Standard- (Phase 1) und anschließend mit Na⁺-freier-Ringerlösung überspült (Phase 2).



2.2.2.2 Durchflusszytometrie (FACS) / Apoptose

Zur Bestimmung des programmierten Zelltodes von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen wurde zunächst das Medium aspiriert, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach mit Trypsin-EDTA behandelt (3-5 min), bis die Zellen sich durch leichtes Klopfen gegen den Schalenboden ablösen, und die Reaktion anschließend durch Zugabe von Wachstumsmedium gestoppt. In den nächsten Schritten wurde die Zellsuspension zentrifugiert (3 min, 400 g, Raumtemperatur), zweimal mit PBS gewaschen und mit eiskaltem (4 °C) 70%igem (v/v) Ethanol zu 10⁵ Zellen pro 100 µl resuspendiert und auf Eis inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert (3 min, 400 g, 4 °C) und der Zellkuchen in 200 µl hypotonischem Puffer mit 24 µl/ml Annexin V-FITC und 50 µg/ml Propidiumiodid resuspendiert, und weitere 60 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen einmal für 3 min bei 4 °C zentrifugiert, der ethanolische Überstand aspiriert und die Zellen in PBS/BSA(1%, m/v) resuspendiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie in einem Fluss-Sortierer wurden die Zellen darauf umgehend bei einer Anregungswellenlänge von λ_{488} und Emissionswellenlänge von λ_{530} (FL-1) gegen λ_{585} (FL-2) vermessen.

2.2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit SEM als Standardfehler und mit n als Anzahl der durchgeführten Experimente angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitig gepaarten-, dem ungepaarten t-Test oder dem Dunnett's-Test (ANOVA) festgestellt. Ergebnisse mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (Fehler-Probabilität) $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 AKT-ABHÄNGIGE REGULATION DES SPEICHERABHÄNGIGEM CA²⁺-EINSTROMS (SOCE) IN OVARIALKARZINOMZELLEN

3.1.1 Bestimmung der SGK1 und Akt/PKB Proteinlevel

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Therapieresistenz und Aggressivität verschiedener Tumore über SGK1 (Lang et al. 2010) und Akt/PKB (Vivanco & Sawyers 2002) reguliert werden. Um diesen Mechanismus weiter zu ergründen, wurden in der vorliegenden Arbeit therapiesensitive A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistente A2780cis Ovarialkarzinomzellen² auf die Proteinexpression von phospho-SGK1/SGK1 und phospho-Akt/Akt (siehe Abb. 3-1) untersucht. Mit Hilfe der Westernblot Technik wurden die Zelllysate der beiden Zelllinien zuerst in einem 10%igen SDS-Gel, mittels Gel-Elektrophorese, aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (siehe Kapitel 2.2.1.7). Nach Inkubation der Membran mit den für SGK1, phospho-SGK1, Akt und phospho-Akt spezifischen primären Antikörpern und der darauffolgenden Behandlung mit einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper wurden die Banden chemiluminometrisch quantitativ ausgewertet. Die ermittelte Proteinmenge des phosphorylierten Proteins wurde ins Verhältnis zur ermittelten Proteinmenge des entsprechend nicht phosphorylierten Proteins gesetzt (phospho-Protein/Protein). Als Ergebnis der Westernblot Untersuchung ergab sich ein signifikant höheres phospho-Akt/Akt Proteinmengenverhältnis in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen als in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen. Die Auswertung in Hinblick auf das

² Nach Brust-, Darm, Lungen- und Gebärmutterkrebs ist das **Ovarialkarzinom** mit 4,8% der am fünfthäufigsten vorkommende Tumor bei Frauen in Deutschland. Jedes Jahr erkranken hierzulande circa 9600 Frauen. Die Beschwerden erstrecken sich über diffuse abdominale Schmerzen, neu aufgetretenen Meteorismus, Veränderungen der Stuhlgewohnheiten, unklare Gewichtsabnahme und massive Bauchumfangszunahme. Aufgrund der unspezifischen Symptomatik werden 70% der Ovarialkarzinome erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und enden insgesamt in circa 60% der Fälle mit dem Tod. Rund 10% der Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt. Am häufigsten sind dabei Mutationen im BRCA1 und BRCA2 Gen (engl.: breast cancer 1 und 2). Die mit einem 36-46%igem bzw. 10-27%igem Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, verbunden sind (Borges & Schmalfeldt 2011).

phospho-SGK1/SGK1 Proteinmengenverhältnis ergab keine signifikanten Unterschiede. Als Haushaltprotein (engl.: housekeeping protein), dessen Proteinmenge von einem konstitutiv reguliertem Gen abhängt, wurde GAPDH verwendet.

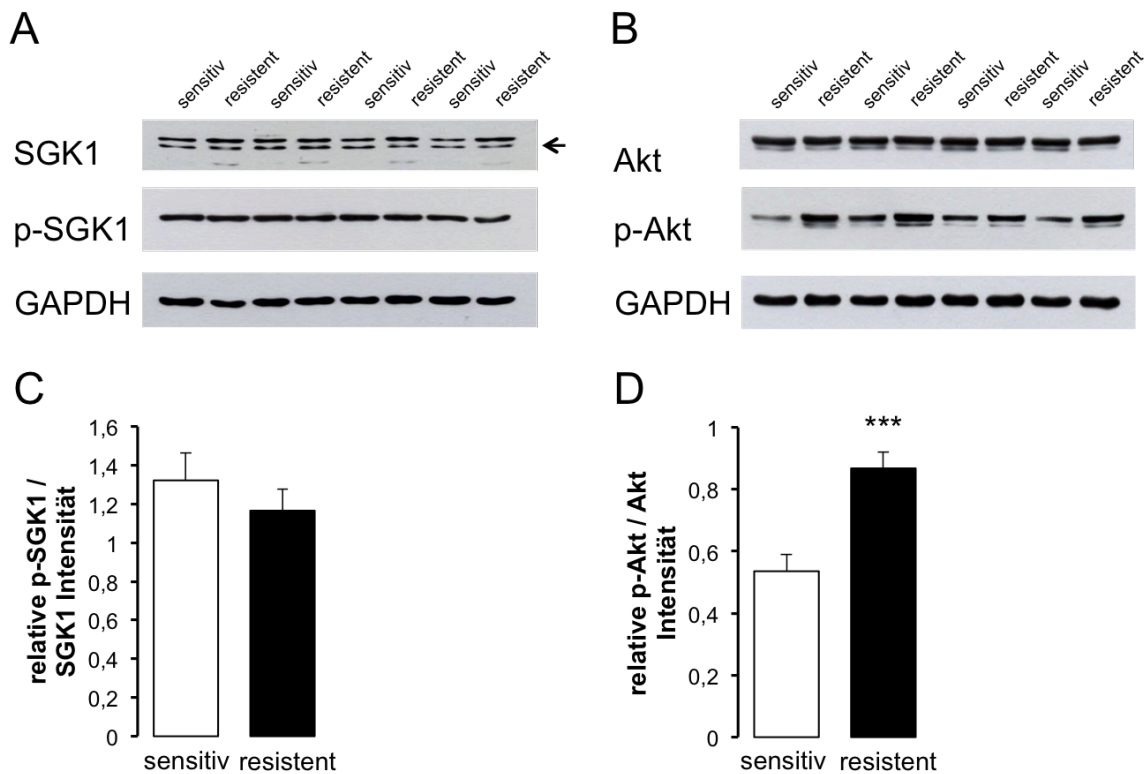


Abb. 3-1 Proteinlevel von SGK1 und phospho-SGK1 sowie Akt/PKB und phospho-Akt/PKB in therapiesensitiven und therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen

A. Original Westerblot des Zellysats von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen auf SGK1 und phospho-SGK1. Zur Ladungskontrolle wurde ein anti-GAPDH Antikörper verwendet. **B.** Original Westerblot des Zellysats von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen auf Akt und phospho-Akt. Zur Ladungskontrolle wurde ein anti-GAPDH Antikörper verwendet. **C.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=4) des Verhältnisses der Proteinmenge von phospho-SGK1/SGK1 in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Balken) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Balken). **D.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=4) des Verhältnisses der Proteinmenge von phospho-Akt/Akt in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Balken) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Balken). *** ($p < 0,001$) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied therapieresistenter- gegenüber therapiesensitiven Ovarialkarzinomzellen.

3.1.2 Bestimmung der mRNA-Level von Orail und STIM1

Wie vorangehend gezeigt werden konnte, besitzen therapieresistente A2780cis Ovarialkarzinomzellen bedeutend höhere phospho-Akt Proteinkonzentrationen als therapiesensitive A2780 Ovarialkarzinomzellen (siehe Abb. 3-1). Da Akt/PKB an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen beteiligt ist (Manning & Cantley 2007), wurde mit Hilfe der RT-PCR Technik (siehe Kapitel 2.2.1.11) untersucht, ob Ovarialkarzinomzellen

Orai1 und/oder STIM1 transkribieren, und inwieweit Unterschiede bei den Transkriptionsleveln zwischen therapiesensitiven A2780 Zellen und therapieresistenten A2780cis Zellen existieren. Dazu wurden Zellen beider Zelllinien lysiert und die mRNA-Level von Orai1 und STIM1 bestimmt. Hierbei wurden Oligonukleotide verwendet, die an Exons der Gene Orai1 und STIM1 binden (siehe Kapitel 2.1.8). Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde das TATA-Box-Bindeprotein mit den entsprechenden Oligonukleotiden verwendet (siehe Kapitel 2.1.8). Die Normierung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Pfaffl (Pfaffl 2001). Wie die Auswertung der RT-PCR Untersuchung zeigt (siehe Abb. 3-2), exprimieren beide Zelllinien Orai1 und STIM1. Die mRNA-Level der therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen sind dabei signifikant höher als die der therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen.

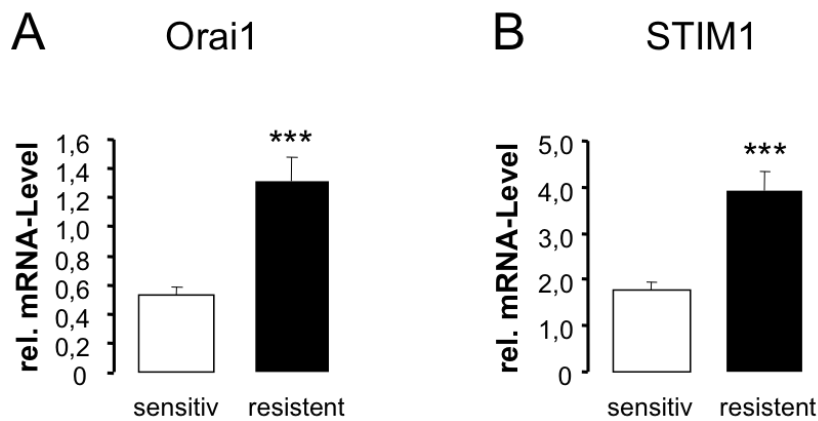


Abb. 3-2 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von Orai1 und STIM1 in therapieresistenten- und therapiesensitiven Ovarialkarzinomzellen

A.B. Normierte Mittelwerte \pm SEM (n=9) der relativen mRNA-Level von Orai1 (A) und STIM1 (B) in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Balken) und in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Balken). ***

($p < 0,001$) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied therapieresistenter- gegenüber therapiesensitiven Ovarialkarzinomzellen.

3.1.3 Bestimmung der Proteinlevel von Orai1 und STIM1

In Übereinstimmung mit den Unterschieden der Orai1 und STIM1 Transkriptionslevel ergab auch die Analyse mit Hilfe der Westernblot-Technik einen vergleichbaren Unterschied der Proteinlevel. Abbildung 3-3 zeigt, dass die Orai1 und STIM1 Proteinexpression in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen signifikant höher ist als in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen.

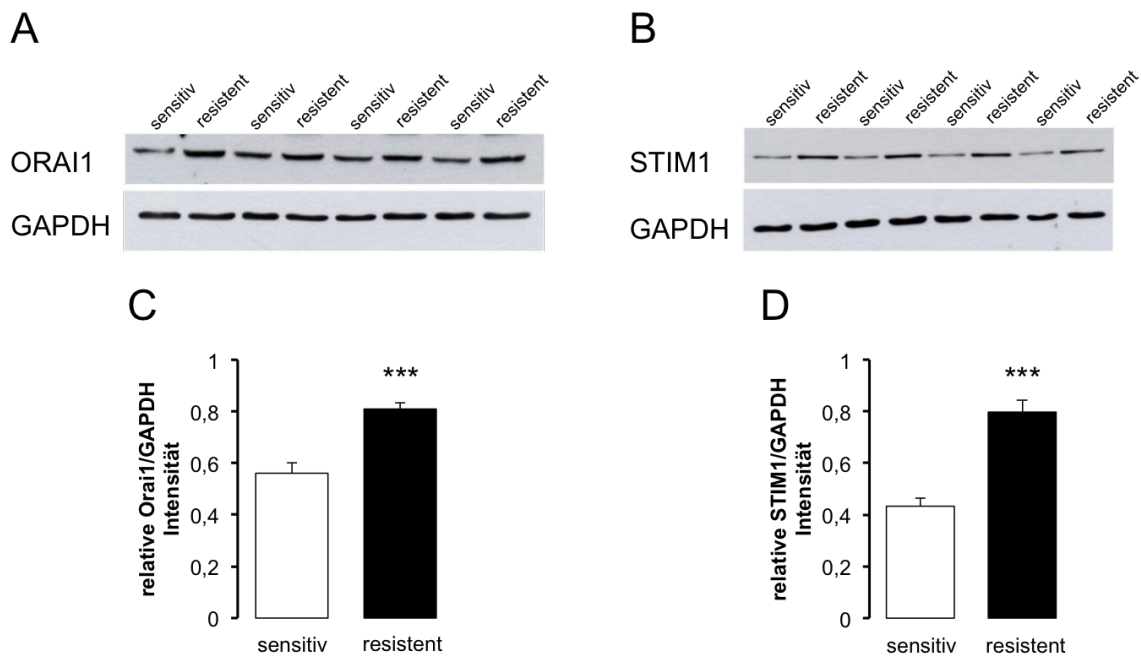


Abb. 3-3 Bestimmung der Proteinlevel von Orai1 und STIM1 in therapi sensitiven und therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen

A.B. Original Westernblot des Zelllysats von therapi sensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen auf Orai1 (A) und STIM1 (B). Zur Ladungskontrolle wurde anti-GAPDH Antikörper verwendet. **C.D.** Statistische Mittelwerte \pm SEM ($n = 4$) des Orai1/GAPDH (C) und STIM1/GAPDH (D) Proteinverhältnisses in therapi sensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Balken) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Balken). *** ($p < 0,001$) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied therapieresistenter- gegenüber therapi sensitiven Ovarialkarzinomzellen.

3.1.4 Untersuchung von Orai1 in der Plasmamembran

Das erhöhte Vorkommen von Orai1 in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen hinsichtlich der mRNA-Transkriptionslevel und Proteinlevel sollte im Anschluss mittels Immunfluoreszenz validiert werden. Zur Detektion von Orai1 wurden die Zellen fixiert, und nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels 5% BSA/PBS (w/v) mit einem primären Orai1-spezifischem Antikörper behandelt (siehe Abb. 3-4). Daraufhin wurden die Zellen mit einem sekundären FITC-gekoppeltem Antikörper inkubiert, und der Zellkern mit Hilfe von DRAQ5 gefärbt. Abbildung 3-4 zeigt das durch Immunfluoreszenz markierte Orai1 nach Anregung von FITC mit einem Laser bei λ_{488} (grün). Die höchste Fluoreszenzintensität von FITC konnte in der Membran der therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen bestimmt werden.

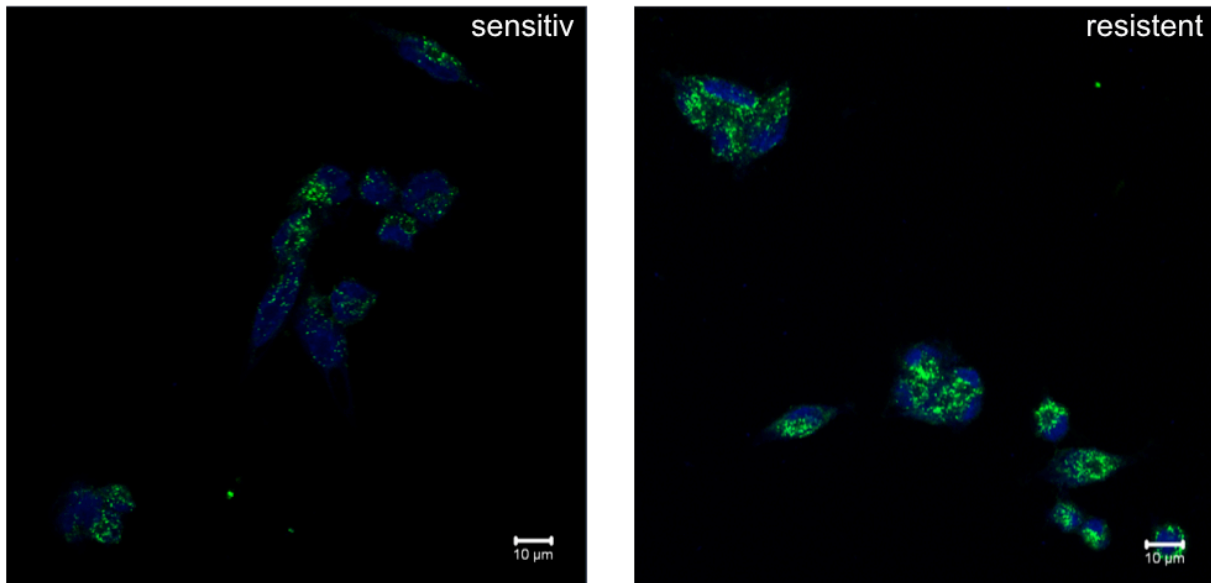


Abb. 3-4 Immunfluoreszenz von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (links) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (rechts) nach Orai1-selektiver FITC-Antikörpermarkierung (grün).

Repräsentative Abbildungen aus sechs verschiedenen Experimenten, bei denen jeweils 5-15 Zellen untersucht wurden (grün: Orai1, blau: Zellkern). Die FITC-Fluoreszenzintensität war in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen höher als in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen.

3.1.5 Bestimmung von SOCE und I_{CRAC}

Durch intrazelluläres Ca^{2+} -Imaging (siehe Kapitel 2.2.2.1) mit Hilfe der Fura-2 Fluoreszenzmessung wurde getestet, ob die unterschiedlichen Orai1 und STIM1 Transkriptions- und Proteinlevel einhergehen mit übereinstimmenden Unterschieden beim speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom. Bevor dem System Ca^{2+} -Ionen extrazellulär entzogen wurden, war das Fura-2 Fluoreszenz-Verhältnis in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen ($0,298 \pm 0,003$ willkürliche Einheiten (w. E.), $n=7$) ähnlich dem Verhältnis in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen ($0,309 \pm 0,003$ w. E., $n=7$). Das Hinzugeben von $1 \mu M$ Thapsigargin führte zu einem schnellen, transienten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und zur Aktivierung des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms. Das Ausmaß, dieses durch Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} -Ionen ausgelösten Ca^{2+} -Anstiegs, war in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen vergleichbar (siehe Abb. 3-5). Wie Abbildung 3-5 zeigt, führt die nachfolgende Zugabe extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen in beiden Zelltypen zu einem, den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom darstellenden, schnellen Anstieg der Fura-2-Fluoreszenz. Dabei werden die mit Fura-2/AM beladenen Zellen abwechselnd mit Licht der Wellenlänge λ_{340} und λ_{380} angeregt und jeweils die Emission bei der Wellenlänge

λ_{505} bestimmt. Als Maß für die intrazelluläre Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration wurde der Anstieg (Geschwindigkeit) und das Maximum (Konzentrationszunahme) der Kurve über das Verhältnis $\lambda_{340}/\lambda_{380}$ (Delta Ratio) bestimmt. Sowohl das Maximum als auch die Geschwindigkeit des Anstiegs mit der die Ca^{2+} -Ionen in die Zelle strömen, waren dabei in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen signifikant höher als in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen.

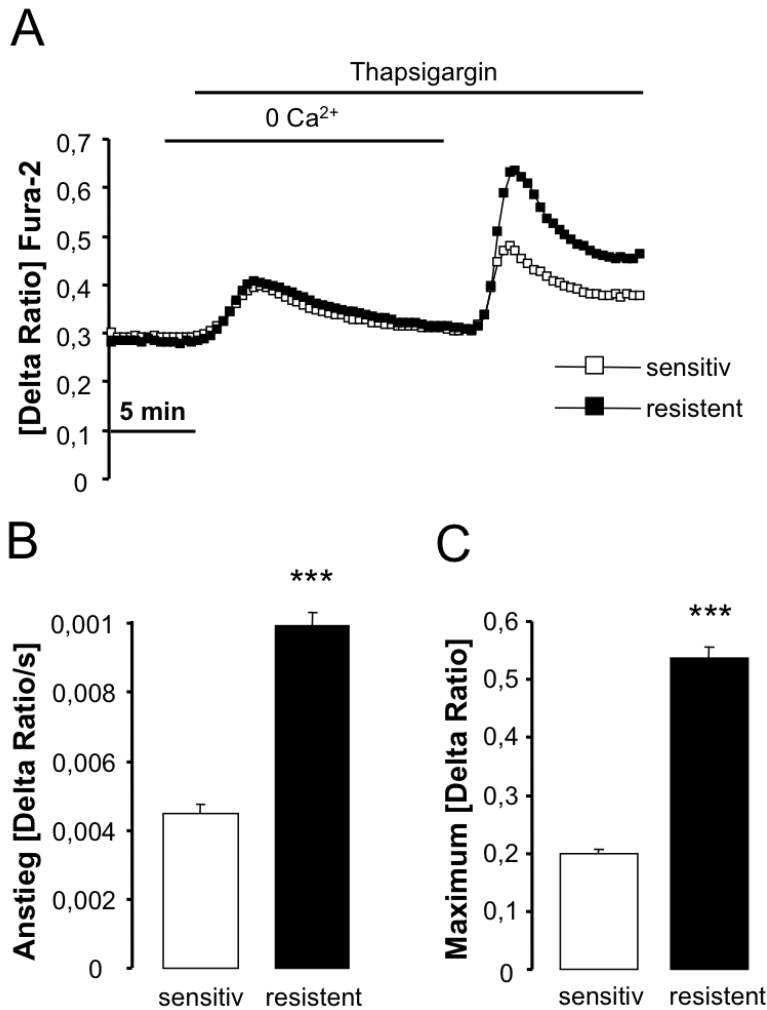


Abb. 3-5 Intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und speicherabhängiger Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen

A. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Quadrate) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Quadrate). Wo dargestellt, befanden sich die Zellen in Ca^{2+} -freier (0 Ca^{2+}) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin ($1 \mu\text{M}$) behandelt um eine Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (SOCE). **B.C.** Statistische Mittelwerte \pm SEM ($n = 7$, jedes Experiment 10-30 Zellen) des Anstiegs (B) und Maximums (C) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} in

therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Balken) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Balken). *** ($p < 0,001$) kennzeichnet den statistisch signifikanten Unterschied therapieresistenter- gegenüber therapiesensitiven Ovarialkarzinomzellen.

3.1.6 Einfluss des Orai1-Inhibitors 2-APB und des Akt/PKB-Inhibitors

SH-6 auf SOCE und I_{CRAC}

Um zu beweisen, dass der durch den Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) dargestellte Ca^{2+} -Einstrom, nach erneutem zuführen von Ca^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin, tatsächlich den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom über Orai-Kanäle darstellt, wurden die Zellen mit dem Orai1-Inhibitor 2-APB (50 μ M) behandelt. Dadurch konnte das Maximum des Ca^{2+} -Einstroms in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen von $0,19 \pm 0,02$ w. E. (n = 6) auf $0,07 \pm 0,01$ w. E. (n = 5) und in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen von $0,49 \pm 0,03$ w. E. (n = 6) auf $0,04 \pm 0,01$ w. E. (n = 5) gesenkt werden (siehe Abb. 3-6). Für den Nachweis, dass das Ausmaß der phospho-Akt/PKB Expression von entscheidender Bedeutung für den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom ist, wurden Fura-2-Fluoreszenzexperimente in An- und Abwesenheit des Akt/PKB-Inhibitors III (SH-6) durchgeführt (siehe Abb. 3-6). Bevor durch die Zugabe von Thapsigargin (1 μ M) der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom angeregt wurde, führte die vorausgegangene Behandlung mit SH-6 (10 μ M) zu keinem Unterschied der Fura-2-Fluoreszenz zwischen therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen ($0,35 \pm 0,01$ w. E., n=6) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen ($0,35 \pm 0,01$ w. E., n=6). Auch der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, ausgelöst durch die Thapsigargin-bedingte Entleerung der intrazellulären Speicher, war, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von SH-6, in beiden Zelltypen vergleichbar (siehe Abb. 3-6). Der schnelle und massive Ca^{2+} -Anstieg allerdings, welcher nach Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen erfolgt, wurde in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen durch SH-6 signifikant verringert (siehe Abb. 3-6). Bei Anwesenheit von SH-6 konnte kein signifikanter Unterschied des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms zwischen therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen und therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen festgestellt werden.

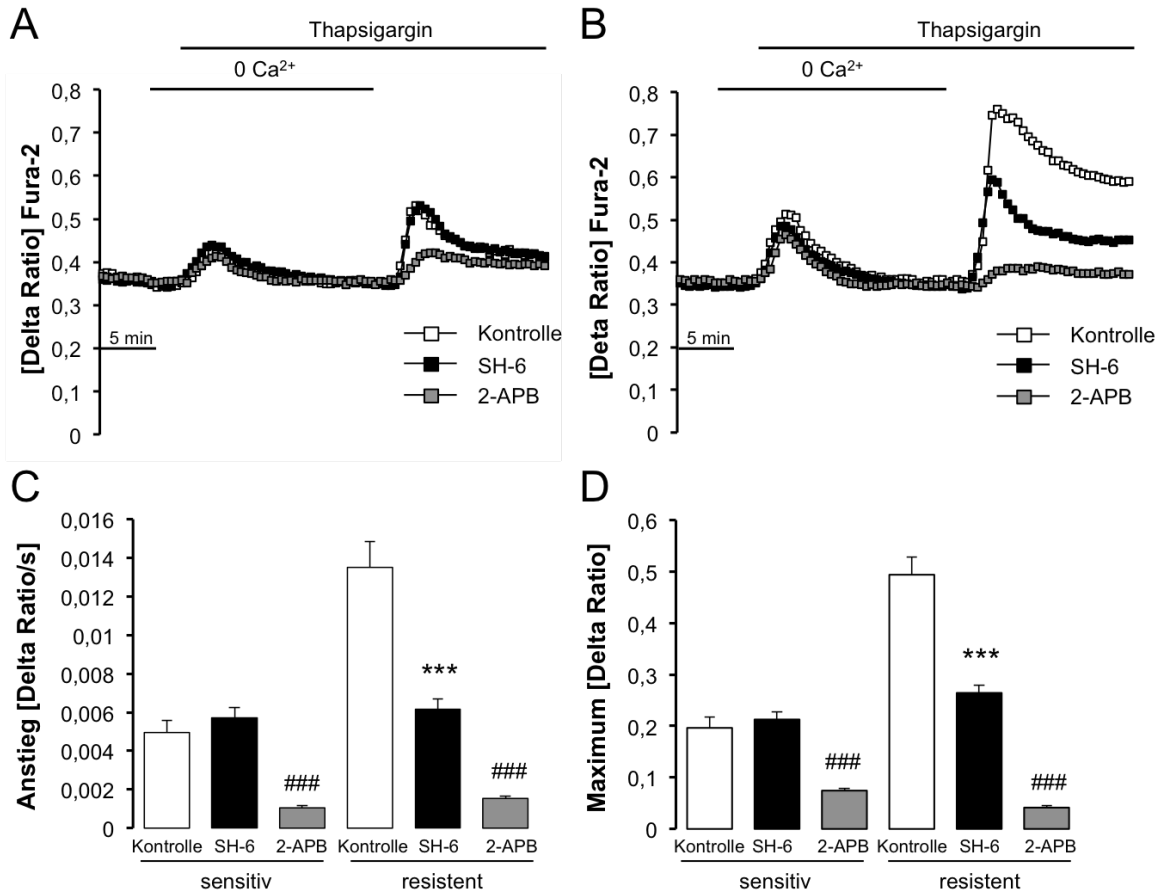


Abb. 3-6 Effekt des Orai1-Inhibitors 2-APB und des Akt/PKB-Inhibitors SH-6 auf die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung und den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen

A.B. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (A) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (B). Wo dargestellt, wurden die Zellen mit DMSO (1 %, weiße Quadrate), dem Orai1-Inhibitor 2-APB (50 μ M, graue Quadrate) oder dem Akt/PKB-Inhibitor SH-6 (10 μ M, schwarze Quadrate) behandelt und befanden sich in Ca²⁺-freier (0 Ca²⁺) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin (1 μ M) behandelt, um eine Entleerung der internen Ca²⁺-Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca²⁺-Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom (SOCE). **C.D.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=5-6, jedes Experiment 10-30 Zellen) des Anstiegs (C) und Maximums (D) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca²⁺-Ionen in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (sensitive) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (resistent). Wo dargestellt, wurden die Zellen mit DMSO (1 %, weiße Balken), dem Orai1-Inhibitor 2-APB (50 μ M, graue Balken) oder dem Akt/PKB-Inhibitor SH-6 (10 μ M, schwarze Balken) behandelt. *** und ### (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber mit DMSO behandelten Zellen.

3.1.7 Einfluss des SGK1-Inhibitors EMD638683 auf SOCE und I_{CRAC}

Nachdem gezeigt werden konnte, dass zwischen therapiesensitiven- und therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des phospho-SGK1/SGK1 Proteinmengenverhältnis existiert (siehe Abb. 3-1), konnte des Weiteren verifiziert werden, dass die SGK1 in Hinblick auf den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom in A2780

Ovarialkarzinomzellen eine untergeordnete Rolle spielt. Dazu wurden therapieresistente A2780cis Ovarialkarzinomzellen mit und ohne SGK1-Inhibitor EMD638683 (50 μM) behandelt und das Fura-2-Fluoreszenzverhältnis ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) fluoreszenzspektroskopisch aufgezeichnet (siehe Abb. 3-7). Die Behandlung mit EMD638683 (50 μM) führte zu keinem Unterschied der Fura-2-Fluoreszenz zwischen behandelten, und unbehandelten therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Sowohl der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, ausgelöst durch die Thapsigargin-bedingte Entleerung der internen Speicher, als auch der schnelle Ca^{2+} -Anstieg nach Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen, waren, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von EMD638683, vergleichbar (siehe Abb. 3-7).

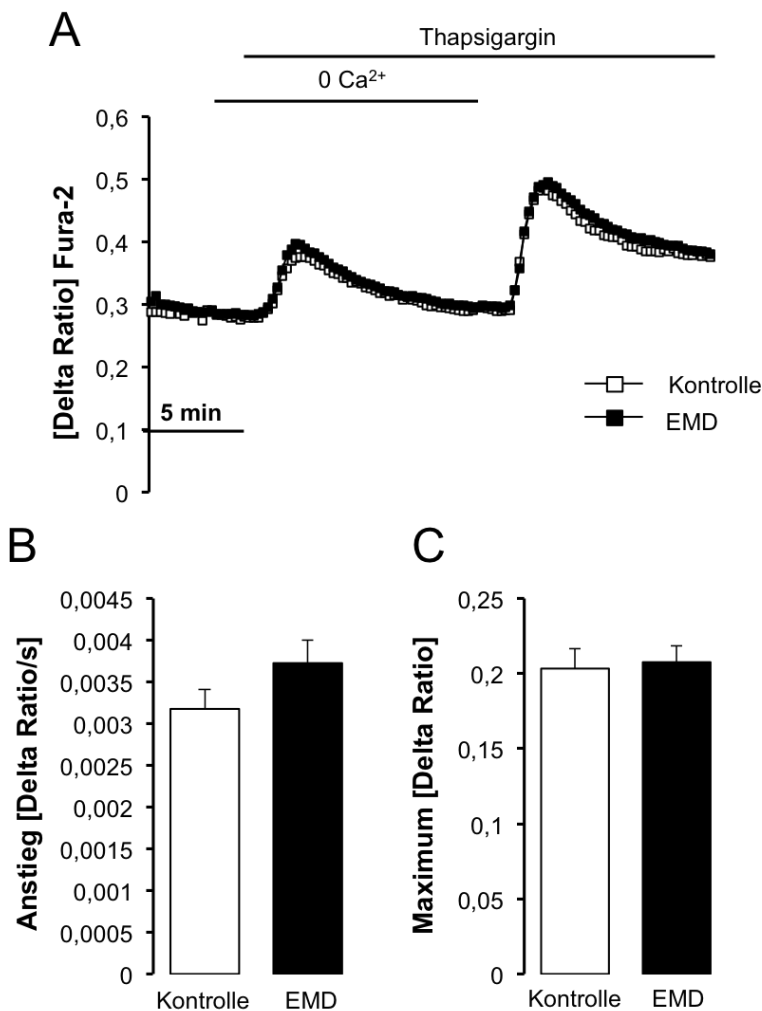


Abb. 3-7 Effekt des SGK1-Inhibitors EMD638683 auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen

A. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Wo dargestellt, wurden die Zellen mit DMSO (1 %, weiße Quadrate) oder dem SGK1-Inhibitor EMD688683 (50 μM , schwarze Quadrate) behandelt und befanden sich in Ca^{2+} -freier (0 Ca^{2+}) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin (1 μM) behandelt, um eine Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (SOCE).

B.C. Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=5, jedes Experiment 10-30 Zellen) des Anstiegs (B) und Maximums (C) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen. Wo dargestellt, wurden die Zellen mit DMSO (1 %, weiße Balken) oder dem SGK1-Inhibitor EMD688683 (50 μM , schwarze Balken) behandelt.

3.1.8 Einfluss der Transfektion therapiesensitiver A2780

Ovarialkarzinomzellen mit aktiver – und inaktiver Akt/PKB auf den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom

Um einen weiteren Beweis für die Beeinflussung des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms durch Akt/PKB anzuführen, wurden therapiesensitive A2780 Ovarialkarzinomzellen mit einer grundlegend aktiven Akt-Isoform (hAkt^{DD}) einer dominierend inaktiven Akt-Isoform (hAkt^{AA}) transfiziert. Anhand des Fura-2-Fluoreszenzverhältnis ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) wurden anschließend die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom bestimmt. Wie in Abbildung 3-8 zu sehen, zeigten therapiesensitive A2780 Ovarialkarzinomzellen, die mit der grundlegend aktiven Akt-Isoform (T308DS473D) transfiziert wurden, einen signifikant höheren speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom als Zellen, die mit der dominierend inaktiven Akt-Isoform (T308AS473A) transfiziert wurden.

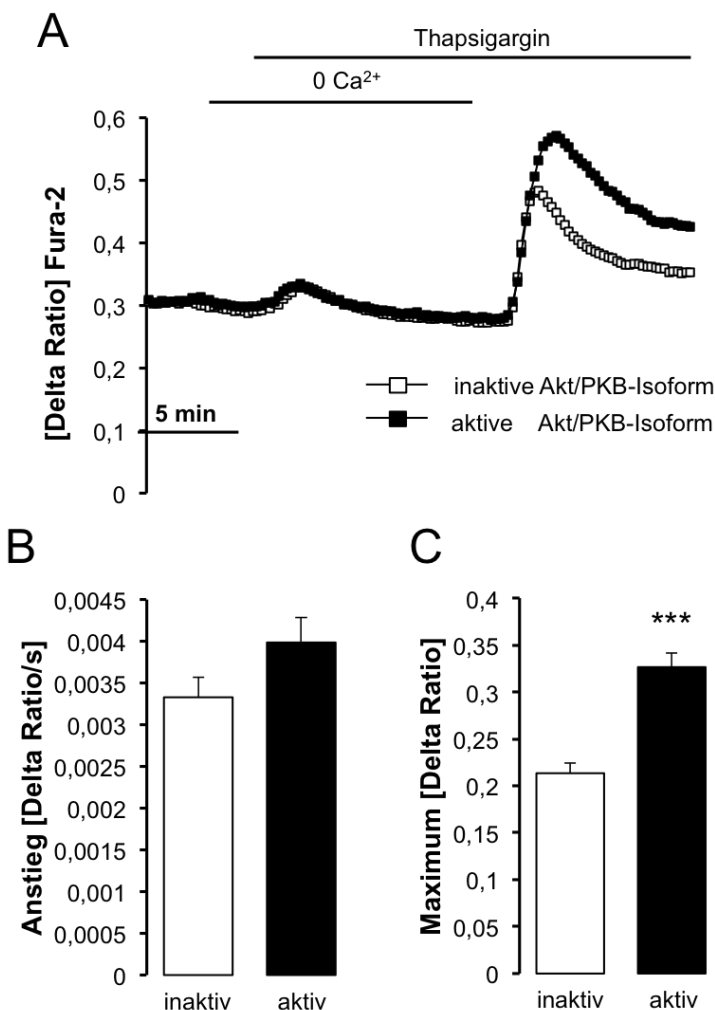


Abb. 3-8 Intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und speicherabhängiger Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in mit aktiver Akt-Isoform oder inaktiver Akt-Isoform transfizierten therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen

A. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen. Wo dargestellt, wurden die Zellen mit einer dominierend inaktiven Akt/PKB-Isoform (T308AS473A, weiße Quadrate) oder einer konsequent aktiven Akt/PKB-Isoform (T308DS473D, schwarze Quadrate) transfiziert und befanden sich in Ca^{2+} -freier ($0 Ca^{2+}$) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin ($1 \mu M$) behandelt um eine Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (SOCE).

B.C. Statistische Mittelwerte \pm SEM ($n=5$, jedes Experiment 10-30 Zellen) des Anstiegs (B) und Maximums (C) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen in mit konsequent aktiver Akt/PKB-Isoform (schwarze Quadrate) und dominant inaktiver Akt/PKB-Isoform (weiße Quadrate) transfizierten therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen. *** ($p<0,001$) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied therapieresistenter- gegenüber therapiesensitiven Ovarialkarzinomzellen.

3.1.9 Einfluss des Orai1-Inhibitors 2-APB und des Akt/PKB-Inhibitors SH-6 auf die Behandlung mit cis-Platin

Um zu testen, inwieweit eine Akt-sensitive Regulation von Orai1 dazu führt, die Sensitivität der Ovarialkarzinomzellen unter Therapie zu steigern, wurde die Zahl der nekrotischen und apoptotischen Zellen nach Behandlung mit cis-Platin (100 μM) bestimmt. Da in frühen Apoptose-Stadien Phosphatidylserin (PS) von der zytoplasmatischen Zellinnenseite auf die Außenseite der Membran transloziert, können entsprechende Zellen selektiv mit Phospholipid-bindenden Proteinen wie Annexin V markiert werden. Um apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen, deren Membran-Integrität aufgehoben ist, und die daher ebenfalls Annexin-V binden, zu unterscheiden, werden die Zellen gleichzeitig mit einem DNA-Farbstoff wie Propidiumiodid (PI) behandelt, der nur die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen passieren kann. Die gleichzeitige Anwendung von Annexin V-FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und Propidiumiodid gestattet die Diskriminierung nekrotischer Zellen im Annexin V positiv gefärbten Zellquadranten. Dabei wird bei der Anregungswellenlänge λ_{488} das Propidiumiodid-Signal λ_{585} (FL-2) über dem Annexin V-FITC-Signal λ_{530} (FL-1) aufgetragen (siehe Abb. 3-9 und 3-10). Die Zahl der nekrotischen und apoptotischen Zellen wurde in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen unter An- und Abwesenheit des Akt-Inhibitors SH-6 und des Orai1-Inhibitors 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB, 50 μM) bestimmt. Es konnte, wie in Abbildung 3-9 und 3-10 zu sehen, gezeigt werden, dass therapieresistente A2780cis Ovarialkarzinomzellen verglichen mit therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen resistent gegenüber cis-Platin induzierter Apoptose sind. Ein Effekt, der durch die Gabe von SH-6 (10 μM) und 2-APB (50 μM) aufgehoben werden konnte, und zu einer erhöhten cis-Platin-Sensitivität der therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen führte, welche vergleichbar mit der Therapiesensitivität war, die in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen beobachtet wurde.

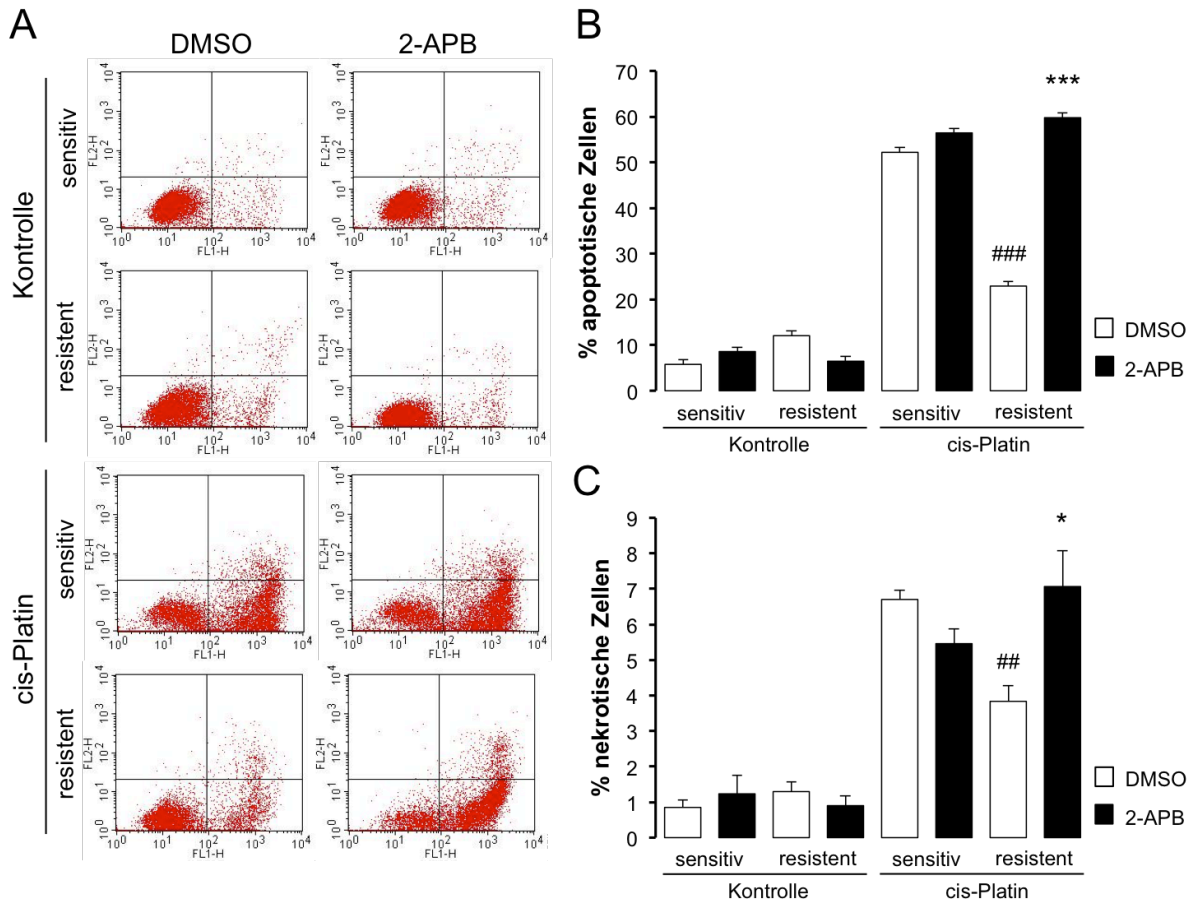


Abb. 3-9 Effekt des SOCE-Inhibitors 2-APB auf die cis-Platin induzierte Apoptose von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen

A. Original Punktauftragung eines repräsentativen Experiments, bei dem nach Anregung λ_{488} das Propidiumiodid-Signal λ_{585} (FL-2) über dem Annexin V-FITC-Signal λ_{530} (FL-1) dargestellt ist. Die therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (sensitiv) und die therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (resistent) wurden für 24 h mit 50 μ M 2-APB inkubiert und entweder mit cis-Platin (100 μ M) oder ohne cis-Platin (Kontrolle) behandelt. Die Zellen ohne Verlust der Membranintegrität und externalisiertem Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche befinden sich im unteren linken Quadranten der Punktauftragung. **B.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=5-6) des Prozentsatzes therapiesensitiver A2780 Ovarialkarzinomzellen (sensitiv) und therapieresistenter A2780cis Ovarialkarzinomzellen (resistent), die Apoptose zeigen (Annexin V positiv, Propidiumiodid negativ). Beide Zelllinien wurden zusätzlich zu einer 24-stündigen Inkubation mit DMSO (1%, weiße Balken) oder 2-APB (50 μ M, schwarze Balken) entweder mit cis-Platin (100 μ M) oder ohne cis-Platin (Kontrolle) behandelt. *** (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber dem entsprechenden Wert, der sich ohne 2-APB Behandlung ergibt, ### (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied der mit DMSO inkubierten therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen gegenüber mit DMSO inkubierten therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen. **C.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=5-6) des Prozentsatzes therapiesensitiver A2780 Ovarialkarzinomzellen (sensitiv) und therapieresistenter A2780cis Ovarialkarzinomzellen (resistent), die Nekrose zeigen. Beide Zelllinien wurden zusätzlich zu einer 24-stündigen Inkubation mit DMSO (1%, weiße Balken) oder 2-APB (50 μ M, schwarze Balken) entweder mit cis-Platin (100 μ M) oder ohne cis-Platin (Kontrolle) behandelt. * (p<0,05) kennzeichnet den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber dem entsprechenden Wert, der sich ohne 2-APB Behandlung ergibt, ## (p<0,01) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied der mit DMSO behandelten therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen gegenüber den mit DMSO behandelten therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen.

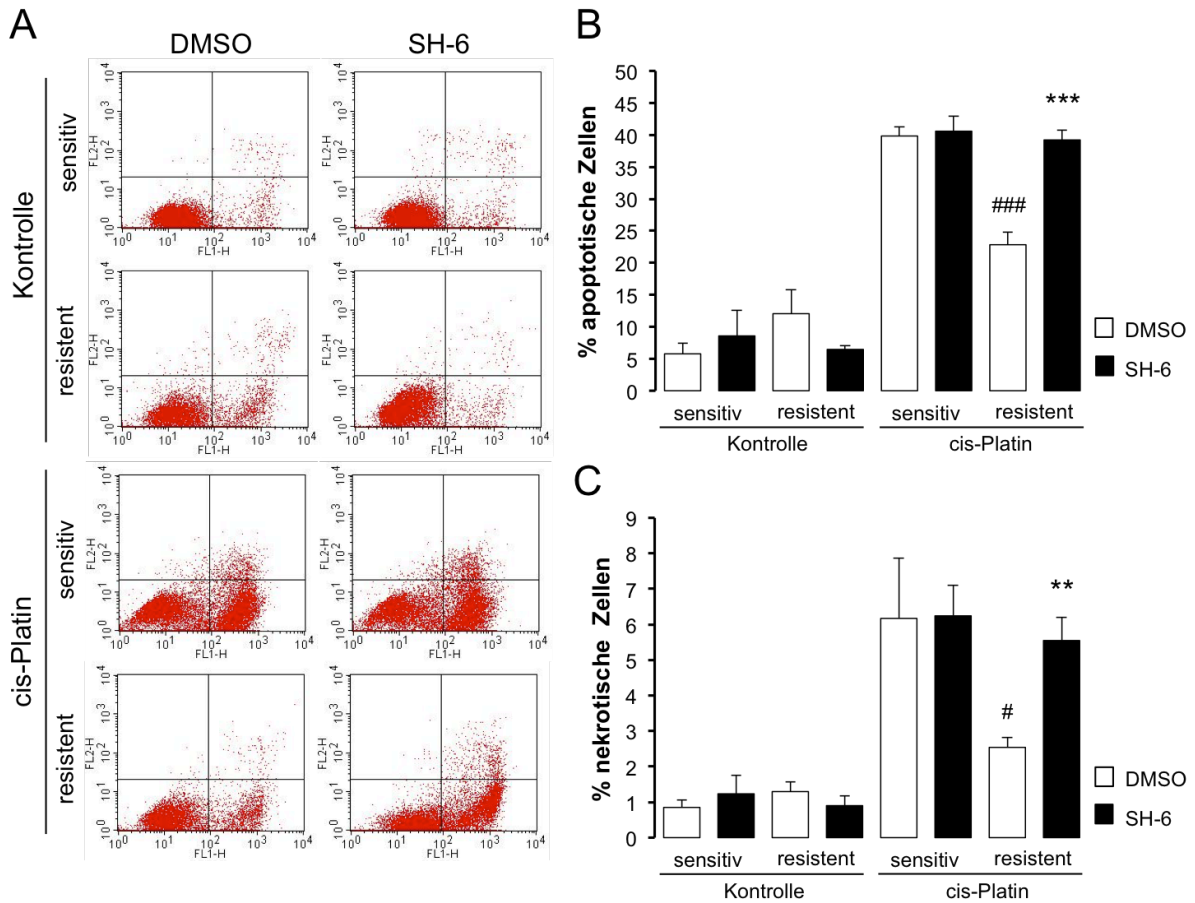


Abb. 3-10 Effekt des Akt-Inhibitors SH-6 auf die cis-Platin induzierte Apoptose von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen

A. Original Punktauftragung eines repräsentativen Experiments, bei dem nach Anregung λ_{488} das Propidiumiodid-Signal λ_{585} (FL-2) über dem Annexin V-FITC-Signal λ_{530} (FL-1) dargestellt ist. Die therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (sensitiv) und die therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (resistent) wurden für 24 h mit 10 μ M SH-6 inkubiert und entweder mit cis-Platin (100 μ M) oder ohne cis-Platin (Kontrolle) behandelt. Die Zellen ohne Verlust der Membranintegrität und externalisiertem Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche befinden sich im unteren linken Quadranten der Punktauftragung. **B.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=5-6) des Prozentsatzes therapiesensitiver A2780 Ovarialkarzinomzellen (sensitiv) und therapieresistenter A2780cis Ovarialkarzinomzellen (resistent), die Apoptose zeigen (Annexin V positiv, Propidiumiodid negativ). Beide Zelllinien wurden zusätzlich zu einer 24-stündigen Inkubation mit DMSO (1%, weiße Balken) oder SH-6 (10 μ M, schwarze Balken) entweder mit cis-Platin (100 μ M) oder ohne cis-Platin (Kontrolle) behandelt. *** (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber dem entsprechenden Wert, der sich ohne SH-6 Behandlung ergibt, ### (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied der mit DMSO inkubierten therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen gegenüber mit DMSO inkubierten therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen. **C.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=5-6) des Prozentsatzes therapiesensitiver A2780 Ovarialkarzinomzellen (sensitiv) und therapieresistenter A2780cis Ovarialkarzinomzellen (resistent), die Nekrose zeigen. Beide Zelllinien wurden zusätzlich zu einer 24-stündigen Inkubation mit DMSO (1%, weiße Balken) oder SH-6 (10 μ M, schwarze Balken) entweder mit cis-Platin (100 μ M) oder ohne cis-Platin (Kontrolle) behandelt. ** (p<0,01) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber dem entsprechenden Wert, der sich ohne SH-6 Behandlung ergibt, # (p<0,05) kennzeichnet den statistisch signifikanten Unterschied der mit DMSO behandelten therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen gegenüber mit DMSO behandelten therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen.

3.1.10 Bestimmung der NCKX-Aktivität und Einfluss des Akt-Inhibitors

SH-6

Um ihren hohen Stoffwechsel zu unterhalten, benötigen Tumorzellen nicht nur mehr Energie, sondern auch eine effizientere Signaltransduktion. Ca^{2+} -Ionen, als eine der wichtigsten intrazellulären Botenstoffe, sind für die Vermittlung mehrerer extra- und intrazellulärer Signale verantwortlich. Wie vorangestellt gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3-5), ist der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen höher als in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen. Da die Ca^{2+} -Homöostase Voraussetzung für eine effektive Signaltransduktion ist, müssen die Ca^{2+} -Ionen ebenso schnell und effektiv wieder aus dem Reaktionsbereich verschwinden. Erreicht wird dies unter anderem über membranständige $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher³. Die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) bzw. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauschers (NCKX) kann über den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bestimmt werden. Die Wegnahme von Na^+ -Ionen aus der extrazellulären Lösung führt bei Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen und K^+ -Ionen (NCKX) zur Umkehr der Leitungsrichtung und zu Carrier-vermitteltem Ca^{2+} -Einstrom (Aneiros et al. 2005). Um die NCKX-Aktivität und den Einfluss des Akt/PKB-Inhibitors SH-6 zu bestimmen, wurden die Zellen für 24 h mit und ohne SH-6 inkubiert. Die vorausgegangene Behandlung von therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen mit SH-6 (10 μM) ($0,44 \pm 0,01$ w. E., n=5) führte zu keinem Unterschied der Fura-2-Fluoreszenz verglichen mit therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen ($0,44 \pm 0,01$ w. E., n=5) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen ($0,45 \pm 0,01$ w. E., n=5) ohne entsprechende Behandlung. Der zu beobachtende schnelle und massive Ca^{2+} -Einstrom durch Wegnahme der Na^+ -Ionen aus der extrazellulären Puffer-Lösung war in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen ($1,07 \pm 0,05$ w. E., n=5) signifikant höher als in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen ($0,23 \pm 0,02$ w. E., n=5), und ließ sich durch SH-6 Behandlung ($0,64 \pm 0,02$ w. E., n=5) signifikant verringern.

³ **$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher** (engl.: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX) und **$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauscher** (engl.: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -exchanger, NCKX) sind durch ihre hohe Kapazität hauptverantwortlich Ca^{2+} -Ionen schnell aus der Zelle zu schleusen (Cervetto et al. 1989). In Säugetieren wurden bisher 3 NCX Gene und 5 NCKX Gene kloniert und identifiziert. Unter physiologischen Bedingungen benutzt der NCX die im Na^+ -Gradienten gespeicherte transmembrane Energie um 3 Na^+ -Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion auszutauschen (Reeves & Hale 1984). Der NCKX hingegen tauscht 4 Na^+ -Ionen gegen ein K^+ -Ion und ein Ca^{2+} -Ion aus (Dong et al. 2001).

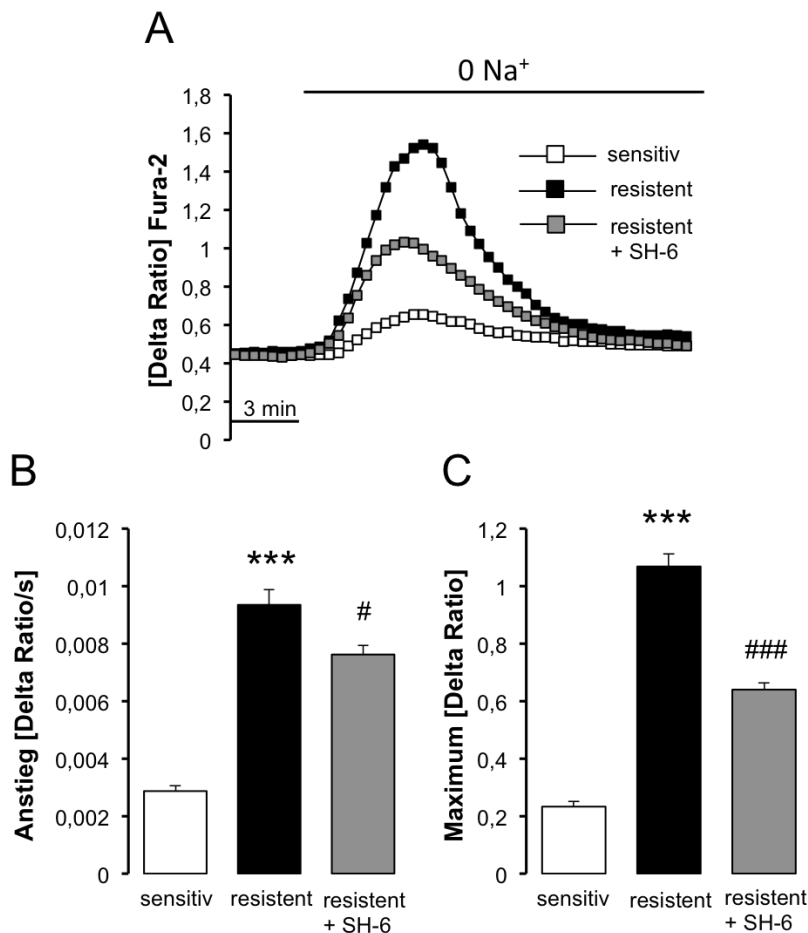


Abb. 3-11 NCKX-Aktivität von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen und Effekt des Akt-Inhibitors SH-6 auf therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen

A. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Quadrate) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Quadrate). Wo dargestellt wurden die therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen (graue Quadrate) mit SH-6 (10 μ M) behandelt. Der Anstieg nach Entnahme von extrazellulärem Na⁺ kennzeichnet die Aktivität des K⁺-abhängigen Na⁺/Ca²⁺-Austauschers (NCKX). **B.C.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=5, jedes Experiment 10-30 Zellen) des Anstiegs (B) und Maximums (C) der Fura-2-

Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Entnahme von extrazellulärem Na⁺-Ionen in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Balken), therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Balken) und in mit SH-6 behandelten therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen (graue Balken). *** (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen therapieresistenten- und therapiesensitiven Ovarialkarzinomzellen. ### (p<0,001) und # (p<0,05) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied gegenüber ohne SH-6 behandelten therapieresistenten Ovarialkarzinomzellen.

3.1.11 Einfluss des NF- κ B-Inhibitors Wogonin auf SOCE und I_{CRAC}

Es ist bekannt, dass verschiedene Zielgene des nuklearen Faktors κ B (NF- κ B) mit Tumorentwicklung und dem Fortschreiten der Erkrankung verbunden sind (J. W. Bradford & Baldwin 2014). Um zu überprüfen, inwieweit in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen eine über NF- κ B vermittelte Regulation des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms besteht, wurden die Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor Wogonin (100 μ M) behandelt. Wogonin inhibiert die Phosphorylierung von I κ B, wodurch die Translokation von NF- κ B in den Zellkern verhindert wird (Zhao et al. 2010). Wie in Abbildung 3-12 dargestellt, unterscheidet sich der Kurvenverlauf der Kontrollgruppe von dem Kurvenverlauf der mit Wogonin behandelten Zellen signifikant. Der nach der Entleerung der intrazellulären Speicher durch Thapsigargin

(1 μM) gemessene speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom war in den Zellen, die mit Wogonin behandelt wurden, signifikant erniedrigt und erfolgte langsamer.

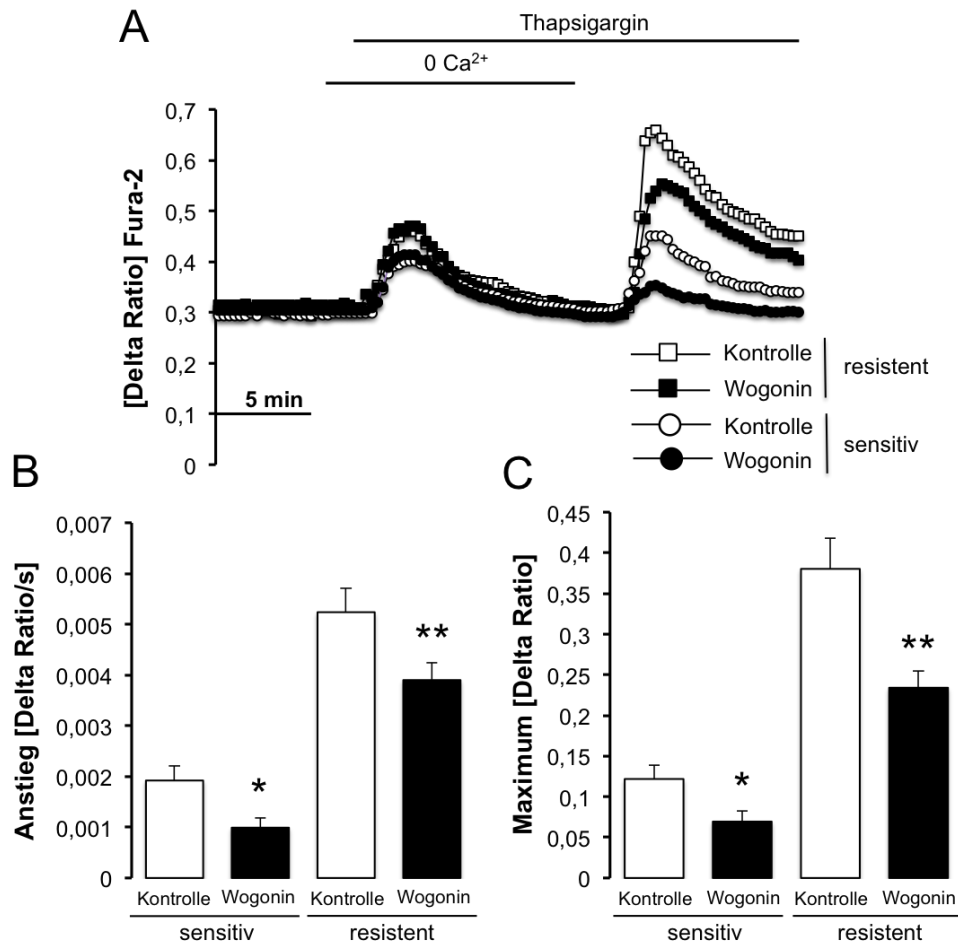


Abb. 3-12 Effekt des NF- κ B-Inhibitors Wogonin auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und speicherabhängiger Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen

A. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (Kreise) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (Quadrate). Wo dargestellt wurden die Zellen für 24 h mit (schwarz) oder ohne (weiß) Wogonin (100 μM) inkubiert und befanden sich in Ca^{2+} -freier (0Ca^{2+}) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin (1 μM) behandelt, um eine Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (SOCE). **B.C.** Statistische Mittelwerte \pm SEM ($n=4$, jedes Experiment 6-19 Zellen) des Anstiegs (B) und Maximums (C) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (weiße Balken) und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen (schwarze Balken). ** ($p<0,01$) und * ($p<0,05$) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen mit und ohne Wogonin behandelten therapieresistenten- und therapiesensitiven Ovarialkarzinomzellen.

3.2 SGK1-ABHÄNGIGE REGULATION DES SPEICHERABHÄNGIGEM Ca^{2+} -EINSTROMS (SOCE) IN HUMANEN ENDOMETRIUM ISHIKAWA-ZELLEN

Auch die SGK1 ist mit verschiedenen Tumoren und deren Aggressivität assoziiert. Besonders hohe SGK1-Konzentrationen sind verbunden mit gesteigerter Proliferation, dem Überleben der Zellen und der Resistenz gegenüber Therapien (Lang et al. 2010; Lang & Stournaras 2013). Niedrige SGK1-Konzentrationen können allerdings ebenso zu Funktionsverlusten führen (Lang et al. 2006; Lessi et al. 2010). Bekannt ist, dass die SGK1 in menschlichem Endometrium exprimiert wird und bei Frauen mit nicht erklärbarer Infertilität heraufreguliert ist (Feroze-Zaidi et al. 2007; Salker et al. 2011). Im Gegensatz dazu ist die SGK1 in dezidualisierenden Stromazellen von Patientinnen mit habituellem Abort (engl.: recurrent pregnancy loss, RPL) herabreguliert (Salker et al. 2011). Über Angriffspunkte der SGK1 in Endometrium-Zellen ist allgemein jedoch noch wenig bekannt. Neue Untersuchungen konnten zeigen, dass eine SGK1-sensitive Regulation des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms existiert.

3.2.1 Proteinlevel von Orai1 in humanem Endometrium

Mit Hilfe der Westernblot-Technik wurde bestimmt, ob humanes Endometrium und humane Endometrium Ishikawa-Zellen⁴ das Protein Orai1 exprimieren. Wie in Abbildung 3-13 zu sehen, wird Orai1 tatsächlich sowohl in humanem Endometrium als auch in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen exprimiert. Dabei wurde es zusammen mit der Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase 1 (SGK1) sowohl in der proliferativen Phase als auch in der sekretorischen Phase gebildet. Die entsprechenden Proteinlevel, relativ zu den Proteinleveln von GAPDH, waren für SGK1 gleich $1,00 \pm 0,19$ w. E. (n=6) in der proliferativen Phase und $3,19 \pm 0,82$ w. E. (n=5) in der sekretorischen Phase. Korrespondierend waren die entsprechenden Werte für Orai1 gleich $0,45 \pm 0,07$ w. E. (n=6) in der proliferativen Phase und $0,58 \pm 0,12$ w. E. (n=7) in der sekretorischen Phase.

⁴ **Endometriose** ist eine Östrogen-abhängige, gynäkologische Erkrankung, bei der Gewebe, welches der Gebärmutter-schleimhaut (Endometrium) sehr ähnlich ist, außerhalb der Gebärmutterhöhle vorkommt. Schätzungen zufolge sind circa 7-15% aller Frauen (ca. 2 Mio. in Deutschland) während der Phase der Geschlechtsreife von ihr betroffen. Es handelt sich bei der Endometriose um eine gutartige, allerdings oft chronisch verlaufende Erkrankung, die mit Unterleibsschmerzen und Unfruchtbarkeit einhergeht (35-50% der betroffenen Frauen). Die Endometriosis genitalis externa als die am häufigsten auftretende Form ist assoziiert mit erhöhter Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, eingeschränkter Zell-vermittelter Immunität, Neo-Angiogenese und Anomalien der verirrten Gebärmutter-schleimhaut (Omwandho et al. 2010).

Durchschnittlich waren die SGK1 Proteinlevel signifikant ($p < 0,05$) höher in der sekretorischen Phase, wie in der proliferativen Phase. Die durchschnittlichen Orai1 Proteinlevel waren im Vergleich tendenziell höher in der sekretorischen Phase als in der proliferativen Phase. Sie erreichten jedoch keinen signifikanten Unterschied.

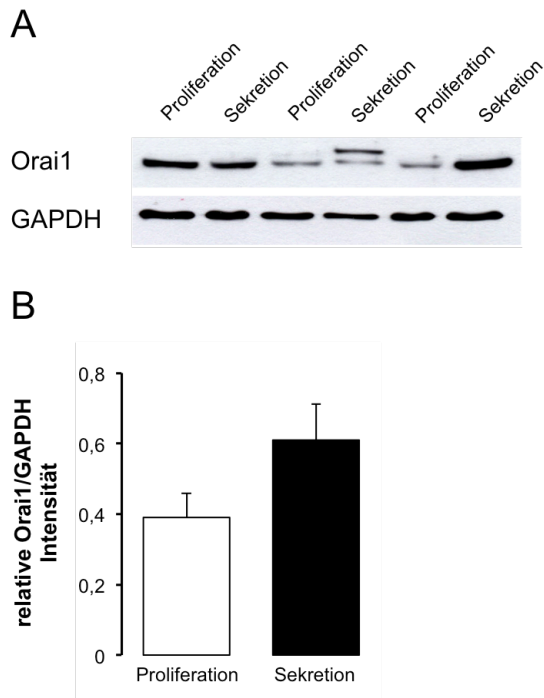


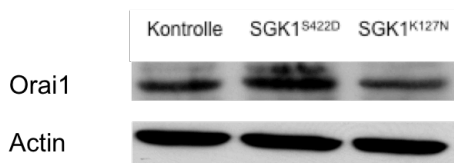
Abb. 3-13 Proteinlevel von Orai1 in humanem Endometrium

A. Original Westernblot des Zelllysats von humanem Endometrium auf Orai1 (obere Bahn). Zur Ladungskontrolle wurde anti-GAPDH Antikörper verwendet (untere Bahn). **B.** Statistische Mittelwerte \pm SEM ($n=6-7$) des Verhältnisses der Proteinmenge von Orai1/GAPDH in humanem Endometrium während der Proliferationsphase (weiße Balken) und der Sekretionsphase (schwarze Balken).

3.2.2 Einfluss der Transfektion mit einer konsequent aktiven SGK1 Isoform und einer dominant negativen SGK1 Isoform auf die Proteinlevel von Orai1

Um zu ergründen, inwieweit in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen die Orai1 Proteinexpression abhängig von der Menge und Aktivität der Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase 1 (SGK1) ist, wurden humane Endometrium Ishikawa-Zellen entweder mit einer konsequent aktiven Isoform (SGK1^{S422D}) oder mit einer dominant negativen Isoform (SGK1^{K127N}) transfiziert (siehe Kapitel 2.2.1.3). Die Transfektion erhöhte die Transkriptionslevel in mit SGK1^{S422D} transfizierten Zellen von $0,09 \pm 0,04$ w. E. (n=4) auf 3722 ± 1086 w. E. (n=4) und in mit SGK1^{K127N} transfizierten Zellen auf 3112 ± 456 w. E. (n=4). Für die entsprechenden Orai1 Transkriptionslevel ergab sich durch die Transfektion mit (SGK1^{S422D}) ein Anstieg von $0,74 \pm 0,07$ w. E. (n=4) auf $0,88 \pm 0,07$ w. E. (n=4) und ein gleichbleibender Wert von $0,78 \pm 0,04$ w. E. nach der Transfektion mit (SGK1^{K127N}). Wie Abbildung 3-14 zeigt, spiegeln sich die Transkriptionslevel auch in der Proteinexpression wieder. Es ist zu sehen, dass die absolute Proteinmenge an Orai1 in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen, die mit der konsequent aktiven Isoform (SGK1^{S422D}) transfiziert wurden, signifikant höher ist als die der Zellen, die mit der dominant negativen Isoform (SGK1^{K127N}) transfiziert wurden.

A



B

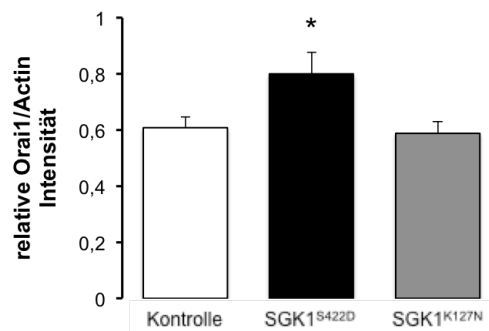


Abb. 3-14 Proteinlevel von Orai1 in transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa Zellen

A. Original Westernblot des Zelllysats von nicht transfizierten (Kontrolle), mit konsequent aktiver Isoform (SGK1^{S422D}) und dominant negativer Isoform (SGK1^{K127N}) transfizierten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen. **B.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=6) des Verhältnisses der Proteinmenge von Orai1/ β -Actin in nicht transfizierten (weiße Balken), in mit konsequent aktiver Isoform (SGK1^{S422D}) (schwarze Balken) transfizierten und in mit dominant negativer Isoform (SGK1^{K127N}) (graue Balken) transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen. * (p<0,05) kennzeichnet den statistisch signifikanten Unterschied von mit konsequent aktiver Isoform SGK1^{S422D} transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen gegenüber mit dominant negativer Isoform SGK1^{K127N} transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen.

3.2.3 Einfluss von 2-APB auf SOCE und I_{CRAC} in transfizierten Zellen

Zur Bestimmung des Einflusses der SGK1 auf den speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom in humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen, wurden die Zellen entweder mit der konsequent aktiven Isoform (SGK1^{S422D}) oder der dominant negativen Isoform (SGK1^{K127N}) transfiziert, und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Fura-2-Fluoreszenzverhältnis $\lambda_{340}/\lambda_{380}$, welches den zytoplasmatischen Ca^{2+} -Status widerspiegelt, war in den mit SGK1^{S422D} transfizierten Zellen ($0,42 \pm 0,04$ w. E., n=6) vergleichbar mit dem Fluoreszenzverhältnis der mit SGK1^{K127N} transfizierten Zellen ($0,46 \pm 0,04$ w. E., n=6). Das Hinzugeben von 1 μ M Thapsigargin (siehe Kapitel 2.2.2.1) führte zu einem schnellen, transienten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der Aktivierung des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms. Das Ausmaß, dieses durch Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Ca^{2+} -Ionen ausgelösten Ca^{2+} -Konzentrationsanstiegs, war zwischen den mit unterschiedlichen Isoformen transfizierten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen vergleichbar. Für die mit konsequent aktiver Isoform (SGK1^{S422D}) transfizierten Zellen betrug das Fura-2-Fluoreszenzverhältnis $0,72 \pm 0,04$ w. E. (n=6). Für die mit der dominant negativen Isoform (SGK1^{K127N}) transfizierten Zellen betrug es $0,66 \pm 0,07$ w. E. (n=6). Die nachfolgende Zugabe extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen führte in beiden transfizierten Zelllinien zu einem, den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom darstellenden, schnellen Anstieg des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses $\lambda_{340}/\lambda_{380}$. Sowohl das Maximum als auch die Geschwindigkeit des Anstiegs mit der Ca^{2+} -Ionen in die Zelle strömen, waren dabei in mit der konsequent aktiven Isoform (SGK1^{S422D}) transfizierten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen signifikant höher als in mit der dominant negativen Isoform (SGK1^{K127N}) transfizierten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen (siehe Abb. 3-15). Weitere Experimente adressierten den Effekt des Orai1-Inhibitors 2-APB (50 μ M) auf den SGK1 sensitiven, speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom. Wie Abbildung 3-15 zeigt, konnte durch die Behandlung mit 2-APB der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom signifikant gesenkt werden, und der Unterschied zwischen humanen Endometrium Ishikawa Zellen, die mit der konsequent aktiven Isoform (SGK1^{S422D}) transfiziert und denen, die mit der dominant negativen Isoform (SGK1^{K127N}) transfiziert wurden, aufgehoben werden.

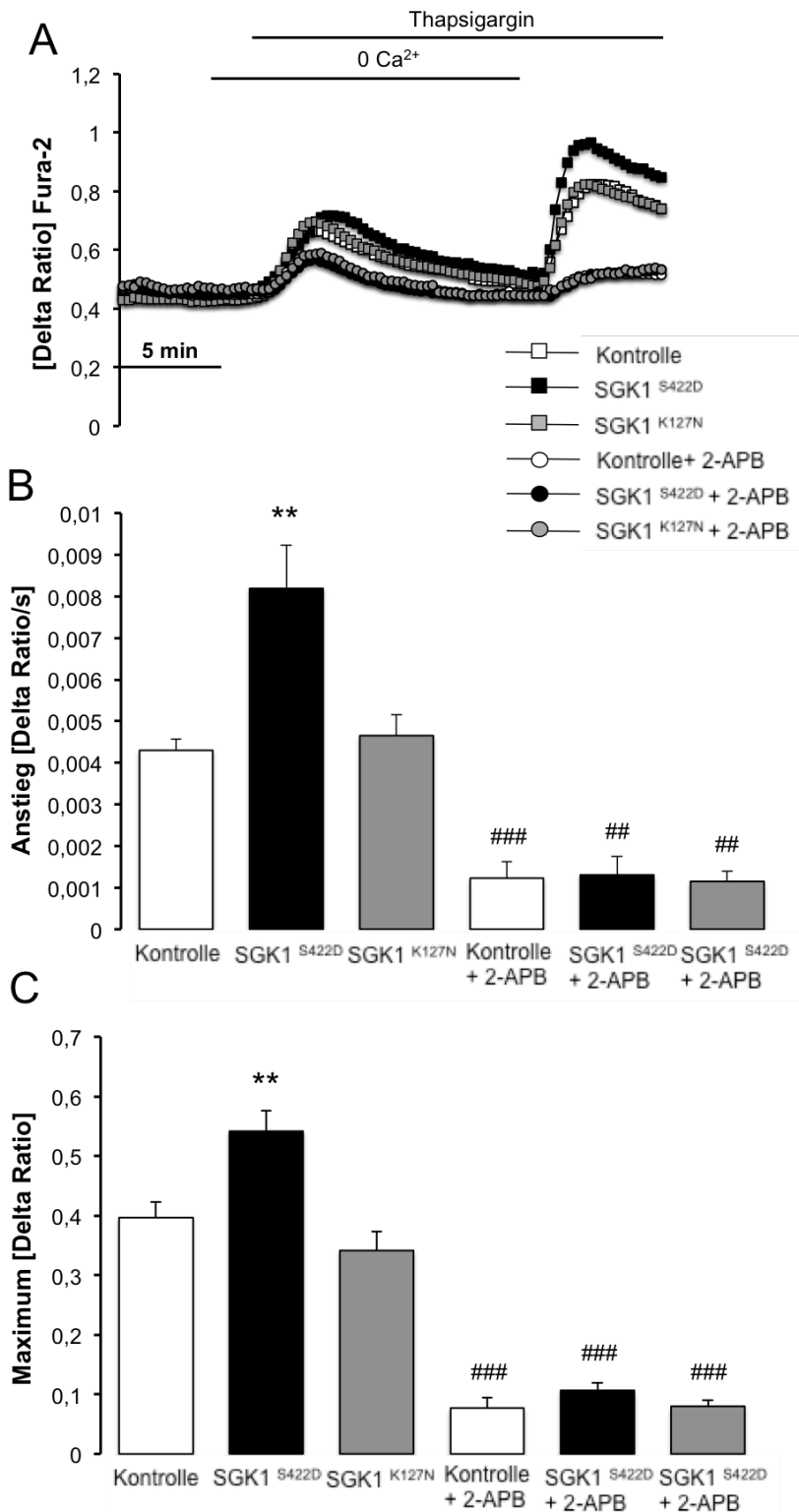


Abb. 3-15 Intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung, SGK1 sensibler speicherabhängiger Ca²⁺-Einstrom (SOCE) und dessen Inhibierung durch 2-APB in transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen

A. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen nicht transfizierten (weiße Symbole), mit konsequent aktiver Isoform (SGK1^{S422D}) (schwarze Symbole) transfizierten und mit dominant negativer Isoform (SGK1^{K127N}) (graue Symbole) transfizierten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen, welche zusätzlich mit (Kreise) und ohne (Quadrate) 2-APB (50 μ M) behandelt wurden. Wo dargestellt, befanden sich die Zellen in Ca²⁺-freier (0 Ca²⁺) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin (1 μ M) behandelt, um eine Entleerung der internen Ca²⁺-Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca²⁺-Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom (SOCE). **B.C.** Statistische Mittelwerte \pm SEM (n=3, jedes Experiment 10-30 Zellen) des Anstiegs (B) und Maximums (C) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca²⁺-Ionen in nicht transfizierten (weiße Balken), in mit konsequent aktiver Isoform (SGK1^{S422D}) (schwarze Balken) transfizierten und in mit dominant negativer Isoform (SGK1^{K127N}) (graue Balken) transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen, welche zusätzlich mit (rechte

Balken, + 2-APB) und ohne (linke Balken, - 2-APB (50 μ M) behandelt wurden. ** (p<0,01) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen mit konsequent aktiver Isoform (SGK1^{S422D}) transfizierten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen und mit dominant negativer Isoform (SGK1^{K127N}) transfizierten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen. ### (p<0,001) und # (p<0,01) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen mit und ohne 2-APB behandelten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen.

3.2.4 Einfluss von Dexamethason auf SOCE und I_{CRAC}

Um zu überprüfen, inwieweit humane Endometrium Ishikawa-Zellen auf SGK1-proteinexpressionsmodulierende Stimuli reagieren, wurden die Zellen mit dem künstlichen Glukokortikoid Dexamethason behandelt. Abbildung 3-16 zeigt, dass humane Endometrium Ishikawa-Zellen, die mit Dexamethason (1 μ M) behandelt wurden, in Fura-2 Fluoreszenzmessungen, einen signifikant erhöhten speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom aufweisen.

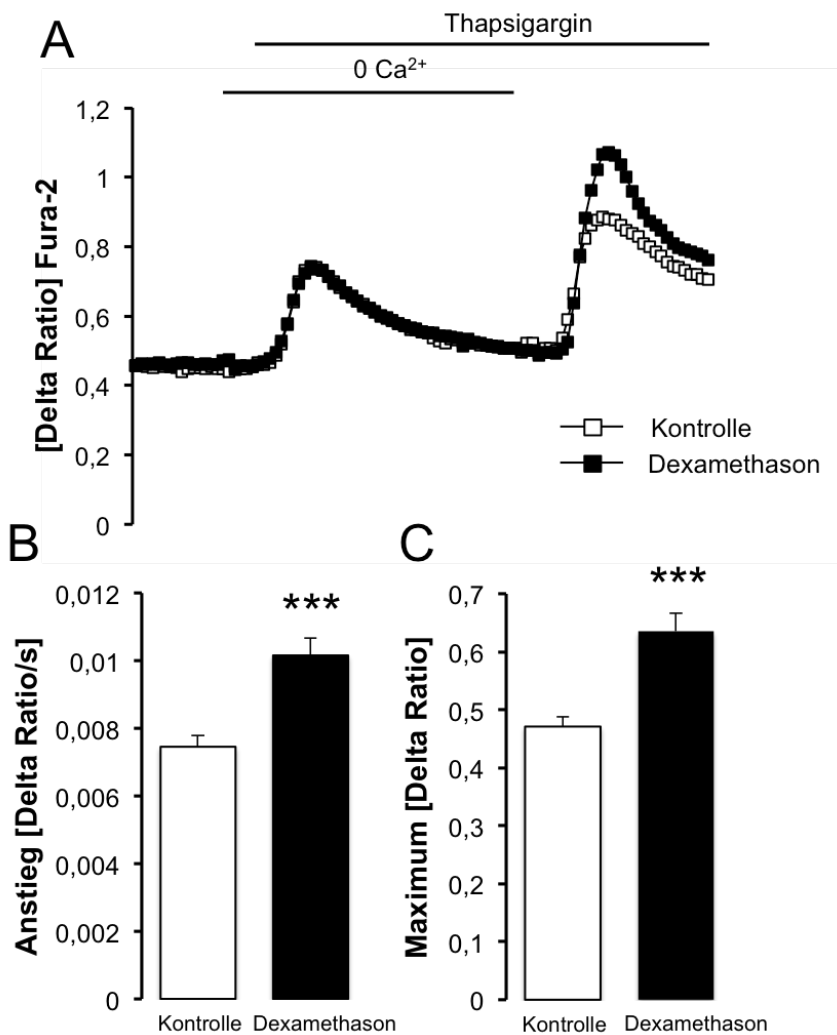


Abb. 3-16 Dexamethason-sensitive intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und speicherabhängiger Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen

A. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen unbehandelten (weiße Quadrate), für 24 h mit 1 μ M Dexamethason behandelten (schwarze Quadrate) humanen Endometrium Ishikawa-Zellen. Wo dargestellt, befanden sich die Zellen in Ca^{2+} -freier (0 Ca^{2+}) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin (1 μ M) behandelt, um eine Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (SOCE). **B.C.** Statistische Mittelwerte \pm

SEM (n = 6, jedes Experiment 8-23 Zellen) des Anstiegs (B) und Maximums (C) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen in unbehandelten (weiße Balken) und in für 24 h mit 1 μ M Dexamethason behandelten (schwarze Balken) humanen Endometrium Ishikawa-Zellen. *** (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen mit 1 μ M Dexamethason behandelten und unbehandelten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen.

3.2.5 Einfluss von TGFβ1 auf die mRNA-Level von SGK1

Ein weiterer starker Stimulator der SGK1 ist TGFβ1, welches an den meisten, einer Metastasierung nicht unähnlichen, Prozessen der Endometriose beteiligt ist, und ausreichend im Endometrium exprimiert wird. Daher wurde mit Hilfe der RT-PCR Technik (siehe Kapitel 2.2.1.11) untersucht, inwieweit sich die Transkription von SGK1 in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit TGFβ1 (2 ng/ml) für 2 und 24 h verändert. Dazu wurden die Zellen lysiert, und die mRNA-Level von SGK1 bestimmt. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die an Exons des SGK1-Gens binden (siehe Kapitel 2.1.8). Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde das TATA-Box-Bindeprotein mit den entsprechenden Oligonukleotiden verwendet (siehe Kapitel 2.1.8). Die Normierung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ – Methode nach Pfaffl (Pfaffl 2001). Wie die Auswertung der RT-PCR Untersuchung (siehe Abb. 3-17) zeigt, konnten die SGK1 Transkriptionslevel in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen durch die Behandlung mit TGFβ1 (2h) signifikant erhöht werden.

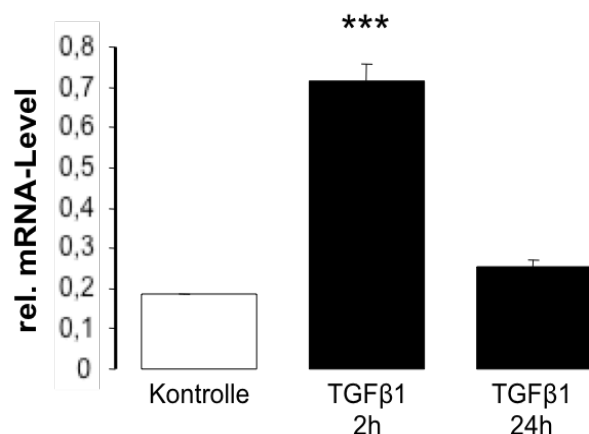


Abb. 3-17 RT-PCR Analyse der mRNA-Level von SGK1 in mit TGFβ1 behandelten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen

Normierte Mittelwerte ± SEM (n=6) der relativen mRNA-Level von SGK1/TATA-Box-Bindeprotein (TBP) in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen. Die Zellen wurden für 2 h oder 24 h mit (schwarze Balken) oder ohne (weiße Balken) TGFβ1 (2 ng/ml) behandelt. *** (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen den für 2 h mit TGFβ1 (2 ng/ml) behandelten und den unbehandelten (Kontrolle) humanen Endometrium Ishikawa-Zellen.

3.2.6 Einfluss von TGFβ1 auf die Orail-Proteinlevel

Da TGFβ1 ein starker Stimulator der SGK1 Expression ist, wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob auch die Orail Proteinmenge und der speicherabhängige Ca²⁺-Einstrom sensitiv auf die Behandlung mit TGFβ1 reagieren. Durch eine 24-stündige Behandlung humaner Endometrium Ishikawa-Zellen mit TGFβ1 (2 ng/ml), konnte ein signifikanter Anstieg der Orail Proteinlevel herbeigeführt werden (siehe Abb. 3-18).

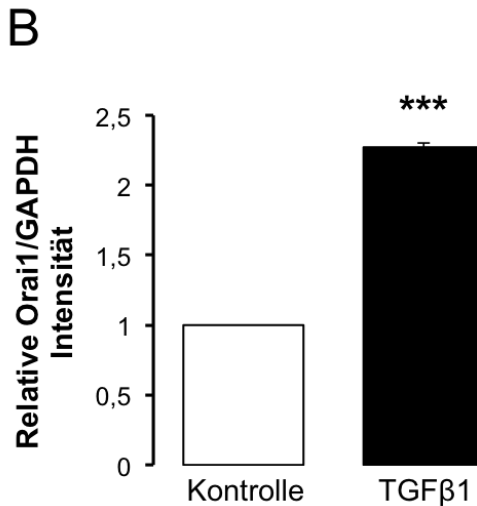
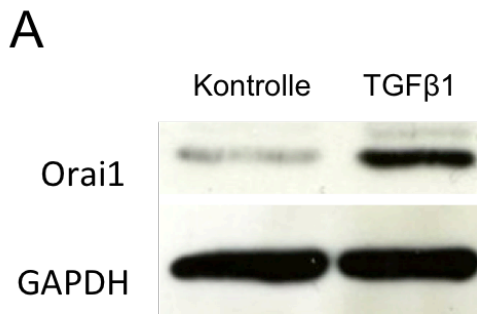


Abb. 3-18 TGFβ1 sensitive Orai1 Proteinexpression in humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen

A. Original Westernblot des Zelllysats von humanem Endometrium-Ishikawa-Zellen auf Orai1 (obere Bahn). Zur Ladungskontrolle wurde anti-GAPDH Antikörper verwendet (untere Bahn). Die Zellen wurden für 24 h entweder mit (TGFβ1, 2 ng/ml) oder ohne TGFβ1 (Kontrolle) behandelt. **B.** Statistische Mittelwerte ± SEM (n=5) des Verhältnisses der Proteinmenge von Orai1/GAPDH in humanem Endometrium-Ishikawa-Zellen, die für 24 h mit (schwarze Balken) oder ohne (weiße Balken) TGFβ1 (2 ng/ml) behandelt wurden. *** (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen den für 24 h mit TGFβ1 (2 ng/ml) behandelten und den unbehandelten (Kontrolle) humanen Endometrium Ishikawa-Zellen.

3.2.7 Einfluss von TGFβ1 auf SOCE und I_{CRAC}

Anschließend konnte gezeigt werden, dass der mit TGFβ1-Behandlung einhergehende Anstieg der Orai1 Proteinmenge folgerichtig zu einem vergleichbaren Anstieg des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms führt. Hierzu wurden humane Endometrium Ishikawa-Zellen mit unterschiedlichen TGFβ1-Konzentrationen (0,2 ng/ml, 2 ng/ml, 20 ng/ml und 200 ng/ml) behandelt und das Fura-2-Fluoreszenzverhältnis ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) fluoreszenzspektroskopisch aufgezeichnet (siehe Abb. 3-19). Sowohl der Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration, ausgelöst durch die Thapsigargin-bedingte Entleerung der internen Speicher, als auch der schnelle Ca²⁺-Anstieg nach Zugabe von extrazellulären Ca²⁺-Ionen, waren abhängig von der Behandlung und der TGFβ1-Konzentration signifikant verschieden (siehe Abb. 3-19).

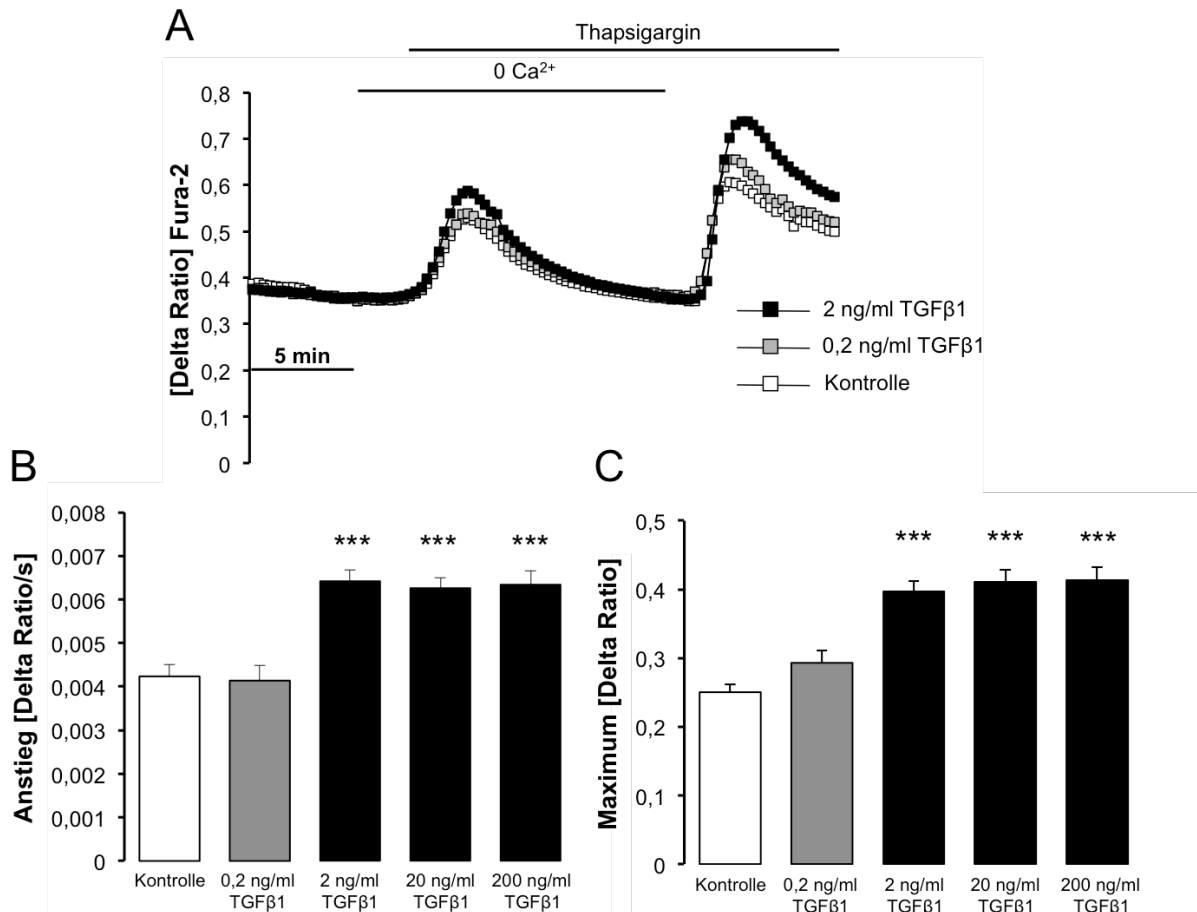


Abb. 3-19 TGFβ1-sensitive intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung und speicherabhängiger Ca²⁺-Einstrom (SOCE) in humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen

A. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen unbehandelten (weiße Quadrate), für 24 h mit 0,2 ng/ml TGFβ1 behandelten (graue Quadrate) und für 24 h mit 2 ng/ml TGFβ1 behandelten (schwarze Quadrate) humanen Endometrium Ishikawa-Zellen. Wo dargestellt, befanden sich die Zellen in Ca²⁺-freier (0 Ca²⁺) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin (1 μM) behandelt, um eine Entleerung der internen Ca²⁺-Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca²⁺-Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom (SOCE). **B.C.** Statistische Mittelwerte ± SEM (n=8, jedes Experiment 10-22 Zellen) des Anstiegs (B) und Maximums (C) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca²⁺-Ionen in unbehandelten (weiße Balken), für 24 h mit 0,2 ng/ml TGFβ1 behandelten (graue Balken) und für 24 h mit 2 ng/ml, 20 ng/ml und 200ng/ml TGFβ1 behandelten (schwarze Quadrate) humanen Endometrium Ishikawa-Zellen. *** (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied von mit 2 ng/ml, 20 ng/ml und 200 ng/ml TGFβ1 behandelten gegenüber unbehandelten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen.

3.2.8 Einfluss des SGK1-Inhibitors EMD638683 auf den SOCE und I_{CRAC} von mit TGFβ1 behandelten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen

In einer zusätzlichen Serie von Experimenten wurde der Einfluss von Serum-reduziertem Medium (0,5% FCS) auf die Behandlung mit TGFβ1 untersucht. Die Gabe von TGFβ1 in Serum-reduziertem Medium steigerte die Orail Proteinabundanz signifikant (P<0,001) von 0,28 ± 0,02 (n=12) auf 0,42 ± 0,03 (n=10) w. E.. Wurden die Zellen mit dem selektiven

SGK1 Inhibitor EMD638683 behandelt, konnte der Effekt von TGFβ1 auf den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom vollständig aufgehoben werden (siehe Abb. 3-20).

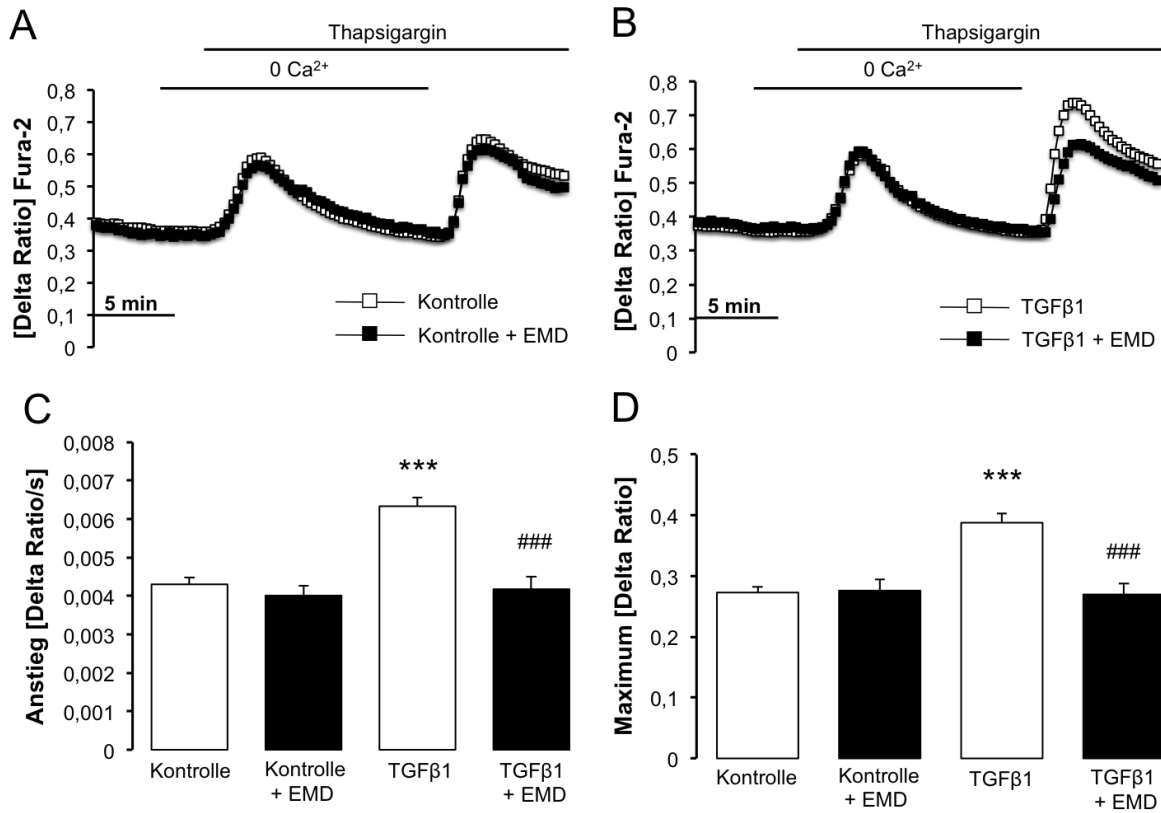


Abb. 3-20 Effekt der Behandlung mit dem SGK1-Inhibitor EMD 638683 auf die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung und den TGFβ1 sensitiven speicherabhängiger Ca²⁺-Einstrom (SOCE)

A.B. Fluoreszenzspektrometrisch aufgenommene, repräsentative Kurven der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) in mit Fura-2/AM beladenen unbehandelten (A) und für 24 h mit 0,2 ng/ml TGFβ1 behandelten (B) humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen. Zusätzlich wurden die Zellen mit (schwarze Quadrate) oder ohne (weiße Quadrate) SGK1-Inhibitor EMD638683 (50 μM) behandelt. Wo dargestellt, befanden sich die Zellen in Ca²⁺-freier (0 Ca²⁺) Pufferlösung bzw. wurden mit Thapsigargin (1 μM) behandelt, um eine Entleerung der internen Ca²⁺-Speicher zu erreichen. Der Anstieg nach erneutem Zuführen von Ca²⁺-Ionen in Anwesenheit von Thapsigargin kennzeichnet den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom (SOCE). **B.C.** Statistische Mittelwerte ± SEM (n=8, jedes Experiment 10-22 Zellen) des Anstiegs (C) und Maximums (D) der Fura-2-Fluoreszenzverhältnisse ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) nach Zugabe von extrazellulären Ca²⁺-Ionen in unbehandelten und für 24 h mit 0,2 ng/ml TGFβ1 behandelten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen, die zusätzlich mit (schwarze Balken) oder ohne (weiße Balken) SGK1-Inhibitor EMD638683 (50 μM) behandelt wurden. *** (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied zwischen mit TGFβ1 behandelten und unbehandelten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen. ### (p<0,001) kennzeichnen den statistisch signifikanten Unterschied von mit TGFβ1 behandelten gegenüber mit TGFβ1 und mit SGK1-Inhibitor EMD638683 behandelten humanen Endometrium-Ishikawa-Zellen.

4 DISKUSSION

4.1 AKT/PKB-ABHÄNGIGE THERAPIERESISTENZ VON A2780CIS OVIARIALKARZINOMZELLEN

In menschlichen Tumoren ist Akt/PKB die am häufigsten überexprimierte Kinase. Ausgehend von der ersten Erwähnung einer anormalen Regulation im Zusammenhang mit Krebs 1987 (Staal 1987) spielt die Proteinkinase B heute eine zentrale Rolle bei der Entstehung von diversen Tumoren (Cheng et al. 2005; T. L. Yuan & Cantley 2008). Nahezu alle bekannten onkogenen Wachstumsfaktoren, angiogenen Faktoren und Zytokine aktivieren Akt, und ihre zahlreichen Effektor-Proteine regulieren eine Vielzahl an onkogenen Signalwegen (Altomare & Testa 2005). Sie ist die bisher einzige Kinase in deren Signalweg sich über ein breites Spektrum von Tumoren jedes entscheidende Element entweder mutiert oder verstärkt finden ließ (Cheng et al. 2005; T. L. Yuan & Cantley 2008). Dabei sind Mutationen von Akt selbst äußerst selten. Vor kurzem konnte in der Lipid-bindenden Tasche von Akt1 eine somatische E17K Mutation gezeigt, und in Verbindung mit der Entstehung von Brust-, Darm- und Ovarialkrebs gebracht werden (Carpten et al. 2007). Insgesamt stellt Akt damit ein außerordentlich interessantes Ziel der Krebstherapie dar, und der klinischen Entwicklung von Akt-Inhibitoren zur Behandlung verschiedener Tumore wird sehr viel Aufmerksamkeit geschenkt (Rhodes et al. 2008; Hirai et al. 2010; Ahad et al. 2011). Eine zuverlässige und häufig notwendige Langzeittherapie bleibt jedoch aufgrund der Beteiligung von Akt an zahlreichen biologischen Prozessen mit sehr vielen Hindernissen verbunden (George et al. 2004; Shiojima et al. 2005; Dudek et al. 1997). Daher ist die Erforschung Akt-abhängiger („On-target“) und Akt-unabhängiger Effekte („off-target“) für die erfolgreiche Therapie entsprechender Tumore von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen signifikant mehr Akt phosphoryliert und aktiviert vorliegt als in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (siehe Abb. 3-1). Um eine daraus resultierende eventuelle Beeinflussung des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms durch Akt zu erfassen, wurden sowohl in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen als auch in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen assoziierte Proteine untersucht. Dabei ließ sich sowohl auf Ebene der mRNA-Level als auch anhand der Proteinmenge in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen eine signifikant höhere Expression von Orail und STIM1 feststellen, wie in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen (siehe

Abb. 3-2 und 3-3). Die erhöhte Expression von Orai1 und STIM1 ging dabei einher mit Unterschieden im speicherabhängigem Ca^{2+} -Einstrom und führte in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen zu einer Erhöhung des I_{CRAC} (siehe Abb. 3-5). Es erscheint als erwiesen, dass die erhöhte Orai1/STIM1 Expression und Aktivität von einer erhöhten phospho-Akt Proteinmenge begleitet wird, welche durch den Einsatz des Akt/PKB-Inhibitors SH-6 unterdrückt werden konnte (siehe Abb. 3-6). Weitere Experimente stützten die ersten aussagekräftigen Resultate. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen mit einer konsequent aktiven Akt/PKB-Isoform eine Erhöhung des speicherabhängige Ca^{2+} -Einstroms herbeiführte (siehe Abb. 3-8). Des Weiteren konnte anhand von Immunfluoreszenz-Aufnahmen eine erhöhte Menge von Orai1 in der Membran von therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen festgestellt werden (siehe Abb. 3-4). Am beeindrucktesten allerdings ist die Tatsache, dass die pharmakologische Inhibierung von sowohl Akt/PKB als auch Orai1 zu einer verstärkten cis-Platin induzierten Apoptose in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen führt, und die Therapiesensitivität sich auf einen Wert, ähnlich dem in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen, einstellen ließ (siehe Abb. 3-9 und 3-10).

Vorausgegangene Untersuchungen zeigen, dass die Ca^{2+} -Kanal-Untereinheiten Orai1, 2 oder 3 (Prakriya et al. 2006; Putney 2007; Vig et al. 2006; Yeromin et al. 2006) und ihre Regulatoren STIM 1 oder 2 (Peinelt et al. 2006; Penna et al. 2008; Zhang et al. 2005) in Verbindung mit der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Apoptose, sowie deren gesteigerter Proliferation und Migration stehen (Bergmeier et al. 2013; Capiod 2013; Prevarskaya et al. 2011; Baryshnikov et al. 2009; Prevarskaya et al. 2014). Bei zervikalen Tumoren führt das Stilllegen (engl.: silencing) von STIM1 zu verminderter Proliferation und induzierte einen Zellzyklusarrest in Phase S und G2/M (Y.-F. Chen et al. 2011). Speicherabhängiger Ca^{2+} -Einstrom könnte Ca^{2+} -Oszillationen auslösen (Lang et al. 1991) und dadurch eine Reihe weitere Zellfunktionen (Berridge et al. 1998; Berridge et al. 2003), wie Einleiten der S- und M – Phase (Steinhardt & Alderton 1988; Taylor et al. 2008) und das Überleben von Krebszellen regulieren (Heise et al. 2010; Parkash & Asotra 2010). Im Gegensatz zu oszillierenden Ca^{2+} -Ionen führt eine anhaltend hohe zytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu Apoptose (Fang et al. 2008; Green & Reed 1998; Lang & Hoffmann 2012). Woraus sich eine denkbare Abhängigkeit des Überlebens der Tumorzellen von oszillierenden, zytosolischen Ca^{2+} -Ionen ergibt. Als Teil dieses Mechanismus könnten membranständige

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - bzw. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauscher dafür verantwortlich sein, Ca^{2+} -Ionen schnell und effektiv aus dem Reaktionsbereich zu entfernen (Cervetto et al. 1989).

In therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen konnte gegenüber therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen eine gesteigerte Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauschers festgestellt werden (siehe Abb. 3-11). Dabei ließ sich die Aktivität des NCKX in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen durch Behandlung mit dem Akt/PKB-Inhibitor SH-6 signifikant herabregulieren (siehe Abb. 3-11).

Vor kurzem konnte die Bedeutung von Akt1 bei der Stimulation der Proliferation, der Inhibierung von Apoptose und der Entstehung von Therapieresistenz eindeutig gezeigt werden (Hers et al. 2011; Martelli et al. 2011; Michl & Downward 2005; Osaki et al. 2004; H. Liu et al. 2013). In der glatten Muskulatur humaner Pulmonal-Arterien ließen sich STIM1 und Orai1 Akt/mTOR-abhängig regulieren (Ogawa et al. 2012). Interessant dabei ist, dass die Akt1-Phosphorylierung durch speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom unterdrückt und durch Inhibieren der Expression von Orai1 heraufreguliert wird (Peng et al. 2013). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die gemeinsame Regulation von Akt1 und Orai1 Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus ist.

Orai1 und damit auch der SOCE werden sowohl in Mastzellen (Eylenstein et al. 2011) als auch in Thrombozyten (Borst et al. 2012) durch die Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1 (SGK1) heraufreguliert. Die Phosphorylierung der Ubiquitin Ligase Nedd4-2 durch SGK1 ermöglicht die Bindung der Ligase an 14-3-3 Proteine und inaktiviert die negative Regulation von Orai (Eylenstein et al. 2011). Daneben konnte gezeigt werden, dass eine SGK1-abhängige Regulation der Orai1-Transkription über NF- κ B existiert (Eylenstein et al. 2012). Da SGK1-Zielstrukturen zu großen Teilen von Akt/PKB-Isoformen geteilt werden (Lang et al. 2006), erscheint es plausibel, dass Orai1 in ähnlicher Weise durch Akt/PKB reguliert wird. Beispielweise resultiert die Phosphorylierung von IKK α an T23 und deren Aktivierung durch Akt in der Phosphorylierung von I κ B, und führt zur Aktivierung und nuklearen Translokation von NF- κ B (Ozes et al. 1999). Mit Hilfe des NF- κ B-Inhibitors Wogonin konnte, sowohl in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen als auch in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen, der speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom signifikant herabreguliert werden (siehe Abb. 3-12). Eine transkriptionelle Regulation der Funktionseinheiten des SOCE, STIM und Orai, erscheint plausibel und wahrscheinlich. Ausmaß und Bedeutung der Regulation bleiben allerdings Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Obwohl Orai1 und STIM1 dafür bekannt sind, über die Serum- und Glukokortikoid-abhängigen Kinase 1 (SGK1) heraufreguliert zu werden (Eylenstein et al. 2011; Borst et al. 2012; Eylenstein et al. 2012), konnten wir keine signifikanten Unterschiede der SGK1-Proteinmenge zwischen therapiesensitiven A2780 und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen feststellen (siehe Abb. 3-1). Im Einklang mit dieser Beobachtung konnte ebenfalls kein signifikanter Effekt auf den speicherabhängiger Ca^{2+} -Einstrom durch den spezifischen SGK1-Inhibitor EMD638683 (Ackermann et al. 2011) ermittelt werden. Es war nicht möglich mit Hilfe von EMD638683 den Unterschied des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms zwischen therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen aufzuheben. (siehe Abb. 3-7) . Es ergibt sich daher, dass unter den gewählten Bedingungen eher Akt1 als SGK1 zur Therapieresistenz der A2780cis Ovarialkarzinomzellen beiträgt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Akt-abhängige Heraufregulation von STIM1 und Orai1 zur cis-Platin Resistenz der Ovarialkarzinomzellen beitragen und eventuell sogar dafür verantwortlich sind. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Kombination von cis-Platin zusammen mit einem Orai-Inhibitor die Therapieresistenz von Ovarialkarzinomzellen aufheben könnte. Es wäre des Weiteren möglich, dass ähnliche Mechanismen in anderen Tumoren eine Rolle spielen und andere Akt/PKB-Isoformen (Agarwal et al. 2013; Gonzalez & McGraw 2009; Yu et al. 2014), SGK-Isoformen (Lang et al. 2010; Bruhn et al. 2013), Orai/STIM-Isoformen (Hoth & Niemeyer 2013; Motiani et al. 2013) oder andere Ca^{2+} -Kanäle (J. Chen et al. 2014; Lang & Stournaras 2014; Nielsen et al. 2014) zum Zellüberleben beitragen und zu Therapieresistenz in anderen Tumorzelltypen führen. Die Kombination zytostatischer Therapie oder Bestrahlung zusammen mit dem entsprechenden Kinase- oder Kanalinhibitor könnte ein neuer Ansatz sein, Therapieresistenzen von Tumoren zu umgehen.

4.2 TGFB-ABHÄNGIGE SGK1-SENSITIVE REGULATION DES SPEICHERABHÄNGIGEM Ca^{2+} -EINSTROMS IN HUMANEN ENDOMETRIUM ISHIKAWA-ZELLEN

Auch wenn die SGK1 in Ovarialkarzinomzellen keine entscheidende Rolle bei der Therapieresistenz gegenüber cis-Platin einnimmt, wird sie ähnlich wie Akt1 in einer Vielzahl von Tumorzellen stark exprimiert (Lang et al. 2010; Amato et al. 2009; Szmulewitz et al. 2012). Die vorliegende Arbeit beweist eine Expression von Orai1, sowohl in humanem Endometrium als auch in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen (siehe Abb. 3-13 und 3-14). Es konnte gezeigt werden, dass durch Transfektion der humanen Endometrium Ishikawa-Zellen mit einer konsequent aktiven SGK1- Isoform (SGK1^{S422D}) eine Heraufregulation von Orai1, und damit eine Zunahme des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms herbeigeführt werden konnte (siehe Abb. 3-15). Die Transfektion mit einer dominant negativen SGK1- Isoform (SGK1^{K127N}) führte zu keiner Änderung des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms gegenüber den nicht transfizierten Kontrollzellen. Durch die Behandlung mit 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB, 50 μ M) konnte der Unterschied im speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom, zwischen den mit der konsequent aktiven Isoform (SGK1^{S422D}) transfizierten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen und denen mit der dominant negativen Isoform (SGK1^{K127N}) transfizierten humanen Endometrium Ishikawa-Zellen, aufgehoben werden (siehe Abb. 3-15). Es konnte gezeigt werden, dass TGF β 1 ein starker Aktivator der SGK1 ist (Kumar et al. 1999; Waldegger et al. 1999; Lang et al. 2000) (siehe Abb. 3-17) und sowohl die Orai1-Proteinexpression (siehe Abb. 3-18) als auch den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen heraufreguliert (siehe Abb. 3-19). Das SGK1 für die Zunahme des I_{CRAC} verantwortlich war, ließ sich durch die Aufhebung des Effekts nach Behandlung mit dem spezifischen SGK1-Inhibitor EMD638683 nachweisen (siehe Abb. 3-20).

Da die SGK1 die Zellproliferation stimuliert und zum Zellüberleben beiträgt (Dehner et al. 2008; Shanmugam et al. 2007; Fagerli et al. 2011), besitzt sie eine entscheidende Rolle im Zusammenspiel von Tumor-Überlebensmechanismen (Nasir et al. 2009; Sherk et al. 2008; Wang et al. 2010). Ebenso wie die SGK1 ist auch Orai an den Mechanismen der Zellproliferation beteiligt (Berra-Romani et al. 2008; Baryshnikov et al. 2009; Motiani et al. 2010; Faouzi et al. 2011; Qu et al. 2011). Es erscheint plausibel, dass die Heraufregulation von Orai1 durch die SGK1 zur Regulation der Proliferation und Migration von Tumorzellen beitragen könnte. Hinzu kommt, dass die Aktivität der SGK1 durch die PI3-Kinase und PDK1

stimuliert wird (Lang et al. 2006), welche wiederum zu zellulären Effekten von Wachstumsfaktoren beitragen (Katso et al. 2001; Segal 2003; Rudd et al. 2009). Interessanterweise zeigt die SGK1 allerdings auch einen gegenteiligen Einfluss auf die Karzinogenese bestimmter Tumore. Unter anderem besteht eine positive Korrelation zwischen hoher SGK1-Proteinexpression und dem Überleben von Patienten mit einem Nebennierenrindenzarzinom (Ronchi, Sbiera, et al. 2012b; Ronchi, Leich, et al. 2012a). Des Weiteren ist die SGK1 in bestimmten Tumoren herabreguliert (Lang et al. 2006; Lang et al. 2010; Lessi et al. 2010).

Mit Hinblick auf die Sensitivität der Orai1 Proteinabundanz und der Abhängigkeit des speicherabhängigen Ca^{2+} Einstroms von TGF β 1 ist es verlockend zu spekulieren, dass die SGK1 sensitive Regulation von Orai1 eine entscheidende Rolle in der TGF β -abhängigen Regulation der postmenstruellen Endometrium-Regeneration spielt (Omwandho et al. 2010). Geht man von der entscheidenden Rolle von Orai1 bei der Regulation der Zellproliferation aus (Berra-Romani et al. 2008; Baryshnikov et al. 2009; Motiani et al. 2010; Faouzi et al. 2011; Qu et al. 2011), könnte TGF β die endometrielle Regeneration unterstützen, indem es die SGK1 abhängige Regulation von Orai1 kontrolliert. Des Weiteren könnte die Sekretion von TGF β bei der Interaktion zwischen Endometriumzellen und dem preimplantierten Embryo eine Rolle spielen (Jones et al. 2006). Durch die Beobachtung der Sekretion von TGF β in die Peritonealflüssigkeit von Frauen, die an Endometriose leiden, wurde TGF β bereits mit der Entwicklung und/oder Aufrechterhaltung einer Endometriose in Zusammenhang gebracht (Omwandho et al. 2010). Neben der möglichen Verzahnung der SGK1 durch Regulation von Orai1 in die Maschinerie, welche die Zellproliferation bei einer Endometriose aufrechterhält, spielt die SGK1 bei einer Vielzahl von physiologischen- und pathophysiologischen Prozessen, unter anderem dem Zellüberleben, eine wichtige Rolle (Lang et al. 2006). Daher erscheint ein zusätzlicher Einfluss der SGK1 auf die Funktion weiterer Kanäle, Transporter und Signalmoleküle in Endometriumzellen durchaus wahrscheinlich.

Als bewiesen erscheint, dass die SGK1-abhängige Regulation der Funktion von Endometriumzellen offensichtlich für eine normale Endothelfunktion verantwortlich (Feroze-Zaidi et al. 2007; Salker et al. 2011) und ebenso maßgeblich für die Regulation der Zellproliferation und die Entwicklung von Tumorwachstum ist. Weitere Studien werden zeigen, inwieweit die SGK1 abhängige Expression und Funktion von Orai1 zu einer normalen Fruchtbarkeit beiträgt und ob diese vom Einfluss der SGK1 abhängig ist.

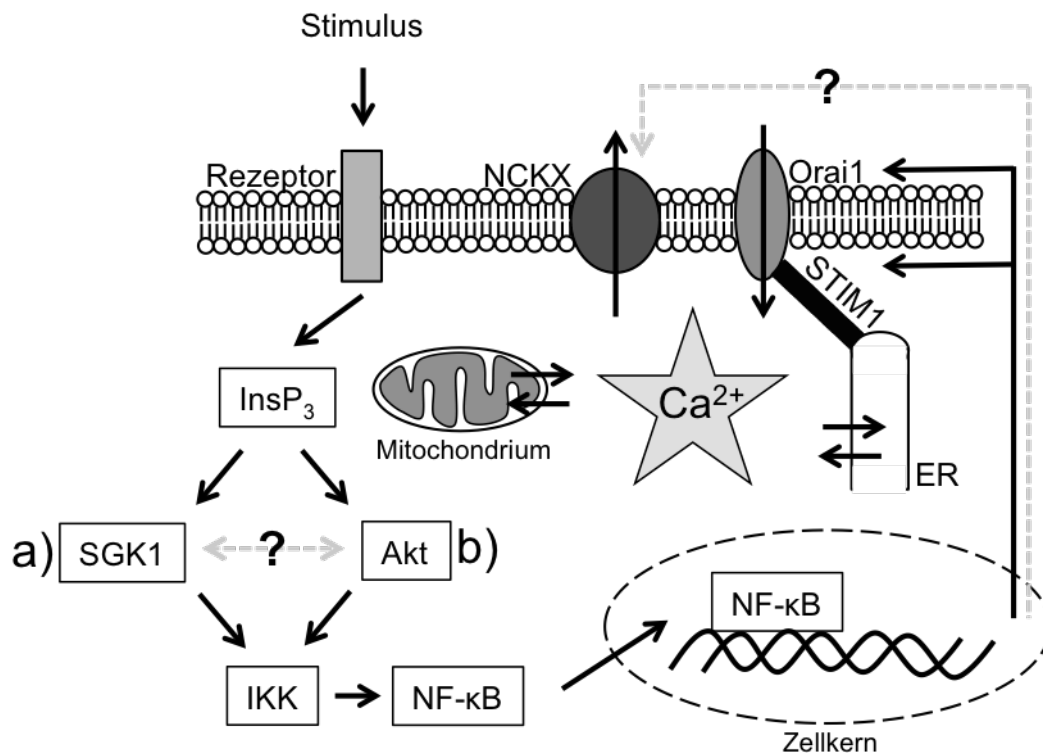


Abb. 4-1 Regulierung des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms (SOCE) in a) humanen Endometrium Ishikawa-Zellen und b) humanen Ovarialkarzinom Zellen

Durch die Bindung von Hormonen und Wachstumsfaktoren an Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-Proteingekoppelte Rezeptoren kommt es, über die PI3-Kinase abhängige Bildung von InsP₃, zur Aktivierung von SGK1 und Akt. Diese sind, u. a. durch die Phosphorylierung von IKK, in der Lage NF-κB zu aktivieren, welches im Zellkern die Expression von STIM1 und Orai1 heraufreguliert. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms (SOCE). Die hohe Konzentration an Ca²⁺-Ionen ist nachweislich (cis-Platin Therapieresistenz von humanen A2780cis Ovarialkarzinomzellen) und mutmaßlich an mehreren onkogen regulierten Prozessen beteiligt (Roderick & Cook 2008). Um den möglichen Mitochondrien-abhängigen Zelltod bei hoher Ca²⁺-Konzentration entgegenzuwirken, muss die Zelle Ca²⁺-Ionen zügig und in großer Zahl wieder aus dem Reaktionsbereich schleusen. Neben der Speicherung in Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum (ER), wird dies über den (Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX)) und Na⁺/Ca²⁺/K⁺-Austauscher (NCKX) erreicht. Inwieweit die Expression von (NCX) und NCKX genomisch über SGK1 und Akt/PKB gesteuert werden, und ob zwischen SGK1 und Akt, eine, die jeweils andere Kinase begünstigende oder beeinträchtigende, direkte oder indirekte Regulation besteht, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ähnlichkeiten zwischen malignem und physiologischem Wachstum sind enorm und die pharmakologischen Strategien, Ersteres zu verhindern und zu bekämpfen ohne Letzteres zu beeinträchtigen, schwierig, wenig sensitiv und unspezifisch.

Über ihre entscheidende Rolle bei der Apoptose, der Proliferation und der Zelldifferenzierung repräsentiert die Signaltransduktion über Ca^{2+} -Ionen im Allgemeinen, und der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom im Speziellen, einen entscheidenden Faktor für die charakteristischen Eigenschaften von Tumoren. Hierbei wird durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern ein einwärtsgerichteter Ca^{2+} -Strom aus dem Extrazellularraum ausgelöst (I_{CRAC}), und über einen, aus den beiden molekularen Untereinheiten STIM1 und Orai1 bestehenden, membranständigen Kanal vermittelt (CRAC-Kanal).

Vorausgehend konnte bereits gezeigt werden, dass die beiden ubiquitär exprimierten und an mehreren Signalwegen entscheidend beteiligten Kinasen, Akt und SGK1, in der Lage sind, die Proteinlevel von STIM und Orai zu regulieren und damit den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom zu beeinflussen (Eylenstein et al. 2011; Ogawa et al. 2009).

Um charakteristische Eigenschaften von malignem Wachstum zu diskriminieren, beschäftigte sich diese Arbeit daher mit der Expression von Akt und SGK1 in Tumorzellen, ihrer regulierenden Rolle auf STIM1, Orai1 und den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom sowie der Frage inwieweit dadurch tumortypische Zelleigenschaften determiniert werden.

Mit Hilfe von Zellkultur, intrazellulärer Ca^{2+} -Messung, Immunfluoreszenz-Messung, quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, der Western Blot Technik und Durchflusszytometrie, konnte gezeigt werden, dass Orai1 in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen und therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen exprimiert wird. Dabei war sowohl das Ausmaß der Transkription als auch die exprimierte Proteinmenge von STIM1 und Orai1, der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom und die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauschers in therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen höher als in therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen. Der Unterschied im speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom zwischen therapieresistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen und therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen wurde hierbei von einer Heraufregulation der molekularen CRAC-Kanal-Untereinheiten, STIM1 und Orai1, durch Akt begleitet, und ist wenigstens teilweise darauf zurückzuführen. Die Akt/PKB-abhängige Heraufregulation des speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms und die gesteigerte Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauschers beeinflussen die Therapieresistenz der A2780cis Ovarialkarzinomzellen in

diesem Zusammenhang zumindest unterstützend, und sind eventuell sogar dafür verantwortlich.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl humane Endometriumzellen als auch humane Endometrium Ishikawa-Zellen Orai1 exprimieren. Im Gegensatz zur Transfektion mit einer dominant negativen SGK1-Isoform (SGK1^{K127N}), konnte durch die Transfektion humaner Endometrium Ishikawa-Zellen mit einer konsequent aktiven SGK1-Isoform (SGK1^{S422D}) eine Heraufregulation von Orai1 und damit eine Zunahme des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms herbeigeführt werden. Darüber hinaus konnten durch die Behandlung mit dem SGK1-Stimulator TGFβ1 (Kumar et al. 1999; Lang et al. 2000; Waldegger et al. 1999), sowohl das Ausmaß der Transkription als auch die exprimierte Proteinmenge von Orai1 und der speicherabhängige Ca²⁺-Einstrom in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen erhöht werden. Die beitragende und eventuell tragende Rolle der SGK1 zum Anstieg des speicherabhängigen Ca²⁺-Einstroms in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen ließ sich durch die Aufhebung des Effektes nach Behandlung der Zellen mit dem SGK1-Inhibitor EMD638683 zeigen.

Diese Arbeit bekräftigt, dass sowohl Akt/PKB als auch SGK1 mit malignem Zellwachstum assoziiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass in humanen Ovarialkarzinomzellen, die cis-Platin Therapieresistenz von resistenten A2780cis Ovarialkarzinomzellen gegenüber therapiesensitiven A2780 Ovarialkarzinomzellen unabhängig von der Aktivität der SGK1 und vor allem auf die gesteigerte Aktivität von Akt zurückzuführen ist. Wohingegen in humanen Endometrium Ishikawa-Zellen vergleichbare Mechanismen vor allem SGK1-abhängig erscheinen. Es ist daher verlockend zu spekulieren, dass eine hohe Aktivität von Akt/PKB in bestimmten Fällen zu einer Herabregulation der SGK1-Proteinexpression führt. Das Zusammenspiel von SGK und Akt/PKB, sowie ihr gemeinsamer Effekt auf den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom und dessen Rücktransport, sind für die Eigenschaften malignem Wachstums und dessen Abgrenzung gegenüber physiologischem Wachstum von entscheidender Bedeutung, und dienen als Grundlage für eine weitere, intensive Forschung, um Überlebensstrategien von Tumorzellen aufzuklären, und eine spezifischere und sensitivere pharmakologische Therapie zu ermöglichen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdullaev, I.F. et al., 2008. Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circulation research*, 103(11), pp.1289–1299.
- Ackermann, T.F. et al., 2011. EMD638683, a novel SGK inhibitor with antihypertensive potency. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 28(1), pp.137–146.
- Agarwal, E., Brattain, M.G. & Chowdhury, S., 2013. Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer. *Cellular signalling*, 25(8), pp.1711–1719.
- Ahad, A.M. et al., 2011. Development of sulfonamide AKT PH domain inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(6), pp.2046–2054.
- Alessi, D.R. et al., 1997. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Current biology : CB*, 7(10), pp.776–789.
- Altomare, D.A. & Testa, J.R., 2005. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24(50), pp.7455–7464.
- Amato, R. et al., 2009. Sgk1 activates MDM2-dependent p53 degradation and affects cell proliferation, survival, and differentiation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 87(12), pp.1221–1239.
- Andjelković, M. et al., 1996. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), pp.5699–5704.
- Aneiros, E. et al., 2005. Modulation of Ca²⁺ signaling by Na⁺/Ca²⁺ exchangers in mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(1), pp.119–130.
- Attisano, L. et al., 1993. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*, 75(4), pp.671–680.
- Baba, Y. et al., 2006. Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), pp.16704–16709.
- Baba, Y. et al., 2008. Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nature immunology*, 9(1), pp.81–88.
- Baryshnikov, S.G. et al., 2009. Orai1, a critical component of store-operated Ca²⁺ entry, is functionally associated with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and plasma membrane Ca²⁺ pump in proliferating human arterial myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 297(5), pp.C1103–12.
- Bergmeier, W. et al., 2013. Emerging roles of store-operated Ca²⁺ entry through STIM and

- ORAI proteins in immunity, hemostasis and cancer. *Channels (Austin, Tex.)*, 7(5), pp.379–391.
- Berra-Romani, R. et al., 2008. Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *American journal of physiology. Cell physiology*, 295(3), pp.C779–90.
- Berridge, M.J., 1995. Capacitative calcium entry. *Biochem j.*
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Lipp, P., 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature*, 395(6703), pp.645–648.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), pp.517–529.
- Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1), pp.11–21.
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), pp.198–205.
- Bird, G.S. et al., 1991. Activation of Ca²⁺ entry into acinar cells by a non-phosphorylatable inositol trisphosphate. *Nature*, 352(6331), pp.162–165.
- Bird, G.S. et al., 2008. Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods (San Diego, Calif.)*, 46(3), pp.204–212.
- Boitano, S., Dirksen, E.R. & Sanderson, M.J., 1992. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5080), pp.292–295.
- Bootman, M.D. et al., 2001. Calcium signalling--an overview. *Seminars in cell & developmental biology*, 12(1), pp.3–10.
- Borst, O. et al., 2012. The serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) influences platelet calcium signaling and function by regulation of Orai1 expression in megakaryocytes. *Blood*, 119(1), pp.251–261.
- Bradford, J.W. & Baldwin, A.S., 2014. IKK/nuclear factor-kappaB and oncogenesis: roles in tumor-initiating cells and in the tumor microenvironment. *Advances in cancer research*, 121, pp.125–145.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Brandman, O. et al., 2007. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*, 131(7), pp.1327–1339.
- Brognaard, J. et al., 2007. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular cell*, 25(6), pp.917–931.

- Bruhn, M.A. et al., 2013. AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. *Cancer management and research*, 5, pp.281–292.
- Burges, A. & Schmalfeldt, B., 2011. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt international*, 108(38), pp.635–641.
- Capiod, T., 2013. The need for calcium channels in cell proliferation. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 8(1), pp.4–17.
- Carafoli, E., 2003. *The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals*,
- Cardone, M.H. et al., 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5392), pp.1318–1321.
- Carpten, J.D. et al., 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 448(7152), pp.439–444.
- Cervetto, L. et al., 1989. Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature*, 337(6209), pp.740–743.
- Chen, J. et al., 2014. Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Bioscience trends*, 8(1), pp.1–10.
- Chen, Y.-F. et al., 2011. Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), pp.15225–15230.
- Cheng, J.Q. et al., 2005. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene*, 24(50), pp.7482–7492.
- Chipuk, J.E. & Green, D.R., 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(3), pp.268–275.
- Choi, Y. et al., 2002. PTEN, but not SHIP and SHIP2, suppresses the PI3K/Akt pathway and induces growth inhibition and apoptosis of myeloma cells. *Oncogene*, 21(34), pp.5289–5300.
- Chu, Z.L. et al., 2001. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 276(12), pp.9239–9245.
- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell*, 131(6), pp.1047–1058.
- Clapham, D.E., 1995. Calcium signaling. *Cell*, 80(2), pp.259–268.
- Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), pp.205–219.
- Daniel, P.T. et al., 2001. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*, 15(7), pp.1022–1032.

- Datta, S.R. et al., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), pp.231–241.
- Dehner, M. et al., 2008. Wnt signaling inhibits Forkhead box O3a-induced transcription and apoptosis through up-regulation of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *The Journal of biological chemistry*, 283(28), pp.19201–19210.
- Derler, I. et al., 2009. A Ca²⁺(+) release-activated Ca²⁺(+) (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca²⁺(+)-dependent inactivation of ORAI1 channels. *The Journal of biological chemistry*, 284(37), pp.24933–24938.
- Derler, I. et al., 2013. The extended transmembrane Orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for Orai1 activation by STIM1. *The Journal of biological chemistry*, 288(40), pp.29025–29034.
- Dong, H. et al., 2001. Electrophysiological characterization and ionic stoichiometry of the rat brain K(+)-dependent NA(+)/CA(2+) exchanger, NCKX2. *The Journal of biological chemistry*, 276(28), pp.25919–25928.
- Dudek, H. et al., 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5300), pp.661–665.
- Dupont, G. et al., 2011. Calcium oscillations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3), pp.a004226–a004226.
- Eylenstein, A. et al., 2011. Stimulation of Ca²⁺-channel Orai1/STIM1 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(6), pp.2012–2021.
- Eylenstein, A. et al., 2012. Transcription factor NF-κB regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions. *The Journal of biological chemistry*, 287(4), pp.2719–2730.
- Fagerli, U.-M. et al., 2011. Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a prominent target gene of the transcriptional response to cytokines in multiple myeloma and supports the growth of myeloma cells. *Oncogene*, 30(28), pp.3198–3206.
- Fahrner, M. et al., 2014. The STIM1/Orai signaling machinery. *Channels*, 7(5), pp.330–343.
- Fang, K.-M. et al., 2008. Arachidonic acid induces both Na⁺ and Ca²⁺ entry resulting in apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 104(5), pp.1177–1189.
- Faouzi, M. et al., 2011. Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 226(2), pp.542–551.
- Feng, J. et al., 2004. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 279(39), pp.41189–41196.
- Feroze-Zaidi, F. et al., 2007. Role and regulation of the serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 in fertile and infertile human endometrium. *Endocrinology*, 148(10), pp.5020–5029.

- Feske, S. et al., 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), pp.179–185.
- Feske, S. et al., 2005. A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *The Journal of experimental medicine*, 202(5), pp.651–662.
- Finkel, E., 2001. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), pp.624–626.
- Frischauf, I. et al., 2011. Cooperativeness of Orai cytosolic domains tunes subtype-specific gating. *The Journal of biological chemistry*, 286(10), pp.8577–8584.
- George, S. et al., 2004. A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5675), pp.1325–1328.
- Gill, D.L., Ghosh, T.K. & Mullaney, J.M., 1989. Calcium signalling mechanisms in endoplasmic reticulum activated by inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP. *Cell calcium*, 10(5), pp.363–374.
- Gonzalez, E. & McGraw, T.E., 2009. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(16), pp.2502–2508.
- Green, D.R. & Kroemer, G., 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5684), pp.626–629.
- Green, D.R. & Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), pp.1309–1312.
- Gwack, Y. et al., 2007. Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *The Journal of biological chemistry*, 282(22), pp.16232–16243.
- Hahne, J.C. et al., 2012. Downregulation of AKT reverses platinum resistance of human ovarian cancers in vitro. *Oncology reports*, 28(6), pp.2023–2028.
- Hail, N., 2005. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 10(4), pp.687–705.
- Hayden, M.S. & Ghosh, S., 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3), pp.344–362.
- Heise, N. et al., 2010. Non-selective cation channel-mediated Ca²⁺-entry and activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II contribute to G2/M cell cycle arrest and survival of irradiated leukemia cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 26(4-5), pp.597–608.
- Hers, I., Vincent, E.E. & Tavaré, J.M., 2011. Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling*, 23(10), pp.1515–1527.
- Hilgemann, D.W. et al., 2006. Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 17 Suppl 1(s1), pp.S47–S56.

- Hirai, H. et al., 2010. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*, 9(7), pp.1956–1967.
- Hogan, P.G., Lewis, R.S. & Rao, A., 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual review of immunology*, 28, pp.491–533.
- Hoover, P.J. & Lewis, R.S., 2011. Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), pp.13299–13304.
- Hoth, M. & Niemeyer, B.A., 2013. The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. *Current topics in membranes*, 71, pp.237–271.
- Hoth, M. & Penner, R., 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358), pp.353–356.
- Hoth, M., Button, D.C. & Lewis, R.S., 2000. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), pp.10607–10612.
- Hoth, M., Fasolato, C. & Penner, R., 1993. Ion channels and calcium signaling in mast cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 707, pp.198–209.
- Hou, X. et al., 2012. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6112), pp.1308–1313.
- Huang, G.N. et al., 2006. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nature cell biology*, 8(9), pp.1003–1010.
- Ichas, F. & Mazat, J.P., 1998. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochimica et biophysica acta*, 1366(1-2), pp.33–50.
- Ji, W. et al., 2008. Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), pp.13668–13673.
- Jones, R.L. et al., 2006. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction (Cambridge, England)*, 132(2), pp.217–232.
- Kandel, E.S. et al., 2002. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 22(22), pp.7831–7841.
- Katso, R. et al., 2001. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annual review of cell and developmental biology*, 17(1), pp.615–675.
- Kawasaki, T., Lange, I. & Feske, S., 2009. A minimal regulatory domain in the C terminus of

- STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. *Biochemical and biophysical research communications*, 385(1), pp.49–54.
- Kazmierczak, J., Kempe, S. & Kremer, B., 2013. Calcium in the Early Evolution of Living Systems: A Biohistorical Approach. *Current Organic Chemistry*, 17(16), pp.1738–1750.
- Klippel, A. et al., 1997. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Molecular and cellular biology*, 17(1), pp.338–344.
- Kluck, R.M. et al., 1997. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *The EMBO journal*, 16(15), pp.4639–4649.
- Kobayashi, T. et al., 1999. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochem j*, 344 Pt 1, pp.189–197.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87(1), pp.99–163.
- Kumar, J.M. et al., 1999. Sgk, a putative serine/threonine kinase, is differentially expressed in the kidney of diabetic mice and humans. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 10(12), pp.2488–2494.
- Kuwana, T. et al., 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111(3), pp.331–342.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lang, F. & Hoffmann, E.K., 2012. Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Comprehensive Physiology*, 2(3), pp.2037–2061.
- Lang, F. & Stournaras, C., 2014. Ion channels in cancer: future perspectives and clinical potential. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1638), pp.20130108–20130108.
- Lang, F. & Stournaras, C., 2013. Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens, Greece)*, 12(2), pp.160–171.
- Lang, F. et al., 2006. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiological reviews*, 86(4), pp.1151–1178.
- Lang, F. et al., 1991. Bradykinin-induced oscillations of cell membrane potential in cells expressing the Ha-ras oncogene. *The Journal of biological chemistry*, 266(8), pp.4938–4942.
- Lang, F. et al., 2000. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), pp.8157–8162.

- Lang, F., Görlach, A. & Vallon, V., 2009. Targeting SGK1 in diabetes. *Expert opinion on therapeutic targets*, 13(11), pp.1303–1311.
- Lang, F., Perrotti, N. & Stournaras, C., 2010. Colorectal carcinoma cells--regulation of survival and growth by SGK1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(10), pp.1571–1575.
- Leivonen, S.-K. & Kähäri, V.-M., 2007. Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121(10), pp.2119–2124.
- Lessi, F. et al., 2010. Down-regulation of serum/glucocorticoid regulated kinase 1 in colorectal tumours is largely independent of promoter hypermethylation. N. Landsberger, ed. *PLoS one*, 5(11), p.e13840.
- Li, Z. et al., 2011. Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell research*, 21(2), pp.305–315.
- Li, Z. et al., 2007. Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation. *The Journal of biological chemistry*, 282(40), pp.29448–29456.
- Liou, J. et al., 2007. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), pp.9301–9306.
- Liou, J. et al., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current biology : CB*, 15(13), pp.1235–1241.
- Lis, A. et al., 2007. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Current biology : CB*, 17(9), pp.794–800.
- Liu, H. et al., 2013. Short-term hyperosmolality pretreatment on cells can reduce the radiosensitivity via RVI and Akt1 activation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 32(5), pp.1487–1496.
- Liu, X. et al., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), pp.147–157.
- Luik, R.M. et al., 2008. Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, 454(7203), pp.538–542.
- Luik, R.M. et al., 2006. The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *The Journal of cell biology*, 174(6), pp.815–825.
- Manning, B.D. & Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), pp.1261–1274.
- Martelli, A.M. et al., 2011. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy:

- roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia*, 25(7), pp.1064–1079.
- Massagué, J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 67(1), pp.753–791.
- Massagué, J., 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134(2), pp.215–230.
- McNally, B.A. et al., 2012. Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1. *Nature*, 482(7384), pp.241–245.
- McNally, B.A. et al., 2009. Structural determinants of ion permeation in CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), pp.22516–22521.
- Meldolesi, J. & Pozzan, T., 1987. Pathways of Ca²⁺ influx at the plasma membrane: voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels. *Experimental cell research*, 171(2), pp.271–283.
- Mercer, J.C. et al., 2006. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *The Journal of biological chemistry*, 281(34), pp.24979–24990.
- Michl, P. & Downward, J., 2005. Mechanisms of disease: PI3K/AKT signaling in gastrointestinal cancers. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 43(10), pp.1133–1139.
- Mignen, O., Thompson, J.L. & Shuttleworth, T.J., 2007. STIM1 regulates Ca²⁺ entry via arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *The Journal of physiology*, 579(Pt 3), pp.703–715.
- Mitsiades, C.S. et al., 2002. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*, 21(37), pp.5673–5683.
- Montero, M. et al., 2000. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nature cell biology*, 2(2), pp.57–61.
- Morales, A. et al., 2004. Glycosphingolipids and mitochondria: role in apoptosis and disease. *Glycoconjugate journal*, 20(9), pp.579–588.
- Motiani, R.K. et al., 2013. Orai3 is an estrogen receptor α -regulated Ca²⁺ channel that promotes tumorigenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(1), pp.63–75.
- Motiani, R.K., Abdullaev, I.F. & Trebak, M., 2010. A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(25), pp.19173–19183.
- Muik, M. et al., 2009. A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. *The Journal of biological chemistry*, 284(13), pp.8421–8426.

- Muik, M. et al., 2008. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *The Journal of biological chemistry*, 283(12), pp.8014–8022.
- Muik, M. et al., 2011. STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *The EMBO journal*, 30(9), pp.1678–1689.
- Mullins, F.M. et al., 2009. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), pp.15495–15500.
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), pp.355–365.
- Nasir, O. et al., 2009. Relative resistance of SGK1 knockout mice against chemical carcinogenesis. *IUBMB life*, 61(7), pp.768–776.
- Ng, S.W. et al., 2008. Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca²⁺ influx through Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*, 283(46), pp.31348–31355.
- Ng, S.W., Nelson, C. & Parekh, A.B., 2009. Coupling of Ca(2+) microdomains to spatially and temporally distinct cellular responses by the tyrosine kinase Syk. *The Journal of biological chemistry*, 284(37), pp.24767–24772.
- Nielsen, N., Lindemann, O. & Schwab, A., 2014. TRP channels and STIM/ORAI proteins: sensors and effectors of cancer and stroma cell migration. *British journal of pharmacology*, 171(24), pp.5524–5540.
- Ogawa, A. et al., 2009. Inhibition of mTOR attenuates store-operated Ca²⁺ entry in cells from endarterectomized tissues of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 297(4), pp.L666–76.
- Ogawa, A. et al., 2012. PDGF enhances store-operated Ca²⁺ entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 302(2), pp.C405–11.
- Omwandho, C.O.A. et al., 2010. Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis. *Human reproduction (Oxford, England)*, 25(1), pp.101–109.
- Ong, H.L. et al., 2015. STIM2 enhances receptor-stimulated Ca²⁺ signaling by promoting recruitment of STIM1 to the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Science signaling*, 8(359), pp.ra3–ra3.
- Osaki, M. et al., 2004. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 130(1), pp.8–14.
- Ozes, O.N. et al., 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401(6748), pp.82–85.
- Padua, D. et al., 2008. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through

- angiopoietin-like 4. *Cell*, 133(1), pp.66–77.
- Palmada, M. et al., 2005. The serine/threonine kinases SGK1, 3 and PKB stimulate the amino acid transporter ASCT2. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(1), pp.272–277.
- Park, C.Y. et al., 2009. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), pp.876–890.
- Park, J. et al., 1999. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *The EMBO journal*, 18(11), pp.3024–3033.
- Parkash, J. & Asotra, K., 2010. Calcium wave signaling in cancer cells. *Life sciences*, 87(19–22), pp.587–595.
- Peinelt, C. et al., 2006. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nature cell biology*, 8(7), pp.771–773.
- Peng, H. et al., 2013. mTORC1 enhancement of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ entry constrains tuberous sclerosis complex-related tumor development. *Oncogene*, 32(39), pp.4702–4711.
- Penna, A. et al., 2008. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 456(7218), pp.116–120.
- Pennison, M. & Pasche, B., 2007. Targeting transforming growth factor-beta signaling. *Current opinion in oncology*, 19(6), pp.579–585.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), p.e45.
- Prakriya, M. et al., 2006. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443(7108), pp.230–233.
- Prevarskaya, N. et al., 2014. Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1638), pp.20130097–20130097.
- Prevarskaya, N., Skryma, R. & Shuba, Y., 2011. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature reviews. Cancer*, 11(8), pp.609–618.
- Puc, J. et al., 2005. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer cell*, 7(2), pp.193–204.
- Putney, J.W., 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium*, 7(1), pp.1–12.
- Putney, J.W., 2007. New molecular players in capacitative Ca²⁺ entry. *Journal of cell science*, 120(Pt 12), pp.1959–1965.
- Putney, J.W., 2010. Pharmacology of Store-operated Calcium Channels. *Molecular interventions*, 10(4), pp.209–218.

- Qu, B. et al., 2011. ORAI-mediated calcium influx in T cell proliferation, apoptosis and tolerance. *Cell calcium*, 50(3), pp.261–269.
- Reeves, J.P. & Hale, C.C., 1984. The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *The Journal of biological chemistry*, 259(12), pp.7733–7739.
- Reiter, M.H. et al., 2011. Opposite effects of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 and glucocorticoids on POMC transcription and ACTH release. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 301(2), pp.E336–41.
- Rhodes, N. et al., 2008. Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Cancer research*, 68(7), pp.2366–2374.
- Roderick, H.L. & Cook, S.J., 2008. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nature reviews. Cancer*, 8(5), pp.361–375.
- Ronchi, C.L., Leich, E., et al., 2012a. Single nucleotide polymorphism microarray analysis in cortisol-secreting adrenocortical adenomas identifies new candidate genes and pathways. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 14(3), pp.206–218.
- Ronchi, C.L., Sbiera, S., et al., 2012b. Low SGK1 expression in human adrenocortical tumors is associated with ACTH-independent glucocorticoid secretion and poor prognosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(12), pp.E2251–60.
- Roos, J. et al., 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *The Journal of cell biology*, 169(3), pp.435–445.
- Ross, S. & Hill, C.S., 2008. How the Smads regulate transcription. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(3), pp.383–408.
- Rothberg, B.S., Wang, Y. & Gill, D.L., 2013. Orai channel pore properties and gating by STIM: implications from the Orai crystal structure. *Science signaling*, 6(267), pp.pe9–pe9.
- Rotte, A. et al., 2011. Influence of dexamethasone on na⁺/h⁺ exchanger activity in dendritic cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 28(2), pp.305–314.
- Rudd, C.E., Taylor, A. & Schneider, H., 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*, 229(1), pp.12–26.
- Sahin, P. et al., 2013. The cell survival kinase SGK1 and its targets FOXO3a and NDRG1 in aged human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39(6), pp.623–633.
- Salker, M.S. et al., 2011. Deregulation of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the endometrium causes reproductive failure. *Nature medicine*, 17(11), pp.1509–1513.
- Salvesen, G.S. & Riedl, S.J., 2008. Caspase mechanisms. *Advances in experimental medicine and biology*, 615(Chapter 2), pp.13–23.
- Sarbassov, D.D. et al., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR

- complex. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5712), pp.1098–1101.
- Schindl, R. et al., 2009. Plasticity in Ca²⁺ selectivity of Orai1/Orai3 heteromeric channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46), pp.19623–19628.
- Schmierer, B. & Hill, C.S., 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(12), pp.970–982.
- Scrimgeour, N. et al., 2009. Properties of Orai1 mediated store-operated current depend on the expression levels of STIM1 and Orai1 proteins. *The Journal of physiology*, 587(Pt 12), pp.2903–2918.
- Seebohm, G. et al., 2005. Regulation of KCNQ4 potassium channel prepulse dependence and current amplitude by SGK1 in *Xenopus* oocytes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 16(4-6), pp.255–262.
- Segal, R.A., 2003. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual review of neuroscience*, 26(1), pp.299–330.
- Shanmugam, I. et al., 2007. Serum/glucocorticoid-induced protein kinase-1 facilitates androgen receptor-dependent cell survival. *Cell death and differentiation*, 14(12), pp.2085–2094.
- Sherk, A.B. et al., 2008. Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer research*, 68(18), pp.7475–7483.
- Shiojima, I. et al., 2005. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *The Journal of clinical investigation*, 115(8), pp.2108–2118.
- Singh, M. et al., 2013. Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance. *BMC cancer*, 13(1), p.233.
- Smyth, J.T. et al., 2008. Ca²⁺-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *Journal of cell science*, 121(Pt 6), pp.762–772.
- Smyth, J.T. et al., 2009. Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nature cell biology*, 11(12), pp.1465–1472.
- Soboloff, J., Madesh, M. & Gill, D.L., 2011. Sensing cellular stress through STIM proteins. *Nature chemical biology*, 7(8), pp.488–492.
- Staal, S.P., 1987. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(14), pp.5034–5037.
- Stathopoulos, P.B. et al., 2013. STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-

- operated calcium entry. *Nature communications*, 4, p.2963.
- Stathopoulos, P.B. et al., 2006. Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *The Journal of biological chemistry*, 281(47), pp.35855–35862.
- Stathopoulos, P.B. et al., 2008. Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell*, 135(1), pp.110–122.
- Steinhardt, R.A. & Alderton, J., 1988. Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. *Nature*, 332(6162), pp.364–366.
- Stiber, J. et al., 2008. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nature cell biology*, 10(6), pp.688–697.
- Streb, H. et al., 1983. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306(5938), pp.67–69.
- Szmulewitz, R.Z. et al., 2012. Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 expression in primary human prostate cancers. *The Prostate*, 72(2), pp.157–164.
- Taylor, J.T. et al., 2008. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World journal of gastroenterology : WJG*, 14(32), pp.4984–4991.
- Thompson, J., Mignen, O. & Shuttleworth, T.J., 2010. The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid. *Channels (Austin, Tex.)*, 4(5), pp.398–410.
- Tran, H. et al., 2003. The many forks in FOXO's road. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2003(172), pp.RE5–re5.
- Ueda, T. et al., 1986. Influence of inositol 1,4,5-trisphosphate and guanine nucleotides on intracellular calcium release within the N1E-115 neuronal cell line. *The Journal of biological chemistry*, 261(7), pp.3184–3192.
- Vig, M. et al., 2006. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5777), pp.1220–1223.
- Vivanco, I. & Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2(7), pp.489–501.
- Waldegger, S. et al., 1997. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), pp.4440–4445.
- Waldegger, S. et al., 1999. h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology*, 116(5), pp.1081–1088.
- Wang, K. et al., 2010. SGK1-dependent intestinal tumor growth in APC-deficient mice.

- Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 25(2-3), pp.271–278.
- Webster, M.K. et al., 1993. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Molecular and cellular biology*, 13(4), pp.2031–2040.
- Wei, M.C. et al., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), pp.727–730.
- Williams, M.S. & Henkart, P.A., 1994. Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 153(9), pp.4247–4255.
- Yamashita, M. et al., 2007. Orai1 mutations alter ion permeation and Ca²⁺-dependent fast inactivation of CRAC channels: evidence for coupling of permeation and gating. *The Journal of general physiology*, 130(5), pp.525–540.
- Yang, N. et al., 2013. Blockade of store-operated Ca(2+) entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer letters*, 330(2), pp.163–169.
- Yang, S., Zhang, J.J. & Huang, X.-Y., 2009. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer cell*, 15(2), pp.124–134.
- Yeromin, A.V. et al., 2006. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, 443(7108), pp.226–229.
- Yoon, J.W. et al., 2009. Defining a role for Sonic hedgehog pathway activation in desmoplastic medulloblastoma by identifying GLI1 target genes. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 124(1), pp.109–119.
- Yu, Z. et al., 2014. miR-17/20 sensitization of breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis requires Akt1. *Oncotarget*, 5(4), pp.1083–1090.
- Yuan, J.P., Kim, M.S., et al., 2009a. TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels (Austin, Tex.)*, 3(4), pp.221–225.
- Yuan, J.P., Zeng, W., et al., 2009b. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature cell biology*, 11(3), pp.337–343.
- Yuan, T.L. & Cantley, L.C., 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), pp.5497–5510.
- Yun, C.C. et al., 2002. The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na⁺/H⁺ exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K⁺ channel ROMK1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(12), pp.2823–2830.
- Zhang, S.L. et al., 2006. Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), pp.9357–9362.

- Zhang, S.L. et al., 2005. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, 437(7060), pp.902–905.
- Zhao, Q. et al., 2010. Wogonin potentiates the antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF-kappaB and regulation of its metabolism. *Toxicology letters*, 197(3), pp.201–210.
- Zheng, L. et al., 2011. Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), pp.1337–1342.
- Zheng, L. et al., 2008. Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(1), pp.240–246.
- Zhou, Y. et al., 2010. Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), pp.4896–4901.

ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir persönlich verfasst wurde und nur unter zur Hilfenahme der angegebenen Mittel und Quellen zustande kam. Sämtliche wörtlich oder inhaltlich übernommene Zitate und Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2011 bis Februar 2014 am Physiologischen Institut der Eberhard Karls Universität Tübingen bei Prof. Dr. med. Florian Lang und Prof. Dr. rer. nat. Peter Ruth angefertigt, wobei wesentliche Teile in folgenden Manuskripten verarbeitet sind:

Schmidt, S., Schneider, S., Yang, W., Liu, G., Schmidt, E.-M., Schmid, E., Mia, S., Brucker, S., Stournaras, C., Wallwiener, D., Brosens, J. J., und Lang, F. *TGF β 1 and SGKI-sensitive store-operated Ca $^{2+}$ entry and Orai1 expression in endometrial Ishikawa cells*. Molecular Human Reproduction (2014)

Schmidt, S., Liu, G., Liu, G., Yang, W., Honisch, S., Pantelakos, S., Stournaras, C., Hönig, A., und Lang F. *Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca $^{2+}$ entry in therapy resistant ovary carcinoma cells*. Oncotarget (2014)

Die in dieser Dissertation erhobenen Daten wurden weder im Inland noch im Ausland einer Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Der allergrößte Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde von mir persönlich erhoben. Die Immunfluoreszenz-Messungen, einzelne Western Blots, die RT-PCR- und FACS-Messungen wurden von Wenting Yang, Guilai Liu und Guoxing Liu durchgeführt und dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

PUBLIKATIONEN

- Eylenstein, A., Gehring, E.-M., Heise, N., Shumilina, E., **Schmidt, S.**, Szteyn, K., Münzer, P., Nurbaeva, M., Eichenmüller, M., Tyan, L., Regel, I., Föllner, M., Kuhl, D., Soboloff, J., Penner, R., und Lang F. *Stimulation of Ca²⁺-channel Orai1/STIM1 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1)*. **FASEB Journal (2011)**
- Eylenstein, A., **Schmidt, S.**, Gu, S., Yang, W., Schmid, E., Schmidt, E.-M., Alesutan, I., Szteyn K., Regel, I., Shumilina, E., und Lang F. *Transcription factor NF- κ B regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions*. **The Journal of Biological Chemistry (2012)**
- Bhavsar, S. K.*, **Schmidt, S.***, Bobbala, D., Nurbaeva, M. K., Hosseinzadeh, Z., Merches, K., Fajol, A., Wilmes, J., und Lang F. *AMPK α 1-sensitivity of Orai1 and Ca(2+) entry in T - lymphocytes*. **Cellular Physiology and Biochemistry (2013)**
- Abed, M., Towhid, S. T., Feger, M., **Schmidt, S.**, Kuro-O, M., Gawaz, M., und Lang, F. *Adhesion of klotho-deficient eryptotic erythrocytes to endothelial cells*. **Acta Physiologica (Oxford, England) (2013)**
- Münzer, P., Borst, O., Walker, B., Schmid, E., Feijge, M. A. H., Cosemans, J. M. E. M., Chatterjee, M., Schmidt, E.-M., **Schmidt, S.**, Towhid, S. T., Leibrock, C., Elvers, M., Schaller, M., Seizer, P., Ferlinz, P., May A. E., Gulbins, E., Heemskerck, J. W. M., Gawaz, M., und Lang F. *Acid sphingomyelinase regulates platelet cell membrane scrambling, secretion, and thrombus formation*. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (2014)**
- Schmidt, S.**, Schneider, S., Yang, W., Liu, G., Schmidt, E.-M., Schmid, E., Mia, S., Brucker, S., Stournaras, C., Wallwiener, D., Brosens, J. J., und Lang, F. *TGF β 1 and SGK1-sensitive store-operated Ca²⁺ entry and Orai1 expression in endometrial Ishikawa cells*. **Molecular Human Reproduction (2014)**
- Borst, O., Münzer, P., Schmid, E., Schmidt, E.-M., Russo, A., Walker, B., Yang, W., Leibrock, C., Szteyn, K., **Schmidt, S.**, Elvers, M., Faggio, C., Shumilina, E., Kuro-O, M., Gawaz, M., und Lang, F. *1,25(OH)² vitamin D₃-dependent inhibition of platelet Ca²⁺ signaling and thrombus formation in klotho-deficient mice*. **FASEB Journal (2014)**
- Chatterjee, S., **Schmidt, S.**, Pouli, S., Honisch, S., Alkahtani, S., Stournaras, C., und Lang, F. *Membrane androgen receptor sensitive Na⁺/H⁺ exchanger activity in prostate cancer cells*. **FEBS Letters (2014)**
- Schmidt, S.**, Liu, G., Liu, G., Yang, W., Honisch, S., Pantelakos, S., Stournaras, C., Hönic, A., und Lang F. *Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca²⁺ entry in therapy resistant ovary carcinoma cells*. **Oncotarget (2014)**
- Liu, G., Honisch, S., Liu, G., **Schmidt, S.**, Pantelakos, S., Alkahtani, S., Toulany, M., Lang, F., und Stournaras C. *Inhibition of SGK1 enhances mAR-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells*. **Cancer Biology & Therapy (2014)**

Lang, E., Gatidis, S., Freise, N. F., Bock, H., Kubitz, R., Lauermann, C., Orth, H. M., Klindt, C., Schuier, M., Keitel, V., Reich, M., Liu, G., **Schmidt, S.**, Xu, H. C., Qadri, S. M., Herebian, D., Pandyra, A. A., Mayatepek, E., Gulbins, E., Lang, F., Häussinger, D., Lang K. S., Föller F. und Lang P.A., *Conjugated bilirubin triggers anemia by inducing erythrocyte death.* **Hepatology (Baltimore, Md.) (2015)**

Zhang, B., Jing, J., Fajol, A., **Schmidt, S.**, Salker, M. S., Alexander-Friedrich, D., Spichtig, D., Daryadel, A., Wagner, C. A., Föller, M. und Lang, F., *Aldosterone-sensitive NFkB-dependent Orail expression in the regulation of FGF23 release.* **Kidney Int. (2015 in Revision)**

Liu, G., Honisch, S., **Schmidt, S.**, Alkahtani, S., AlKahtane, A. A., Stournaras C., und Lang, F., *Up-regulation of Orail expression and store operated Ca²⁺ entry following activation of membrane androgen receptors in MCF-7 breast tumor cells.* **Oncotarget (2015 eingereicht)**

* geteilte Erstautorschaft

DANKSAGUNG

Mit wenigen und aufgrund der vielen Unterstützung ganz sicher nicht annähernd ausreichenden Worten möchte ich mich bei all jenen bedanken ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. med. Florian Lang, der es mir ermöglichte diese Arbeit am Physiologischen Institut der Eberhard Karls Universität Tübingen anzufertigen und mir jederzeit willkommen und mit wissenschaftlichem Rat zur Seite stand.

Weiterhin Danke ich Prof. Dr. Peter Ruth für die Übernahme der naturwissenschaftlichen Berichterstattung und der damit verbundenen Möglichkeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen zu promovieren.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Wenting Yang, Guilai Liu und Guoxing Liu für ihre Unterstützung bei den erforderlichen Experimenten und bei Christina Leibrock, Martina Feger, Britta Walker, Evi Schmid, Eva-Maria Schmidt, Sabina Honisch, Ganesh Pathare und allen anderen Kollegen am Physiologischen Institut für ihre fachliche Unterstützung und ihre erheiternde Gesellschaft auch außerhalb des wissenschaftlichen Betriebs. Besonders Hervorheben möchte ich dabei Patrick Münzer, Anja Eyllenstein, Michael Föller und Prof. Dr. Christos Stournaras. Es war mir eine Freude und eine Bereicherung!

Von Herzen danke ich meiner Familie und meiner Freundin Naomi Gabriel, deren bedingungsloser Rückhalt und stille Unterstützung ein stetiger Wind in meinen Segeln sind.