

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Dekodierung Phospholipase C-vermittelter Signale:
räumlich-zeitliche Muster von Proteinkinase C-Aktivierung
und Modulation der Spannungsabhängigkeit
des Kationenkanals TRPC4

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Sinnecker

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Schaefer

2. Prof. Dr. med. W. Reutter

3. Prof. Dr. med. Th. Gudermann

Datum der Promotion: 15.12.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Signaltransduktion durch Phospholipasen C	7
1.2	Methoden zur Untersuchung der Phospholipase C-Aktivierung	9
1.3	Phospholipase C-vermittelte Ca^{2+} -Oszillationen in HEK293-Zellen	13
1.4	Phospholipase C-vermittelte Aktivierung der TRPC-Kationenkanäle	16
1.5	Fragestellung	19
2	Methoden	20
2.1	Zellkultur und Transfektion	20
2.2	Molekularbiologie	20
2.2.1	Expressionsplasmide für Säugerzellen	21
2.2.2	Plasmide zur bakteriellen Expression fluoreszierender Proteine	22
2.3	Proteinreinigung und Absorptionsspektroskopie fluoreszierender Proteine	23
2.3.1	Bakterielle Expression	23
2.3.2	Reinigung	24
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.3.4	Absorptionsspektroskopie	24
2.4	Digitale Video-Epifluoreszenz-Mikroskopie	25
2.4.1	Aufbau des Imaging-Systems	25
2.4.2	Analyse der Bilddaten	26
2.4.3	Simultane Darstellung verschiedener Fluoreszenzsignale	27
2.4.4	Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Fura-2	29
2.4.5	Einstellung des intrazellulären pH	29
2.4.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	29
2.5	Elektrophysiologische Untersuchungen	30
2.5.1	Prinzip	30
2.5.2	Aufbau des Messplatzes	31

Inhaltsverzeichnis

2.5.3	Praktische Durchführung	31
2.6	Mathematische und statistische Verfahren	32
2.7	Sonstige Materialien	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Neuartiger Photochromismus fluoreszierender Proteine	34
3.1.1	Die Farbvariante CFP	34
3.1.2	Gelbe Farbvarianten	35
3.1.3	Gereinigte fluoreszierende Proteine	35
3.1.4	Reaktivierung der Fluoreszenzintensität nach reversiblen Ausbleichen . . .	36
3.1.5	Spektrale Abhängigkeit	40
3.1.6	Kinetische Untersuchung	42
3.1.7	Bedeutung für zellbiologische Anwendungen	45
3.2	Translokation der Proteinkinase C- α im Rahmen von Ca ²⁺ -Oszillationen	49
3.2.1	Aufzeichnung der Translokationskinetik	50
3.2.2	Vergleich der Kinetik primärer und sekundärer Translokationen	51
3.3	Ca ²⁺ -Signale und Translokation der Proteinkinase C- α nach maximaler und submaximal effektiver Rezeptorstimulation	52
3.4	Translokation der Proteinkinase C- ϵ und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C- δ_1	54
3.4.1	Simultane Visualisierung	55
3.4.2	Translokationseffizienzen nach maximaler und submaximal effektiver Rezeptorstimulation	56
3.4.3	Subzelluläre Lokalisation der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C- δ_1 im Rahmen von Ca ²⁺ -Oszillationen	58
3.5	Phospholipase C-abhängige Aktivierung des Kationenkanals TRPC4	60
4	Diskussion	65
4.1	Photochromismus der fluoreszierenden Proteine	65
4.1.1	Zustandsmodell	65
4.1.2	Vergleich mit bekannten photophysikalischen Effekten	67
4.1.3	Implikationen für zellbiologische Experimente	69
4.2	Untersuchung der Phospholipase C-Aktivierung in Einzelzellen	70
4.2.1	Translokationskinetik der Proteinkinase C- α	71

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Translokationen von Proteinkinase C- ϵ und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C- δ_1	74
4.2.3	Empfindlichkeit der Indikatoren	76
4.2.4	Implikationen für Phospholipase C-vermittelte Ca^{2+} -Oszillationen	76
4.3	Phospholipase C-abhängige Modulation der Spannungsabhängigkeit von TRPC4	78
4.3.1	Spannungsabhängigkeit von TRPC4	78
4.3.2	Modulation der Spannungsabhängigkeit als Aktivierungsmechanismus	80
5	Zusammenfassung	81
	Literaturverzeichnis	83
	Abkürzungsverzeichnis	93
	Lebenslauf	95
	Publikationsliste	96
	Danksagung	97
	Erklärung	98