

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

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Signaltransduktion durch Phospholipasen C . . . . .	7
1.2	Methoden zur Untersuchung der Phospholipase C-Aktivierung . . . . .	9
1.3	Phospholipase C-vermittelte $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in HEK293-Zellen . . . . .	13
1.4	Phospholipase C-vermittelte Aktivierung der TRPC-Kationenkanäle . . . . .	16
1.5	Fragestellung . . . . .	19
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
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
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
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- $\alpha$ im Rahmen von Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen . . . . .	49
3.2.1	Aufzeichnung der Translokationskinetik . . . . .	50
3.2.2	Vergleich der Kinetik primärer und sekundärer Translokationen . . . . .	51
3.3	Ca <sup>2+</sup> -Signale und Translokation der Proteinkinase C- $\alpha$ nach maximaler und submaximal effektiver Rezeptorstimulation . . . . .	52
3.4	Translokation der Proteinkinase C- $\epsilon$ und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C- $\delta_1$ . . . . .	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- $\delta_1$ im Rahmen von Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen . . . . .	58
3.5	Phospholipase C-abhängige Aktivierung des Kationenkanals TRPC4 . . . . .	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
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- $\alpha$ . . . . .	71

## *Inhaltsverzeichnis*

4.2.2	Translokationen von Proteinkinase C- $\epsilon$ und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C- $\delta_1$ . . . . .	74
4.2.3	Empfindlichkeit der Indikatoren . . . . .	76
4.2.4	Implikationen für Phospholipase C-vermittelte $\text{Ca}^{2+}$ -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
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>95</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>96</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>97</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>98</b>