

1 Einleitung

Für die Funktion eines vielzelligen Organismus ist die Kommunikation zwischen den verschiedenen spezialisierten Zellen von essentieller Bedeutung. Eine wichtige Rolle spielen dabei von den Zellen sezernierte Botenstoffe wie Hormone, Neurotransmitter oder Wachstumsfaktoren, die entweder auf benachbarte Zellen wirken oder über den Blutkreislauf zu entfernten Geweben transportiert werden und dort eine Signalwirkung entfalten können. Einige dieser Botenstoffe wie z. B. die Schilddrüsen- oder Steroidhormone sind so lipophil, dass sie die Lipiddoppelschicht der Zellmembran ihrer Zielzellen permeieren und ihre Wirkung durch Interaktion mit intrazellulären Komponenten entfalten können. Die meisten Botenstoffe wirken jedoch extrazellulär durch Bindung an membranständige Rezeptoren. Die Übermittlung eines extrazellulären Signals an die intrazellulären Effektoren, die häufig als eine Kaskade nacheinander aktivierter Signalmoleküle mit Mechanismen der Signalverstärkung und Schleifen positiver sowie negativer Rückkopplung organisiert ist, wird als *Signaltransduktion* bezeichnet.

Die größte bekannte Familie membranständiger Rezeptoren bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die das Signal nach einer ligandeninduzierten Konformationsänderung an auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisierte heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) übertragen (Gilman, 1987). Dies geschieht, indem sie als Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*GEF*, *guanine nucleotide exchange factors*) den Austausch von an das inaktive G-Protein gebundenem GDP durch GTP beschleunigen. Dadurch dissoziiert das G-Protein in die α -Untereinheit und den $G\beta\gamma$ -Komplex, die jeweils Effektorproteine durch Protein-Protein-Interaktion aktivieren oder inhibieren können.

Eine zweite wichtige Gruppe von Rezeptoren bilden die Rezeptortyrosinkinasen, die bei der Bindung eines extrazellulären Liganden dimerisieren (Weiss & Schlessinger, 1998). In Folge dieser Dimerisierung kommt es durch die Kinaseaktivität der Rezeptoren zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten ihrer cytosolischen Termini, an die über SH2 (*src-homology 2*)-Domänen vermittelt Effektor- oder Adapterproteine andocken, die wiederum an Tyrosinresten phosphoryliert werden können.

1.1 Signaltransduktion durch Phospholipasen C

Ein Konvergenzpunkt der sowohl durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als auch durch Rezeptortyrosinkinasen vermittelten Signalwege ist die Aktivierung verschiedener Isoformen der Phospholipase C (PLC, Rhee, 2001). Enzyme der Säuger-PLC-Superfamilie katalysieren die Hydrolyse des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2), wobei seine beiden Bestandteile Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (InsP_3) frei werden (Abb. 1.1). Beide Reaktionsprodukte sind als sogenannte “*second messengers*” Ausgangspunkte von Signalketten.

Es sind insgesamt 14 Säuger-PLC-Isoformen bekannt, die sich phylogenetisch in 6 Klassen (β_{1-4} , γ_{1-2} , δ_{1-4} , ϵ , η_{1-2} und ζ) einteilen lassen (Rhee, 2001; Kouchi *et al.*, 2004; Nakahara *et al.*, 2005). Die β -Isoformen werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert, wobei PLC- β_{1-4} durch GTP beladene $\text{G}\alpha_q$ -Untereinheiten aktiviert werden, PLC- β_{1-3} daneben auch durch $\text{G}\beta\gamma$ -Komplexe. Die γ -Isoformen PLC- γ_{1-2} verfügen über phosphotyrosinbindende SH2-Domänen und werden durch Rezeptortyrosinkinasen aktiviert, daneben ist auch eine Regulation durch nicht-rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben. Die übrigen bekannten Isoformen werden durch eine Reihe

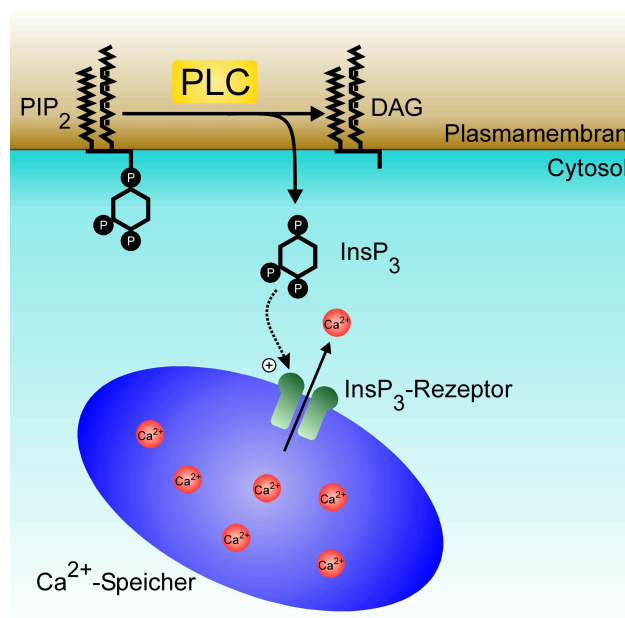


Abbildung 1.1: Signaltransduktion durch Phospholipasen C. Die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) führt zur Hydrolyse des Membranphospholipids PIP_2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu seinen beiden Bestandteilen DAG (Diacylglycerol) und InsP_3 (Inositol-1,4,5-Trisphosphat). Das wasserlösliche InsP_3 bindet an Rezeptoren auf der Membran intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und löst eine Freisetzung von Ca^{2+} aus.

1 Einleitung

von Faktoren wie Ca^{2+} (PLC- δ , PLC- η , PLC- ζ), die kleine GTPase Ras (PLC- ϵ) oder das ungewöhnliche GTP-bindende Protein G_h (PLC- δ_1) reguliert.

Ein wesentlicher PLC-vermittelter Effekt ist die vorübergehende Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). In den meisten Geweben beträgt die extrazelluläre Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen etwa 1 mmol/l. Im Cytosol ruhender Zellen hingegen ist die Konzentration etwa 10.000-fach geringer, wobei die Zelle diesen Gradienten durch aktiven Transport von Ca^{2+} -Ionen sowohl aus der Zelle heraus als auch durch Sequestration in intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher wie das Endoplasmatische Retikulum aufrecht erhält. Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ können daher sowohl durch Einstrom von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Ionenkanäle in der Plasmamembran als auch durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern verursacht werden. Der Hauptanteil des durch PLC-Aktivierung vermittelten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs wird durch InsP_3 -vermittelte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Freisetzung verursacht: Das durch die PLC-Aktivität frei gewordene wasserlösliche InsP_3 diffundiert frei im Cytosol und bindet an Rezeptoren auf der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Diese InsP_3 -Rezeptoren sind ligandenaktivierte Ionenkanäle, die bei InsP_3 -Bindung öffnen und einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Ausstrom aus den Speichern entlang des Konzentrationsgradienten erlauben (siehe Abb. 1.1). Die zellulären Effekte einer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung werden über verschiedene Ca^{2+} -abhängige Effektoren vermittelt. Von herausragender Bedeutung ist hierbei das Calmodulin, ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das Ca^{2+} -abhängig die Aktivität einer Reihe von Effektorproteinen wie beispielsweise Calmodulin-abhängiger Proteinkinasen durch Protein-Protein-Interaktion moduliert. Als Beispiele $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -vermittelter zellulärer Effekte seien Sekretionsvorgänge, Muskelkontraktion, Zellproliferation und Zelldifferenzierung genannt.

PLC-vermittelte Ca^{2+} -Signale können als einfache transiente Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auftreten, sie können aber auch komplexe räumlich-zeitliche Muster bilden (Berridge & Galione, 1988). Häufig treten repetitive Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit einer Periodendauer von Sekunden bis Minuten auf, sogenannte *Ca^{2+} -Oszillationen*. Solche Ca^{2+} -Oszillationen steuern eine Vielzahl von Prozessen im Rahmen der Entwicklung des Organismus, beispielsweise die Fertilisation oder das Wachstum und die Differenzierung von Neuronen. Auch im adulten Organismus spielen Ca^{2+} -Oszillationen etwa bei der Steuerung von Sekretionsvorgängen eine wichtige Rolle. Es wird vermutet, dass solche komplexen Ca^{2+} -Signale ein Weg für die Zelle sind, um die Intensität eines Stimulus zu kodieren. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} -abhängige Effekte im Sinne einer Frequenzmodulation durch die Frequenz repetitiver $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege gesteuert werden können (Woods *et al.*, 1986; Gu & Spitzer, 1995; Li *et al.*, 1998). Zum anderen können auch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege verschiedener Amplitude im Sinne einer Amplitudenmodulation zu differentiellen Effekten führen (Berridge, 1997; Dolmetsch *et al.*, 1997).

1 Einleitung

Eine PLC-Aktivierung führt über die Ca^{2+} -Freisetzung hinaus zu weiteren zellulären Effekten. Ein wichtiger Vermittler dieser Effekte ist das PLC-abhängig gebildete Diacylglycerol, an das verschiedene Proteine, die über DAG-bindende C1-Domänen verfügen, andocken können. Diese Domänen wurden zuerst in Proteinkinase C (PKC)-Isoformen charakterisiert, die durch Diacylglycerol an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert werden. Inzwischen sind auch andere C1-Domänen-tragende Proteine identifiziert worden, die vermutlich ebenso durch Diacylglycerol reguliert werden, z. B. die Chimaerine, die RasGRPs und die Munc13-Isoformen (Brose & Rosenmund, 2002; Kazanietz, 2002). Weiterhin wurde eine direkte Aktivierung der nichtselektiven Kationenkanäle TRPC3, TRPC6 und TRPC7 durch Diacylglycerol beschrieben (Hofmann *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 1999). Diese Proteine verfügen über keine C1-Domänen, ihre DAG-Bindestelle konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

Schließlich können Effekte einer PLC-Aktivierung auch durch die Depletion des Substrats PIP_2 vermittelt werden (Hilgeman *et al.*, 2001; Suh & Hille, 2005). Eine Reihe von Ionenkanälen und Transporterproteinen wird durch PIP_2 -Bindung entweder aktiviert oder gehemmt. Darüber hinaus spielt PIP_2 eine Rolle im Rahmen von Umbauprozessen am Aktin-Cytoskelett und dem Vesikelverkehr. Da eine PLC-Aktivierung zu einer relevanten Abnahme des zellulären PIP_2 -Pools führen kann (Várnai & Balla, 1998), können durch plasmamembranäres PIP_2 vermittelte Effekte prinzipiell auch durch PLC reguliert werden.

1.2 Methoden zur Untersuchung der Phospholipase C-Aktivierung

Die Enzymaktivität gereinigter PLC kann durch Zugabe von exogenem radioaktiv markiertem Substrat und anschließende Analyse der freigesetzten Produkte bestimmt werden. Für viele Fragestellungen ist jedoch die Untersuchung der Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung, also im Kontext einer intakten Zelle, erstrebenswert. Eine verbreitete Methode basiert darauf, die Zellen mit tritiiertem Inositol zu inkubieren, aus dem die Zellen radioaktiv markiertes PIP_2 synthetisieren. Dann wird die PLC-abhängige Signaltransduktionskette beispielsweise über einen Rezeptor stimuliert, während die Dephosphorylierung am Inositolring durch Lithiumsalze gehemmt wird. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation radioaktiver Inositolphosphate, die nach Aufschließen der Zellen chromatographisch aufgetrennt und szintillatorisch quantifiziert werden können.

Ein Nachteil dieser und ähnlicher biochemischer Untersuchungsmethoden liegt darin, dass mit ihnen immer die durchschnittliche PLC-Aktivität in einer Population von Zellen erfasst wird. PLC-Aktivierungen, die in verschiedenen Einzelzellen asynchron ablaufen, sind ihnen daher nicht zugänglich. Solche asynchronen PLC-Aktivierungen könnten beispielsweise Ca^{2+} -Oszillationen zu-

1 Einleitung

grunde liegen, bei denen die repetitiven $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten in verschiedenen Zellen nicht gekoppelt sind, sondern sich in Frequenz und Phase unterscheiden. Zur Untersuchung solcher Phänomene, bei denen Einzelzellen oder sogar Zellkompartimente als eigenständige Einheiten betrachtet werden können, sind fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen lebender Zellen gut geeignet.

Da die Aktivierung von PLC zu einem $InsP_3$ -vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg führt, können fluoreszierende $[Ca^{2+}]_i$ -Indikatoren wie Fura-2 (Grynkiewicz *et al.*, 1985), die ihre Fluoreszenzeigenschaften bei Bindung von Ca^{2+} ändern, zur Untersuchung der PLC-Aktivierung in Einzelzellen verwendet werden. Auf diese Weise lässt sich der Zeitverlauf von $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten in einzelnen lebenden Zellen darstellen. Aus den Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ kann jedoch nicht direkt auf die Kinetik einer zugrundeliegenden PLC-Aktivierung geschlossen werden: Zum einen ist die $InsP_3$ -vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} nicht der einzige Vorgang, der zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt. Auch andere Mediatoren wie zyklische ADP-Ribose (cADPR), Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAADP) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) können eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bewirken, und ein Ca^{2+} -Einstrom durch Ionenkanäle in der Plasmamembran führt ebenfalls zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Berridge *et al.*, 2003). Zum anderen wird die Offenwahrscheinlichkeit der $InsP_3$ -Rezeptoren durch die lokale Ca^{2+} -Konzentration in direkter Umgebung der Rezeptoren auf duale Weise beeinflusst, wobei geringe Konzentrationen den Ca^{2+} -Ausstrom noch vergrößern, höhere Konzentrationen die Kanäle jedoch inhibieren (Bezprozvanny *et al.*, 1991; Tu *et al.*, 2005). Diese Kombination aus positiver und negativer Rückkopplung führt dazu, dass Ca^{2+} -Anstiegen ähnlicher Höhe ein sehr variables Maß an PLC-Aktivität zugrunde liegen kann.

Zu einem genaueren Bild der PLC-Aktivierung in Einzelzellen konnten Untersuchungen mit genetisch kodierten Fluoreszenz-Biosensoren beitragen, die auf dem fluoreszierenden Protein GFP (*green fluorescent protein*) aus der Qualle *Aequorea victoria* basieren (Tsien, 1998). In der Qualle wandelt GFP durch Chemolumineszenz erzeugtes blaues Licht in grüne Fluoreszenzemission um. Wird die für GFP kodierende cDNA mithilfe geeigneter Vektoren in prokaryote oder eukaryote Zellen eingeschleust, exprimieren sie das fluoreszierende Protein, dessen Chromophor durch Autokatalyse gebildet wird. Durch molekularbiologische Techniken können Fusions-cDNAs hergestellt werden, in denen die GFP-Sequenz an die cDNA-Sequenz eines anderen Proteins gekoppelt ist. Eine Transfektion mit dieser cDNA führt dann zur Synthese eines fluoreszierenden Fusionsproteins. Ausgehend vom wildtypischen GFP, das eine Tendenz zur Dimerisierung aufweist und dessen Fluoreszenzanregungsspektrum sich unter intensiver Belichtung durch eine photochemische Reaktion verschiebt, wurde durch Mutagenese eine Vielzahl von Farbvarianten entwickelt, die eine

1 Einleitung

stabilere Fluoreszenz aufweisen, nicht dimerisieren und die simultane Untersuchung verschiedenfarbiger GFP-Fusionsproteine in der selben Zelle ermöglichen.

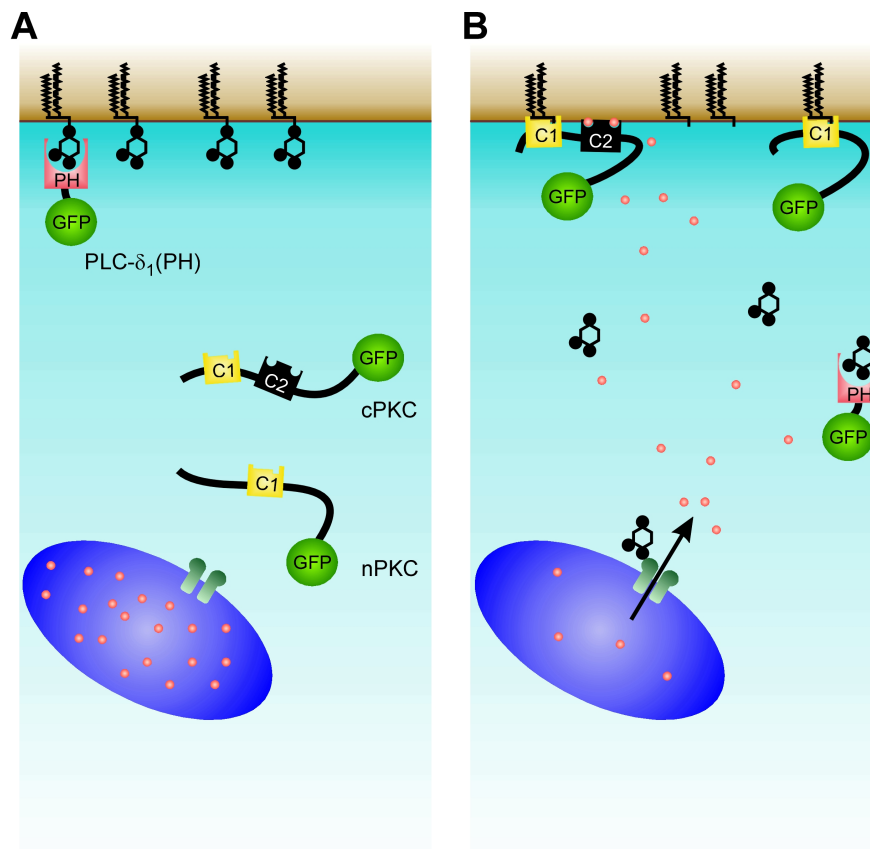


Abbildung 1.2: Nachweis der Phospholipase C-Aktivierung durch translozierende Biosensoren. Schematische Darstellung dreier translozierender Fluoreszenz-Biosensoren, deren subzelluläre Lokalisation vor (A) und nach (B) PLC-vermitteltem Abbau von PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu InsP₃ (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) und Diacylglycerol sich unterscheidet. Dargestellt sind nur die für die subzelluläre Lokalisation relevanten Proteindomänen der fluoreszierenden Fusionsproteine (GFP = *green fluorescent protein* bzw. seine Farbvarianten). Die PH-Domäne (Pleckstrin-homologe Domäne) der PLC-δ₁ (PLC-δ₁(PH)) bindet sowohl an PIP₂ als auch an InsP₃. Die C1-Domänen klassischer (cPKC) und neuartiger (nPKC) Proteinkinase C (PKC)-Isoformen binden an PLC-abhängig gebildetes Diacylglycerol, die C2-Domäne klassischer PKC-Isoformen bindet zusätzlich im Komplex mit Ca²⁺-Ionen an Membranphospholipide.

Als PLC-Biosensoren können fluoreszierende Fusionsproteine aus solchen Proteinen eingesetzt werden, die an PLC-abhängig gebildete oder abgebaute Signalmoleküle binden und dadurch eine bestimmte subzelluläre Lokalisation aufweisen (Abb. 1.2). Veränderungen in der Konzentration der Signalmoleküle führen dann zu einer fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren subzellulären Umverteilung der Fusionsproteine. Zu diesem Zweck wurden insbesondere die Pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne) der PLC-δ₁ sowie verschiedene PKC-Isoformen verwendet.

1 Einleitung

Die PH-Domäne der PLC- δ_1 (PLC- δ_1 (PH)) bindet mit hoher Affinität und Spezifität an das PLC-Substrat PIP₂ (Lemmon *et al.*, 1995; Kavran *et al.*, 1998). Ein fluoreszierendes Fusionsprotein aus PLC- δ_1 (PH) ist in ruhenden Zellen im Bereich der Plasmamembran lokalisiert und erfährt nach PLC-Aktivierung eine schnelle Umverteilung ins Cytosol (Stauffer *et al.*, 1998; Várnai & Balla, 1998). Dieser Befund wurde zunächst auf den PLC-vermittelten Abbau des als Membranker dienenden PIP₂ zurückgeführt. Später zeigte sich, dass PLC- δ_1 (PH) InsP₃ mit 20-fach höherer Affinität bindet als PIP₂, so dass auch die PLC-vermittelte InsP₃-Bildung für die Translokation verantwortlich sein könnte, ohne dass es zwangsläufig zu einer relevanten Abnahme des PIP₂-Gehalts der Plasmamembran kommen muss (Hirose *et al.*, 1999; Nash *et al.*, 2001b, 2003). Unabhängig davon, welcher der beiden Mechanismen für die Translokation in lebenden Zellen relevanter ist, zeigt die Umverteilung eines fluoreszierenden PLC- δ_1 (PH)-Fusionsproteins von der Plasmamembran ins Cytosol eine PLC-Aktivierung an.

Verschiedene PKC-Isoformen werden als Effektoren der PLC-vermittelten Signaltransduktion sowohl direkt durch das PLC-Reaktionsprodukt Diacylglycerol als auch indirekt durch den InsP₃-vermittelten [Ca²⁺]_i-Anstieg aktiviert (Nishizuka, 1992; Mellor & Parker, 1998). Die Enzyme liegen in ruhenden Zellen cytosolisch vor und translozieren im Rahmen ihrer Aktivierung an die Plasmamembran. Die Mitglieder der PKC-Familie wurden nach strukturellen Ähnlichkeiten und regulatorischen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt. Sie weisen eine Domänenstruktur auf, wobei für die subzelluläre Translokation insbesondere die C1- und die C2-Domänen verantwortlich sind. Die klassischen PKCs (α , β I, β II und γ) werden sowohl durch Ca²⁺ als auch durch Diacylglycerol an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert. Bei Erhöhung der [Ca²⁺]_i kommt es zu einer [Ca²⁺]_i-abhängigen Bindung ihrer C2-Domäne an das anionische Membranphospholipid Phosphatidylserin (Corbalán-García *et al.*, 1999; Conesa-Zamora *et al.*, 2001; Nalefski *et al.*, 2001). Weiterhin führt eine Erhöhung der Diacylglycerolkonzentration in der Plasmamembran zu einer Ca²⁺-unabhängigen Bindung von Diacylglycerol an cysteinreiche Motive innerhalb der C1-Domäne (siehe Abb. 1.2). Die neuartigen PKCs (δ , ϵ , η , θ und μ) besitzen keine funktionelle C2-Domäne und werden über ihre C1-Domäne vermittelt durch Diacylglycerol an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert (Siehe Abb. 1.2, Zhang *et al.*, 1995). Die atypischen PKCs (λ / ι und ζ) werden weder durch Diacylglycerol, noch durch Ca²⁺ aktiviert (Nishizuka, 1992; Mellor & Parker, 1998). Prinzipiell können also GFP-Fusionsproteine sowohl aus klassischen als auch aus neuartigen PKC-Isoformen eine PLC-vermittelte DAG-Bildung durch eine Translokation vom Cytosol an die Plasmamembran anzeigen, wobei die klassischen Isoformen jedoch auch auf einen reinen [Ca²⁺]_i-Anstieg ohne DAG-Bildung mit einer Translokation an die Plasmamembran reagieren können.

1.3 Phospholipase C-vermittelte Ca^{2+} -Oszillationen in HEK293-Zellen

In elektrisch erregbaren Zellen können Ca^{2+} -Oszillationen durch repetitiven Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran generiert werden (Berridge & Galione, 1988). Der Mechanismus, der Ca^{2+} -Oszillationen in elektrisch nicht erregbaren Zellen wie der häufig für Transfektionsexperimente verwendeten Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney cells*, menschliche embryonale Nierenzellen) zugrundeliegt, ist nicht vollständig aufgeklärt.

Modelle, die zur Erklärung oszillatorischer Ca^{2+} -Signale in elektrisch nicht erregbaren Zellen aufgestellt wurden, lassen sich in zwei Kategorien einteilen (Berridge & Galione, 1988; Berridge, 1990): Modelle, die von einer zyklischen PLC-vermittelten Produktion von InsP_3 ausgehen (sogenannte „rezeptorkontrollierte“ Modelle), sowie Modelle, die die Ca^{2+} -Oszillationen durch eine periodische Ca^{2+} -Freisetzung aus den Speichern bei konstanter InsP_3 -Konzentration erklären (sogenannte „second-messenger-kontrollierte“ Modelle). Verschiedene Schleifen positiver und negativer Rückkopplung werden für die Generierung der repetitiven $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten verantwortlich gemacht (Abb. 1.3).

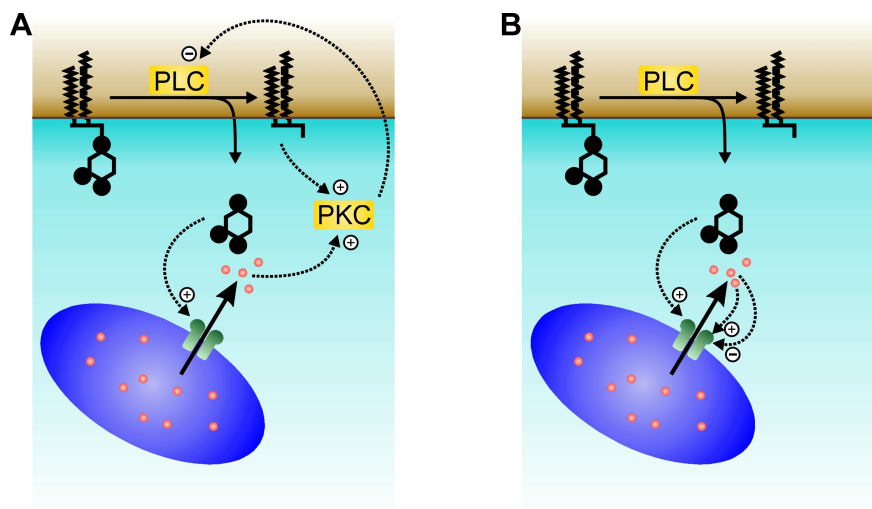


Abbildung 1.3: Modelle für die Generierung von Ca^{2+} -Oszillationen. (A) Rezeptorkontrollierter Mechanismus: InsP_3 (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) stimuliert eine Ca^{2+} -Freisetzung über den InsP_3 -Rezeptor, das freigesetzte Ca^{2+} sowie das Diacylglycerol aktivieren Proteinkinase C (PKC), diese hemmt direkt oder indirekt die rezeptoraktivierte Phospholipase C. (B) *Second-messenger*-kontrollierter Mechanismus: InsP_3 stimuliert die Ca^{2+} -Freisetzung über den InsP_3 -Rezeptor, das freigesetzte Ca^{2+} führt konzentrationsabhängig sowohl zu einer weiteren Aktivierung als auch zu einer Hemmung des InsP_3 -Rezeptors, außerdem desensibilisiert dieser in Folge der InsP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung.

Für eine periodische Bildung von InsP_3 könnte eine negative Rückkopplung zwischen PKC und PLC verantwortlich sein: Die Aktivierung von PLC führt zur Bildung von InsP_3 und damit

1 Einleitung

zur Freisetzung von Ca^{2+} . Gleichzeitig wird durch Diacylglycerol und Ca^{2+} PKC aktiviert, die wiederum die PLC direkt oder indirekt inhibieren kann (Siehe Abb. 1.3 A). Die rezeptorvermittelte PLC-Aktivierung könnte dadurch zyklisch verlaufen und zur pulsatilen Bildung von InsP_3 führen (Berridge, 1987; Cobbold *et al.*, 1988).

Ca^{2+} -Oszillationen bei konstanter InsP_3 -Konzentration könnten auf intrinsischen Eigenschaften der InsP_3 -Rezeptoren beruhen, deren InsP_3 -abhängiges Öffnungsverhalten durch Ca^{2+} -Bindung moduliert wird (Siehe Abb. 1.3 B; Berridge & Galione, 1988). Ihre Offenwahrscheinlichkeit weist eine glockenförmige Ca^{2+} -Abhängigkeit mit einer Aktivierung durch niedrige (bis 10^{-5} mol/l) und einer Inhibition durch hohe ($> 10^{-5}$ mol/l) Ca^{2+} -Konzentrationen auf (Bezprozvanny *et al.*, 1991; Tu *et al.*, 2005). Weiterhin desensibilisieren die InsP_3 -Rezeptoren nach einer Ca^{2+} -Freisetzung und erholen sich mit Zeitkonstanten von einigen Sekunden (Oancea & Meyer, 1996). So kann die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach einer InsP_3 -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung durch Rücktransport in die Speicher wieder gesenkt werden, bis erneut eine zur Auslösung eines weiteren Ca^{2+} -Transienten ausreichende Anzahl von InsP_3 -Rezeptoren aktivierbar ist. Dieser Mechanismus ist hinreichend, um eine oszillatorische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum permeabilisierter Hepatozyten auszulösen (Hajnóczky & Thomas, 1997).

Experimente mit einem fluoreszierenden Fusionsprotein aus PLC- δ_1 (PH) ergaben, dass dieser $\text{PIP}_2/\text{InsP}_3$ -Sensor während ATP-induzierter Ca^{2+} -Oszillationen in MDCK-Zellen eine parallel zu den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten verlaufende repetitive Umverteilung von der Plasmamembran ins Cytosol und zurück vollführt (Hirose *et al.*, 1999). Diese Befunde stützen die Theorie, dass oszillatorische Ca^{2+} -Signale durch eine zyklische PLC-Aktivierung verursacht werden können. Solche repetitiven Translokationen fluoreszierender $\text{PIP}_2/\text{InsP}_3$ -Sensoren im Rahmen von Ca^{2+} -Oszillationen wurden in verschiedenen Zelltypen, unter anderem auch in mit metabotropen Glutamatrezeptoren transfizierten HEK293-Zellen, beobachtet (Dale *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001a).

Im Gegensatz dazu stehen Befunde, die mithilfe fluoreszierender PKC-Fusionsproteine ebenfalls in HEK293-Zellen erhoben wurden, in denen Ca^{2+} -Oszillationen durch niedrige Konzentrationen von Carbachol ausgelöst wurden (Schaefer *et al.*, 2001). Die sowohl Ca^{2+} - als auch DAG-abhängig translozierende klassische PKC-Isoform PKC- α zeigte eine mit den Ca^{2+} -Anstiegen synchrone repetitive Translokation vom Cytosol zur Plasmamembran und wieder zurück (Abb. 1.4 A). Die Ca^{2+} -unabhängige, DAG-bindende neuartige PKC- ϵ zeigte jedoch nur eine monophasische, mehrere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten überdauernde Anreicherung an der Plasmamembran (Abb. 1.4 B). Dieser Befund legt eine monophasische, nicht oszillatorische DAG-Bildung nahe.

Da durch PLC-Aktivität InsP_3 und DAG in äquimolaren Mengen gebildet werden, stellt sich die Frage, warum die verschiedenen PLC-Indikatoren im gleichen Zelltyp entweder eine mono-

1 Einleitung

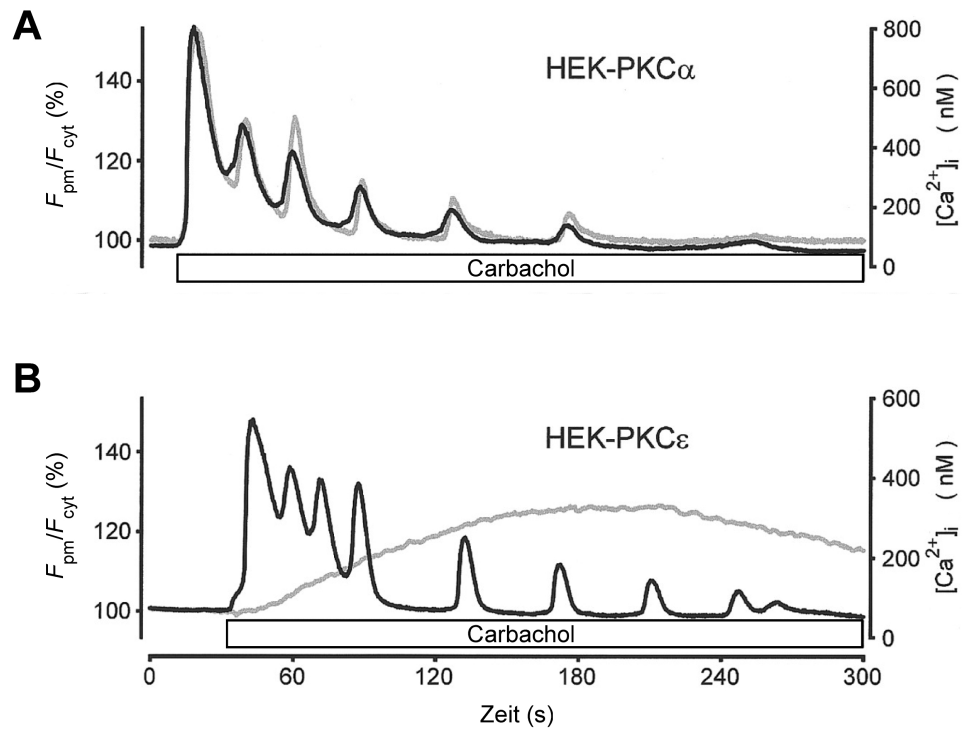


Abbildung 1.4: Translokation klassischer und neuartiger Proteinkinase C-Isoformen während Carbachol-induzierter Ca^{2+} -Oszillationen in HEK293-Zellen. Dargestellt sind typische Translokationskinetiken der klassischen PKC-Isoform PKC- α (A) und der neuartigen Isoform PKC- ϵ (B) in Einzelzellen während durch Stimulation der Zellen mit Carbachol ausgelöster Ca^{2+} -Oszillationen. Die PKC-Isoformen wurden als fluoreszierende Fusionsproteine exprimiert und das zeitliche Muster ihrer Translokation als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten über der Plasmamembran und dem Cytosol ($F_{\text{pm}}/F_{\text{cyt}}$) dargestellt (graue Spuren). Gleichzeitig wurde der Zeitverlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mit Fura-2 gemessen (schwarze Spuren, aus Schaefer *et al.*, 2001)

oder eine multiphasische PLC-Aktivierung im Rahmen von Ca^{2+} -Oszillationen anzeigen. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich eine tatsächlich oszillatorische PLC-Aktivierung dann nicht in Oszillationen der DAG-Konzentration ausdrücken muss, wenn das gebildete DAG nur langsam abgebaut wird und es dadurch zu einer Kumulation von DAG in der Plasmamembran kommt. Würde sich die Kinetik des DAG-Abbaus erheblich von der des InsP_3 -Abbaus bzw. der PIP_2 -Resynthese unterscheiden, könnten die beiden Indikatoren PKC- ϵ und PLC- δ_1 (PH) so auf das gleiche Muster von PLC-Aktivität unterschiedlich reagieren. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass in HEK293-Zellen beide Typen von Ca^{2+} -Oszillationen realisiert werden können, so dass die Stimulation endogener muskarinischer Azetylcholinrezeptoren einen *second-messenger*-kontrollierten Oszillationsmechanismus bei konstanter InsP_3 -Konzentration in Gang setzt, während

1 Einleitung

die Stimulation heterolog exprimierter metabotroper Glutamatrezeptoren zu einer oszillatorischen PLC-Aktivierung im Sinne eines rezeptorkontrollierten Oszillationsmechanismus führt.

Die Frage, ob Ca^{2+} -Oszillationen mit einer oszillatorischen Aktivierung der PLC einhergehen, ist insofern von Bedeutung, als es bei einer oszillatorischen PLC-Aktivität auch zu einer repetitiven Aktivierung der nicht Ca^{2+} -abhängigen PLC-Effektoren kommen kann, die bei einem reinen *second-messenger*-kontrollierten Oszillationsmechanismus nicht zu erwarten ist. Die Fähigkeit, beide Typen von Ca^{2+} -Oszillationen als Antwort auf verschiedene Reize zu generieren, könnte von einer Zelle genutzt werden, um auf verschiedene Reize mit unterschiedlichen zellulären Reaktionen zu antworten. Zur Klärung dieser Frage ist eine genauere Analyse der PLC-vermittelten Translokation der verfügbaren Biosensoren notwendig. Ein direkter Vergleich der Translokation von PKC- ϵ und PLC- δ_1 (PH) als Antwort auf den gleichen Reiz könnte zur Klärung der Frage beitragen, ob sich die Abbaukinetik des DAG von der des InsP_3 bzw. der Resynthesekinetik des PIP_2 unterscheidet.

Als weiterer Ansatzpunkt kann untersucht werden, ob sich auch aus der Translokation der sowohl DAG- als auch Ca^{2+} -abhängig translozierenden klassischen PKC-Isoformen Rückschlüsse auf die zugrundeliegende PLC-Aktivität ziehen lassen. In diese Richtung weisen Befunde, die mithilfe fluoreszierender Fusionsproteine aus PKC- γ und PKC- α erhoben wurden (Oancea & Meyer, 1998; Tanimura *et al.*, 2002). Diese beiden klassischen PKC-Isoformen zeigten im Verlauf von Ca^{2+} -Oszillationen eine mit den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten synchrone Translokation an die Plasmamembran und zurück ins Cytosol. Die Applikation eines membranpermeablen DAG-Analogons während solcher oszillatorischer Translokationen führt zur verzögerten Rückverteilung ins Cytosol nach jedem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten. Dieser Befund legt nahe, dass auch klassische PKC-Isoformen als PLC-Indikatoren verwendet werden können, wenn ihre Translokationskinetik, insbesondere die Phase der Rückverteilung ins Cytosol, analysiert wird. Zu diesem Zweck muss die zeitliche Auflösung der Registrierung hoch genug sein, um eine eventuelle Verlangsamung der Rückverteilung ins Cytosol durch Bindung von PLC-abhängig gebildetem DAG erfassen zu können. Eine Quantifizierung dieser Verlangsamung könnte durch eine Parameterisierung der Translokationskinetik mithilfe einer geeigneten Funktion erreicht werden.

1.4 Phospholipase C-vermittelte Aktivierung der TRPC-Kationenkanäle

Die klassischen TRP-Kanäle (TRPC) bilden eine Familie nichtselektiver Kationenkanäle, die in Folge einer rezeptorvermittelten Aktivierung von Phospholipasen C aktiviert werden (Harteneck

1 Einleitung

et al., 2000; Montell, 2001; Clapham, 2003). Die 7 bekannten Säuger-TRPC-Isoformen bilden die vier phylogenetischen Verwandtschaftsgruppen TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5. Wie bereits weiter oben erwähnt, werden TRPC3/6/7 direkt durch PLC-abhängig gebildetes Diacylglycerol aktiviert, wobei von manchen Autoren bezweifelt wird, ob dies der physiologische Mechanismus ihrer Aktivierung ist (Kiselyov & Muallem, 1999). Der genaue Mechanismus der PLC-abhängigen Aktivierung der übrigen TRPCs ist bisher ungeklärt. Experimentelle Befunde sprechen gegen eine direkte Aktivierung der bisher am besten untersuchten TRPC4/5 durch die PLC-Produkte Diacylglycerol und InsP_3 (Schaefer *et al.*, 2000, 2002).

Hinweise auf einen möglichen Aktivierungsmodus dieser TRPC-Kanäle liefern Untersuchungen an entfernter verwandten Mitgliedern der TRP-Superfamilie, den TRPV- und TRPM-Kanälen. Ihre Mitglieder spielen unter anderem eine wichtige Rolle als Vermittler von Hitze- und Kälteempfindung (Clapham, 2003). Sie werden zwar nicht wie die TRPCs direkt durch PLC aktiviert, für viele TRPV- und TRPM-Kanäle konnte jedoch eine PLC-abhängige Modulation nachgewiesen werden, wobei für verschiedene Kanäle entweder eine Sensitisierung (Chuang *et al.*, 2001; Prescott & Julius, 2003) oder eine Inhibition (Runnels *et al.*, 2002; Liu & Liman, 2003; Liu & Quin, 2005; Rohács *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005) durch PLC-Aktivität beschrieben wurde.

TRP-Kanäle wurden lange Zeit als nicht spannungsabhängige Ionenkanäle betrachtet und damit von den spannungsgesteuerten Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chloridkanälen, die vielfältige Aufgaben beispielsweise in der neuronalen Signalübertragung oder der muskulären Funktion erfüllen, abgegrenzt. Dennoch konnte in der letzten Zeit in einer Reihe von Arbeiten demonstriert werden, dass viele ihrer Mitglieder sehr wohl spannungsabhängig sind, ihre Offenwahrscheinlichkeit also vom Membranpotential abhängt, und dass diese Spannungsabhängigkeit ein wesentlicher Mechanismus ihrer Aktivierung ist (Nilius *et al.*, 2005).

Als Beispiel für eine solche Spannungsabhängigkeit sei der Vanilloidrezeptor TRPV1 angeführt, ein nichtselektiver Kationenkanal, der in Hinterwurzelganglienzellen exprimiert wird und durch Hitze ($>43\text{ °C}$) sowie durch Capsaicin, die scharfe Komponente von Chilischoten, aktiviert wird (Caterina *et al.*, 1997). Die Offenwahrscheinlichkeit dieses Ionenkanals ist im nicht aktivierten Zustand bei physiologischem (negativem) Ruhemembranpotential nahezu Null. Depolarisation der Zellen zu positiven Potentialen ($>50\text{ mV}$) führt hingegen zu einem Auswärtsstrom durch den Kanal, seine Offenwahrscheinlichkeit hängt also vom Membranpotential ab (Chuang *et al.*, 2001; Voets *et al.*, 2004). Eine Temperaturerhöhung führt zu einer Verschiebung dieser Abhängigkeit in Richtung negativer Membranpotentiale, so dass es bereits bei physiologischem Ruhemembranpotential zu einer Kanalöffnung und zur Entwicklung eines kationengenetzten Einwärtsstroms kommen kann. Die Bindung von Agonisten wie Capsaicin führt ebenfalls zu einer Verschiebung der

1 Einleitung

spannungsabhängigen Aktivierungskurve in Richtung negativer Membranpotentiale (Voets *et al.*, 2004). Darüber hinaus kann die Temperaturempfindlichkeit des Kanals durch entzündliche Mediatoren wie Bradykinin, die zu einer PLC-Aktivierung führen, in Richtung niedrigerer Temperaturen verschoben werden. Bradykinin führt dabei zu einer überproportionalen Zunahme der Einwärtsströme bei negativem Membranpotential gegenüber den Auswärtsströmen bei positivem Membranpotential, was dafür spricht, dass Bradykinin ebenfalls die Spannungsabhängigkeit des Ionenkanals moduliert. Es konnte demonstriert werden, dass der PLC-vermittelte Abbau von PIP₂ für diese Bradykinin-induzierte Verschiebung der Spannungsabhängigkeit verantwortlich ist (Chuang *et al.*, 2001).

Eine ähnliche Spannungsabhängigkeit mit einer Auslösung von Einwärtsströmen durch Verschiebung der Aktivierungsschwelle zu physiologischen Membranpotentialen sowie eine Modulation dieser Spannungsabhängigkeit durch das Membranphospholipid PIP₂ konnte für verschiedene Mitglieder der TRP-Superfamilie demonstriert werden (Nilius *et al.*, 2005; Suh & Hille, 2005), so dass sich die Frage stellt, ob es sich hierbei um ein allgemeines Prinzip handelt, das ebenfalls für Mitglieder der TRPC-Familie zutrifft. Ein erster Schritt zur Beantwortung dieser Frage wäre die Untersuchung, ob die PLC-vermittelte Aktivierung von TRPC-Kanälen mit einer Verschiebung ihrer Spannungsabhängigkeit einhergeht.