

1.5 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter Verwendung fluoreszierender PLC-Biosensoren zwei zelluläre Systeme der Dekodierung PLC-vermittelter Signale zu untersuchen: Den für die Generierung von Ca^{2+} -Oszillationen in HEK293-Zellen verantwortlichen Mechanismus sowie den Kationenkanal TRPC4 als neuartigen PLC-Effektor.

Phospholipase C-abhängige Ca^{2+} -Oszillationen Zur Klärung der Frage, ob die Carbachol-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen in HEK293-Zellen durch eine zyklische PLC-Aktivierung zustande kommen, wurden verschiedene fluoreszierende Biosensoren eingesetzt: Eine Analyse der Translokationskinetik der klassischen PKC-Isoform PKC- α wurde vorgenommen, um aus einer Verzögerung ihrer Rückverteilung ins Cyosol auf eine zugrundeliegende Diacylglycerol-Bindung schließen zu können. PLC- δ_1 (PH) wurde als $\text{PIP}_2/\text{InsP}_3$ -Biosensor verwendet. Weiterhin wurde zur Klärung divergenter Literaturbefunde untersucht, inwieweit sich Translokationskinetiken, -effizienzen und Empfindlichkeiten der beiden PLC-Sensoren PLC- δ_1 (PH) und PKC- ϵ unterscheiden.

Phospholipase C-vermittelte Modulation des Kationenkanals TRPC4 Um zu untersuchen, ob die PLC-vermittelte Aktivierung des Kationenkanals TRPC4 mit einer Verschiebung seiner Spannungsabhängigkeit einhergeht, wurden *patch-clamp*-Messungen in der *whole-cell*-Konfiguration in Kombination mit der fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung des PLC-Biosensors PLC- δ_1 (PH) durchgeführt. Zur Charakterisierung der Spannungsabhängigkeit wurde eine Analyse von Strom-Spannungs-Kennlinien vorgenommen, außerdem wurden Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken mit Spannungssprungprotokollen untersucht.

Neuartiger Photochromismus fluoreszierender Proteine Im Rahmen von Vorarbeiten zur Visualisierung der PLC-Indikatoren mit hoher zeitlicher Auflösung fiel ein zunächst rätselhafter Effekt auf, der sich bei genauerer Untersuchung als ein bisher nicht beschriebener Photochromismus der verwendeten fluoreszierenden Proteine entpuppte. In Anbetracht der Bedeutung von GFP-Farbvarianten sowohl für die vorliegende Arbeit als auch für die moderne biomedizinische Forschung insgesamt – In PubMed lassen sich allein aus dem Jahr 2004 über 2500 mit dem MeSH-Terminus “*Green Fluorescent Proteins*” klassifizierte Artikel finden – wurde dieser Effekt zunächst genauer charakterisiert, um seinen Einfluss auf die geplanten Experimente zu untersuchen und Strategien für die Vermeidung von Artefakten zu entwickeln, die sich aus ihm ergeben können. Da sich aus dem Photochromismus wichtige Implikationen für die Planung quantitativer Fluoreszenzexperimente ergeben, wird die Charakterisierung dieses biophysikalischen Effekts dem biologischen Teil der Arbeit vorangestellt.