

2 Methoden

2.1 Zellkultur und Transfektion

HEK293-Zellen (American Type Culture Collection, Manassas, USA) wurden in MEM Earle's Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alles von Biochrom, Berlin) unter 5 % CO₂ bei 37 °C als adhärenente Zellen kultiviert. Alle 3–4 Tage wurden die Zellen passagiert, indem das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom) abgelöst, im Verhältnis 1:10 in frischem Kulturmedium aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen ausgesetzt wurden. Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen so auf runde Deckgläschen mit 2,4 cm Durchmesser (Menzel, Braunschweig) in 3,5-cm-Kulturschälchen ausgesät, dass sie zur Transfektion 1–2 Tage später eine Konfluenz von 50–70 % aufwiesen.

Zur Transfektion wurde das Transfektionsreagenz FuGene6 (Roche, Mannheim) verwendet. Pro 3,5-cm-Kulturschale wurden 100 µl serumfreies Medium mit 4 µl Transfektionsreagenz gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zu 2 µg Plasmid-DNA gegeben und weitere 15 Minuten inkubiert, um eine Komplexbildung zwischen der DNA und dem Transfektionsreagenz zu erreichen. Dann wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Die Untersuchung der Zellen erfolgte am 1.–3. Tag nach der Transfektion. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden die Zellen am Tag nach der Transfektion erneut im Verhältnis 1:5 auf Deckgläschen umgesetzt, um transfizierte Zellen ohne Kontakt mit Nachbarzellen untersuchen zu können.

2.2 Molekularbiologie

Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden findet sich bei Sambrook & Russel (2001). Die Herkunft der verwendeten Kits und für molekularbiologische Arbeiten wichtigen Materialien ist in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die genaue Klonierungsstrategie soll hier nur für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Plasmide beschrieben werden, für die übrigen verwendeten Plasmide werden die Herkunft, der verwendete Vektor und die entsprechenden Literaturstellen angegeben.

Tabelle 2.1: Kits und Materialien für molekularbiologische Arbeiten

Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
TOPO-TA-Cloning-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Qiagen Plasmid Purification Kits	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Beverly, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly, USA
DYEnamic ET Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
1-kb-DNA-Standard	Gibco BRL, Eggenstein
Oligonukleotide (Primer)	Roth, Karlsruhe, und BioTeZ, Berlin

2.2.1 Expressionsplasmide für Säugerzellen

Zur heterologen Expression von Proteinen in eukaryoten Zellen wurden die jeweiligen cDNAs in Expressionsvektoren kloniert, die auf dem Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) basierten. Dieser Plasmidvektor besitzt für die Vermehrung in *E. coli* den Replikationsursprung ColE1 sowie ein β -Lactamase-Gen zur Selektionierung transformierter Bakterienklone. Als Expressionsvektor für eukaryote Zellen besitzt er einen Cytomegalievirus-Promotor und das Polyadenylierungssignal aus bovinem Wachstumshormon. Der Vektor ist in einer linearisierten Form (pcDNA3.1/V5-His-TOPO) verfügbar, in der die 3'-Enden jeweils ein Desoxythymidin als Überhang besitzen, an das über das 3'-Phosphat das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Die Topoisomerase und die Thymidin-Überhänge verhindern eine Religation des leeren Vektors und ermöglichen eine Subklonierung von PCR-Produkten, die einen 3'-Desoxyadenosin-Überhang besitzen, ohne Verwendung einer weiteren Ligase. Durch Transformation von *E. coli* und Kultur auf Ampicillin-haltigem Nährboden kommt es zur Selektion von Bakterienklonen, die den Vektor mit dem PCR-Fragment enthalten. Ausgehend von dem Vektor pcDNA3.1 wurden zur Generierung fluoreszierender Fusionsproteine Expressionsvektoren konstruiert, die die für das fluoreszierende Protein kodierende cDNA entweder am 3' - (pcDNA3-YFP und pcDNA3-CFP, Schaefer *et al.* (2001)) oder am 5'-Ende (pcDNA3-NYFP, Philipp Voigt, Berlin, analog zu pcDNA3-NCFP (Voigt *et al.*, 2005) konstruiert) ihrer *multiple cloning site* enthielten. Durch geeignete PCR-Primer wurde die cDNA der zu fusionierenden Proteine dann so amplifiziert, dass unter Verwendung von Schnittstellen der *multiple cloning site* ein leserahmengerechter Übergang zwischen den cDNAs für das zu fusionierende Protein und die GFP-Variante erreicht wurde. Durch PCR generierte Konstrukte wurden durch

2 Methoden

cDNA-Sequenzierung unter Verwendung eines ABI-Prism 377 DNA-Sequenziergerätes (Perkin Elmer, Norwalk, USA) verifiziert.

Die für PLC- δ_1 kodierende cDNA für wurde aus Rattenhirn-RNA durch RT-PCR unter Verwendung der Primer 5'-GCCACCATGGACTCGGGTAGGGACTT (*sense*) und 5'-CCCCGGGCTT-AGTCCTGGAT (*antisense*) amplifiziert. Zur Amplifikation der PH-Domäne wurde das Produkt der ersten PCR in einer zweiten PCR unter Verwendung der Primer 5'-AAGCTTGCACGGGCTCCAGGATGA und 5'-T TACTTCTGCCGCTGGTCCATG eingesetzt, wobei der *sense*-Primer eine *HindIII*-Schnittstelle enthielt (unterstrichen). Das Amplifikat wurde in pcDNA3.1/V5-His-TOPO subkloniert, das resultierende Konstrukt mit *HindIII* und *XbaI* verdaut und das 400 Basenpaare lange Fragment zwischen die *HindIII*- und die *XbaI*-Schnittstelle des N-terminalen YFP-Fusionsvektors pcDNA-NYFP ligiert. Das resultierende Fusionsprotein weist am Übergang die Sequenz **DELYK-SL-HGLQD** auf (Anteile von YFP fett und von PLC- δ_1 (PH) kursiv gedruckt).

Die übrigen in der Arbeit verwendeten Expressionsplasmide für Säugerzellen sind in Tabelle 2.2 angegeben.

Tabelle 2.2: Verwendete Expressionsplasmide

	Herkunft	Vektor	Literaturstelle
PKC- α -YFP	M. Schaefer, Berlin	pcDNA3-YFP	Schaefer <i>et al.</i> (2001)
PKC- ϵ -CFP	M. Schaefer, Berlin	pcDNA3-CFP	Lenz <i>et al.</i> (2002)
pECFP-C1	Clontech, Palo Alto, USA	pcDNA3.1	-
pEYFP-C1	Clontech, Palo Alto, USA	pcDNA3.1	-
Citrine	R. Y. Tsien, San Diego, USA	pcDNA3.1	Griesbeck <i>et al.</i> (2001)
CFP-YFP	N. Hellwig, Berlin	pECFP-C1	Hellwig <i>et al.</i> (2004)
CFP-Citrine	N. Hellwig, Berlin	pECFP-C1	Hellwig <i>et al.</i> (2004)
TRPC4 α -YFP	M. Schaefer, Berlin	pcDNA3-YFP	Schaefer <i>et al.</i> (2002)
TRPC4 α	M. Schaefer, Berlin	pcDNA3.1	Schaefer <i>et al.</i> (2002)
H ₁ -Rezeptor	C. Harteneck, Berlin	pcDNA3.1	-

2.2.2 Plasmide zur bakteriellen Expression fluoreszierender Proteine

Für die bakterielle Expression der fluoreszierenden Proteine CFP, YFP und Citrine wurden Plasmide erstellt, die auf dem Vektor pQE60 (Qiagen, Hilden) basierten. In diesem Vektor steht die Transkription unter der Kontrolle eines T5-Promotors und zweier *lac*-Operatorsequenzen. Wird

2 Methoden

das Plasmid in einem Bakterienstamm wie *E. coli* JM109 propagiert, in dem das *lac*-Repressorprotein in ausreichender Menge exprimiert wird, so wird die Transkription unterdrückt, kann aber durch Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG), das an das *lac*-Repressorprotein bindet und es inaktiviert, induziert werden.

Zunächst wurde unter Verwendung der Primer 5'-CCATGGGACATCACCATCACCATCACAGCAAGGGCGAGGAGCT (*sense*) und 5'-AAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT (*antisense*) eine PCR durchgeführt, wobei als *template* die Plasmide pECFP-C1, pEYFP-C1 (beide Clontech, Palo Alto, USA) und zur Amplifikation von Citrine YC3.1 (Roger Tsien, San Diego, USA, Griesbeck *et al.* (2001)) verwendet wurden (die Sequenz der verschiedenen GFP-Farbvarianten unterscheidet sich im Bereich der Primerbindung nicht). Der *sense*-Primer enthielt eine *Nco*I-Restriktionsschnittstelle (unterstrichen) und, zur anschließenden Affinitätsreinigung der Proteine, die für einen N-terminalen Hexahistidin-Tag kodierenden Nukleotide (fett gedruckt), der *antisense*-Primer eine *Hind*III-Schnittstelle (unterstrichen) und ein *antisense*-Stopp-Kodon (fett gedruckt). Das Amplifikat wurde in pcDNA3.1/V5-His-TOPO subkloniert, das resultierende Konstrukt mit *Hind*III und *Nco*I verdaut und das 750 Basenpaare lange Fragment zwischen die *Nco*I- und die *Hind*III-Schnittstelle von pQE60 ligiert.

2.3 Proteinreinigung und Absorptionsspektroskopie fluoreszierender Proteine

2.3.1 Bakterielle Expression

Nach der Transformation von *E. coli* JM109 (Stratagene) mit den Plasmiden CFP-pQE60, YFP-pQE60 oder Citrine-pQE60 wurden Vorkulturen (jeweils 12 ml) angeimpft, über Nacht expandiert und mit der gesamten Vorkultur jeweils 400 ml vorgewärmtes LB-Medium angeimpft. Nach Erreichen einer Extinktion bei 600 nm von 0,67 wurde die Proteinexpression für 4 h mit 0,8 mM IPTG (Qiagen) induziert, danach wurden die Zellen abzentrifugiert. Die Pellets (jeweils ca. 3 g) wurden in 14 ml Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30 min inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 10 Zyklen Ultraschallbehandlung bei 30 W für jeweils 10 s auf Eis. Die Lysate wurden für 25 min mit DNase I (60 μ g) inkubiert und durch 40 min Zentrifugation bei 10.000 g geklärt.

2.3.2 Reinigung

Die Reinigung der fluoreszierenden Proteine erfolgte in zwei Stufen. Zuerst wurde eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Matrix (Qiagen) durchgeführt. Die Lysate wurden auf die Säulen aufgetragen und gewaschen (erst mit 10 ml Lysepuffer, danach mit 10 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0). Schließlich wurden die über ihr Hexahistidin-Tag gebundenen Proteine mit 9 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0) fraktioniert eluiert.

Als zweite Stufe der Reinigung wurden die vereinigten ersten 6 Fraktionen des Eluats zur Entsalzung und Konzentrierung einer Ionenaustauschchromatographie mit einer Resource Q Anionenaustauschersäule mit einem Äkta Purifier (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA) unterzogen. Die Eluate wurden in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 auf die Säule aufgetragen und mit einem Na₂SO₄-Gradienten von 0 bis 500 mM fraktioniert eluiert.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aliquots der bakteriellen Lysate und der einzelnen Reinigungsschritte wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) mit 12 % Acrylamid (Sammegel: 3,9 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 125 mM Tris/HCl pH 6,8; Trenngel 12 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 375 mM Tris/HCl pH 8,8) aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1985) analysiert.

2.3.4 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionmessungen wurden mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Cary 2E, Varian, Walnut Creek, USA) durchgeführt. Aliquots der gereinigten Proteine wurden im Verhältnis 1:10 in Probenpuffer (PBS mit 10 mM Natriumacetat und 12,5 mM Imidazol) aufgenommen, in eine 10×10 mm Acrylküvette (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und das Absorptionsspektrum gegen eine nur mit Probenpuffer gefüllte Referenzküvette gemessen. Der pH wurde mit einer pH-Elektrode in der Küvette gemessen und durch Zugabe von Phosphorsäure schrittweise verringert, wobei jeweils die gleiche Menge Phosphorsäure auch in die Referenzküvette gegeben wurde. Die entstandenen Spektrenscharen bei verschiedenen pH-Werten wurden für die Verdünnung durch die Zugabe von Phosphorsäure korrigiert.

2.4 Digitale Video-Epifluoreszenz-Mikroskopie

2.4.1 Aufbau des Imaging-Systems

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an lebenden Zellen und an gereinigten fluoreszierenden Proteinen wurden mit einem auf einem invertierten Mikroskopstativ (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena) basierenden Imaging-System durchgeführt. Als Lichtquelle für die Fluoreszenzanregung diente eine Monochromatoreinheit (Polychrome II bzw. Polychrome IV, TILL-Photonics, Martinsried), in der aus dem kontinuierlichen Spektrum einer Xenon-Hochdrucklampe mithilfe eines auf einem Galvanometerscanner montierten Beugungsgitters ein monochromatisches Lichtbündel erzeugt und auf die Eintrittspupille einer Quarz-Lichtfaser projiziert wurde. Aus einer Ruheposition, in der nur geringe Streulichtanteile in die Lichtfaser eintraten, ließ sich das Gitter computergesteuert in kurzer Zeit (<3 ms) auf Wellenlängen zwischen 320 und 680 nm einstellen. Das Anregungslicht wurde über die Lichtfaser in den Epifluoreszenzkondensator (TILL Photonics) des invertierten Mikroskops eingekoppelt.

In einem Filterschlitten ließen sich manuell verschiedene Kombinationen von dichroitischem Farbteiler und Emissionsfilter wählen (alle Filter und Farbteiler von Chroma Technology, Battleboro, USA). Für die spektrale Dekonvolution (siehe unten) wurde ein 505-nm-Farbteiler in Kombination mit einem 510-nm-Langpass verwendet. Für die spektrale Trennung cyan und gelb fluoreszierender Proteine unter Verwendung wechselbarer Emissionsfilter (siehe unten) wurde ein CFP-YFP-Farbteiler mit dualer Reflektivität (<460 nm und 500–520 nm) verwendet. Für die Charakterisierung der spektralen Abhängigkeit der reversiblen Bleichung wurde ein halbdurchlässiger Spiegel (80 % Transmission, 20 % Reflexion) in Verbindung mit geeigneten Langpass-Emissionsfiltern (535–580 nm für CFP, 560–600 nm für YFP und Citrine) verwendet.

Verschiedene Objektive (alle von Carl Zeiss) fanden für verschiedene experimentelle Ansätze Verwendung. Für die Visualisierung fluoreszierender Proteine in Einzelzellen ohne gleichzeitige Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ein Plan-Apochromat $63\times/1,4$ -Objektiv verwendet. Wegen der besseren UV-Transmission wurde für Experimente, in denen die $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2 gemessen wurde, ein F-Fluar $40\times/1,3$ -Objektiv verwendet. Zur Untersuchung der reversiblen Bleichung gereinigter fluoreszierender Proteine wurde ein Fluar $10\times/0,5$ -Objektiv verwendet, in dessen Bildfeld ein Tröpfchen der Proteinlösung vollständig Platz fand.

Ein schwenkbarer Spiegel erlaubte wahlweise die Betrachtung der Probe im Okular oder die Anfertigung von Aufnahmen durch eine gekühlte CCD-Kamera (Imago, TILL Photonics). Im Strahlengang vor der CCD-Kamera war ein computergesteuertes motorisiertes Filterrad (Lambda 10/2,

Sutter Instruments, Novato, USA) angebracht, mit dem verschiedene Emissionsfilter computergesteuert gewechselt werden konnten.

Die runden 2,4-cm-Deckgläschen, auf denen die Zellen kultiviert wurden, wurden vor der Messung mit 1 ml HBS-Puffer (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5,5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,4, 0,2 g/ml bovines Serumalbumin) gewaschen, in eine Messkammer eingespannt, deren Boden durch das Deckgläschen gebildet wurde, und mit 900 µl HBS-Puffer überschichtet. Die Zugabe von Substanzen zu den Zellen während der Messung erfolgte durch vorsichtiges Zupipettieren von 100 µl der 10-fach konzentrierten Substanz und anschließendes Durchmischen mit der Pipette. Zur Untersuchung der gereinigten GFP-Farbvarianten wurde eine Glaskapillare (Innendurchmesser 0,8 mm, Science Products GmbH, Hofheim) an einem Ende zugeschmolzen, mit leichtem Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) gefüllt und ein Tropfen des gereinigten fluoreszierenden Proteins mit einer dünn ausgezogenen Pipettenspitze in das Öl injiziert. Die Glaskapillare wurde auf dem Objektisch des invertierten Mikroskops fixiert. Zur Analyse wurden Tröpfchen mit Durchmessern von 300–500 µm verwendet, die vollständig im Bildfeld des Objektivs dargestellt werden konnten.

Die Steuereinheit des Monochromators, die CCD-Kamera sowie das Filterrad wurden zentral durch einen Computer mit einer geeigneten Software (TILL Vision, TILL Photonics) gesteuert. In einem Protokolleditor konnten dazu Sequenzen von Belichtung, Bildaufzeichnung und Filterwechseln programmiert werden. Im Rahmen der Untersuchung der reversiblen Bleichung fluoreszierender Proteine wurden verschiedene teilweise komplexe Messprotokolle verwendet, die zum besseren Verständnis an der jeweiligen Stelle im Resultateteil erläutert werden sollen.

2.4.2 Analyse der Bilddaten

Die Analyse der Bilddaten erfolgte im Anschluss an das jeweilige Experiment. Dazu wurden in den entstandenen Bildsequenzen sogenannte *regions of interest* (ROI) definiert, über denen die Pixelintensitäten von der Software gemittelt und im Zeitverlauf dargestellt wurden. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz, die jeweils von der gemessenen Fluoreszenz subtrahiert wurde, kamen zwei verschiedene Verfahren zum Einsatz: Entweder wurde in der Nähe jeder ROI eine Hintergrundregion definiert, in der sich nicht transfizierte Zellen befanden. Da sich die Hintergrundfluoreszenz fast ausschließlich aus Streulicht sowie Autofluoreszenz aus den Komponenten des optischen Systems zusammensetzte, konnten alternativ am Ende eines Experiments alle Zellen vom Deckgläschen abgespült und die verbleibende Fluoreszenz in jeder ROI als Hintergrundfluoreszenz für die jeweilige Region verwendet werden. Die weitere Analyse der so gewonnenen Daten

erfolgte in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft, Unterschleißheim). Die spektrale Dekonvolution (siehe unten) wurde mit einer eigens dafür entwickelten Software (Michael Schaefer, Berlin, Lenz *et al.* (2002)) durchgeführt.

2.4.3 Simultane Darstellung verschiedener Fluoreszenzsignale

Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe können anhand ihrer spektralen Eigenschaften unterschieden werden. Zur Unterscheidung der Signale verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in der gleichen Probe kann man sich dabei Unterschiede sowohl in ihren Fluoreszenzanregungsspektren, als auch in den Emissionsspektren zunutze machen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt, um die Signale verschiedener Fluorochrome zu trennen.

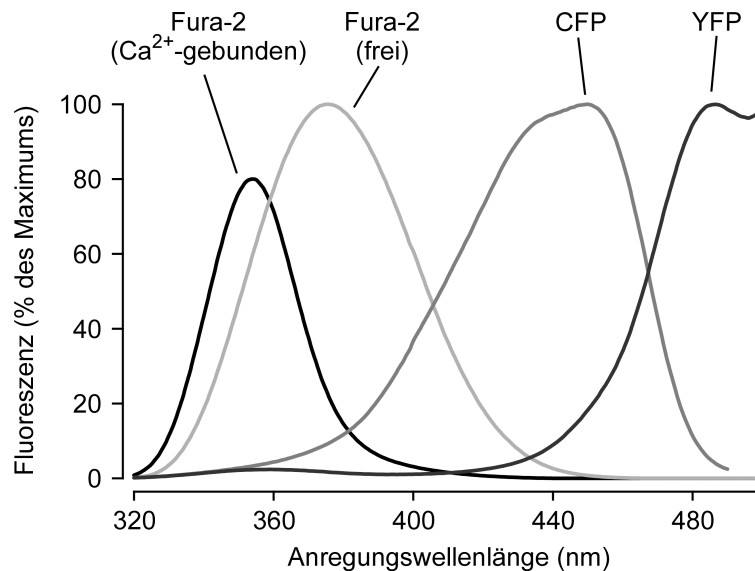


Abbildung 2.1: Anregungsspektren verschiedener verwendeter Fluorochrome. Dargestellt sind mit dem F-Fluar 40×/1,3-Objektiv unter Verwendung des 505-nm-Hauptfarbteilers gemessene Anregungsspektren, die jeweils auf ihren Maximalwert normiert wurden. Das bei sättigender Ca²⁺-Konzentration gemessene Spektrum des Ca²⁺-gebundenen Fura-2 wurde so gegenüber dem unter Ca²⁺-freien Bedingungen gemessenen Spektrum des Ca²⁺-freien Fura-2 skaliert, dass sich die durch den spektralen Dekonvolutionsalgorithmus bestimmte Gesamtkonzentration (Ca²⁺-gebundenes + Ca²⁺-freies Fura-2) im Rahmen eines gemessenen Ca²⁺-Signals nicht änderte.

Spektrale Dekonvolution

Da das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Monochromator-basierte Imagingsystem eine freie Wahl der Anregungswellenlänge in einem weiten Bereich ermöglicht, wurde ein Verfahren entwickelt, um verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe anhand ihrer unterschiedlichen Anregungsspektren zu unterscheiden (Lenz *et al.*, 2002). Dazu wurden für jede verwendete Kombination

2 Methoden

von Farbteiler, Emissionsfilter und Objektiv Anregungsspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe aufgezeichnet (siehe z. B. Abb. 2.1). Befinden sich nun in einer Probe m verschiedene spektral unterscheidbare Fluoreszenzfarbstoffe, so ist das bei einer bestimmten Anregungswellenlänge i gemessene, Hintergrund-korrigierte Fluoreszenzsignal der Probe F_i additiv aus den bei dieser Wellenlänge gemessenen Fluoreszenzsignalen $f_{i,m}$ der verschiedenen einzelnen Farbstoffe zusammengesetzt:

$$F_i = \sum (f_{i,1} \dots f_{i,m}) \quad (2.1)$$

Die Fluoreszenzsignale der einzelnen Farbstoffe $f_{i,m}$ skalieren dabei sowohl mit der relativen Konzentration des Farbstoffs c_m als auch mit seiner aus dem Absorptionsspektren bekannten normalisierten Fluoreszenzintensität bei der verwendeten Wellenlänge $x_{i,m}$ linear:

$$f_{i,m} = c_m x_{i,m} \quad (2.2)$$

Damit lässt sich das Signal der Probe beschreiben als

$$F_i = \sum (c_1 x_{i,1} \dots c_m x_{i,m}) \quad (2.3)$$

Wird nun die Fluoreszenz der Probe bei n verschiedenen Wellenlängen angeregt, ergibt sich ein lineares Gleichungssystem, das sich als invertierte Matrix schreiben lässt:

$$\begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \\ c_3 \\ \vdots \\ c_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum x_{i,1} x_{i,1} & \sum x_{i,1} x_{i,2} & \sum x_{i,1} x_{i,3} & \dots & \sum x_{i,1} x_{i,m} \\ \sum x_{i,2} x_{i,1} & \sum x_{i,2} x_{i,2} & \sum x_{i,2} x_{i,3} & \dots & \sum x_{i,2} x_{i,m} \\ \sum x_{i,3} x_{i,1} & \sum x_{i,3} x_{i,2} & \sum x_{i,3} x_{i,3} & \dots & \sum x_{i,3} x_{i,m} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sum x_{i,m} x_{i,1} & \sum x_{i,m} x_{i,2} & \sum x_{i,m} x_{i,3} & \dots & \sum x_{i,m} x_{i,m} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \sum x_{i,1} F_i \\ \sum x_{i,2} F_i \\ \sum x_{i,3} F_i \\ \vdots \\ \sum x_{i,m} F_i \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

Dieses Gleichungssystem kann durch lineare multivariate Regressionsanalyse gelöst werden. Um eine möglichst hohe Genauigkeit dieses spektralen Dekonvolutionsverfahrens zu erreichen, wurden überdeterminierte Gleichungssysteme gelöst, d. h. die Anzahl der verwendeten Anregungswellenlängen i war größer als die Anzahl m der spektral unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffe. Für die simultane Messung von Fura-2 und YFP wurde beispielsweise für jeden analysierten Zeitpunkt eine Serie von Aufnahmen bei den Anregungswellenlängen 340, 360, 380, 440 und 480 nm aufgezeichnet.

Wechsel der Emissionsfilter

Alternativ wurden die Fluoreszenzsignale von CFP und YFP oder Citrine getrennt, indem verschiedene Anregungswellenlängen zusammen mit über das Filterradausgewechselten Emissionsfiltern verwendet wurden. Das CFP-Signal wurde durch Anregung bei 400–440 nm unter Verwendung eines

Emissions-Bandpassfilters 460–500 nm gewonnen, das YFP- oder Citrine-Signal durch Anregung bei 480–510 nm unter Verwendung eines Emissions-Bandpassfilters 535–580 nm.

2.4.4 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2

Zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde der Fluoreszenzindikator Fura-2 (Grynkiewicz *et al.*, 1985) verwendet. Dieser Indikator bindet Ca^{2+} mit einer K_d von 224 nM. Im Komplex mit Ca^{2+} liegt sein Absorptionsmaximum bei kürzeren Wellenlängen als in Abwesenheit von Ca^{2+} , so dass es in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration zu einer Verschiebung seines Anregungsspektrums kommt (siehe Abb. 2.1). Da Fura-2 nicht membrangängig ist, wurde die Substanz in Form des membrangängigen Acetoxymethylesters (Fura-2/AM, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) verwendet. Nach Aufnahme in lebende Zellen wird die Esterbindung durch Esterasen gespalten, wodurch es zu einer Akkumulation von Fura-2 in den Zellen kommt. Zur Beladung mit dem Ca^{2+} -Indikator wurden die Zellen für 20 min bei 37 °C mit Fura-2/AM (1 μ M in HBS) inkubiert, anschließend mit HBS gewaschen und für weitere 10 min in HBS ohne Fura-2/AM inkubiert, um eine möglichst vollständige Esterspaltung zu erreichen. Die Aufnahme der Fluoreszenz bei den Anregungswellenlängen 340, 360 und 380 nm erlaubt eine Berechnung der relativen Konzentrationen von freiem ($[Fura_{frei}]$) und Ca^{2+} -gebundenem Fura-2 ($[Fura_{Ca}]$) durch das spektrale Dekonvolutionsverfahren (siehe oben). Daraus ließ sich die $[Ca^{2+}]_i$ als

$$[Ca^{2+}]_i = 224 \text{ nM} \times \frac{[Fura_{Ca}]}{[Fura_{frei}]} \quad (2.5)$$

berechnen.

2.4.5 Einstellung des intrazellulären pH

Um einen definierten intrazellulären pH einzustellen, wurde das Protonophor Nigericin (10 μ M) in mit HCl bzw. KOH auf den gewünschten pH eingestelltem modifiziertem HBS-Puffer (mit 128 mM KCl und 10 mM NaCl) für 20 min bei 37 °C inkubiert und die Messung anschließend in dem selben Puffer durchgeführt.

2.4.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Vergleichenden Untersuchung der *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) mit CFP- und YFP-fusionierten Konstrukten erfolgten mit einem invertierten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 META, Carl Zeiss), in das die Messkammer mit den lebenden Zellen eingespannt wurde. Aufnahmen der Zellen im Differential-Interferenzkontrast wurden mithilfe des

Durchlichtsensoren angefertigt. Zur Fluoreszenzanregung dienten die 458-nm- (CFP) und die 514-nm-Linien (YFP) eines Argon-Gaslaser, wobei für die beiden fluoreszierenden Proteine verschiedene Bandpass-Emissionsfilter verwendet wurden (470–500 nm für CFP, 530–560 nm für YFP). In der Steuersoftware wurde eine subzelluläre Region definiert, die durch repetitives Scannen mit voller Laserenergie gebleicht wurde, um danach den Zeitverlauf der Fluoreszenzerholung in dieser Region zu untersuchen.

2.5 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.5.1 Prinzip

Messungen PLC-induzierter Ströme durch TRPC4 wurden in der *whole-cell*-Konfiguration der *patch-clamp*-Technik durchgeführt (Hamill *et al.*, 1981). Dazu wird eine Glaskapillare auf einen Spitzendurchmesser von ca. 1 μm ausgezogen, hitzepoliert und mit einer Elektrolytlösung gefüllt. Diese auch als „Pipette“ bezeichnete Elektrode wird mit einem Mikromanipulator so an die Zellmembran einer lebenden Zelle angenähert, dass es unter idealen Bedingungen zur Ausbildung einer hochohmigen (mehrere $\text{G}\Omega$) Verbindung zwischen der Pipette und der Zellmembran, einem sogenannten *gigaseal*, kommt. Ein Rückkopplungsverstärker ist so mit der Pipette und einer Badelektrode verschaltet, dass das Potential zwischen der Pipette und der Badelektrode auf einen vorgegebenen Wert (das Kommandopotential) eingestellt werden kann. Über den Rückkopplungsschaltkreis wird bei Abweichungen des Pipettenpotentials vom Kommandopotential an der Elektrode eine Spannung generiert, die zu einer kompensatorischen Strominjektion führt, wodurch das Pipettenpotential wieder auf das Kommandopotential gebracht wird. Die dabei zwischen Pipette und Badelektrode fließenden Ströme werden aufgezeichnet.

Die *whole-cell*-Konfiguration wird hergestellt, indem der Membranfleck unter der Pipette zerstört wird. Unter der Voraussetzung, dass der Zugangswiderstand zwischen Pipette und Zelle (R_S) sehr viel geringer ist als der *seal*-Widerstand, entspricht dann der vom Verstärker generierte Strom dem durch Ionenkanäle in der Zellmembran fließenden Strom zuzüglich einer kapazitiven Komponente, die bei Änderungen des Kommandopotentials auftritt und das Laden der als Kondensator mit einer Kapazität C_M wirkenden Zellmembran kompensiert. Der kapazitive Strom fließt nur kurz nach einem Wechsel des Kommandopotentials und klingt exponentiell mit einer Zeitkonstante $\tau = R_S \times C_M$ ab.

2.5.2 Aufbau des Messplatzes

Auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Barry Controls, Burbank, USA) war ein invertiertes Mikroskop (Axiovert 10, Carl Zeiss) und eine einen piezobetriebenen Mikromanipulator mit mechanischem Grobtrieb sowie einen Objektisch (Luigs & Neumann, Ratingen) tragende Säule montiert. In den Objektisch wurde die oben beschriebene Probenkammer eingesetzt, wobei ein schwerkraftbetriebenes Perfusionssystem (Flussrate 3 ml/min bei kontinuierlicher Absaugung durch eine Membranpumpe) einen Lösungswechsel und die Zugabe sowie das Auswaschen von Substanzen ermöglichte. An dem Mikromanipulator war der Vorverstärker (*head stage*) des *patch-clamp*-Verstärkers (EPC-9, HEKA, Lambrecht) angebracht, der direkt mit einem Pipettenhalter verbunden war, der über einen chlorierten Silberdraht die elektrische Verbindung zur Pipettenlösung herstellte, luftdicht abschloss und über eine seitliche Öffnung das Erzeugen von Über- oder Unterdruck in der Pipette ermöglichte. Als Badelektrode wurde ein Silber/Silberchlorid-Pellet (Science Products GmbH) verwendet, das in das Bad eintauchte. Über dem gesamten schwingungsgedämpften Tisch war zur Abschirmung elektromagnetischer Felder ein Faraday-Käfig aus Kupferdraht angebracht. Zur gleichzeitigen Visualisierung von PLC- δ_1 (PH)-YFP wurden die Komponenten des oben beschriebenen Fluoreszenz-Imaging-Systems an das Mikroskop angebaut und die YFP-Fluoreszenz bei 480 nm angeregt.

Sämtliche Einstellungen des Verstärkers sowie der integrierten Filter und des Pulsgenerators wurden genau wie die Datenaufzeichnung durch eine Software (Pulse und X-Chart, Heka) gesteuert. Die Stromdaten wurden mit dem internen Bessel-Filter des Verstärkers bei 1 kHz gefiltert und mit 3 kHz digitalisiert.

2.5.3 Praktische Durchführung

Pipetten wurden mit einem Pipettenzieher (Hans Ochotzki, Hamburg) aus Borosilikatglaskapillaren (Science Products GmbH) gezogen und anschließend mit einer *microforge* (Narishige, London, UK) hitzepoliert. Mit der Standard-Pipettenlösung (110 M Cäsiummethansulfonat, 25 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 3,62 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 30 mM HEPES pH 7,2) gefüllt besaßen sie einen Widerstand von 3–8 M Ω . Die Deckgläschen mit den Zellen wurden in die Messkammer eingespannt und mit extrazellulärem Puffer (140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 6 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,4) perfundiert, die Pipette wurde luftblasenfrei mit Pipettenlösung gefüllt, in den Pipettenhalter eingespannt und ein Überdruck angelegt.

Nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde das Potential auf 0 mV abgeglichen, ein depolarisierender Testpuls angelegt und die Pipette vorsichtig an die Zelle angenähert. Bei ausrei-

chender Annäherung an die Zellmembran (erkennbar an einer leichten Abnahme der Stromantwort auf den Testpuls) wurde der Überdruck abgelassen, worauf es im idealen Fall zur Bildung eines *gigaseal* mit einem Abdichtwiderstand von mindestens 5 GΩ kam. Nach der *gigaseal*-Bildung wurde die schnelle kapazitive Antwort auf den Testpuls kompensiert und anschließend der Membranflecken unter der Pipettenöffnung durch ruckartiges Anlegen von Unterdruck zerstört. Das Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration war erkennbar an dem Auftauchen kapazitiver Antworten auf den Testpuls, die durch die Kapazität der Zellmembran verursacht wurden. Diese langsame kapazitive Komponente wurde ebenfalls kompensiert (die Kapazität der Zellmembran betrug 8–14 pF), der Serienwiderstand (5–10 MΩ) wurde zu 60–80% kompensiert.

Das Haltepotential wurde auf -60 mV eingestellt und der Strom bei diesem Potential kontinuierlich gemessen. Daneben wurden wie in den entsprechenden Abbildungslegenden beschrieben Spannungsrampen und/oder Spannungssprünge durchgeführt. Da sich die Kapazität der Zellmembran nicht immer vollständig kompensieren ließ, wurden die ersten 300 μs nach einem Spannungssprung (in denen ein durch eine Membrankapazität von 10 pF bei einem Serienwiderstand von 10 MΩ hervorgerufener kapazitiver Strom zu über 95 % abklingt) nicht in die kinetische Analyse einbezogen.

Zur Stimulation der Zellen mit AlF_4^- wurde jeweils frisch 1 μl NaF (0,5 M) mit 0,5 μl AlCl_3 (3 mM) gemischt und in 50 μl der Pipettenlösung aufgenommen.

2.6 Mathematische und statistische Verfahren

Die experimentell gewonnenen Daten wurden häufig durch nichtlineare Regressionsanalysen mit verschiedenen, jeweils angegebenen Funktionen parameterisiert. Dazu wurde entweder die auf dem Marquardt-Levenberg-Algorithmus basierende Regressionsfunktion des Programms SigmaPlot (Systat Software GmbH, Erkrath) oder für wenig komplexe Funktionen alternativ das Solver-Modul von Microsoft Excel verwendet.

Die Funktion zur Parameterisierung der Bleichkinetiken von GFP-Farbvarianten wurde aus dem im Resultateteil erläuterten Zustandsmodell (Gleichung 3.1, Seite 42) hergeleitet, aus dem sich das folgende System linearer Differentialgleichungen ergibt:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{FP}_{\text{nat}}]}{dt} &= -(k_1 + k_3)[\text{FP}_{\text{nat}}] + k_2[\text{FP}_{\text{rbl}}] \\ \frac{d[\text{FP}_{\text{rbl}}]}{dt} &= -k_2[\text{FP}_{\text{rbl}}] + k_1[\text{FP}_{\text{nat}}] \end{aligned} \tag{2.6}$$

2 Methoden

Die eckigen Klammern bezeichnen dabei die Konzentrationen der in dem Zustandsmodell vorkommenden Spezies in beliebig gewählten Einheiten. Für die Ausgangsbedingungen $[\text{FP}_{\text{nat}}](0) = 1$ und $[\text{FP}_{\text{rbl}}](0) = 0$ existieren die Lösungen

$$[\text{FP}_{\text{nat}}](t) = \frac{(k_2 + \lambda_1)e^{\lambda_1 t} - e^{\lambda_2 t}(k_2\lambda_2)}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (2.7)$$

und

$$[\text{FP}_{\text{rbl}}](t) = \frac{k_1(e^{\lambda_1 t} - e^{\lambda_2 t})}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (2.8)$$

mit den Substituenten λ_1 und λ_2 berechnet als

$$\lambda_{1/2} = \frac{1}{2} \left(-k_1 - k_2 - k_3 \pm \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3)^2 - 4k_2k_3} \right) \quad (2.9)$$

Die Funktion für $[\text{FP}_{\text{nat}}]$ (Gleichung 2.7) wurde zur Parameterisierung der gemessenen Bleichkinetiken verwendet. Durch Einsetzen der dabei gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten k_{1-3} in Gleichung 2.8 ergab sich der von dem Modell vorhergesagte Zeitverlauf von $[\text{FP}_{\text{rbl}}]$, der Zeitverlauf von $[\text{FP}_{\text{ibl}}]$ konnte dann als $[\text{FP}_{\text{ibl}}] = 1 - [\text{FP}_{\text{nat}}] - [\text{FP}_{\text{rbl}}]$ berechnet werden.

Die Simulation von PKC- α -Translokationen wurde mit dem frei erhältlichen Softwarepaket KinTekSim (KinTec Corporation, Austin, USA) durchgeführt, wobei die verwendeten Modelle jeweils in den Abbildungen dargestellt sind.

Aus zellbiologischen Experimenten abgeleitete quantitative Messwerte wurden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm S.E.M. aus einer ebenfalls bezeichneten Anzahl von Experimenten n dargestellt.

2.7 Sonstige Materialien

Calciumchlorid, Dimethylsulfoxid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glucose, Glycerin, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Manganchlorid und Methanol wurden von Merck, Darmstadt, bezogen; Acrylamid/Bisacrylamid-Gellösung (37,5:1), Agar-Agar, Agarose, Ampicillin, Ethidiumbromid, Hefeextrakt, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure (HEPES), Natriumlaurylsulfat (SDS) und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) von Roth; Ethanol und Isopropanol von J. T. Baker, Deventer, Niederlande; Trypton von Otto Norwald, Hamburg; alle übrigen Chemikalien von Sigma.