3 Ergebnisse

3.1 Neuartiger Photochromismus fluoreszierender Proteine

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Fusionsproteinen, die die cyan fluoreszierende GFP-Farbvariante CFP enthielten, in lebenden Zellen kam es bei Verwendung einer hohen Bildwiederholfrequenz häufig zu einer auffälligen Abnahme der Fluoreszenz am Beginn der Experimente. Daneben kam es in der Arbeitsgruppe zu falsch-positiven Meßdaten im Rahmen von FRET-Experimenten, die ebenso auf eine nicht stabile Fluoreszenz des CFP hinwiesen. Da diese Effekte ein bisher nicht bekanntes photophysikalisches Verhalten dieser GFP-Farbvariante nahelegten, wurden sie zunächst systematisch untersucht. Dazu wurden, um einen Einfluss der nicht-GFP-Komponenten der Fusionsproteine auszuschließen, keine Fusionsproteine, sondern das isolierte lösliche CFP in HEK293-Zellen exprimiert.

3.1.1 Die Farbvariante CFP

Abb. 3.1 zeigt den initialen Abfall der CFP-Fluoreszenzintensität während eines solchen Fluoreszenz-Imaging-Experiments. Dieser Effekt zeigte sich erstaunlicherweise nicht in jeder Messung. Genauere Untersuchungen ergaben, dass der Effekt dann reproduzierbar auftrat, wenn die Zellen nicht kurz vor Beginn des Experiments, beispielsweise bei der Suche nach fluoreszierenden Zellen oder beim Fokussieren, intensiver Belichtung mit zur Fluoreszenzanregung geeignetem Licht ($\lambda =$ 400–480 nm) ausgesetzt worden waren.

Das initiale Ausbleichen war bei saurem intrazellulärem pH ausgeprägter als bei physiologischem pH: Bei pH 5,5 betrug die initiale Abnahme der Fluoreszenz das dreifache des bei pH 7,4 gemessenen Wertes (siehe Abb. 3.1, ungefüllte Rhomben).

Die Abhängigkeit von vorausgegangener Belichtung legte nahe, dass es sich bei dem initialen Ausbleichen um einen lichtinduzierten, reversiblen Prozess im Sinne eines Photochromismus handelt. Tatsächlich war der Abfall der CFP-Fluoreszenzintensität spontan reversibel (siehe Abb. 3.2, obere Reihe): In einer Pause von 100 s ohne Belichtung erlangte mehr als die Hälfte des initial ausgebleichten CFP seine Fluoreszenz zurück. Die Abnahme der CFP-Fluoreszenz zu Beginn der Fluoreszenz-Experimente lässt sich somit als Einstellung eines Gleichgewichts zwischen reversi-

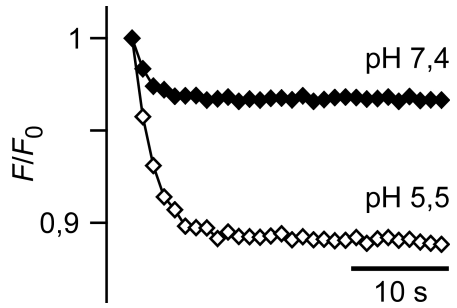

Abbildung 3.1: Initialer Abfall der CFP-Fluoreszenz bei Messungen mit hoher Auslesefrequenz. CFP exprimierende vorher keiner intensiven Belichtung ausgesetzte HEK293-Zellen wurden mittels kurzer (10 ms) Lichtpulse ($\lambda = 430$ nm) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt ist der Zeitverlauf der hintergrundkorrigierten Fluoreszenzintensität bei physiologischem pH (gefüllte Rhomben) und bei pH 5,5 (ungefüllte Rhomben). Die Beleuchtungsintensität betrug 0,48 W cm^{-2}.

blem Ausbleichen und spontaner Reaktivierung der Fluoreszenz interpretieren. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Lage dieses Gleichgewichts durch zusätzliche Belichtung verschoben werden kann (siehe Abb. 3.2, mittlere und untere Zeile): Zusätzliche Belichtung bei $\lambda = 500$ nm verschob das Gleichgewicht innerhalb weniger Sekunden in Richtung höherer Fluoreszenzintensität (Abb. 3.2, mittlere Zeile), zusätzliche Belichtung bei $\lambda = 480$ nm verschob es ähnlich schnell in Richtung niedrigerer Fluoreszenzintensität (Abb. 3.2, untere Zeile). Auch aus diesem neuen Gleichgewicht heraus kam es bei Dunkelheit zur spontanen Reaktivierung der Fluoreszenz. Interessanterweise wurde diese Reaktivierung durch Wiederaufnahme der Bildaufzeichnung mittels kurzer (10 ms) Belichtungen bei 430 nm beschleunigt (Abb. 3.2, untere Zeile). Somit kann Licht dieser Wellenlänge, je nach Lage des Gleichgewichts, das CFP entweder reversibel ausbleichen oder aber die Reaktivierung von reversibel gebleichtem CFP beschleunigen (Siehe auch Abschnitt 3.1.4, Seite 37).

3.1.2 Gelbe Farbvarianten

Auch die gelben GFP-Farbvarianten Citrine und YFP zeigten einen spontan reversiblen Photochromismus. Überraschenderweise konnten Citrine und YFP in einem spektralen Bereich ($\lambda =$ 400–420 nm) reversibel gebleicht werden, in dem ihre Absorptionsspektren bei neutralem pH Minima aufweisen (siehe Abschnitt 3.1.3 und 3.1.5).

3.1.3 Gereinigte fluoreszierende Proteine

Um zu untersuchen, ob der beschriebene Photochromismus nur in lebenden Zellen auftritt oder ob er eine von zellulären Faktoren unabhängige Eigenschaft der GFP-Farbvarianten ist, wurden Experimente mit affinitätsgereinigten fluoreszierenden Proteinen durchgeführt. Tatsächlich ließ sich

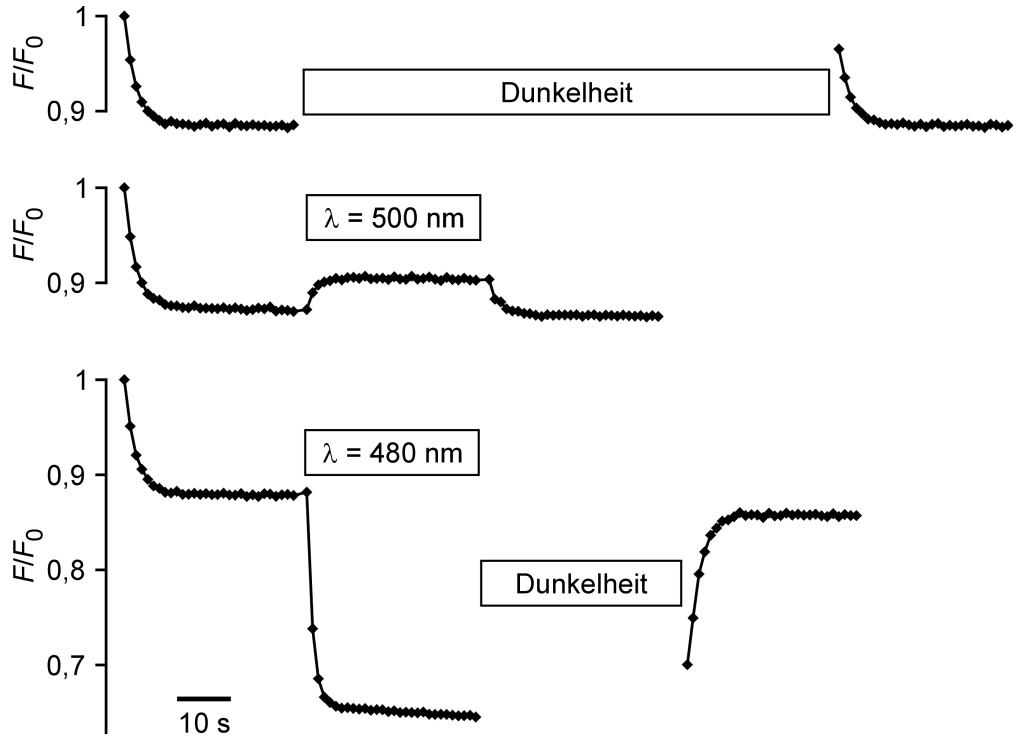

Abbildung 3.2: Reversibles Ausbleichen von CFP. CFP exprimierende vorher keiner intensiven Belichtung ausgesetzte HEK293-Zellen wurden mithilfe von Nigericin (10 µM) auf pH 5,5 gebracht und mittels repetitiver kurzer (10 ms) Lichtpulse (λ=430 nm) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt ist der Zeitverlauf der hintergrundkorrigierten Fluoreszenzintensität. Wo durch die Balken angezeigt wurden Perioden von Dunkelheit oder von zusätzlicher Belichtung bei 500/480 nm in das Protokoll integriert. Die Beleuchtungsintensitäten betrugen 0,48 W cm^{-2} (bei 430 nm), 0,64 W cm^{-2} (bei 480 nm) und 0,59 W cm^{-2} (bei 500 nm).

der spontan reversible Photochromismus auch an gereinigtem CFP, YFP und Citrine nachweisen, Abb. 3.3 zeigt entsprechende Experimente für Citrine (A) und CFP (B). Damit handelt es sich bei dem Effekt um eine intrinsische Eigenschaft der GFP-Farbvarianten.

3.1.4 Reaktivierung der Fluoreszenzintensität nach reversiblem Ausbleichen

Nach lichtinduzierter Auslösung eines Photochromismus kann die Rückreaktion entweder spontan thermisch (Photochromismus vom Typ T) oder photochemisch durch Absorption eines Photons (Photochromismus vom Typ P) erfolgen (Bouas-Laurent & Dürr, 2001). Die bereits dargestellten Daten zeigen, dass alle untersuchten GFP-Farbvarianten nach reversiblem Ausbleichen thermisch reaktivieren können, CFP darüber hinaus auch photochemisch. Die Kinetik dieser Reaktivierung wurde im Folgenden näher charakterisiert.

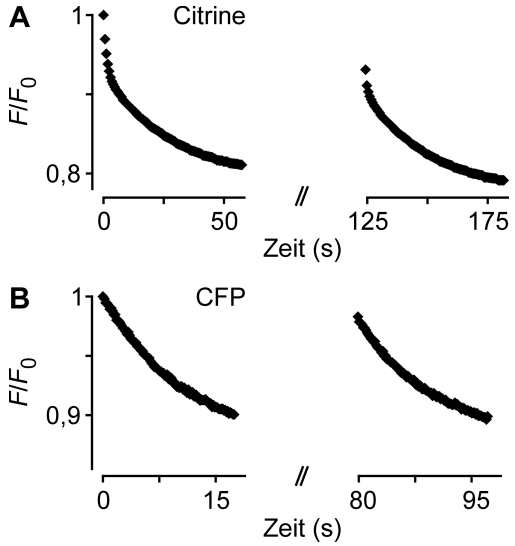

Abbildung 3.3: Reversibles Ausbleichen von gereinigtem Citrine und CFP. (A) In eine ölgefüllte Kapillare wurde ein Tröpfchen (Durchmesser 500 µm) gereinigtes Citrine (pH 6,0) injiziert und mithilfe eines 10x/0.5-Fluar-Objektivs bei 420 nm belichtet (Lichtintensität: 0,057 W cm^{-2}). Dargestellt ist der Zeitverlauf der mittels Anregung bei 480 nm gemessenen Fluoreszenz. Zwischen zwei solchen Belichtungszyklen wurde die Probe für 65 s nicht belichtet, um reversibel gebleichtem Citrine die Möglichkeit zur Erholung zu geben. (B) Das gleiche Experiment wie in (A) wurde mit gereinigtem CFP bei pH 7,0 durchgeführt (Belichtung und Messung der Fluoreszenz bei 460 nm, Lichtintensität 0,025 W cm^{-2}).

Spontane Erholung

Die spontane Erholung der Fluoreszenzintensität von reversibel gebleichtem CFP bei Dunkelheit wurde untersucht, indem das CFP durch Belichtung ($\lambda = 460$ nm) um etwa 40 % reversibel gebleicht und nach einer Pause ohne Belichtung die Erholung der Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Durch Wiederholung dieses Experiments bei Variation der Pausendauer konnte die Kinetik der spontanen Erholung der Fluoreszenz bestimmt werden (Abb. 3.4). Diese Erholungskinetik wies gute Übereinstimmung mit einer monoexponentiellen Funktion $F = F_{\max}\,(\mathrm{e}^{-kt})$ mit einer Zeitkonstante $\tau = \frac{1}{k} = 58$ s auf (siehe Abb. 3.4). Entsprechende Experimente mit den gelben GFP-Farbvarianten ergaben die Zeitkonstanten $\tau = 54$ s für die spontane Erholung von YFP und $\tau = 25$ s für Citrine, jeweils bei $\lambda = 420$ nm gebleicht (Daten nicht dargestellt).

Lichtinduzierte Reaktivierung

Der Effekt von Licht der Wellenlänge 430 nm, wie es häufig in Mehrfarb-Experimenten zum Auslesen der CFP-Fluoreszenz Verwendung findet, auf die Reaktivierung von CFP nach reversiblem Ausbleichen ist in Abb. 3.5 A dargestellt. Wurde die Reaktivierung des CFP mit einer niedrigen Auslesefrequenz (0,1 Hz) bei kurzen Belichtungszeiten (10 ms) visualisiert, ergab sich ein Zeitver-

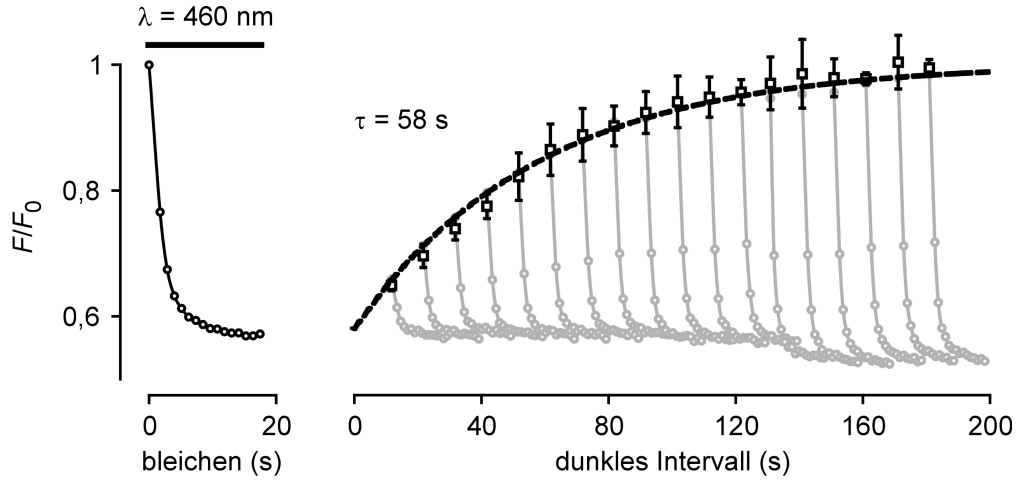

Abbildung 3.4: Spontane Erholung der CFP-Fluoreszenzintensität nach reversiblem Ausbleichen. CFP exprimierende HEK293-Zellen, die vorher keiner intensiven Belichtung ausgesetzt waren, wurden mithilfe von Nigericin (10 µM) auf pH 5,5 gebracht und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das CFP wurde durch Belichtung bei λ = 460 nm (0,56 W cm^{-2}) wie durch den Balken angezeigt reversibel gebleicht. Darauf folgten Pausen variabler Dauer (10–180 s), in denen die Zellen nicht belichtet wurden. Nach diesen Pausen wurden die Zellen wiederum reversibel gebleicht (graue Symbole). Das Ausmaß der spontanen Erholung der Fluoreszenzintensität wurde als Funktion der Dauer des dunklen Intervalls dargestellt, und die Kinetik der spontanen Erholung wurde mithilfe einer einfach exponentiellen Funktion parameterisiert. Dargestellt sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (ungefüllte Quadrate, die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen), zusammen mit dem besten Fit (gestrichelte Linie) und repräsentativen experimentellen Daten (graue Symbole).

lauf, der der Kinetik der spontanen Erholung bei Dunkelheit ähnelte (siehe Abb. 3.5 A, vgl. Abb. 3.4). Die Fluoreszenz stieg allerdings nicht bis zum Ausgangswert, sondern erreichte ein Gleichgewicht bei ca. 80 % der ursprünglichen Intensität. Mit steigender Auslesefrequenz kam es zu einer erheblichen Beschleunigung der Reaktivierung, wobei sich unabhängig von der Auslesefrequenz jeweils ein Gleichgewicht bei etwa 80 % der ursprünglichen Intensität einstellte.

Einen ähnlichen Effekt hatte auch auch eine zusätzliche intensive Belichtung bei $\lambda = 500$ nm (Abb. 3.5 B), wie sie beispielsweise in FRET-Experimenten irreversiblen Ausbleichen des Akzeptors appliziert wird (Schaefer *et al.*, 2002). Die Erholung der Fluoreszenzintensität wurde wiederum mit kurzen (10 ms) Belichtungen bei 430 nm und einer Auslesefrequenz von 0,1 Hz verfolgt (Abb. 3.5 B, *Kontrolle*). Zusätzliche Belichtung bei 500 nm beschleunigte, abhängig von der Belichtungsdauer pro Auslesezyklus, die Reaktivierung und verschob das Gleichgewicht in Richtung größerer Fluoreszenzintensität (Abb. 3.5 B). Das ist insofern bemerkenswert, als aufgrund des Absorptionsspektrums von CFP bei 500 nm keine nennenswerte Absorption zu erwarten ist (Tsien, 1998, siehe auch Abschnitt 3.1.5).

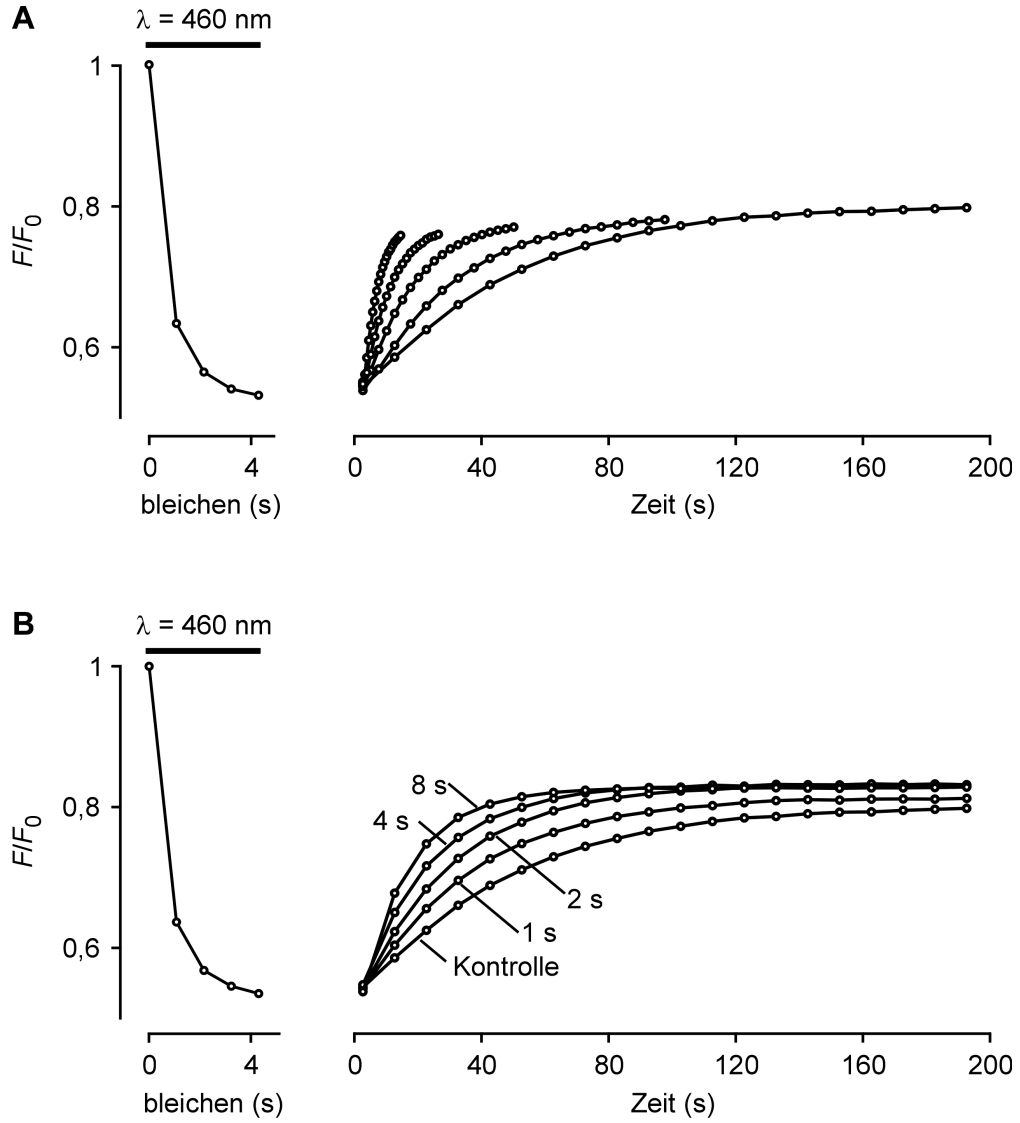

Abbildung 3.5: Lichtinduzierte Beschleunigung der Reaktivierung von reversibel gebleichtem CFP. CFP exprimierende HEK293-Zellen, die vorher keiner intensiven Belichtung ausgesetzt waren, wurden mithilfe von Nigericin (10 µM) auf pH 5,5 gebracht und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das CFP wurde durch Belichtung bei λ = 460 nm (0,56 W cm^{-2}) wie durch den Balken angezeigt reversibel gebleicht. (A) Beschleunigung durch Licht der Wellenlänge λ = 430 nm: Nach dem Bleichen wurden bei verschiedenen Wiederholungsfrequenzen Fluoreszenzaufnahmen (λ_{ex} = 430 nm; 0,48 W cm^{-2}; 10 ms Belichtung pro Aufnahme) aufgezeichnet. (B) Beschleunigung durch Licht der Wellenlänge λ = 500 nm: nach dem Bleichen wurden mit einer Wiederholungsfrequenz 0,1 Hz Fluoreszenzaufnahmen (λ_{ex} = 430 nm; 0,48 W cm^{-2}, 10 ms Belichtung pro Aufnahme) angefertigt. Zwischen den Fluoreszenzaufnahmen wurden die Zellen nicht (Kontrolle) oder mit 500 nm Licht (1, 2, 4 oder 8 s pro Zyklus, 0,59 W cm^{-2}) beleuchtet. Dargestellt ist jeweils der Verlauf der Fluoreszenzintensität während des reversiblen Ausbleichens und der darauf folgenden Reaktivierung.

Bei den am verwendeten optischen System erreichbaren Lichtintensitäten (bis etwa 3,5 W cm^{-2}) konnte im Wellenlängenbereich von 320–540 nm eine lichtinduzierte Beschleunigung der Reaktivierung von reversibel gebleichtem YFP oder Citrine nicht nachgewiesen werden.

3.1.5 Spektrale Abhängigkeit

Aktionsspektren

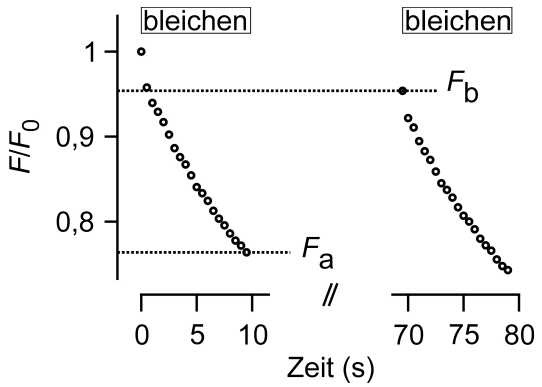

Abbildung 3.6: Protokoll zur Bestimmung der Aktionsspektren des Photochromismus. Für jede untersuchte Wellenlänge wurde die jeweilige GFP-Farbvariante (hier Citrine) durch 500-ms-Pulse bei der jeweiligen Wellenlänge (hier λ = 400 nm) gebleicht. Nach einem Zyklus 20 solcher Bleichpulse wurde für 60 s kein Licht appliziert, um dem reversibel gebleichten fluoreszierenden Protein die Möglichkeit zu geben, sich zu erholen. Dann wurde ein zweiter Bleichzyklus appliziert. Die minimale Fluoreszenzintensität am Ende des ersten Zyklus wurde als F_a bezeichnet, die maximale Fluoreszenzintensität am Beginn des zweiten Bleichzyklus als F_b. Das Ausmaß der reversiblen Bleichung berechnet sich dann als $F_b - F_a$. Die Fluoreszenzintensität wurde mit kurzen (10 ms) Pulsen am jeweiligen Anregungsoptimum bestimmt.

Die spektrale Abhängigkeit des spontan reversiblen Photochromismus wurde für CFP, YFP und Citrine ermittelt. Abb. 3.6 zeigt das dazu verwendete Messprotokoll, das die Reaktivierung der Fluoreszenz des bei der jeweiligen Wellenlänge gebleichten fluoreszierenden Proteins während eines dunklen Intervalls ($F_b - F_a$) als Maß für die stattgefundene reversible Bleichung erfasst.

Wie anhand der Vorbefunde erwartet wiesen die Aktionsspektren der gelben Varianten Citrine (Abb. 3.7 A) und YFP (Abb. 3.7 B) Maxima im Bereich von 400–420 nm auf. Das Spektrum von Citrine zeigte ein Nebenmaximum bei 500–520 nm, ein solches war im Spektrum von YFP nicht zu erkennen. Das Spektrum von CFP (Abb. 3.7 C) wies ein Maximum im Bereich um 460 nm auf.

Absorptionsspektren

Die Aktionsspektren der gelben GFP-Farbvarianten mit ihren Maxima bei 400–420 nm stehen in offensichtlichem Gegensatz zu den publizierten Absorptionsspektren, die bei neutralem pH in diesem Bereich Minima aufweisen (Visser *et al.*, 2002). Es ist jedoch bereits berichtet worden, dass im Absorptionsspektrum von Citrine bei saurem pH eine Bande in diesem Wellenlängenbereich entsteht (Griesbeck *et al.*, 2001). Zum Vergleich mit den Aktionsspektren des Photochromismus

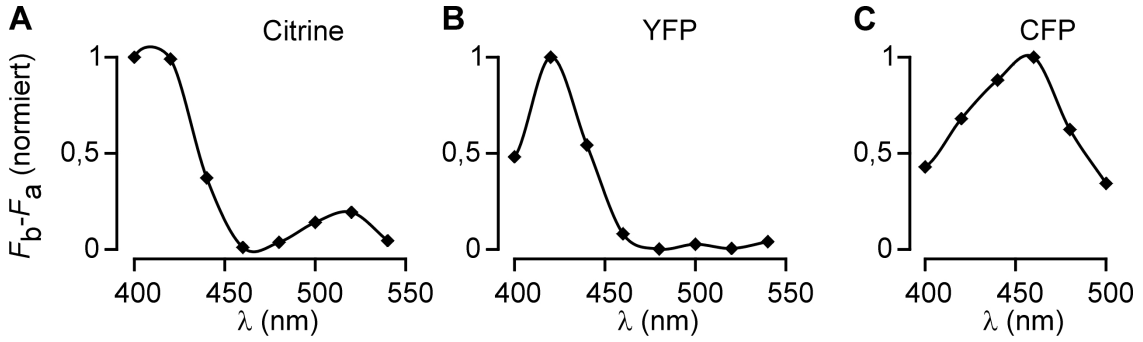

Abbildung 3.7: Aktionsspektren des Photochromismus. Ermittelt nach dem in Abb. 3.6 dargestellten Protokoll sind die Aktionsspektren für Citrine (A), YFP (B) und CFP (C) dargestellt, wobei die berechneten Werte für das Intensitätsprofil der Lampe korrigiert und auf das jeweilige Maximum normiert wurden.

wurden deshalb Absorptionsspektren der gereinigten fluoreszierenden Proteine bei verschiedenen pH-Werten aufgezeichnet (Abb. 3.8).

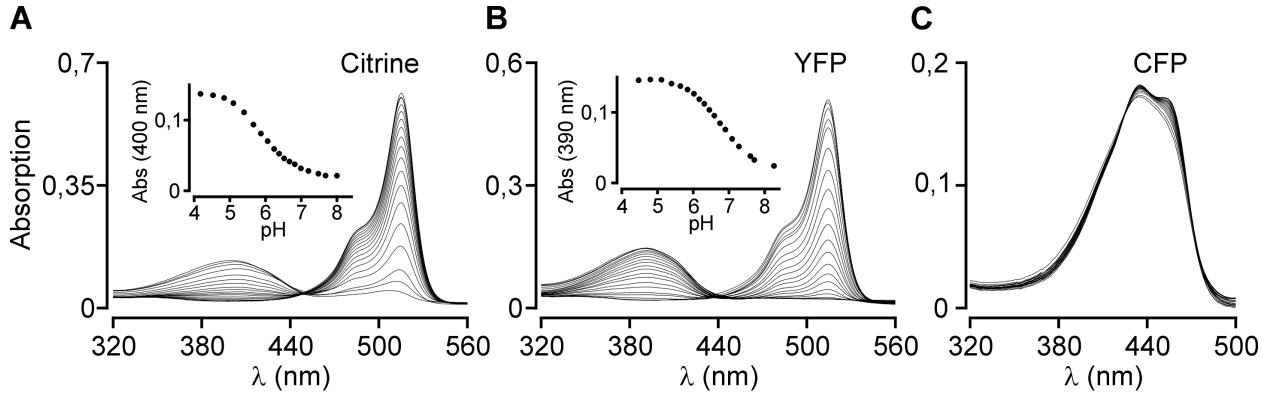

Abbildung 3.8: pH-Abhängigkeit der Absorptionsspektren von GFP-Farbvarianten. Absorptionsspektren von Citrine (A), YFP (B) und CFP (C) wurden in einem Zweistrahlphotometer bei Variation des pH von 9,2 bis 4,2 (von oben nach unten bei 514 nm für Citrine und YFP und bei 455 nm für CFP) aufgenommen. Die Einsäze in (A) und (B) zeigen die Absorption bei 400 nm (Citrine) bzw. 390 nm (YFP) als Funktion des pH.

Tatsächlich nahm bei Citrine (Abb. 3.8 A) und YFP (Abb. 3.8 B) die Absorption bei 500–520 nm bei Ansäuerung unter Ausbildung einer neuen Absorptionsbande bei 380–410 nm ab. Der Übergang wies einen isosbestischen Punkt bei 449 nm (Citrine) bzw. 439 nm (YFP) auf. Die Titrationskurven der Absorption bei 400 nm (Citrine) bzw. 390 nm (YFP) verliefen bei Auftragung gegen den pH sigmoidal, aus den Kurven ergaben sich für den Übergang pK_a-Werte von 5,9 (Citrine) bzw. 6,8 (YFP, siehe Abb. 3.8 A und B, Einsätze).

Das Absorptionsspektrum von CFP zeigte im untersuchten pH-Bereich nur geringe pH-abhängige Veränderungen. Bei azidem pH war die Absorption im Maximum nur leicht gegenüber neutralem pH vermindert, und die bei neutralem pH deutlich erkennbare Schulter des Spektrums bei 460 nm war verstrichen (siehe Abb. 3.8 C).

3.1.6 Kinetische Untersuchung

Der hier beschriebene Photochromismus lässt sich nicht isoliert untersuchen, weil bei den Wellenlängen und Belichtungsintensitäten, die zum reversiblen Ausbleichen führen, stets in gewissem Maße auch eine irreversible Bleichung der Fluorochrome stattfindet. Um das Ausmaß und die Kinetik des Photochromismus bei definierter Lichtintensität zu bestimmen und daraus Quanteneffizienzen für den zugrundeliegenden photophysikalischen Vorgang zu berechnen, wurde ein vereinfachtes mathematisches Modell aufgestellt, das sowohl die reversible als auch die irreversible Bleichung berücksichtigt und eine Parameterisierung der experimentellen Daten ermöglicht.

Entwicklung eines Modells

In dem Modell wurde davon ausgegangen, dass ein fluoreszierendes Protein sich in drei Zuständen befinden kann: Aus dem nativen Zustand (FP_{nat}) kann lichtinduziert entweder ein Übergang in den irreversibel gebleichten Zustand (FP_{ibl}) oder in den reversibel gebleichten Zustand (FP_{rbl}) stattfinden, wobei FP_{rbl} wieder zu FP_{nat} reaktivieren kann. FP_{nat} soll hierbei der einzige Zustand sein, von dem eine messbare Fluoreszenz ausgeht. Weiterhin wird angenommen, dass die Übergänge $FP_{nat} \longrightarrow FP_{rbl}$, $FP_{rbl} \longrightarrow FP_{nat}$ und $FP_{nat} \longrightarrow FP_{ibl}$ jeweils Reaktionen erster Ordnung mit den Geschwindigkeitskonstanten k_1, k_2 und k_3 sind:

$$\mathrm{FP_{rbl}} \underset{k_1}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \mathrm{FP_{nat}} \xrightarrow{k_3} \mathrm{FP_{ibl}} \tag{3.1}$$

Anwendung des Modells auf Bleichexperimente

Es wurden Experimente durchgeführt, in denen CFP, Citrine oder YFP exprimierende Zellen jeweils bei für reversible Bleichung geeigeten Wellenlängen belichtet wurden und der Verlauf der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet wurde. Abb. 3.9 A zeigt das Resultat eines solchen Experiments für Citrine. Die grauen Symbole zeigen den Zeitverlauf der gemessenen Fluoreszenz, die durchgezogene schwarze Kurve zeigt den durch Approximation des Modells an die experimentellen Daten gewonnenen Verlauf von FP_{nat}, der in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten war. Die unterbrochene Kurve zeigt den berechneten Verlauf von FP_{rbl}, die punktierte Kurve den von FP_{ibl}. Man erkennt, dass sich nach dem Modell zu Beginn des Experiments schnell eine Fraktion von etwa 40 % reversibel gebleichter Spezies (FP_{rbl}) aufbaute. Während des gesamten Experiments fand ständig auch irreversible Bleichung statt, erkennbar an der graduellen Zunahme von FP_{ibl}. Im Gegenzug nahmen sowohl FP_{nat} als auch FP_{rbl} graduell ab.

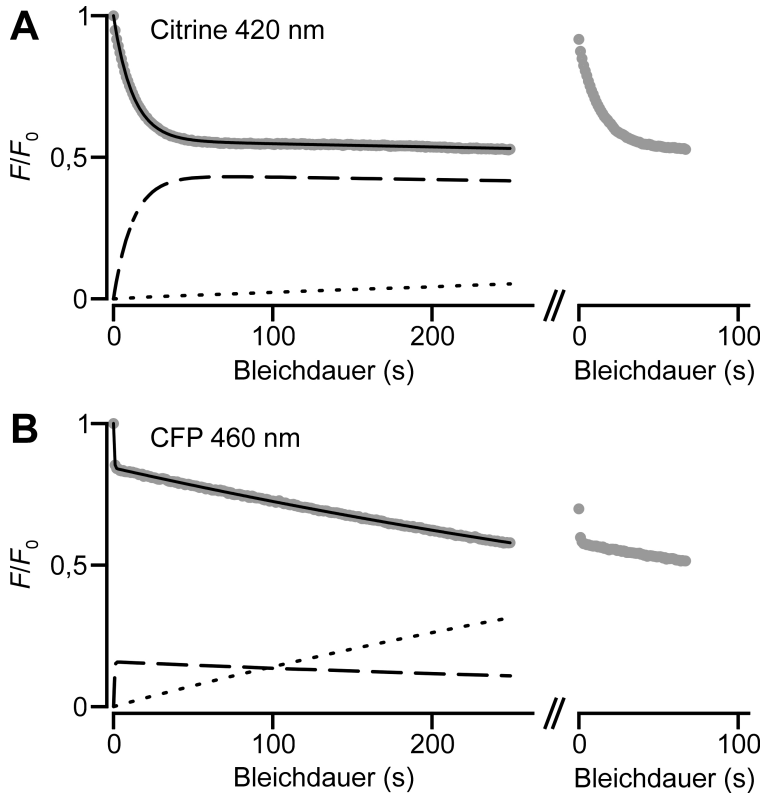

Abbildung 3.9: Modellierung von Bleichkinetiken. Zellen, die CFP oder Citrine exprimierten, wurden durch intensive Belichtung gebleicht und der Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität dabei registriert. In einem ersten Zyklus wurden die Zellen durch 250 Pulse von je einer Sekunde Dauer bei der angegebenen Wellenlänge gebleicht. Nach einem dunklen Intervall von 120 s wurde ein zweiter Bleichzyklus appliziert. Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenzintensität (graue Symbole) sowie die durch nichtlineare Approximation mithilfe des kinetischen Modells gewonnenen Zeitverläufe von FP_{nat} (durchgezogene Kurve), FP_{rbl} (unterbrochene Kurve) sowie FP_{ibl} (punktierte Kurve) während des ersten Bleichzyklus.

Nach diesem Bleichzyklus wurden die Zellen für 120 s nicht belichtet, um den reversibel gebleichten Spezies die Gelegenheit zur Erholung zu geben. In guter Übereinstimmung mit dem Modell zeigte sich eine Zunahme der gemessenen Fluoreszenz, die gut der vom Modell vorhergesagten reversibel ausgebleichten Fraktion FP_{rbl} entsprach (siehe Abb. 3.9 A). Einen ähnlichen Verlauf der Fraktionen FP_{nat}, FP_{rbl} und FP_{ibl} zeigten die entsprechende Experiment mit YFP exprimierenden Zellen, wobei sowohl das reversible als auch das irreversible Bleichen langsamer voranschritten (Daten nicht dargestellt).

Das entsprechende Experiment mit CFP exprimierenden Zellen zeigt Abb. 3.9 B. Auch hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Vorhersage des Modells mit den experimentellen Daten. Im Vergleich zu den gelben Farbvarianten wurde nur eine geringere Fraktion von etwa 20 % reversibel ausgebleicht, jedoch mit einer schnelleren Kinetik. Die aus den Bleichexperimenten gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Aus den Bleichexperimenten gewonnene Daten

	CFP	YFP	Citrine
λ (nm)[a]	460	420	420
k_1 (s^{-1})[b]	0,40	$7,7 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-2}$
k_2 (s^{-1})[b]	2,15	$1,6 \times 10^{-2}$	$4,6 \times 10^{-2}$
k_3 (s^{-1})[b]	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-4}$
$P_{\mathrm{rbl}}/P_{\mathrm{ibl}}$[c]	129	67	168
F_{prot}[d]	$8,9 \times 10^{-2}$	0,1	$3,2 \times 10^{-2}$
I (Einstein cm^{-2}s^{-1})[e]	$1,34 \times 10^{-5}$	$8,3 \times 10^{-6}$	$8,3 \times 10^{-6}$
ε (cm^{2}mol^{-1})[f]	$2,8 \times 10^{7}$	$1,37 \times 10^{7}$	$1,41 \times 10^{7}$
ϕ_{rbl}[g]	$5,19 \times 10^{-3}$	$3,03 \times 10^{-4}$	$4,24 \times 10^{-3}$

[a] Verwendete Wellenlänge. [b] durch Parameterisierung der Bleichkinetik mithilfe des Modells gewonnene Geschwindigkeitskonstanten. [c] Das Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten für reversible und irreversible Bleichung bei der angegebenen Wellenlänge. [d] Die bei pH 7,2 protoniert vorliegende Fraktion. [e] Die Belichtungsintensität. [f] Der Extinktionskoeffizient. [g] Die Quanteneffizienz der reversiblen Bleichung.

Ableitung von Quanteneffizienzen

Das Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten für reversibles und irreversibles Ausbleichen ($P_{\mathrm{rbl}}/P_{\mathrm{ibl}}$) konnte unabhängig von dem Modell näherungsweise bestimmt werden, indem die durch den ersten Belichtungspuls gebleichte Fraktion, die bei den verwendeten Wellenlängen fast ausschließlich durch reversibles Bleichen zustande kam, durch die pro Belichtungspuls gebleichte Fraktion während der Gleichgewichtsphase geteilt wurde, die vor allem irreversible Bleichung repräsentiert. Die Ergebnisse dieser Rechnung (siehe Tabelle 3.1) zeigen, dass bei diesen Wellenlängen die Wahrscheinlichkeit des reversiblen Ausbleichens 67–168-fach größer war als die einer irreversiblen Bleichung.

Aus den mithilfe des Modells bestimmten Geschwindigkeitskonstanten k_1 konnten darüber hinaus die Quanteneffizienzen des reversiblen Ausbleichens (ϕ_{rbl}) als $\phi_{\mathrm{rbl}} = (I\ \varepsilon\ t_{90\%})^{-1}$ berechnet werden (Adams *et al.*, 1988). Dabei bezeichnet ε den molaren Extinktionskoeffizienten in cm^2 mol^{-1} und $t_{90\%}$ berechnet sich als $t_{90\%} = k_1 \ln(10)$.

Da es aufgrund der pH-Abhängigkeit des Photochromismus sowie der Aktionsspektren der gelb fluoreszierenden Proteine Citrine und YFP naheliegt, dass der Photochromismus seinen Ausgang in der Absorption eines Photons durch die protonierten Form des jeweiligen Fluorochroms nimmt, wurden für die Berechnung die Extinktionskoeffizienten der protonierten Formen verwendet, multipliziert mit der Fraktion von Molekülen, die bei physiologischem intrazellulärem pH (7,2) in protonierter Form vorliegt (F_{prot}). Aus diesen Daten wurden die Quanteneffizienzen für das reversible Ausbleichen (ϕ_{rbl}) berechnet (siehe Tabelle 3.1).

3.1.7 Bedeutung für zellbiologische Anwendungen

GFP-Farbvarianten werden immer häufiger für komplexe Experimente verwendet, beispielsweise zur simultanen Bildgebung verschiedenfarbig markierter Proteine in der selben Zelle (Lenz *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2003), zur Analyse der Proteinmobilität mittels *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP, Reits & Neefjes, 2001; Sprague & McNally, 2005), oder zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mithilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET, Miyawaki & Tsien, 2000; Truong & Ikura, 2001). In solchen Anwendungen werden häufig Belichtungen bei verschiedenen Wellenlängen kombinert. Außerdem erfordern einige dieser Techniken, dass die Belichtungsintensitäten im Laufe des Experiments verändert werden. Wird der hier charakterisierte Photochromismus in der Planung solcher Experimente nicht berücksichtigt, können Artefakte resultieren. Andererseits kann das reversible Ausbleichen von GFP-Farbvarianten auch experimentell genutzt werden. Im Folgenden werden ein Beispiel für mögliche aus dem Photochromismus resultierende Artefakte sowie eine neue experimentelle Anwendung des Effekts demonstriert.

Artefakte in Bestimmungen der Proteinmobilität

Die FRAP-Methode zur Bestimmung der Mobilität von Makromolekülen beruht darauf, die zu untersuchenden fluoreszierenden Moleküle in einer definierten Region irreversibel auszubleichen. Unter der Annahme, dass eine nach der Bleichung auftretende Erholung der Fluoreszenzintensität in dieser Region durch die Diffusion von nicht ausgebleichten Molekülen aus benachbarten Regionen in die Bleichregion zustande kommt, können mit dieser Methode Diffusionsgeschwindigkeiten bestimmt werden. Die FRAP-Methode ist vielfach auf mit GFP-Varianten fusionierte Proteine angewendet worden.

Um zu untersuchen, ob solche Experimente durch den Photochromismus verfälscht werden können, wurden FRAP-Bestimmungen an Zellen, die den Ionenkanal TRPC4α sowohl als YFP- als

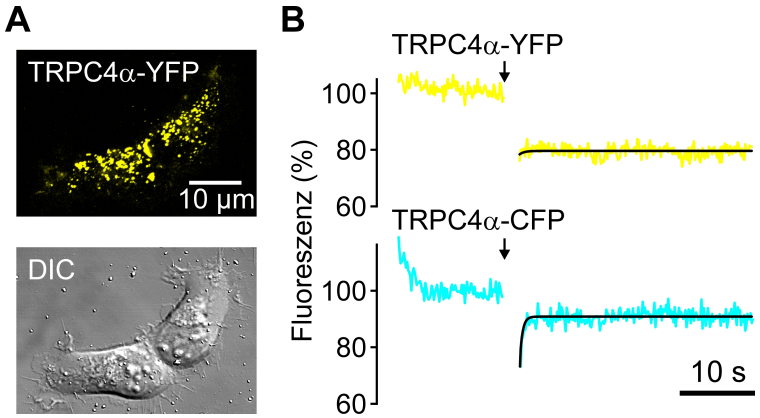

Abbildung 3.10: Photochromismus fluoreszierender Proteine führt zu Artefakten in Bestimmungen der Proteinmobilität. HEK293-Zellen wurden mit TRPC4α-CFP und TRPC4α-YFP kodierenden Plasmiden transfiziert und in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. (A) Dargestellt ist ein konfokales Bild von TRPC4α-YFP (oberes Bild) und ein mittels Differential-Interferenz-Kontrast (DIC) aufgenommenes Bild der selben Zellen (unteres Bild). (B) FRAP-Experimente wurden nacheinander für TRPC4α-YFP und TRPC4α-CFP in der selben subzellulären Region durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Fluoreszenz in einer Region über einem fluoreszierenden TRPC4α-Aggregat zur Aufnahme einer Grundlinie repetitiv gemessen. Dann wurde (durch die Pfeile angezeigt) die Region durch repetitives Scannen mit voller Laserenergie gebleicht. Danach wurde die Kinetik der Erholung der Fluoreszenz ermittelt. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Fluoreszenz für TRPC4α-YFP (oberes Diagramm) und TRPC4α-CFP (unteres Diagramm). Die Kinetik der Erholung der Fluoreszenz wurde geweils durch eine monoexponentielle Erholungsfunktion approximiert (schwarze Kurven).

auch als CFP-Fusion exprimierten, vorgenommen. TRPC4α ist in HEK293-Zellen in Aggregaten in der Plasmamembran lokalisiert, in denen TRPC4α-CFP Multimere mit TRPC4α-YFP ausbildet (Schaefer *et al.*, 2002). Insofern sollten die beiden Konstrukte die gleiche geringe laterale Mobilität aufweisen. FRAP-Experimente (Abb. 3.10) mit dem TRPC4α-YFP-Anteil bestätigten die geringe laterale Mobilität (5,5 % Erholung mit einer Zeitkonstante von 0,5 s, siehe Abb. 3.10 B, oberes Diagramm). Die FRAP-Bestimmung von TRPC4α-CFP in der gleichen Region ergab dagegen eine deutlich ausgeprägtere Erholung der Fluoreszenz (66 % Erholung mit einer Zeitkonstante von 0,36 s, siehe Abb. 3.10 B, unteres Diagramm). Offenbar kam es in dieser Messung nicht nur zu irreversiblem, sondern auch zu reversiblem Ausbleichen des CFP. Die lichtinduzierte Reaktivierung führte dann zu einer scheinbar erhöhten lateralen Mobilität von TRPC4α-CFP im Vergleich mit TRPC4α-YFP.

Eine neue Methode zur Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Die Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen GFP-Farbvarianten ist vielfach zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder intramolekularen Konfor-

mationsänderungen eingesetzt worden (Miyawaki & Tsien, 2000; Truong & Ikura, 2001). Am häufigsten wird dabei CFP als FRET-Donor und eine gelbe Variante wie YFP oder Citrine als FRET-Akzeptor eingesetzt. Eine weit verbreitete Methode zur FRET-Bestimmung basiert darauf, den FRET-Akzeptor durch intensive Belichtung irreversibel auszubleichen und damit seine Absorptionsfähigkeit zu zerstören. Wenn für den strahlungslosen Energietransfer kein Akzeptor mehr zur Verfügung steht, erhöht sich die Donor-Fluoreszenz um den Betrag, der vorher *via* FRET an den Akzeptor übertragen wurde. Aus der Zunahme der Donor-Fluoreszenz nach dem Ausbleichen des Akzeptors berechnet sich daher die FRET-Effizienz als $E = 1 - \frac{F_{\mathrm{DA}}}{F_{\mathrm{D}}}$, wobei F_{DA} die Fluoreszenzintensität des Donors in Gegenwart des Akzeptors und F_{D} die Fluoreszenzintensität des Donors bei vollständig gebleichtem Akzeptor bezeichnet. Die Bestimmung von FRET durch irreversibles Ausbleichen des Akzeptors hat den Vorteil, dass aus den gemessenen Fluoreszenzen direkt die FRET-Effizienz berechnet werden kann. Der Nachteil der Methode liegt in der Irreversibilität der Bleichung begründet, die somit keine repetitiven Bestimmungen erlaubt. Damit ist die Methode nicht zur Verfolgung dynamischer Änderungen der FRET-Effizienz geeignet.

Unter der Voraussetzung, dass der Photochromismus der gelben GFP-Farbvarianten mit einer Reduktion ihrer Absorption einhergeht, bietet sich ein neues, auf reversibler Bleichung des FRET-Akzeptors basierendes Verfahren zur repetitiven Messung von FRET-Effizienzen an. Um die prinzipielle Möglichkeit eines solchen Verfahrens zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das ein direktes Fusionsprotein aus CFP und Citrine (CFP-Citrine) kodiert. In dem resultierenden Fusionsprotein sind die beiden FRET-Partner kovalent miteinander verbunden, so dass eine hohe intramolekulare FRET-Effizienz von 46–52 % (Hellwig *et al.*, 2004, gemessen durch irreversibles Ausbleichen des Akzeptors) resultiert. In diesen Zellen wurde das Citrine wiederholt durch Belichtung bei 400 nm reversibel gebleicht, wobei es jedesmal zu einer Zunahme der gemessenen CFP-Fluoreszenz kam (Abb. 3.11 A). Während der auf das reversible ausbleichen folgenden Reaktivierung der Citrine-Fluoreszenz kam es jeweils wieder zu einer gegenläufigen Abnahme der CFP-Fluoreszenz. Aus der Korrelation zwischen CFP- und Citrine-Fluoreszenz während dieser Reaktivierungsphase (Abb. 3.11 B) konnte für jedes Bleichexperiment die FRET-Effizienz berechnet werden (Abb. 3.11 C). Die berechneten FRET-Effizienzen von 47–50 % waren in guter Übereinstimmung mit den durch irreversibles Ausbleichen bestimmten Werten. Diese Übereinstimung spricht dafür, dass das reversibel gebleichte Citrine zumindest im spektralen Bereich der CFP-Emission keine relevante Absorption aufweist.

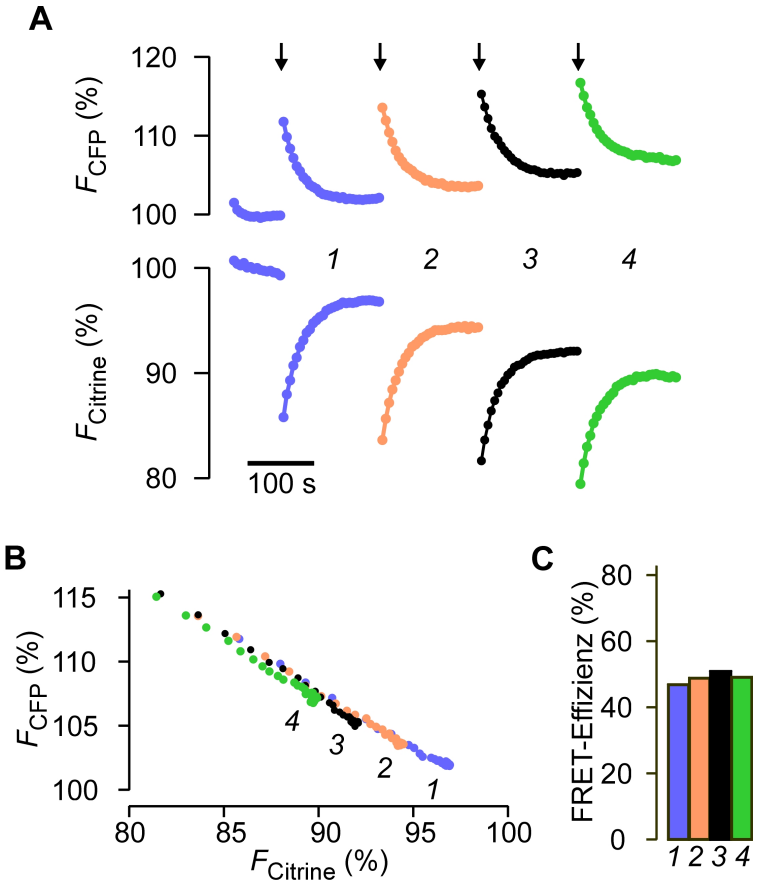

Abbildung 3.11: Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer durch reversibles Ausbleichen des Akzeptors. HEK293-Zellen wurden mit dem für CFP-Citrine kodierenden Plasmid transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. (A) Alle 5 s wurden Bilder der CFP- (10 ms Belichtung bei 440 nm) und Citrine-Fluoreszenz (6 ms Belichtung bei 500 nm) aufgenommen. Viermal nacheinander wurde das Citrine zur Messung der FRET-Effizienz durch 5 s Belichtung bei 400 nm reversibel gebleicht (angezeigt durch die Pfeile, die einzelnen Messungen sind mit *1–4* bezeichnet). Dargestellt ist der Zeitverlauf der hintergrundkorrigierten Fluoreszenz von CFP (oberer Abbildungsteil) und Citrine (unterer Abbildungsteil). (B) Dargestellt ist die Korrelation zwischen den Fluoreszenzintensitäten von Citrine und CFP für die vier Messungen *(1–4)*. Für jede Messung wurde durch lineare Regressionsanalyse die CFP-Fluoreszenz in Gegenwart (F_{DA}) und in Abwesenheit (F_D) des Akzeptors extrapoliert. (C) Dargestellt dind die aus F_{DA} und F_D berechneten FRET-Effizienzen für die vier Messungen. Die verwendeten Lichtintensitäten betrugen 0,67 W cm^{-2} bei 400 nm, 1,18 W cm^{-2} bei 440 nm und 1,61 W cm^{-2} bei 500 nm.

Implikationen für die folgenden Untersuchungen

Für die folgenden Untersuchungen zur Phospholipase C-abhängigen Signaltransduktion mithilfe fluoreszierender Fusionsproteine ergaben sich aus dem hier charakterisierten Photochromismus einige Implikationen. Zum einen legte die Tendenz von CFP, bei allen zur Fluoreszenzanregung geeigneten Wellenlängen auch einem reversiblen Bleichen zu unterliegen, nahe, bei Experimenten, in denen eine hohe zeitliche Auflösung angestrebt wurde, auf die gelben Varianten Citrine oder

insbesondere YFP auszuweichen, das im Bereich seines Absorptionsoptimums bei neutralem pH angeregt werden kann, ohne es in einem relevanten Ausmaß reversibel auszubleichen (siehe Abb. 3.7 und 3.8, Seite 41).

Für die simultane Visualisierung cyan und gelb fluoreszierender Proteine in der gleichen Zelle ergibt sich aus den beschriebenen Effekten die Notwendigkeit, das Messprotokoll, insbesondere Belichtungszeiten, Aufnahmefrequenz und Lichtintensität, während eines Experiments nicht zu verändern, da sich sonst aus der Einstellung eines neuen Gleichgewichts zwischen reversibler Bleichung und spontaner oder lichtinduzierter Reaktivierung eine scheinbare Verschiebung zwischen den gemessenen Fluoreszenzen ergeben könnte.

Für die Untersuchung subzellulärer Translokationen bietet es sich an, eher Verhältnisse von Fluoreszenzintensitäten zwischen verschiedenen Regionen der Zelle als absolute Intensitäten über bestimmten Regionen als Maß für die Translokation heranzuziehen. Solche ratiometrischen Bestimmungen sind weitgehend unabhängig von Schwankungen der Gesamtfluoreszenzintensität und damit auch von dem hier charakterisierten reversiblen Photochromismus.

3.2 Translokation der Proteinkinase C-α im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen

Bei Stimulation von HEK293-Zellen mit Carbachol in submaximal effektiven Konzentrationen kommt es häufig zu oszillatorischen Ca^{2+}-Signalen (Schaefer *et al.*, 2001). Parallel zu den repetitiven Anstiegen der $[Ca^{2+}]_i$ kommt es dabei zur Translokation klassischer PKC-Isoformen an die Plasmamembran (Oancea & Meyer, 1998; Schaefer *et al.*, 2001; Tanimura *et al.*, 2002).

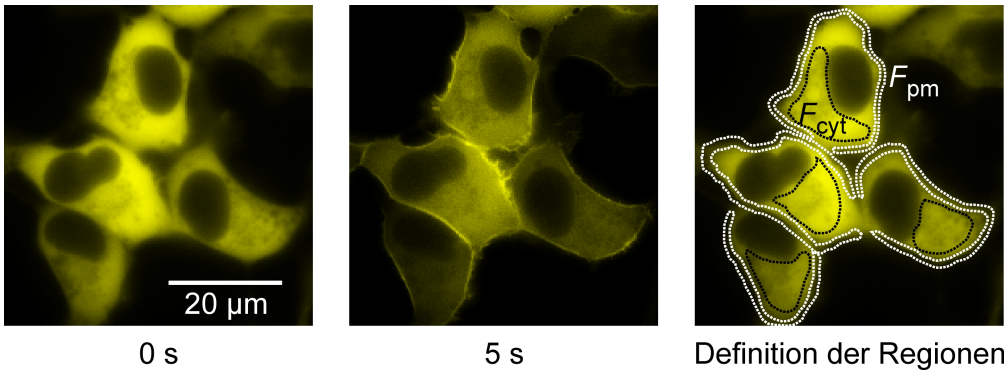

Abbildung 3.12: Subzelluläre Lokalisation der Proteinkinase C-α vor und nach Carbachol-Stimulation. PKC-α-YFP exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 30 µM Carbachol stimuliert und dabei fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Dargestellt ist die Fluoreszenz vor (linkes Bild) und 5 s nach Stimulation (mittleres Bild). Zur Auswertung wurden für jede Zelle Regionen über der Zellmembran (F_{pm}) und über dem Cytosol (F_{cyt}) definiert, über denen die Fluoreszenzintensität gemittelt wurde (rechtes Bild).

3.2.1 Aufzeichnung der Translokationskinetik

Abb. 3.12 zeigt die subzelluläre Translokation einer mit YFP fusionierten PKC-α (PKC-α-YFP) in einer repräsentativen Zellgruppe vor (linkes Bild) und 5 s nach Stimulation der Zellen mit 30 µM Carbachol (mittleres Bild). Dargestellt sind zwei Bilder aus einer Zeitserie, die mit einer Bildfrequenz von 6 Hz aufgenommen wurde.

Vor Stimulation zeigte sich eine gleichmäßige Anfärbung der Zellen mit Aussparung der Kernregion, entsprechend einer cytosolischen Lokalisation des Konstrukts. Nach Stimulation kam es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität über dem Cytosol und einer deutlichen Anfärbung der Zellgrenzen, entsprechend einer Umverteilung des Konstrukts vom Cytosol an die Plasmamembran. Mithilfe einer Software zur Bildauswertung wurde in jeder Zelle eine Region über dem Cytosol (F_{cyt}) und eine über der Plasmamembran (F_{pm}) definiert, über denen jeweils die Fluoreszenzintensität gemittelt wurde (Siehe Abb. 3.12, rechtes Bild). Als Maß für die subzelluläre Translokation an die Plasmamembran wurde für jede einzelne Zelle der Quotient F_{pm}/F_{cyt}, ausgedrückt als Prozentsatz des Ausgangswerts, berechnet.

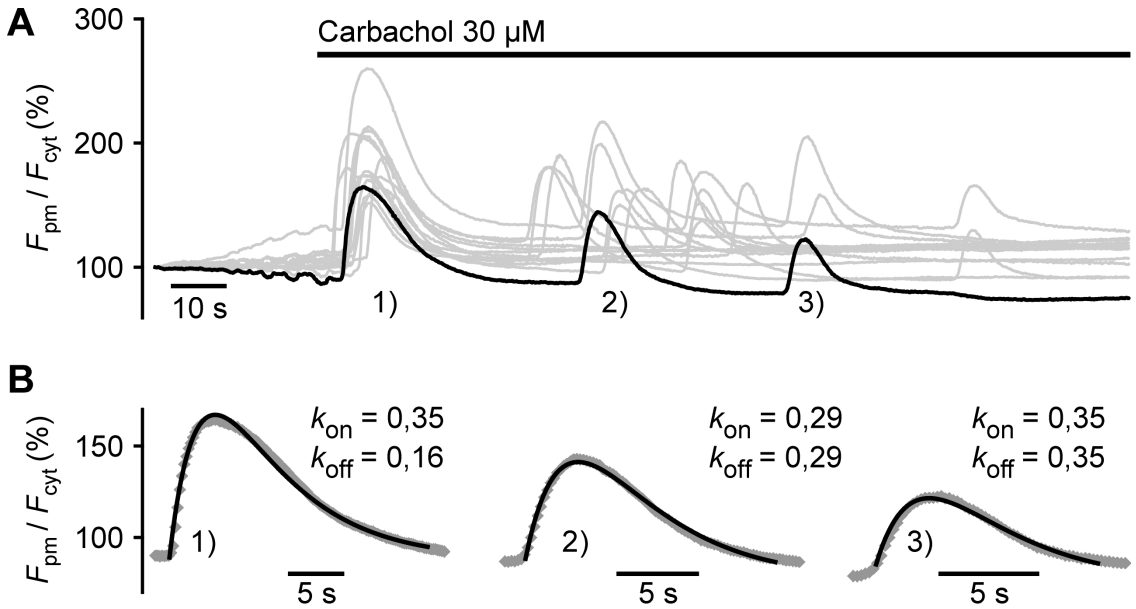

Abbildung 3.13: Translokationskinetik der Proteinkinase C-α im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen. Zeitverlauf der Translokation von PKC-α-YFP, ausgedrückt als F_{pm}/F_{cyt} in Prozent des Anfangswerts bei wie in Abb. 3.12 dargestellt definierten subzellulären Regionen. (A) Dargestellt ist der Zeitverlauf von F_{pm}/F_{cyt} in 14 einzelnen Zellen. Die Zugabe von Carbachol ist durch den Balken angezeigt. (B) Die Parameterisierung der Translokationskinetik ist exemplarisch für drei Translokationsereignisse in einer einzelnen Zelle (der in (A) schwarz gezeichneten Kurve entsprechend) demonstriert. Dargestellt sind experimentelle Daten (graue Symbole), zusammen mit der besten Approximation durch eine Bateman-Funktion (schwarze Kurven). Die durch nichtlineare Regressionsanalyse gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} sind für jedes Translokationsereignis angegeben.

Abb. 3.13 A zeigt den Zeitverlauf von F_{pm}/F_{cyt} in 14 einzelnen Zellen nach Stimulation mit 30 µM Carbachol. Das erste Translokationsereignis direkt nach Zugabe des Agonisten erfolgte in allen Zellen etwa zum gleichen Zeitpunkt. Die nachfolgenden Translokationen waren in den einzelnen Zellen nicht synchron. Im Folgenden soll die jeweils erste Translokation in einer Zelle nach Zugabe des Agonisten als *primäre*, alle folgenden als *sekundäre* Translokationen bezeichnet werden.

3.2.2 Vergleich der Kinetik primärer und sekundärer Translokationen

Die Kinetik der primären Translokationen unterschied sich von der der sekundären Translokationen. Die primären Translokationen waren durch eine schnelle Umverteilung an die Plasmamembran und eine langsamere Rückverteilung ins Cytosol charakterisiert, während bei den sekundären Translokationen die Rückverteilung schneller erfolgte (siehe Abb. 3.13 A). Zur Objektivierung dieses visuellen Befundes sollten die Translokationskinetiken mittels Approximation einer geeigneten Funktion parameterisiert werden, um Geschwindigkeitskonstanten für die Umverteilung an die Plasmamembran und die Rückverteilung ins Cytosol zu erhalten. Die Kinetik der einzelnen Translokationsereignisse ließ sich gut mithilfe einer Bateman-Funktion modellieren:

$$\frac{F_{pm}}{F_{cs}} = a + b \quad \frac{k_{on}}{(k_{on} - k_{off})} \quad (e^{-k_{off}t} - e^{-k_{on}t}) \tag{3.2}$$

In Abb. 3.13 B ist exemplarisch die Approximation der primären und zweier sekundärer Translokationen in einer Zelle durch diese Funktion dargestellt.

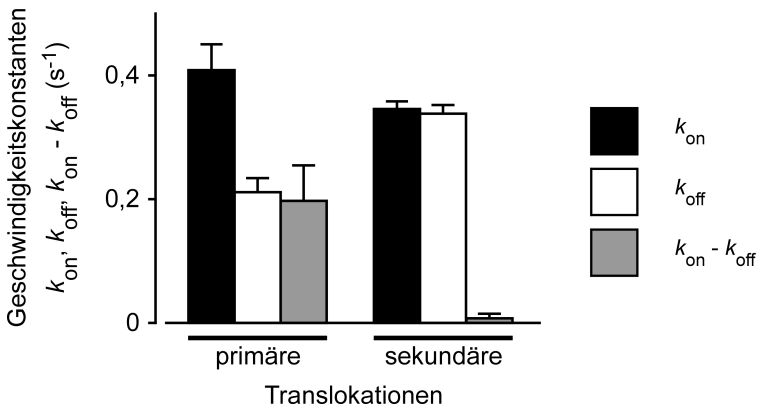

Abbildung 3.14: Geschwindigkeitskonstanten primärer und sekundärer Proteinkinase C-α-Translokationen. Statistische Auswertung des in Abb. 3.13 gezeigten Experiments. Dargestellt sind Mittelwerte ± S. E. M. von k_{on} (schwarze Balken), k_{off} (weisse Balken) und $k_{on} - k_{off}$ (graue Balken). Analysiert wurden 14 primäre und 20 sekundäre Translokationen in 14 verschiedenen Zellen.

Abb. 3.14 zeigt die Analyse von 14 primären und 20 sekundären Translokationen in 14 einzelnen Zellen. In den primären Translokationen war k_{on} etwa doppelt so groß wie k_{off}, die Translokation

vom Cytosol an die Plasmamembran war also schneller als die Rückverteilung ins Cytosol. Interessanterweise wurden die meisten sekundären Translokationen am besten mit nahezu identischen Geschwindigkeitskonstanten für Hin- und Rückverteilung modelliert: In 19 der 20 analysierten sekundären Translokationen war die Differenz ($k_{on} - k_{off}$) < 0,001 s^{-1}.

3.3 Ca^{2+}-Signale und Translokation der Proteinkinase C-α nach maximaler und submaximal effektiver Rezeptorstimulation

Es ist gezeigt worden, dass die Zugabe von membranpermeablem Diacylglycerol zu Zellen während Ca^{2+}-Oszillationen die Rückverteilung von klassischen PKC-Isoformen von der Plasmamembran ins Cytosol verlangsamen kann (Oancea & Meyer, 1998; Tanimura *et al.*, 2002). Unter der Vorstellung, dass die unterschiedliche Kinetik der primären und sekundären PKC-α-Translokationen durch eine unterschiedliche Verfügbarkeit von Diacylglycerol an der Plasmamembran verursacht wird, bot es sich nun an, zu untersuchen, ob eine Stimulation der Zellen mit niedrigen Agonistenkonzentrationen über eine geringere PLC-abhängige Bildung von Diacylglycerol zu primären PKC-α-Translokationen führen kann, deren Kinetik der der sekundären Translokationen im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen gleicht. Hierzu wurden PKC-α-YFP exprimierende HEK293-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Carbachol (10 µM–1 mM) stimuliert, zum Vergleich wurde außerdem eine maximale Stimulation über einen kotransfizierten H_1-Rezeptor mit Histamin (100 µM) durchgeführt. Zusätzlich wurden mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2 die $InsP_3$-vermittelten Ca^{2+}-Signale aufgezeichnet.

Bei allen eingesetzten Agonistenkonzentrationen kam es zu transienten Anstiegen der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 3.15 A). Die Ca^{2+}-Signale nach Stimulation mit 10 µM Carbachol waren im Vergleich mit denen nach maximaler Stimulation etwas schwächer (maximaler Anstieg auf 610 ± 40 nM nach Stimulation 10 µM Carbachol *versus* 728 ± 40 nM nach Stimulation mit 100 µM Histamin).

Die Translokationen der PKC-α-YFP nach Stimulation mit 100 µM Histamin waren in verschiedenen einzelnen Zellen sehr variabel ausgeprägt (Abb. 3.15 B). Nach Stimulation mit Carbachol waren die Translokationen in verschiedenen Zellen homogener. Die Zeitverläufe der Translokationen ließen sich wiederum gut mit einer Bateman-Funktion (Gleichung 3.2) approximieren.

Mit abnehmender Konzentration des Agonisten beschleunigte sich die Rückverteilung ins Cytosol, was sich durch eine Zunahme der Geschwindigkeitskonstante k_{off} bzw. durch eine Abnahme der Differenz $k_{on} - k_{off}$ ausdrückte (Abb. 3.16).

Insbesondere bei niedrigen Konzentrationen von Carbachol zeigte sich, dass sich in vielen Zellen k_{on} und k_{off} aneinander annäherten. Die Darstellung von k_{on} gegen k_{off} in Einzelzellen zeigt diesen

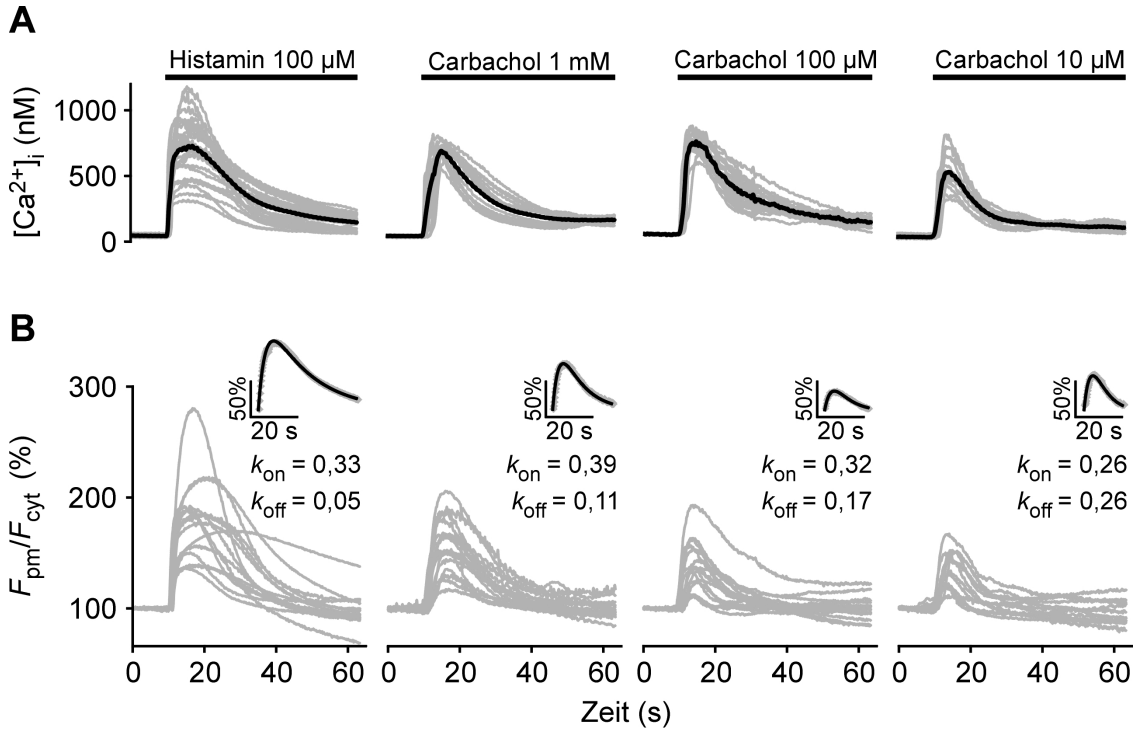

Abbildung 3.15: Ca^{2+}-Signale und Proteinkinase C-α-Translokationen nach maximaler und submaximal effektiver Rezeptorstimulation. HEK293-Zellen wurden mit PKC-α-YFP und den H_1-Rezeptor kodierenden Plasmiden transfiziert, mit dem Ca^{2+}-Indikator Fura-2 geladen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Durch die Balken angezeigt ist die Zugabe von Histamin oder Carbachol in der jeweils angegebenen Konzentration. (A) Dargestellt ist der Verlauf des $[Ca^{2+}]_i$ in einzelnen Zellen (graue Kurven) und der Mittelwert aller Zellen (schwarze Kurven) für die jeweils angegebene Agonistenkonzentration. (B) PKC-α-YFP-Translokation, dargestellt als F_{pm}/F_{cyt} in Prozent des Ausgangswerts (graue Kurven). Die Einsätze zeigen jeweils exemplarisch für eine Zelle die Parameterisierung der experimentellen Daten (graue Symbole) durch eine Bateman-Funktion (schwarze Kurve), zusammen mit den so gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off}.

Sachverhalt (Abb. 3.17). Hierbei wird deutlich, dass die primären PKC-α-YFP-Translokationen zwei unterschiedlichen Mustern folgten: In einer Gruppe von Zellen wurden nahezu identische Werte für k_{on} und k_{off} gefunden, während sich in einer zweiten Gruppe von Zellen die Translokationen mit $k_{on} > k_{off}$ modellieren ließen. Der Anteil von Zellen, deren Translokationskinetik sich durch $(k_{on} - k_{off}) < 0{,}001\ s^{-1}$ modellieren ließ, betrug bei Stimulation mit 100 µM Histamin 30 % ($n = 33$ Zellen), und stieg bei Stimulation mit 10 µM Carbachol auf 89 % ($n = 18$ Zellen, siehe Abb. 3.17). Damit entspricht das bei niedrigen Carbachol-Konzentrationen vorherrschende Muster der primären PKC-α-YFP-Translokationen ($k_{on} \approx k_{off}$) dem der sekundären Translokationen, die im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen auftreten.

Die Translokationskinetik mit $k_{on} > k_{off}$ kam nicht durch einen Ca^{2+}-Einstrom über die Plasmamembran zustande: Bei Stimulation mit 100 µM Histamin in Ca^{2+}-freiem Puffer (HBS ohne Ca^{2+}

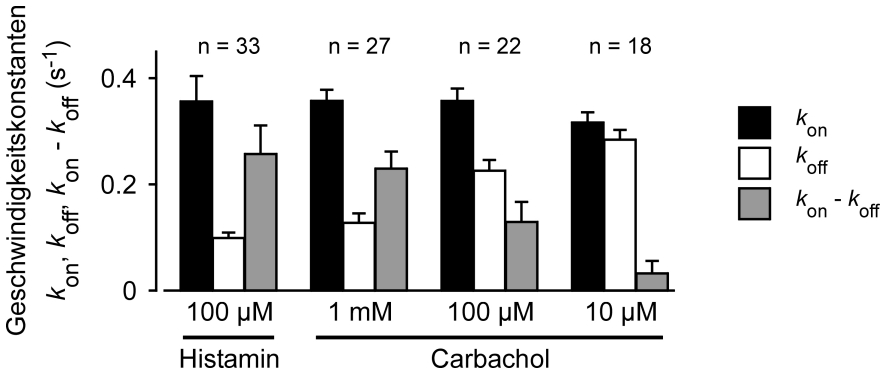

Abbildung 3.16: Geschwindigkeitskonstanten der Proteinkinase C-α-Translokationen nach maximaler und submaximal effektiver Rezeptorstimulation. Statistische Auswertung des in Abb. 3.15 gezeigten Experiments. Dargestellt sind Mittelwerte ± S. E. M. von k_{on} (schwarze Balken), k_{off} (weisse Balken) und $k_{on} - k_{off}$ (graue Balken) nach Stimulation mit den angezeigten Agonistenkonzentrationen. Die Anzahl der analysierten Zellen (n) ist jeweils angegeben.

mit 100 µM EGTA) reduzierte sich der Anteil der mit $(k_{on} - k_{off}) < 0{,}001\ s^{-1}$ reagierenden Zellen nur moderat auf 39 % ($n = 23$ Zellen, Daten nicht dargestellt).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Diacylglycerol-Bildung nach Stimulation mit submaximal effektiven Agonistenkonzentrationen ebenso wie während sekundärer Translokationen im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen geringer ausgeprägt ist als nach maximaler Rezeptorstimulation, wobei sich dieses unterschiedliche Ausmaß an PLC-Aktivierung nicht in deutlich unterschiedlichen Ca^{2+}-Signalen widerspiegelt. In der Diskussion wird mithilfe von Computersimulationen gezeigt, wie PKC-α-Translokationen mit $k_{on} \approx k_{off}$ durch einen Diacylglycerol-unabhängigen, Ca^{2+}-abhängigen Mechanismus entstehen können, während Diacylglycerol-Bindung die Rückverteilung verzögern und zu Translokationen mit $k_{on} > k_{off}$ führen kann (siehe Abschnitt 4.2.1, Seite 71).

3.4 Translokation der Proteinkinase C-ε und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C-δ_1

Das Ausmaß der PLC-Aktivierung bei den verschiedenen verwendeten Agonistenkonzentrationen wurde durch Analyse der Translokationen der neuartigen PKC-Isoform PKC-ε, die Diacylglycerol-abhängig, aber Ca^{2+}-unabhängig vom Cytosol an die Plasmamembran transloziert, sowie der PH-Domäne der PLC-δ_1 (PLC-δ_1(PH)), die sowohl an PIP_2 als auch an $InsP_3$ bindet und PLC-vermittelt von der Plasmamembran ins Cytosol transloziert, näher untersucht. Hierzu wurden fluoreszierende Fusionsproteine (PKC-ε-CFP und PLC-δ_1(PH)-YFP) in HEK293-Zellen exprimiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

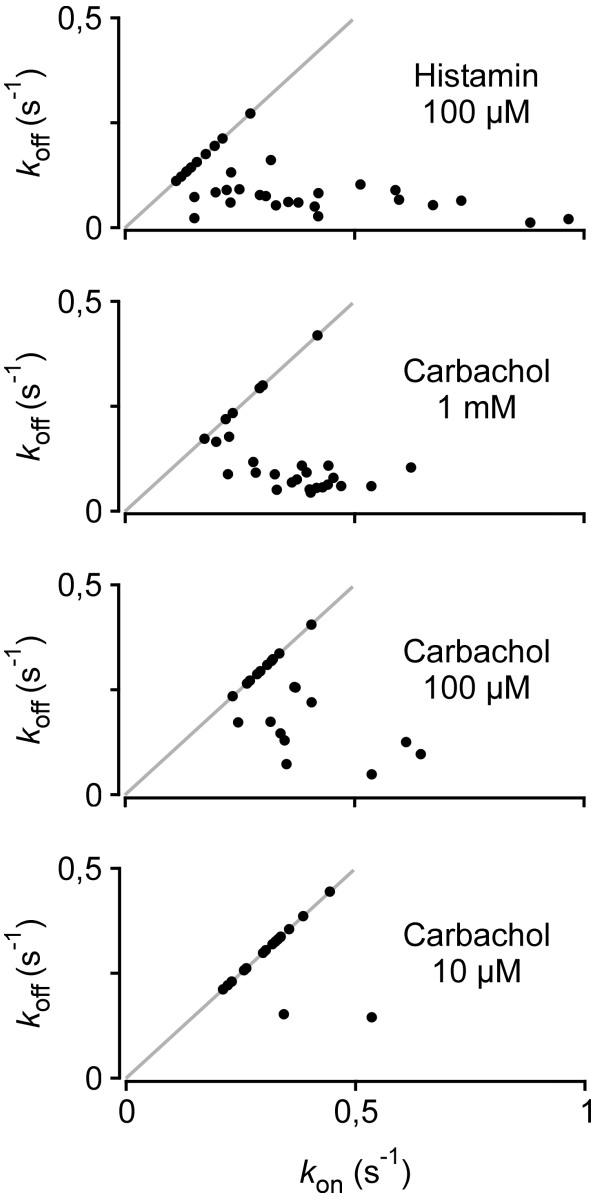

Abbildung 3.17: Korrelation der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} der Proteinkinase C-α-Translokationen. Jeder Datenpunkt wurde aus der Analyse einer primären PKC-α-YFP-Translokation in einer Zelle, wie in Abb. 3.15 dargestellt, gewonnen. Der verwendete Agonist und seine Konzentration ist in den Diagrammen jeweils angegeben. Die grauen Linien bezeichnen den Bereich identischer Werte für k_{on} und k_{off}.

3.4.1 Simultane Visualisierung

HEK293-Zellen wurden mit PKC-ε-CFP, PLC-δ_1(PH)-YFP sowie den H_1-Rezeptor kodierenden Plasmiden transfiziert und die subzelluläre Lokalisation der fluoreszierenden PLC-Indikatoren vor und nach Stimulation der Zellen mit Histamin oder Carbachol fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abb. 3.18 zeigt Falschfarbendarstellungen der Fluoreszenz von PKC-ε-CFP (obere Reihe) und PLC-δ_1(PH)-YFP (untere Reihe) in einer repräsentativen Zellgruppe vor und 20 s nach Stimulation der Zellen mit 100 µM Histamin. In den ruhenden Zellen war die Fluoreszenz von PKC-ε-CFP unter Aussparung der Kerne gleichmäßig über die Zellen verteilt (Abb. 3.18, links oben), während die Fluoreszenz von PLC-δ_1(PH)-YFP vorwiegend im Bereich der Plasmamembran lokalisiert war (Abb. 3.18, links unten). In den 20 s nach Stimulation aufgenommenen Bildern waren die Verhältnisse umgekehrt: die Fluoreszenz von PKC-ε-CFP konzentrierte sich nun auf die

Plasmamembran, während die Fluoreszenz von PLC-δ_1(PH)-YFP cytosolisch mit Aussparung der Kerne lokalisiert war (siehe Abb. 3.18, rechte Spalte). Der Zeitverlauf der Translokation beider Konstrukte wurde wiederum aus einer Zeitserie von Fluoreszenzaufahmen berechnet, indem der Quotient F_{pm}/F_{cyt} aus den Fluoreszenzen über der Zellmembran und über dem Cytosol gebildet wurde.

Abb. 3.19 zeigt den Zeitverlauf von F_{pm}/F_{cyt} für beide Konstrukte nach Stimulation mit 100 µM Histamin in vier repräsentativen Zellen. Die Translokation der beiden Konstrukte zeigte einen prinzipiell ähnlichen Zeitverlauf, wobei jedoch die Translokation der PLC-δ_1(PH)-YFP von der Plasmamembran ins Cytosol schneller war als die gegenläufige Translokation der PKC-ε-CFP vom Cytosol an die Plasmamembran (Zeit bis zur halbmaximalen Translokation 3,0 ± 0,2 s für PLC-δ_1(PH)-YFP *versus* 5,7 ± 0,3 s für PKC-ε-CFP; $n = 48$ Zellen). Dieser Befund spricht dafür, dass der Zeitverlauf des Diacylglycerol-Abbaus nach PLC-Aktivierung dem der PIP_2-Resynthese bzw. des $InsP_3$-Abbaus ähnelt (siehe auch Diskussion, Abschnitt 4.2.2, Seite 74).

3.4.2 Translokationseffizienzen nach maximaler und submaximal effektiver Rezeptorstimulation

In Abb. 3.19 ist zu erkennen, das in den Zellen, in denen PKC-ε-CFP effizient translozierte, die Translokation von PLC-δ_1(PH)-YFP ebenfalls effizient war. Die Korrelation zwischen den Trans-

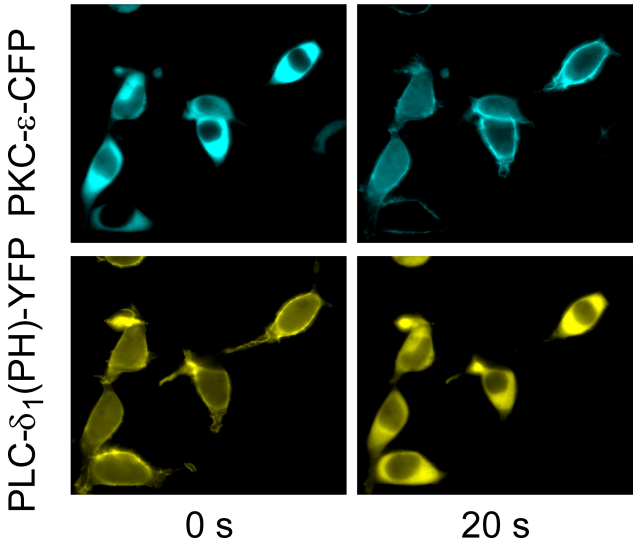

Abbildung 3.18: Subzelluläre Lokalisation von Proteinkinase C-ε und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C-δ_1 vor und nach Histamin-Stimulation. HEK293-Zellen wurden mit PKC-ε-CFP, PLC-δ_1(PH)-YFP und den H_1-Rezeptor kodierenden Plasmiden kotransfiziert und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Dargestellt sind Falschfarbenbilder der CFP- (obere Zeile) und der YFP-Fluoreszenz (untere Zeile) in einer repräsentativen Zellgruppe vor und 20 s nach Stimulation mit 100 µM Histamin.

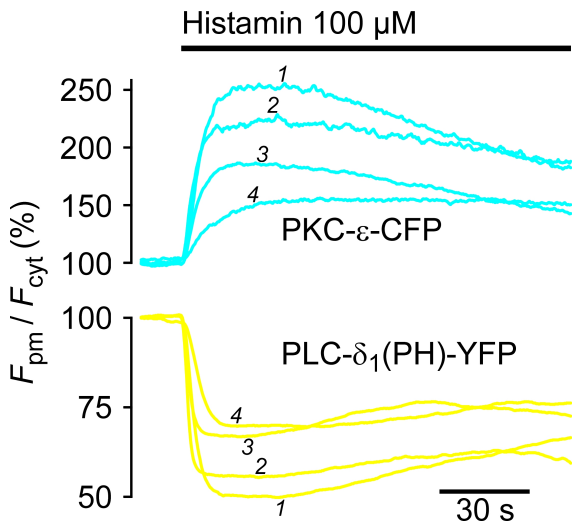

Abbildung 3.19: Zeitverlauf der Translokation von Proteinkinase C-ε und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C-δ_1 nach Histamin-Stimulation. Mit PKC-ε-CFP, PLC-δ_1(PH)-YFP und den H_1-Rezeptor kodierenden Plasmiden kotransfizierte HEK293-Zellen wurden mit 100 µM Histamin stimuliert und dabei fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenz wurde in subzellulären Regionen über dem Cytosol (F_{cyt}) und über der Plasmamembran (F_{pm}) gemittelt und die subzelluläre Translokation als F_{pm}/F_{cyt}, ausgedrückt in Prozent des Ausgangswerts, für vier repräsentative Zellen (nummeriert als *1–4*) dargestellt. Die Zugabe von Histamin ist durch den Balken angezeigt.

lokationseffizienzen der beiden Biosensoren nach maximaler und submaximal effektiver Rezeptorstimulation wurde näher untersucht, um einerseits diesen Zusammenhang an einer größeren Anzahl von Zellen statistisch zu sichern und andererseits die Empfindlichkeit beider Indikatoren zu vergleichen.

Bei Stimulation mit 100 µM Histamin kam es in den meisten Zellen zu einer deutlichen Translokation sowohl von PKC-ε-CFP als auch von PLC-δ_1(PH)-YFP, wobei die Translokationseffizienzen beider Konstrukte eng korreliert waren (Abb. 3.20). In $n = 58$ untersuchten Zellen war die Korrelation zwischen den Translokationseffizienzen von PLC-δ_1(PH)-YFP und PKC-ε-CFP mit einem Korrelationskoeffizienten $r = -0{,}79$ hochsignifikant ($P < 0{,}01$). Bei Stimulation mit 1 mM Carbachol war die Translokation beider Konstrukte weniger effizient, und die Korrelation der Translokationseffizienzen war nicht mehr signifikant (n = 47 Zellen; $r = -0{,}29$; $0{,}05 < P < 0{,}1$). Bei Reduktion der Carbachol-Konzentration auf 100 und 10 µM nahmen die Translokationseffizienzen weiter ab (siehe Abb. 3.19) und eine Korrelation war nicht mehr zu erkennen. Die Translokationseffizienzen nach Stimulation mit 10 µM Carbachol waren von denen nach Zugabe von Messpuffer nicht zu unterscheiden (siehe Abb. 3.19, *Kontrolle*).

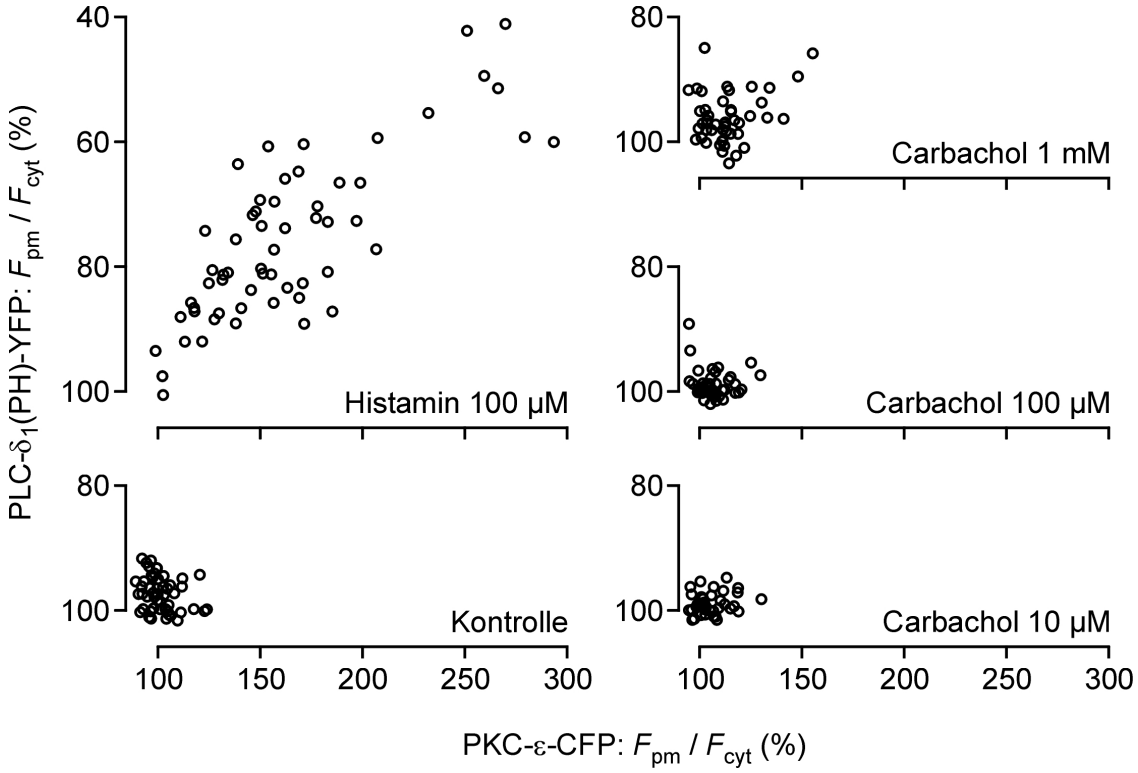

Abbildung 3.20: Korrelation der Translokationseffizienzen von Proteinkinase C-ε und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C-δ_1. Mit PKC-ε-CFP, PLC-δ_1(PH)-YFP und den H_1-Rezeptor kodierenden Plasmiden kotransfizierte HEK293-Zellen wurden mit Histamin (100 µM) oder mit Carbachol (1 mM, 100 µM oder 10 µM) stimuliert und dabei fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Maß für die Translokationseffizienzen von PKC-ε-CFP und PLC-δ_1(PH)-YFP wurden für jede analysierte Zelle die maximalen Änderungen von F_{pm}/F_{cyt} für CFP und YFP innerhalb der ersten 40 s nach Zugabe des Agonisten berechnet. Dargestellt ist die Korrelation zwischen der Translokationseffizienz von PLC-δ_1(PH)-YFP und der von PKC-ε-CFP für die jeweils angegebenen Agonisten und Konzentrationen. Als Kontrolle wurde Messpuffer zu den Zellen gegeben.

3.4.3 Subzellulläre Lokalisation der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C-δ_1 im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen

Die hier beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass die Aktivierung von PLC im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen im untersuchten System allenfalls sehr gering ist. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu der Beobachtung, dass repetitive $[Ca^{2+}]_i$-Erhöhungen in verschiedenen Zellmodellen, darunter auch HEK293-Zellen, von repetitiven Translokationen fluoreszenzmarkierter PLC-δ_1(PH) begleitet sind (Hirose *et al.*, 1999; Dale *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001a). Deshalb wurde im Folgenden das Verhalten von PLC-δ_1(PH)-YFP im Rahmen von Carbachol-induzierten Ca^{2+}-Oszillationen in den für die vorliegende Arbeit verwendeten HEK293-Zellen untersucht.

In PLC-δ_1(PH)-YFP exprimierenden, mit Fura-2-AM geladenen Zellen ließen sich durch Stimulation mit 10 µM Carbachol in einigen Zellen Ca^{2+}-Oszillationen auslösen (Abb. 3.21 A). Un-

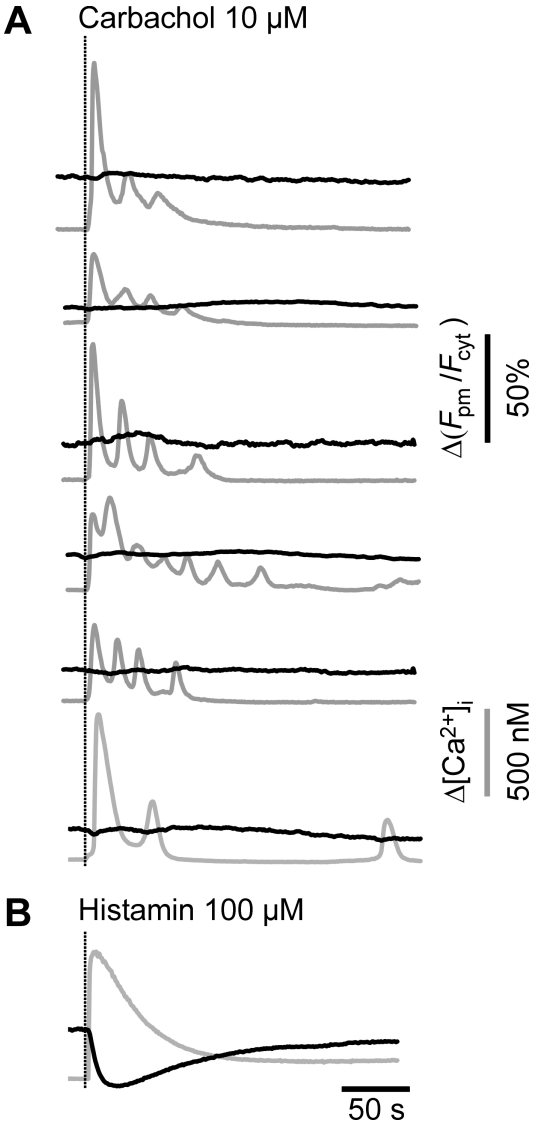

Abbildung 3.21: Subzelluläre Lokalisation der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C-δ_1 während Carbachol-induzierter Ca^{2+}-Oszillationen. HEK293-Zellen wurden mit PLC-δ_1(PH)-YFP und den H_1-Rezeptor kodierenden Plasmiden transfiziert, mit dem Ca^{2+}-Indikator Fura-2 geladen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt ist der Zeitverlauf von $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$, graue Kurven) und $\Delta(F_{pm}/F_{cyt}$ (schwarze Kurven) in Einzelzellen. Die Zugabe des Agonisten ist durch die punktierte Linie angezeigt. (A) Die Zellen wurden mit 10 µM Carbachol stimuliert, wodurch häufig Ca^{2+}-Oszillationen ausgelöst wurden. Dargestellt sind Daten aus 6 Zellen, in denen es zu oszillatorischen $[Ca^{2+}]_i$-Antworten kam. (B) Stimulation mit 100 µM Histamin als Kontrolle.

ter diesen Bedingungen kam es zu keiner synchronen Translokation von PLC-δ_1(PH)-YFP (siehe Abb. 3.21 A). Die zur Kontrolle durchgeführte Stimulation mit 100 µM Histamin führte in vielen Zellen zu einem $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg, der von einer Translokation von PLC-δ_1(PH)-YFP von der Plasmamembran ins Cytosol begleitet war (Abb. 3.21 B). Die Höhe des $[Ca^{2+}]_i$-Anstiegs war dabei ähnlich wie die der $[Ca^{2+}]_i$-Transienten im Rahmen der Carbachol-induzierten Ca^{2+}-Oszillationen (siehe Abb. 3.21 A und B).

Zusammenfassend sprechen diese Befunde dafür, dass den Carbachol-induzierten Ca^{2+}-Oszillationen in HEK293-Zellen keine oszillatorische PLC-Aktivität zugrunde liegt (siehe auch Diskussion, Abschnitte 4.2.3 und 4.2.4, ab Seite 76).

3.5 Phospholipase C-abhängige Aktivierung des Kationenkanals TRPC4

Um die PLC-abhängige Aktivierung des rezeptoraktivierten Kationenkanals TRPC4 näher zu untersuchen, wurden elektropysiologische Untersuchungen in Kombination mit der fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung eines PLC-Biosensors durchgeführt. Da sich der rezeptoraktivierte Einwärtsstrom in TRPC4 exprimierenden Zellen nach Stimulation eines kotransfizierten H_1-Rezeptors innerhalb weniger Sekunden entwickelt (Schaefer *et al.*, 2000, 2002), wurde als PLC-Biosensor PLC-δ_1(PH) gewählt, deren subzelluläre Umverteilung nach PLC-Aktivierung schneller stattfindet als die der PKC-ε (siehe Abb. 3.19). Es wurden Untersuchungen in der *whole-cell*-Konfiguration der *patch-clamp*-Technik vorgenommen, bei der eine simultane fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des translozierenden fluoreszierenden Biosensors möglich ist. Die Messungen wurden im *voltage-clamp*-Modus durchgeführt, wobei ein Membranpotential vorgegeben wird und die transmembranären Ströme, die bei diesem Potential fließen, mit einem Rückkopplungsverstärker gemessen werden. Ausgehend von einem Haltepotential von −60 mV wurde in jeder Sekunde eine Spannungsrampe von −100 bis +150 mV aufgezeichnet, um ein spannungsabhängiges Verhalten des Ionenkanals erfassen zu können.

Abb. 3.22 zeigt ein typisches Beispiel eines solchen Experiments mit Zellen, die mit den cDNAs für TRPC4, PLC-δ_1(PH)-YFP sowie den H_1-Rezeptor transfiziert waren. Die Rezeptorstimulation mit Histamin (100 µM) führte zu einer schnellen Translokation von PLC-δ_1(PH)-YFP von der Plasmamembran ins Cytosol, nach Auswaschen des Agonisten kam es zu einer Rückverteilung an die Plasmamembran (Abb. 3.22 A, obere Reihe; Abb. 3.22 B zeigt Fluoreszenzaufnahmen vor Histaminstimulation und zum Zeitpunkt maximaler Translokation).

Parallel zu der Translokation des PLC-Indikators kam es zur Entwicklung sowohl von Auswärtsströmen bei positivem Pipettenpotential als auch von Einwärtsströmen bei negativem Pipettenpotential (Abb. 3.22 A, mittlere und untere Reihe). Die Auswärtsströme entwickelten sich dabei schneller als die Einwärtsströme und blieben auch nach Auswaschen des Agonisten substantiell gegenüber den basalen Werten erhöht. Dieser Sachverhalt zeigt sich deutlich an den im Verlauf des Experiments aufgezeichneten Strom-Spannungs-Kennlinien (Abb. 3.22 C): Vor Rezeptoraktivierung wies die Strom-Spannungs-Kennlinie eine auswärtsgleichrichtende Charakteristik mit einem maximalen Strom von etwa 300 pA bei +150 mV auf (Spur *1*). Als erste Veränderung nach Rezeptorstimulation kam es zu einer Zunahme der Auswärtsströme, die schon nahezu ihr Maximum von etwa 4,5 nA bei +150 mV erreicht hatten, während weiterhin nur ein geringer Einwärtsstrom von etwa -500 pA bei −100 mV floss (Spur *2*). Die Steigung der zu diesem Zeitpunkt aufgezeichneten

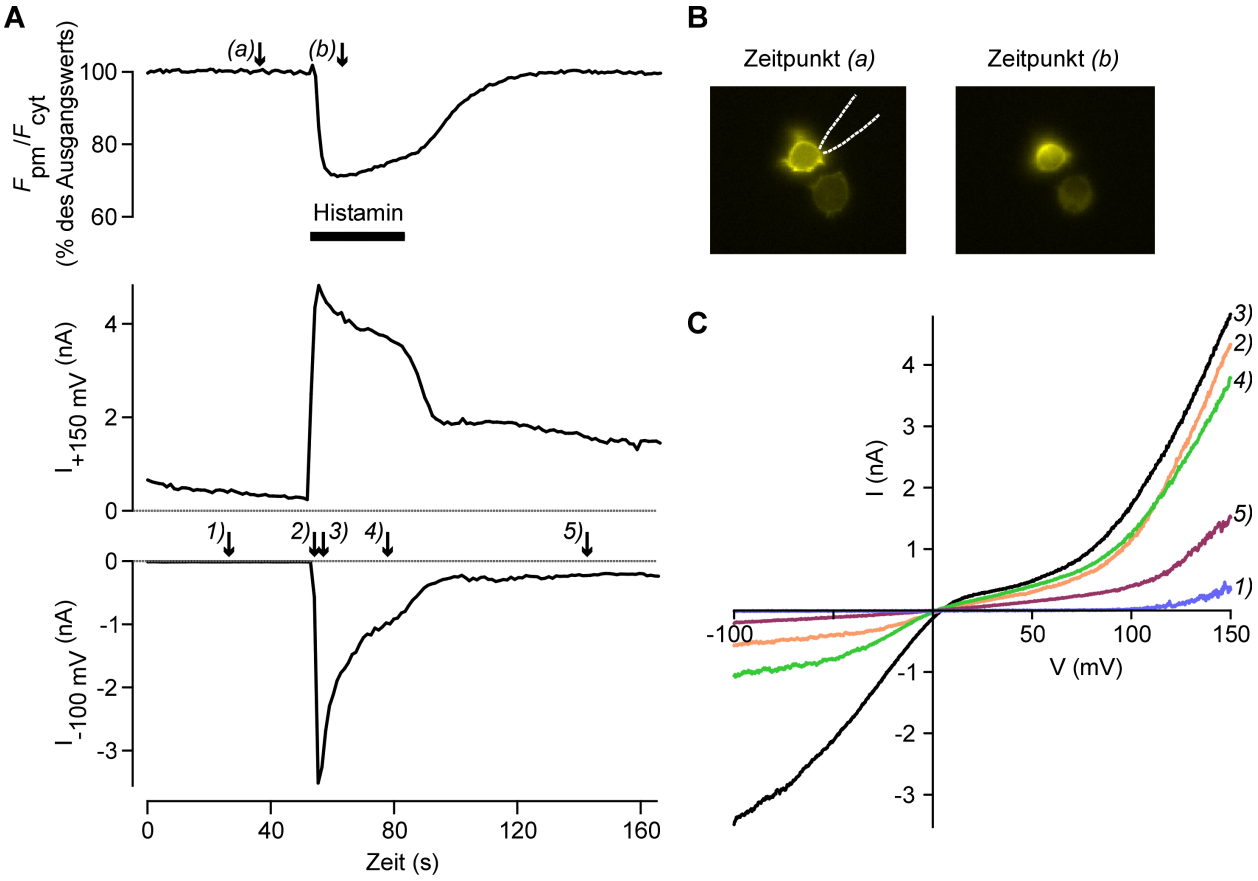

Abbildung 3.22: Phospholipase C-abhängige Aktivierung des Kationenkanals TRPC4. *Whole-cell-patch-clamp*-Untersuchungen an einer TRPC4, PLC-δ_1(PH)-YFP und den H1-Rezeptor exprimierenden HEK293-Zelle vor und nach Stimulation mit Histamin (100 µM). (A) Zeitverlauf der Translokation von PLC-δ_1(PH)-YFP (ausgedrückt als Quotient der Fluoreszenzen über der Plasmamembran (F_{pm}) und über dem Cytosol (F_{cyt}; obere Reihe), der bei einem Potential von +150 mV gemessenen Auswärtsströme (mittlere Reihe) sowie der bei einem Potential von -100 mV gemessenen Einwärtsströme (untere Reihe). Die Anwesenheit von Histamin in der Perfusionslösung ist mit einem Balken angezeigt. (B) Zwei Fluoreszenzaufnahmen, die zu den in (A) angegebenen Zeitpunkten aufgezeichnet wurden (In das linke Bild ist die Lage der Pipette eingezeichnet). (C) Strom-Spannungs-Kennlinien, die als Antwort auf Spannungsrampen (Dauer 500 ms) von -100 bis +150 mV zu verschiedenen Zeitpunkten (in (A) angegeben) registriert wurden. Dargestellt sind Daten eines repräsentativen Experiments aus einer Reihe von 6 Experimenten.

Strom-Spannungs-Kennlinie bei Potentialen < 0 mV nahm dabei mit zunehmend negativeren Potentialen immer mehr ab. Kurze Zeit später erreichten auch die Einwärtsströme ihr Maximum von etwa $-3,5$ nA bei -100 mV, wobei die Strom-Spannungs-Kennlinie im Bereich von 0 bis etwa -50 mV nahezu linear war und erst bei noch negativeren Potentialen flacher wurde (Spur *3*). Nach Auswaschen des Agonisten nahmen die Einwärtsstöme stärker ab als die Auswärtsströme (Spuren *4* und *5*).

Eine solche Spannungsabhängigkeit kann mit Spannungssprungprotokollen genauer charakterisiert werden: Nach einem Spannungssprung nimmt die Offenwahrscheinlichkeit eines Ionenkanals

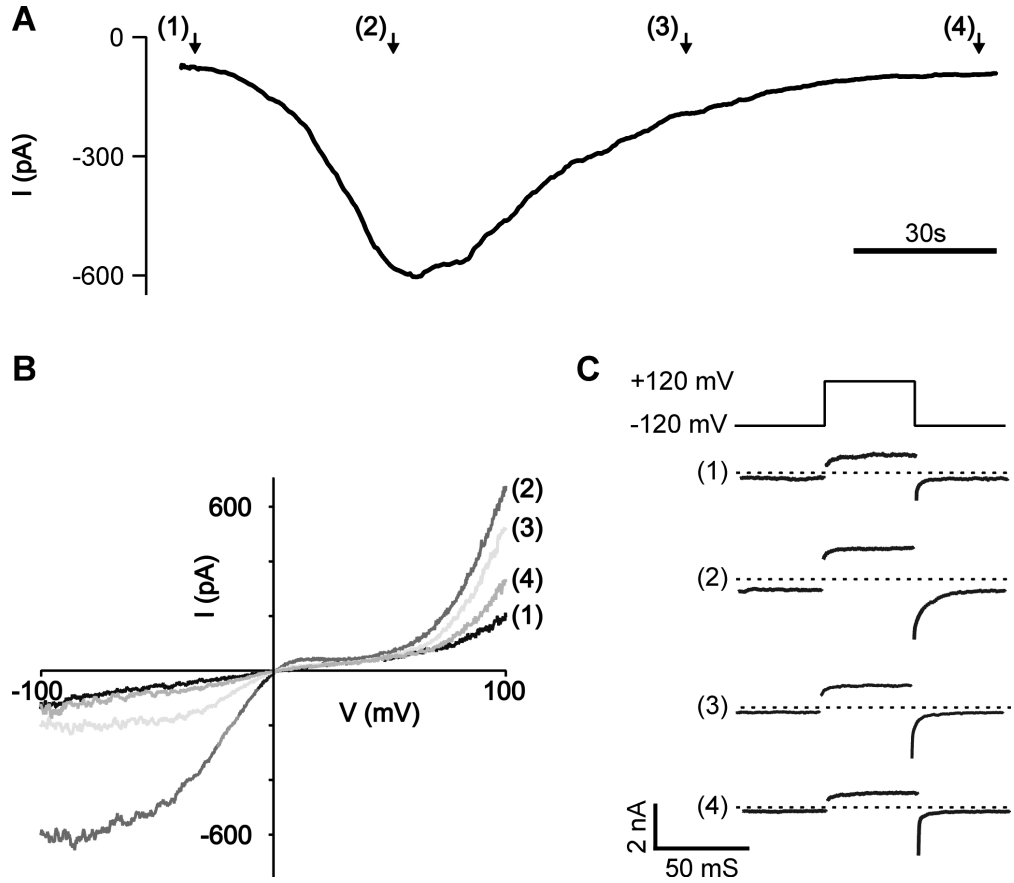

Abbildung 3.23: Charakterisierung der Spannungsabhängigkeit des Kationenkanals TRPC4 mit Spannungssprüngen. *Whole-cell-patch-clamp*-Untersuchungen an einer TRPC4 exprimierenden HEK293-Zelle während einer Stimulation durch AlF_4^- in der Pipettenlösung. (A) Verlauf der bei einem Haltepotential von -60 mV gemessenen Einwärtsströme vom Zeitpunkt des Einbrechens in die *whole-cell*-Konfiguration an. (B) Strom-Spannungs-Kennlinien, die als Antwort auf Spannungsrampen (Dauer 500 ms) von -100 bis +100 mV zu den in (A) angegeben Zeitpunkten registriert wurden. (C) Stromantworten auf ein zu den verschiedenen in (A) angegebenen Zeitpunkten durchgeführtes Spannungssprungprotokoll (siehe oberste Reihe). Die 0-mV-Linie der Stromaufzeichnung ist jeweils als punktierte Linie eingezeichnet.

nicht instantan einen neuen Wert an, sondern nähert sich dem neuen Wert mit einer bestimmten Kinetik an. Um die PLC-abhängige Modulation der Spannungsabhängigkeit von TRPC4 auch in der Aktivierungsphase mit Spannungssprüngen charakterisieren zu können, sollte ein Aktivierungsmodus gewählt werden, der nicht zu einer so schnellen Aktivierung führt wie die Stimulation des Histaminrezeptors. Deshalb wurde der Kanal für dieses Experiment mit AlF_4^- stimuliert, das über die *patch-clamp*-Pipette in die untersuchte Zelle dialysiert wurde. AlF_4^- führt zu einer direkten Aktivierung heterotrimerer G-Proteine (Sternweis & Gilman, 1982; Bigay *et al.*, 1987) und in Folge zu einer Aktivierung von TRPC-Kanälen, wobei sich der Einwärtsstrom langsamer entwickelt als nach Rezeptorstimulation (Jung *et al.*, 2003). Stimulation TRPC4 exprimierender Zellen mit AlF_4^- führte reproduzierbar zu einem Einwärtsstrom, der eine geringere Amplitude aufwies und sich

langsamer entwickelte als der Histamin-induzierte Strom (Abb 3.23 A). Die Strom-Spannungs-Kenlinien zeigten wiederum zuerst eine Zunahme der Auswärts-, dann auch der Einwärtsströme (Abb 3.23 B).

Bei Spanungssprüngen von −120 auf +120 mV zeigte sich eine Aktivierung innerhalb einiger Millisekunden, die eine monoexponentielle Kinetik aufwies (Abb. 3.23 C). Beim Sprung zurück auf −120 mV zeigte sich die Deaktivierung in Form sogenannter *tail currents*: Kurz nach dem Sprung sind die Kanäle noch geöffnet, so dass ein Einwärtsstrom fließt, der mit der Deaktivierung der Kanäle innerhalb einiger Millisekunden wieder abnimmt. Auch diese *tail currents* ließen sich durch eine monoexponentielle Funktion beschreiben. Die *tail currents* zeigten zum Zeitpunkt maximaler Aktivierung des Kanals eine deutlich langsamere Inaktivierung als zu Beginn des Experiments, während sich die Aktivierungskinetik beim Sprung von −120 nach +120 mV mit zunehmender Aktivierung des Kanals beschleunigte (siehe Abb. 3.23 C, *(1) vs. (2)*)

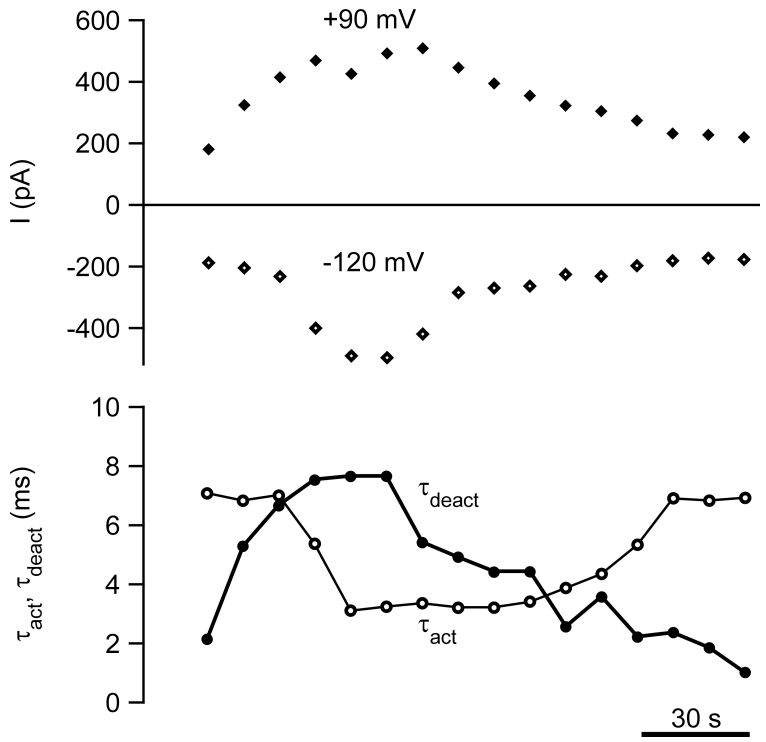

Abbildung 3.24: Aktivierungs- und Deaktivierungs-Zeitkonstanten im Verlauf der Phospholipase C-abhängigen Aktivierung des Kationenkanals TRPC4. Weitere Analyse des in Abb. 3.23 gezeigten Experiments. Dargestellt sind die *steady-state*-Ströme am Ende von Spannungssprüngen (50 ms Dauer) zu +90 mV (obere Reihe) und -120 mV (untere Reihe), sowie die durch nichtlineare Regressionsanalyse gewonnenen monoexponentiellen Zeitkonstanten der Aktivierung beim Sprung von -120 nach +120 mV (τ_{act}) und der Deaktivierung beim Sprung von +120 nach -120 mV (τ_{deact}).

Eine weitere Analyse dieses Experiments ist in Abb. 3.24 dargestellt. Gezeigt ist der Zeitverlauf der *steady-state*-Ströme bei +90 und −120 mV (obere Reihe) sowie die Zeitkonstanten der

Aktivierung bei Sprüngen von -120 nach $+120$ mV (τ_{act}) sowie der Deaktivierung bei Sprüngen von $+120$ mV nach -120 mV (τ_{deact}, untere Reihe). Parallel zu der Zunahme der Auswärtsströme bei positivem Potential und der Einwärtsströme bei negativem Potential kam es zu einer Beschleunigung der Aktivierungskinetik (Abnahme von τ_{act}) und einer Verlangsamung der Inaktivierungskinetik (Zunahme von τ_{deact}). Mit dem Rückgang der Stromantworten näherten sich auch die Aktivierungs- und Inaktivierungszeitkonstanten wieder ihren ursprünglichen Werten an.

Damit konnte für TRPC4 ein spannungsabhängiges Verhalten charakterisiert werden, das dem für die Mitglieder der TRPV- und TRPM-Familien beschriebenen ähnelt: im Rahmen der Aktivierung durch PLC-Aktivierung verschiebt sich die Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit vom Membranpotential in Richtung negativer Potentiale. Dadurch kann es im Zustand voller Aktivierung auch bei physiologischem Membranpotential zu einem Einstrom von Kationen kommen, der die Zelle depolarisieren und die Vielzahl Ca^{2+}-abhängiger zellulärer Systeme aktivieren kann.