

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden unter Verwendung fluoreszierender Biosensoren zwei zelluläre Systeme untersucht, die der Dekodierung Phospholipase C (PLC)-vermittelter Signale dienen: der Mechanismus, durch den nach submaximaler PLC-Stimulation oszillatorische Ca^{2+} -Signale generiert werden, sowie der PLC-vermittelt aktivierte nichtselektive Kationenkanal TRPC4. Außerdem wurde ein im Rahmen der Arbeit beobachteter bisher nicht beschriebener Photochromismus von Farbvarianten des grün fluoreszierenden Proteins GFP charakterisiert.

Als fluoreszenzmikroskopisch in lebenden Einzelzellen auslesbare PLC-Biosensoren wurden Fusionsproteine aus GFP-Varianten und solchen Proteinen eingesetzt, deren subzelluläre Lokalisation durch ihre Interaktion mit PLC-abhängig gebildeten oder abgebauten Signalmolekülen bestimmt wird: die neuartige Proteinkinase C (PKC)-Isoform PKC- ϵ , die durch Bindung an PLC-abhängig gebildetes Diacylglycerol (DAG) vom Cytosol an die Plasmamembran transloziert, die klassische Isoform PKC- α , die zusätzlich auch Ca^{2+} -abhängig transloziert, sowie die Pleckstrinhomologe Domäne der PLC- δ_1 (PLC- δ_1 (PH)), die an das plasmamembranständige PLC-Substrat Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) und an das lösliche PLC-Produkt Inositol-1,4,5-Trisphosphat (InsP_3) bindet und PLC-vermittelt von der Plasmamembran ins Cytosol transloziert. Zur Untersuchung der PLC-vermittelten Modulation von TRPC4 wurden zusätzlich elektrophysiologische Experimente in der *patch-clamp*-Technik durchgeführt. Für die Charakterisierung des Photochromismus fluoreszierender Proteine wurden Epifluoreszenz-, *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)- und Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Mikroskopie sowie Absorptionsspektroskopie an gereinigten Proteinen eingesetzt.

Phospholipase C-Aktivität während Ca^{2+} -Oszillationen In elektrisch nicht erregbaren Zellen können Ca^{2+} -Oszillationen entweder durch zyklische PLC-vermittelte InsP_3 -Bildung oder durch repetitive Ca^{2+} -Freisetzung bei konstanter InsP_3 -Konzentration generiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass den Carbachol-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen in HEK293-Zellen eine konstante, nicht-oszillatorische PLC-Aktivierung zugrunde liegt: Synchron mit den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegen translozierte PKC- α vom Cytosol an die Plasmamembran und zurück, wobei Hin- und Rückverteilung gleich schnell waren, was sich durch einen diffusionsgetriebenen, Ca^{2+} -aber nicht DAG-abhängigen Translokationsmechanismus erklären lässt. PLC- δ_1 (PH) blieb dabei an der Plasmamembran lokalisiert, und PKC- ϵ vollführte eine monophasische, mehrere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten überdauernde Translokation an die Plasmamembran und zurück. Im Gegensatz dazu zeigten nach maximaler Stimulation PLC-kopplender Rezeptoren alle drei Indikatoren eine PLC-

Aktivierung an: PLC- δ_1 (PH) und PKC- ϵ vollführten in Zeitverlauf und Effizienz eng korrelierte gegenläufige Translokationen, während PKC- α nach einer schnellen Translokation an die Plasmamembran eine durch DAG-Bindung verzögerte Rückverteilung ins Cytosol zeigte.

Phospholipase C-abhängige Aktivierung des Kationenkanals TRPC4 In dieser Arbeit konnte erstmals demonstriert werden, dass der klassischerweise als nicht spannungsabhängig angesehene Ionenkanal TRPC4 ein spannungsabhängiges Schaltverhalten zeigt, das durch PLC-Aktivierung moduliert wird: Parallel zu einer mit PLC- δ_1 (PH) visualisierten rezeptorvermittelten PLC-Aktivierung entwickelten sich in TRPC4 exprimierenden Zellen zunächst Auswärtsströme bei positivem Membranpotential, dann auch Einwärtsströme bei negativem Membranpotential und bildeten sich nach Auswaschen des Agonisten in umgekehrter Reihenfolge zurück. Die im Zeitverlauf der Aktivierung gemessenen Strom-Spannungs-Kennlinien zeigten dabei eine durch PLC-Aktivität induzierte Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Membranpotential in Richtung negativer Potentiale. Außerdem führte PLC-Aktivierung zu einer Beschleunigung der Aktivierungs- und einer Verlangsamung der Deaktivierungskinetik von TRPC4.

Damit ergibt sich eine neue, mechanistische Sicht der PLC-abhängigen Aktivierung dieses Ionenkanals: Durch PLC-Aktivität wird seine Aktivierungskurve in den Bereich physiologischer Membranpotentiale verschoben, wodurch es zu einem TRPC4-vermittelten Einstrom von Kationen und nachfolgenden Effekten wie der Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Signalwege und Depolarisation der Zellmembran kommen kann.

Neuartiger Photochromismus fluoreszierender Proteine Eine im Rahmen dieser Arbeit aufgefallene Instabilität der Fluoreszenz häufig verwendeter GFP-Farbvarianten konnte auf ein bisher nicht beschriebenes reversibles Ausbleichen zurückgeführt werden: Nach Anregung der protonierten Form der fluoreszierenden Proteine kommt es zur Ausbildung eines nicht fluoreszierenden Zustands verminderter Absorption, wobei die Quanteneffizienz dieses Übergangs um ein Vielfaches höher ist als die des klassischen irreversiblen Ausbleichens. Die reversibel ausgebleichten fluoreszierenden Proteine erlangen ihre Fluoreszenz mit Zeitkonstanten im Bereich einiger Sekunden spontan zurück, außerdem ist eine Beschleunigung der Reaktivierung durch Belichtung möglich.

Da dieser neuartige Photochromismus zu bedeutsamen Artefakten in quantitativen Fluoreszenzexperimenten führen kann, werden anhand der erhobenen Daten Wege zur Vermeidung solcher Probleme aufgezeigt. Außerdem wird die Nutzbarkeit des Effekts zur Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer durch reversibles Ausbleichen des Akzeptors demonstriert.