

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Fluorometrische Analyse der Assemblierung des Calcium-  
permeablen Kationenkanals TRPC6

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hemasse Amiri

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Schaefer

2. Prof. Dr. K.-P. Hofmann

3. Prof. Dr. M. Bünemann

Datum der Promotion: 18.09.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Grundprinzip des Calcium-Signals	7
1.1.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum	8
1.1.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern	8
1.2 Die TRP-Kanalfamilie	11
1.2.1 Strukturelle Eigenschaften	12
1.2.2 Funktion, Aktivierungsmodi und Multimerisierung	13
1.3 Das grün fluoreszierende Protein	18
1.3.1 Struktur des GFP	18
1.3.2 Anregungs- und Fluoreszenzeigenschaften des GFP	20
1.3.3 Anwendungsgebiete des GFP und seiner Varianten	20
1.4 Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	22
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>24</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1 Materialien	25
3.1.1 Verbrauchskemikalien	25
3.1.2 Weitere Materialien	25
3.1.3 Expressionsplasmide	26
3.1.4 Zellen	26
3.1.5 Zellkultur	26
3.1.6 Messpuffer für Imaging-Experimente	26
3.2 Zellkultur und transiente Transfektion	27
3.3 Digitale Fluoreszenzmikroskopie	27
3.4 Konfokale Mikroskopie	28
3.4.1 Konfokale FRAP-Messung	29

## *Inhaltsverzeichnis*

3.4.2 Konfokale FRET-Messung	29
3.5 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	30
3.5.1 Wahl der Fluorochrome	30
3.5.2 Methoden des FRET-Nachweises	30
a) Akzeptor-Bleichverfahren	31
b) spektrale Dekonvolution	32
3.6 Berechnung von FRET-Effizienzen und statistische Analyse der Ergebnisse	33
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1 Detektion der TRPC-Interaktion in verschiedenen Stadien der Proteinexpression	35
4.2. Konfokale FRET-Darstellung von TRPC-Oligomeren	38
4.2.1 Konfokale FRET-Darstellung in lebenden Zellen	39
4.2.2 FRET-Mikroskopie	40
4.2.3 Konfokale FRET-gestützte Darstellung des Kompartiments der TRPC6-Kanalassemblierung	41
4.3 FRET-gestützter Nachweis spezifisch geformter TRPC-Komplexe	43
4.4 Kompetitive FRET-Messung zur Erfassung interagierender nichtfluoreszierender TRPC6-Wildtyp-Untereinheiten	44
4.5. Untersuchung der TRPC6-Untereinheiten-Stöchiometrie mittels FRET	46
4.5.1 Hypothese zur Beurteilung der Kanalstöchiometrie des TRPC6	46
4.5.2 Bestimmung des Donor-Akzeptor-Verhältnisses	47
4.5.3 Beurteilung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Donor-Akzeptor-Verhältnis und Rückschlüsse auf die Untereinheiten-Stöchiometrie	47

<b>5 Diskussion</b>	<b>51</b>
5.1 FRET-basierte Darstellung der Proteininteraktion in verschiedenen Expressionsstadien	51
5.1.1 Zeitlich-topographisch aufgelöste FRET-Darstellung	52
5.1.2 Beurteilung der TRPC-Mobilität innerhalb der Plasmamembran	53
5.1.3 Konfokaler FRET-Nachweis	54
5.2 Spezifität und erweiterte Anwendung des FRET als Multimerisierungsnachweis in lebenden Zellen	55
5.2.1 Vorzüge des FRET als Multimerisierungsnachweis	55
5.2.2 Zuverlässigkeit des FRET-Nachweises	57
5.2.3 Schwache Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Effizienz	58
5.2.4 Kompetitive FRET-Messung	59
5.3 FRET-basierte Identifizierung der tetrameren Stöchiometrie des TRPC6	61
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>85</b>
<b>Publikation</b>	<b>86</b>
<b>Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>Erklärung</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

Zahlreiche wichtige physiologische Prozesse wie Muskelkontraktion, Transmitterfreisetzung, Sekretfreisetzung aus Drüsen, Zellproliferation, Gentranskription, Fertilisation und Zelltod werden über Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration maßgeblich moduliert [Clapham, 1995; Berridge et al., 2000]. Entscheidender Aktivierungsreiz ist dabei der Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  auf das bis zu Hundertfache, der auch als  $Ca^{2+}$ -Signal bezeichnet wird. Die Bereitstellung der erforderlichen Calciumionen erfolgt dabei aus zwei Quellen: dem Extrazellulärraum und den intrazellulären Calciumspeichern der Zelle. Extrazelluläres Calcium wird hauptsächlich über Öffnung Calcium-permeabler Kationenkanäle bezogen, die anhand ihrer Aktivierungsmechanismen in zwei Kategorien unterteilt werden können: die bereits sehr gut charakterisierten spannungsgesteuerten Kationenkanäle [Hofmann F. et al, 1999] und die nicht-spannungsgesteuerten Calcium-permeablen Kanäle. Letztere Gruppe umfasst ein breites Spektrum von  $Ca^{2+}$ -selektiven oder unselektiven Kationenkanälen, die nach ihrem Aktivierungsmodus weiter unterschieden werden. Eine besondere Rolle spielen dabei die Mitglieder der *transient receptor potential*-Familie (TRP-Familie), die sowohl in erregbaren wie nicht-erregbaren Zellen als Calcium-permeable Kationenkanäle fungieren und somit wesentlich zum Calcium-vermittelten Signalweg beitragen können. Auf der Grundlage struktureller Gemeinsamkeiten erfolgt die Unterteilung der TRP-Familie in insgesamt 7 Unterfamilien, deren Vertreter sich durch eine große Bandbreite physiologischer Funktionen und zum Teil noch nicht sicher geklärter Aktivierungsmodi unterscheiden. Trotz ihres fast ubiquitären Vorkommens und ihrer Beteiligung an multiplen physiologischen Prozessen wie Blutdruckregulation, Fertilität, Nieren- und Harnblasenfunktion stehen insbesondere die überwiegende Expression von TRP-Kanälen im Nervensystem und ihre Bedeutung für neuronale Entwicklung und Plastizität sowie auf dem Gebiet der Sinnesphysiologie zunehmend im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Trotz umfangreicher Untersuchungen zur TRP-Kanalstruktur blieben wesentliche

Aspekte wie beispielsweise die Stöchiometrie der bekanntlich zu Multimeren assemblierenden Kanaluntereinheiten mehrheitlich unklar. Die exakte Aufklärung der Kanalstruktur unter Berücksichtigung der zeitabhängigen Topologie könnte in Analogie zu bereits eingehender erforschten Ionenkanälen Rückschlüsse auf Struktur-Funktions-Zusammenhänge ermöglichen und zum künftigen Verständnis der Funktionsweise der TRP-Kanäle beitragen. Eine Ausdehnung des Einsatzgebietes bekannter Techniken wie dem bisher zur Abstandsmessung genutzten Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer auf den Bereich der Stöchiometrieanalyse kann zur Beurteilung von Proteinstöchiometrien in lebenden Zellen und zur künftigen Untersuchung dynamischer Prozesse herangezogen werden.

### 1.1 Grundprinzip des Calcium-Signals

Grundprinzip der Calcium-vermittelten Signaltransduktion ist die Veränderung der zytosolischen Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$ . Die im Ruhezustand sehr geringe  $[Ca^{2+}]_i$  (ca. 50-100 nM) kann durch Aktivierung rasch auf das hundertfache ansteigen. Dabei stehen im Allgemeinen zwei Calciumionen-Quellen zur Verfügung: extrazelluläres Calcium und jenes aus intrazellulären Speichern wie dem sarkoplasmatischen bzw. dem endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien. Die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration liegt mit einer Größenordnung von 1 mM zehntausendmal über der intrazellulären, was zu einem ausgeprägten Konzentrationsgradienten über der Plasmamembran führt. Zusammen mit dem negativen inneren Plasmamembranpotential von ca. -60 mV in der ruhenden Zelle resultiert eine ausgeprägte Triebkraft für einen passiven, elektrisch oder durch Agonisten getriggerten  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle. Dieser  $Ca^{2+}$ -Einstrom wird hauptsächlich durch Calcium-permeable Ionenkanäle gesichert. In die Gruppe der nicht-spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanäle gehören die durch extra- oder intrazelluläre Liganden aktivierbaren Ionenkanäle, durch sekundäre Botenstoffe gesteuerte Ionenkanäle und die über Depletion intrazellulärer Calciumspeicher aktivierbaren Ionenkanäle. Zusätzlich wird ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom in einigen Zellen durch  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher vermittelt. Die folgenden Ausführungen stützen sich auf Übersichtsarbeiten von Tsien & Tsien, 1990; Clapham, 1995 und Berridge et al., 2000.

### 1.1.1 Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum

Der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol wird durch Ca<sup>2+</sup>-permeable Kationenkanäle in der Plasmamembran getragen. Die hauptsächlich in erregbaren Zellen exprimierten spannungsabhängigen Calciumkanäle („*voltage-operated channels*“, VOC) ermöglichen nach Aktivierung durch Depolarisation des Plasmamembranpotentials den selektiven Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in das Zytosol [Jones, 1998]. Die quasi ubiquitär exprimierten nicht-spannungsabhängigen calciumpermeablen Kationenkanäle können aufgrund der jeweiligen Aktivierungsmechanismen in drei Gruppen unterteilt werden: Die Liganden-gesteuerten Kanäle („*ligand-operated channels*“, LOC), die über sekundäre Botenstoffe gesteuerten Kanäle („*second messenger-operated channels*“, SMOC) und die über Depletion intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher aktivierbaren Speicher-gesteuerten Kanäle („*store-operated channels*“, SOC). Die Liganden-gesteuerten Kanäle, vereinigen eine Rezeptordomäne sowie eine Kanalpore innerhalb eines Kanal-moleküls und werden durch Bindung eines Agonisten an die Rezeptordomäne aktiviert [Neher & Sakman, 1976; Barnard, 1992]. Als Beispiele für LOC seien der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor, der 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor3 (5-HT3) sowie der nikotinische Acetylcholinrezeptor und die P2X-Rezeptoren genannt. Die Aktivierung der SMOC erfolgt durch Bindung geeigneter sekundärer Botenstoffe wie zyklische Nukleotide, Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) oder Ca<sup>2+</sup>-Ionen an die jeweiligen Kanal-moleküle von zyklische-Nukleotide-gesteuerten Kanälen („*cyclic nucleotide-gated channels*“, CNG) [Kaupp et al., 1989; Yau, 1994; Biel et al., 1999], Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>)-gesteuerten Kanälen [Kuno & Gardner, 1987; Penner et al., 1988; Kiselyov et al., 1997] bzw. Ca<sup>2+</sup>-regulierten Kationenkanälen [von Tscharner et al., 1986]. Die SOC oder CRAC-Kanäle („*calcium-release-activated calcium channel*“, CRAC-channel) werden einzig durch Depletion intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher aktiviert. Die molekulare Basis dieser tetrameren Kanäle bilden die Proteine Stim und Orai. Stim transloziert nach Erkennung einer Depletion des ER an plasmamembranäre Bindungsstellen und Orai bildet die Pore des plasmamembranären Ca<sup>2+</sup>-Kanals [Feske et al., 2006, Penna et al., 2008].

### 1.1.2 Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus internen Speichern

Zu den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern zählen das endoplasmatische Retikulum (ER), das in Myozyten als sarkoplasmatisches Retikulum (SR) bezeichnet wird, sowie die Mitochondrien.



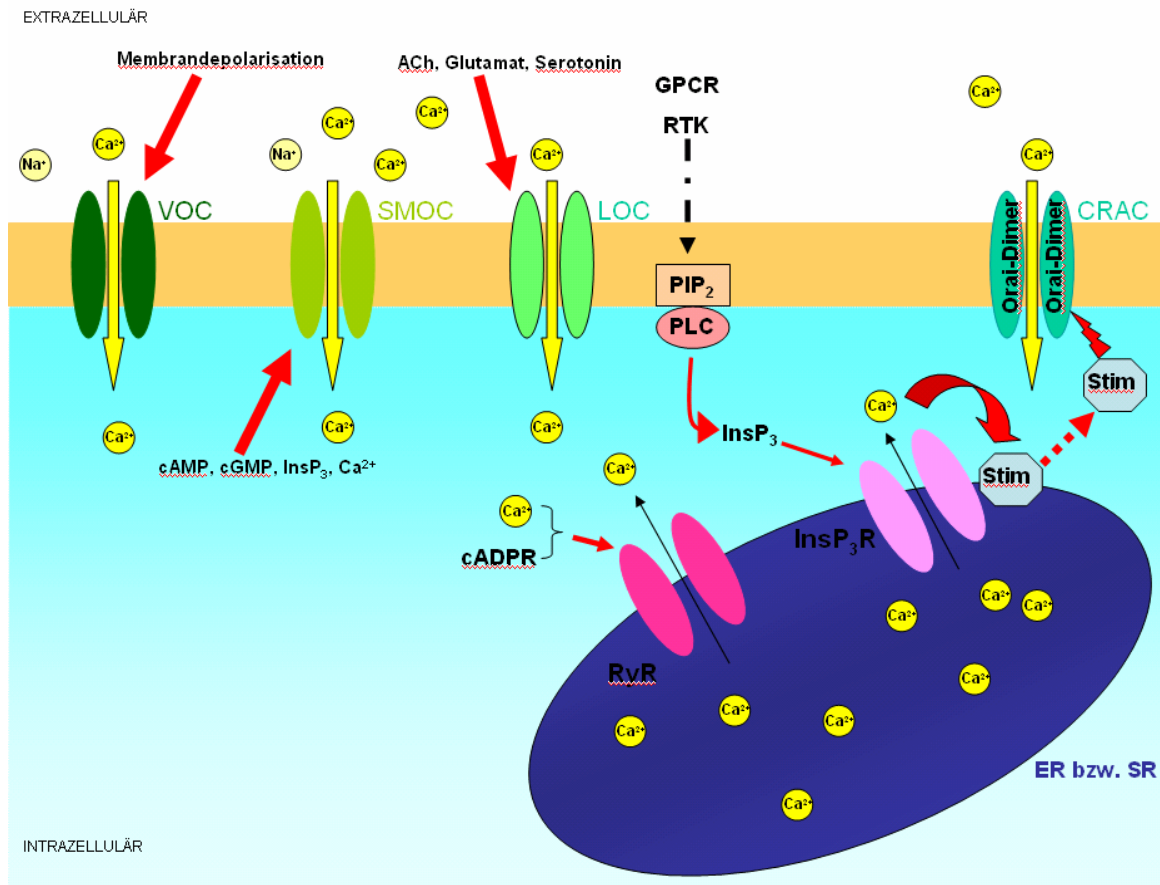
## 1 Einleitung

Die Pufferung der endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Calciumionen erfolgt durch die Speicherproteine Calsequestrin und Calreticulin, die eine durchschnittliche Speicherkapazität von ca. 50 Calciumionen pro Speicherprotein aufweisen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus ER und SR wird durch verschiedene Kanäle gewährleistet, zu denen die Familie der Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) und der Ryanodin-Rezeptoren (RyR) gehören.  $\text{InsP}_3\text{R}$  werden durch Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) aktiviert, welches nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) oder Rezeptor-Tyrosinkinasen durch die Phospholipasen C aus dem Phosphoinositol-4,5-bisphosphat der Plasmamembran abgespalten wird. Ferner kann eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über  $\text{InsP}_3\text{R}$  durch Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotidphosphat (NAADP) und Sphingosin-1-phosphat (S1P). Auch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen beeinflusst die  $\text{InsP}_3\text{R}$ -Aktivität. Die Wirkung kann stimulierend ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$  100-300 nM) oder inhibierend ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über 300 nM) sein und variiert zwischen den unterschiedlichen  $\text{InsP}_3\text{R}$ -Isoformen.

Die Aktivierung der RyR erfolgt im Allgemeinen über eine hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, weshalb die RyR als Mittler der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung („ $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release“, CICR) gelten. Cyclische ADP-Ribose (cADPR) hat dabei einen modulierenden Einfluss auf die RyR-Sensitivität gegenüber cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$ .

Der Vollständigkeit halber sei noch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus den Mitochondrien erwähnt, der keine Rolle für die Entstehung des Calcium-Signals spielt, und über  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher [Baysal et al., 1994],  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ -Austauscher [Gunter et al., 1994] sowie eine als „*permeability transition pore*“ (PTP) bezeichnete regulierte Pore [Ichas et al., 1997] erfolgt.

## 1 Einleitung



**Abb 1.1 Synopsis der Mechanismen der  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung** Plasmamembranäre Kationenkanäle ermöglichen nach entsprechender Stimulation den  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol. In diese Gruppe gehören spannungsgesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle („*voltage-operated  $Ca^{2+}$ -channels*“, VOC), Liganden-gesteuerte Kanäle („*ligand-operated channels*“, LOC), über sekundäre Botenstoffe gesteuerte Kanäle („*second messenger-operated channels*“, SMOC) und durch  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aktivierbare  $Ca^{2+}$ -Kanäle („ *$Ca^{2+}$ -release-activated  $Ca^{2+}$ -channels*“, CRAC). Bei  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER transloziert das Protein Stim an die Plasmamembran und interagiert mit Orai-Dimeren. Die dadurch induzierte Zusammenlagerung von je zwei Orai-Dimeren führt zur Ausbildung des tetrameren CRAC. Die roten Pfeile stellen aktivierende Reize dar. Außerdem wird  $Ca^{2+}$  aus dem endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum (ER bzw. SR) über Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren ( $InsP_3R$ ) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR) in das Cytosol freigesetzt. Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $InsP_3$ ) wird nach Aktivierung von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK) Phospholipase C (PLC)-vermittelt aus dem Membranlipid Phosphoinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) abgespalten. Zyklische ADP-Ribose (cADPR) und zyklisches Adenosin-/Guanosinmonophosphat (cAMP/cGMP) sind neben  $Ca^{2+}$  weitere Reize für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom ins Zytosol aus internen Speichern.

## 1.2 Die TRP-Kanalfamilie

Anders als in den Photorezeptoren von Wirbeltieraugen erfolgt die Phototransduktion im Auge der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* über eine Rhodopsin-G-Protein-gekoppelte Phospholipase C (PLC). Während der Lichteinfall ins Wirbeltierauge die Schließung von cGMP-aktivierten Na<sup>+</sup>-permeablen Kationenkanälen mit konsekutiver Hyperpolarisation des Plasmamembranpotentials der Photorezeptorzelle induziert, erzeugt die PLC-vermittelte Aktivierung von plasmamembranären Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Kanälen im Facettenauge von Insekten einen sogenannten Licht-induzierten Strom („*light-induced current*“, LIC), der zur Depolarisation führt [Hardie & Minke, 1992; Ranganathan et al., 1995]. Detaillierte Untersuchungen zur Entstehung des LIC führten zur Identifizierung von *Drosophila-trp*-Mutanten, die anstelle des anhaltenden LIC der wildtypischen Fliegen bei Lichteinfall lediglich ein transientes Rezeptorpotential aufwies. Weitere Analysen ergaben, dass den Mutanten ein einwärtsgerichteter Ca<sup>2+</sup>-permeabler Kanal fehlte, der „transient receptor potential“ (TRP) genannt wurde und eine phylogenetische Verwandtschaft mit der Familie hexahelikaler Kationenkanäle aufweist [Montell et al., 1985; Montell & Rubin, 1989; Hardie & Minke, 1992]. Ferner konnte die Beteiligung zweier weiterer homologer Kanäle, TRP-like (TRPL) und TRP $\gamma$  an diesem Prozess nachgewiesen werden. Aufgrund der Analogien zwischen rezeptorvermitteltem Kationeneinstrom in Säugetierzellen und dem PLC-abhängigen Kationeneinstrom im Rahmen der Phototransduktion bei der *Drosophila* begann die Suche nach Säugerhomologen der TRP. Bislang wurden insgesamt 56 verwandte Kationenkanäle - darunter 28 Säugerisoformen - über Sequenzhomologie oder durch Expressionsklonierung identifiziert. Phylogenetische Analysen und die Existenz konservierter Domänen führten zur Untergliederung in 7 Subfamilien [Clapham, 2003; Vriens et al., 2004; Huang, 2004; Montell, 2005]: TRPC („*classical*“ oder „*canonical*“ TRP-Kanäle), die mit den *Drosophila* TRP-Kanälen am nächsten verwandt sind, TRPV (Vanilloidrezeptor-verwandt), TRPM (Melastatin-ähnlich), TRPP (PKD; „*polycystic kidney disease*“), TRPML (MLN; Mukolipidin), TRPN (NOMP-C; „*no mechanoreceptor potential-C*“), TRPA (ANKTM1; „*ankyrin-like with transmembrane domain 1*“).

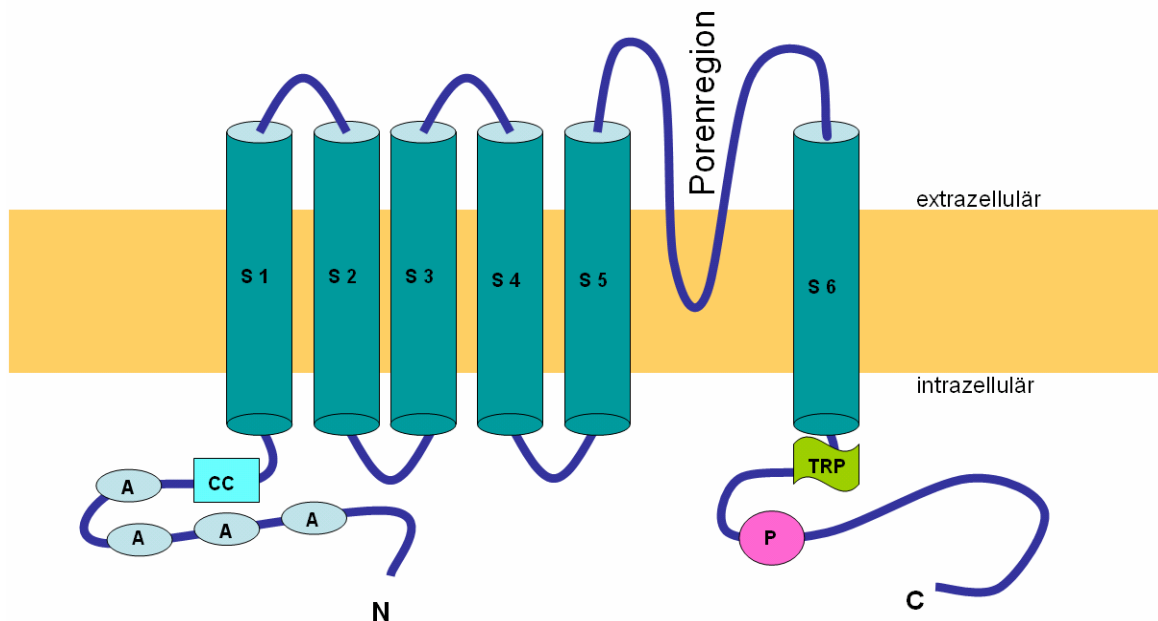
Da in dieser Arbeit ausschließlich Säugerisoformen der TRPC-Subfamilie verwendet wurden, fokussieren sich die folgenden Ausführungen auf diese Subfamilie.

## 1.2.1 Strukturelle Eigenschaften

Säugetierhomologe der TRPC stellen eine Familie aus sieben Genen (*trpc 1 - trpc 7*) dar. Beim Menschen können durch alternatives Spleißen mindestens 12 verschiedene, vollständige TRPC-Untereinheiten gebildet werden [Harteneck et al., 2000; Hofmann T et al., 2000; Plant & Schaefer, 2003]. Die Transmembrantopologie der TRPC weist zytosolische Amino- und Carboxy-Termini, sechs hydrophobe Transmembransegmente und ein Porenmotiv vor dem letzten Transmembransegment auf [Vannier et al., 1998; Clapham et al., 2003; Abb.1.2]. Damit weisen TRP-Kanäle strukturelle Ähnlichkeiten mit spannungsgesteuerten Kaliumkanälen, durch zyklische Nukleotide-regulierten Kanälen („*cyclic nucleotide gated channels*“, CNG) und „*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels*“ (HCN) auf. Den TRP-Kanälen fehlen jedoch die positiv geladenen Aminosäurereste im Bereich des 4. Transmembransegments, die in den spannungsgesteuerten Ionenkanälen als Spannungssensor fungieren. Zu den Besonderheiten der Kanaluntereinheiten der TRPC-Subfamilie zählen N-terminale *ankyrin-repeats*. Dabei handelt um mehrere Ankyrin-homologe Wiederholungen noch unklarer Funktion. Einige *ankyrin-repeats* können durch Bildung von *coiled-coil*-Strukturen, die Interaktion zwischen TRP-Kanaluntereinheiten und die Ausbildung von Kanalkomplexen vermitteln. Wie auch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle und CNG-Kanäle bilden funktionelle TRP-Kanalkomplexe eine homo- bzw. heteromere Quartärstruktur aus vier Kanaluntereinheiten aus, was bereits für Vertreter der TRPC- und der TRPV-Familie bewiesen werden konnte [Kedei et al., 2001; Hofmann et al., 2002; Hoenderop et al., 2003]. Dabei sind die für die Kanalassemblierung erforderlichen Untereinheiten-Domänen bislang noch nicht genau bekannt. TRPC-Kanäle weisen untereinander eine über 30%ige Sequenzidentität auf. Zu den hochkonservierten Bereichen zählen eine *coiled-coil*-Region im cytosolischen N-Terminus, ein unmittelbar hinter dem 6. Transmembransegment gelegenes Motiv aus sechs Aminosäuren, das als TRP-Box bezeichnet wird sowie ein Prolin-reicher Abschnitt im cytosolischen C-Terminus.

Die Relevanz der *coiled-coil*-Domänen für die Untereinheiten-Interaktion konnte für den murinen TRP1 $\beta$  [Engelke et al., 2002], TRPV [Hellwig et al., 2005], TRPC4- und TRPC6-Chimären [Lepage et al., 2006] sowie zwischen TRPC4-Kanaluntereinheiten und dem Spektrin-Zytoskelett belegt werden [Odell et al., 2007].

## TRPC



**Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Membrantopologie von TRPC-Kanälen**

Alle TRPC-Kanäle weisen 6 Transmembrandomänen (S1-S6) mit einer putativen Porenregion zwischen dem 5. und 6. Transmembransegment auf. N-terminal finden sich eine *coiled-coil*-Region (CC) und drei bis vier Ankyrin-homologe Wiederholungen (A). Die TRP-Box (TRP) liegt wie auch die Prolin-reiche Region (P) liegen C-terminal.

### 1.2.2 Funktion, Aktivierungsmodi und Multimerisierung

Die folgenden Ausführungen sollen einen kurzen Überblick über die derzeit vorliegenden Daten zu funktionellen und biophysikalischen Eigenschaften von Säugerhomologen der TRPC-Familie gewähren. Die Angaben basieren auf Übersichtsarbeiten von Vennekens et al. (2002), Clapham (2003), Vriens et al. (2004), Montell (2005) und Venkatachalam & Montell (2007). Als nicht-selektive,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle vermitteln TRPC-Kanäle nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum ins Zytoplasma. Die zu Grunde liegenden direkten Aktivierungsmechanismen sind derzeit allerdings noch strittig, bzw. werden für einige TRPC-Kanäle unterschiedliche Aktivierungsmechanismen beschrieben. In diesem Zusammenhang spielen möglicherweise Spleißvarianten, die sich meist durch Deletionen im N- oder C-Terminus unterscheiden, für alle TRPC-Isoformen mit Ausnahme von TRPC5 eine Rolle. Widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich biophysikalischer und regulatorischer

## *1 Einleitung*

Eigenschaften scheinen jedoch auch mit der Wahl des Expressionssystems zusammenzuhängen. So wurde für TRPC3-Kanäle bei Expression in HEK-293-Zellen eine Aktivierung durch Diacylglycerol (DAG) beschrieben [Hofmann T et al, 1999], während TRPC3-Kanäle in COS-M6-Zellen als SOC fungierten [Zhu et al., 1996] und die Kanalaktivierung in CHO-Zellen unabhängig von intrazellulärer Speicher-Depletion über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Mechanismus erfolgte [Zitt et al., 1997]. Eine mögliche Erklärung könnten die differierenden endogenen Proteinausstattungen der unterschiedlichen Zelllinien mit den daraus resultierenden Interaktionsmöglichkeiten für die TRPC-Kanäle liefern. Unterschiede hinsichtlich biophysikalischer Eigenschaften von homo- und heteromultimeren Kanalkomplexen wurden bereits am Beispiel von TRPC5-Homomultimeren und TRPC5/TRPC1-Heteromultimeren belegt [Strübing et al, 2001]. Hinsichtlich der Übertragbarkeit biophysikalischer und regulatorischer Beobachtungen *in vitro* auf physiologische Prozesse gilt zu berücksichtigen, dass TRPC-Kanäle nativ bisher nur als Heteromultimere beschrieben wurden [Strübing et al, 2001; Goel et al, 2002], während sich *in-vitro*-Ergebnisse meist auf homomultimere TRPC-Kanäle bezogen.

Einen Überblick über bereits belegte oder derzeit postulierte Aktivierungsmodi und physiologische Bedeutungen von TRPC-Kanälen bietet Tabelle 1.

## 1 Einleitung

Name	Aktivierungsmodus	prädominante Expression	Funktion
TRPC1	SOC?, SMOC im Heteromer mit TRPC4/ TRPC5	Herz, Gehirn, Hoden, Ovar	erforderlich für das erregende post- synaptische Potenzial in Purkinje-Zellen
TRPC2	DAG, SOC?	vomeronasales Organ, Hoden, Ovarien, Gehirn, Spermien	(Pseudogen beim Menschen), männliches Aggres- sionsverhalten Pheromon-Antwort
TRPC3	DAG, SOC? Exozytose	Gehirn, Herz, glatte Muskulatur	-
TRPC4	SMOC	Gehirn, Endothelzellen, Nebennierenrinde, glatte Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes	Vasorelaxation,  Neurotransmitter- ausschüttung
TRPC5	SMOC, Exozytose	Gehirn	Modulation des Neuritenwachstums
TRPC6	DAG	Lunge, Gehirn	-
TRPC7	DAG, SOC	Auge, Herz, Lunge	-

**Tabelle 1: Aktivierungsmodi, prädominante Expression und Funktion von TRPC-Kanälen**

**DAG:** Diacylglycerol; **SMOC:** *second messenger-operated channel* (durch sekundäre Botenstoffe aktivierter Kanal); **SOC:** speichertvermittelt reguliert; **Fragezeichen:** widersprüchliche Beobachtungen

## 1 Einleitung

Zu den Kanälen mit derzeit ungeklärtem Aktivierungsmodus gehört TRPC1. Die von Zitt beschriebene speicherabhängige Aktivierung [Zitt et al., 1996] konnte bisher von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden [Sinkins et al., 1998; Brereton et al., 2000]. Anderen Beobachtungen zufolge lag TRPC1 im heterologen Expressionssystem retiniert vor. Intrazellulär zurückgehaltene TRPC1-YFP-Fusionsproteine wiesen in der konfokal-fluoreszenzmikroskopischen Darstellung erst nach Koexpression mit überexprimierten TRPC4-Wildtyp-Untereinheiten eine Verteilung in der Plasmamembran auf. Zusätzlich wurde die heteromere Zusammenlagerung von TRPC1- und TRPC4- oder TRPC5-Untereinheiten mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer belegt. [Hofmann T et al., 2002]. Der Nachweis von TRPC1/TRPC5-Heteromeren in Rattengehirnen deutet auf eine funktionelle Bedeutung dieser Kanalkomplexe [Strübing et al., 2001; Goel et al., 2002]. Ferner wurde die Beteiligung von TRPC1 am Sekretionsprozess in pancreatischen  $\beta$ -Zellen [Sakura & Ashcroft, 1997] und an der Modulation der synaptischen Aktivität von Purkinje-Zellen des Cerebellums sowie dopaminergen Neuronen nach Aktivierung von Glutamatrezeptoren nachgewiesen [Bengtson et al., 2004; Tozzi et al., 2003].

Für heterolog exprimierte bovine TRPC4 und für TRPC5 wurden sowohl eine Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher-Depletion [Warnat et al., 1999; Philipp et al., 1996; Philipp et al., 2000, Philipp et al., 1998] als auch durch Stimulation  $G_q$ -koppelter Rezeptoren [Okada et al., 1998; Obukhov & Nowycky, 2002; Schaefer et al., 2000; Schaefer et al., 2002] beschrieben. TRPC4-Knock-out-Mäuse wiesen eine Veränderung der Aktivierung speichervermittelt regulierter Kanalkomplexe und der Vasorelaxation auf [Freichel et al., 2001].

Da TRPC1, TRPC4 und TRPC5 einerseits und TRPC3, TRPC6 und TRPC7 andererseits zur Heteromultimerisierung neigen, zwischen diesen beiden Gruppen jedoch keine Heteromultimerisierung stattfindet, lassen sich diese Kanäle in zwei Unterfamilien einteilen [Hofmann T et al., 2001; Goel et al., 2002]. Diese Untergliederung wird zusätzlich durch strukturelle Ähnlichkeiten innerhalb dieser Unterfamilien gerechtfertigt. Im Gegensatz dazu scheint TRPC2 keine heteromultimeren Komplexe mit anderen Mitgliedern der TRPC-Familie auszubilden. Diese Beobachtung wurde durch Koimmunpräzipitationsexperimente in Sf9-Zellen und in Synaptosomen von Rattenhirnen bestätigt [Goel et al., 2002].

Während TRPC2 beim Menschen und beim Rind als Pseudogen vorliegt [Wes et al., 1995; Wissenbach et al., 1998], konnte bei Nagern die Expression im Vomeronasalorgan (VNO) mit Bedeutung bei der Pheromonperzeption [Liman et al., 1999; Leypold et al., 2002] und Verlust geschlechtsspezifischen Paarungsverhaltens bei TRPC2-defizienten männlichen Mäusen



## 1 Einleitung

nachgewiesen werden [Stowers et al., 2002; Keverne, 2002]. Für TRPC2 wurde außerdem eine Rolle bei der Akrosomenreaktion in Spermien vermutet, wenngleich die Fertilität TRPC2-defizienter Tiere unverändert blieb [Stowers et al., 2002]. Die TRPC2-Aktivierung wurde sowohl durch Rezeptorstimulation als auch durch Speicherentleerung belegt [Chu et al., 2002; Vannier et al., 1999] und erfolgt in vomeronasalen Neuronen durch Diacylglycerol (DAG) [Lucas et al., 2003]. In diversen heterologen Expressionssystemen konnte hingegen nur eine intrazelluläre Retention ohne signifikante Funktion von TRPC2 nachgewiesen werden [Hofmann et al., 2000].

TRPC3, TRPC6 und TRPC7 weisen als Mitglieder derselben TRPC-Unterfamilie eine enge strukturelle Verwandtschaft sowie funktionelle Übereinstimmungen auf und werden u.a. in glatter Muskulatur, Gehirn, Herz und Lunge exprimiert. Dabei scheint TRPC6 in glatten Gefäßmuskelzellen den nicht-selektiven Kationeneinstrom nach  $\alpha$ 1-adrenerger Rezeptorstimulation [Inoue et al., 2001] und in glatten Muskelzellen von Ratten den rezeptorvermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu gewährleisten [Jung et al., 2002]. Mutationen des u.a. in renalen Podozyten exprimierten *trpc6*-Gens verursachen hereditäre Formen der fokal-segmentalen Glomerulosklerose mit Proteinurie und terminaler Niereninsuffizienz [Winn et al., 2005; Reiser et al., 2005]. Ferner ist der TRPC6-Kanal an der Modulation der pulmonalen Vasokonstriktion und des Euler-Liljestrand-Mechanismus sowie der allergischen Atemwegsreaktion beteiligt [Weissmann et al., 2006; Sel et al., 2008]. Für TRPC3 wurden ein speicherabhängiger Aktivierungsmechanismus [Zhu et al., 1996; Preuss et al., 1997], eine speicherunabhängige Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$  [Zitt et al., 1997] sowie eine Aktivierung durch DAG [Hofmann T, 1999] beschrieben. Des Weiteren wird eine Aktivierung durch Depletion intrazellulärer Calciumspeicher diskutiert. Auch für TRPC6 und TRPC7 konnte eine Proteinkinase-C-unabhängige Aktivierung durch Stimulation der PLC und durch DAG nachgewiesen werden [Hofmann T et al., 1999; Okada et al., 1999; McKay et al., 2000]. Außerdem gibt es Hinweise auf eine Aktivierung dieser Kanäle durch Interaktion mit dem  $\text{InsP}_3\text{R}$ . Zwar fällt auf, dass sich die Bindungsstellen für den Calcium-Calmodulin-Komplex ( $\text{Ca}^{2+}$  soll einen inhibitorischen Einfluss auf die Kanalaktivität ausüben) und den  $\text{InsP}_3\text{R}$  beim TRPC3 überschneiden [Boulay et al., 1999; Kiselyov et al., 1998; Kiselyov et al., 1999; Zhang et al., 2001; Vazquez et al., 2001], doch bleibt eine funktionelle Relevanz weiterhin umstritten. Gegen eine  $\text{InsP}_3\text{R}$ -abhängige Aktivierung spricht die erhaltene TRPC3-Aktivierbarkeit in  $\text{InsP}_3\text{R}$ -defizienten Zellen [Venkatachalam et al., 2001].

## 1.3 Das grün fluoreszierende Protein

Im Rahmen der Untersuchung von Quetschpräparaten der Qualle *Aequorea victoria* entdeckten O. Shimomura und Mitarbeiter 1962 ein neuartiges, unter UV-Bestrahlung leuchtend grün fluoreszierendes Protein, das GFP („*green fluorescent protein*“), dessen Emissionsspektrum noch im selben Jahr veröffentlicht wurde [Johnson et al., 1962]. Für die Entdeckung des GFP wurde Shimomura 46 Jahre später mit dem Nobel-Preis für Chemie ausgezeichnet. 1974 folgte die Publikation des Absorptionsspektrums und der Fluoreszenzquantenausbeute. War seine Assoziation mit *Aequorin*, dem kalziumabhängigen, blau-chemolumineszenten Protein der *Aequorea* bereits seit Entdeckung des GFP bekannt, wurde der strahlungslose Energietransfer von *Aequorin* auf GFP erst 1974 bewiesen [Morise et al., 1974]. In der Folge ermöglichte die hochauflösende Darstellung der kristallinen GFP-Struktur das Verständnis des Zusammenhangs zwischen Proteinstruktur und spektroskopischen Eigenschaften und war Grundstein für die Synthese neuer, spektroskopisch unterschiedlicher GFP-Varianten [Tsien, 1998]. Der entscheidende Durchbruch und die konsequente Etablierung des GFP als Marker von Genexpression und Proteindarstellung in lebenden Zellen und Organismen gelangen mit der Klonierung des *gfp*-Gens [Prasher et al., 1992] und seiner heterologen Expression [Chalfie et al., 1994, Inoué & Tsuji, 1994]. Seither führten Mutagenese und Herstellung von GFP-Chimären zur Erweiterung des Anwendungsspektrums des GFP. Als Teil physiologischer Indikatoren und Biosensoren, in seiner klassischen Funktion als Marker von Genexpression und Proteindarstellung sowie als Mittel zum Interaktionsnachweis zwischen Proteinen via FRET sind das GFP und seine Varianten zu etablierten und weit verbreiteten Werkzeugen zur Untersuchung lebender Organismen geworden.

Die Angaben in diesem Abschnitt basieren auf folgenden Übersichtsartikeln: Cubitt et al., 1995; Tsien, 1998; Matz et al., 2002; Chudakov & Lukyanov, 2003; Miyawaki et al., 2003; Griesbeck, 2004 und Zaccolo, 2004.

### 1.3.1 Struktur des GFP

1974 gelang erstmalig die Kristallisierung des GFP [Morise et al., 1974]. GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat ein relatives Molekulargewicht von 26,9 kDa [Pendergast & Mann,

## 1 Einleitung

1978]. Wurden 1988 erstmalig Beugungsbilder des GFP publiziert [Perozzo et al., 1988] so dauerte es noch bis 1996, bis die Arbeitsgruppen um Ormö und Yang unabhängig voneinander die Proteinstruktur des GFP aufklärten.

Das GFP bildet eine so genannte  $\beta$ -Tonne, einen Zylinder aus 11 antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern in dessen Lumen sich parallel zur Längsachse eine  $\alpha$ -Helix windet [Ormö et al., 1996]. Der Zylinder hat einen Radius von ca. 3 nm und eine Höhe von ca. 4 nm [Yang et al., 1996]. Das Chromophor im Zentrum der Helix ist ein p-Hydroxybenzyliden-Imidazolinon und entsteht durch Zyklisierung und Oxidation der Ser-Tyr-Gly-Sequenz in Position 65-67 des Proteins [Shimomura, 1979]. Sichtbare Absorption und Emission wird der gängigen Theorie zufolge erst durch die autokatalytische Oxidation der Hydroxybenzyl-Seitenkette des Tyrosins in Position 66 durch atmosphärischen Sauerstoff erzielt [Heim et al., 1994]. Bei atmosphärischem Sauerstoff-Partialdruck und einer Temperatur von 22 °C erfordert diese Reaktion unabhängig von der Substratkonzentration und höchst wahrscheinlich unabhängig von Enzymen oder Kofaktoren beim wildtypischen GFP ca. 4 Stunden [Heim et al., 1994]. Die hohe Stabilität des GFP ist a.e. auf die geschützte Lage des Fluorophors im Zentrum der soliden  $\beta$ -Tonne zurückzuführen [Yang et al., 1996]. Das reife GFP ist säurestabil (bis pH 1) und temperaturstabil (bis 65°C) [Ward et al., 1982]. Dank seiner Formaldehyd-Stabilität eignet sich GFP als Fluorochrom zur Untersuchung fixierter Proben [Chalfie et al., 1994]. Seine hohe Stabilität schränkt allerdings den Einsatz des GFP zur Untersuchung bidirektionaler Änderungen der Genexpression ein. Während die Proteinsynthese mit Hilfe neuer GFP-Varianten ohne wesentliche Zeitverzögerung verfolgt werden kann, beweist ein intaktes GFP nicht unbedingt die Integrität des markierten Proteins [Cubitt et al. 1995]. Wildtypisches GFP neigt zur Multimerisierung mit konsekutiver Verschiebung des Anregungsspektrums (siehe Abschnitt 1.3.2) und bietet nur eine niedrige Quantenausbeute [Ward et al., 1982]. Durch Mutagenese konnten entscheidende Veränderungen der Proteineigenschaften im Vergleich zum wildtypischen GFP erzielt werden. Dazu gehören die Erweiterung des Fluorochromspektrums, die Steigerung der Fluoreszenzintensität, eine beschleunigte Akquisition der Fluoreszenz und die Eliminierung der Multimerisierungstendenz [Zhang et al., 2002].

### 1.3.2 Anregungs- und Fluoreszenzeigenschaften des GFP

Wildtypisches GFP weist ein Anregungsmaximum bei 395 nm mit einem kleineren Scheitelpunkt bei 475 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 508 nm und eine Fluoreszenzlebensdauer von 3,25 ns [Perozzo et al., 1988] auf. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zum Produkt aus Quantenausbeute (0,72- 0,85) [Morise et al., 1974] und Extinktionskoeffizient, liegt unter der des Fluoreszeins und ist somit eher als mäßig einzustufen [Ward et al., 1982]. Ferner ist sie abhängig von der Temperatur zum Zeitpunkt der Proteinreifung (die Fluoreszenzintensität bei Expression bei 37°C ist um ein vielfaches niedriger als bei 15°C), nach abgeschlossener Proteinreifung jedoch temperaturunabhängig [Lim et al., 1995]. Speziell unter UVA-Bestrahlung neigt wildtypisches GFP zur Photoisomerisation bzw. zur Dimerisierung mit spektraler Verschiebung des Absorptionsspektrums im Sinne einer partiellen Suppression des Anregungspeaks bei 475 nm [Cubitt et al., 1995]. Dieser Effekt wird durch hohe Proteinkonzentrationen begünstigt. Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des GFP ist aufgrund der erforderlichen Oxidation des Fluorophors nur zeitverzögert möglich, ist vom umgebenden Sauerstoff-Partialdruck und der Umgebungstemperatur abhängig und beträgt bei wildtypischem GFP ca. 4 Stunden [Heim et al., 1994]. Durch chemische Mutagenese konnte das GFP in seinen Eigenschaften deutlich optimiert werden. So existiert inzwischen eine umfangreiche Farbpalette an GFP-Varianten, deren Fluoreszenz von blau bis gelb reicht [Tsien, 1998; Patterson et al., 2001; Zhang et al., 2002]. Darunter befinden sich auch die gentechnisch verbesserten Varianten EBFP, ECFP, EGFP und EYFP („enhanced blue/cyan/green/yellow fluorescent protein“), die wildtypischem GFP hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität, ihrer zeitnahen Darstellbarkeit und ihrer Aggregationseigenschaften deutlich überlegen sind [Miyawaki et al., 1997; Yang et al., 1998]. So konnten durchschnittlich eine Versechsfachung der Fluoreszenzintensität, eine viermal schnellere Oxidation mit entsprechend beschleunigter Akquisition der Fluoreszenz und eine Aufhebung der Multimerisierungstendenz erzielt werden.

### 1.3.3 Anwendungsgebiete des GFP und seiner Varianten

Die Einsatzmöglichkeiten des GFP umfassen eine umfangreiche Bandbreite, die von der klassischen Anwendung als Marker für Genexpression und Proteindarstellung über ein Mittel zum Interaktionsnachweis zwischen Proteinen via FRET bis zum Einsatz als Teil

physiologischer Indikatoren und Biosensoren reicht. Im Folgenden soll lediglich auf die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Anwendungen eingegangen werden.

### **GFP als Fusionsmarker**

GFP lässt sich als Markerprotein mit einem Zielprotein fusionieren, ohne dabei die GFP-Fluoreszenz zu beeinträchtigen. Sowohl N-terminale wie auch C-terminale Fusionen mit membranständigen und zytosolischen Proteinen wurden bisher erfolgreich durchgeführt. Dies und der Einsatz optimierter GFP-Varianten gestatten die zeitnahe Visualisierung der Zielstrukturen, womit sich GFP hervorragend als Markerprotein zur Darstellung von Genexpression und Proteinlokalisierung in lebenden Zellen oder Organismen [Chalfie et al., 1994; Wang & Hazelrigg, 1994] eignet. Auch subzelluläre Strukturen lassen sich durch geeignete Fusionen mit GFP-Varianten darstellen [De Giorgi et al., 1996; Kalish et al., 1996; Shulga et al., 1996; Cole et al., 1996; Roderick et al., 1997; Wiemer et al., 1997; Llopis et al., 1998]. Während die hohe Stabilität des GFP und seine Varianten zu guten Langzeitmarkern macht, schränkt sie die Darstellbarkeit des Proteinabbaus ein (siehe Abschnitt 1.3.1). Die Verwendung unterschiedlicher Farbvarianten des GFP ermöglicht sowohl die simultane Darstellung unterschiedlicher Proteine [Lippincott-Schwartz et al., 2000] als auch die Markierung unterschiedlicher Zelltypen zur Beobachtung dynamischer Prozesse wie Zellmigrationen in Echtzeit und ohne Notwendigkeit der Zellfixierung oder -zerstörung.

### **Darstellung von Protein-Protein Interaktionen**

Der Interaktionsnachweis zwischen Proteinen mittels GFP und seiner Varianten basiert auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), dem strahlungslosen Energietransfer zwischen zwei eng benachbarten Fluorochromen [Förster et al., 1948; Stryer et al., 1978, siehe auch Abschnitt 1.4]. Ein ähnlicher Vorgang ist in der Natur bei der *Aequora victoria* als strahlungsloser Energietransfer vom blau-chemolumineszenten Aequorin auf das wildtypische GFP zu beobachten und wird als Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) bezeichnet [Morise et al., 1974]. Grundvoraussetzung sind neben einem Abstand von weniger als 10-12 nm zwischen den Fluorochromen die Überlappung des Emissionsspektrums des einen Fluorochroms (Donor) mit dem Absorptionsspektrum des anderen Fluorochroms (Akzeptor) und die relative räumliche Orientierung von Donor- und Akzeptor-Dipol (wobei sich die Polarisations Ebenen nicht im 90°-Winkel kreuzen dürfen). Zur Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen werden geeignete GFP-Varianten mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert. Hinsichtlich des für den FRET erforderlichen Mindestabstandes von 10-

12 nm zwischen den Interaktionspartnern ist zu berücksichtigen, dass das GFP bzw. seine Varianten selbst bereits Radien von ca. 5 nm aufweisen. Um das Risiko unspezifischer Interaktionen zwischen den Fluorochromen zu minimieren, müssen dementsprechend die Größenverhältnisse zwischen Fluorochrom und Zielprotein in die Wahl des geeigneten Fluoreszenzproteins einbezogen werden.

### 1.4 Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Seit Beschreibung der quantenmechanischen Grundzüge durch T. Förster 1948 hat sich der FRET als vielseitige Methode zur intra- und intermolekularen Abstandsbestimmung etabliert. Dabei zeichnet sich der FRET durch eine Reihe von Vorteilen aus, die wesentlich zur Diversifizierung seiner Einsatzmöglichkeiten beigetragen haben. So wird der FRET-Nachweis u.a. zur Darstellung von Konformationsänderungen in spezifisch konstruierten Sensorproteinen wie  $\text{Ca}^{2+}$ - und pH-Sensoren [Miyawaki et al., 1999; Tsien, 1998] genutzt. Die dadurch mögliche zeitnahe Darstellung intrazellulärer Prozesse in lebenden Zellen wie beispielsweise Veränderungen von Ionenkonzentrationen gestattet die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden.

Zu den Vorteilen des FRET als Methode des Abstandsnachweises gehören:

- Die hohe räumliche Auflösung: Mittels FRET können Abstände im Bereich von 1-10 nm dargestellt werden. Die optische Auflösung von Fluoreszenzmikroskopen, die typischer Weise über 250 nm liegt, lässt sich so unter Verwendung der FRET-Technik erhöhen [Kenworthy, 2001].
- Die hohe zeitliche Auflösung: In Abhängigkeit von der gewählten Methode des FRET-Nachweises und den damit verbundenen technischen Gegebenheiten ermöglicht der FRET dynamische Darstellungen von inter- und intramolekularen Abstandsveränderungen und somit von Konformationsänderungen binnen Millisekunden [Stryer, 1978].
- Die Anwendbarkeit in komplexen Systemen: die geringe Zytotoxizität der Fluorochrome, die relativ zellschonenden Messungen und die optimalerweise fehlende Beeinträchtigung der physiologischen Funktionen der markierten Proteine ermöglichen die Darstellung intrazellulärer Prozesse in lebenden Zellen.

## Physikalische Grundlagen des FRET

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) kann zum Nachweis der unmittelbaren Nähe zwischen Fluorochromen bzw. Fluorochrom-markierten Strukturen genutzt werden. Ein positiver FRET-Nachweis beweist einen Abstand von weniger als 12 nm zwischen geeigneten Fluorochromen.

Die theoretische Grundlage des FRET beruht auf dem strahlungsfreien Energietransfer von einem angeregten Donor-Fluorophor auf ein benachbartes Akzeptor-Fluorophor. Voraussetzung für den FRET ist die Resonanz von Donor- und Akzeptor-Energie, d.h. dass sich das Fluoreszenz-Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Die Effizienz des Energietransfers  $E$  ist nach T. Förster abhängig vom Abstand  $r$  zwischen den Zentren von Donor- und Akzeptor-Fluorochrom und definiert sich über die Formel (1)

$$E = 1 / [1 + (r/R_0)^6] \quad (1)$$

Dabei bezeichnet  $R_0$  den Förster-Radius.  $R_0$  beträgt weniger als 8 nm und entspricht jenem Abstand zwischen einem gegebenen Donor-Akzeptor-Paar, bei dem die FRET-Effizienz 50% beträgt. Daraus folgt, dass bei einem Donor-Akzeptor-Abstand  $> 2R_0$  kein FRET stattfindet, womit der FRET-Nachweis zum zuverlässigen Gradmesser für die Nähe zweier Moleküle wird.  $R_0$  ist unter anderem anhängig vom spektralen Überlappungsintegral von Donor- und Akzeptor-Fluorochrom, vom Absorptionskoeffizienten des Donors, der Quantenausbeute der Donor-Fluoreszenz in Abwesenheit des Akzeptors und der relativen räumlichen Orientierung von Donor- und Akzeptor-Dipol.

Es gilt zu berücksichtigen, dass der absolute Wert der FRET-Effizienz in mikroskopischen FRET-Experimenten von einer Reihe von Faktoren abhängt und nicht unbedingt direkt den Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor widerspiegelt. Zu den Einflussgrößen gehören das Größenverhältnis zwischen Fluorochrom und dem markierten Protein sowie die Stöchiometrie der Donor- und Akzeptor-markierten Proteine [Kenworthy, 2001]. Prinzipiell beeinflusst auch die relative Orientierung der Fluorophore (im Sinne ihrer Dipol-Ausrichtung) die FRET-Effizienz. Dieser Faktor kann jedoch aufgrund der Mittelung der Werte unter Annahme einer zufälligen Verteilung der Fluorophore vernachlässigt werden.

## 2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels fluorometrischer Untersuchungen Informationen in Bezug auf den Ort der Kanalassemblierung des TRPC6, seine Lebensdauer und Mobilität innerhalb der Plasmamembran sowie die Kanalstöchiometrie des TRPC6 zu gewinnen. In diesem Zusammenhang wurde außerdem die Spezifität des FRET als Interaktionsnachweis zwischen TRPC-Untereinheiten durch Prüfung der Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Effizienz und die Einführung der kompetitiven FRET-Messung untersucht.

**Darstellung der Proteininteraktion in verschiedenen Expressionsstadien** Die Untersuchung des Kompartiments der TRPC6-Kanalassemblierung und die Beurteilung der Proteinlebensdauer erfolgten durch zeitlich-topographisch aufgelöste FRET-Darstellungen mittels konfokalmikroskopischen FRET-Nachweises auf Basis eines spektralen Dekonvolutionsverfahrens zu verschiedenen Zeitpunkten der Proteinexpression. Die TRPC6-Mobilität innerhalb der Plasmamembran wurde anhand von FRAP-Messungen beurteilt.

**Spezifität und erweiterte Anwendung des FRET als Multimerisierungsnachweis in lebenden Zellen** Zur Beurteilung der Spezifität des von fluoreszierenden TRPC-Untereinheiten ausgehenden FRET-Signals wurde die Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Effizienz durch Korrelation von FRET-Effizienz und Expressionsniveau Donor- und Akzeptorfluorochrom-markierter TRPC6-Untereinheiten beurteilt. Außerdem wurde im Rahmen der kompetitiven FRET-Messung die Fähigkeit nicht-fluoreszierender TRPC6- oder TRPC4 $\beta$ -Untereinheiten analysiert, ihre fluoreszierenden Gegenparts in unterschiedliche Kanalkomplexe zu rekrutieren.

**Analyse der Stöchiometrie des TRPC6** Anhand der Korrelation von FRET-Effizienz und dem quantitativen Verhältnis Donor- zu Akzeptorfluorochrom-markierter TRPC6-Untereinheiten wurde die Möglichkeit einer FRET-basierten Bestimmung der Stöchiometrie von Ionenkanälen in lebenden Zellen untersucht. Dafür wurde die FRET-Effizienz in Zellen gemessen, die jeweils unterschiedliche Mengenverhältnisse Akzeptor- und Donor-Fluorochrom-markierter TRPC6-Untereinheiten aufwiesen.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1. Verbrauchskemikalien

Substanz	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Fötiales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Glucose	Merck, Darmstadt
HEPES	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MEM Earle's Medium	PAN, Aidenbach
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Penicillin	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin

#### 3.1.2. Weitere Materialien

Glasplättchen	Menzel, Braunschweig
FuGene 6 transfection reagent	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

### 3.1.3. Expressionsplasmide

pcDNA-TRPC6-CFP	AG Michael Schaefer, Berlin
pcDNA-TRPC6-YFP	AG Michael Schaefer, Berlin
pcDNA-TRPC6	AG Michael Schaefer, Berlin
pcDNA-TRPC4 $\beta$	AG Michael Schaefer, Berlin

### 3.1.4. Zellen

Humane embryonale Nierenzellen

HEK293                      American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA)

### 3.1.5 Zellkultur

*Kulturmedium für HEK293-Zellen:*

MEM Earle's-Medium mit

fötalem Kälberserum	10 %
Glutamin	4 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 $\mu$ g/ml

### 3.1.6 Messpuffer für Imaging-Experimente

*HBS-Puffer:*

NaCl	134 mM
KCl	6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Glucose	5,5 mM
HEPES	10 mM (pH 7,4)
BSA	0,2%

### 3.2 Zellkultur und transiente Transfektion

Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney, HEK293) wurden in Earle's Minimal Essential Medium (MEM Earle) unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37°C als adhärenente Zellen kultiviert. Alle 4 bis 5 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 umgesetzt. Dafür wurden das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen durch Benetzen mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) über 2 min bei 37°C von den Wänden der Kulturflaschen abgelöst. Anschließend wurde die Trypsin/EDTA-Lösung zum Schutz der Zellen vor fortschreitender Proteolyse vorsichtig abgesaugt. Die abgelösten Zellen wurden dann in frischem Kulturmedium suspendiert und in neue Kulturflaschen überführt.

24 Stunden vor geplanter Transfektion wurden die Zellen in 35 mm-Schalen mit eingelegtem rundem 24 mm-Deckglas und 2 ml Kulturmedium ausgesetzt. Um eine ausreichende Zelldichte (ca. 60% Konfluenz) zum Transfektionszeitpunkt zu gewährleisten, wurde pro Deckglas ca. 1-2 % der Gesamtzellmenge einer 75cm<sup>2</sup>-Kulturflasche aufgebracht. Zur Transfektion der HEK-Zellen wurde ein Transfektionsreagenz auf der Basis polykationischer Lipide verwendet (FuGene6 Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Für die Transfektion einer Gesamtmenge von 2 µg Expressionsplasmid wurden 100 µl MEM Earle's Medium und 4 µl FuGene6-Transfektions-Reagenz vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die gewünschte DNA bzw. DNA-Mischung hinzugefügt, vorsichtig vermengt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die DNA/Fugene-Mischung tropfenweise auf die HEK293-Zellen-bewachsenen Deckgläser pipettiert.

### 3.3 Digitale Fluoreszenzmikroskopie

Alle fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden an lebenden, transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Dafür wurde das jeweilige mit HEK-293-Zellen bewachsene Deckgläschen in eine geeignete Messkammer eingespannt und mit HBS-Puffer überschichtet. Die Messkammer wurde in einem invertierten Mikroskop platziert (Axiinvert 100, Carl Zeiss, Jena). Als monochromatische Lichtquelle diente eine

Monochromatoreinheit (Polychrome II, TILL-Photonics, Martinsried) auf der Basis einer Xenon-Hochdrucklampe. Fluoreszenzproteine wurden über einen dichroitischen Spiegel (CFP/YFP dichroic; Chroma) angeregt und über ein Plan-Apochromat 63 x / 1,4-Objektiv (Carl Zeiss, Jena) visualisiert. Die Fluoreszenz-Emission wurde über ein motorisiertes Filtrerrad (Lambda 10/2 motorized filter wheel, Sutter Instruments, Novato, CA), das den computergesteuerten Wechsel der verschiedenen Emissionsfilter ermöglichte, gefiltert und über eine gekühlte CCD-Kamera (IMAGO, TILL-Photonics) aufgezeichnet. Die Darstellung von CFP erfolgte über Anregung bei 415 nm in Kombination mit einem 460-500 nm Emissionsbandpass-Filter. YFP wurde selektiv bei 515 nm angeregt. Emittiertes Licht wurde über einen 535-580 nm Bandpass-Filter aufgezeichnet.

#### 3.4 Konfokale Mikroskopie

Die Darstellung von subzellulärer Lokalisation, zeitlichem Verlauf und Ort der Kanalassemblierung sowie lateraler Mobilität der Fluorochrom-markierten TRPC6-Untereinheiten erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie lebender HEK-293-Zellen. Auf runde 24 mm-Deckgläschen ausgesetzte HEK-293 Zellen wurden transient mit den für die einzelnen Versuche erforderlichen Expressionsplasmiden transfiziert. Zum Mikroskopieren wurde das entsprechende Deckgläschen in eine Messkammer eingespannt, mit HBS-Puffer überschichtet und im Strahlengang eines invertierten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM-META, Carl Zeiss) mit Plan-Apochromat 63 x / 1,4 Objektiv platziert. Fluorochrome wurden mit der 458-nm- oder der 488-nm-Linie eines Argon-Lasers in Kombination mit geeigneten dichroitischen Spiegeln angeregt.

Zelldarstellungen im Nomarski-Interferenzkontrast erfolgten mithilfe des Durchlichtsensors.

### 3.4.1 Konfokale FRAP-Messung

Die laterale Mobilität von TRPC6 wurde mittels *fluorescence recovery after photobleach* (FRAP) getestet. TRPC6-exprimierende HEK-293-Zellen wurden bei niedrigen Laserintensitäten vor und nach Photobleichung einer definierten Region der Plasmamembran dargestellt. Die gezielte Photobleichung in einer vordefinierten Region erfolgte mittels der 488-nm-Linie eines Argon-Lasers bei maximaler Intensität.

### 3.4.2 Konfokale FRET-Messung

Für die konfokale FRET-Darstellung wurden Zellen sequenziell mit nicht bleichenden Intensitäten der 458-nm- bzw. der 488-nm-Linie eines Argon-Lasers angeregt. Die Anregungsintensität wurde mittels eines Photomultipliers im Transmissionslichtweg bestimmt. Emittiertes Licht wurde spektral aufgelöst und vom Photomultiplier-Array des LSM-META aufgezeichnet. Um die lineare Skalierung der Intensitätsdaten zu wahren, wurden weder Signalamplifikationen noch off-set-Korrekturen vorgenommen. Für jede untersuchte Zellgruppe wurden insgesamt 12 Bilder (8 Bilder bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 458$  nm und Emissionswellenlängen im Bereich von 481 bis 556 nm, 4 Bilder bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm und Emissionswellenlängen von 524 bis 556 nm) aufgezeichnet, in eine Bildanalyse-Software exportiert und für nicht-identische Anregungsintensitäten normalisiert.

Um ein signifikantes Mitbleichen des Donors (CFP) während Photobleichen des Akzeptors (YFP) zu verhindern, wurde die Intensität des 488-nm-Lasers ungefähr dreimal schwächer als die 458-nm-Laser-Linie gewählt. Für die Trennung der Signale von Donor, Akzeptor und FRET wurden Regressionsanalysen für jeden einzelnen Bildpunkt durchgeführt, wobei die 12 spektral aufgelösten Datenpunkte (8 Bilder bei  $\lambda_{\text{ex}} = 458$  nm und 4 Bilder bei  $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm) und die gespeicherten Datensets der spektralen Muster von CFP, YFP und FRET verwendet wurden. Die Ergebnisse dieser Bildanalysen wurden als Bilder dargestellt, nachdem den Intensitätswerten eine Pseudofarbskala zugeordnet worden war.

## 3.5 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

### 3.5.1 Wahl der Fluorochrome

Im Rahmen der durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden als Fluorochrome das cyan fluoreszierende Protein (*cyan fluorescent protein*, CFP) und das gelb fluoreszierende Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP) verwendet. Als Donor-Fluorochrom fungierte das CFP mit einem Absorptionsspektrum von ca. 380-475 nm (Absorptionsmaximum bei 437 nm) und einem Emissionsspektrum von ca. 470-530 nm (Emissionsmaximum bei 476 nm). Als entsprechendes Akzeptor-Fluorochrom wurde YFP gewählt. Mit einem Absorptionsspektrum von ca. 470-515 nm (Absorptionsmaximum bei 512 nm) und einem Emissionsspektrum von ca. 520-600 nm (Emissionsmaximum bei 535 nm) erfüllt YFP zwei wichtige Anforderungen, die es als geeignetes Akzeptor-Fluorochrom für FRET-Messungen qualifizieren: YFP bietet eine ausreichende Überlappung von Donor-Emissions- und Akzeptor-Absorptionsspektrum bei gleichzeitig ausreichender Trennung der Spektren. Es gewährleistet somit eine spezifische Auflösung der Spektren mittels geeigneter Filter sowie eine Minimierung der Donor-Mitbleichung bei Akzeptor-Bleichung.

### 3.5.2 Methoden des FRET-Nachweises

Ein FRET-Nachweis kann auf unterschiedliche Arten geführt werden, die sich in den technischen Anforderungen wie auch in Schwachpunkten und Fehlerquellen unterscheiden. Zu den verschiedenen Methoden des FRET-Nachweises gehören u.a. die Messung:

- der Akzeptor-Fluoreszenz während Anregung des Donors
- der Zunahme der Donor-Fluoreszenz nach Photobleichung des Akzeptors
- der Verkürzung der Donor-Fluoreszenzlebensdauer
- der reduzierten Photobleichung des Donors bei FRET

Die in dieser Arbeit gewählten Methoden des FRET-Nachweises, werden im Folgenden beschrieben.

#### a) Akzeptor-Bleichverfahren

Die Quantifizierung der FRET-Effizienz im Rahmen der digitalen Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte mittels Akzeptor-Bleichverfahren („acceptor photobleaching“ oder „donor unquenching“). Dabei wurde der FRET zwischen CFP- und YFP-markierten TRPC6-Untereinheiten durch Photobleichung des Akzeptors (YFP) und gleichzeitige Bestimmung der Donor-Fluoreszenz (CFP) ermittelt. Findet ein FRET statt, so führt die Anregung des Donors zum (partiellen) Energietransfer auf den Akzeptor, der daraufhin niederenergetischeres und somit langwelligeres Licht emittiert, wobei die Donor-Emission abnimmt. Durch Photobleichung des Akzeptors wird der Energietransfer unterbunden. Die Donor-Fluoreszenz steigt folglich entsprechend des zuvor an den Akzeptor abgegebenen Energieanteils an. Eine direkte Quantifizierung der FRET-Effizienz (E) ermöglicht die Formel (1)

$$E = F_{\text{CFP-max}} - F_{\text{CFP-min}} / F_{\text{CFP-max}} \quad (1)$$

Dabei bezeichnet  $F_{\text{CFP-min}}$  die gemessene CFP-Fluoreszenzintensität vor Photobleichen des Akzeptors und  $F_{\text{CFP-max}}$  die CFP-Fluoreszenzintensität nach Photobleichen also in Abwesenheit des Akzeptors. Die Bestimmung von  $F_{\text{CFP-max}}$  erfolgte über die Quantifizierung der relativen Zunahme der CFP-Fluoreszenzintensität während fraktionellem Akzeptorbleichen mittels linearer Regressionsanalyse und Extrapolation der CFP-Fluoreszenzintensität bei einer YFP-Fluoreszenzintensität von Null.

Wie unter 3.1 beschrieben wurden die Messungen an lebenden HEK-293-Zellen in HBS-Puffer anhand eines Zeiss Axiovert 100-Mikroskop mit einem Polychrom II-Monochromator und einer IMAGO CCD-Kamera vorgenommen. Zur Messvorrichtung gehörten ferner ein dichroitischer Spiegel (80 %Transmission, 20 % Reflexion), ein Plan-Apochromat 63x/1,4-Objektiv und ein motorisiertes Lambda 10/2- Emissionsfilterrad (Sutter Instruments, Novato, CA) mit 460-500 nm- und 535-580 nm- Bandpassfiltern. Im Rahmen jedes Messzyklus wurden zunächst CFP bei 410 nm für 20-60 ms und YFP bei 510 nm für 10-15 ms angeregt und die Emissionsintensitäten über einen 460-500 nm- (CFP) bzw. einen 535-580 nm Bandpassfilter (YFP) aufgezeichnet. Gemäß Akzeptor-Bleichprotokoll wurden insgesamt 15 dieser Messzyklen durchgeführt. Dann folgten 60 Messzyklen, die jeweils mit einem Akzeptor-Bleichen über 2,1 s bei 512 nm endeten und zur nahezu vollständigen Photobleichung von YFP führten.

## b) spektrale Dekonvolution

Die hochauflösende räumliche Zuordnung der FRET-Signale mit Darstellung des Kompartiments der Kanalassemblierung erfolgte über den konfokalen FRET-Nachweis. Da ein Akzeptor-Bleichprotokoll sich aus den unter 4.2.1 geschilderten Gründen nicht eignete, wurde die spektrale Dekonvolution als alternatives Verfahren zur FRET-Darstellung gewählt. Dabei wurde das aus überlagerten Einzelspektren bestehende Emissionsspektrum über die Identifizierung der spektralen Anregungs- und Emissionseigenschaften der involvierten Fluorochrome zerlegt. Zu diesem Zweck wurden zunächst die spektralen Eigenschaften von CFP und YFP bestimmt. Dafür wurden entweder nur CFP- oder nur YFP-exprimierende HEK-293-Zellen bei 458 nm und 488 nm angeregt und das jeweilige Emissionsspektrum über einen Bereich von 481 bis 556 nm bzw. von 524 bis 556 nm unter Verwendung der entsprechenden Filter aufgezeichnet. Ferner wurden die Anregungs- und Emissionseigenschaften eines virtuellen „FRET-Fluorochroms“ mit den Anregungseigenschaften von CFP und den Emissionseigenschaften von YFP gespeichert. Anschließend erfolgte die konfokale Mikroskopie der TRPC6-CFP und TRPC6-YFP exprimierenden Zellen wie unter 3.4.2 beschrieben. Die spektrale Dekonvolution wurde dann über lineare Regressionsanalysen durchgeführt, deren Gleichungssystem auf den folgenden Überlegungen basiert:

In einer Probe mit  $m$  verschiedenen spektral unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffen, setzt sich das Hintergrund-korrigierte Fluoreszenzsignal der Probe  $F_i$  bei einer gegebenen Kombination aus Anregungs- und Emissionswellenlänge  $i$ , additiv aus den bei dieser Wellenlänge gemessenen Fluoreszenzsignalen  $f_{i,m}$  der verschiedenen einzelnen Farbstoffe zusammen:

$$F_i = \Sigma (f_{i,1} \dots f_{i,m}) \quad (2)$$

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:

$$f_{i,m} = c_m x_{i,m} \quad (3)$$

Das Signal der Probe lässt sich wie folgt beschreiben

$$F_i = \Sigma (c_1 x_{i,1} \dots c_m x_{i,m}) \quad (4)$$

Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten der Probe bei  $n$  verschiedenen Wellenlängen, liefert  $n$  unabhängige Lösungen für  $F_i$ , was ein lineares Gleichungssystem ergibt. Werden



$n \geq m$  Lösungen durch Messungen erzielt, so ergeben sich die relativen Konzentrationen  $c_1 \dots c_m$  durch multivariate lineare Regressionsanalyse:

$$\begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ c_3 \\ \vdots \\ c_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sum X_{i1} X_{i1} & \sum X_{i1} X_{i2} & \sum X_{i1} X_{i3} \dots & \sum X_{i1} X_{im} \\ \sum X_{i2} X_{i1} & \sum X_{i2} X_{i2} & \sum X_{i2} X_{i3} \dots & \sum X_{i2} X_{im} \\ \sum X_{i3} X_{i1} & \sum X_{i3} X_{i2} & \sum X_{i3} X_{i3} \dots & \sum X_{i3} X_{im} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \sum X_{im} X_{i1} & \sum X_{im} X_{i2} & \sum X_{im} X_{i3} \dots & \sum X_{im} X_{im} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} \sum X_{i1} F_i \\ \sum X_{i2} F_i \\ \sum X_{i3} F_i \\ \vdots \\ \sum X_{im} F_i \end{pmatrix}$$

Für eine möglichst hohe Genauigkeit dieses spektralen Dekonvolutionsverfahrens werden überdeterminierte Gleichungssysteme gelöst, d. h. dass die 12 verwendeten Kombinationen aus Anregungs- und Emissionswellenlängen  $i$  die Anzahl der spektral unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffe (CFP, YFP, FRET) übertrifft.

### 3.6 Berechnung von FRET-Effizienzen und statistische Analyse der Ergebnisse

Für die quantitative Analyse der fluorimetrischen Daten wurden *regions of interest* über den einzelnen Zellen definiert. Ca. 5% der dargestellten Zellen wurden aufgrund großer intrazellulärer Aggregate von Fluoreszenzproteinen von den Messungen ausgeschlossen. Einzelzell-FRET-Effizienzen wurden mit Hilfe von linearen Regressionsanalysen der CFP-Fluoreszenzintensitäten ermittelt, die während der Photobleichung des Akzeptor-Fluorochroms YFP von 100% auf ca. 10% der ursprünglichen Fluoreszenzintensität gemessen wurden. Die Regressionsanalyse erlaubt die Extrapolation der CFP-Intensität ohne Akzeptor ( $F_{\text{CFP-max}}$  bei YFP = 0) über die Bestimmung der Steigung der

### 3 Material und Methoden

Regressionsgeraden. Diese Werte wurden über die unter 3.5.2.a) genannte Formel in FRET-Effizienzen umgerechnet.

Zur Beurteilung des Einflusses des Expressionsniveaus von TRPC6 auf die FRET-Effizienz wurde eine große Anzahl an Zellen untersucht. Zellen mit einem molaren Akzeptor-zu-Donor-Verhältnis von unter 1,5 oder inakzeptablem Signal-zu-noise-Verhältnis ( $R^2$  in der linearen Regressionsanalyse  $< 0,6$ ) wurden ausgemustert. Die Daten wurden im Rahmen von 38 Bleichexperimenten unter identischen Bedingungen gewonnen. FRET-Effizienzen von Einzelzellen wurden gegen die ursprünglichen YFP-Intensitäten als Maß für das Expressionsniveau der Proteine aufgetragen und einer linearen Regressionsanalyse unterzogen um das Ausmaß des Proteinexpressionsniveaus auf die FRET-Effizienz zu beurteilen.

Um die Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom molaren Verhältnis zwischen koexprimierten TRC6-CFP und TRPC6-YFP-Untereinheiten zu untersuchen wurden in gleicher Weise im Rahmen von insgesamt 48 Bleichexperimenten Einzelzell-Daten von 202 Zellen aus 14 unabhängigen Transfektionen gewonnen. Dabei wurden auch Zellen mit niedrigem Expressionsniveau berücksichtigt. Die Fluoreszenzintensitäten von CFP und YFP wurden durch Normalisierung der Intensitätsratios anhand eines CFP-YFP-Tandemproteins in molare Verhältnisse umgerechnet.

Zur Beurteilung der Signifikanz der FRET-Kompetition durch koexprimierte nicht-fluoreszierende TRPC-Untereinheiten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen für  $n = 11-12$  Bleichexperimente mit Mittelwerten aus 3-5 Einzelzellmessungen aus 3-4 unabhängigen Transfektionen berechnet. Die Mittelwerte wurden mittels Student's-*t*-test verglichen.

## 4 Ergebnisse

Die FRET-Technik als Methode zur Darstellung der Multimerisierung von Ionenkanal-Untereinheiten in lebenden Zellen wurde in Abschnitt 3 bereits vorgestellt. Die fluorometrische Untersuchung von TRPC-Untereinheiten unter Einschluss des FRET kann erweitert werden, um zusätzliche Informationen in Bezug auf den Ort der Protein-Zusammenlagerung, die Mobilität und die Lebensdauer der Proteine zu gewinnen. Ferner ermöglichen systematische Veränderung experimenteller Parameter wie dem quantitativen Verhältnis Donor- und Akzeptor-markierter Kanaluntereinheiten und der Gesamtkonzentration fluoreszenzmarkierter Moleküle spezifische Arten der Protein-Protein-Interaktion zu unterscheiden. Unter diesen Bedingungen erlaubt die Bestimmung der FRET-Effizienz Rückschlüsse auf die Spezifität der Untereinheiten-Interaktion und auf die Stöchiometrie der Untereinheiten-Zusammenlagerung.

### 4.1 Detektion der TRPC-Interaktion in verschiedenen Stadien der Proteinexpression

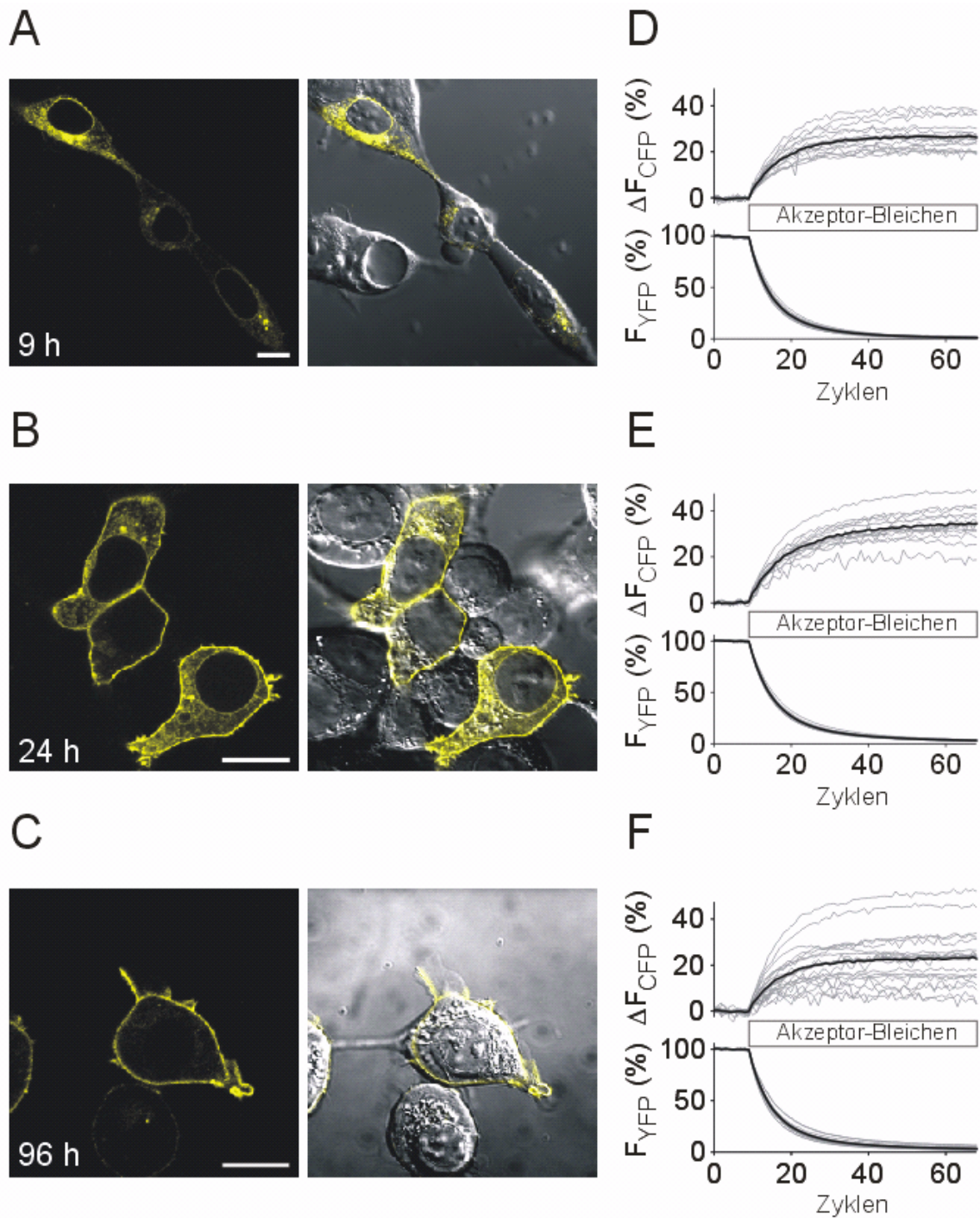
Zunächst wurde die zeitabhängige Entwicklung des FRET in verschiedenen Stadien der Proteinexpression untersucht. Während die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten TRPC6-Untereinheiten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgte, wurde die Quantifizierung der FRET-Effizienz im Rahmen des *digital fluorescence videoimaging* durchgeführt. Bei einer durchschnittlichen Lebensdauer der transient transfizierten Zellen von ca. 96 h konnten nach konfokaler Laser-Scanning-mikroskopischer Beobachtung der Zellen in 3-stündigen Zeitintervallen 3 morphologisch distinkte Stadien der Proteinexpression beobachtet werden. Die Unterteilung erfolgte chronologisch in ein frühes, ein mittleres und ein spätes Stadium der Proteinexpression. Als repräsentativ für das frühe Stadium der

#### 4 Ergebnisse

Proteinexpression wurde der Zeitpunkt 9 Stunden nach transienter Zelltransfektion gewählt. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich die Fluorochrom-markierten TRPC6-Untereinheiten fluoreszenzmikroskopisch eindeutig nachweisen. 9 Stunden nach transienter Transfektion stellten sich die TRPC6-YFP- und TRPC6-CFP-Proteine fluoreszenzmikroskopisch mehrheitlich in Endomembranen wie dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat dar (Abb. 4.1A). Quantitative Messungen der FRET-Effizienz erbrachten zu diesem Zeitpunkt Werte von  $22,5 \pm 1,6\%$  ( $n = 20$  Zellen).

Einen Tag nach Transfektion waren die fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten fast ausnahmslos in die Plasmamembran eingebaut. Dabei war die FRET-Effizienz mit  $23,9 \pm 0,9\%$  (bei  $n = 25$  Zellen) im Vergleich zur Messung zum Zeitpunkt  $t = 9$  Stunden nur leicht erhöht (Abb. 4.1A und D).

Vier Tage nach Transfektion befanden sich die fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten entweder noch in der Plasmamembran (siehe Abb. 1C) oder in kleinen intrazellulären Vesikeln. Die Gesamtfluoreszenzintensität betrug nur noch ca. 25% der Fluoreszenzintensität 24 h bzw. 48 h nach Transfektion, was einer quantitativen Abnahme fluoreszierender Kanaluntereinheiten entspricht. Daraus kann geschlossen werden, dass die durchschnittliche Lebensdauer fluoreszierender TRPC6-Untereinheiten ca. 2 Tage beträgt. Die endosomale Lokalisation von TRPC6 in intrazellulären Vesikeln in späten Stadien der Proteinexpression kann als Ausdruck der Internalisation und des konsekutiven Abbaus der Proteine gewertet werden. Die FRET-Effizienzen zwischen den verbliebenen TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP-Fusionsproteinen waren mit  $21,2 \pm 2,6\%$  und  $n = 17$  Zellen weiterhin hoch. Auffällig war jedoch eine ausgeprägtere Zell-zu-Zell-Variabilität der FRET-Effizienz, die sich in einer höheren Standardabweichung im Vergleich zu den Messungen zu früheren Stadien der Proteinexpression niederschlug (Abb. 4.1F). Sie ist a.e. auf eine Abnahme der Signalintensität auf 25% bei konstantem Messrauschen zurückzuführen.



**Abb. 4.1 Zeitabhängige zelluläre Lokalisation von TRPC6 und Beobachtung des FRET zwischen TRPC6-Untereinheiten.** HEK293 Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden transfiziert, die entweder TRPC6-YFP oder TRPC6-CFP kodierten. (A-C) Lebende, adhärenente HEK293-Zellen wurden nach 9 h (A), 24 h (B) oder 96 h (C) mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie dargestellt. Auf den Bildern links sind die YFP-Fluoreszenz-Signale, rechts die entsprechenden Nomarski Interferenz-Kontrast-Bilder (graue Farbskala) mit überlagertem Fluoreszenz-Signal (gelber Kanal) dargestellt. Die Balken entsprechen einem Maßstab von 10  $\mu\text{m}$ . (D-F) Bestimmung der Erholung (recovery) des

## 4 Ergebnisse

FRET-Donors (CFP) während der Unterbrechung des FRET durch selektive Photobleichung des Rezeptors (YFP). Transient transfizierte Zellen wurden 9 h (D), 24 h (E) und 96 h (F) nach Transfektion dargestellt. Ein digitales Videomikroskop wurde mit einem Monochromator und einem motorisierten Filterrad kombiniert, um die Fluoreszenzen von CFP (ohne die FRET-Komponente) und YFP zu trennen. Gezeigt werden die relativen Anstiege der CFP-Fluoreszenz über das Ausgangsniveau ( $\Delta F_{\text{CFP}}$ ) und die verbleibende Fluoreszenz-Intensität von YFP. Der Akzeptor wurde selektiv bei  $\lambda = 515$  nm gebleicht (2 s Bestrahlung pro Messzyklus) wie im Kästchen angegeben. Ein Anstieg der CFP-Emissionsintensität während der Photobleichung von YFP entspricht einem direkten Nachweis des FRET. Die Daten zeigen ein jeweils typisches Beispiel für jeweils drei bis vier unabhängige Transfektionsexperimente, die vergleichbare Resultate aufwiesen.

### 4.2. Konfokale FRET-Darstellung von TRPC-Oligomeren

Eine exakte topographische Zuordnung der von spezifisch geformten TRPC6-Kanalkomplexen ausgehenden FRET-Signale würde die Identifizierung des Kompartiments der Kanalassemblierung ermöglichen. Somit ließe sich klären, ob die Zusammenlagerung der TRPC6-Untereinheiten unmittelbar im Anschluss an die Proteinsynthese also noch auf Höhe der Endomembranen oder erst im Bereich der Plasmamembran erfolgt. Die digitale Videomikroskopie erlaubt einen quantitativen FRET-Nachweis. Ferner ermöglicht die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie über die Darstellung fluoreszenzmarkierter Proteine Aussagen über deren subzelluläre Lokalisation und Kolokalisationen in einzelnen Zellkompartimenten zu treffen. Der Nachweis spezifischer Protein-Interaktionen bzw. eine sichere räumliche Zuordnung der FRET-Signale ist auf diese Weise jedoch nicht möglich. Zur Klärung der Frage nach dem Kompartiment der Kanalassemblierung wurden die FRET-Signale konfokalmikroskopisch dargestellt.

### 4.2.1 Konfokale FRET-Darstellung in lebenden Zellen

Wie bereits in Abschnitt 1 erläutert, existieren mehrere Möglichkeiten der FRET-Darstellung. Grunderfordernis eines FRET-Nachweises mittels Akzeptor-Bleich-Protokoll ist die Gewährleistung einer suffizienten Akzeptor-Bleichung bei gleichzeitiger Vermeidung von Bewegungen der Probe. Bei der hohen Ortsauflösung konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie würden bereits kleinste Positionsänderungen der Fluorochrome ein Akzeptor-Bleich-Verfahren beeinträchtigen. Ursächlich können zelluläre Bewegungen aber auch die diffusionsbedingte Mobilität der fluorochrommarkierten Proteine sein. Ein Akzeptor-Bleich-Protokoll würde sich unter diesen Umständen nicht zur konfokalen FRET-Darstellung in lebenden Zellen eignen.

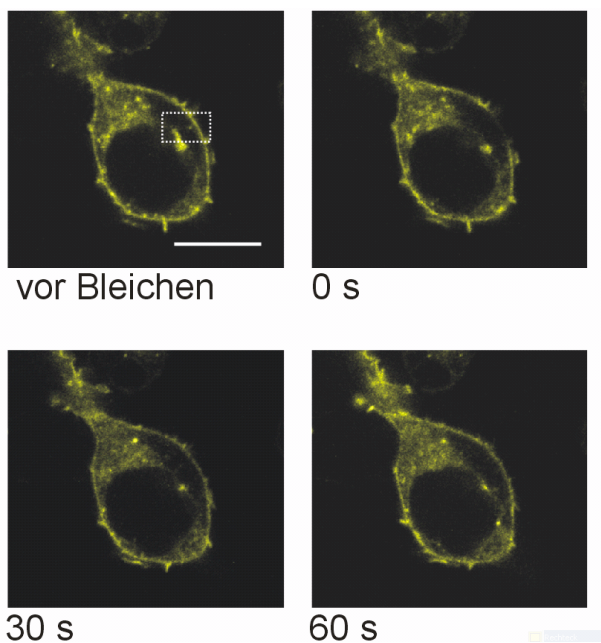
Aus diesen Gründen wurde eine alternative Methode des FRET-Nachweises mittels spektraler Dekonvolution als eine optimierte Variante der als „*sensitized emission*“ bekannten Methode der FRET-Darstellung mit Korrektur des Durchblutens von Donoremission und direkter Akzeptoranregung im FRET-Messkanal eingeführt. Grundprinzip war dabei die Charakterisierung der spezifischen Emissionsspektren von Donor-Fluorochrom CFP, Akzeptor-Fluorochrom YFP sowie der Anregungs- und Emissionseigenschaften des FRET-Signals, dem ein virtuelles FRET-Fluorochrom zugeordnet wurde. Mittels multivariater linearer Regressionsanalysen erfolgte die spektrale Dekonvolution der nach Anregung der Fluorochrome aufgezeichneten Spektren mit konsekutiver Identifizierung des FRET-Signals für jedes Bildpixel eines spektral in der Anregungs- und Emissionsdomäne aufgelösten Bildstapels.

Hierfür wurden zunächst HEK-293-Zellen mit CFP- oder YFP-kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert und die spezifischen Emissionsspektren der Fluorochrome nach Anregung durch einen Argon-Laser mittels Photomultiplier eines spektral auflösenden LSM-META Mikroskops (Carl Zeiss) aufgezeichnet. Die so erstellten spektralen Fingerabdrücke der Fluorochrome wurden abgespeichert. Das FRET-spezifische Spektrum wurde bestimmt, indem die Anregungseigenschaften des Donor-Fluorochroms CFP und die Emissionseigenschaften des Akzeptor-Fluorochroms YFP einem virtuellen FRET-Fluorochrom zugeschrieben und ebenfalls gespeichert wurden. Nun wurden TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP-koexprimierende HEK-293-Zellen sequenziell mit isointensen Linien eines Argon-Lasers bei 458nm und 488 nm angeregt. Die erhaltenen Emissionsspektren wurden wie oben beschrieben aufgezeichnet. Anhand einer Pixel für Pixel durchgeführten, multivariaten

linearen Regressionsanalyse konnten anschließend die komplexen Fluoreszenzsignale von Zellen, die interagierende CRP- und YFP-Fusionsproteine exprimierten, in 3 Komponenten (Donor, Akzeptor und FRET) quantitativ unter Erhaltung der Ortsauflösung zerlegt und eine konfokale FRET-Bildgebung durchgeführt werden.

### 4.2.2 FRET-Mikroskopie

Zur Beurteilung der lateralen Mobilität der TRPC6-Kanäle innerhalb der Plasmamembran wurde die *fluorescence recovery after photobleach* in einem umschriebenen Bereich der Plasmamembran genutzt. TRPC6-YFP exprimierende Zellen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bei einer Wellenlänge von 488 nm dargestellt. Um die damit einhergehende Bleichung der Fluorochrome auf ein Mindestmaß zu reduzieren, wurden hierfür niedrige Laser-Intensitäten gewählt. Nach anschließender vollständiger Photobleichung eines umschriebenen Bereichs der Plasmamembran mit einem 488nm-Laser-Strahl maximaler Intensität wurde die Zeitspanne bis zum vollständigen Ausgleich des Fluoreszenzgradienten dokumentiert. Ein fast vollständiger Ausgleich erfolgte binnen 60 s (Abb. 4.2). Er belegt die Diffusion intakter Fluorochrome in den irreversibel gebleichten Bereich und ermöglicht zusätzlich eine quantitative Abschätzung der lateralen Mobilität der TRPC6-Untereinheiten.



**Abb. 4.2 Laterale Mobilität von TRPC6-Komplexen.** TRPC6-YFP-exprimierende Zellen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bei niedriger Intensität eines 488 nm



Lasers vor (vor Bleichung) und nach Photobleichung eines vordefinierten Bereichs dargestellt. Der zu bleichende Bereich ist durch das gepunktete Rechteck auf der Aufnahme vor Bleichung umrissen. Die fluorescence recovery after photobleach (FRAP) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Photobleichung beobachtet. Der Balken entspricht einem Maßstab von 10  $\mu\text{m}$ .

Angesichts der signifikanten lateralen Mobilität der TRPC6-Komplexe und unter zusätzlicher Berücksichtigung der Zellbewegung während des Bleichvorgangs eignet sich ein Akzeptor-Bleich-Protokoll folglich nicht zum konfokalen FRET-Nachweis. Die fluoreszierenden TRPC6-Fusionsproteine würden dem bleichenden Laserstrahl entgehen, indem sie aus dem zu bleichenden Zielgebiet hinausdiffundieren. Gleichzeitig könnten nach abgeschlossenem Bleichvorgang ungebleichte fluoreszierende TRPC6-Fusionsproteine in das Untersuchungsgebiet hineindiffundieren.

### **4.2.3 Konfokale FRET-gestützte Darstellung des Kompartiments der TRPC6-Kanalassemblierung**

Die konfokale FRET-Darstellung mittels spektraler Dekonvolution erbrachte 9 Stunden nach transienter Kotransfektion von HEK-293-Zellen mit TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP-kodierender Plasmide ein signifikantes FRET-Signal über den Endomembranen der frisch transfizierten Zellen (Abb. 4.3A, 9 h nach transienter Kotransfektion). 24 Stunden nach Transfektion gingen FRET-Signale von reifen Proteinen in der Plasmamembran aus (Abb. 4.3B).

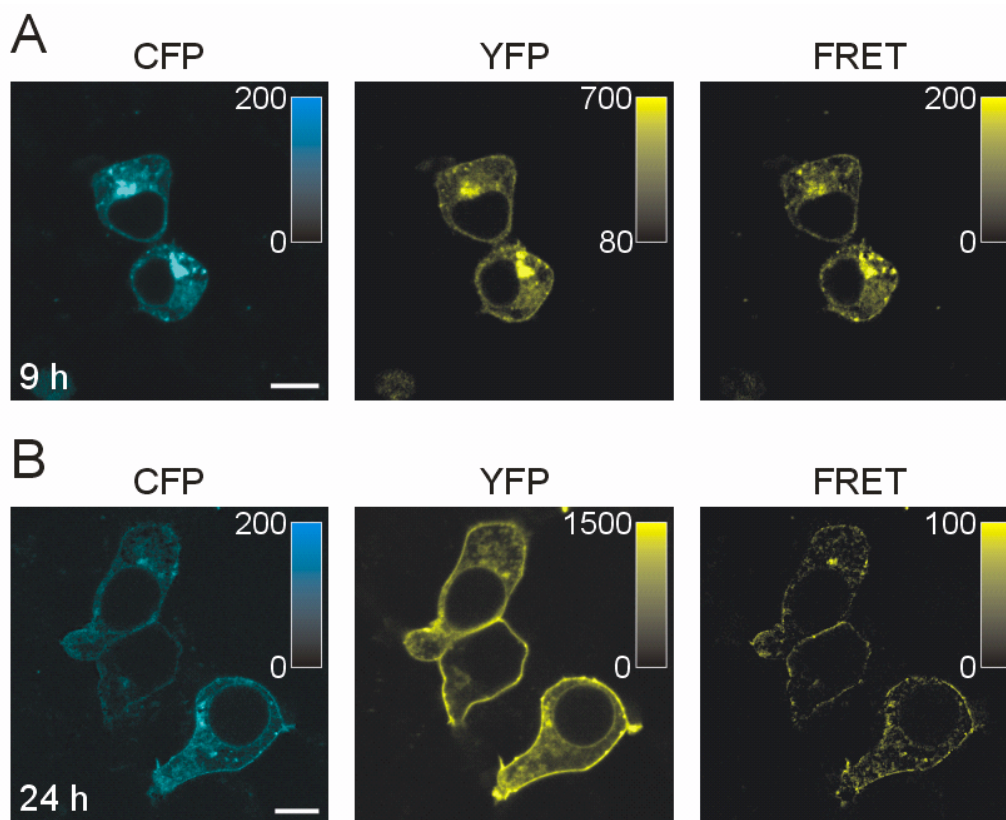
Daraus kann gefolgert werden, dass sich die TRPC6-Untereinheiten bereits im Bereich der Endomembranen und somit unmittelbar im Anschluss an die Translation zusammenlagern und bereits als Multimere über den Golgi-Apparat in die Plasmamembran eingebaut werden.

Die so gewonnenen Daten belegen zudem einen signifikanten Vorteil der konfokalen FRET-Darstellung mittels spektraler Dekonvolution gegenüber der *donor-recovery*-Methode. Die entscheidende Rolle spielt die deutlich erhöhte Geschwindigkeit der Datengewinnung, die das Risiko von Messfehlern durch Bewegungsartefakte wesentlich reduziert.

Es bleibt festzustellen, dass im Rahmen dieser Methode der konfokalen FRET-Darstellung keine quantitativen Aussagen über die FRET-Effizienz durch den direkten Vergleich der

## 4 Ergebnisse

Fluoreszenzintensitäten der aufgezeichneten Spektren getroffen werden konnten. Während der qualitative FRET-Nachweis den spezifischen Interaktionsnachweis zwischen TRPC6-Untereinheiten gestattete, würde eine Quantifizierung der FRET-Effizienzen einen direkten Vergleich der Fluoreszenzintensitäten unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Quantenausbeuten von CFP und YFP erfordern. Diese prinzipiell mögliche Quantifizierung der konfokal aufgezeichneten FRET-Signale wurde aufgrund der gleichzeitig im Labor durch eine andere Studie nachgewiesenen photophysikalischen Instabilität der verwendeten fluoreszierenden Proteine bei Laser-vermittelter, hochenergetischer ( $> 1 \text{ kW/cm}^2$ ) Anregung nicht durchgeführt [Sinnecker et al., 2005].



**Abb. 4.3 Konfokale Darstellung von TRPC6 und FRET.** HEK293-Zellen, die fluoreszierende TRPC6-Untereinheiten exprimieren wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (458 nm und 488 nm) mit dem spektral auflösenden Photomultiplier-Array (LSM-META, Carl Zeiss) sequenziell dargestellt. Linear skalierte Bilddaten wurden exportiert und einer multivariaten Pixel-für-Pixel-Auswertung unterzogen, was unter Verwendung der spektral aufgelösten Daten der untersuchten Probe und der spezifischen Spektren von CFP, YFP und FRET wie in Abschnitt 2 beschrieben, erfolgte. Die resultierenden channels entsprechen den Signalen, die von

CFP, YFP und FRET ausgehen. Dargestellt sind typische Beispiele TRPC6-exprimierender Zellgruppen 9 h (A) und 24 h (B) nach transienter Transfektion. Die Balken entsprechen einem Maßstab von 10  $\mu\text{m}$ . Eingefügt sind relative Fluoreszenzintensitätsskalen in Farbskalierung.

### 4.3 FRET-gestützter Nachweis spezifisch geformter TRPC-Komplexe

FRET-Signale als Ausdruck der großen Nähe von Donor- und Akzeptor-Fluorochrom können entweder von spezifisch zusammengelagerten Protein-Komplexen, von ungeordneten Aggregaten in zellulären Kompartimenten oder bei sehr hohen lokalen Proteinkonzentrationen von zufälligen Ansammlungen frei diffundierender, überexprimierter Proteine ausgehen. Sollten die FRET-Signale unspezifisch, also Ergebnis einer zufälligen Nähe frei diffundierender überexprimierter TRPC6-Kanaluntereinheiten sein, müsste sich die FRET-Effizienz proportional zur Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Aggregatbildung verhalten und mit zunehmender Konzentration verfügbarer Kanaluntereinheiten ansteigen. Folglich wäre die FRET-Effizienz eine konzentrationsabhängige Funktion und letztlich abhängig vom Expressionsniveau der untersuchten Proteine. FRET aus Ausdruck einer spezifischen Zusammenlagerung von Kanaluntereinheiten hingegen ließe über eine weite Spanne unterschiedlicher Expressionsniveaus relativ konstante FRET-Effizienzen erwarten.

Zur Klärung der Spezifität des FRET-Signals wurde die Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der Konzentration exprimierter TRPC6-Untereinheiten untersucht. HEK293-Zellen wurden mit TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP-kodierenden Expressionsplasmiden kotransfiziert. Die Quantifizierung der FRET-Effizienz erfolgte unter Anwendung eines Akzeptor-Bleichprotokolls. Dafür wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität des Donors (CFP) nach Photobleichung des Akzeptors (YFP) bestimmt. Das Expressionsniveau der TRPC-Untereinheiten jeder einzelnen Zelle wurde vor Akzeptor-Bleichung anhand der Fluoreszenzintensität der TRPC-YFP-Untereinheiten beurteilt. Schließlich wurde das so ermittelte Expressionsniveau jeder Einzelzelle mit der jeweils ermittelten FRET-Effizienz korreliert. Dabei zeigte sich, dass die FRET-Effizienz über die Spanne einer Größenordnung nur geringfügig vom TRPC6-Expressionsniveau abhing (Abb. 4.4 A). Selbst einige der am

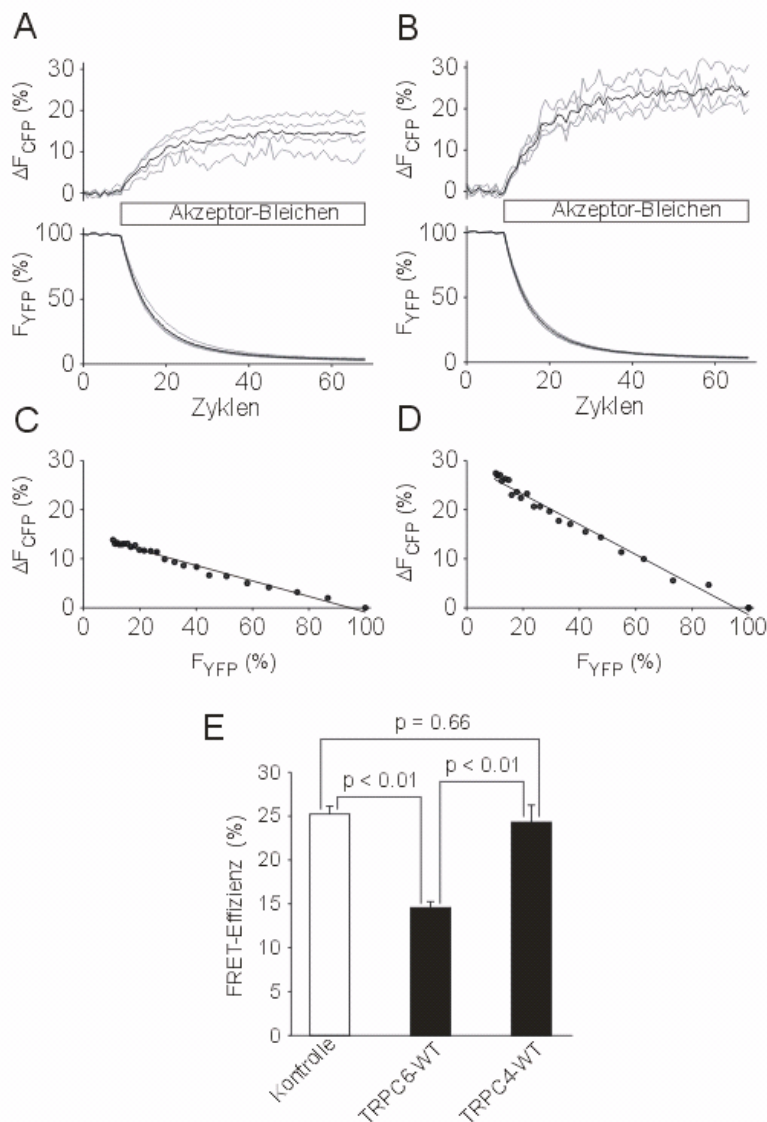
schwächsten exprimierenden Zellen wiesen noch FRET-Effizienzen von ca. 25% auf. Einer linearen Regressionsanalyse zufolge wären selbst für niedrigste Expressionsniveaus noch FRET-Effizienzen von mindestens 16% zu erwarten. Da bei derart niedrigen Expressionsniveaus niederaffin bindender Proteinhäufungen oder ein zufälliges Aufeinandertreffen überexprimierter Kanaluntereinheiten sehr unwahrscheinlich sind, konnte geschlussfolgert werden, dass der FRET zwischen CFP- und YFP-markierten TRPC6-Untereinheiten Ergebnis der großen Nähe zwischen spezifisch zu homomultimeren TRPC6-Kanälen zusammengelagerten TRPC-Kanaluntereinheiten war. Der FRET-Nachweis entspricht somit einer zuverlässigen Methode zum spezifischen Interaktionsnachweis von TRPC6-Untereinheiten.

### **4.4 Kompetitive FRET-Messung zur Erfassung interagierender nichtfluoreszierender TRPC6-Wildtyp-Untereinheiten**

Da die FRET-Signale deutlich und zuverlässig zu erfassen waren, konnte die Fähigkeit nichtfluoreszierender Wildtyp-TRPC6-Untereinheiten untersucht werden, fluoreszierende TRPC-Untereinheiten in unterschiedliche Kanalkomplexe zu rekrutieren. Der Versuchsaufbau gestaltete sich wie folgt: 0,6 µg Expressionsplasmid, das für fluoreszierende TRPC6-Untereinheiten kodierte, wurden mit 1,4 µg TRPC6-Wildtyp- oder murine TRPC4β-kodierenden Expressionsplasmiden kotransfiziert. Die FRET-Effizienzen wurden 48 h nach transienter Transfektion gemessen. Dafür wurde die Donor-Erhholung nach selektiver Photobleichung des Akzeptors aufgezeichnet (siehe Abb. 4.1D und F). Die FRET-Effizienz zwischen TRPC6-CFP und TRPC6-YFP war durch die Koexpression nichtfluoreszierender TRPC6-Wildtyp-Untereinheiten deutlich reduziert (14,6 ± 0,7 %, n = 11 Bleichexperimente mit insgesamt 54 Einzelzellen; Abb. 4.4A und C). Obwohl das molare Verhältnis zwischen CFP- und YFP-fusionierten TRPC6-Untereinheiten konstant blieb (Daten nicht gezeigt), war die Reduktion des FRET durch Konkurrenz mit wildtypischen TRPC6-Untereinheiten hoch signifikant ( $P < 10^{-7}$ ; n = 11 - 12 Bleichexperimente mit 3-4 unabhängigen Transfektionen). Im Gegensatz dazu beeinflusste die Koexpression wildtypischer TRPC4β-Untereinheiten den FRET zwischen fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten nicht (FRET-Effizienzen 24,3 ± 1,9%; n = 10), was ein eindeutiges Zeichen dafür ist, dass TRPC4β nicht mit TRPC6

## 4 Ergebnisse

heterooligomere Komplexe bildet (Abb. 4.4B und D). Es gilt zu berücksichtigen, dass das Ausmaß der FRET-Kompetition die Wahrscheinlichkeit widerspiegelt, dass TRPC6-CFP-Untereinheiten von nicht-fluoreszierenden Kompletitor-Untereinheiten umgeben sind. Die tetramere Stöchiometrie der TRPC ist somit bei Weitem nicht das beste Modell für einen Wettbewerbs-FRET-Ansatz. Dennoch waren die Unterschiede zwischen den Wettbewerbern (TRPC6-Wildtyp- bzw. TRPC4 $\beta$ -Untereinheiten) hoch signifikant (Abb. 4.4E) und unterstreichen somit Verlässlichkeit und Anwendbarkeit dieses Ansatzes.



**Abb. 4.4** Konkurrenz des FRET zwischen fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten und koexprimierten wildtypischen TRPC6- bzw. TRPC4 $\beta$ -Untereinheiten. HEK293-Zellen wurden transient mit pcDNA3-TRPC6-CFP (0,15  $\mu\text{g}$ ) und pcDNA-TRPC6-YFP (0,45  $\mu\text{g}$ ) sowie einem molaren Überschuss von (1,4  $\mu\text{g}$  cDNA-Plasmid) von pcDNA3-TRPC6 (A und C) oder pcDNA-TRPC4 $\beta$  (B und D) transfiziert. Die Bestimmung des Fluoreszenzanstieges des Donors CFP ( $\Delta F_{\text{CFP}}$ ) bei selektiver Photobleichung des Akzeptors YFP erfolgte wie in

Fig. 1 beschrieben. Die Daten stellen Einzelzell-Messungen (graue Kurven) und Mittelwerte (schwarze Kurven) für eine representative Zellgruppe dar. (C und D) Lineare Regressionsanalyse der Donor recovery ( $\Delta F_{CFP}$ ) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität des Akzeptors (YFP) während fraktionierter Bleichung. Abgebildet sind die Messdaten typischer Einzelzellen aus den Versuchen (A) und (B). (E) Statistische Analyse aller Kompetitions-FRET Experimente. Die Histogramme stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10-12 Bleichexperimenten dar, die Daten von 30-50 Einzelzellen aus drei bis vier unabhängigen Transfektionen entsprechen. Die Mittelwerte wurden mittels Student's t-test verglichen, die ermittelten P-Werte sind in der Abbildung angegeben.

### 4.5. Untersuchung der TRPC6-Untereinheiten-Stöchiometrie mittels FRET

#### 4.5.1 Hypothese zur Beurteilung der Kanalstöchiometrie des TRPC6

In einem einzelnen Homodimer (Anzahl der Untereinheiten  $m = 2$ ) ist die Grundbedingung für einen FRET einzig für ein Donor-Akzeptor-Verhältnis von 1:1 erfüllt. Doch bereits das Modell eines Trimers ( $m=3$ ) bietet zwei mögliche Donor-Akzeptor-Verhältnisse ( $p=2$ ), nämlich 1:2 und 2:1. Für ein Tetramer ( $m=4$ ) ergeben sich 3 mögliche Konstellationen ( $p=3$ ) der Zusammenlagerung CFP- und YFP-fusionierter Untereinheiten. Verallgemeinert resultieren dementsprechend für ein Homooligomer aus  $m = x$  Untereinheiten  $p = (x-1)$  mögliche Donor-Akzeptor-Verhältnisse (Zur Vereinfachung gelte dabei näherungsweise Equidistanz zwischen den Untereinheiten eines Kanalkomplexes.).

Diese Betrachtungen werfen die Frage auf, ob und wie sich eine zunehmende Anzahl von Interaktionspartnern ( $m$ ) auf die FRET-Effizienz auswirkt. Am Beispiel der TRPC6-Kanäle sollte geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen der FRET-Effizienz und dem zahlenmäßigen Donor-Akzeptor-Verhältnis besteht und inwiefern gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Stöchiometrie der gebildeten Proteinkomplexe möglich sind.

Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen mit TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP-kodierenden Plasmiden kotransfiziert, wobei die Mengenverhältnisse von Donor-Plasmid zu Akzeptor-Plasmid von 1:4 bis 4:1 variiert wurden. Nach Beurteilung des Expressionsniveaus von

TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP-Untereinheiten für jede Einzelzelle wurden die jeweiligen FRET-Effizienzen untersucht und beide Werte für jede Einzelzelle korreliert.

### 4.5.2 Bestimmung des Donor-Akzeptor-Verhältnisses

HEK293-Zellen wurden mit TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP- kodierenden Plasmiden in unterschiedlichen Mengenverhältnissen (von 1:4 bis 4:1) kotransfiziert. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität von TRPC6-CFP und TRPC6-YFP durch sequenzielle Anregung bei Wellenlängen von 410 nm bzw. 510 nm vor und nach nahezu vollständigem Ausbleichen von YFP. Aufgrund der höheren Quantenausbeute wies YFP bei identischem Expressionsniveau eine höhere Fluoreszenzintensität als CFP auf. In Folge dessen war ein direkter Vergleich der Fluoreszenzintensitäten mit konsekutiver Abschätzung des quantitativen Verhältnisses von CFP- und YFP-markierten Kanaluntereinheiten nicht möglich. Es war zunächst eine Kalibrierung der Fluoreszenzintensitäten erforderlich. Als Standard für eine molare Donor-Akzeptor-Ratio von 1:1 wurden intramolekular fusionierte CFP-YFP-Tandem Proteine genutzt, deren Fluoreszenzintensität wie oben beschrieben bestimmt wurde. Anhand dieses Standards erfolgten dann die Kalibrierung der Intensitäten von Donor- Fluorochrom CFP (gemessen nach Ausbleichen des YFP) und Akzeptor-Fluorochrom YFP (gemessen vor dem Ausbleichen) und die Bestimmung der molaren Ratio zwischen Donor- und Akzeptor-Untereinheiten auf Einzelzellniveau. Die so ermittelten Expressionsniveaus von TRPC6-CFP und TRPC6-YFP wurden als molare Ratio (YFP : CFP) für jede untersuchte Zelle vermerkt. Die Spannweite der Ratio reichte dabei von 1:4 bis 4:1 und entsprach damit dem Transfektionsverhältnis der entsprechenden Expressionplasmide.

### 4.5.3 Beurteilung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Donor-Akzeptor-Verhältnis und Rückschlüsse auf die Untereinheiten-Stöchiometrie

Nach Bestimmung der molaren Ratio zwischen Donor- und Akzeptor-Untereinheiten erfolgte die Bestimmung der FRET-Effizienz für jede Einzelzelle. Dafür wurde gemäß Akzeptor-

## 4 Ergebnisse

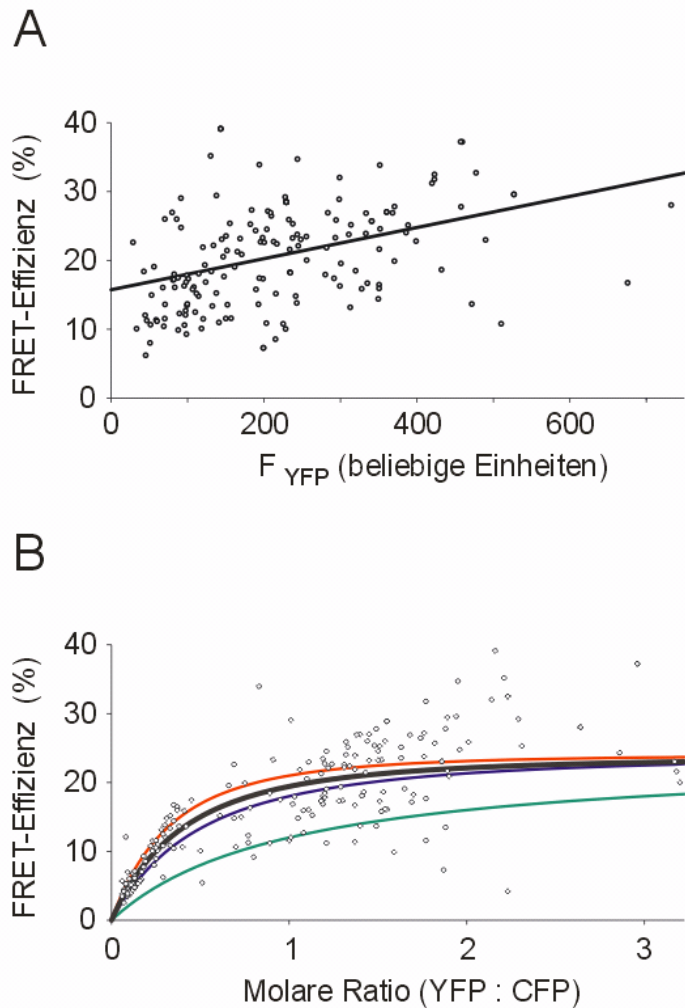
Bleich-Protokoll der Anstieg der Donor-Fluoreszenz ( $\Delta F_{CFP}$ ) während Photobleichung des Akzeptors YFP gemessen und die FRET-Effizienz abgeleitet.

Insgesamt wurden auf diese Weise im Rahmen von 48 Bleichexperimenten die FRET-Effizienzen in 202 einzelnen Zellen bestimmt. Die graphische Darstellung der ermittelten FRET-Effizienzen in Abhängigkeit vom molaren Akzeptor-zu-Donor-Verhältnis mittels nicht-linearer Regressionsanalyse zeigte eine signifikante, nicht-lineare Korrelation zwischen beiden Parametern (Abb. 4.4B). Am auffälligsten war, dass die FRET-Effizienz bei einem Akzeptor-zu-Donor-Verhältnis von über 1 : 2 bereits halbmaximal war. Ab einem Akzeptor-zu-Donor-Verhältnis von 1 : 1 näherte sich die FRET-Effizienz der maximalen FRET-Effizienz an und wies bei einem Verhältnis von 3:1 letztlich einen asymptotischen Kurvenverlauf auf. Eine Steigerung des Akzeptor-zu-Donor-Verhältnisses auf 4 :1 führte zu keiner weiteren Erhöhung der FRET-Effizienz.

Die Steigerbarkeit der FRET-Effizienz bis zu einem Akzeptor-zu-Donor-Verhältnis von 3:1 stützt die Hypothese, dass TRPC6-Kanäle ähnlich den Shaker-Kanälen eine tetramere Struktur aufweisen. In einem Tetramer gewährleistete bereits ein einziges Donor-Fluorochrom eine hohe FRET-Effizienz. Daraus kann im Umkehrschluss bei bekannter Stöchiometrie auf das optimale Mengenverhältnis von Donor- zu Akzeptor-Fluorochromen für das Erreichen der maximalen FRET-Effizienz geschlossen werden.

Anhand der nicht-linearen Regressionsanalyse auf Basis der experimentellen Daten wurden die Kurvenverläufe für ein dimeres, ein trimeres und ein tetrameres Modell erstellt und mit den experimentell gewonnenen Daten verglichen. Dabei fiel auf, dass die Kurve auf Basis der experimentellen Daten zwischen den Kurven für das trimere und das tetramere Modell lag. Würden TRPC6-Kanäle Dimere oder Trimere bilden, wären die Abstände zwischen den einzelnen Untereinheiten eines Kanalkomplexes identisch. Die spezifische Position der fluoreszierenden Donor- und Akzeptor-Untereinheiten wäre in Hinblick auf die FRET-Effizienz irrelevant. Anders verhält es sich bei einem Tetramer. Bei diesem Modell weisen die diametral gegenüberliegenden fluoreszierenden Untereinheiten einen größeren Abstand zueinander als zu den direkt angrenzenden Untereinheiten auf. Als abstandsabhängige Funktion wird der FRET zwischen diesen beiden Interaktionspartnern negativ beeinflusst, was sich in einer erniedrigten FRET-Effizienz niederschlägt. Da dieser Energieverlust im Gleichungssystem der Kurve für das Tetramer-Modell nicht berücksichtigt wurde, resultieren für ein gegebenes Akzeptor-zu-Donor-Verhältnis „falsch hohe“ FRET-Effizienzen. Unter Berücksichtigung dieses Fehlers lassen sich die experimentellen Daten mit einer tetrameren Kanalstöchiometrie vereinbaren.





**Abb. 4.5. Einzelzell-FRET-Effizienzen korrelieren nur schwach mit dem Expressionsniveau der TRPC6-Kanaluntereinheiten aber steigen mit der Ratio aus Akzeptor:Donor-Expressionsniveau.** (A) TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP-koexprimierende HEK 293-Zellen wurden einer FRET-Analyse unterzogen (*Donor recovery after acceptor bleach*). Einzelzell-Daten wurden im Rahmen von insgesamt 38 Bleich-Experimenten unter identischen apparativen Messbedingungen gewonnen und gegen die entsprechenden Expressionsniveaus von TRPC6-YFP ( $F_{YFP}$ ) aufgetragen. Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse ( $R^2 = 0,16$ ;  $FRET_{min} = 15,8\%$ ) wurden mit den experimentell gewonnenen Daten verglichen. Man beachte die niedrige Korrelation zwischen FRET-Effizienz und Protein-Expressionsniveau. (B) HEK293-Zellen wurden mit TRPC6-CFP- und TRPC6-YFP-kodierenden Plasmiden in verschiedenen Verhältnissen (von 1:4 bis 4:1) kotransfiziert. Im Rahmen von 48 Bleichexperimenten wurden die FRET-Effizienzen in 202 einzelnen Zellen bestimmt. Die Einzelzell-FRET-Effizienzen wurden gegen die molare Ratio von TRPC6-YFP- und TRPC6-CFP-Untereinheiten in der jeweiligen Zelle aufgetragen. Die Kurven beschreiben respektive die erwarteten FRET-Effizienzen für homodimere (grün), homotrimere (blau) und homotetramere (rot) quartäre Strukturen von TRPC6-Komplexen (mit

#### *4 Ergebnisse*

einer maximalen FRET-Effizienz von 24% wenn der Akzeptor im Überschuss vorhanden ist). Die schwarze Kurve beschreibt das Ergebnis der nicht-linearen Regressionsanalyse zur Berechnung der Zusammensetzung von TRPC6-Oligomeren.

## 5 Diskussion

In Analogie zu anderen 6-Transmembrandomänen-Kanälen lagern sich TRPC-Untereinheiten zu homo- und heterotetrameren Komplexen zusammen, was bisher mittels biochemischer Methoden wie Immunpräzipitation und *crosslinking*-Analysen sowie durch funktionelle Untersuchungen unter Verwendung dominant-negativer Poren-Mutanten belegt werden konnte. In letzter Zeit wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer vermehrt zur Darstellung von Protein-Protein-Interaktion in lebenden Zellen genutzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Einsatzmöglichkeiten des FRET zur Untersuchung von Proteininteraktionen dargestellt und auf ihre Validität überprüft.

So konnte mittels zeitlich-topographischer FRET-Nachweise die Interaktion der TRPC6-Kanaluntereinheiten in verschiedenen Stadien der Proteinexpression dargestellt werden.

Die kompetitive FRET-Messung erwies sich als verlässliches Werkzeug zur Kontrolle der Spezifität der beobachteten FRET-Signale und zur Abschätzung der relativen Affinität zwischen verschiedenen Proteinen und ermöglicht den Interaktionsnachweis zwischen mehr als zwei unterschiedlichen Proteinen.

Am Beispiel des TRPC6-Kanals erfolgte eine Bestimmung der Kanalstöchiometrie durch Korrelation von FRET-Effizienz und Donor-zu-Akzeptor-Verhältnis.

### 5.1 FRET-basierte Darstellung der Proteininteraktion in verschiedenen Expressionsstadien

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen ermöglichte die konfokale FRET-Darstellung eine genaue topographische Zuordnung der FRET-Signale in verschiedenen Stadien der Proteinexpression. Somit konnten Aussagen über das Kompartiment der

Kanalassemblierung und die weitere Entwicklung der TRPC-Kanalkomplexe getroffen werden.

### 5.1.1 Zeitlich-topographisch aufgelöste FRET-Darstellung

Die zeitlich und räumlich aufgelösten konfokalen FRET-Darstellungen bewiesen eine frühe Zusammenlagerung von TRPC-Untereinheiten im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat. TRPC6-Kanäle verhalten sich diesbezüglich offenbar analog zu den strukturell verwandten TRPV4-Kanälen. In einem FRET-basierten Ansatz konnte die Arbeitsgruppe um Arniges eine TRPV4-Assemblierung im ER nachweisen [Arniges et al., 2006]. Dabei wurde die FRET-Effizienz mittels Akzeptor-Bleichen unter pharmakologischer Blockade des intrazellulären Vesikeltransportes 14 h nach transienter Transfektion und somit zu einem Zeitpunkt bestimmt, zu dem die TRPV4-Kanäle vornehmlich im ER lokalisiert waren. Es fiel auf, dass nicht assemblierte TRPV4-Untereinheiten im ER zurückgehalten wurden, was auf die Exposition spezifischer Retentionssignale in nicht oligomerisierten Kanal-Untereinheiten zurückgeführt wurde.

Die in der frühen Phase der TRPC6-Expression im Vergleich zum Folgestadium noch leicht erniedrigte FRET-Effizienz ließ sich am ehesten durch das Vorhandensein frisch synthetisierter und noch nicht assemblierter TRPC-Untereinheiten oder durch die verzögerte autooxidative Maturation der autofluoreszierenden Proteine [Heim et al., 1994] erklären.

Eine zufriedenstellende fluoreszenzmikroskopische Darstellung der zeitlichen Entwicklung von Proteinsynthese und Kanalassemblierung war in der Frühphase der Proteinexpression aufgrund zu niedriger Fluoreszenzintensitäten nicht möglich. Bedingt durch die verzögerte Autooxidation der Fluorochrome und die erforderliche Synthese einer Fluorochrom-Mindestmenge entstand ein postransfektionelles Zeitfenster von ca. 8 Stunden, innerhalb dessen sich die Proteine einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung weitgehend entzogen.

Da die TRPC-Untereinheiten zum frühen Zeitpunkt nach transienter Transfektion noch keinen Stöchiometrieanalysen unterzogen wurden, lässt sich nicht beurteilen, ob die TRPC-Untereinheiten in diesem Stadium bereits als Tetramere oder lediglich in partiell oder unassemblierter Form vorlagen. Im Rahmen der jüngst erfolgten Stöchiometrie-Analyse von CRAC-Kanälen wurden in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus unterschiedliche Stöchiometrien nachgewiesen. So lagerten sich plasmamembranäre Dimere des Kanalproteins

Orai erst nach CRAC-Aktivierung zu Tetrameren zusammen [Penna et al., 2008]. Im Falle der untersuchten TRPC6-Untereinheiten ließ sich jedoch mit Sicherheit sagen, dass die spezifische Assemblierung bereits im Kompartiment der Proteinsynthese und nicht erst in der Plasmamembran begann.

Ferner erfolgte der Einbau der TRPC6-Kanäle in die Plasmamembran ohne Zugabe spezifischer Agonisten. Dies deutet darauf, dass sich TRPC6-Kanäle ähnlich wie die ebenfalls DAG-aktivierbaren TRPC3-Kanäle verhalten, deren Einbau in die Plasmamembran unabhängig von einer Aktivierung durch PLC erfolgt [Smyth et al., 2006]. Davon abweichend verhalten sich Beobachtungen von Goel et al. zufolge TRPC3-Untereinheiten in den Sammelrohrzellen der Niere. In intrazellulären Vesikeln mit AQP2-Untereinheiten kolokalisierte TRPC3-Untereinheiten assoziierten erst nach Arginin-Vasopression-Stimulation und wurden an die apikalen Plasmamembranen renaler Sammelrohrzellen transportiert. Koexprimierte, subzellulär lokalisierte TRPC6-Untereinheiten blieben währenddessen unbeeinflusst [Goel et al., 2007].

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität in späten Stadien der Proteinexpression entsprach einer Abnahme der Menge fluoreszierender Kanaluntereinheiten. Bei gleichzeitig konstantem Messrauschen resultierte eine ausgeprägte Zell-zu-Zell-Variabilität der FRET-Effizienz. Während der Fluoreszenznachweis in intrazellulären Vesikeln als Ausdruck der Internalisation und des konsekutiven Abbaus der Proteine gewertet werden konnte, erlaubte ein FRET-Nachweis in diesen Vesikeln keine Rückschlüsse auf Zeitpunkt und Ort einer eventuellen Dissoziation der TRPC6-Komplexe. Aufgrund der hohen Stabilität der GFP-Varianten (siehe 1.3.1), die häufig die Stabilität der markierten Zielproteine übertrifft, kann in chemisch aggressiven Milieus nicht vom Zustand der GFP-Varianten auf den Zustand der markierten Proteine geschlossen werden.

### 5.1.2 Beurteilung der TRPC-Mobilität innerhalb der Plasmamembran

Im Rahmen der konfokalen FRET-Darstellung schränkten sowohl die Mobilität der Zellen selbst wie auch die der Fluorochrome innerhalb der Plasmamembran den FRET-Nachweis mittels Akzeptor-Bleichen ein. Die Abschätzung der TRPC-Mobilität innerhalb der Plasmamembran war sowohl für die Auswahl der geeigneten FRET-Nachweismethode als auch für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Effizienz erforderlich.

Die Darstellung und Beurteilung der Proteinmobilität innerhalb der Plasmamembran erfolgten mittels FRAP [Reits & Neefjes, 2001]. Der dabei ermittelte vollständige Ausgleich des Fluoreszenzgradienten binnen 60 s wies auf eine deutliche TRPC6-Mobilität innerhalb der Plasmamembran hin. Bei der Quantifizierung der Proteinmobilität war die photophysikalische Instabilität von GFP-Varianten zu berücksichtigen. Da die Anregung des verwendeten YFP bei 488 nm in einem Wellenlängenbereich erfolgte, in dem der Anteil reversiblen Photobleichens als gering einzustufen ist, konnte dieses als mögliche Artefaktquelle vernachlässigt werden. Im Gegensatz dazu kann CFP in seinem gesamten Anregungswellenlängen-Bereich reversibel gebleicht werden, womit sein Einsatz für FRAP-Bestimmungen problematisch ist. Weil neben der beabsichtigten irreversiblen Bleichung immer auch ein reversibles Ausbleichen auftritt, führt die spontane oder durch Belichtung beschleunigte Erholung der Fluoreszenz zu einer Überschätzung der Proteinmobilität [Sinnecker et al., 2005].

### 5.1.3 Konfokaler FRET-Nachweis

Die konfokale FRET-Messung wurde auf Basis des von Lenz et al. beschriebenen spektralen Dekonvolutionsverfahrens durchgeführt [Lenz et al., 2002]. Als optimierte Variante der als *sensitized emission* bekannten Methode der FRET-Darstellung ermöglichte die spektrale Dekonvolution eine gegenüber der *donor-recovery*-Methode deutlich beschleunigte Datengewinnung. Damit ließen sich Fluorochrom- und zellmobilitätsbedingte Artefakte auf ein Mindestmaß reduzieren.

Eine Quantifizierung der konfokal aufgezeichneten FRET-Signale wurde in dieser Arbeit aufgrund der photophysikalischen Instabilität der verwendeten fluoreszierenden Proteine bei hochenergetischer, Laser-vermittelter Anregung nicht durchgeführt. Selbst unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Quantenausbeuten von YFP und CFP und nach Korrektur des Durchblutens von Donoremmission und direkter Akzeptoranregung ist die FRET-Quantifizierung durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von YFP bei 458 nm und 488 nm wie von Zheng und Zagotta durchgeführt fehlerbehaftet [Zheng & Zagotta, 2004]. Ursächlich ist das reversible Photobleichen der Fluoreszenzproteine [Sinnecker et al., 2005]. Anders als in der oben beschriebenen FRAP-Untersuchung bedingt die Anregung im höherenergetischen Wellenlängenbereich (458 nm), dass nicht nur das diesbezüglich

besonders empfindliche CFP, sondern zusätzlich das YFP reversibel geblichen wird. Eine Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten zur Quantifizierung der FRET-Effizienz wird unter diesen Umständen gestört.

Der von Zheng et al. dargestellte konfokale FRET-Nachweis unterscheidet sich leicht vom in dieser Arbeit genutzten spektralen Evaluationsansatz. So wäre die Korrektur der Kreuzanregung des Akzeptors bei 458 nm exakter gewesen, wenn beide Anregungsintensitäten im Transmissionslichtweg bestimmt worden wären, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen. Der mathematische Ansatz mit Subtraktion der geschätzten Kreuzanregung des Akzeptors *versus* Dekonvolution kombinierter Anregungs- und Emissionsspektren beeinträchtigt die Ergebnisse nicht, solange das Messrauschen keinen signifikanten Anteil der Gesamtsignale ausmacht. Im Rahmen der konfokalen Bildanalyse wird dieses Problem jedoch relevant. Unter diesen Bedingungen ist eine regressionsbasierte spektrale Analyse weniger fehlerbehaftet, da sie die Daten auf Basis der geringsten Abweichung zwischen experimentellen Daten und den gespeicherten spezifischen Spektren (CFP, YFP, FRET) ermittelt. Trotz der geringen Menge rekombinanter TRPCs ermöglichte dieser Ansatz die orts aufgelöste konfokale FRET-Darstellung.

## **5.2 Spezifität und erweiterte Anwendung des FRET als Multimerisierungsnachweis in lebenden Zellen**

Der FRET ist eine Nachweismethode für Proteininteraktionen die sich in den letzten Jahren zunehmender Beliebtheit erfreut [Vogel et al., 2006]. Die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens soll im Folgenden diskutiert werden.

### **5.2.1 Vorzüge des FRET als Multimerisierungsnachweis**

Im Gegensatz zu biochemischen Nachweisen von Proteininteraktionen wie der Koimmunpräzipitation und dem Western Blot erfordert der FRET-Nachweis keine Zellerstörung, was Messungen in lebenden Zellen und die Darstellung der Dynamik von Proteininteraktionen ermöglicht. Insbesondere die Untersuchung membranständiger Proteine mittels biochemischer Techniken birgt Artefaktquellen. Beispielsweise kann die erforderliche

Membransolubilisierung zur Proteindenaturierung mit Freilegung nicht-physiologischer Interaktionsdomänen und unspezifischer Proteinaggregation führen. Ferner können bestehende Proteinkomplexe aufgelöst werden und in Folge dessen einen falsch negativen Interaktionsnachweis liefern. So fanden Kedei et al. im Rahmen einer PFO-PAGE-basierten (PFO-PAGE, „*perfluoro-octanoic acid - polyacrylamid gel electrophoresis*“) Untersuchung der TRPV1-Stöchiometrie nicht nur die erwarteten Homotetramere sondern auch Di- und Trimere [Kedei et al., 2001]. Der Verdacht, dass es sich bei den Di- und Trimeren um Artefakte als Folge von Proteinauftrennung handelte, wurde durch den Nachweis heterotrimerer Komplexe des aller Wahrscheinlichkeit nach heteropentameren GABA-A-Rezeptors erhärtet.

Antikörper-vermittelte Interaktionsnachweise wie die Immunpräzipitation können mitunter durch Elimination des Epitops in unterschiedlichen Spleißvarianten eines untersuchten Proteins falsch negative Resultate liefern und sind generell nur schwer zu quantifizieren.

Auch *crosslinking*-basierte Interaktionsnachweise versagen bei Cluster- und Aggregatbildung der untersuchten Strukturen. Die Verbindung eng benachbarter aber nicht spezifisch assemblierter Proteine ist als Artefaktquelle zu berücksichtigen.

Zur Untersuchung der Homo- und Heterooligomerisierung von TRPV5- und TRPV6-Kanälen wählten Hoenderop et al. die Konkatemerisierung als molekularbiologischen Ansatz [Hoenderop et al., 2003]. Zu den Einschränkungen dieser Methode zählen falsch negative Resultate durch Beeinträchtigung der regelrechten Proteinfaltung und falsch niedrige Stöchiometriebestimmungen, wenn die tatsächliche Proteinstöchiometrie einem Mehrfachen der konstruierten Multimere entspricht.

Im Gegensatz zu elektrophysiologisch basierten Interaktionsnachweisen wie sie in den Arbeiten von Strübing und Hofmann verwendet wurden [Strübing et al., 2001; Hofmann et al. 2002], beschränkt der FRET nicht nur auf plasmamembranäre Proteine, sondern ermöglicht auch den Interaktionsnachweis und Stöchiometrie-Bestimmungen in subzellulären Kompartimenten. Proteine ohne messbare elektrische Leitfähigkeit entziehen sich der elektrophysiologisch basierten Stöchiometrie-Bestimmung per definitionem.



### 5.2.2 Zuverlässigkeit des FRET-Nachweises

Der FRET beruht auf der unmittelbaren Nähe zwischen geeignetem Donor- und Akzeptorfluorochrom. Um den so erbrachten Interaktionsnachweis auf die Fluorochrom-markierten Proteine übertragen zu können, muss die Wahrscheinlichkeit einer rein auf die GFP-Varianten beschränkten Interaktion auf ein Minimum reduziert werden.

Das GFP und seine frühen Varianten wiesen noch eine deutliche spontane Oligomerisierungstendenz auf und führten so zu falsch positiven FRET-Nachweisen [Cubitt et al., 1995]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten GFP-Varianten eCFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) und eYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) handelt es sich um weiterentwickelte, nicht-oligomerisierende GFP-Varianten der zweiten Generation [Zhang et al., 2002].

Weiter sind bei der Fluorochromwahl die Größenverhältnisse zwischen fluoreszierendem Protein und zu untersuchendem Protein zu beachten [Kenworthy, 2001]. Für die Mitglieder der TRP-Familie wurden FRET-basierte Multimerisierungsnachweise unter Verwendung von CFP und YFP durch elektrophysiologische und biochemische Methoden bestätigt [Hofmann et al., 2002; Goel et al., 2002; Hoenderop et al., 2003; Hellwig et al., 2004]. Ein artefaktanfälliges Größenverhältnis von CFP bzw. YFP zu TRPC6-Untereinheiten ist demnach unwahrscheinlich.

Die variable räumliche Ausrichtung von Donor- und Akzeptor-Fluorochrom oder ihrer Dipolmomente zueinander ist unter der Annahme einer Zufallsverteilung bei wiederholten Messungen als Fehlerquelle vernachlässigbar [Vogel et al., 2006].

Auch die von Sinnecker et al. und Henderson et al. beschriebene reversible Bleichung der verwendeten GFP-Farbvarianten CFP und YFP ist hinsichtlich einer kritischen Beurteilung der Zuverlässigkeit der durchgeführten FRET-Messungen zu berücksichtigen.

Das reversible Ausbleichen und die sowohl spontane als auch durch Belichtung beschleunigte Erholung aus dem reversibel geblichenen Zustand führen im Laufe eines fluoreszenzmikroskopischen Experiments zur Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen diesen Vorgängen. Variationen von Belichtungsintensität oder Auslesefrequenz können dieses Gleichgewicht ebenso wie eine zusätzliche Belichtung bei anderen Wellenlängen verschieben, wobei die Helligkeit der Probe zu- oder abnehmen und dadurch die Messung der FRET-Effizienz beeinflusst werden kann. Um Artefakte durch Störungen des Gleichgewichts zwischen reversibler und irreversibler Photobleichung zu unterbinden, wurden Bildaufzeichnungsfrequenzen und Belichtungsintensitäten während der Messungen nicht

verändert. Die Quantifizierung der FRET-Effizienz erfolgte auf Basis irreversiblen Photobleichens des Akzeptors (YFP) bei einer Wellenlänge von 512 nm und somit in einem Wellenlängenbereich der weder reversibles Photobleichen des YFP noch lichtinduzierte Donorfluoreszenzerholung verursacht [Sinnecker et al., 2005]. Der Einfluss des reversiblen Photobleichens auf die hier ermittelten FRET-Effizienzen ist folglich auf ein Mindestmaß reduziert und ohne signifikante Relevanz für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse.

Die Photokonversion von YFP in eine CFP-ähnliche Art während Akzeptor-Bleichens mit konsekutiver Beeinflussung der FRET-Effizienz wie von Valentin et al. beschrieben, konnte von Thaler et al. nicht bestätigt werden [Valentin et al., 2005; Thaler et al., 2006]. Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen ergaben sich keine Hinweise auf ein derartiges Phänomen.

### 5.2.3 Schwache Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Effizienz

Eine wichtige Einschränkung der FRET-Technik stellt die unter 5.1.1 erwähnte Notwendigkeit der Überexpression der zu untersuchenden Proteine dar. Dies könnte zu unspezifischen Zusammenlagerungen der koexprimierten Fusionsproteine bei Proteinüberladung in einem Kompartiment führen. Hinzu kommt, dass membranäre Kompartimente wie die Plasmamembran die Bewegungsmöglichkeiten der Fusionsproteine im Raum auf zwei Freiheitsgrade beschränken, was die Wahrscheinlichkeit eines unspezifischen „Seit-zu-Seit“-FRET zwischen Transmembranproteinen, die diffundieren und zufällig zusammenstoßen, weiter erhöht.

Gegen eine lokale Anhäufung von Proteinen sprach die konfokalmikroskopisch belegte homogene Membranverteilung der TRPC6-Komplexe ohne massige Aggregate. Außerdem bestätigten die *fluorescence recovery after photobleach*-Experimente, dass TRPC6-Komplexe in der Plasmamembran lateral beweglich sind (siehe 5.1.2).

Ein weiterer Spezifitätsnachweis des FRET wurde durch die Untersuchung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Protein-Expressionsniveau erbracht. Da die Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Effizienz nur schwach ausgeprägt war, kann geschlussfolgert werden, dass die FRET-Signale eher die spezifische homotetramere Zusammenlagerung der TRPC-Untereinheiten als die zufällige Anhäufung von Proteinen widerspiegeln.

Überdies wiesen andere, zytosolisch translatierte und sekundär an die Plasmamembran angelagerte Proteine wie die CFP- oder YFP-fusionierten PH-Domänen der PLC $\delta_1$  erst bei wesentlich höheren Expressionsniveaus (das Expressionsniveau war ungefähr 20- bis 50 mal höher als das der fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten, Daten nicht gezeigt) eine konzentrationsabhängige FRET-Effizienz von bis zu 7% auf (Schaefer et al., nicht publizierte Beobachtungen). Somit kann ausgeschlossen werden, dass der FRET zwischen fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten Ergebnis unspezifischer Assoziationsmechanismen ist.

Angesichts der schwachen Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Effizienz spielt der Anteil ungepaarter Donoren und Akzeptoren beim hier erbrachten FRET-Nachweis allenfalls eine untergeordnete Rolle. Im Gegensatz dazu muss für die Quantifizierung der FRET-Effizienz durch spektrale Dekonvolutionsverfahren der Beitrag ungepaarter Donoren und Akzeptoren zum aufgezeichneten Spektrum berücksichtigt werden. Eine zuverlässige FRET-Quantifizierung erfordert in diesem Fall die Bestimmung der Stöchiometrie von freien Donoren, Akzeptoren und spezifischen Proteinkomplexen [Neher & Neher, 2004; Hoppe et al., 2002].

### 5.2.4 Kompetitive FRET-Messung

Ähnlich wie die Ausbildung multimerer Kanalkomplexe zwischen TRPV4-Spleißvarianten [Arniges et al., 2006] erfolgt auch die Heteromultimerisierung von TRPC-Untereinheiten nur innerhalb definierter Unterfamilien, was sowohl in heterologen [Hofmann et al., 2001] als auch in nativen Systemen wie dem Rattenhirn belegt wurde [Strübing et al., 2001; Goel et al., 2002]. Koimmunpräzipitationsexperimenten und FRET-Nachweisen zufolge assembliert TRPC6 mit TRPC3 und TRPC7, nicht jedoch mit TRPC4 $\beta$  [Hofmann et al., 2002].

Über die Einführung einer kompetitiven FRET-Messung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet, inwiefern Wildtyp-TRPC-Untereinheiten in der Lage sind, fluoreszierende TRPC-Untereinheiten in separate Kanalkomplexe zu rekrutieren. Unter Berücksichtigung der bekannten Multimerisierungstendenzen wurde die Untersuchung mit TRPC6-Untereinheiten durchgeführt, die Negativkontrolle erfolgte mit TRPC4 $\beta$ -Untereinheiten.

Die spezifische Entkopplung von FRET zwischen fluoreszierenden TRPC6-Kanaluntereinheiten durch koexprimierte TRPC6-Wildtyp-Untereinheiten nicht jedoch durch

TRPC4 $\beta$  erweitert die Anwendungsmöglichkeiten des FRET. Die hier dargestellte kompetitive FRET-Messung ermöglicht den Interaktionsnachweis zwischen mehr als zwei unterschiedlichen Proteinen in nur einem Messschritt sowie eine Affinitätsprüfung zwischen den Untereinheiten eines spezifischen Proteinkomplexes. Auf diese Weise kann die ganze Bandbreite nicht-fluoreszierender TRPC-Untereinheiten auf eine spezifische Kombination homo- oder heteromerer TRPCs untersucht werden.

Auf die physiologische Relevanz von TRPC-Kanälen aus bis zu 3 verschiedenen Untereinheiten deutet der Nachweis von TRPC(1+3+5)-Kanälen im Rattengehirn [Strübing et al., 2003].

Die funktionelle Relevanz der exakten heterooligomeren Zusammensetzung von Kanalkomplexen offenbarte der funktionelle Vergleich heteromultimerer (nativer) und homomultimerer (heterolog exprimierter) TRPC-Kanäle [Stübing et al., 2001]. Auch zwischen einzelnen Heteromultimeren bestehen zum Teil erhebliche funktionelle Unterschiede, wie das Beispiel der NMDA-Rezeptoren belegt. Während das NR1-NR2-Tetramer Glutamat-aktivierbar ist, erfolgt die Aktivierung des NR1-NR3-Tetramers durch Glycin [Chatterton et al., 2002].

Die Beurteilung der Affinität zwischen verschiedenen Proteinen durch die hier beschriebene Methode wurde inzwischen zur Untersuchung assemblierungsrelevanter Domänen des TRPV1 genutzt. Affinitäts-Analysen zwischen fluoreszenzmarkierten TRPV1-Untereinheiten und trunkierten, nicht fluoreszenzmarkierten Konstrukten trugen zur Identifizierung der für die TRPV-Kanalassemblierung relevanten Kanaldomänen in Bereich von zytosolischen C-Termini und Transmembrandomänen bei [Hellwig et al., 2005]. Die so ermittelte Relevanz des zytosolischen C-Terminus für die Kanalassemblierung deckte sich mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Garcia-Sanz [Garcia-Sanz et al., 2004]. Auch in der Untersuchung von Protein-Interaktionen löslicher Proteine hat sich die Kompetition als geeignetes Testverfahren für die Selektivität bzw. Spezifität der Interaktionen bewährt. So trugen kompetitive FRET-Messungen zur Untersuchung funktioneller Domänen innerhalb der regulatorischen Untereinheit p 101 der Phosphoinositid-3-Kinase  $\gamma$  bei [Voigt et al., 2005].

Bei Einsatz Fluorochrom-schonender FRET-Nachweis-Methoden wie beispielsweise dem von Sinnecker vorgeschlagenen reversiblen Akzeptor-Bleichen könnte mit Hilfe der kompetitiven FRET-Analyse eine eventuelle Agonisten-getriggerte Dynamik der Untereinheiten-Affinitäten beurteilt werden.

Eine andere Anwendung der FRET-Methode - die Koexpression verschiedenster Kombinationen fluoreszierender und nicht fluoreszierender  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten von

CNG-Kanälen - ermöglichte die Überprüfung der favorisierten 3-zu-1- Stöchiometrie zwischen diesen Kationenkanal-Untereinheiten in den Stäbchen-Zellen des Auges [Zheng et al., 2002] und die Aufklärung der 2:1:1-Stöchiometrie der A2-, A4- und B1b-Untereinheiten olfaktorischer CNG-Kanäle [Zheng & Zagotta, 2004]. Die dabei durchgeführte, aufwändige paarweise Austestung von Untereinheiten-Interaktionen hätte unter Verwendung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen kompetitiven FRET-Messung deutlich vereinfacht werden können.

### **5.3 FRET-basierte Identifizierung der tetrameren Stöchiometrie des TRPC6**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel des TRPC6 eine Stöchiometrie-Analyse auf Basis der Korrelation zwischen FRET-Effizienz und Donor-Akzeptor-Verhältnis etabliert werden. Die Ergebnisse der nicht linearen Regressionsanalyse deuten auf die Zusammenlagerung von vier TRPC6-Untereinheiten zu einem Kanalkomplex hin. Die Diskrepanz zwischen Messdaten und der theoretischen Korrelation von FRET-Effizienz und Donor-Akzeptor-Verhältnis für einen tetrameren Proteinkomplex könnte durch die suboptimalen Energietransfer-Bedingungen im tetrameren Modell erklärt werden (siehe 4.5.3). Eine falsch niedrige Stöchiometrie als Ausdruck der Mittelwerte von Kanalkomplexen unterschiedlicher Stöchiometrie wie von Kedei et al. im Rahmen der TRPV1-Untersuchungen beobachtet, erscheint hingegen eher unwahrscheinlich.

Hinsichtlich der Validität der hier vorgestellten Stöchiometrieanalyse sind die von Vogel et al. beschriebenen Einschränkungen kritisch zu berücksichtigen [Vogel et al., 2006]. Da die FRET-Effizienz nicht mit der Donor-Akzeptor-Stöchiometrie innerhalb einer Zelle sondern nur mit jener innerhalb eines spezifisch formierten Proteinkomplexes korreliert, können Stöchiometriebestimmungen durch Korrelation von FRET-Effizienz und quantitativem zellulären Donor-zu-Akzeptor-Verhältnis fehlerhaft sein. In ihren Ausführungen beziehen sich Vogel et al. auf Vergleiche zwischen intramolekular fusionierten Donor-Akzeptor-Konstrukten mit und ohne Koexpression freier, nicht spezifisch assemblierter Donoren und Akzeptoren bei jeweils identischer zellulärer Donor-Akzeptor-

Ratio. Im Gegensatz dazu, wurde die spezifische Assemblierung der fluorochrommarkierten TRPC6-Untereinheiten in den vorangegangenen Untersuchungen belegt. Das zelluläre Donor-Akzeptor-Verhältnis kann somit unter Berücksichtigung der statistischen Verteilung von Donoren und Akzeptoren auf die einzelnen Kanalkomplexe mit der Donor-Akzeptor-Ratio innerhalb spezifisch assemblierter TRPC6-Komplexe gleichgesetzt werden. Demnach kann die Korrelation von FRET-Effizienz und Donor-Akzeptor-Ratio zur Abschätzung der TRPC6-Stöchiometrie herangezogen werden.

Entsprechend der Darstellung von Vogel et al. erreichte in der hier vorgestellten Untersuchung die FRET-Effizienz bei einem Donor-Akzeptor-Verhältnis von 1 zu 3 (also einem Donor pro Kanalkomplex) ihr Maximum. Anders als im Falle der intramolekular fusionierten Donor-Akzeptor-Konstrukte war der Anstieg der FRET-Effizienz bei Verschiebung der Donor-Akzeptor-Ratio zugunsten der Akzeptoren nur sehr gering. Dies könnte auf die unterschiedliche Donor-Akzeptor-Stöchiometrie innerhalb verschiedener TRPC6-Kanalkomplexe zurückzuführen sein. Bei einem Donor-Akzeptor-Verhältnis von 1 zu 3 steigt zwar die Wahrscheinlichkeit für ein entsprechendes Verhältnis innerhalb der Kanalkomplexe, doch gehen auch Kanalkomplexe mit anderen Donor-zu-Akzeptor-Verhältnissen die Gesamt-FRET-Effizienz ein.

Die hier ermittelte tetramere Stöchiometrie des TRPC6 deckt sich mit Ergebnissen aus biochemischen sowie FRET-basierten Multimerisierungs-untersuchungen der TRP-Familie [Hofmann et al., 2002, Hellwig et al., 2004; Kedei et al., 2001; Hoenderop et al., 2003] und weist strukturelle Parallelen zu anderen 6-TMD-Kanälen auf. Wie auch TRPC-Kanäle gehören Shaker-Kaliumkanäle und CNG-Kanäle in die Familie der 6-Transmembrandomänen-Kanäle mit einem Porenmotiv zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment [Kreusch et al., 1998]. Neben Shaker-Kaliumkanälen [MacKinnon, 1991] weisen auch CNG-Kanäle eine tetramere Struktur auf [Liu et al., 1996] was mit Hilfe elektrophysiologischer Ansätze geklärt werden konnte. Während Liu Einzelkanalmessungen mit Untereinheiten unterschiedlicher Leitfähigkeit durchführte, bestimmte MacKinnon die Kaliumkanal-Stöchiometrie auf Grundlage eines elektrophysiologischen Ansatzes mit kinetischer Analyse der Toxin-vermittelten Kanalinaktivierung unter Verwendung Toxin-unempfindlicher Kanalmutanten. Die von Zhong et al. mittels biochemischer Nachweismethoden identifizierte CNG-Stöchiometrie von 3 A- zu 1 B-Untereinheiten [Zhong et al., 2002] wurde unmittelbar darauf bestätigt [Weitz et al., 2002; Zheng et al., 2002].

Während die Arbeitsgruppe um Weitz den Nachweis mittels biochemischer Techniken erbrachte, wählte die Gruppe um Zheng einen FRET-basierten Ansatz [Zheng et al., 2002].

Bei bereits bekannter tetramerer Kanalstruktur wurde die genaue Untereinheiten-Zusammensetzung membranständiger Kanalkomplexe auf Grundlage des viel genutzten FRET-basierten Interaktionsnachweises unterschiedlicher Kanaluntereinheiten bestimmt. Zwar erfolgte die FRET-Messung konfokalmikroskopisch, doch blieben die Untersuchungen auf die Plasmamembran beschränkt. Ein zeitlich-topographisch aufgelöster FRET-Nachweis in subzellulären Strukturen und eine Identifizierung des Kompartiments der Kanalssemblierung fanden nicht statt. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit gewählten Methode zur Bestimmung der FRET-Effizienz führten Zheng et al. eine konfokalmikroskopische Quantifizierung der FRET-Effizienz auf Basis der als *sensitized emission* bekannten Methode der FRET-Darstellung durch. Die damit verbundenen Probleme wurden bereits in Abschnitt 5.1 erörtert.

Bald darauf untersuchten Zheng und Zagotta bei bekannter tetramerer Struktur die Untereinheiten-Zusammensetzung olfaktorischer CNG-Kanäle anhand eines von ihnen als *fluorescence intensity ratio* (FIR) bezeichneten Verfahrens [Zheng & Zagotta, 2004]. Unter der Annahme, das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten sei (unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Quantenausbeuten) proportional zur Anzahl der mit YFP oder CFP markierten plasmamembranären Kanaluntereinheiten, leiteten sie das Untereinheiten-Verhältnis innerhalb der CNG-Kanäle ab. Dabei sind einige Aspekte kritisch zu berücksichtigen. Die Gleichsetzung von plasmamembranärem und kanalikulärem Proteinverhältnis ist nur zulässig, wenn alle plasmamembranären Kanal-Untereinheiten in Kanalkomplexen rekrutiert sind. Erfolgt dieser Interaktionsnachweis mittels quantitativer konfokaler FRET-Messung auf Grundlage eines spektralen Dekonvolutionsansatzes, müsste zusätzlich das Verhältnis von freien Donor- und Akzeptor-Untereinheiten berücksichtigt werden [Neher & Neher, 2004]. Die von Zheng und Zagotta getroffene Wahl der Fluorochrome CFP und YFP stellte bei der Quantifizierung der CFP-markierten Proteine ein weiteres Problem dar, da ein FRET zwischen CFP und YFP über eine erniedrigte CFP-Fluoreszenzintensität eine falsch niedrige CFP-Quantifizierung bedingt hätte. Die zur Abschätzung der geschilderten Fehlerquellen erforderliche FRET-Bestimmung erfolgte gemäß des Protokolls von Zheng et al. (2002) mit den damit verbundenen Schwierigkeiten. Die aus der photophysikalischen Instabilität von GFP-Varianten resultierenden Artefakte, wie sie von Sinnecker beschrieben wurden [Sinnecker et al., 2005], blieben in der Arbeit von Zheng und Zagotta unberücksichtigt.

Für die Stöchiometrie-Analyse der CRAC-Kanäle (CRAC, „*calcium-release-activated calcium*“) verwendeten Penna und Mitarbeiter [Penna et al., 2008] die von Ulbrich und

Isacoff am Modell der NMDA-Rezeptoren etablierte Methode des *subunit counting* im Rahmen der *total internal reflection fluorescence microscopy* (TIRFM) [Ulbrich & Isacoff, 2007]. Dabei wurde die Anzahl der Untereinheiten eines membranständigen Proteins durch Zählen diskreter Photobleich-Schritte während kontinuierlicher Laser-Exposition einzelner fluoreszierender Moleküle bestimmt. Die Anzahl der Bleichschritte bis zum völligen Ausbleichen eines Leuchtpunktes korrelierte demnach mit der Anzahl der Untereinheiten des betreffenden Proteins. In den Arbeiten von Ulbrich & Isacoff sowie von Penna et al. waren die untersuchten Proteinuntereinheiten GFP-markiert und wiesen zu ca. 20% eine falsch niedrige Untereinheiten-Stöchiometrie auf, was die Autoren auf einen entsprechend hohen Anteil nicht funktionstüchtiger GFP in den Proteinkomplexen zurückführten. Obgleich es sich beim *subunit counting* um ein auf irreversibler Photobleichung basierendes Verfahren handelt, fanden der Photochromismus des GFP und die durch reversible Photobleichung bedingten Artefakte keinen Eingang in die Betrachtungen der Autoren. Gerade hinsichtlich der erschwerten Abgrenzung einzelner Bleichschritte durch kurze Verweildauern auf einem Fluoreszenzniveau und niedrige Ausgangsfluoreszenzintensitäten [Ulbrich & Isacoff, 2007] wäre dieser Aspekt von erheblicher Relevanz gewesen.

Eine weitere Einschränkung des *subunit counting* besteht in der Konzentrationsabhängigkeit der Methode. Zwar optimiert das Verfahren indirekt die optische Auflösung eines als einzelner Leuchtpunkt imponierenden Proteinkomplexes und ermöglicht somit die Quantifizierung der beteiligten Fluorochrome, doch liefert es keinen direkten Protein-Protein-Interaktionsnachweis. Da bei hoher lokaler Proteindichte nicht mehr zu unterscheiden ist, ob es sich bei den untersuchten Leuchtpunkten um zufällig angenäherte, in der Plasmamembran diffundierende Proteinuntereinheiten handelte, beschränkten sich die Untersuchungen auf Membranregionen mit einer Leuchtpunkt-Dichte zwischen 20 und 200 auf  $15 \times 15 \mu\text{m}$  [Penna et al., 2008]. Im Gegensatz dazu war die FRET-Effizienz interagierender TRPC6-Untereinheiten als Beispiel für membranständige Proteine nur schwach konzentrationsabhängig (siehe 4.3), woraus eine lediglich geringe Beeinträchtigung der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten FRET-basierten Stöchiometrie-Bestimmung resultiert.

Ferner beschränkt sich das *subunit counting* durch seine Kopplung an die TIRFM auf die Stöchiometrie-Bestimmung oberflächlicher also plasmamembranär lokalisierter Proteine. Die Methode eignet sich weder zur Untersuchung von Proteinkomplexen in subzellulären Kompartimenten noch zur Untersuchung zytosolischer Proteine und ist somit der hier vorgestellten FRET-basierten Stöchiometrieanalyse in einem weiteren Punkt unterlegen.



## *5 Diskussion*

Eine ausschließlich auf subzelluläre Kompartimente bezogene FRET-Quantifizierung ist auch ohne hochauflösende Darstellungen wie der konfokalen FRET-Bestimmung möglich. So können wie von Arniges et al. beschrieben durch pharmakologische Blockade des Vesikeltransports in frühen posttransfektionellen Stadien der Proteineinbau in die Plasmamembran unterbunden und im Rahmen der digitalen Videomikroskopie FRET-basierte Stöchiometrie-Bestimmungen durchgeführt werden.

## 6 Zusammenfassung

In Analogie zu anderen 6-Transmembrandomänen-Kanälen lagern sich TRPC-Untereinheiten zu homo- und heterotetrameren Komplexen zusammen, was bisher mittels biochemischer Methoden sowie durch funktionelle Untersuchungen belegt werden konnte. Diese Protein-Interaktionsnachweise waren häufig mit der Zerstörung der untersuchten Zellen verbunden oder blieben auf die Untersuchung plasmamembranständiger Kanalkomplexe beschränkt, womit dynamische Untersuchungen an lebenden Zellen oder Aussagen über die Kanalassemblierung in subzellulären Kompartimenten nicht möglich waren. In letzter Zeit wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) vermehrt zur Darstellung von Protein-Protein-Interaktion in lebenden Zellen genutzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Einsatzmöglichkeiten des FRET zur Untersuchung von Proteininteraktionen dargestellt und auf ihre Validität überprüft.

**Darstellung der Proteininteraktion in verschiedenen Expressionsstadien** Die räumlich aufgelöste FRET-Darstellung zu verschiedenen Zeitpunkten der Proteinexpression belegt die frühe Zusammenlagerung der TRPC6-Untereinheiten im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat. Die konfokale FRET-Darstellung bestätigt FRET-Signale über den Endomembranen bei hoher räumlicher Auflösung. Aufgrund der durch *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) belegten Mobilität der TRPC6-Kanäle innerhalb der Plasmamembran erfolgte die konfokale FRET-Darstellung zur Minimierung von Bewegungsartefakten auf Basis eines spektralen Dekonvolutionsverfahrens. Die Quantifizierung der FRET-Effizienz erfolgte unter Berücksichtigung der photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzproteine mittels Akzeptor-Bleichen im Rahmen der digitalen Videomikroskopie.

Der hier erbrachte, nicht-destruktive Assemblierungsnachweis ermöglicht die Untersuchung der Dynamik der Kanalassemblierung (z.B. nach Agonisten-Zugabe) auch in subzellulären Kompartimenten.

**Spezifität und erweiterte Anwendung des FRET als Multimerisierungsnachweis in lebenden Zellen** Die schwache Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Expressionsniveau der fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten belegt die Spezifität dieses Protein-Protein-Interaktionsnachweises. Die Wahrscheinlichkeit eines FRET-Signals als Folge lokaler Proteinanhäufungen war angesichts der konfokalmikroskopisch belegten homogenen Membranverteilung und der oben genannten Mobilität der fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten innerhalb der Plasmamembran als sehr gering einzustufen. Der hier vorgestellte kompetitive FRET-Nachweis belegt die Entkopplung von FRET zwischen

## 6 Zusammenfassung

fluoreszierenden TRPC6-Untereinheiten durch koexprimierte TRPC6-Wildtyp-Untereinheiten nicht jedoch durch TRPC4 $\beta$ . Er ist somit nicht nur ein weiterer Spezifitätsnachweis für den FRET, sondern ermöglicht den Interaktionsnachweis zwischen mehr als zwei verschiedenen Proteinen in nur einem Messschritt unter zusätzlicher Berücksichtigung ihrer Affinität zueinander. Dieses Verfahren kann auch die Untersuchung der Dynamik von Affinitäten zwischen unterschiedlichen Untereinheiten eines Proteinkomplexes z.B. nach Agonistenzugabe ermöglichen.

**Analyse der Stöchiometrie des TRPC6** Die hier vorgestellte Methode der Stöchiometrie-Analyse durch Korrelation von FRET-Effizienz und dem quantitativen Verhältnis Donor- zu Akzeptorfluorochrom-markierter TRPC6-Untereinheiten deutet auf eine tetramere Struktur des TRPC6 und deckt sich mit Ergebnissen aus biochemischen und FRET-basierten Multimerisierungsuntersuchungen der TRP-Familie. Im Gegensatz zu den meisten bisher publizierten Multimerisierungsnachweisen gestattet das hier vorgestellte Verfahren Beurteilungen von Proteinstöchiometrien sowohl in der Plasmamembran als auch in subzellulären Kompartimenten lebender Zellen und schließt die Möglichkeit von Untersuchungen einer Dynamik von Proteinstöchiometrien ein.

## Literaturverzeichnis

Arniges M, Fernández-Fernández JM, Albrecht N, Schaefer M, Valverde MA. (2006) Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem.* **3**:1580-6.

Barnard EA (1992) Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem Sci* **17**: 368-374.

Baysal K, Jung DW, Gunter KK, Gunter TE, Brierley GP (1994) Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca<sup>2+</sup>/2Na<sup>+</sup> exchanger. *Am J Physiol* **266**: C800-C808.

Bengtson CP, Tozzi A, Bernardi G, Mercuri NB (2004) Transient receptor potential-like channels mediate metabotropic glutamate receptor EPSCs in rat dopamine neurones. *J Physiol* **555**: 323-330.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11-21.

Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**: 151-171.

Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptor coupled by the Gq class of G-protein. *J Biol Chem* **272**:29672-29680.

Brereton HM, Harland ML, Auld AM, Barritt GJ (2000) Evidence that the TRP-1 protein is unlikely to account for store-operated Ca<sup>2+</sup> inflow in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Cell Biochem* **214**: 63-74.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.

Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**:793-8.

Chudakov DM, Lukyanov KA (2003) Use of green fluorescent protein (GFP) and its homologs for *in vivo* protein motility studies. *Biochemistry (Mosc)* **68**: 952-957.

Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.

Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517-524.

Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D (2003) International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* **55**: 591-596.

Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**: 387-396.

Cole NB, Smith CL, Sciaky N, Terasaki M, Edidin M, Lippincott-Schwartz J (1996) Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* **273**: 797-801.

Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448-455.

De Giorgi F, Brini M, Bastianutto C, Marsault R, Montero M, Pizzo P, Rossi R, Rizzuto R (1996) Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles. *Gene* **173**: 113-137.

Engelke M, Friedrich O, Budde P, Schäfer C, Niemann U, Zitt C, Jüngling E, Rocks O, Lückhoff A, Frey J. (2002) Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1 beta. *FEBS Lett.* **523**:193-9.

## Literaturverzeichnis

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. (2006) A mutation in Orai 1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. **441**:179-85.

Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Physik* **2**: 55-75.

Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice. *Nat Cell Biol* **3**: 121-127.

García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sánchez E, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* **24**: 5307-5314.

Goel M, Sinkins WG, Schilling WP (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **277**: 48303-48310.

Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, Hopfer U, Schilling WP. (2007) Vasopressin-induced membrane trafficking of TRPC3 and AQP2 channels in cells of the rat renal collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. **293**:F1476-88.

Griesbeck O (2004) Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 636-641.

Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, Gavin CE (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* **267**: C313-C339.

Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* **8**: 643-651.

Harteneck, C., Plant, T. D., & Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.*, 23, 159–166.

## Literaturverzeichnis

Heim R, Prasher DC, Tsien RY (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12501-12504.

Hellwig N, Plant TD, Janson W, Schäfer M, Schultz G, Schaefer M (2004) TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *J Biol Chem* **279**: 34553-34561.

Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* **118**: 917-928.

Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ (2003) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* **22**: 776-785.

Hofmann F, Lacinová L, Klugbauer N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **139**:33-87.

Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**: 259-263.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2000) Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem J* **351**: 115-122.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7461-7466.

Hoppe A, Christensen K, Swanson JA. (2002) Fluorescence resonance energy transfer-based stoichiometry in living cells *Biophys J.* **83**:3652-64.

Huang CL (2004) The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol* **15**:1690-1699.

## Literaturverzeichnis

Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* **89**: 1145-1153.

Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha$ 1-adrenoceptor-activated  $Ca^{2+}$ -permeable cation channel. *Circ Res* **88**: 325-332.

Inouye S, Tsuji FI (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* **341**: 277-280.

Johnson FH; Shimomura O; Saiga Y; Gershman LC; Reynolds GT, Water JR (1962) Quantum efficiency of Cybridina luminescences, with a note on that of *Aequorea*. *J Comp Cell Physiol* **60**: 85-103.

Jones WJ (1998) Overview of voltage-operated calcium channels. *J Bioenerg Biomemb* **30**: 299-312.

Jung S, Strotmann R, Schultz G, Plant TD (2002) TRPC6 is a candidate channel involved in receptorstimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C347-C359.

Kalish JE, Keller GA, Morrell JC, Mihalik SJ, Smith B, Cregg JM, Gould SJ (1996) Characterization of a novel component of the peroxisomal protein import apparatus using fluorescent peroxisomal proteins. *EMBO J* **15**: 3275-3285.

Kaupp UB, Niidome T, Tanabe T, Terada S, Bönigk W, Strühmer W, Cook NJ, Kangawa K, Matsuo H, Hirose T, Myata T, Numa S (1989) Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**: 762-766.

Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276**: 28613-28619.



Kenworthy AK. (2001) Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods*. **24**:289-96.

Keverne EB (2002) Pheromones, vomeronasal function, and gender-specific behavior. *Cell* **108**: 735-738.

Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S (1999) The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* **4**: 423-429.

Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Prssah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S (1998) Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* **396**: 478-482.

Kiselyov KI, Mamin AG, Semyonova SB, Mozhayeva GN (1997) Low-conductance high selective inositol (1,4,5)-trisphosphat activated Ca<sup>2+</sup> channels in plasma membrane of A431 carcinoma cells. *FEBS Lett* **407**: 309-312.

Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the *Shaker* potassium channel. *Nature* **392**: 945-948.

Kuno M, Gardener P (1987) Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature* **326**: 301-304.

Lenz JC, Reusch HP, Albrecht N, Schultz G, Schaefer M (2002) Ca<sup>2+</sup>-controlled competitive diacylglycerol binding of protein kinase C isoenzymes in living cells. *J Cell Biol* **159**: 291-301.

Lepage PK, Boulay G. (2007) Molecular determinants of TRP channel assembly. *Biochem Soc Trans*. **35**: 81-3.

Leypold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R (2002) Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6376-6381.

Liman ER, Corey DP, Dulac C (1999) TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5791-5796.

## Literaturverzeichnis

Lippincott-Schwartz J, Roberts TH, Hirschberg K (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 557-589.

Liu DT, Tibbs GR, Siegelbaum SA (1996) Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* **16**: 983-990.

Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6803-6808.

Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003) A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* **40**: 551-561.

Matz MV, Lukyanov KA, Lukyanov SA (2002) Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *Bioessays* **24**: 953-959.

McKay R, Szymeczek-Seay CL, Lievreumont JP, Bird GS, Zitt C, Jüngling E, Lückoff A, Putney JW Jr. (2000) Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRPC4 and TRPC3. *Biochem J* **351**: 735-746.

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**: 882-887.

Miyawaki A, Sawano A, Kogure T (2003) Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat Cell Biol* **5**: S1-S7.

Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **272**: re3.

Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* **230**: 1040-1043.

## Literaturverzeichnis

Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**: 1313-1323.

Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**: 2656-2662.

Neher E, Sakmann B (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fiber. *Nature* **260**: 779-802.

Neher RA, Neher E. (2004) Applying spectral fingerprinting to the analysis of FRET images. *Microsc Res Tech.* **64**:185-95.

Obukhov AG, Nowycky MC (2002) TRPC4 can be activated by G-protein-coupled receptors and provides sufficient Ca<sup>2+</sup> to trigger exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* **277**: 16172-16178.

Odell AF, Van Helden DF, Scott JL. (2008) The spectrin cytoskeleton influences the surface expression and activation of human transient receptor potential channel 4 channels. *J Biol Chem.* **283**:4395-407.

Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, Mori Y (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. *J Biol Chem* **274**: 27359-27370.

Okada, T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K. Mori Y (1998) Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca<sup>2+</sup> channel from mouse brain. *J Biol Chem* **273**: 10279-10287.

Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392-1395.

Patterson G, Day RN, Piston D (2001) Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* **114**: 837-838.

## Literaturverzeichnis

Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, Cahalan MD. (2008) The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*. **456**:116-20.

Penner R, Matthews G, Neher E (1988) Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature* **334**: 499-504.

Perozzo MA, Ward KB, Thompson RB, Ward WW (1988) X-ray diffraction and time-resolved fluorescence analyses of *Aequorea* green fluorescent protein crystals. *J Biol Chem* **263**: 7713-7716.

Philipp S, Cavalie A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M, Flockerzi V (1996) A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J* **15**: 6166-6171.

Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A, Flockerzi V (1998) A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* **17**: 4274-4282.

Philipp S, Trost C, Warnat J, Rautmann J, Himmerkus N, Schroth G, Kretz O, Nastainczyk W, Cavalie A, Hoth M, Flockerzi V (2000) TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca<sup>2+</sup>-like channels in adrenal cells. *J Biol Chem* **275**: 23965-23972.

Plant TD, Schaefer M. (2003) TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium*. **33**:441-50.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233.

Preuß KD, Nöller JK, Krause E, Gobel A, Schulz I (1997) Expression and characterization of a *trpl* homolog from rat. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 167-172.

Ranganathan R, Malicki DM., Zuker CS (1995) Signal transduction in *Drosophila* photoreceptors. *Ann Rev Neurosci* **18**: 283-317.

Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR. (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.***37**:739-44.

Reits, E. A. J. & Neeffjes, J. N. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat. Cell Biol.*, 3, E145–E147.

Roderick HL, Campbell AK, Llewellyn DH (1997) Nuclear localisation of calreticulin in vivo is enhanced by its interaction with glucocorticoid receptors. *FEBS Lett* **405**: 181-185.

Sakura H, Ashcroft FM (1997) Identification of four *trp1* gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia* **40**: 528-532.

Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G (2000) Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* **275**: 17517-17526.

Schaefer M, Plant TD, Stresow N, Albrecht N, Schultz G (2002) Functional differences between TRPC4 splice variants. *J Biol Chem* **277**: 3752-3759.

Sel S, Rost BR, Yildirim AO, Sel B, Kalwa H, Fehrenbach H, Renz H, Gudermann T, Dietrich A. (2008) Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response. *Clin Exp Allergy*. **38**:1548-58.

Shimomura O (1979) Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett* **104**: 220-222.

## Literaturverzeichnis

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239.

Shulga N, Roberts P, Gu Z, Spitz L, Tabb MM, Nomura M, Goldfarb DS (1996) In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol* **135**: 329-339.

Sinkins WG, Estacion M, Schilling WP (1998) Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. *Biochem J* **331**: 331-339.

Sinnecker D, Voigt P, Hellwig N, Schaefer M (2005) Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins. *Biochemistry* **44**: 7085-7094.

Smyth et al., 2006

Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* **295**: 1493-1500.

Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**: 645-655.

Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**: 819-846.

Thaler C, Vogel SS, Ikeda SR, Chen H. (2006) Photobleaching of YFP does not produce a CFP-like species that affects FRET measurements. *Nat Methods*. **3**:491

Tozzi A, Bengtson CP, Longone P, Carignani C, Fusco FR, Bernardi G, Mercuri NB (2003) Involvement of transient receptor potential-like channels in responses to mGluR-I activation in midbrain dopamine neurons. *Eur J Neurosci* **18**: 2133-2145.

## Literaturverzeichnis

Tsien RW, Tsien RY (1990) Calcium channels, stores and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* **6**: 715-760.

Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544.

Ulbrich MH, Isacoff EY. (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat Methods*. **4**:319-21.

Valentin G, Verheggen C, Piolot T, Neel H, Coppey-Moisan M, Bertrand E. (2005) Photoconversion of YFP into a CFP-like species during acceptor photobleaching FRET experiments. *Nat Methods*. **2**: 801.

Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L (1999) Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2060-2064.

Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L (1998) The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem* **273**: 8675-8679.

Vazquez G, Lievremont JP, St J Bird G, Putney JW Jr (2001) Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11777-11782.

Venkatachalam K, Ma HT, Ford DL, Gill DL (2001) Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor InsP3 knockout cells. *J Biol Chem* **276**: 33980-33985.

Venkatachalam K, Montell C. (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem*. **76**:387-417.

## Literaturverzeichnis

Vennekens R, Voets T, Bindels RJ, Droogmans G, Nilius B (2002) Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* **31**: 253-264.

von Tscharner V, Prod'homme B, Baggiolini M, Reuter H (1986) Ion channel in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration. *Nature* **324**: 369-372.

Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2004) Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 396-401.

Vogel SS, Thaler C, Koushik SV. (2006) Fanciful FRET. *Sci STKE*. **331**: re2.

Voigt, P., Brock, C., Nürnberg, B., & Schaefer, M. (2005). Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, 280, 5121–5127.

Wang S, Hazelrigg T (1994) Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* **369**: 400-403.

Ward WW, Prentice HJ, Roth AF, Cody CW, Reeves SC (1982) Spectral perturbations of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* **35**: 803–808.

Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalie A (1999) Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of  $Ca^{2+}$ . *J Physiol* **518**: 631-638.

Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrescu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T. (2006) TRPC6 is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**:19093-8.



## Literaturverzeichnis

Weitz D, Ficek N, Kremmer E, Bauer PJ, Kaupp UB (2002) Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron* **36**: 881-889.

Wes P, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9652-9656.

Wiemer EA, Wenzel T, Deerinck TJ, Ellisman MH, Subramani S (1997) Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. *J Cell Biol* **136**: 71-80.

Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. (2005) A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*. **308**:1801-4.

Wissenbach U, Bosse-Doenecke E, Freise D, Ludwig A, Murakami M, Hofmann F, Flockerzi V. (1998) The structure of the murine calcium channel gamma-subunit gene and protein. *Biol Chem*. **379**:45-50

Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **14**: 1246-1251.

Yang TT, Sinai P, Green G, Kitts PA, Chen YT, Lybarger L, Chervenak R, Patterson GH, Piston DW, Kain SR (1998) Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* **273**: 8212-8216.

Yau KW (1994) Cyclic nucleotide-activated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3481-3483.

## Literaturverzeichnis

Zaccolo M (2004) Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses. *Circ Res* **94**: 866-873.

Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 906-918.

Zhang Z, Tang J, Tikunova S, Johnson JD, Chen Z, Qin N, Dietrich A, Stefani E, Birnbaumer L, Zhu MX (2001) Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3168-3173.

Zheng J, Trudeau MC, Zagotta WN (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* **36**: 891-896.

Zheng J, Zagotta WN (2004) Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **42**: 411-421.

Zhong H, Molday LL, Molday RS, Yau KW (2002) The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry. *Nature* **420**: 193-198.

Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1996) *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell* **85**: 661-671.

Zitt C, Obukhov AG, Strubing C, Zobel A, Kalkbrenner F, Luckhoff A, Schultz G (1997) Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J Cell Biol* **138**: 1333-1341.

Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Lückhoff A, Schultz G (1996) Cloning and functional expression of a human Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel activated by store depletion. *Neuron* **16**: 1189-1196.

## Abkürzungsverzeichnis

cADPR	<i>cyclic ADP-ribose</i> , zyklische ADP-Ribose
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
CCD	<i>charge-coupled device</i> , ladungsgekoppeltes Bauteil
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> , GFP-Farbvariante
CRAC	<i>calcium-release-activated calcium channel</i> , durch Calciumfreisetzung gesteuerter Kanal
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated channel</i> , durch zyklische Nukleotide gesteuerter Kanal
DAG	Diacylglycerol
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i> , Fluoreszenzerholung nach lichtinduzierter Bleichung
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
G-Protein	regulatorisches heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
HBS	HEPES-buffered saline, HEPES-gepufferte Salzlösung
HEK293-Zellen	<i>human embryonic kidney</i> -Zellen
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, 4-(2-(Hydroxyethyl)- Piperazin-1-Ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MEM	<i>minimal essential medium</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

## Anhang

RTK	Rezeptortyrosinkinasen
RyR	Ryanodin-Rezeptore
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumlaurylsulfat
SMOC	<i>second messenger-operated channel</i> , durch sekundäre Botenstoffe gesteuerter Kanal
SOC	<i>store-operated channel</i> , durch Speicherentleerung gesteuerter Kanal
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TIRFM	<i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>
TRP	<i>transient receptor potential channels</i> , Familie von Kationenkanälen
TRPC	<i>canonical transient receptor potential channels</i> , klassische TRP-Kanäle
VOC	<i>voltage-operated channel</i> , Spannungsgesteuerter Kanal
wt	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , GFP-Farbvariante

## **Lebenslauf**

In der elektronischen Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten

## **Publikation**

Amiri H, Schultz G, Schaefer M (2003) FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium* **33**: 463-470.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Michael Schaefer danke ich für die ausgezeichnete Betreuung meines Promotionsvorhabens und die unermüdliche Bereitschaft zu Hilfe in theoretischen und praktischen Belangen.

Herrn Prof. Dr. Günter Schultz danke ich für konstruktive Kritik, Beratung und Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der AG Schaefer danke ich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

## **Erklärung**

„Ich, Hemasse Amiri, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Fluorometrische Analyse der Assemblierung des Calcium-permeablen Kationenkanals TRPC6* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift