

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

DISSERTATION

Calcium-abhängige Translokation der Phospholipase C- β_{1a}
aus der Plasmamembran

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Umut Yilmaz

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. M. Schaefer
 2. Prof. Dr. W. M. Kübler
 3. Priv.-Doz. Dr. R. Schülein

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Intrazelluläre Signaltransduktion: physiologische, pathophysiologische und pharmakologische Bedeutung	6
1.2	Calcium-vermittelte Signaltransduktion.....	8
1.3	Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die β -Isoformen der Phospholipasen C	9
1.4	Domänenstruktur der Phospholipase C-Isoformen	10
1.5	Subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β_{1a}	11
1.6	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Enzyme, Reaktionssysteme und Kits.....	14
2.1.3	Plasmide	14
2.1.4	Zellen.....	15
2.1.5	Medien, Puffer, Lösungen.....	15
2.1.6	Sonstige Materialien	16
2.2	Methoden: Überblick.....	17
2.3	Molekularbiologische Methoden	18

2.3.1	Expressionsplasmide für Säugetierzellen	18
2.3.2	Herstellung N-terminal trunktierter Konstrukte der PLC- β_{1a}	19
2.3.3	Ortsgerichtete Mutagenese zur Herstellung C-terminal trunktierter Konstrukte der PLC- β_{1a}	19
2.4	Zellkultur und Transfektion	21
2.4.1	Zelllinien und Kultivierung.....	21
2.4.2	Transiente Transfektion.....	21
2.5	Fluoreszenz-Imaging	21
2.5.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	21
2.5.2	TIRF-Mikroskopie	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β_{1a} und Ca^{2+} -vermittelte Translokation.....	23
3.1.1	Subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β -Isoformen PLC- β_{1a} , PLC- β_2 und PLC- β_3	23
3.1.2	TRPV1-vermittelte Translokation der Phospholipase C- β_{1a} aus der Plasmamembran.....	25
3.1.3	Ca^{2+} -Abhängigkeit der TRPV1-vermittelten Translokation.....	26
3.1.4	Histamin-Rezeptor-vermittelte Translokation der Phospholipase C- β_{1a}	28
3.1.5	Unabhängigkeit der Membranbindungseffizienz der Phospholipase C- β_{1a} von der $G\alpha_q$ -Untereinheit G-Proteingekoppelter Rezeptoren	29
3.1.6	Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation der Phospholipase C- β_{1a} von der Umgebungsmolarität.....	31
3.2	Chlorpromazin-induzierte Translokation der Phospholipase C- β_{1a}	33

3.3	Bestimmung der für die Membranbindung und Translokation der Phospholipase C- β_{1a} verantwortlichen Domäne	35
4	Diskussion	41
4.1	Subzelluläre Lokalisation und Membranbindungsdomäne der Phospholipase C- β_{1a}	42
4.2	Membranbindungseigenschaften der Phospholipase C- β_{1a}	44
4.3	Regulation der PLC- β_{1a} -Aktivität durch Translokation aus der Plasmamembran	45
4.4	Hinweise auf Relevanz in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen	49
5	Zusammenfassung	53
	Literaturverzeichnis	54
	Abkürzungsverzeichnis	62
	Lebenslauf	63
	Danksagung	64
	Erklärung	65

1 Einleitung

Die Isoformen der Familie der Phospholipasen C- β sind Teile intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die eine zentrale Stellung in der Weiterleitung Calcium-abhängiger Signale nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren einnehmen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind die subzelluläre Lokalisation und das Verhalten der Isoform Phospholipase C- β_{1a} (PLC- β_{1a}) während intrazellulärer Signaltransduktionsvorgänge. Im folgenden soll zunächst orientierend die allgemeine Bedeutung der intrazellulären Signaltransduktion in der Medizin dargestellt werden, bevor näher auf den aktuellen Kenntnisstand zum Signaltransduktionsweg der Phospholipase C- β_{1a} und seiner biologischen Funktion eingegangen wird.

1.1 Intrazelluläre Signaltransduktion: physiologische, pathophysiologische und pharmakologische Bedeutung.

Eine Grundvoraussetzung für die Funktion des menschlichen Körpers wie der aller vielzelligen Organismen ist die Fähigkeit seiner spezialisierten Zellen verschiedene Informationen auch ohne direkten Kontakt und über größere Distanzen untereinander auszutauschen. Auf neuronalem Weg wird so beispielsweise das Signal für eine Bewegung aus der motorischen Hirnrinde über das Rückenmark und die peripheren Nerven bis zu den Muskelzellen übertragen, die sich zur Durchführung der gewünschten Bewegung kontrahieren müssen. Auch humoral können Signale über den Blutkreislauf mit Hilfe von Hormonen an die jeweiligen Zielzellen vermittelt werden. So wird zum Beispiel der Blutzuckerspiegel u.a. durch das Hormon Insulin reguliert, das von den β -Zellen des Pankreas ins Blut sezerniert wird und mit diesem zu seinen Zielzellen transportiert werden muss, die ihre Glucoseaufnahme aus dem Blut dann entsprechend anpassen.

Gemeinsam ist diesen Signalübertragungsmechanismen, dass die meisten Hormone und Neurotransmitter nicht in ihre jeweiligen Zielzellen eindringen, sondern an deren Plasmamembran an Rezeptoren binden, die das entsprechende Signal in das Innere der Zelle weiterleiten. Die auf diese Rezeptoraktivierung folgende Kaskade an biochemischen Reaktionen in der Zelle wird als intrazelluläre Signaltransduktion bezeichnet.

1 Einleitung

Störungen der Signaltransduktion können unmittelbar zu pathologischen Veränderungen in den Funktionen des menschlichen Körpers führen. Dies zeigt sich insbesondere dann eindrucksvoll, wenn Veränderungen Membranrezeptoren betreffen und somit am Anfang solcher Kaskaden stehen. Das klinische Bild einer Hyperthyreose beispielsweise kann durch Fehlfunktionen am Rezeptor des Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSH) verursacht werden. So entsteht ein Teil der autonomen Schilddrüsenadenome durch Mutationen im TSH-Rezeptor-Gen, die zur Expression eines konstitutiv, d.h. von der Ligandenbindung unabhängig, aktiven Rezeptors führen. Auch in der Pathogenese der hyperthyreoten Stoffwechsellage beim Morbus Basedow ist der TSH-Rezeptor involviert. Dabei bildet der Körper Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor, die diesen bei der Bindung fälschlich aktivieren und somit ein TSH-Signal in der Schilddrüsenzelle erzeugen, das zu einer verstärkten Produktion von Schilddrüsenhormonen führt.

Komplexere Störungen der intrazellulären Signaltransduktion, die über Veränderungen an den Membranrezeptoren hinausgehen, sind häufig gerade an der Ätiologie von derzeit noch schwer behandelbaren Krankheiten wie bösartigen Neubildungen oder chronisch degenerativen Erkrankungen beteiligt. So verdichten sich beispielsweise in den letzten Jahren Hinweise, dass Störungen der intrazellulären Calciumhomöostase, einem wichtigen Faktor in der intrazellulären Signaltransduktion, an der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Parkinson oder Chorea Huntington beteiligt sind (Bezprozvanny, 2009).

Die medizinische Relevanz der Erforschung dieser Signalwege liegt dabei nicht allein im Verständnis der Pathophysiologie, sondern auch in der Entwicklung pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten. Die Mehrzahl der heute genutzten Pharmaka entfalten ihre Wirkung an den Plasmamembranrezeptoren außerhalb der Zelle. Noch vor 15 Jahren schätzte man, dass allein die Untergruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Angriffspunkt für 50 bis 60% der klinisch eingesetzten Medikamente ist (Gudermann *et al.*, 1995). Dabei ist die pharmakologische Beeinflussung von Plasmamembranrezeptoren in mehrerer Hinsicht unspezifisch. Da die Rezeptoren am Anfang der intrazellulären Signalkaskade stehen, wirken sich die Veränderungen auch auf alle nachfolgenden Signalprozesse aus, selbst wenn der gewünschte Effekt nur einen Ast der Signalkaskade betreffen sollte. Zudem können die gleichen Rezeptoren mit unterschiedlichen Zielpunkten in verschiedenen Zelltypen vorhanden sein, so dass die Blockade eines Rezeptors neben der erwünschten Wirkung in einem Zelltyp auch unerwünschte Wirkun-

gen in anderen Zelltypen verursachen kann (wie z.B. die Obstipation bei analgetischer Behandlung mit Opioiden).

Mit zunehmendem Wissen über die intrazellulären Signaltransduktionskaskaden wird daher in den letzten Jahren vermehrt nach Möglichkeiten gesucht mit Hilfe sogenannter „small molecule inhibitors“, kleiner chemischer Verbindungen, die in der Lage sind die Plasmamembran zu durchdringen, intrazellulär spezifisch einzelne Äste dieser Kaskaden durch Blockierung der Interaktionen zwischen den beteiligten Signalproteinen zu beeinflussen (Blazer & Neubig, 2009). Diese Spezifität wiederum kommt jedoch zum Preis einer fehlenden Gewebs- bzw. Zelltyp-Selektivität, da die gleichen intrazellulären Signalkaskaden in unterschiedlichen Zelltypen teilweise durch unterschiedliche Rezeptoren aktiviert werden.

1.2 Calcium-vermittelte Signaltransduktion

Ein gemeinsamer Zwischenschritt vieler verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden ist die dynamische Änderung der cytosolischen Calciumkonzentration, die in ruhenden Zellen deutlich unterhalb der extrazellulären liegt (ca. 100 nM cytosolisch im Vergleich zu ca. 1 mM extrazellulär). Zwei der Hauptmechanismen, die diesem Zweck dienen, sind zum Einen die Öffnung von Calciumkanälen in der Zellmembran, durch die dann extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen dem Konzentrationsgradienten folgend in die Zelle diffundieren können und zum Anderen die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speicherorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum. Während die beim transmembranären Calciumeinstrom beteiligten Rezeptoren teilweise selbst als Ionenkanäle fungieren und die Rezeptorbindung über eine Konformationsänderung im Molekül zur einer Öffnung des Kanals führt, erfolgt die Öffnung der Calciumkanäle des endoplasmatischen Retikulums erst durch die Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3), das nach dem rezeptoraktivierten Ablauf einer Signalkaskade unter Beteiligung mehrerer intrazellulärer Proteine in der Zelle gebildet wird.

1.3 Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die β -Isoformen der Phospholipasen C

Einer dieser Signalwege, der zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führt, ist die Aktivierung der β -Isoformen der Phospholipasen C durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spielen unter den Membranrezeptoren sowohl quantitativ in der Biologie als auch pharmakologisch in der Medizin eine herausragende Rolle.

Sie besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal sieben Transmembrandomänen und leiten ein extrazelluläres Signal über die Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen in das Innere einer Zelle weiter. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, der α -, β - und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit ist in der Lage die Guaninnukleotide Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP) zu binden und zudem durch seine intrinsische GTPase-Aktivität die Hydrolyse von GTP zu GDP zu katalysieren. Die Interaktion mit den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren verläuft nun derart, dass diese nach Ligandenbindung als GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) den Austausch des an die α -Untereinheit gebundenen GDP durch GTP bewirken. Das heterotrimere G-Protein wird dadurch aktiviert, löst sich vom Rezeptor und zerfällt in seine α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Diese assoziieren mit ihren jeweiligen Effektorproteinen, die sie aktivieren oder deaktivieren und geben auf diese Weise das Signal innerhalb der Signalkaskade weiter. Die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit sorgt, eventuell verstärkt durch GTPase aktivierende Proteine (GAP), für die Spaltung von GTP zu GDP, wodurch die α -Untereinheit wieder deaktiviert wird und erneut mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit und dem Rezeptor assoziiert.

Die Familie der Phospholipasen C- β wird durch die $G\alpha_q$ -Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert und katalysiert in der Folge die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die intrazellulären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3) und Diacylglycerol.

Die Phospholipasen C- β werden in die Untergruppen Phospholipase C- β_{1-4} eingeteilt. Diese unterscheiden sich u.a. in ihrer Aktivierbarkeit durch $G\alpha_q$ und in ihrer Gewebeverteilung. Am weitesten verbreitet ist die PLC- β_1 , die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Sie existiert in zwei Spleißvarianten, der PLC- β_{1a} (1216 Aminosäuren) und PLC- β_{1b} (1173 Aminosäuren), die beide besonders stark im Hirnparenchym exprimiert werden und sich lediglich in den letzten 64 bzw. 31 Aminosäuren ihres C-Terminus unterschei-

1 Einleitung

den (Rebecchi & Pentylala, 2000). Zudem ist für die PLC- β_1 gezeigt worden, dass sie im Sinne eines Regulationsmechanismus eine eigene GAP-Aktivität besitzt, die die Abschaltung des durch das aktivierte $G\alpha_q$ -vermittelten Signals beschleunigt (Berstein *et al.*, 1992; Biddlecome *et al.*, 1996; Chidiac & Ross, 1999).

Erste Erkenntnisse bezüglich der physiologischen Funktion der PLC- β_1 konnten aus Knockout-Experimenten gewonnen werden. Diese zeigten, dass das Fehlen des PLC- β_1 -Gens in Mäusen einen Phänotyp mit starker Neigung zu epileptiformen Anfällen hervorbringt, die schließlich zum Tod führen (Kim *et al.*, 1997). Auch eine Beteiligung an der Freisetzung von Endocannabinoiden aus hippocampalen Neuronen (Hashimoto *et al.*, 2005) und an der Differenzierung des somatosensorischen Cortex (Hannan *et al.*, 2001) ist bekannt. Darüber hinaus ist in einem aktuellen Fallbericht erstmals eine humane Mutation des PLC- β_1 -Gens in einem Kind mit frühkindlicher epileptischer Enzephalopathie nachgewiesen worden (Kurian *et al.*, 2010).

Da sich die konsequente Unterscheidung der Spleißvarianten in der Literatur erst in den letzten Jahren durchgesetzt hat und sich frühere Arbeiten zur PLC- β_1 in der Regel auf die PLC- β_{1a} beziehen, wurde in dieser Arbeit zunächst die Spleißvariante PLC- β_{1a} untersucht.

1.4 Domänenstruktur der Phospholipase C-Isoformen

Unter den bisher bekannte 14 Isoformen der Phospholipasen C unterscheidet sich die Familie der Phospholipasen C- β durch einen deutlich verlängerten C-Terminus. Gemeinsames Strukturmerkmal aller Isoformen sind die durch unterschiedlich lange Peptidketten voneinander getrennten X- und Y-Regionen, denen die katalytische Aktivität der Phospholipasen zugeschrieben wird. Abb. 1.1 zeigt schematisch die Domänenstruktur der verschiedenen PLC-Isoformen. Weitere gemeinsame Domänen, die alle bzw. die meisten Isoformen enthalten, sind die C2- und die Pleckstrin-homologe (PH)-Domäne, welchen in anderen Proteinen eine Beteiligung an einer jeweiligen Membranbindung nachgewiesen worden ist (Rhee, 2001). Die γ - und ϵ -Isoformen der Phospholipasen C besitzen darüber hinaus spezifische Domänen die für ihre Interaktion mit Proteinen aus ihrer jeweiligen Signalkaskade notwendig sind. So ermöglichen die SH2- und SH3-Domänen der PLC- γ die Teilnahme am Signalweg nach Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen. Die PLC- ϵ interagiert mit dem kleinen G-Protein Ras über seine „Ras association“ (RA)- und RasGEF-Regionen.

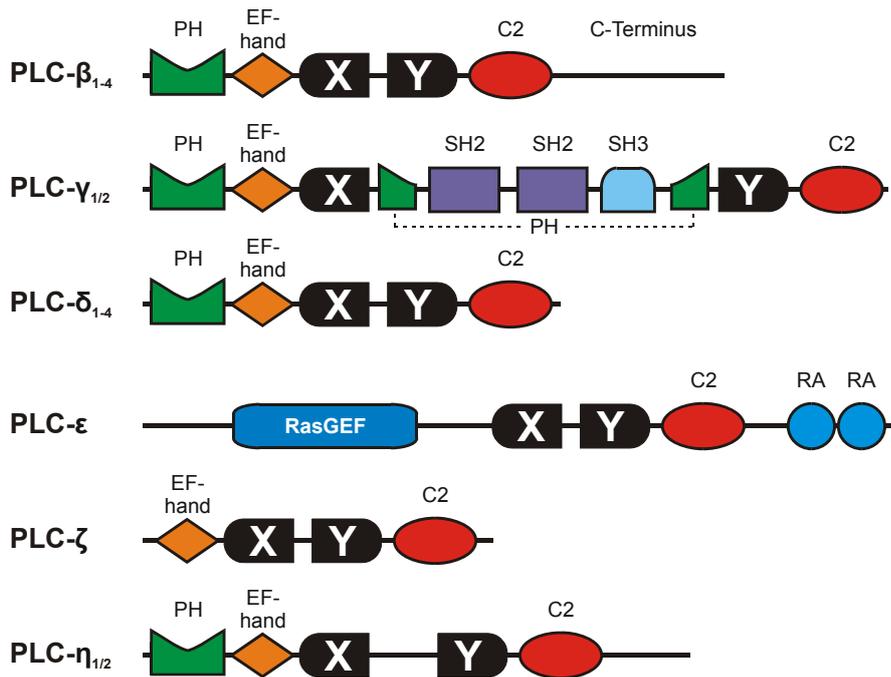


Abbildung 1.1: Domänenstruktur der PLC-Isoformen. Modifiziert nach Rhee, 2001 und Nakahara *et al.*, 2005).

1.5 Subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C-β_{1a}

Die Weiterleitung eines Signals innerhalb einer zellulären Signalkaskade beruht auf der Interaktion aufeinanderfolgender Signalmoleküle der entsprechenden Kaskade. Chemisch betrachtet müssen diese Moleküle dafür zunächst eine Bindung eingehen. Anschließend kann das Signal im Falle von Proteinen beispielsweise durch Konformationsänderung im Zielprotein oder durch eine vom Effektorprotein katalysierte Reaktion am Zielprotein übertragen werden. Die Weiterleitung eines Signals innerhalb einer Kaskade kann durch verschiedene Eigenschaften wie Geschwindigkeit, Dauer, Robustheit und Effizienz weiter charakterisiert werden, die wiederum die weitere Zellantwort beeinflussen können und somit einen Teil des Signals darstellen. Diese Differenzierung wird von den Eigenschaften der beteiligten Signalmoleküle bestimmt. So kann die Geschwindigkeit, mit der ein Signal von einem Signalmolekül auf das nächste in der Kaskade übertragen wird, von der räumlichen Entfernung der Signalmoleküle und ihrer Bindungseffizienz abhängen. Beispielsweise ist gezeigt worden, dass die unterschiedliche Geschwindigkeit bei der Weiterleitung von Signalen klassischer und neuer Proteinkinase C-Isoformen auf einer unterschiedlichen Dauer bis zur Translokation an die Plasma-

membran beruht, die wiederum in einer unterschiedlichen Bindungseffizienz begründet ist (Schaefer *et al.*, 2001; Lenz *et al.*, 2002).

Im Fall der PLC- β_{1a} befinden sich sowohl ihr Substrat, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), als auch ihr Aktivator G α_q in der Plasmamembran (Rebecchi & Penzala, 2000). Zur Lokalisation der PLC- β_{1a} selbst wurden in der Literatur jedoch unterschiedliche Aussagen getroffen. So wurde nachgewiesen, dass die PLC- β_1 nach Aufschluss von COS-7-Zellen und Western-Blot-Analyse der unterschiedlichen Fraktionen hauptsächlich im Bereich der partikulären Zell-Fraktion zu finden war (Wu *et al.*, 1993). Auch vorrangig cytosolische (Bahk *et al.* 1998) oder nukleäre Lokalisationen (Martelli *et al.*, 1992; Divecha *et al.*, 1993) sind beschrieben worden.

1.6 Zielsetzung

Die Bedeutung der Lokalisation von Signalproteinen innerhalb verschiedener Zellkompartimente für die Weiterleitung intrazellulärer Signale ist oben bereits dargestellt worden. Bisherige Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der PLC- β_{1a} waren mit unterschiedlichen Resultaten (s. Kapitel 1.4) aber stets mit Hilfe biochemischer Methoden durchgeführt geworden, die das Aufspalten der Zellen zur Analyse der einzelnen Zellkompartimente bezüglich des Vorhandenseins des Proteins erfordert hatten. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der PLC- β_{1a} und ihres Verhalten während intrazellulärer Signaltransduktionsvorgänge mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden in lebenden Zellen.

Dazu wurden die Methoden der transienten Transfektion immortalisierter Zelllinien mit Plasmiden, die für Fusionsproteine aus Varianten des *green fluorescent protein* (GFP) und der PLC- β_{1a} kodieren in Verbindung mit der konfokalen Laser-Scanning und TIRF-Mikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence) genutzt.

Weitere Ziele der Arbeit waren die Charakterisierung der im ersten Teil der Arbeit beobachteten Membranbindung der PLC- β_{1a} in ruhenden Zellen und ihrer Ca²⁺-abhängigen Translokation. Auch zur Lokalisation der Membranbindungsdomäne innerhalb der PLC- β_{1a} gab es in der Literatur divergierende Angaben. Sie sollte daher ebenfalls mit fluoreszenzmikroskopischen und molekularbiologischen Methoden kartiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Capsaicin	Calbiochem, Merck Biosciences, Schwalbach
Chlorpromazin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desipramin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl-N,N, N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid (1 %)	Roth, Karlsruhe
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fluoxetin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
fötales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe
Haloperidol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan- sulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Meta-Chlorphenylpiperazin (m-CPP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MEM Earle's-Medium	PAN, Aidenbach

2 Material und Methoden

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Penicillin	Serva, Heidelberg
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Serva, Heidelberg
Tetracain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
U-73122	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Verapamil	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Enzyme, Reaktionssysteme und Kits

Restriktionsendonukleasen	New England Biolab., Beverly, USA
T4-DNA Ligase	New England Biolab., Beverly, USA
Expand High Fidelity PCR-System	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
QuickChange, site-directed mutagenesis kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Qiagen Spin Miniprep-Kit	Qiagen, Hilden, Germany
Nucleobond AX Maxiprep-Kit	Macherey-Nagel, Düren

2.1.3 Plasmide

pcDNA3	Invitrogen, Leek, NL
PLC- β_1 -YFP (Ratte)	AG Michael Schaefer, Berlin
PLC- β_2 -YFP (Ratte)	AG Michael Schaefer, Berlin
PLC- β_3 -YFP (Ratte)	AG Michael Schaefer, Berlin
CFP-PLC- β_1 (Ratte)	AG Michael Schaefer, Berlin
PKC ϵ -YFP (Ratte)	AG Michael Schaefer, Berlin
TRPV1 (Ratte)	AG Michael Schaefer, Berlin
H ₁ -Rezeptor (Ratte)	AG Christian Harteneck, Berlin
Gαq	AG Michael Schaefer, Berlin

2 Material und Methoden

2.1.4 Zellen

Kompetente Bakterien

E. coli "TOP 10"

Invitrogen, Karlsruhe

Eukaryotische Zelllinien

HEK293

American Type Culture Collection
(ATCC), Rockville, USA

HIT-T15

American Type Culture Collection
(ATCC), Rockville, USA

2.1.5 Medien, Puffer, Lösungen

Medium für die Zelllinien

MEM Earle's-Medium mit
fötalem Kälberserum 10 %
Glutamin 4 mM
Penicillin 100 U/ml
Streptomycin 100 µg/ml

LB-Flüssigmedium

Trypton 10 g/l
Hefeextrakt 5 g/l
NaCl 10 g/l
in H₂O; pH 7,4

LB-Agarplatten

Agar-Agar 1,5 %
in LB-Flüssigmedium

SOB-Medium

Trypton 20 g/l
Hefeextrakt 5 g/l
NaCl 0,5 g/l
KCl 2,6 mM
in H₂O; pH 7,0

2 Material und Methoden

SOC-Medium	MgCl ₂ (sterilfiltriert) 20 mM Glucose (sterilfiltriert) 20 mM in hitzesterilisiertem SOB-Medium
HBS-Puffer (mit oder ohne Ca ²⁺):	NaCl 128 mM KCl 6 mM MgCl ₂ 1 mM HEPES 10 mM Glucose 5,5 mM BSA 0,2 % entweder mit CaCl ₂ (1 mM) oder EGTA (2 mM) in H ₂ O; pH 7,4 mit NaOH
TBE (Tris-Borat/EDTA Elektrophorese-puffer)	Tris 100 mM Borsäure 100 mM EDTA 2,5 mM

2.1.6 Sonstige Materialien

FuGene 6 transfection reagent	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
1 kb-DNA-Standard	Gibco BRL, Rockville MD, USA
Glasplättchen rund, 24mm Durchmesser, 0,17 mm Dicke	Menzel, Braunschweig

2.2 Methoden: Überblick

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode für Experimente mit fluoreszierenden Fusionsproteinen nach heterologer Expression in lebenden Zellen ist schematisch in Abb. 2.1 dargestellt. Zunächst wurden mit Hilfe molekularbiologischer Methoden Plasmide aus Expressionsvektoren, der cDNA des zu untersuchenden Proteins und der cDNA eines fluoreszierenden Proteins basierend auf dem „green fluorescent protein“ aus der Qualle *Aequorea victoria* (Tsien, 1998) hergestellt.

Säugetierzellen aus kultivierten Zelllinien wurden dann mit diesen Plasmiden transfiziert und exprimierten in der Folge das fluoreszierende Fusionsprotein. Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden konnten dann an invertierten Mikroskopen unterschiedliche Experimente wie die in Abb. 2.1 schematisch dargestellte Messung der subzellulären Lokalisation eines Fusionsproteins in lebenden Zellen durchgeführt werden.

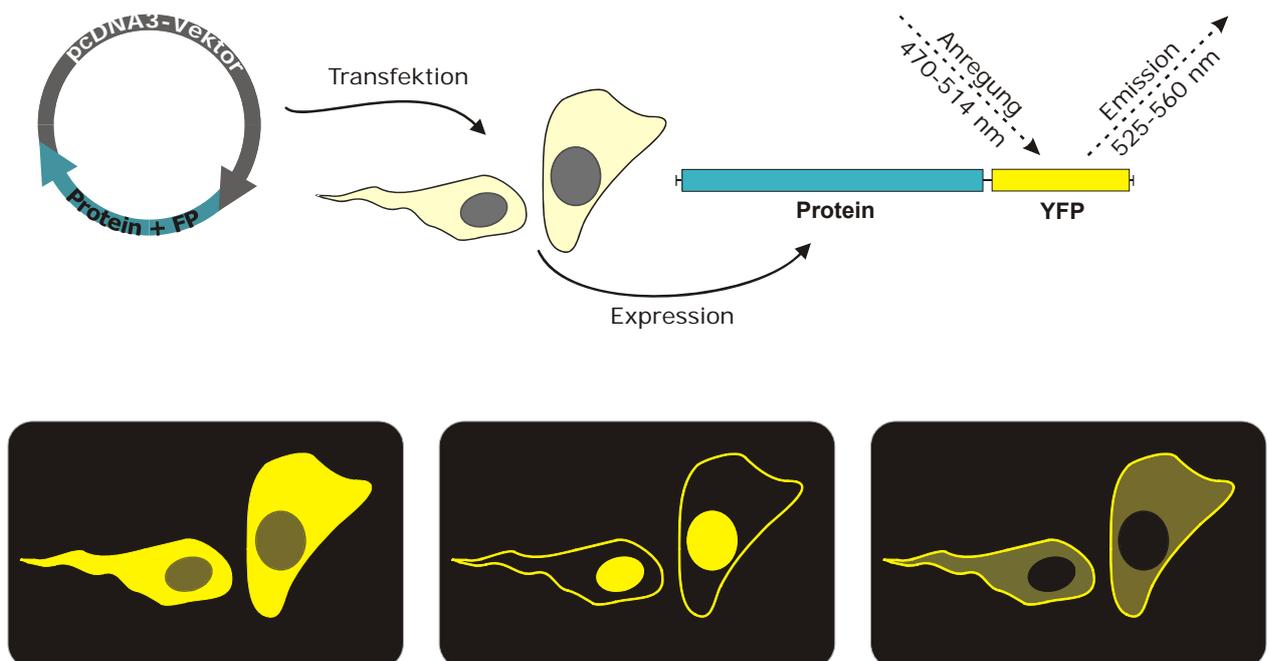


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Experimente mit fluoreszierenden Fusionsproteinen nach heterologer Expression in lebenden Zellen. Kultivierte Säugetierzellen werden mit den Plasmiden für fluoreszierende Fusionsproteine transfiziert und exprimieren nachfolgend die gewünschten Fusionsproteine. Nach Anregung des fluoreszierenden Anteils kann so mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden beispielsweise wie hier dargestellt die subzelluläre Lokalisation des Proteins bestimmt werden. Drei mögliche Verteilungsmuster sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Links: Lokalisation im Cytosol und geringer im Kern. Mitte: Lokalisation in der Plasmamembran und im Kern. Rechts: Lokalisation in der Plasmamembran und geringer im Cytosol.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Eine ausführliche Beschreibung der angewandten molekularbiologischen Standardmethoden findet sich bei Sambrook & Russel (2001).

2.3.1 Expressionsplasmide für Säugetierzellen

Für die heterologe Expression in Säugetierzellen wurden die Expressionsplasmide pcDNA3 und pcDNA3.1-V5/His-TOPO eingesetzt. Diese Plasmidvektoren enthalten für die Vermehrung in *E. coli* den Replikationsursprung ColE1 und eine Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion transformierter Bakterienklone. Zur Expression in eukaryoten Zellen besitzen sie einen CMV-Promotor und eine Polyadenylierungssequenz. pcDNA3.1-V5/His-TOPO besitzt als linearisierter Vektor zusätzlich an beiden Enden 3'-Desoxythymidin-Überhänge mit kovalent gebundener Topoisomerase I. Die Thymidin-Überhänge verhindern eine Religation des leeren Vektors. PCR-Produkte mit einem 3'-Desoxyadenosin-Überhang können dafür somit ohne weitere Ligase subkloniert werden. Nach Transformation in *E. coli* und Kultur auf Ampicillin-haltigem Nährboden können durch das Ampicillin-Resistenzgen diejenigen Bakterienklone selektiert werden, die das vollständige Expressionsplasmid enthalten. Aus diesen können anschließend nach weiterer Kultur mit Hilfe verschiedener kommerziell verfügbarer Systeme die Expressionsplasmide extrahiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzten PCR-*forward*-Primer enthalten unmittelbar vor dem Startcodon (ATG) mit der Sequenz 5'-GCCACC-ATG eine optimierte ribosomale Bindungsstelle (Kozak, 1987). Die *reverse*-Primer wurden zudem oft mit geeigneten Stopcodons oder Schnittstellen für Restriktionsenzyme versehen.

Für die Generierung fluoreszierender Fusionsproteine wurden in der Arbeitsgruppe Expressionsvektoren konstruiert, die basierend auf dem Vektor pcDNA3.1 die cDNA für das fluoreszierende Protein am 3'- oder am 5'-Ende der *multiple cloning site* von pcDNA3.1 enthalten (Schaefer *et al.*, 2001; Voigt *et al.*, 2005). In diese konnte die cDNA der zu fusionierenden Proteine dann nach PCR mit geeigneten Primern eingefügt werden. Dabei wurden durch die Primer Schnittstellen eingefügt, die auch in der *multiple cloning site* von pcDNA3.1 enthalten sind und nach Schnitt und Ligation einen lese-rahmengerechten Übergang zwischen den cDNAs des fluoreszierenden Proteins und des zu fusionierenden Proteins ermöglichen.

Alle hergestellten Konstrukte wurden auf ihre Identität und Korrektheit nach Sequenzierung der cDNA (Methode „HotShot“ der Firma SEQLAB, Göttingen) überprüft. Dazu

wurden die Plasmide nach den Angaben des kommerziellen Sequenzierungsunternehmens vorbereitet und zur Sequenzierung dorthin verschickt.

2.3.2 Herstellung N-terminal trunkierter Konstrukte der PLC- β_{1a}

Zur Herstellung N-terminal trunkierter Konstrukte der PLC- β_{1a} wurde das Konstrukt PLC- β_1 -YFP, das das fluoreszierende Protein C-terminal von der PLC- β_{1a} enthält, in den jeweiligen PCR mit Hilfe von Primern amplifiziert, die entsprechend der gewünschten Verkürzungen neue Startcodons mit Kozak-Sequenzen in das Konstrukt einfügen. Tabelle 2.1 listet die hergestellten Konstrukte und die hierfür genutzten Primer auf. Das Konstrukt YFP-PLC- β_1 -CT (Daniel Sinnecker, Berlin), das für ein N-terminales YFP fusioniert mit den Aminosäuren 903 bis 1216 der PLC- β_{1a} codiert, wurde im Rahmen eines anderen Projektes in der Arbeitsgruppe hergestellt.

Aminosäuren	<i>forward primer</i>	<i>reverse primer</i>
954-1216	GCC-ACC- <u>ATG</u> -GAG-ATT-CAG- AAT-GAC-TAC-TTG	<u>TTA</u> -CTT-GTA-CAG-CTC-GTC- CAT-GC
996-1216	GCC-ACC- <u>ATG</u> -GCC-CTG-GAT- GCA-GAA-ATG	<u>TTA</u> -CTT-GTA-CAG-CTC-GTC- CAT-GC
1056-1216	GCC-ACC- <u>ATG</u> -AAG-CTG-AAG- GAA-ATC-TGC-G	<u>TTA</u> -CTT-GTA-CAG-CTC-GTC- CAT-GC

Tabelle 2.1: N-terminal verkürzte Konstrukte der PLC- β_{1a} und die genutzten Primer. Die *forward primer* enthalten eine optimierte, ribosomale Andocksequenz (kursiv) gefolgt von einem Startcodon (unterstrichen). Bei den *reverse primern* ist das Stopcodon unterstrichen.

2.3.3 Ortsgerichtete Mutagenese zur Herstellung C-terminal trunkierter Konstrukte der PLC- β_{1a}

Ausgehend vom Konstrukt YFP-PLC- β_1 -CT wurden C-terminal trunkierte Konstrukte der PLC- β_{1a} mit N-terminal lokalisiertem Fluoreszenzprotein durch die Einfügung eines zusätzlichen Stopcodons und einer Schnittstelle für Kontrollschnitte durch eine ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe eines kommerziellen Systems (QuikChange, Stratagene) nach den Angaben des Herstellers generiert. Tabelle 2.2 listet die hergestellten Konstrukte, die hierfür genutzten Primer und die eingefügten Schnittstellen auf.

2 Material und Methoden

Aminosäuren	Primer	Schnittstelle
903-1195	for: GCT-AAG-GTG-AAC-CTC-TAG-ACT-CCC- TCC-AGT-GAG-G	XbaI
	rev: CCT-CAC-TGG-AGG-GAG-TCT-AGA-GGT- TCA-CCT-TAG-C	
903-1177	for: GTT-AGT-GAG-GAC-AGC-TAG-CAC-GGC- TCT-GCC-CCT-C	NheI
	rev: GAG-GGG-CAG-AGC-CGT-GCT-AGC-TGT- CCT-CAC-TAA-C	
903-1152	for: GCA-AGA-ATA-CCA-AGA-CTA-GTT-CAA- AAG-ACT-GCC	SpeI
	rev: GGC-AGT-CTT-TTG-AAC-TAG-TCT-TGG- TAT-TCT-TGC	
903-1132	for: CAC-AAG-GAG-ATC-CGC-TAG-CAG-ATC- CTG-GAT-G	NheI
	rev: CAT-CCA-GGA-TCT-GCT-AGC-GGA-TCT- CCT-TGT-G	
903-1110	for: GGT-GGT-GCA-GTA-CAT-CTA-GAG-GTT- AGA-GGA-AGC	XbaI
	rev: GCT-TCC-TCT-AAC-CTC-TAG-ATG-TAC- TGC-ACC-ACC	
903-1054	for: GTG-TCA-GAA-CAA-TCA-GTT-CTA-GAA- GCT-GAA-GGA-AAT-CTG-C	XbaI
	rev: GCA-GAT-TTC-CTT-CAG-CTT-CTA-GAA- CTG-ATT-GTT-CTG-ACA-C	
903-1030	for: GTA-TTA-CAG-TGA-GAA-GTT-CTA-GAA- GCG-GGA-GCA-CAT	XbaI
	rev: ATG-TGC-TCC-CGC-TTC-TAG-AAC-TTC- TCA-CTG-TAA-TAC	
903-994	for: GCC-ATT-GAG-CAA-GAC-CTC-TAG-ACC- CTG-GAT-GCA-GAA-ATG	XbaI
	rev: CAT-TTC-TGC-ATC-CAG-GGT-CTA-GAG- GTC-TTG-CTC-AAT-GGC	

Tabelle 2.2: C-terminal verkürzte Konstrukte der PLC- β_{1a} und die zur ortsgerichteten Mutagenese genutzten Primer. Grau hinterlegt sind die Sequenzen der eingefügten Schnittstellen (letzte Spalte). Die eingefügten Stopcodons sind jeweils unterstrichen.

2.4 Zellkultur und Transfektion

2.4.1 Zelllinien und Kultivierung

HEK293- und HIT-T15-Zellen wurden als adhärenente Zellen in Zellkulturflaschen in geeignetem Medium (s. Abschnitt 2.1.5) unter 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Die Passage erfolgte alle 3-4 Tage. Dazu wurden die Zellen, nachdem das Medium abgesaugt wurde mit 10 ml PBS-Lösung gewaschen und in einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sie sich von der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Anschließend wurden sie in frisches Kulturmedium aufgenommen (Verhältnis 1:10) und in neue Zellkulturflaschen ausgesetzt.

2.4.2 Transiente Transfektion

HEK293- und HIT-T15-Zellen wurden auf Deckgläschen mit 24 mm Durchmesser in 35-mm-Kulturschälchen in Kulturmedium ausgesät. Die Transfektion erfolgte 1-2 Tage später bei einer Konfluenz von 50%-70%. Dazu wurden je Kulturschale 4 μ l des FuGene6-Transfektionsreagenz mit 100 μ l serumfreien Medium gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 μ g Plasmid-DNA hinzugefügt und 1 Sekunde gevortext. Das Gemisch wurde weitere 15 Minuten inkubiert und schließlich tröpfchenweise aus geringer Höhe auf das Deckglas pipettiert. Bei erfolgreicher Transfektion zeigte sich nach 1-3 Tagen eine suffiziente Expression der zu untersuchenden Proteine.

2.5 Fluoreszenz-Imaging

2.5.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisationen der fluoreszierenden Fusionsproteine wurde ein invertiertes konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena) mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4 oder einem α Plan-Fluar 100x/1,45 Öl-Immersion-Objektiv benutzt. Die Deckgläschen mit den transfizierten Zellen wurden in

Messkammern eingelegt und mit HBS-Puffer überschichtet. Diese Messkammern wiederum wurden in das Mikroskop eingespannt. Die Anregung der fluoreszierenden Proteine erfolgte über einen Argon-Gaslasers über die 458-nm- (CFP) bzw. die 514-nm-Linie (YFP). Die Filterung der Signale erfolgte für CFP mit einem 470-500-nm Bandpass-Emissionsfilter und für YFP mit einem 530-nm Langpassfilter. Mit Hilfe des konfokalen Pinholes wurde die Dicke der optischen Schichten während der jeweiligen Untersuchung auf 0,8-1,4 μm eingegrenzt.

2.5.2 TIRF-Mikroskopie

Die TIRF-Mikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence) erlaubt es, unter Nutzung der Totalreflexion einer Anregungsstrahlung an Grenzflächen selektiv einen Bereich nahe des Deckgläschens, der die Plasmamembran einer Zelle und ca. 150 nm des Zytoplasmas umfasst, zu untersuchen. Das im Rahmen dieser Arbeit genutzte System ist ohne Prisma (Axelrod, 2003) mit einem α Plan-Fluar 100x/1,45 Öl-Immersions-Objektiv aufgebaut (Planung, Konstruktion und Aufbau: Michael Schaefer, Steffen Burgold Wolfgang Stamm, Astrid Tannert). Die Anregung von YFP erfolgte über die 488-nm Linie eines Argon-Lasers (Lasos GmbH, Ebersberg). Die Emission wurde über einen 514-nm Langpassfilter (Razor Edge, Semrock, USA) selektiert und mit einer EMCCD-Kamera (iXon 887BV, Andor, Belfast, Großbritannien) aufgenommen. Die weitere Bildprozessierung erfolgte über die TillVision software (TILL Photonics, Gräfelfing). Eine ausführliche Beschreibung des experimentellen Aufbaus und eines darüber hinaus gehenden Ansatzes zur Messung des membranären Anteils von Fusionsproteinen wurde aus der Arbeitsgruppe publiziert (Tannert *et al.*, 2008).

3 Ergebnisse

Um entsprechend der Zielstellung die subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β_{1a} und ihr Verhalten während intrazellulärer Signaltransduktionsvorgänge in lebenden Zellen zu untersuchen wurden die Methoden der konfokalen Laser-Scanning- und TIRF-Mikroskopie in Verbindung mit den molekularbiologischen Methoden der transienten Transfektion von Zellkulturzellen mit Plasmiden für fluoreszierende Fusionsproteine genutzt. Dadurch war es möglich die in anderen Verfahren notwendige Aufspaltung der Zellen zur Analyse der einzelnen Zellkompartimente zu umgehen, da diese die Untersuchung dynamischer Signalprozesse nur annäherungsweise und unter großem Aufwand erlaubt.

3.1 Subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β_{1a} und Ca^{2+} -vermittelte Translokation

3.1.1 Subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β -Isoformen PLC- β_{1a} , PLC- β_2 und PLC- β_3

HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die für PLC- β_{1a} -YFP, PLC- β_2 -YFP und PLC- β_3 -YFP kodieren, transfiziert und die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Abb.3.1 zeigt die Lokalisation der drei Konstrukte in repräsentativen Zellgruppen.

Einen Tag nach Transfektion zeigten sich deutliche Unterschiede in der Verteilung der Fluoreszenz der Phospholipase C- β -Isoformen innerhalb der Zellen: Während die Fluoreszenz des PLC- β_2 -YFP-Fusionsproteins unter Aussparung des Zellkerns gleichmäßig über die Zelle verteilt blieb, zeigten PLC- β_{1a} -YFP und PLC- β_3 -YFP neben der auch hier weitgehend vorhandenen Aussparung des Zellkerns eine deutliche Anreicherung im Bereich der Plasmamembran. Diese war in den Zellen, die das PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsprotein exprimierten, besonders stark ausgeprägt.

3 Ergebnisse

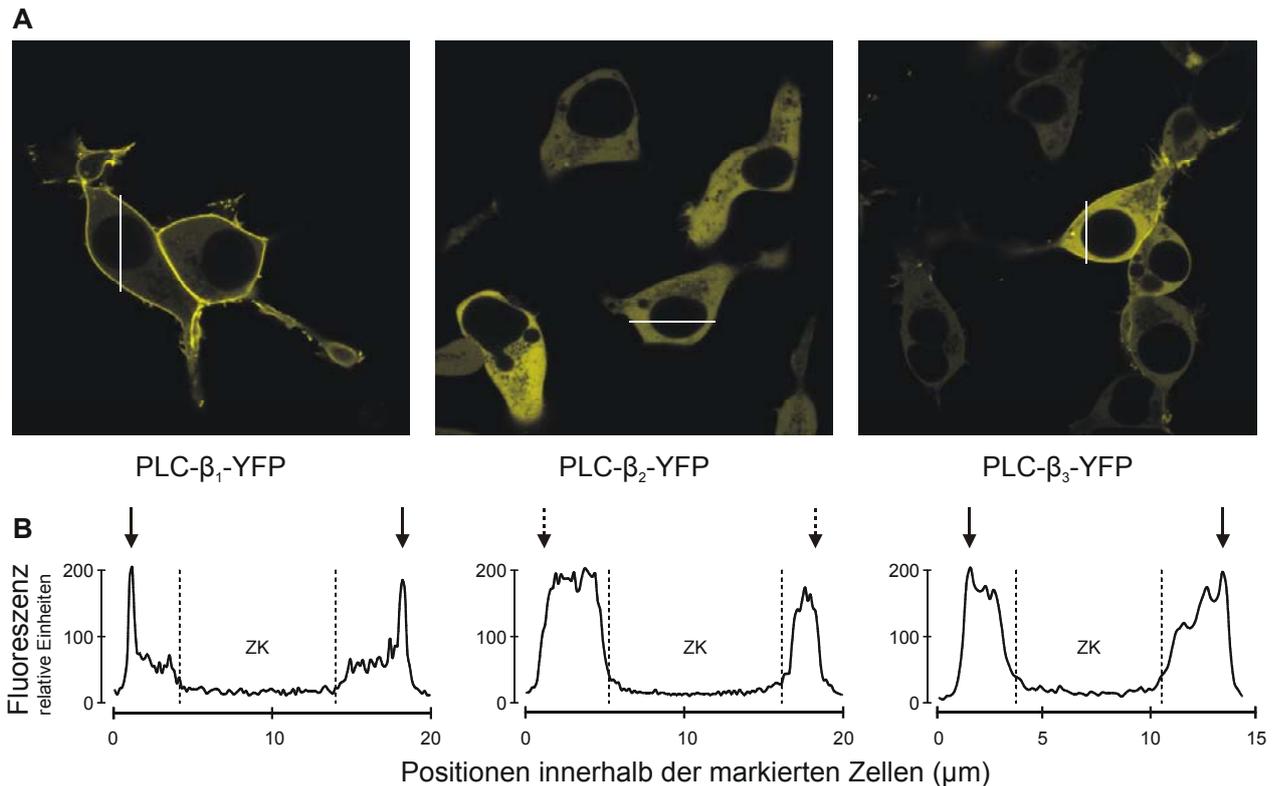


Abbildung 3.1: Subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β -Isoformen 1a, 2 und 3 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden für die Fusionsproteine PLC- β_{1a} -YFP, PLC- β_2 -YFP und PLC- β_3 -YFP transfiziert und 24 h nach Transfektion mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes (Carl Zeiss, LSM510-META) untersucht. (A) Dargestellt sind Falschfarbenbilder der YFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen. (B) Exemplarische Verteilung der Fluoreszenz entlang der in (A) eingezeichneten Profile. PLC- β_{1a} -YFP und PLC- β_3 -YFP zeigen Fluoreszenzmaxima im äußeren Bereich der Zellen (Pfeilsymbole), der als Plasmamembrankompartiment gedeutet wird. ZK: Zellkern

Um einen Einfluss der C-terminalen Fusion der PLC- β -Isoformen mit den Fluoreszenzproteinen auf die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine zu untersuchen, wurden auch Plasmide transfiziert, die für Proteine kodieren, in denen die Fluoreszenzproteine mit dem N-Terminus der jeweiligen PLC- β -Isoform verbunden sind. Wie in Abb.3.2 für die PLC- β_{1a} -Konstrukte gezeigt, blieb das beschriebene Verteilungsmuster unabhängig von der Position des fluoreszierenden Anteils des Fusionsproteins bestehen.

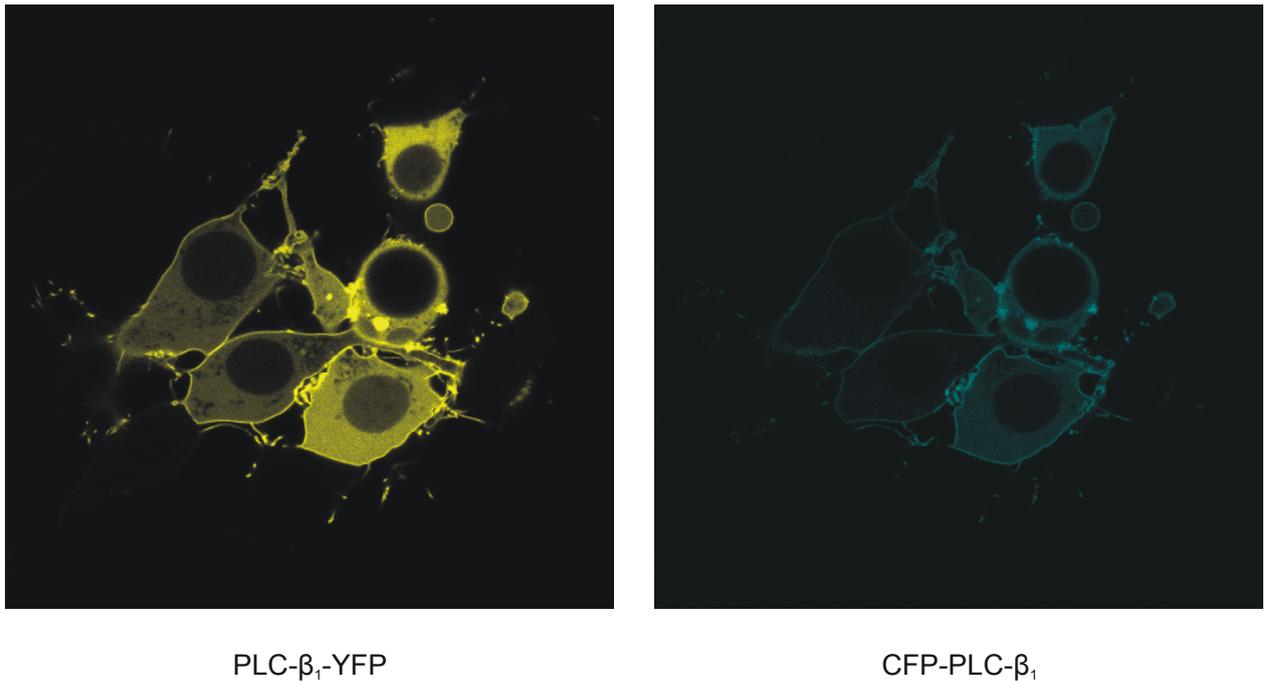


Abbildung 3.2: C- bzw. N-terminal fluoreszenzmarkierte PLC- β_{1a} . Dargestellt sind Falschfarbenbilder der YFP- (links) und CFP-Fluoreszenz (rechts) der Fusionsproteine PLC- β_{1a} -YFP und CFP-PLC- β_{1a} , koexprimiert in HEK293-Zellen. Auch bei unterschiedlicher Expressionseffizienz zeigt das Konstrukt CFP-PLC- β_{1a} , in dem sich der fluoreszierende Teil des Fusionsproteins am N-Terminus befindet, das gleiche Verteilungsmuster mit maximaler Fluoreszenz im Bereich der Plasmamembran, geringerer Fluoreszenz im Cytosol und schwacher Fluoreszenz im Kern.

3.1.2 TRPV1-vermittelte Translokation der Phospholipase C- β_{1a} aus der Plasmamembran ins Cytosol

Um das Verhalten der Phospholipase C- β_{1a} während zellulärer Signaltransduktionvorgänge zu untersuchen, wurde die subzelluläre Lokalisation des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins unter verschiedenen Stimulationsprotokollen beobachtet. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung des Kationenkanals TRPV1 durch seinen Liganden Capsaicin eine vollständige Translokation von PLC- β_{1a} -YFP ins Cytosol induzierte. Dieser Effekt wurde mit Hilfe verschiedener fluoreszenzmikroskopischer Experimente untersucht und zur Darstellung gebracht. Abb. 3.3 zeigt repräsentative konfokal-mikroskopische Aufnahmen der Translokationsereignisse in HEK293- (A) und HIT-Zellgruppen (B), die nach transienter Transfektion PLC- β_{1a} -YFP und ein TRPV1-Konstrukt exprimierten. Jeweils links sind die Zellgruppen vor und rechts nach Stimulation abgebildet. Die Translokation des fluoreszierenden Fusionsproteins äußerte sich in Messungen mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop in einem Anstieg der Fluoreszenz im Bereich des

3 Ergebnisse

cytosolischen Kompartiments bei gleichzeitigem Abfall der Fluoreszenz über den Zellgrenzen, entsprechend einer Umverteilung des Konstruktes von der Plasmamembran ins Cytosol. Zur Auswertung wurden in der Software Regionen über dem Cytosol (F_{CYT}) und der Plasmamembran (F_{PM}) der Zellen definiert, deren Intensität als Zeitverlauf ausgewertet und dargestellt wurde. Mit dieser Methode konnte die Translokation des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins als Anstieg der Fluoreszenzintensität über dem Cytosol oder als Abfall im Quotienten $F_{\text{PM}}/F_{\text{CYT}}$ quantifiziert werden (Abb. 3.3 C und D). Auch mit Methoden der TIRF-Mikroskopie, die sowohl sensiblere als auch spezifischere Fluoreszenz-Messungen im Bereich der Plasmamembranen von Zellen ermöglicht, konnten die Translokationsereignisse in zeitlich hoher Auflösung und der membranassoziierte Anteil des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins registriert werden (Abb. 3.3 E und F).

3.1.3 Ca^{2+} -Abhängigkeit der TRPV1-vermittelten Translokation

Mit Hilfe von Phospholipid-Liposomen-Assays war in der Arbeit von Ross *et al.*, 2006 ein Verlust der Bindung zwischen der PLC- β_1 und dem Membranphospholipid Phosphatidylserin durch hohe Salzkonzentrationen und somit der elektrostatische Charakter dieser Bindung gezeigt worden. Das legte die Vermutung nahe, dass auch der durch den TRPV1-Ionenkanal vermittelte Verlust der Membranbindung der PLC- β_{1a} durch den Kationeneinstrom und den damit verbundenen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verursacht wurde. In weiteren Experimenten zeigte sich die Ca^{2+} -Abhängigkeit der TRPV1-vermittelten PLC- β_{1a} -Translokation. Die Capsaicin-Stimulationsversuche wurden in Ca^{2+} -freien Messpuffern wiederholt. Unter diesen Bedingungen ergab die Stimulation mit Capsaicin lediglich eine geringe Umverteilung der Fluoreszenzintensitäten des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins. Durch konsekutive Zugabe von CaCl_2 wurde die Translokation dann aber auf dem Niveau der ursprünglichen Experimente ausgelöst. Abb. 3.4 zeigt ein repräsentatives Experiment in HIT-Zellen.

Wie kürzlich gezeigt wurde, kann die Aktivierung des TRPV1-Kanals durch Capsaicin auch zu einer Aktivierung des PLC-Signalweges führen (Lukacs *et al.*, 2007). Die initiale, unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen ausgelöste Translokation der PLC- β_{1a} könnte mit einer Aktivierung des PLC-Signalweges und der daraus folgenden Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern zusammenhängen. Alternativ könnten auch ein TRPV1-vermittelter Na^+ -Einstrom und K^+ -Ausstrom über eine Depolarisation der Plasmamembran zu einer leichten Translokation führen.

3 Ergebnisse

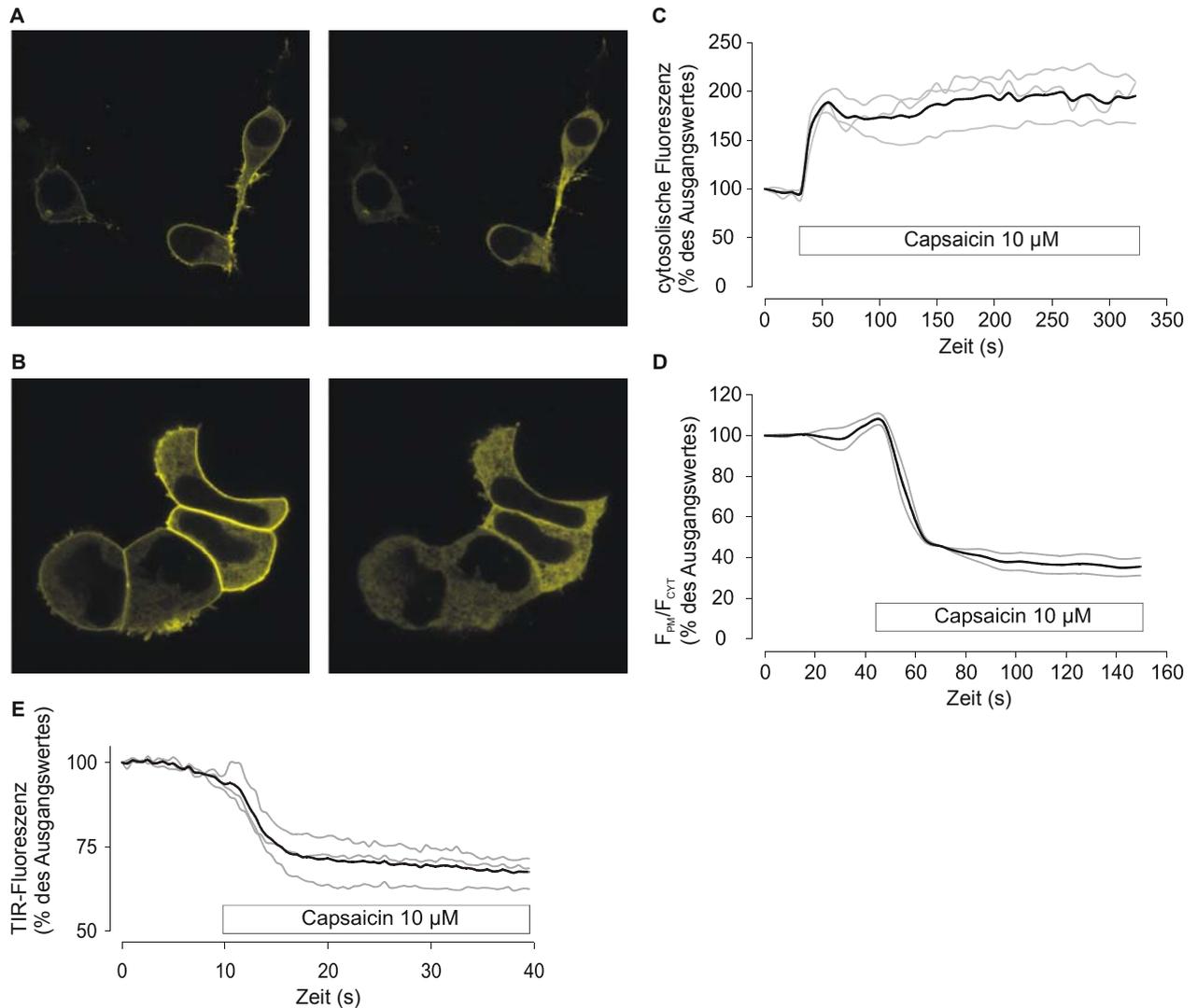


Abbildung 3.3: TRPV1-vermittelte Translokation der PLC- β_{1a} aus der Plasmamembran. Durch Stimulation mit 10 μ M Capsaicin wurde in TRPV1- und PLC- β_{1a} -YFP- exprimierenden Zellen eine Umverteilung des fluoreszierenden Proteins von der Plasmamembran in das Cytosol ausgelöst. Dargestellt sind Falschfarbenbilder transfizierter HEK293- (A) und HIT-Zellen (B), jeweils vor (links) und 8s nach Stimulation mit Capsaicin (rechts). Erkennbar sind der Verlust der hellen Umrandung der Zellen und die Zunahme der Helligkeit des Cytosols. (C-F) Zeitverläufe der Translokation der PLC- β_{1a} . Dargestellt sind Verläufe der Translokation in einzelnen Zellen (graue Kurven) bzw. deren Mittelwerte (schwarze Kurven) gemessen nach unterschiedlichen Methoden. Die Stimulation mit Capsaicin ist jeweils durch den Balken gekennzeichnet.

(C) Verläufe der cytosolischen Fluoreszenzintensitäten in den Zellen aus (A). Über dem Cytosol der Zellen wurden Regionen definiert, deren Fluoreszenzintensität gemessen und gemittelt. (D) Verläufe in den Zellen aus (B). Zusätzlich zu den cytosolischen Regionen wurden hier Regionen über der Plasmamembran definiert. Dargestellt sind die Verläufe der Quotienten der Fluoreszenzintensitäten über Plasmamembran und Cytosol (F_{PM}/F_{CYT}). (E) Abnahme der TIRF-Intensität nach Stimulation mit Capsaicin als Ausdruck der Translokation in transfizierten HEK293-Zellen.

3 Ergebnisse

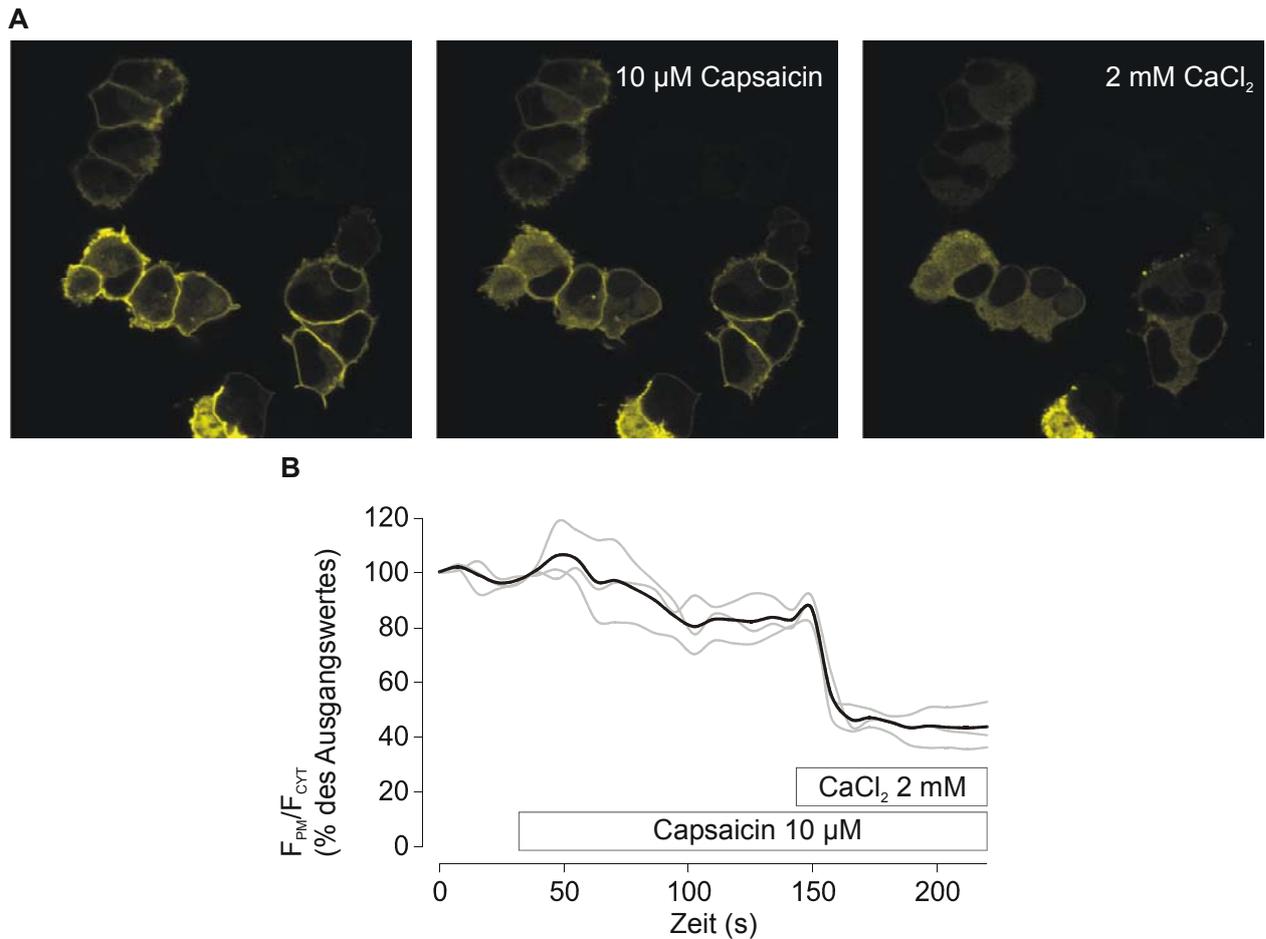


Abbildung 3.4: Ca^{2+} -Abhängigkeit der TRPV1-vermittelten Translokation der PLC- β_{1a} aus der Plasmamembran. HIT-Zellen wurden mit den Plasmiden für den TRPV1-Kanal und das PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsprotein kotransfiziert. Messungen der subzellulären Lokalisation des fluoreszierenden Proteins ergaben nur geringe Translokationseffizienzen in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium. Diese erreichten nach Zugabe von $CaCl_2$ in die Pufferlösung wieder das Niveau der ursprünglichen Translokationsexperimente (s. Abb. 3.3 D). (A) Dargestellt sind Falschfarbenbilder einer repräsentativen Zellgruppe vor Stimulation (links), 8 s nach Stimulation mit 10 μM Capsaicin (Mitte) und 8 s nach Zugabe von $CaCl_2$ (final 2 mM, rechts). (B) Zeitverlauf der Translokation dargestellt als Quotient F_{PM}/F_{CYT} . Erst in Anwesenheit von extrazellulärem Calcium erfolgte die Translokation in vollem Ausmaß.

3.1.4 Histaminrezeptor-vermittelte Translokation der Phospholipase C- β_{1a}

Zur Überprüfung ob durch den PLC-Signalweg selbst ausgelöste Ca^{2+} -Erhöhungen zur Auslösung einer Translokation der PLC- β_{1a} ausreichen, wurden HEK293-Zellen mit Plasmiden für fluoreszenzmarkierte Konstrukte der PLC- β_{1a} und der Proteinkinase C- ϵ (PKC ϵ) zusammen mit dem Histamin-1-Rezeptor, der $G\alpha_q$ -gekoppelt den PLC- β -Signalweg aktiviert, transfiziert und die Reaktion auf einen Stimulus durch Zugabe von Histamin im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gemessen (Abb.3.5).

3 Ergebnisse

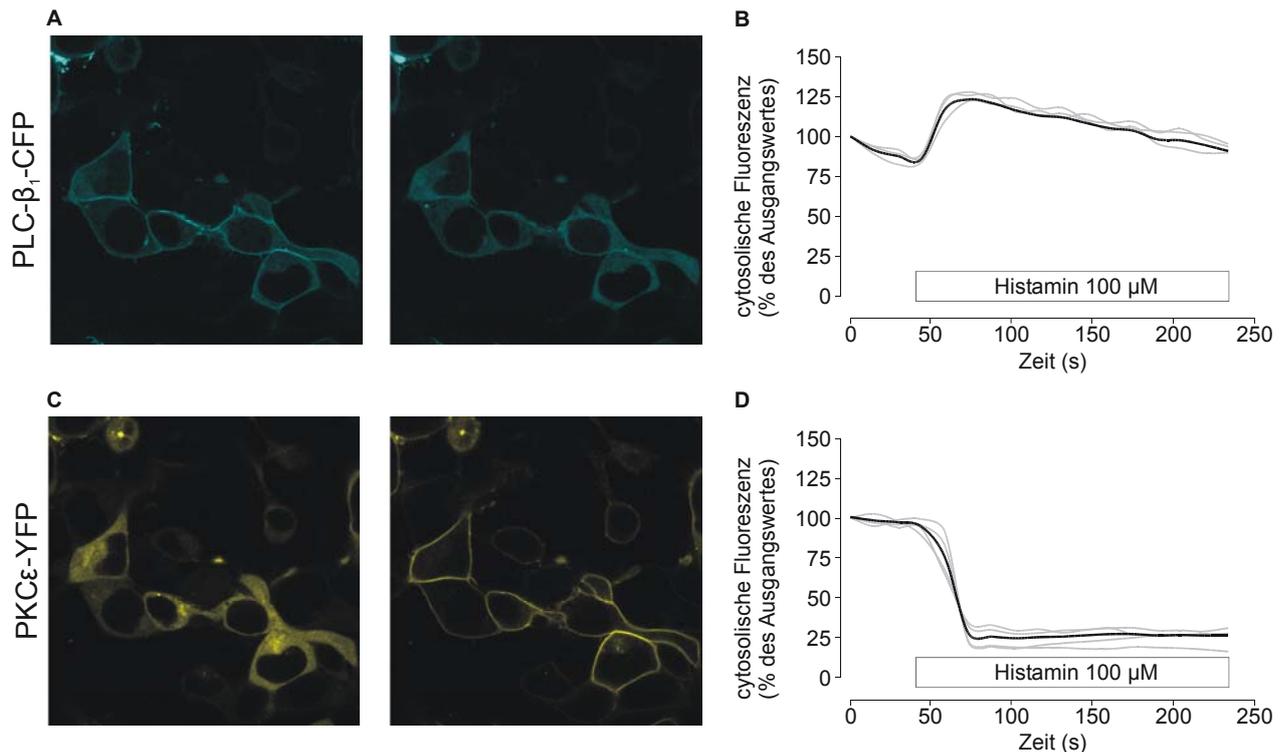


Abbildung 3.5: Histamin-induzierte Translokation der Phospholipase C-β_{1a} und Proteinkinase C-ε.

Die CFP-markierte PLC-β_{1a} transloziert nach einem Histaminstimulus aus der Plasmamembran ins Cytosol (A und B). Der vor und nach Stimulation zu beobachtende Abfall der Fluoreszenzintensität ist Ausdruck des ausbleichenden CFP (vgl. Methoden). Die PKCε bindet das in der Plasmamembran durch die PLC aus PIP₂ gebildete Diacylglycerol und zeigt somit durch ihre Translokation in die Plasmamembran die PLC-Aktivierung direkt an (C und D).

Die PKCε transloziert Diacylglycerol-abhängig und Ca²⁺-unabhängig aus dem Cytosol in die Plasmamembran und kann daher als Sensor für eine PLC-Aktivierung eingesetzt werden (Zhang *et al.*, 1995). Hier zeigte sich, dass auch die Histamin-induzierte PLC-Aktivierung eine Translokation der PLC-β_{1a} auslösen kann.

3.1.5 Unabhängigkeit der Membranbindungseffizienz der Phospholipase C-β_{1a} von der Gα_q-Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Phospholipase C-β₁ wird durch die Plasmamembran-assoziierte Gα_q-Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert (Rhee, 2001). Kürzlich ist in Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Experimenten gezeigt worden, dass die Phospholipase C-β₁ und die Gα_q-Untereinheit auch in unstimulierten Zellen präformierte Komple-

3 Ergebnisse

xe bilden können (Dowal *et al.*, 2006). Der Einfluss der $G\alpha_q$ -Untereinheit auf die Membranbindung der PLC- β_{1a} wurde in HIT-Zellen durch Kotransfektion des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins mit der $G\alpha_q$ -Untereinheit untersucht (Abb. 3.6).

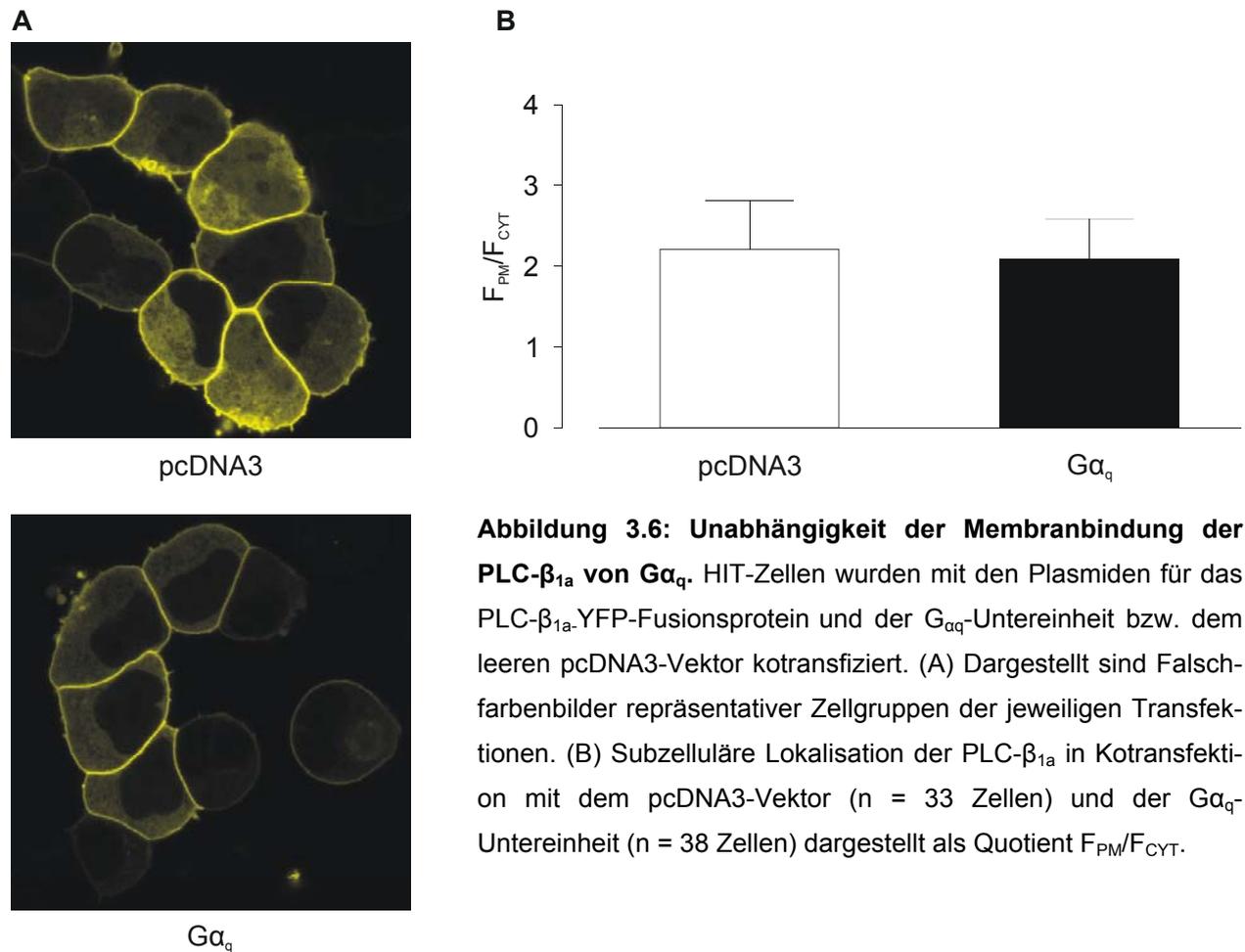


Abbildung 3.6: Unabhängigkeit der Membranbindung der PLC- β_{1a} von $G\alpha_q$. HIT-Zellen wurden mit den Plasmiden für das PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsprotein und der $G\alpha_q$ -Untereinheit bzw. dem leeren pcDNA3-Vektor kotransfiziert. (A) Dargestellt sind Falschfarbenbilder repräsentativer Zellgruppen der jeweiligen Transfektionen. (B) Subzelluläre Lokalisation der PLC- β_{1a} in Kotransfektion mit dem pcDNA3-Vektor (n = 33 Zellen) und der $G\alpha_q$ -Untereinheit (n = 38 Zellen) dargestellt als Quotient F_{PM}/F_{CYT} .

Als Kontrolle dienten Kotransfektionen des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins mit dem leeren pcDNA3-Vektor im selben Verhältnis. Sowohl in den Kontrollen als auch bei der Kotransfektion mit der $G\alpha_q$ -Untereinheit ergab sich in den Messungen im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop das bereits für die vorangegangenen Experimente beschriebene Bild mit starker membranärer und schwächerer cytosolischer Lokalisation der PLC- β_{1a} (Abb. 3.6 A). Das Verhältnis zwischen membranärer und cytosolischer Lokalisation betrug, dargestellt als Quotient der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten F_{PM}/F_{CYT} , für die Kotransfektion mit der $G\alpha_q$ -Untereinheit $2,09 \pm 0,49$ (n = 38 Zellen). In den pcDNA3-Kontrollen betrug F_{PM}/F_{CYT} $2,21 \pm 0,60$ (n = 33 Zellen) (Abb. 3.6 B). Somit konnte kein signifikanter Einfluss einer zusätzlichen Expression der $G\alpha_q$ -Untereinheit

3 Ergebnisse

auf die Membranbindungseffizienz der Phospholipase C- β_{1a} nachgewiesen werden. Eine Übersättigung der zelleigenen $G\alpha_q$ -Proteine als Ursache für den stabilen cytosolischen Anteil der transfizierten PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteine scheint somit ebenfalls ausgeschlossen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde kürzlich in Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt, dass die PLC- β_{1a} im Gegensatz zu ihrer Spleißvariante PLC- β_{1b} in unstimulierten neonatalen ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten nicht mit der $G\alpha_q$ -Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren interagiert (Grubb *et al.*, 2008).

3.1.6 Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation der Phospholipase C- β_{1a} von der Umgebungsosmolarität

Der in Rekonstitutionsexperimenten gezeigte Verlust der Membranbindung der PLC- β_1 durch hohe Salzkonzentrationen als Hinweis auf den elektrostatischen Charakter der Bindung (Ross *et al.*, 2006) wurde in lebenden HEK293-Zellen weiter untersucht (Abb. 3.7). Dazu wurden mit dem Plasmid für das PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsprotein transfizierte HEK293-Zellen während der Messungen im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Messpuffern verschiedener Osmolarität ausgesetzt. Es zeigte sich, dass die PLC- β_{1a} auch *in vivo* durch eine hyperosmolare Umgebung aus der Membranbindung gedrängt werden konnte (Abb. 3.7 A, C und D). Darüber hinaus konnte der membrangebundene Anteil des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins in hypoosmolarer Messpufferumgebung auch weiter gesteigert werden (Abb. 3.7 B und C). Es ergaben sich F_{PM}/F_{CYT} -Quotienten in Höhe von $4,75 \pm 1,57$ ($n = 12$ Zellen) in Messpuffern mit einer Osmolarität von 150 mOsm und $1,31 \pm 0,25$ ($n = 6$ Zellen) bei einer Osmolarität von 600 mOsm ($p < 0,01$ / Abb. 3.7 C). Der zeitliche Verlauf der Translokation des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins aus der Plasmamembran ins Cytosol nach Erhöhung der Umgebungsosmolarität ist für ein repräsentatives Experiment in Abb. 3.7 D als Anstieg der cytosolischen Fluoreszenz dargestellt.

Um zu untersuchen ob auch die subzelluläre Lokalisation anderer Phospholipase C- β -Isoformen eine Abhängigkeit von der extrazellulären Osmolarität zeigt, wurden HEK293-Zellen mit den Plasmiden für PLC- β_2 - und PLC- β_3 -YFP-Fusionsproteine transfiziert und in Messpuffern unterschiedlicher Osmolarität betrachtet. Das in unstimulierten Zellen in physiologischer Osmolarität zu beobachtende Verteilungsmuster des PLC- β_2 -YFP-Fusionsproteins konnte dabei auch bei starker Absenkung der Osmolarität des Messpuffers nicht beeinflusst werden.

3 Ergebnisse

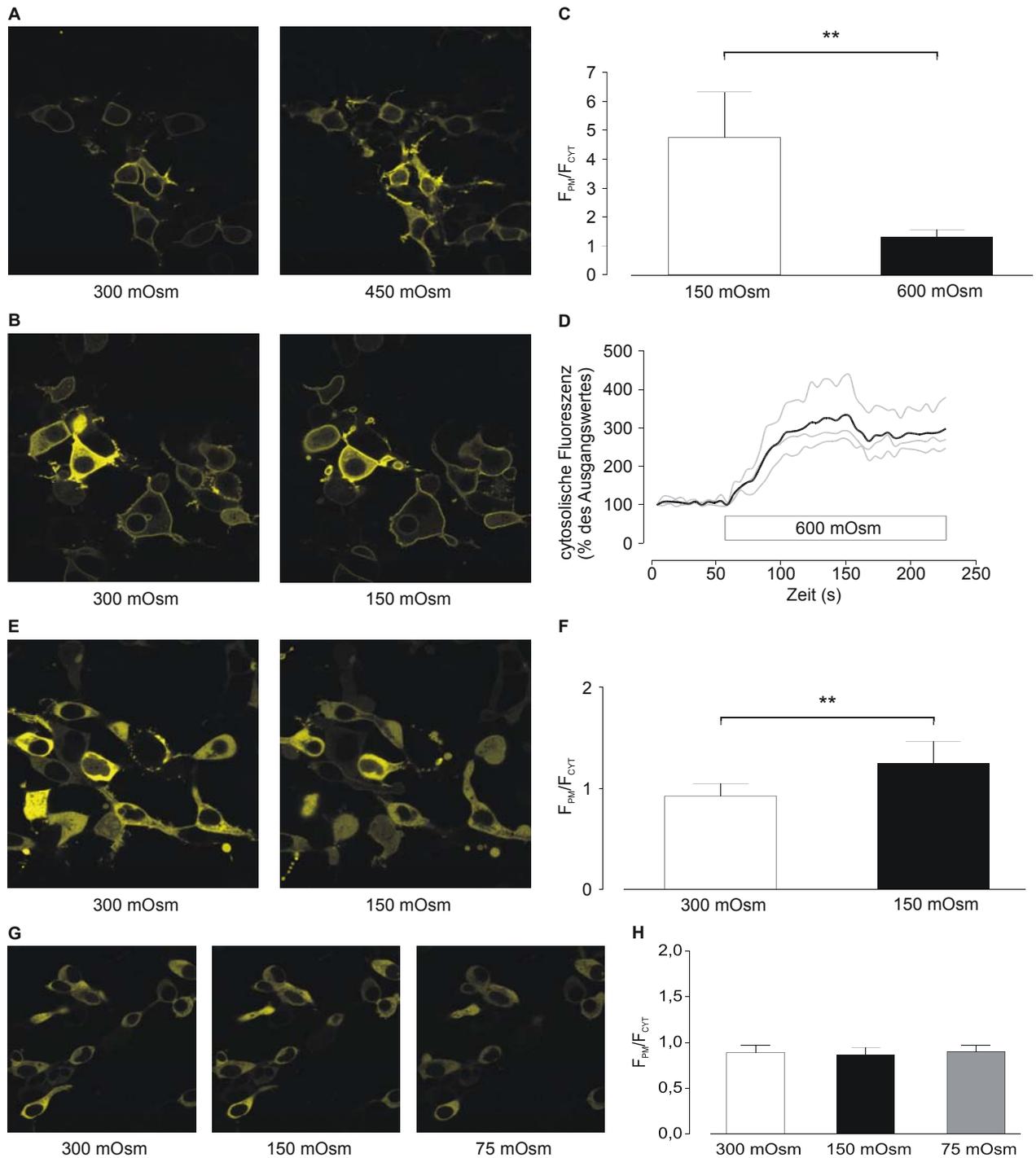


Abbildung 3.7: Subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β -Isoformen 1a, 2 und 3 in Abhängigkeit von der Umgebungsosmolarität. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für PLC- β_{1a} - (A-D), PLC- β_2 - (G, H) und PLC- β_3 -YFP-Fusionsproteine (E, F) transfiziert und im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop in Messpuffern unterschiedlicher Osmolarität gemessen. Dargestellt sind Falschfarbenbilder repräsentativer Zellgruppen (A, B, E, G) und Balkendiagramme der F_{PM}/F_{CYT} -Quotienten der jeweiligen Isoformen (C, D, H). (D) Zeitverlauf der Translokation des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins nach Steigerung der Osmolarität des Messpuffers von 300 mOsm auf 600 mOsm. (A-H) Die Senkung der Osmolarität erfolgte durch Zugabe von H_2O , die Steigerung durch Zugabe von $CaCl_2$.

3 Ergebnisse

Wie in Abb. 3.7 G an einem repräsentativen Experiment gezeigt, blieb die Fluoreszenz des PLC- β_2 -YFP-Fusionsproteins unter Aussparung des Zellkerns gleichmäßig über die Zelle verteilt. Der F_{PM}/F_{CYT} -Quotient lag bei 300 mOsm bei $0,89 \pm 0,08$ ($n = 10$ Zellen), bei 150 mOsm bei $0,87 \pm 0,07$ und bei 75 mOsm bei $0,90 \pm 0,07$ ($n = 10$ Zellen) und zeigte somit keine signifikante Veränderung (Abb. 3.7 H).

Dagegen konnte in HEK293-Zellen, die das PLC- β_3 -YFP-Fusionsprotein exprimierten, eine Steigerung der Fluoreszenz im Membrankompartiment durch die Absenkung der Osmolarität im Messpuffer ausgelöst werden (Abb. 3.7 E und F). Diese war, wie auch die Membranassoziation unter physiologischer Osmolarität, schwächer ausgeprägt als bei der PLC- β_{1a} . Der F_{PM}/F_{CYT} -Quotient lag bei 300 mOsm bei $0,92 \pm 0,12$ ($n = 10$ Zellen) und bei 150 mOsm bei $1,25 \pm 0,22$ ($p < 0,01$).

Bei der Betrachtung der Änderung der cytosolischen Fluoreszenz bei unterschiedlicher Pufferosmolarität musste auch der Effekt der cytosolischen Volumenschwankung durch dem osmotischen Druck folgende Wasserbewegungen aus bzw. in die Zelle berücksichtigt werden. Erwartungsgemäß nahm das Zellvolumen in den Experimenten bei hyperosmolaren Messpuffern ab und bei hypoosmolaren Messpuffern zu. Dabei führt aber die Abnahme des Zellvolumens auch zu einer höheren Dichte der verbliebenen intrazellulären Moleküle und im Falle der Fluoreszenzmessung dadurch zu einer höheren Fluoreszenz pro Volumeneinheit. Bei alleiniger Messung der cytosolischen Fluoreszenz könnte also eine Zunahme unter hyperosmolarem Messpuffer zum Teil auch der cytosolischen Volumenschwankung zuzuschreiben sein. Bei Betrachtung des F_{PM}/F_{CYT} -Quotienten sollte sich dieser Effekt relativieren, da beispielsweise bei Einfaltungen der Plasmamembran bei Volumenabnahme der Zelle sich auch der Anteil der Plasmamembran in einem identischen Messvolumen erhöhen würde. Da sich außerdem in den Experimenten mit dem PLC- β_2 -YFP-Fusionsprotein, bei dem eine cytosolische Lokalisation zu erwarten war, keine signifikante Änderung des F_{PM}/F_{CYT} -Quotienten bei unterschiedlicher Messpufferosmolarität zeigt, konnte der Einfluss der cytosolischen Volumenschwankung auf die F_{PM}/F_{CYT} -Quotienten der PLC- β_1 - und PLC- β_3 -YFP-Fusionsproteine vernachlässigt werden.

3.2 Chlorpromazin-induzierte Translokation der Phospholipase C- β_{1a}

Der elektrostatische Charakter der Bindung zwischen der Phospholipase C- β_{1a} und der Plasmembran legte Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussbarkeit dieser

3 Ergebnisse

Interaktion nahe. Eine Auswahl von Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie mit Phospholipidmembranen interagieren oder eine Wirkung im Phospholipase C-Signalweg in der Literatur diskutiert worden ist, wurde auf ihren Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der PLC- β_{1a} untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass das als membraninteragierende Substanz bekannte Neuroleptikum Chlorpromazin (Sheetz & Singer, 1974; Hill & Schaefer, 2007) eine Translokation der PLC- β_{1a} aus der Membran auslösen kann (Abb. 3.8).

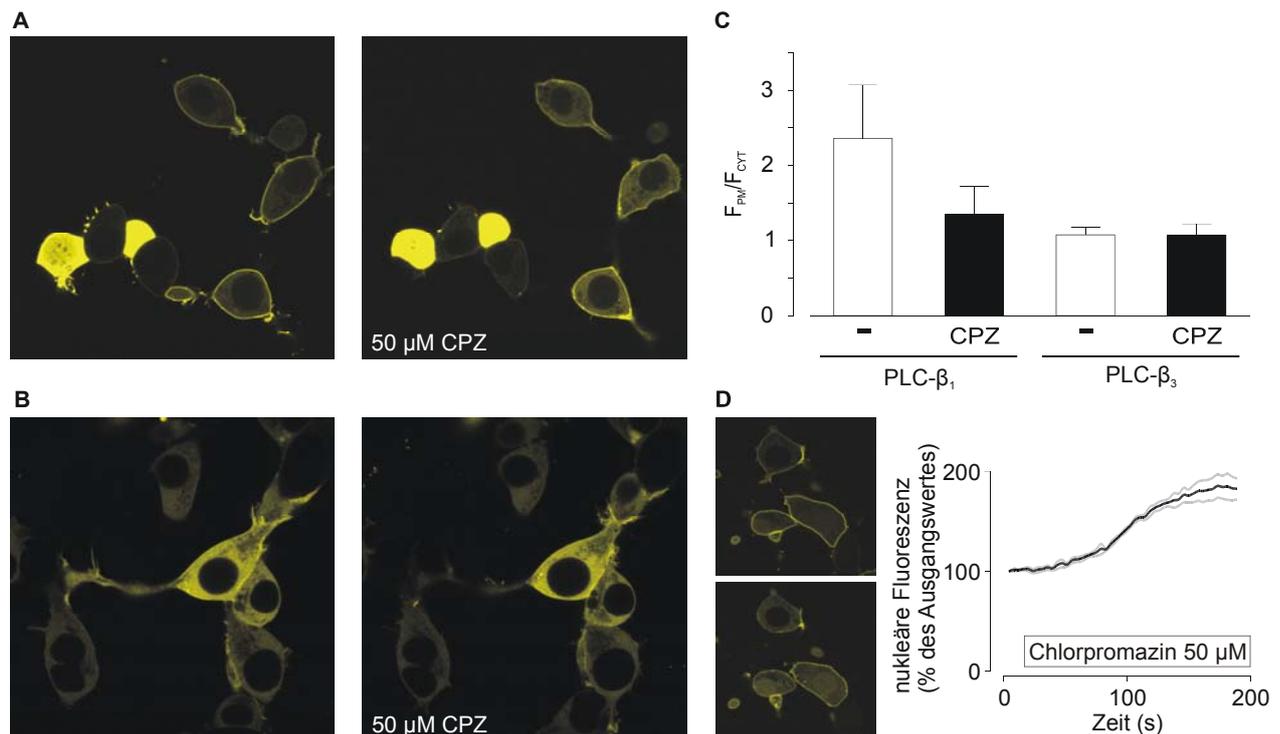


Abbildung 3.8: Chlorpromazin-vermittelte Translokation der PLC- β_{1a} aus der Plasmamembran. HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden für PLC- β_{1a} - und PLC- β_3 -YFP-Fusionsproteine transfiziert und einen Tag nach Transfektion im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Dargestellt sind Falschfarbenbilder repräsentativer PLC- β_{1a} -YFP- (A) und PLC- β_3 -YFP- (B) exprimierender Zellgruppen jeweils vor (links) und 1 Minute nach (rechts) Zugabe von 50 μ M Chlorpromazin. (C) Balkendiagramme der F_{PM}/F_{CYT} -Quotienten der jeweiligen Isoformen vor und nach Chlorpromazinzugabe. (D) Translokation des PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteins aus dem Cytosol in das Kernkompartiment. Links: Falschfarbenbilder repräsentativer Zellgruppen vor (oben) und nach (unten) Zugabe von Chlorpromazin. Rechts: Verlauf der Translokation aus dem Zytosol in den Zellkern in einem repräsentativen Experiment. Graue Kurven: Messungen in einzelnen Zellen, schwarze Kurve: Mittelwerte

3 Ergebnisse

HEK293-Zellen, die das PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsprotein exprimierten, wurden während der Messung im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop 50 μ M Chlorpromazin ausgesetzt. Die Fluoreszenz verlagerte sich daraufhin vom Membrankompartiment in das Cytosol (Abb. 3.8 A, B). In Zellen, die das PLC- β_3 -YFP-Fusionsprotein exprimierten, konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.8 B, C).

In einigen PLC- β_{1a} -YFP-exprimierenden Zellen führte die Behandlung mit 50 μ M Chlorpromazin nach der Translokation von der Membran ins Cytosol zu einer weiteren langsameren Translokation aus dem Cytosol in das Kernkompartiment (Abb. 3.8 D). Dieser Effekt trat unregelmäßig auf und beschränkte sich auf Zellen, die schon vor der Behandlung eine überdurchschnittliche Fluoreszenz im Kernkompartiment aufwiesen. Da dies weder in der Ca^{2+} -abhängigen TRPV1-vermittelten, noch in der osmotisch ausgelösten Translokation zu beobachten war, muss hier ein zusätzlicher Effekt des Chlorpromazins angenommen werden.

Von den anderen untersuchten Substanzen war in den Experimenten keine weitere in der Lage eine Translokation der PLC- β_{1a} aus der Membran auszulösen.

Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die getesteten Substanzen und jeweils Referenzen aus der Literatur zur Membraninteraktion bzw. Wirkung im PLC-Signalweg.

3.3 Bestimmung der für die Membranbindung und Translokation der Phospholipase C- β_{1a} verantwortlichen Domäne

In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse zu der für die Membranbindung der PLC- β_{1a} verantwortlichen Domäne (Rhee, 2001). Biochemische Befunde zu Membranbindungseigenschaften existieren für die N-terminale PH-Domäne (Razzini *et al.*, 2000), für unterschiedliche Regionen innerhalb des C-Terminus (Wu *et al.*, 1993; Kim *et al.* 1996) und ein C-terminales PDZ-Bindungsmotiv (Hwang *et al.*, 2000).

Zur Identifikation der Region innerhalb der PLC- β_{1a} , die für die in den vorangegangenen Experimenten zu beobachtende Membranassoziation und Translokation verantwortlich ist, wurden mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese Plasmide hergestellt, die verkürzte PLC- β_{1a} -YFP-Fusionsproteine kodieren. Diese wurden dann im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop auf Membranassoziation und Translokation untersucht.

3 Ergebnisse

Substanz und Konzentration	Referenz	PLC- β_{1a} - Translokation
Chlorpromazin (50 μ M)	Sheetz & Singer, 1974; Hill & Schaefer, 2007	+
Verapamil (50 μ M bis 100 μ M)	Scheufler <i>et al.</i> , 1990	-
Haloperidol (10 μ M)	Dwivedi <i>et al.</i> , 1999	-
Desipramin (20 μ M bis 200 μ M)	Dwivedi <i>et al.</i> , 2002; Schreier <i>et al.</i> , 2000	-
Fluoxetin (10 μ M bis 100 μ M)	Dwivedi <i>et al.</i> , 2002	-
Tetracain (50 μ M)	Schreier <i>et al.</i> , 2000	-
U-73122 (10 μ M)	Smith <i>et al.</i> , 1990	-
m-CPP (50 μ M)	Dwivedi <i>et al.</i> , 2002	-

Tabelle 3.1: Substanzen, die auf die Fähigkeit zur Auslösung einer Translokation der PLC- β_{1a} untersucht wurden. Angegeben sind jeweils Referenzen aus der Literatur zu Interaktionen mit Phospholipidmembranen bzw. Wirkungen im PLC-Signalweg. Von den getesteten Substanzen löste lediglich Chlorpromazin eine Translokation der PLC- β_{1a} aus.

Im ersten Schritt erfolgte die Teilung des PLC- β_{1a} -Proteins an einer Position hinter der C2-Domäne (Abb. 3.8) zur Herstellung eines N-terminalen Konstruktes der Aminosäuren 1 bis 902 und eines C-terminalen Konstruktes entsprechend der Aminosäuren 903 bis 1216. Dabei zeigte sich, dass das C-terminale, nicht jedoch das N-terminale Konstrukt mit der Plasmamembran assoziierte (Abb. 3.9 B).

Eine genauere Eingrenzung der Bindungsregion erfolgte im C-terminalen Fragment des PLC- β_{1a} -Proteins. Weitere C- und N-terminale Verkürzungen wurden erzeugt und auf ihre Fähigkeit zur Membranassoziation hin untersucht. Der kürzeste Abschnitt, für den eine Membranassoziation nachgewiesen werden konnte, erstreckte sich auf die Aminosäuren 903 - 1030.

3 Ergebnisse

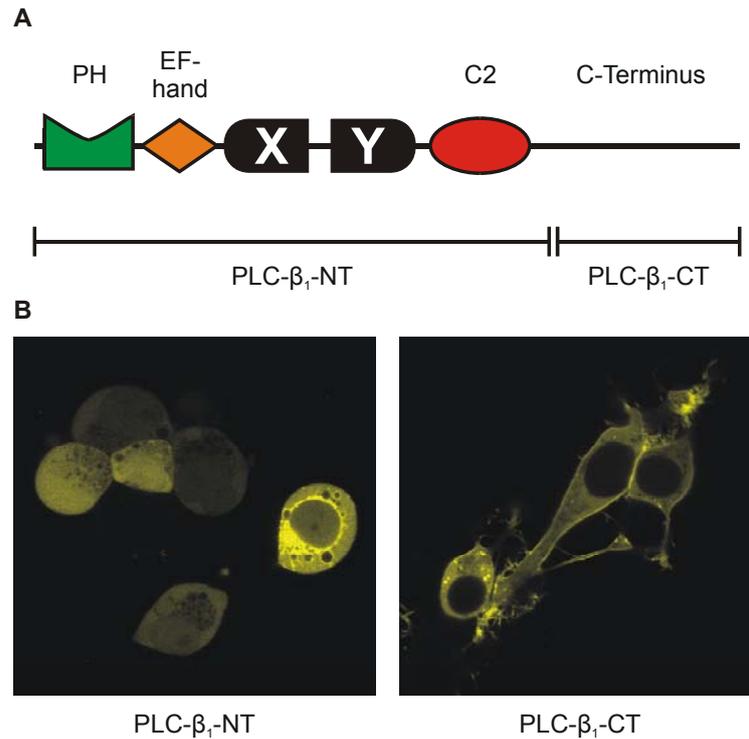


Abbildung 3.9: Domänenstruktur der PLC-β_{1a} und subzelluläre Lokalisation des N-terminalen und C-terminalen Anteils. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PLC-β_{1a} mit der PH-, EF-Hand- und C2-Domäne und den katalytischen X- und Y-Regionen (modifiziert nach Rhee, 2001). (B) Konfokale Bildgebung der YFP-markierten Konstrukte. Das N-terminale Konstrukt assoziiert nicht mit der Plasmamembran.

Bei weiterer Verkürzung ging die Membranbindungsfähigkeit verloren. Eine Membranassoziation, die sich nicht durch TRPV1-vermittelten Ca²⁺-Einstrom aufheben ließ, konnte nicht nachgewiesen werden. Auch das kürzeste Konstrukt, das an die Plasmamembran assoziierte, ließ sich Ca²⁺-abhängig translokieren und glich demzufolge hinsichtlich seines Translokationsverhaltens dem kompletten PLC-β_{1a}-Protein.

Die Aminosäuren 903 – 1030 stimmen mit einer Region überein, die in biochemischen Experimenten für die Assoziation der PLC-β₁ mit der partikulären Zellfraktion und ihre Aktivierung durch die Gα_q-Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verantwortlich gemacht wurde (Wu *et al.*, 1993). Bei Übertragung auf die Kristallstruktur der PLC-β des Truthahns (*Meleagris gallopavo* / Singer *et al.*, 2002) umfasst diese Region die α_A-Helix, das Verbindungsstück zwischen α_A- und α_B-Helix und den N-terminalen Teil der α_B-Helix. Außerdem beinhaltet dieser Abschnitt eine der drei polybasischen Regionen des C-terminalen Fragmentes, deren Beteiligung an der Membranassoziation bereits

3 Ergebnisse

biochemisch nachgewiesen wurde (Kim *et al.*, 1996). Abb. 3.10 stellt schematisch die für die Membranbindung verantwortliche Region in Beziehung zur Kristallstruktur und den polybasischen Regionen des C-terminalen Fragmentes dar.

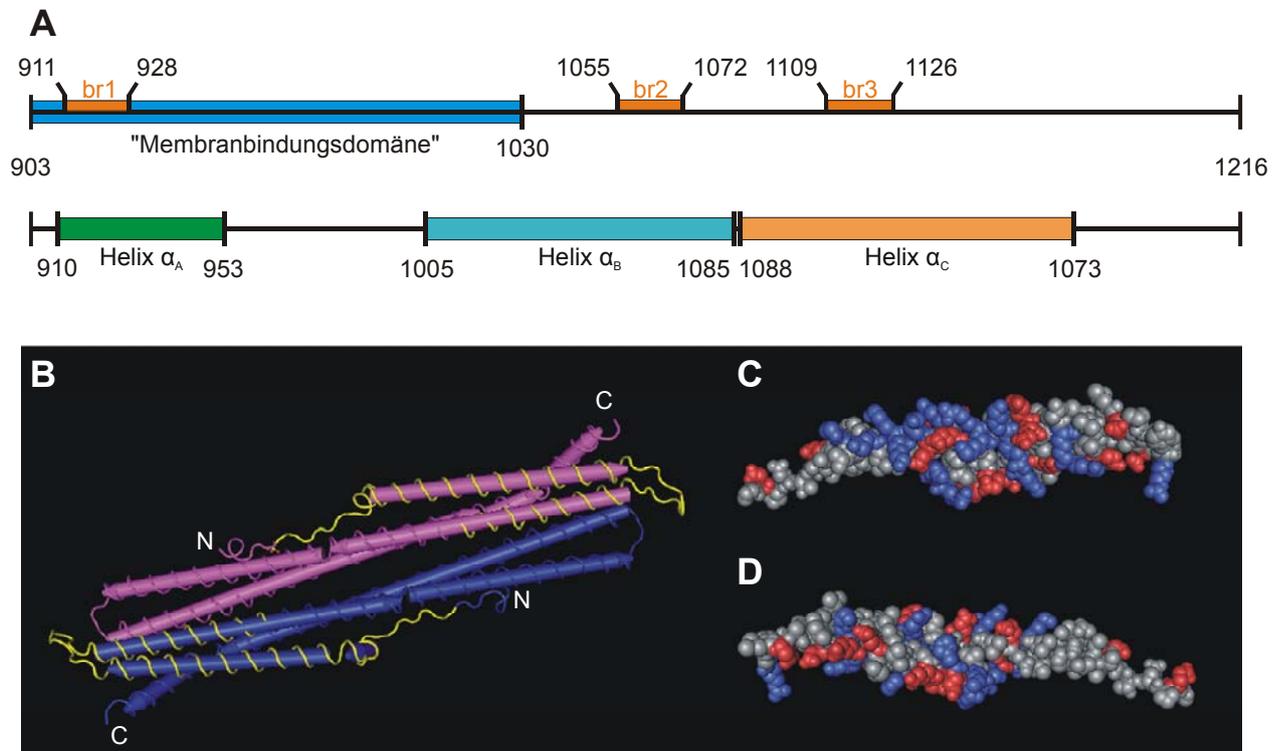


Abbildung 3.10: „Membranbindungsdomäne“ der Phospholipase C-β 1a. (A) Schematische Darstellung der für die Membranbindung verantwortlichen Region in Projektion auf die aus der Kristallstruktur übertragenen Helices. Abgebildet sind außerdem die polybasischen Regionen des C-terminalen Fragmentes (Kim *et al.*, 1996). (B) Markierung der Bindungsregion (gelb) nach Alignment innerhalb der von Singer *et al.*, 2002 publizierten Kristallstruktur des PLC-β-Dimers des Truthahns. (C und D) Ladungsverteilung der Bindungsregion. (C) Ansicht wie in (B) oben. (D) Ansicht der Gegenseite. (B – D) erstellt mit der Software Cn3D der United States National Library of Medicine. *br*: basische Region

Die jeweils verkürzten PLC-β_{1a}-Konstrukte zeigten neben der Membranbindung auch weitere Unterschiede in ihrer subzellulären Lokalisation (Abb. 3.11). Vor allem fiel auf, dass sich das Verhältnis zwischen nukleärer und cytoplasmatischer Verteilung der Konstrukte ab dem Wegfall der letzten C-terminalen 64 Aminosäuren zugunsten der nukleären Lokalisation veränderte, was möglicherweise auf das Überwiegen basischer Aminosäuren mit daraus folgender Bindung an die DNA im Kern in den kürzeren Konstrukten zurückzuführen ist.

3 Ergebnisse

Eine Kernlokalisationssequenz war nach biochemischen Befunden im C-terminalen Ende der PLC- β_1 vermutet worden, konnte dann aber nicht nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 1996). Am ausgeprägtesten war die nukleäre Lokalisation in dem Konstrukt, das die Aminosäuren 902 bis 1087 der PLC- β_{1a} umfasste. Das Konstrukt für den Abschnitt 902 bis 1030 zeigte dagegen wieder eine deutliche cytosolische Lokalisation. Die einzelnen Verkürzungsschritte und das subzelluläre Verteilungsbild repräsentativer Messungen zeigt Abbildung 3.11.

3 Ergebnisse

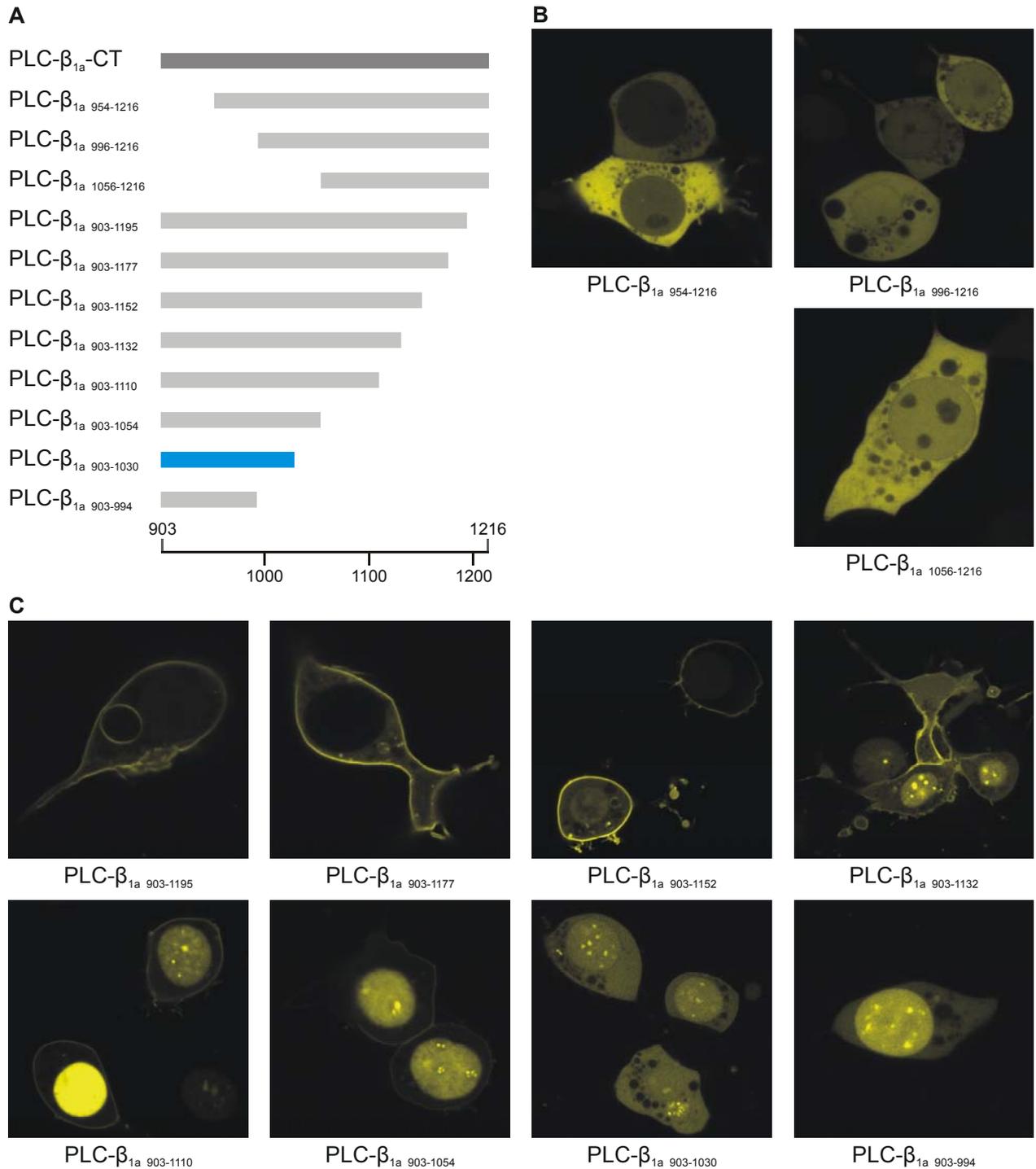


Abbildung 3.11: Kartierung der Membranbindungsdomäne der Phospholipase C-β 1a. (A) Schematische Darstellung der YFP-markierten N- bzw. C-terminal verkürzten Konstrukte des C-terminalen Fragments der PLC-β_{1a}. Der blaue Balken zeigt das kürzeste Konstrukt, das an die Plasmamembran assoziierte. (A und B) Repräsentative Zellgruppen, die Konstrukte für die N-terminalen (B) und C-terminalen Verkürzungen des C-terminalen Fragments der PLC-β_{1a} exprimieren.

4 Diskussion

Die Lokalisation von Signalproteinen innerhalb verschiedener Zellkompartimente ist für die Kontrolle der Lokalisation, Verstärkung, Robustheit und Geschwindigkeit der Weiterleitung eines intrazellulären Signals von großer Relevanz. Die Familie der Phospholipasen C- β wird durch die $G\alpha_q$ -Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert und katalysiert in der Folge die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die intrazellulären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat ($InsP_3$) und Diacylglycerol (Rhee, 2001). Sowohl die $G\alpha_q$ -Untereinheit als Aktivator als auch das Substrat PIP_2 befinden sich dabei im Plasmamembran-Kompartiment der Zelle. Die schnelle intrazelluläre Weiterleitung eines durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor ausgelösten Signals durch die PLC- β ist also davon abhängig, ob die PLC- β selbst bereits vor ihrer Aktivierung mit der Plasmamembran assoziiert ist oder ob sie erst durch Diffusion oder aktiven Transport ihren Aktivator und ihr Substrat erreichen kann (Schaefer, 2002).

Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Versuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit die subzelluläre Lokalisation der Phospholipase C- β_{1a} in verschiedenen Zelllinien und unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen untersucht. Dabei zeigte sich einerseits, dass die PLC- β_{1a} in ruhenden HEK293- und HIT-Zellen weitgehend in der Plasmamembran lokalisiert ist und somit die oben genannte Bedingung zur schnellen intrazellulären Weiterleitung von Signalen erfüllt aber andererseits auch, dass die Plasmamembranbindung Agonist-induziert oder durch Veränderung des extrazellulären Milieus beeinflussbar ist.

Ein Verlust oder eine Verstärkung der Membranbindung der PLC- β_{1a} könnten dabei durch direkte Einwirkung auf die Weiterleitung $G\alpha_q$ -vermittelter Signale eine Rolle in physiologischen, pathologischen oder pharmakologischen Prozessen spielen.

Besondere Aufmerksamkeit verdient die in den beschriebenen Experimenten beobachtete Ca^{2+} -abhängige Translokation der PLC- β_{1a} aus der Plasmamembran. Da auch ein Ast des PLC-Signalweges selbst, die $InsP_3$ -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, direkt zu einer Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt, könnte die Translokation der PLC- β_{1a} aus der Plasmamembran einen Regulationsmechanismus im Sinne einer negativen Rückkopplung darstellen.

4.1 Subzelluläre Lokalisation und Membranbindungsdomäne der Phospholipase C- β_{1a}

Bereits in einer früheren Arbeit zur Lokalisation und Aktivierung der PLC- β_1 in COS-7-Zellen konnte mit Hilfe biochemischer Methoden nachgewiesen werden, dass die PLC- β_1 nach Aufschluss der Zellen und Western-Blot-Analyse der unterschiedlichen Fraktionen hauptsächlich im Bereich der partikulären Zell-Fraktion zu finden war. Außerdem wurde durch Deletionsanalysen der Abschnitt der PLC- β_1 , der zu dieser Assoziation mit der partikulären Zell-Fraktion nötig war, im Bereich der Aminosäuren 903 bis 1030 identifiziert und gezeigt, dass dieser Abschnitt, als P-Box bezeichnet, auch zur Aktivierung der PLC- β_1 durch die $G\alpha_q$ -Untereinheit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren benötigt wird (Wu *et al.*, 1993).

Die angewandte Methode erlaubte damals keine Differenzierung des innerhalb der partikulären Fraktion durch die PLC- β_1 gebundenen Zellanteils (Plasmamembran, Zytoskelett oder endoplasmatisches Retikulum). Dennoch diskutierten die Autoren, dass die fehlende Aktivierbarkeit der Deletionsmutante ohne die Aminosäuren 903-1030 durch Verlust der Membranbindung begründet sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden und Fluoreszenzprotein-gekoppelter PLC- β_{1a} -Konstrukte gezeigt werden, dass die PLC- β_{1a} in lebenden HEK293- und HIT-Zellen an die Plasmamembran gebunden ist und dass diese Bindung durch jene Domäne im Bereich der Aminosäuren 903-1030 vermittelt wird, die bereits für die partikuläre Assoziation der PLC- β_1 verantwortlich gemacht worden war. In Abb. 4.1 ist die Lokalisation der Membranbindungs-vermittelnden P-Box innerhalb der Domänenstruktur der PLC- β_{1a} abgebildet.

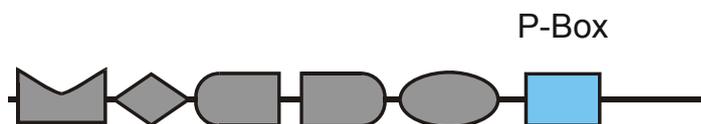


Abbildung 4.1: Lokalisation der Membranbindungsdomäne der Phospholipase C- β 1a. Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PLC- β_{1a} (modifiziert nach Rhee, 2001) einschließlich der Membranbindungsdomäne „P-Box“ im C-Terminus.

4 Diskussion

In der Literatur existieren auch andere Ergebnisse zu subzellulärer Lokalisation und Membranbindungsdomänen der PLC- β_1 . So wurde gezeigt, dass die PLC- β_1 in einigen Zelllinien auch oder sogar hauptsächlich im Zellkern lokalisiert sei und dort in von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren unabhängige Signalprozesse eingebunden sein könnte (Martelli *et al.*, 1992; Divecha *et al.*, 1993; Kim *et al.* 1996; Manzoli *et al.*, 2005). Eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden Spleißvarianten der PLC- β_1 konnte mit Hilfe immunologischer Methoden in C6Bu-1-Zellen beobachtet werden (Bahk *et al.* 1998). Dort war die PLC- β_{1a} hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, während die PLC- β_{1b} vor allem im Zellkern nachgewiesen werden konnte.

Membranbindungseigenschaften wurden auch für die N-terminale PH-Domäne der PLC- β_1 beobachtet. Diese war in ruhenden Zellen verschiedener Zelllinien jeweils im Cytosol lokalisiert und translozierte dann nach Stimulation durch Serum oder Lyso-phosphatidsäure in die Plasmamembran, wobei eine hohe Affinität zum Phosphatidylinositol-3-Kinase-Produkt Phosphatidylinositol-3-Phosphat nachgewiesen werden konnte (Razzini *et al.*, 2000). Auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Membranbindung hatte die PH-Domäne der PLC- β_{1a} keinen Einfluß. So konnte in ruhenden HEK293-Zellen weder eine Membranbindung des die PH-Domäne enthaltenden N-terminalen Anteils der PLC- β_{1a} beobachtet werden, noch war dieser N-terminale Anteil für die Bindung des Proteins an die Plasmamembran nötig.

Auch im C-Terminus der PLC- β_{1a} wurden neben der P-Box auch weiteren Regionen bindungsvermittelnde Eigenschaften zugeschrieben. So wurden die Beteiligung von drei im C-Terminus lokalisierten polybasischen Regionen (Abb. 3.10) an der partikulären Assoziation der PLC- β_1 in Deletionsexperimenten beobachtet (Park *et al.*, 1996). Von diesen befand sich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen allerdings nur die erste innerhalb der Region, die für die Bindung an die Plasmamembran verantwortlich war.

Auch das sich im C-Terminus befindliche PDZ-Bindungsmotiv, dessen Mitwirkung an der Membranbindung durch Bindung an Na^+/K^+ -Austauscher Regulationsfaktoren NHERFs vermutet worden ist (Rhee, 2000; Hwang *et al.*, 2000), war für die hier zu beobachtende Membranbindung nicht erforderlich.

Für die PLC- δ_1 ist eine Beteiligung ihrer C2-Domäne an der Membranbindung durch eine Komplexbildung mit Ca^{2+} und Phosphatidylserin nachgewiesen worden (Lomasney *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu zeigten Wang *et al.*, 1999, dass die C2-Domäne der

PLC- β_1 an ihrer Aktivierung durch $G\alpha_q$, aber nicht an der Bindung an die Plasmamembran beteiligt ist.

4.2 Membranbindungseigenschaften der Phospholipase C- β_{1a}

Hinweise auf den elektrostatischen Charakter der Bindung zwischen der PLC- β_1 und der Plasmamembran finden sich ebenfalls bereits in der Literatur. So wurde berichtet, dass sich die nach Zellfraktionierung in der partikulären Fraktion lokalisierte PLC- β_1 durch eine hohe Salzkonzentration in die lösliche Phase umverteilen ließ (Katan *et al.*, 1988). Später wurde mit Hilfe von Phospholipid-Liposomen-Assays nachgewiesen, dass die PLC- β_1 eine hohe Affinität zu dem im inneren Blatt der Plasmamembran stark angereicherten Phospholipid Phosphatidylserin besitzt und dass sich die Bindung zwischen der PLC- β_1 und Phosphatidylserin durch hohe Konzentration von Kaliumchlorid (KCl) verdrängen lässt (Ross *et al.*, 2006).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass sich die PLC- β_1 auch in lebenden Zellen durch Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im Rahmen von Signaltransduktionskaskaden ebenso wie durch hohe Salzkonzentrationen im extrazellulären Medium aus der Membranbindung verdrängen lässt. Darüber hinaus konnte der membrangebundene Anteil der zellulären PLC- β_1 - und PLC- β_3 -Proteine durch die Verringerung der Salzkonzentration im Außenmedium weiter gesteigert werden. Unter der Annahme von Phosphatidylserin als Bindungspartner der PLC- β_1 in der Plasmamembranbindung kann somit ein Modell vorgeschlagen werden, in dem die PLC- β_1 durch Kationen aus der Bindung mit den anionischen Kopfgruppen des negativ geladenen Phospholipids Phosphatidylserin verdrängt werden kann (Abb. 4.2).

Weitere Konkurrenten um eine mögliche Phosphatidylserin-Bindung könnten andere Proteine wie die Proteinkinase C oder die PLC- δ_1 (vgl. Kapitel 4.1) sein, von denen eine Ca^{2+} -abhängige Bindung an Phosphatidylserin bekannt ist.

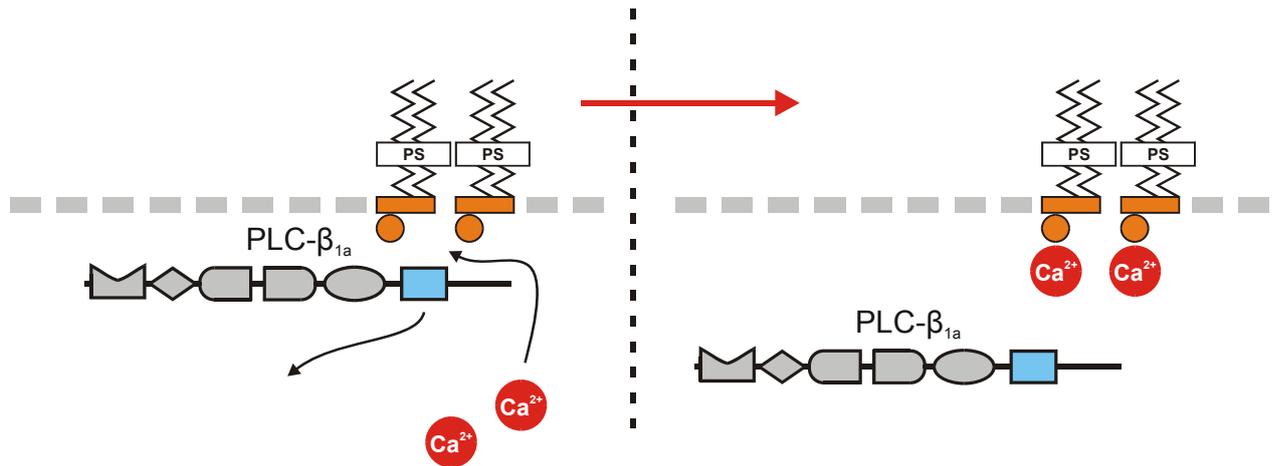


Abbildung 4.2: Verdrängung der PLC-β_{1a} aus der Membranbindung durch Calcium (Modell). Nach Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration könnte Ca²⁺ in diesem Modell die P-Box aus der hier angenommenen elektrostatischen Bindung mit Phosphatidylserin (PS) verdrängen.

4.3 Regulation der PLC-β_{1a}-Aktivität durch Translokation aus der Plasmamembran

Die hier beobachtete und auf verschiedene Weise induzierbare Translokation der PLC-β_{1a} aus der Plasmamembran führt zu einer räumlichen Trennung sowohl von der Gα_q-Untereinheit als ihrem Aktivator als auch von ihrem Substrat PIP₂. Diese Trennung wiederum könnte durch die fehlende Aktivierbarkeit und den fehlenden Kontakt zum Substrat zu einer Verringerung der Aktivität der PLC-β_{1a} führen. Im Fall der Translokation durch erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen im Cytosol könnte dieser Mechanismus als eine negative Rückkopplung des infolge der PLC-Aktivierung aus intrazellulären Speichern freigesetzten Ca²⁺ auf die PLC-β_{1a} gedeutet werden. Abb. 4.3 zeigt schematisch das Modell eines möglichen Regulationsmechanismus.

Ein solches Modell widerspricht auf den ersten Blick frühen Beobachtungen, nach der die gemeinsame Eigenschaft der Phospholipasen C darin besteht, dass ihre Aktivität durch Ca²⁺ gesteigert und durch das Fehlen von Ca²⁺ gehemmt wird. Diese wurden sowohl in *invitro*-Experimenten in Bezug auf die katalytische Aktivität der Phospholipasen C (Ryu *et al.*, 1987, Smrcka *et al.*, 1991), als auch in permeabilisierten Zellen erhoben, in denen der Rezeptor-vermittelte Phosphoinositid-Umsatz durch EGTA angehalten und durch die Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration beschleunigt wurde (Fisher *et al.*, 1989; Wojcikiewicz *et al.*, 1994).

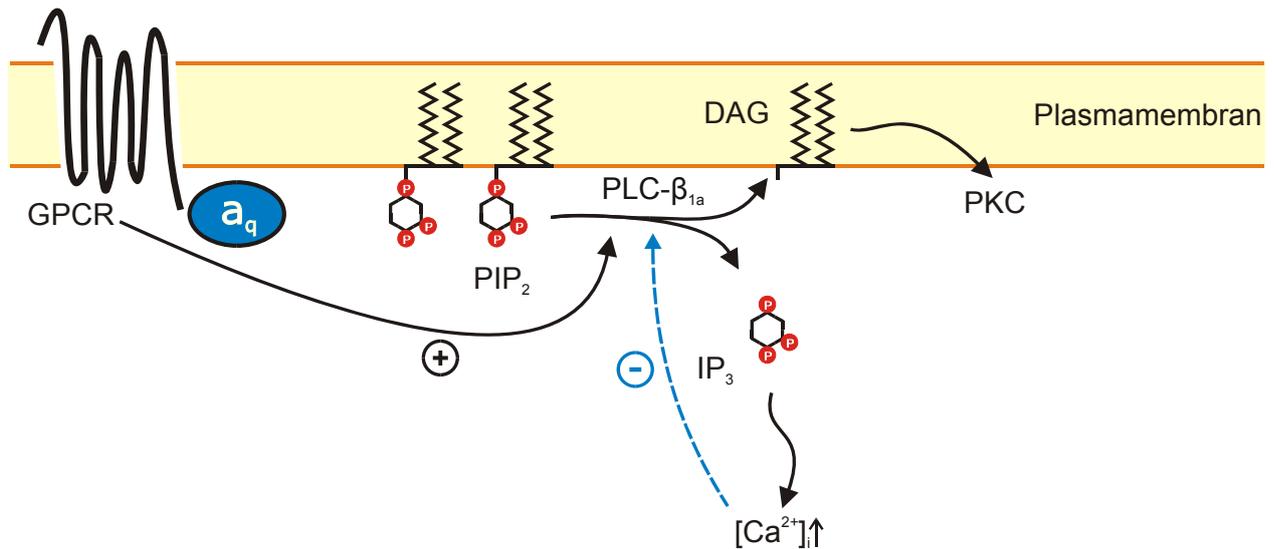


Abbildung 4.3: Negativer Rückkopplungsmechanismus der PLC- β_{1a} -Aktivität durch Calcium (Modell). Schematische Darstellung zur Hemmung der PLC- β_{1a} -Aktivität durch Ca^{2+} -abhängige Translokation. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktivieren $\text{G}\alpha_q$ -vermittelt die PLC- β_{1a} . Diese spaltet PIP_2 zu DAG und Inositoltriphosphat (IP_3). IP_3 vermittelt die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Das freigesetzte Ca^{2+} wiederum verdrängt die PLC- β_{1a} aus der Plasmamembranbindung und hemmt somit deren Aktivität (blau gestrichelter Pfeil).

Der Angriffspunkt für den steigenden Einfluss von Ca^{2+} auf die katalytische Aktivität der Phospholipasen C wird jedoch bisher in den katalytischen Domänen vermutet (Rhee, 2001) und ist daher wahrscheinlich unabhängig von der hier beschriebenen Ca^{2+} -abhängigen Translokation. Ein Befund, der das Modell einer negativen Rückkopplung von Ca^{2+} auf die PLC- β_{1a} unterstützen könnte, wurde in einer Arbeit zum Einfluss des Membranpotentials auf den PLC-Signalweg erhoben. Dort zeigte sich in SH-S5Y5-Zellen, dass durch den $\text{G}\alpha_q$ -gekoppelten Bradykinin-Rezeptor vermittelte PLC-Signale bei Depolarisation der Zellen abgeschwächt werden. Interessanterweise wurden jedoch PLC-Signale, die durch den ebenfalls $\text{G}\alpha_q$ -gekoppelten M_3 -Subtyp des muskarinischen Acetylcholinrezeptors vermittelt wurden, durch die Depolarisationen verstärkt (Billups *et al.*, 2006).

Eine derartige Verstärkung von PLC- β -Signalen durch Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im Sinne positiver Rückkopplung wurde auch in weiteren Arbeiten nachgewiesen, so dass selbst eine Funktion des PLC- β -Signalweges als Sensor für die Koinkidenz ionotroper und metabotroper Ca^{2+} -Signale diskutiert wurde (Thore *et al.*, 2005; Hashimoto *et al.*, 2005; Horowitz *et al.*, 2005).

4 Diskussion

Eine Verstärkung der Aktivität der PLC- β_{1a} durch den Verlust ihrer Membranbindung und damit auch der räumlichen Nähe zu Aktivator und Substrat erscheint jedoch unwahrscheinlich, so dass möglicherweise andere PLC- β -Isoformen für das konsekutiv verstärkte PLC-Signal verantwortlich sein könnten.

Ihre Eigenschaft als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für $G\alpha_q$ (Berstein *et al.*, 1992; Biddlecome *et al.*, 1996; Chidiac & Ross, 1999) könnte jedoch auch der PLC- β_{1a} eine Rolle in einer solchen Verstärkung der Aktivitäten anderer PLC- β -Isoformen zuweisen. GTPase-aktivierende Proteine beschleunigen die Hydrolyse des an die $G\alpha$ -Untereinheit gebundenen GTP zu GDP und führen somit zu einer schnelleren Inaktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit.

Die Aufgabe der GAP-Aktivität der PLC- β_1 wird darin vermutet, die Schwelle für ihre Aktivierung durch die $G\alpha_q$ -Untereinheit zu erhöhen, so dass Signale, die wegen der relativ langsamen intrinsischen GTPase-Aktivität von $G\alpha_q$ auch nach Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor noch fortgeleitet würden, auf diese Weise unterdrückt werden (Rebecchi & Pentylala, 2000). Eine Verstärkung PLC- β -vermittelter Signale durch die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration könnte also auch dadurch entstehen, dass die aktivierte $G\alpha_q$ -Untereinheit durch die Translokation der PLC- β_{1a} vor deren GAP-Aktivität geschützt wird und somit ankommende Signale länger fortleiten kann. Interessanterweise liegt der Abschnitt der PLC- β_1 , der für die GAP-Aktivität verantwortlich gemacht wird, im Bereich der Aminosäuren 903-1042 (Paulssen *et al.*, 1996) und ist somit nahezu identisch mit der Membranbindungsdomäne. Abb. 4.4 zeigt schematisch ein Modell einer positiven Rückkopplung PLC- β -vermittelter Signale durch Erhöhungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter Berücksichtigung der Translokation der PLC- β_{1a} aus der Plasmamembran und ihrer GAP-Aktivität.

Kürzlich wurde mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Experimente in neonatalen ventrikulären Ratten-Myozyten (NRVMs) gezeigt, dass die b-Spleißvariante der PLC- β_1 eine weitere Membranbindungsdomäne in dem ihr eigenen 31 Aminosäuren langen C-Terminus besitzt und außerdem nachgewiesen, dass die PLC- β_{1b} in diesen Zellen in der Plasmamembran lokalisiert und im Gegensatz zu der dort cytosolisch lokalisierten PLC- β_{1a} verantwortlich für die Weiterleitung $G\alpha_q$ -vermittelter Signale ist (Grubb *et al.*, 2008).

4 Diskussion

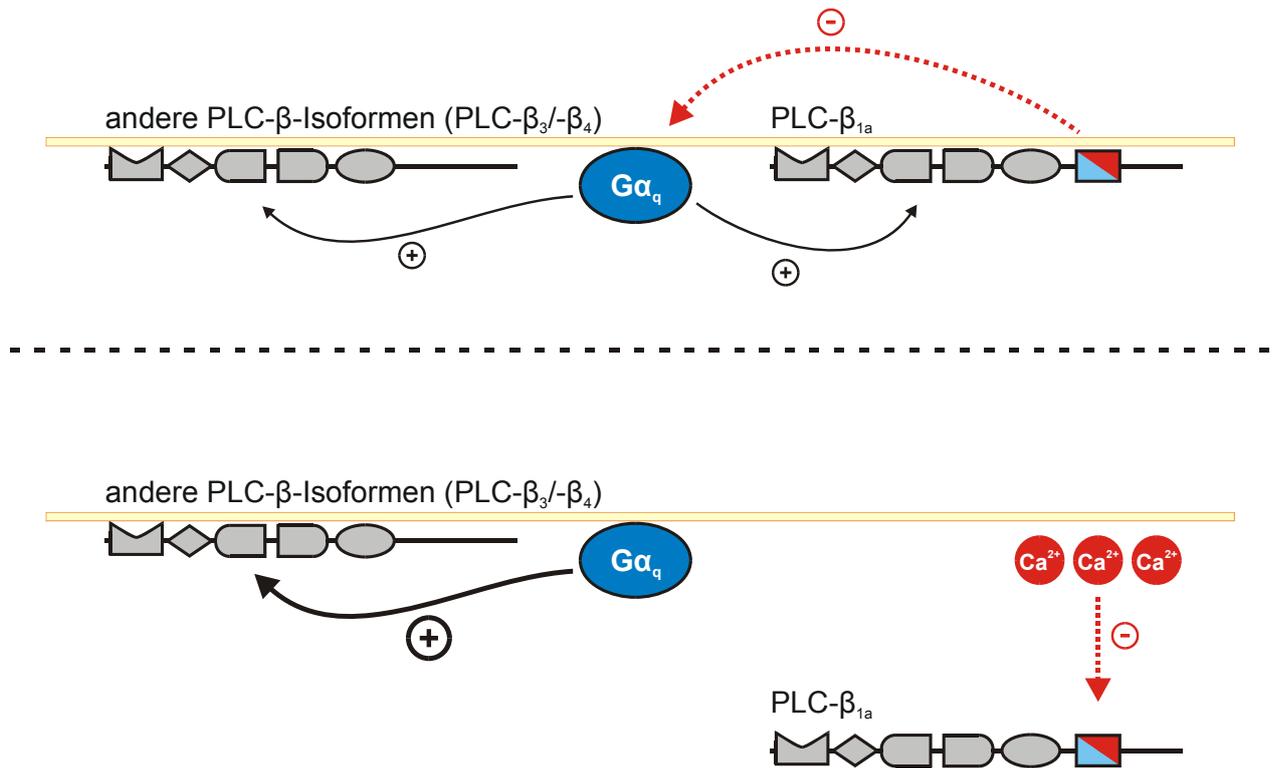


Abbildung 4.4: Verstärkung $G\alpha_q$ -vermittelter Signale durch Ca^{2+} -abhängige Translokation der PLC- β_{1a} (Modell). Schematische Darstellung zur Ca^{2+} -abhängigen Verstärkung $G\alpha_q$ -vermittelter Signale durch die Hemmung der PLC- β_{1a} -GAP-Aktivität. Die inhibitorische Wirkung der PLC- β_{1a} (oben, roter Pfeil) wird durch die Ca^{2+} -abhängige Translokation aufgehoben (unten). Die aktivierte $G\alpha_q$ -Untereinheit kann ihr Signal länger auf andere PLC- β -Isoformen fortleiten.

Die a- und b-Spleißvarianten der PLC- β_1 unterscheiden sich ab der Aminosäure 1142, auf die ein jeweils spezifischer 64 (in der PLC- β_{1a}) bzw. 31 (in der PLC- β_{1b}) Aminosäuren langer C-Terminus folgt (Bahk *et al.*, 1994). Im Bereich der P-Box und der Domäne, die die GAP-Aktivität der PLC- β_1 vermittelt, unterscheiden sich die beiden Spleißvarianten jedoch nicht. Bezieht man die unterschiedliche Expression der PLC- β -Isoformen und PLC- β_1 -Spleißvarianten in den verschiedenen Zelltypen und Geweben (Rebecchi & Pentylala, 2000; Grubb *et al.*, 2008) in diese Überlegungen mit ein, lässt sich das zuvor vorgestellte Modell derart erweitern, dass sich ein vom jeweiligen PLC- β -Expressionsmuster abhängig differenziertes PLC- β -Signal ergeben könnte.

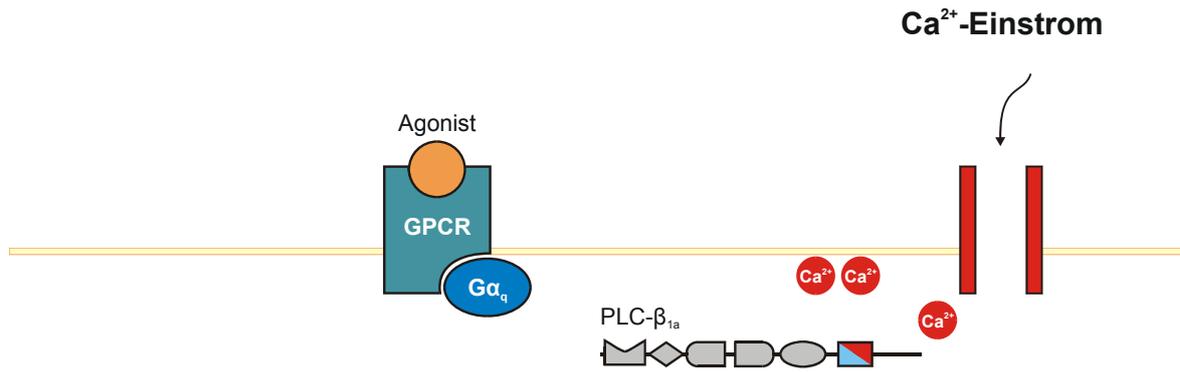
Noch differenzierter könnten in einem solchen Modell die Antworten der unterschiedlichen PLC- β -Isoformen auf die Koinzidenz metabotroper und ionotroper Ca^{2+} -Signale ausfallen (Abb. 4.5). In einem lediglich die PLC- β_{1a} exprimierenden Modell wäre ein $G\alpha_q$ -vermitteltes metabotropes Signal durch die Ca^{2+} -abhängige Translokation nach einem suffizienten ionotropen Ca^{2+} -Signal nicht mehr auslösbar (Abb. 4.5 A). In einem

System, das die PLC- β_{1b} allein oder zusammen mit einer PLC- β -Isoform ohne GAP-Aktivität exprimiert, würde das Koinzidenz-Signal in seiner Intensität dem metabotropen Signal entsprechen, da die PLC- β_{1b} durch ihre zusätzliche Membranbindungsdomäne im C-Terminus (grüner Kasten in Abb. 4.5) nicht durch das ionotrope Ca^{2+} -Signal aus der Membranbindung zu verdrängen wäre und somit sowohl das PLC-Signal als auch die GAP-Aktivität gleichermaßen weiterlaufen könnte (Abb. 4.5 B). Zu einer Verstärkung eines metabotropen Signals durch Koinzidenz mit einem ionotropen Signal könnte es schließlich in einem Modell kommen, in dem die PLC- β_{1a} zusammen mit einer PLC- β -Isoform ohne GAP-Aktivität exprimiert wird. Durch das ionotrope Ca^{2+} -Signal würde die PLC- β_{1a} aus der Membranbindung gedrängt und dadurch in ihrer GAP-Aktivität inhibiert. Die aktivierte $G\alpha_q$ -Untereinheit könnte ihr Signal länger auf andere PLC- β -Isoformen fortleiten (Abb. 4.5 C).

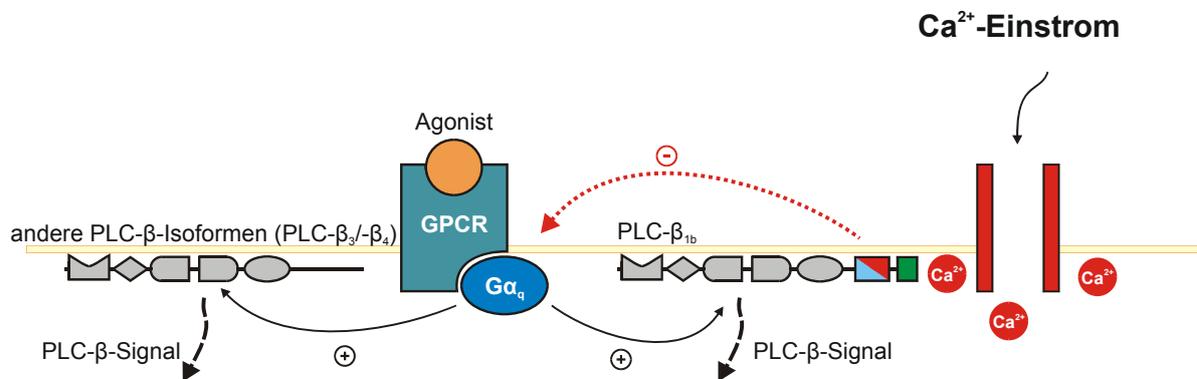
4.4 Hinweise auf Relevanz in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen

Koinzidenz-Signale sind in neuronalen Signaltransduktionswegen und für Mechanismen der neuronalen Plastizität von großer Bedeutung. Der in dieser Arbeit charakterisierte Effekt der Ca^{2+} -abhängigen Translokation der PLC- β_{1a} und die daraus abgeleiteten Modelle möglicher Regulationsmechanismen der PLC- β -vermittelten Signaltransduktion könnten daher eine Rolle in einigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen spielen, für die eine Beteiligung der PLC- β_1 bereits gezeigt wurde. Erste Hinweise auf eine Rolle der PLC- β_1 in der neuronalen Entwicklung ergaben sich aus Beobachtungen einer besonders hohen PLC- β_1 -Expression im visuellen Kortex postnataler Katzen. Dabei zeigte sich, dass Phasen hoher Expression parallel zu Phasen hoher neuronaler Plastizität verlaufen und sich ebenso wie diese aktivitätsabhängig verlängern lassen (Kind *et al.*, 1997). Auch weitere Arbeiten an Ratten und schließlich auch Knockout-Mäusen konnten eine Bedeutung der PLC- β_1 für die Entwicklung des somatosensorischen Kortex (Hannan *et al.*, 2001; Hannan *et al.*, 1998) und dendritischer Dornfortsätze und Synapsen nachweisen (Spires *et al.*, 2005).

A kein PLC- β -Signal



B PLC- β -Signal \leftrightarrow



C PLC- β -Signal \uparrow

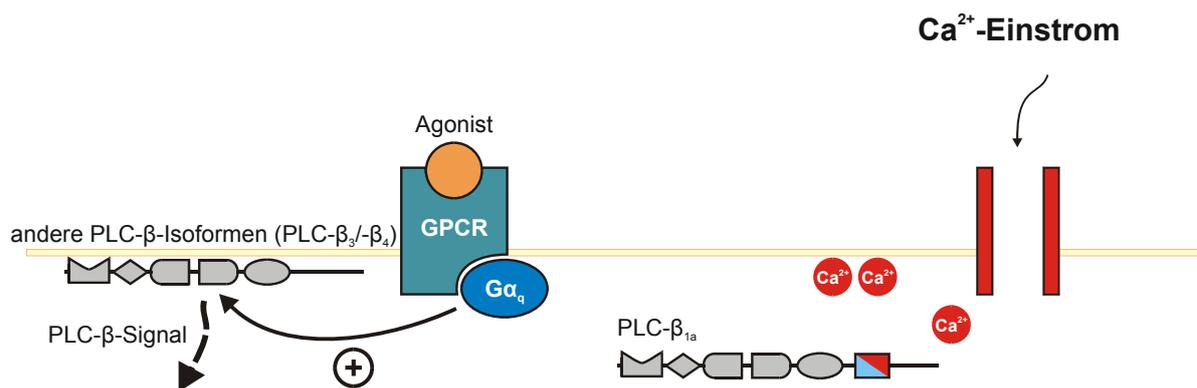


Abbildung 4.5: Weiterleitung von PLC- β -Signalen bei Koinkidenz metabotroper und ionotroper Ca $^{2+}$ -Signale. Erläuterung im Text.

4 Diskussion

Auf zellulärer Ebene konnte dann in einer vielbeachteten Arbeit in elektrophysiologischen Untersuchungen an hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden, dass die PLC- β_1 als Koinzidenz-Detektor für die Freisetzung von Endocannabinoiden nach gleichzeitiger Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren und spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen dient (Hashimotodani *et al.*, 2005). Dieser Vorgang wird in neueren Übersichtsartikeln als ein möglicher Mechanismus der synaptischen Plastizität durch Langzeit-Depression angesehen (Heifets & Castillo, 2009; Caporale & Dan, 2008; Kauer & Malenka, 2007; Hashimotodani *et al.*, 2007; Chevaleyre *et al.*, 2006).

Auch in Untersuchungen zu pathophysiologischen Prozessen konnten einige Befunde erhoben werden, die auf eine Beteiligung der PLC- β_1 hinweisen. So zeigten sich in Gehirnen von Patienten mit chronischer Schizophrenie (Lin *et al.*, 1999; Shirakawa *et al.*, 2001) und von jugendlichen Suizidopfern (Pandey *et al.*, 1999) abweichende Expressionsmuster der PLC- β_1 . Darüber hinaus konnte auch nachgewiesen werden, dass im Zustand der Stress-induzierten erlernten Hilflosigkeit, einem Tiermodell der Depression, die Expression der PLC- β_1 im frontalen Kortex und Hippocampus von Ratten sinkt (Dwivedi *et al.*, 2005). Interessanterweise hatte die selbe Arbeitsgruppe zuvor gezeigt, dass die Expression der PLC- β_1 in Gehirnen von Ratten durch eine 21-tägige Gabe von antidepressiv bzw. anxiolytisch wirksamen Substanzen (Desipramin, Fluoxetin, Alprazolam, Buspiron) ebenfalls gesenkt wurde (Dwivedi *et al.*, 2002).

Dieses widersprüchlich wirkende Ergebnis könnte dadurch begründet sein, dass in den hier beschriebenen Arbeiten nicht zwischen den beiden Spleißvarianten der PLC- β_1 differenziert wurde. Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Effekt der Ca^{2+} -abhängigen Translokation der PLC- β_{1a} deutet jedoch zusammen mit der für die PLC- β_{1b} nachgewiesenen zusätzlichen Membranbindungsdomäne (Grubb *et al.*, 2008) auf fundamental entgegengesetzte Regulationsmechanismen hin. Expressionsanalysen, die nach den beiden Spleißvarianten differenzieren, könnten in Zukunft zur weiteren Einordnung der Relevanz des in dieser Arbeit vorgestellten Effektes beitragen.

Ein weiteres Feld für zukünftige Arbeiten ergibt sich aus neueren Untersuchungen aus verschiedenen Arbeitsgruppen an PLC- β_1 -Knockout-Mäusen, die in Verhaltensexperimenten neben den vorbeschriebenen Orientierungsstörungen (Böhm *et al.*, 2002) weitere Auffälligkeiten in Form motorischer Hyperaktivität, gestörter sensomotorischer Hemmung und kognitiver Beeinträchtigung nachweisen konnten, welche als Korrelate schizophreniformer Symptome in Nagern gelten (McOmish *et al.*, 2007; Koh *et al.*,

4 Diskussion

2008). Diese Defizite konnten zum Teil durch die Gabe des atypischen Antipsychotikums Clozapin oder positive Umweltfaktoren verbessert werden.

In der vorliegenden Arbeit war aus einer Auswahl von Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie mit Phospholipidmembranen interagieren, lediglich das Antipsychotikum Chlorpromazin (in der Lage eine Translokation der PLC- β_{1a} auszulösen, wobei die erforderliche Konzentration das 50fache der therapeutischen Konzentration betrug. In Zusammenschau mit den zuvor genannten Arbeiten zu einer möglichen Rolle der PLC- β_1 für Mechanismen der neuronalen Plastizität könnte dies dennoch einen weiteren Hinweis für die Bedeutung der PLC- β_1 in der Pathophysiologie der Schizophrenie darstellen.

Kürzlich wurde in einem Fallbericht erstmals eine humane Mutation des PLC- β_1 -Gens in einem Kind konsanguiner Eltern mit frühkindlicher epileptischer Enzephalopathie nachgewiesen (Kurian *et al.*, 2010). Hinweise auf eine Rolle der PLC- β_1 in der Pathophysiologie epileptischer Syndrome hatten sich bereits aus ersten Knockout-Experimenten ergeben, in denen das Fehlen des PLC- β_1 -Gens in Mäusen einen Phänotyp mit starker Neigung zu schließlich letalen epileptiformen Anfällen hervorgebracht hatte (Kim *et al.*, 1997). Das Fehlen eines Ca^{2+} -abhängigen Regulationsmechanismus in einer PLC- β_1 -defizienten neuronalen Signaltransduktion könnte an der Genese epileptischer Störungen beteiligt sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein möglicher neuer Mechanismus in der Feinabstimmung PLC-vermittelter zellulärer Signale vorgestellt werden, der auf der Ca^{2+} -abhängigen Translokation der PLC- β_{1a} aus der Plasmamembran basiert. In folgenden Arbeiten wird die Bedeutung dieses Effektes in der neuronalen Signaltransduktion untersucht werden. Von besonderer Relevanz für Mechanismen der neuronalen Plastizität, deren Störung in der Pathogenese psychiatrischer und neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen scheint, ist die Erzeugung von Koinzidenzsignalen aus verschiedenen Ästen intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden. In einem ersten weiteren Schritt wird daher die Rolle der Ca^{2+} -abhängigen Translokation der PLC- β_{1a} aus der Plasmamembran für die Generierung solcher Koinzidenzsignale mit Hilfe kombinierter elektrophysiologischer und fluoreszenzmikroskopischer Methoden an neuronalen Zelllinien untersucht werden. Außerdem sollen mit Hilfe eines systematisierten Screenings die in dieser Arbeit begonnenen Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussbarkeit des vorgestellten Effektes fortgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Die Phospholipase C- β_{1a} wird nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert und katalysiert anschließend die Bildung der beiden intrazellulären *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol. InsP₃ vermittelt die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, die für die Aktivierung und Modulierung vieler weiterer intrazellulärer Prozesse und Signalkaskaden von großer Bedeutung ist. Dadurch kommt der PLC β_{1a} eine zentrale Rolle in Ca²⁺-vermittelten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden zu.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die subzelluläre Lokalisation der PLC β_{1a} und dynamische Änderungen dieser Lokalisation während intrazellulärer Signalprozesse mit Hilfe der transienten Transfektion fluoreszierender Fusionsproteine und verschiedener fluoreszenzmikroskopischer Methoden untersucht. Die Lokalisation eines Signalproteins und ihre dynamische Änderung sind wichtige Parameter für Geschwindigkeit und Effizienz der Weiterleitung eines intrazellulären Signals. Es zeigte sich, dass die primär membranlokalisierte PLC β_{1a} durch eine Erhöhung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration aus der Plasmamembran ins Cytosol transloziert. Durch Trunkierungen des Proteins mittels ortsgerichteter Mutagenese wurde die sowohl für die Membranbindung als auch für die Ca²⁺-abhängige Translokation verantwortliche Domäne innerhalb der PLC β_{1a} auf die Aminosäuren 903 – 1030 eingegrenzt. Darüber hinaus konnte mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden der elektrostatische Charakter der PLC β_{1a} -Membranbindung erstmals auch in lebenden Zellen nachgewiesen werden.

Da Erhöhungen der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration, die zur Translokation aus der Plasmamembran führen auch durch die PLC β_{1a} selbst vermittelt werden, wird die funktionelle Bedeutung dieses Effektes für die Regulation PLC β_{1a} -vermittelter Signale diskutiert. So werden sowohl ein Modell zur negativen Rückkopplung des PLC β_{1a} -Signals durch Ca²⁺ als auch Modelle zur Verstärkung G α_q -vermittelter Signale und zur Erzeugung von Koinzidenzsignalen unterschiedlicher Signalwege vorgeschlagen. Letztere sind von entscheidender Bedeutung für Mechanismen der neuronalen Plastizität, für die eine Beteiligung der PLC β_1 in der Literatur bereits vermutet worden ist.

Die Ca²⁺-abhängige Translokation könnte somit einen neuen Mechanismus in der Feinabstimmung PLC β_{1a} -vermittelter zellulärer Signalwege darstellen.

Literaturverzeichnis

- Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Methods Enzymol.* 2003;361:1-33.
- Bahk YY, Lee YH, Lee TG, Seo J, Ryu SH, Suh PG. Two forms of phospholipase C- β_1 generated by alternative splicing. *J Biol Chem.* 1994;269(11):8240-5.
- Bahk YY, Song H, Baek SH, et al. Localization of two forms of phospholipase C- β_1 , a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1389(1):76-80.
- Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM. Phospholipase C- β_1 is a GTPase-activating protein for $G_{q/11}$, its physiologic regulator. *Cell.* 1992;70(3):411-8.
- Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med.* 2009;15(3):89-100.
- Biddlecome GH, Bernstein G, Ross EM. Regulation of phospholipase C- β_1 by G_q and m1 muscarinic cholinergic receptor. Steady-state balance of receptor-mediated activation and GTPase-activating protein-promoted deactivation. *J Biol Chem.* 1996;271(14):7999-8007.
- Billups D, Billups B, Challiss RA, Nahorski SR. Modulation of G_q -protein-coupled inositol trisphosphate and Ca^{2+} signaling by the membrane potential. *J Neurosci.* 2006;26(39):9983-95.
- Blazer LL, Neubig RR. Small molecule protein-protein interaction inhibitors as CNS therapeutic agents: current progress and future hurdles. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34(1):126-41.

Literaturverzeichnis

- Böhm D, Schwegler H, Kotthaus L, et al. Disruption of PLC- β_1 -mediated signal transduction in mutant mice causes age-dependent hippocampal mossy fiber sprouting and neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci*. 2002;21(4):584-601.
- Caporale N, Dan Y. Spike Timing-Dependent Plasticity: A hebbian learning rule. *Annu Rev Neurosci* 2008;31:25-46.
- Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:37-76.
- Chidiac P, Ross EM. Phospholipase C- β_1 directly accelerates GTP hydrolysis by $G\alpha_q$ and acceleration is inhibited by $G\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem*. 1999;274(28):19639-43.
- Divecha N, Rhee SG, Letcher AJ, Irvine RF. Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform β_1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem J*. 1993;289 (Pt 3):617-20.
- Dowal L, Provitera P, Scarlata S. Stable association between $G\alpha_q$ and phospholipase C β_1 in living cells. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23999-4014.
- Dwivedi Y, Agrawal AK, Rizavi HS, Pandey GN. Antidepressants reduce phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) activity and the mRNA and protein expression of selective PLC- β_1 isozyme in rat brain. *Neuropharmacology*. 2002;43(8):1269-79.
- Dwivedi Y, Mondal AC, Rizavi HS, Shukla PK, Pandey GN. Single and repeated stress-induced modulation of phospholipase C catalytic activity and expression: role in LH behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(3):473-83.
- Fisher SK, Domask LM, Roland RM. Muscarinic receptor regulation of cytoplasmic Ca^{2+} concentrations in human SK-N-SH neuroblastoma cells: Ca^{2+} requirements for phospholipase C activation. *Mol Pharmacol*. 1989;35(2):195-204.

- Grubb DR, Vasilevski O, Huynh H, Woodcock EA. The extreme C-terminal region of phospholipase C- β_1 determines subcellular localization and function; the "b" splice variant mediates α_1 -adrenergic receptor responses in cardiomyocytes. *FASEB J.* 2008;22(8):2768-74.
- Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med.* 1995;73(2):51-63.
- Hannan AJ, Blakemore C, Katsnelson A, et al. PLC- β_1 , activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat Neurosci.* 2001;4(3):282-8.
- Hannan AJ, Kind PC, Blakemore C. Phospholipase C- β_1 expression correlates with neuronal differentiation and synaptic plasticity in rat somatosensory cortex. *Neuropharmacology.* 1998;37(4-5):593-605.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. Ca^{2+} -assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17(3):360-5.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, et al. Phospholipase C- β serves as a coincidence detector through its Ca^{2+} dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron.* 2005;45(2):257-68.
- Heifets BD, Castillo PE. Endocannabinoid Signaling and Long-Term Synaptic Plasticity. *Annu Rev Physiol* 2009;71:283-306.
- Hill K, Schaefer M. TRPA1 is differentially modulated by the amphipathic molecules trinitrophenol and chlorpromazine. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7145-53.
- Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, Hilgemann DW, Mackie K, Hille B. Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca^{2+} requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol.* 2005;126(3):243-62.

Literaturverzeichnis

- Hwang JI, Heo K, Shin KJ, et al. Regulation of phospholipase C- β_3 activity by Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2. *J Biol Chem.* 2000;275(22):16632-7.
- Katan M, Kriz RW, Totty N, et al. Determination of the primary structure of PLC-154 demonstrates diversity of phosphoinositide-specific phospholipase C activities. *Cell.* 1988;54(2):171-7.
- Karp G. *Molekulare Zellbiologie.* Berlin, Springer-Verlag, 2005:2-3
- Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(11):844-58.
- Kim D, Jun KS, Lee SB, et al. Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature.* 1997;389(6648):290-3.
- Kim CG, Park D, Rhee SG. The role of carboxyl-terminal basic amino acids in G α_q -dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C- β_1 . *J Biol Chem.* 1996;271(35):21187-92.
- Kind PC, Kelly GM, Fryer HJ, Blakemore C, Hockfield S. Phospholipase C- β_1 is present in the botrysome, an intermediate compartment-like organelle, and is regulated by visual experience in cat visual cortex. *J Neurosci.* 1997;17(4):1471-80.
- Koh HY, Kim D, Lee J, Lee S, Shin HS. Deficits in social behavior and sensorimotor gating in mice lacking phospholipase C- β_1 . *Genes Brain Behav.* 2008;7(1):120-8.
- Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 1987; 196: 947–950.
- Kurian MA, Meyer E, Vassallo G, et al. Phospholipase C- β_1 deficiency is associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Brain* 2010 (Online-Publikation vor Druck 09.09.2010 / doi: 10.1093/brain/awq238).

- Lenz JC, Reusch HP, Albrecht N, Schultz G, Schaefer M. Ca^{2+} -controlled competitive diacylglycerol binding of protein kinase C isoenzymes in living cells. *J Cell Biol.* 2002; 159(2):291-302.
- Lin XH, Kitamura N, Hashimoto T, Shirakawa O, Maeda K. Opposite changes in phosphoinositide-specific phospholipase C immunoreactivity in the left prefrontal and superior temporal cortex of patients with chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1999;46(12):1665-71.
- Lomasney JW, Cheng HF, Roffler SR, King K. Activation of phospholipase C- δ_1 through C2 domain by a Ca^{2+} -enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21995-2001.
- Lukacs V, Thyagarajan B, Varnai P, Balla A, Balla T, Rohacs T. Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci.* 2007;27(26):7070-80.
- Manzoli L, Martelli AM, Billi AM, Faenza I, Fiume R, Cocco L. Nuclear phospholipase C: involvement in signal transduction. *Prog Lipid Res.* 2005;44(4):185-206.
- Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L, Cocco L. Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature.* 1992;358(6383):242-5.
- McOmish CE, Burrows E, Howard M, et al. Phospholipase C- β_1 knockout mice exhibit endophenotypes modeling schizophrenia which are rescued by environmental enrichment and clozapine administration. *Mol Psychiatry.* 2008;13(7):661-72.
- Nakahara M, Shimosawa M, Nakamura Y, Irino Y, Morita M, Kudo Y, Fukami K. A novel phospholipase C, PLC- η_2 , is a neuron-specific isozyme. *J Biol Chem.* 2005;280(32):29128-34.
- Pandey GN, Dwivedi Y, Pandey SC, et al. Low phosphoinositide-specific phospholipase C activity and expression of phospholipase C- β_1 protein in the prefrontal cortex of teenage suicide subjects. *Am J Psychiatry.* 1999;156(12):1895-901.

Literaturverzeichnis

- Park D, Jhon DY, Lee CW, Ryu SH, Rhee SG. Removal of the carboxyl-terminal region of phospholipase C- β_1 by calpain abolishes activation by G_{α_q} . *J Biol Chem.* 1993;268(5):3710-4.
- Paulssen RH, Woodson J, Liu Z, Ross EM. Carboxyl-terminal fragments of phospholipase C- β_1 with intrinsic G_q GTPase-activating protein (GAP) activity. *J Biol Chem.* 1996;271(43):26622-9.
- Razzini G, Brancaccio A, Lemmon MA, Guarnieri S, Falasca M. The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase C- β_1 . *J Biol Chem.* 2000;275(20):14873-81.
- Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1291-335.
- Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:281-312.
- Ross EM, Mateu D, Gomes AV, Arana C, Tran T, Litosch I. Structural determinants for phosphatidic acid regulation of phospholipase C- β_1 . *J Biol Chem.* 2006;281(44):33087-94.
- Ryu SH, Suh PG, Cho KS, Lee KY, Rhee SG. Bovine brain cytosol contains three immunologically distinct forms of inositolphospholipid-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(19):6649-53.
- Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd edition). Cold Spring Harbor Press, New York 2001.
- Schaefer M. *Proteinkinasen C und TRP-Kanäle als klassische und neuartige Effektoren von Phospholipase C-Produkten.* Berlin 2002.
- Schaefer M, Albrecht N, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G. Diffusion-limited translocation mechanism of protein kinase C isotypes. *FASEB J.* 2001;15:1634-1636.

Literaturverzeichnis

- Scheufler E, Vogelgesang R, Wilffert B, et al. Uptake of catamphiphilic drugs into erythrocytes and muscular tissue correlates to membrane enrichment and to ^{45}Ca displacement from phosphatidylserine monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;252(1):333-8.
- Schreier S, Malheiros SV, de Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1508(1-2):210-34.
- Sheetz MP, Singer SJ. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(11):4457-61.
- Shirakawa O, Kitamura N, Lin XH, Hashimoto T, Maeda K. Abnormal neurochemical asymmetry in the temporal lobe of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001;25(4):867-77.
- Singer AU, Waldo GL, Harden TK, Sondek J. A unique fold of phospholipase C- β mediates dimerization and interaction with $G\alpha_q$. *Nat Struct Biol.* 2002;9(1):32-6.
- Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253(2):688-97.
- Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G_q . *Science.* 1991;251(4995):804-7.
- Spires TL, Molnár Z, Kind PC, et al. Activity-dependent regulation of synapse and dendritic spine morphology in developing barrel cortex requires phospholipase C- β_1 signalling. *Cereb Cortex.* 2005;15(4):385-93.

Literaturverzeichnis

- Tannert A, Voigt P, Burgold S, Tannert S, Schaefer M. Signal amplification between G $\beta\gamma$ release and PI3K γ -mediated PI(3,4,5)P₃ formation monitored by a fluorescent G $\beta\gamma$ biosensor protein and repetitive two component total internal reflection/fluorescence redistribution after photobleaching analysis. *Biochemistry*. 2008 Oct 28;47(43):11239-50.
- Thore S, Dyachok O, Gylfe E, Tengholm A. Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca²⁺ in insulin-secreting β -cells. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 19):4463-71.
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67: 509–544.
- Voigt P, Brock C, Nürnberg B, Schaefer M. Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase γ . *J Biol Chem*. 2005;280:5121–5127.
- Wang T, Pentylala S, Elliott JT, et al. Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C- β_1 and - β_2 with activated G α_q subunits: an alternative function for C2-signaling modules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):7843-6.
- Wojcikiewicz RJ, Tobin AB, Nahorski SR. Muscarinic receptor-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate formation in SH-SY5Y neuroblastoma cells is regulated acutely by cytosolic Ca²⁺ and by rapid desensitization. *J Neurochem*. 1994 Jul;63(1):177-85.
- Wu D, Jiang H, Katz A, Simon MI. Identification of critical regions on phospholipase C- β_1 required for activation by G-proteins. *J Biol Chem*. 1993;268(5):3704-9.
- Zhang G, Kazanietz MG, Blumberg PM, Hurley JH. Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C- δ in complex with phorbol ester. *Cell*. 1995;81(6):917-24.

Abkürzungsverzeichnis

CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> , cyan-fluoreszierendes Protein
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre Deoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendinitrilo-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl-N,N, N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> , Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i> , HEPES-gepufferte Salzlösung
HEK	<i>human embryonic kidney</i> , menschliche embryonische Niere
InsP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MEM	<i>minimum essential medium</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
PIP ₂	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPV	Vanilloidrezeptor-verwandte TRP-Kanäle
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb-fluoreszierendes Protein

Lebenslauf

*Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen
Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.*

Danksagung

Bei Prof. Dr. Michael Schaefer möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und intensive Förderung meines Promotionsvorhabens bedanken. Sein Engagement und seine Begeisterung haben stets zur Erprobung neuer Wege angeregt und seine stetige Präsenz und seine offene Tür dabei Sicherheit und Mut gegeben.

Allen Mitgliedern der ehemaligen AG Schaefer des Dahlemer Instituts für Pharmakologie – namentlich Nadine Albrecht, Alejandra Pérez Sastre, Astrid Tannert, Kerstin Hill, Daniel Sinnecker, Solveig Großmann, Steffen Burgold und Philipp Voigt – danke ich für die gute Zusammenarbeit, die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die wunderbare Zeit, die wir gemeinsam in der Thielallee erlebt haben.

Peter Hellen, der dieses Projekt seit unserer gemeinsamen Teilnahme am Praktikum für molekulare Pharmakologie und intrazelluläre Signaltransduktion begleitet hat, danke ich für die vielen anregenden Diskussionen.

Meinen Eltern und meiner Freundin gilt mein besonderer Dank für ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld.

Erklärung

„Ich, Umut Yilmaz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Calcium-abhängige Translokation der Phospholipase C- β_{1a} aus der Plasmamembran* 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