4 Diskussion

4.1 Photochromismus der fluoreszierenden Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein neuartiger, bisher nicht beschriebener spontan reversibler Photochromismus der häufig in zellbiologischen Experimenten verwendeten GFP-Farbvarianten CFP, YFP und Citrine charakterisiert worden. Diese reversible Bleichung trat unter für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an lebenden Zellen typischen Bedingungen auf, war aber auch an gereinigten fluoreszierenden Proteinen nachweisbar. Aus den erhobenen Daten wie der pH-Abhängigkeit, den Aktionsspektren und der Kinetik lassen sich Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Mechanismus ziehen, die sich in einem Zustandsmodell zusammenfassen lassen.

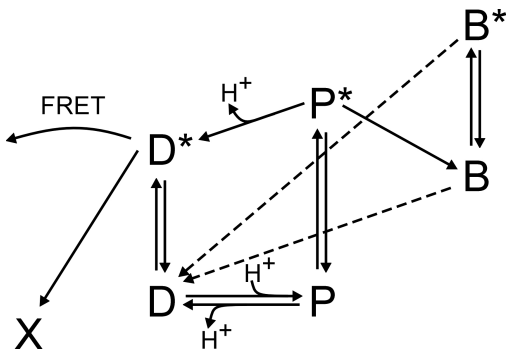

Abbildung 4.1: Zustandsmodell für reversible und irreversible Bleichung. Dargestellt sind die möglichen Übergänge eines fluoreszierenden Proteins zwischen fluoreszierenden, protonierten und reversibel gebleichten Zuständen. Das Modell berücksichtigt eine protonierte Form **(P)**, eine deprotonierte Form **(D)** und eine reversibel gebleichte Form **(B)** des fluoreszierenden Proteins, die jeweils im Grundzustand und in einem angeregten Zustand (durch ein * gekennzeichnet) existieren können (Details siehe Text).

4.1.1 Zustandsmodell

Ein Zustandsmodell, mit dem sich die reversible Bleichung der GFP-Farbvarianten erklären lässt, ist in Abb. 4.1 dargetellt. Bei Dunkelheit kann sich ein fluoreszierendes Protein in zwei Zuständen befinden, dem deprotonierten **(D)** und dem protonierten **(P)** Zustand, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht **(P** $\rightleftharpoons$ **D)** stehen. Die Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen dieses Gleichgewichts finden im Zeitraum von Mikrosekunden statt (Haupts *et al.*, 1998). Der klassi-

sche Fluoreszenzzyklus beginnt mit der Anregung der deprotonierten Form durch Absorption eines Photons geeigneter Energie (**D** $\longrightarrow$ **D***). Der angeregte Zustand **D*** kann thermisch oder unter Fluoreszenzemission wieder zum Grundzustand relaxieren, er kann alternativ seine Energie durch strahlungslosen Energietransfer (FRET) an ein nahegelegenes Fluorochrom übertragen oder durch eine photochemische Reaktion in einen nicht absorbierenden Zustand (**X**) übergehen, was sich makroskopisch als irreversible Bleichung darstellt. Für alle diese Vorgänge lassen sich Quanteneffizienzen angeben, die aussagen, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Absorption eines Photons den jeweiligen Prozess auslöst. Die Quanteneffizienz der Fluoreszenz beträgt für GFP-Farbvarianten zwischen 0,4 und 0,8 (Tsien, 1998), die des strahlungslosen Energietransfers (die FRET-Effizienz) ist abhängig von dem Ausmaß der spektralen Überlappung, der räumlichen Orientierung und dem Abstand der Chromophore und kann in Gegenwart eines kovalent verknüpften FRET-Akzeptors im Bereich um 0,5 liegen (Hellwig *et al.*, 2004). Die Quanteneffizienz der irreversiblen Bleichung liegt zwischen 10^{-6} und 10^{-5} (Peterman *et al.*, 1999; Griesbeck *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach Anregung des protonierten Zustands **P** zu einem Photochromismus kommt, wofür Quanteneffizienzen von 3×10^{-4} bis 5×10^{-3} berechnet wurden (siehe Tabelle 3.1, Seite 44). Die pH-Abhängigkeit und der Vergleich der Aktionsspektren dieser reversiblen Bleichung (siehe Abb. 3.7, Seite 41) mit den pH-abhängigen Absorptionsspektren der gelben Farbvarianten (siehe Abb. 3.8, Seite 41) unterstützen die Annahme, dass der Photochromismus seinen Ausgang in der Absorption eines Photons durch die protonierte Form nimmt (**P** $\longrightarrow$ **P***), wobei der reversibel gebleichte Zustand (**B**) einen Relaxierungsweg des angeregten Zustands **P*** darstellen könnte. Die Quanteneffizienz dieses Übergangs ist somit mehr als 100-fach höher als die der irreversiblen Bleichung nach Anregung der deprotonierten Form (siehe Tabelle 3.1). Dementsprechend kann dieser Vorgang auch in klassischen Imaging-Experimenten nicht verhindert werden, sondern er sollte bei der Planung der Experimente berücksichtigt werden, um nicht zu Artefakten zu führen (siehe unten).

Eine andere Möglichkeit der Inaktiverung des Zustands **P*** wäre eine Deprotonierung im angeregten Zustand (**P*** $\longrightarrow$ **D***), wie sie für das wildtypische GFP beschrieben worden ist (Tsien, 1998). Für die gelben Farbvarianten ist ein effektiver Protonentransfer im angeregten Zustand unwahrscheinlich: Die Anregung ihrer protonierten Formen führt nicht zu einer Fluroeszenzemission, ihre Fluoreszenzanregungsspektren weisen im Bereich der Absorption ihrer protonierten Formen Minima auf (siehe z. B. Abb. 2.1, Seite 27). Für CFP hingegen erscheint ein solcher Protonentransfer wahrscheinlicher und könnte beispielsweise erklären, warum die Fluoreszenzemission dieser Farbvariante bei Protonierung nur um etwa 40 % sinkt (Hellwig *et al.*, 2004).

Der reversibel gebleichte Zustand **(B)** kann auf verschiedenen Wegen zu einem fluoreszierenden Zustand zurückkehren. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die reversibel gebleichten GFP-Farbvarianten mit Zeitkonstanten im Bereich einiger Sekunden spontan ihre Fluoreszenz wiedererlangen können (siehe Abschnitt 3.1.4, Seite 36). Wegen des schnellen Gleichgewichts $\mathbf{P} \rightleftharpoons \mathbf{D}$ kann dabei nicht unterschieden werden, ob der reversibel gebleichte Zustand **B** dabei direkt zum deprotonierten Grundzustand **D** relaxiert oder indirekt über einen der Zustände **P**, $\mathbf{P}^*$ oder $\mathbf{D}^*$.

Zum anderen kann die Erholung der Fluoreszenz von reversibel gebleichtem CFP durch Belichtung beschleunigt werden (Siehe Abb. 3.5, Seite 39). Dies impliziert die Absorption eines Photons durch den reversibel gebleichten Zustand, was vermutlich zur Bildung eines weiteren angeregten Zustands führt ($\mathbf{B} \longrightarrow \mathbf{B}^*$), der schneller zum fluoreszierenden Grundzustand **D** relaxieren kann als **B**. Wiederum kann dabei nicht unterschieden werden, ob diese Relaxation zum Zustand **D** direkt oder indirekt erfolgt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten erlauben einige Rückschlüsse auf den Zustand **B**: Die Erholung von reversibel gebleichtem CFP ließ sich durch Belichtung bei 500 nm effektiv beschleunigen (siehe Abb. 3.5 B, Seite 39). Daraus ergibt sich, dass das Absoptionsspektrum von **B** gegenüber dem von **D** rotverschoben sein könnte. Auf der Basis der vorliegenden Arbeit kann nicht entschieden werden, ob auch bei den gelben Farbvarianten der reversibel gebleichte Zustand Photonen absorbieren kann. Die Zunahme der CFP-Fluoreszenz bei reversibler Bleichung des Citrine in dem CFP-Citrine-Tandemprotein (siehe Abb. 3.11, 48) beweist, dass das reversibel gebleichte Citrine zumindest im spektralen Bereich der CFP-Emission keine nennenswerte Absorption aufweist.

4.1.2 Vergleich mit bekannten photophysikalischen Effekten

Das wildtypische GFP aus *Aequorea victoria* weist eine komplexe Photophysik auf und ändert bei intensiver Belichtung sein Absorptionsspektrum (Cubitt *et al.*, 1995). Diese Photokonversion konnte zwar für bestimmte Spezialanwendungen wie die intrazelluläre Verfolgung von Proteinen genutzt werden (Yokoe & Meyer, 1996), behindert aber die für viele Anwendungen notwendige genaue Quantifizierung der Fluoreszenz. Nicht zuletzt deshalb wurde eine Reihe von Farbvarianten entwickelt, darunter auch CFP, YFP und Citrine, in denen die Photokonversion des Wildtyp-GFP nicht auftritt (Tsien, 1998; Griesbeck *et al.*, 2001).

Allerdings zeigten auch diese modernen GFP-Farbvarianten bei Untersuchung mit verschiedenen spektroskopischen Techniken einige ungewöhnliche photophysikalische Eigenschaften. Einige der bereits beschriebenen Effekte unterscheiden sich fundamental von der hier charakterisierten reversiblen Bleichung, während andere, insbesondere einige in der Fluoreszenz-Korrelations-Spek-

troskopie erhobene Befunde, durchaus auf den gleichen photophysikalischen Eigenschaften der GFP-Farbvarianten beruhen könnten wie die hier beschriebene reversible Bleichung.

Die reversible Bleichung unterscheidet sich fundamental von irreversiblen Prozessen wie dem Photochromismus des wildtypischen GFP (Yokoe & Meyer, 1996; van Thor *et al.*, 2002) oder eines auf GFP basierenden photoaktivierbaren Proteins (Patterson & Lippincott-Schwartz, 2002). Auf Einzelmolekülebene würde sich eine reversible Bleichung als lichtabhängiges Blink- oder Flackerverhalten einzelner Moleküle darstellen. Ein langsames Blinken einzelner in ein Polyacrylamidgel eingebetteter YFP- und GFP-Moleküle, die bei 488–514 nm angeregt wurden, ist in der Tat beschrieben worden (Dickson *et al.*, 1997; Moerner *et al.*, 1999). Der Einfluss des pH auf dieses Blinkverhalten wurde jedoch ebenso wie seine spektrale Abhängigkeit nicht untersucht. Für die gelben Varianten wurde gezeigt, dass die Moleküle nach einer Reihe von Blinkzyklen schließlich in einen nicht fluoreszierenden Zustand übergingen, aus dem sie nicht spontan, wohl aber durch Belichtung bei 405 nm reaktivierten. Die fehlende spontane Reaktivierung spricht dagegen, dass es sich bei diesem Effekt um das Korrelat der hier charakterisierten reversiblen Bleichung auf molekularer Ebene handelte.

Kürzlich wurde im Rahmen einer detaillierten Untersuchung der lichtinduzierten Bleichung von YFP ein anderer Effekt charakterisiert, der vermutlich dem oben beschriebenen Blinken einzelner YFP-Moleküle entspricht (McAnaney *et al.*, 2005). Es zeigte sich dabei, dass auch das auf konventionelle Weise im Bereich seines Absorptionsmaximums vermeintlich irreversibel gebleichte YFP einen Teil seiner Fluoreszenz spontan oder durch Belichtung im nahen UV-Bereich wiedererlangt. Die spontane Erholung war jedoch um etwa 3 Größenordnungen langsamer als die hier beschriebene Erholung des bei 400–420 nm reversibel gebleichten YFP und lag daher außerhalb des Zeitfensters der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente. Im Rahmen der beschriebenen Arbeit zeigten sich zwar auch Hinweise auf die hier beschriebene innerhalb von Sekunden spontan reversible Bleichung, wegen apparativer Limitationen konnte sie jedoch nicht weiter charakterisiert werden (Clive R. Bagshaw, Leicester, UK, persönliche Mitteilung).

Mithilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, einer Technik, die entwickelt wurde, um aus den schnellen Fluktuationen der Fluoreszenz in einem kleinen Anregungsvolumen Informationen über die zugrunde liegenden Prozesse wie Diffusion und Protein-Protein-Interaktionen zu gewinnen (Brock *et al.*, 1999), wurde ein lichtabhängiges Blinken gelber GFP-Farbvarianten charakterisiert, das zur Ausbildung einer Fraktion nicht fluoreszierender Spezies führt (Schwille *et al.*, 2000; Heikal *et al.*, 2000). Für diesen Vorgang wurde eine Quanteneffizienz von etwa 10^{-3} berechnet. Es ist durchaus möglich, dass es sich dabei um den hier beschriebenen spontan reversiblen Photochromismus handelt, wobei ein direkter Vergleich der Daten dadurch erschwert wird, dass die

Belichtungsintensitäten in den beschriebenen Arbeiten um etwa 3 Größenordnungen höher waren als die hier verwendeten, dass die spektrale Abhängigkeit des Effekts in den beschriebenen Arbeiten nicht charakterisiert wurde und dass die Zeitskala der hier beschriebenen spontanen Erholung zu langsam ist, um von der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie erfasst werden zu können.

4.1.3 Implikationen für zellbiologische Experimente

Die hier charakterisierte reversible Bleichung der häufig verwendeten GFP-Farbvarianten CFP, YFP und Citrine ist für die Planung zellbiologischer Experimente, in denen diese fluoreszierenden Proteine verwendet werden sollen, von großer Bedeutung. Das reversible Ausbleichen und die sowohl spontane als auch durch Belichtung beschleunigte Erholung aus dem reversibel gebleichten Zustand führen dazu, dass sich im Verlauf eines fluoreszenzmikroskopischen Experiments ein Gleichgewicht zwischen diesen Vorgängen ausbildet. Eine Variation der Belichtungsintensität oder der Auslesefrequenz kann ebenso wie eine zusätzliche Belichtung bei anderen Wellenlängen zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts führen, so dass die Helligkeit der Probe entweder zu- oder abnimmt. Werden die fluoreszierenden Proteine lediglich als „passive Fluoreszenzindikatoren“ (Tsien, 1998) verwendet, um beispielsweise statisch die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, stören diese Effekte nicht. Neben solchen Anwendungen werden die GFP-Farbvarianten aber immer häufiger als „aktive Fluoreszenzindikatoren“ (Tsien, 1998) verwendet, um die verschiedensten zellbiologischen Probleme zu bearbeiten. Solche „aktiven“Anwendungen umfassen die Messung von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen verschiedenen GFP-Farbvarianten (Miyawaki & Tsien, 2000; Truong & Ikura, 2001; Zaccolo, 2004) oder die Bestimmung von Proteinmobilitäten durch *“fluorescence recovery after photobleaching”* (FRAP, Reits & Neefjes (2001), Sprague & McNally (2005)). In diesen Anwendungen ist die Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten von essentieller Wichtigkeit, so dass hier mit Artefakten durch den reversiblen Photochromismus zu rechnen ist.

CFP kann in dem gesamten für die Fluoreszenzanregung geeigneten Wellenlängenbereich reversibel gebleicht werden (siehe Abb. 3.7, Seite 41). Damit sind FRAP-Bestimmungen mit dieser GFP-Variante problematisch, weil es neben der in dieser Technik beabsichtigten irreversiblen Bleichung immer auch zu reversiblem Ausbleichen kommt. Die spontane oder durch Belichtung beschleunigte Erholung wird dann zu einer Überschätzung der Proteinmobilität führen (siehe Abb. 3.10, Seite 46).

Die gelben Farbvarianten YFP und Citrine werden bei Belichtung im Wellenlängenbereich ihrer Absorptionsmaxima nur in sehr geringem Maße reversibel gebleicht (siehe Abb. 3.7, Seite 41).

Durch den Photochromismus verursachte Artefakte werden bei diesen Farbvarianten insbesondere dann auftreten, wenn eine zusätzliche Belichtung im Wellenlängenbereich um 400–420 nm durchgeführt wird, beispielsweise zur Anregung eines weiteren Fluoreszenzfarbstoffes. Solche Artefakte sind auch zu erwarten, wenn die Methode der FRET-Bestimmung durch Bleichung des Donors auf FRET-Pärchen aus cyan und gelb fluoreszierenden Proteinen angewendet wird (Schmid *et al.*, 2001; Scholze *et al.*, 2002).

Für die Planung von Fluoreszenz-Experimenten sollte die reversible Bleichung der GFP-Farbvarianten berücksichtigt werden, indem die Belichtungszeiten und -intervalle während des Experiments möglichst konstant gehalten und ansonsten sorgfältige Kontrollen auf durch reversibles Ausbleichen verursachte Artefakte durchgeführt werden. Da sich das Gleichgewicht zwischen reversibler Bleichung und der Erholung aus dem reversibel gebleichten Zustand zu Beginn des Experiments schnell einstellt (siehe z. B. Abb. 3.1, Seite 35), sollten experimentelle Schritte, die eine Veränderung der Fluoreszenz erwarten lassen (z. B. eine Stimulation der Zellen) erst einige Sekunden nach Beginn des Experiments nach Etablierung einer stabilen Fluoreszenzintensität durchgeführt werden.

Die reversible Bleichung von Citrine konnte genutzt werden, um eine neue Methode zur FRET-Messung durch reversibles Ausbleichen des Akzeptors zu entwickeln (siehe Abb. 3.11, Seite 48). Ähnlich wie bei der häufig angewandten Methode der FRET-Messung durch irreversible Akzeptor-Bleichung kann aus der Zunahme der Donor-Fluoreszenz bei reduzierter Absorption des Akzeptors die FRET-Effizienz direkt berechnet werden. Der Vorteil der FRET-Messung durch reversible Akzeptor-Bleichung besteht darin, dass die Messung in der selben Zelle mehrfach nacheinander durchgeführt werden kann. Mögliche Anwendungsbereiche für diese Methode zur repetitiven Quantifizierung von FRET sind Untersuchungen dynamischer Signaltransduktionsprozesse unter Verwendung der zahlreichen auf der Basis von fluoreszierenden Proteinen konstruierten FRET-Sensoren für die Konzentration intrazellulärer Ionen oder den pH sowie Vorgänge wie Proteolyse oder die Bildung von sekundären Botenstoffen (Miyawaki, 2003).

4.2 Untersuchung der Phospholipase C-Aktivierung in Einzelzellen

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob den Carbachol-induzierten Ca^{2+}-Oszillationen in HEK293-Zellen eine oszillatorische Aktivierung der Phospholipase C zugrunde liegt. Dazu wurde in einzelnen Zellen die subzelluläre Translokation fluoreszierender Fusionsproteine mit Membran-bindenden Domänen untersucht, die eine Spezifität für das Ausgangsprodukt der durch PLC vermittelten Reaktion (PIP_2) oder für eines der PLC-Reaktionsprodukte ($InsP_3$ und

Diacylglycerol) aufwiesen. Es wurden fluoreszierende Fusionsproteine aus GFP-Farbvarianten und einer klassischen PKC-Isoform (PKC-α-YFP), einer neuartigen PKC-Isoform (PKC-ε-CFP) sowie der PH-Domäne der PLC-δ_1 (PLC-δ_1(PH)-YFP) verwendet.

Da gezeigt werden konnte, dass ein exogen appliziertes membrangängiges Diacylglycerol die Dissoziation klassischer PKC-Isoformen von der Membran verlangsamt (Oancea & Meyer, 1998; Tanimura *et al.*, 2002), wurde zunächst die Translokationskinetik einer fluoreszenzmarkierten klassischen PKC-Isoform (PKC-α-YFP) analysiert, um die Verfügbarkeit des PLC-Produkts Diacylglycerol in der Plasmamembran zu untersuchen (siehe Abb. 3.13, Seite 50 und Abb. 3.15, Seite 53). Die primären Translokationen von PKC-α-YFP nach maximaler Rezeptorstimulation zeichneten sich durch eine schnelle Umverteilung an die Plasmamembran und eine langsamere Rückverteilung ins Cytosol ($k_{on} \gg k_{off}$) aus. Nach Stimulation mit submaximal effektiven Agonistenkonzentrationen war die Rückverteilung ins Cytosol schneller, so dass in den meisten Zellen k_{on} und k_{off} nahezu identische Werte annahmen. Eine ähnliche Translokationskinetik mit $k_{on} \approx k_{off}$ zeichnete die sekundären PKC-α-YFP-Translokationen im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen aus. Unter der Vorstellung, dass die verzögerte Dissoziation der PKC-α von der Plasmamembran durch die Bindung ihrer C1-Domäne an Diacylglycerol zustande kommt, lässt sich daraus schließen, dass die Verfügbarkeit von Diacylglycerol an der Plasmamembran während sekundärer Ca^{2+}-Transienten ebenso wie während primärer Ca^{2+}-Signale nach Stimulation mit geringen Carbacholkonzentrationen gering ist.

Dafür spricht auch der Befund, dass signifikante Translokationen der Diacylglycerol bindenden PKC-ε-CFP und der $InsP_3/PIP_2$-abhängig translozierenden PLC-δ_1(PH)-YFP nur durch maximale Rezeptorstimulation ausgelöst werden konnten (siehe Abb. 3.20, Seite 58). Ebenso zeigten weder PKC-ε-CFP (Schaefer *et al.*, 2001) noch PLC-δ_1(PH)-YFP repetitive Translokationen während Carbachol-induzierter Ca^{2+}-Oszillationen in HEK293-Zellen (siehe Abb. 3.21, Seite 59).

4.2.1 Translokationskinetik der Proteinkinase C-α

Klassische PKC-Isoformen liegen in ruhenden Zellen cytosolisch vor und translozieren sowohl bei Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als auch bei Anstieg der Diacylglycerol-Konzentration vom Cytosol an die Plasmamembran (Nishizuka, 1992; Oancea & Meyer, 1998). Studien zur Assoziationskinetik haben zu dem Modell geführt, dass sich ihre Translokation an die Plasmamembran nach PLC-Aktivierung in zwei Schritten vollzieht (Schaefer *et al.*, 2001): In einem ersten Schritt führt die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ dazu, dass zufällige durch ungerichtete Diffusion bedingte Zusammenstöße mit der Plasmamembran mit hoher Kollisions-Kopplungs-Effizienz zu einer Ca^{2+}-abhängigen

Bindung der C2-Domäne an anionische Membranphospholipide führen. Nach diesem ersten Bindungsschritt ist die Diffusion der so mit der Plasmamembran assoziierten PKC auf nur noch zwei Raumdimensionen beschränkt, was die Wahrscheinlichkeit, dass in einem zweiten Schritt in der Membran befindliches freies Diacylglycerol an die C1-Domäne gebunden wird, deutlich erhöht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Translokationskinetik von PKC-α-YFP durch zwei verschiedene Muster beschreiben lässt (siehe Abb. 3.17, Seite 55). Die bei Stimulation mit niedrigen Agonistenkonzentrationen vorherrschende Translokationskinetik lässt sich durch eine Bateman-Funktion (Gleichung 3.2, Seite 51) mit nahezu identischen Werten für k_{on} und k_{off} approximieren. Bei maximaler Stimulation hingegen lässt sich die Translokation in den meisten Zellen durch $k_{\text{on}} > k_{\text{off}}$ beschreiben. Ähnliche Befunde sind für die Translokation einer fluoreszenzmarkierten isolierten C2-Domäne aus PKC-γ in RBL-Zellen erhoben worden. Bei Stimulation mit einer niedrigen Agonistenkonzentration kam es zu einer transienten Translokation dieses Konstrukts vom Cytosol an die Plasmamembran, während maximale Stimulation zu einer lang andauernden Translokation führte. Die lang andauernde Translokation war in diesem Zellmodell von einem Ca^{2+}-Einstrom über die Plasmamembran abhängig (Teruel & Meyer, 2002). Es sprechen allerdings einige Argumente dagegen, dass Unterschiede im Ca^{2+}-Einstrom für die zwei hier beobachteten Muster der PKC-α-YFP-Translokation verantwortlich sind. Vor allem führte in dem hier verwendeten Zellmodell die Verwendung eines Ca^{2+}-freien Messpuffers nicht zu einer ausgeprägten Abnahme der Fraktion von Zellen, die auf maximale Stimulation mit $k_{\text{on}} > k_{\text{off}}$ reagierten. Da unter diesen Bedingungen kein Ca^{2+}-Einstrom stattfinden kann, spricht die dennoch in den meisten Zellen vorliegende Translokationskinetik gegen einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} als Ursache für die verzögerte Rückverteilung ins Cytosol. Darüber hinaus wurden die Arbeiten an der isolierten C2-Domäne in RBL-Zellen durchgeführt, die ein gut etabliertes Modell für einen nach Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern auftretenden Ca^{2+}-Einstrom (I_{CRAC}, *"Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current"*) darstellen (Broad *et al.*, 1999; Krause *et al.*, 1999; Kozak *et al.*, 2002; Hermosura *et al.*, 2002). In HEK293-Zellen hingegen ist der I_{CRAC} geringer ausgeprägt (Fasolato & Nilius, 1998; Mignen *et al.*, 2001). Außerdem sind die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Unterschiede der Translokationskinetiken von PKC-α-YFP weniger deutlich ausgeprägt als die der isolierten C2-Domäne in RBL-Zellen, die in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} über viele Sekunden an der Plasmamembran verweilte.

Folgender Mechanismus bietet sich auf der Grundlage der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde als Erklärung für die beobachteten Translokationskinetiken an: Zu einer Translokation mit $k_{\text{on}} \approx k_{\text{off}}$ kommt es, wenn PKC-α-YFP durch einen $[Ca^{2+}]_i$-Anstieg an die Plasmamembran rekrutiert wird, während die Diacylglycerol-Konzentration an der Plasmamembran niedrig

ist. Beim Vorliegen höherer Diacylglycerol-Konzentrationen verzögert eine zusätzliche Bindung an Diacylglycerol die Dissoziation von der Plasmamembran und führt somit zu Translokationen mit $k_{\text{on}} > k_{\text{off}}$.

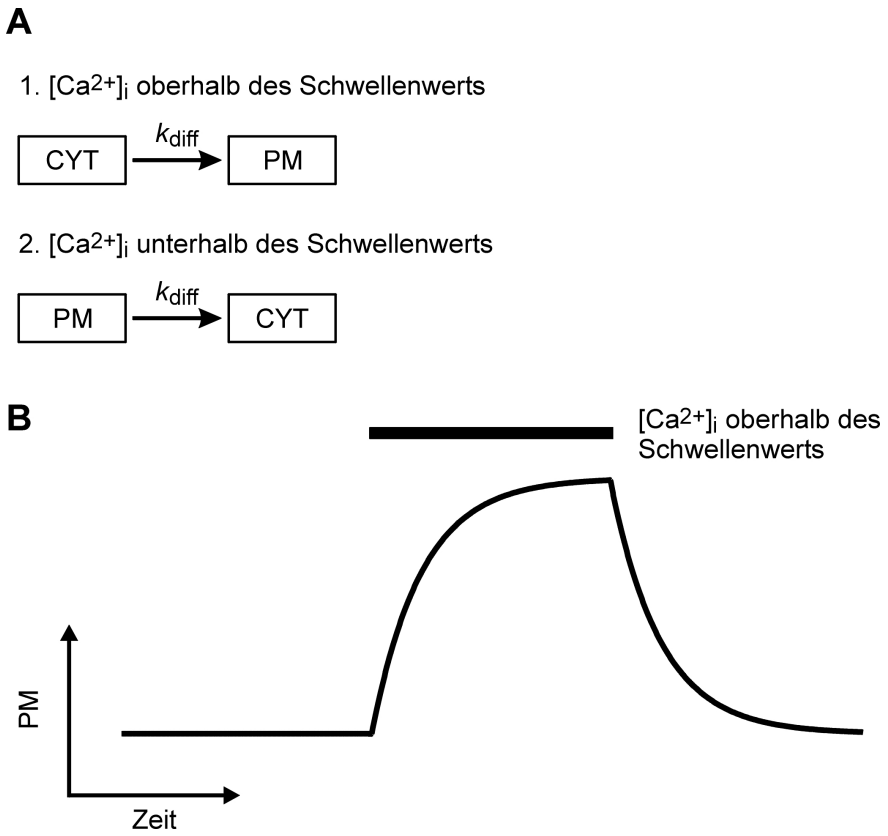

Abbildung 4.2: Computersimulation der Proteinkinase C-α-Translokation unter Annahme eines allein durch Ca^{2+}-abhängige Membranbindung getriebenen Mechanismus. (A) Der Übergang von PKC-α zwischen zwei Zuständen, einem cytosolischen (CYT) und einem membrangebundenen (PM), wurde als Kinetik erster Ordnung mit einer durch die Diffusionsgeschwindigkeit bestimmten Geschwindigkeitskonstante k_{diff} simuliert. Solange die Ca^{2+}-Konzentration den Schwellenwert für die Membranbindung überschreitet, findet eine diffusionsgetriebene Translokation vom Cytosol an die Membran statt, bei Unterschreitung des Schwellenwerts verläuft die Translokation in entgegengesetzter Richtung. (B) zeigt das Ergebnis einer solchen Simulation unter der Annahme, dass zu Beginn sämtliche PKC-α cytosolisch lokalisiert ist. Die Zeit, während derer die Ca^{2+}-Konzentration den Schwellenwert für die Membranbindung überschreitet, ist als schwarzer Balken angegeben.

Aufgrund der hohen Kooperativität der Ca^{2+}-abhängigen Bindung der C2-Domäne an anionische Phospholipide (Corbalán-García *et al.*, 1999; Nalefski *et al.*, 2001; Nalefski & Newton, 2001) ist zu erwarten, dass das Ca^{2+}-Signal wie ein Schalter bei Anstieg über einen Schwellenwert die Translokation initiiert und, bei Abfall unter den Schwellenwert, auch wieder terminiert. Eine Computersimulation (Abb. 4.2) zeigt jedoch, dass der Zeitverlauf der Translokation unter diesen Bedingungen nicht der experimentell bestimmten Kinetik entsprechen würde. Der tatsächlich be-

obachtete Zeitverlauf der PKC-α-YFP-Translokation ließe sich mit der Annahme erklären, dass jedes PKC-α-YFP-Molekül nach Bindung an die Plasmamembran einer Modifikation unterliegt, die zur Dissoziation von der Plasmamembran führt und eine erneute Membranbindung zumindest solange verhindert, wie die $[Ca^{2+}]_i$ noch den Schwellenwert übersteigt. Eine solche Modifikation könnte beispielsweise eine Phosphorylierung sein, wie sie bereits für PKC-βII beschrieben wurde, die erst nach einer Autophosphorylierung wieder von der Plasmamembran dissoziieren kann (Feng & Hannun, 1998; Feng *et al.*, 2000). Eine kinasedefiziente PKC-α-Mutante zeigt ebenfalls nach einer Ca^{2+}-vermittelten Translokation an die Plasmamembran keine Rückverteilung ins Cytosol (Fontainhas *et al.*, 2005), was die Notwendigkeit einer Autophosphorylierung für die Dissoziation der PKC-α von der Plasmamembran nahelegt.

Da die Translokation klassischer PKC-Isoformen an die Plasmamembran ein diffusionslimitierter Vorgang ist (Schaefer *et al.*, 2001) und die Rückverteilung ins Cytosol vermutlich ebenfalls diffusionsgetrieben ist, würde der gemeinsame Mechanismus auch die in Abwesenheit von Diacylglycerol auftretenden nahezu identischen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} erklären, während Diacylglycerol-Bindung die Dissoziation von der Plasmamembran verzögern und damit die Rückverteilung verlangsamen könnte. Eine Computersimulation (Abb. 4.3) zeigt, dass dieses Modell den beobachteten Zeitverlauf der Translokation erklären kann.

4.2.2 Translokationen von Proteinkinase C-ε und der Pleckstrin-homologen Domäne der Phospholipase C-δ_1

Die Aktivierung von PLC führt zur Spaltung von PIP_2 unter Bildung von $InsP_3$ und Diacylglycerol. Die Translokation einer fluoreszenzmarkierten PLC-δ_1(PH), die sowohl an plasmamembranäres PIP_2 als auch an lösliches $InsP_3$ bindet, von der Plasmamembran ins Cytosol kann daher als Indikator für eine PLC-Aktivierung verwendet werden. Unter Verwendung dieses Sensors ist in verschiedenen Zellmodellen eine parallel zu Ca^{2+}-Oszillationen ablaufende repetitive Aktivierung der PLC beobachtet worden, so dass postuliert wurde, dass diese Ca^{2+}-Oszillationen durch eine oszillatorische Aktivierung der PLC ausgelöst würden (Hirose *et al.*, 1999; Dale *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001a).

Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen Untersuchungen an der Diacylglycerol-abhängig und Ca^{2+}-unabhängig translozierenden PKC-ε, die als fluoreszierendes Fusionsprotein im Rahmen von durch Carbachol induzierten Ca^{2+}-Oszillationen in HEK293-Zellen nicht mit den Ca^{2+}-Transienten synchron translozierte, sondern eine langsame, viele $[Ca^{2+}]_i$-Transienten überdauernde Translokation an die Plasmamembran und zurück ins Cytosol vollführte (Schaefer *et al.* (2001), siehe

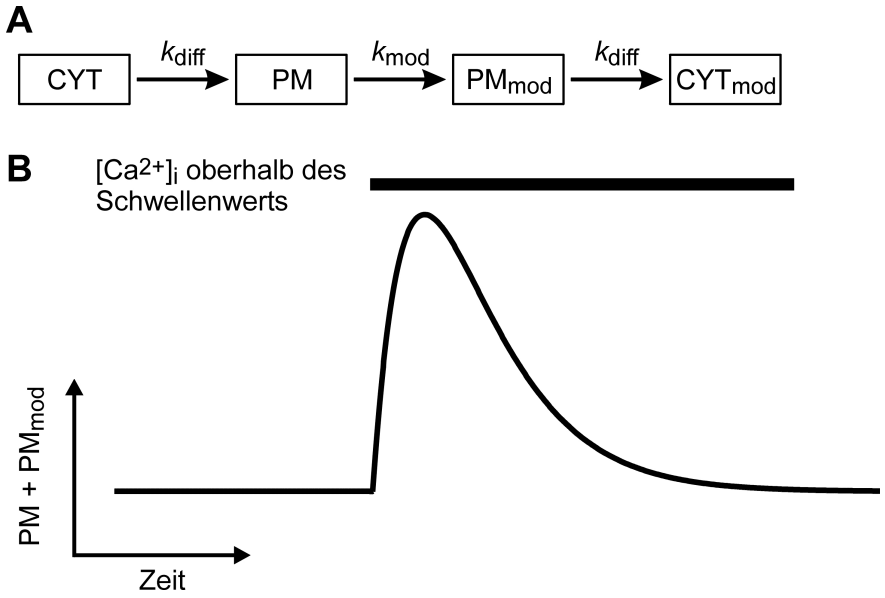

Abbildung 4.3: Computersimulation der Proteinkinase C-α-Translokation unter der Annahme, dass die PKC-α an der Plasmamembran eine die weitere Membranbindung verhindernde Modifikation erfährt. (A) Die Übergänge der PKC-α zwischen vier Zuständen wurden jeweils als Kinetik erster Ordnung simuliert: Bei Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration über den Schwellenwert für die Membranbindung kommt es zunächst zu einer Translokation der PKC-α vom Cytosol (CYT) an die Plasmamembran (PM) mit einer durch die Diffusionsgeschwindigkeit bestimmten Geschwindigkeitskonstante k_{diff}. Die an der Plasmamembran lokalisierte PKC-α erfährt dort mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{mod}, für die gelten soll $k_{mod} \gg k_{diff}$, eine Modifikation, die eine weitere Membranbindung verhindert, und geht damit in den Zustand PM_{mod} über. Die so modifizierte PKC-α transloziert nun, wiederum diffusionsgetrieben mit der Geschwindigkeitskonstante k_{diff}, zurück ins Cytosol und kann aufgrund der an der Plasmamembran erfahrenen Modifikation weiterhin nicht an die Plasmamembran binden (Zustand CYT_{mod}). (B) zeigt die Simulation eines solchen Translokationsvorgangs unter der Annahme, dass zu Beginn sämtliche PKC-α cytosolisch lokalisiert und nicht modifiziert ist. Die Zeit, während derer die Ca^{2+}-Konzentration den Schwellenwert für die Membranbindung überschreitet, ist als schwarzer Balken angegeben.

Abb. 1.4, Seite 15). Um zur Klärung dieses Widerspruchs beizutragen, wurden die beiden Biosensoren gemeinsam exprimiert und ihre Translokationen nach Rezeptorstimulation untersucht.

Es zeigte sich, dass sowohl die Zeitverläufe als auch die Effizienzen der Translokationen von PKC-ε-CFP und PLC-δ_1(PH)-YFP eng korreliert waren (siehe Abb. 3.19 und 3.20, Seite 57 und 58). Aufgrund der ähnlichen Zeitverläufe ist es unwahrscheinlich, dass die widersprüchlichen Befunde durch Unterschiede der Abbaukinetik von Diacylglycerol und $InsP_3$ oder der Resynthese von PIP_2 bedingt sind. Da die Translokation von PLC-δ_1(PH)-YFP der von PKC-ε-CFP deutlich vorausging, können die ähnlichen Zeitverläufe auch nicht artifiziell durch Verdrängung der PLC-δ_1(PH)-YFP durch PKC-ε-CFP verursacht sein. Die unterschiedliche Kinetik zu Beginn der Translokation deckt sich darüber hinaus mit der Vorstellung, dass PLC-δ_1(PH)-YFP nach Akti-

vierung der PLC den Kontakt mit der Plasmamembran verliert und sofort diffusionsgetrieben ins Cytosol transloziert, während PKC-ε-CFP einige zufällige Kollisionen mit der Plasmamembran durchmachen muss, um schließlich an Diacylglycerol zu binden (Schaefer *et al.*, 2001).

4.2.3 Empfindlichkeit der Indikatoren

In den in dieser Studie verwendeten HEK293-Zellen konnte keine repetitive Translokation von PLC-δ_1(PH) im Rahmen von Ca^{2+}-Oszillationen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.21, Seite 59). Damit stellt sich die Frage, ob eine geringe, aber dennoch zyklische PLC-Aktivität unterhalb der Empfindlichkeitsschwelle dieses Sensors ausreichen könnte, um über den $InsP_3$-Rezeptor eine Freisetzung von Ca^{2+} zu bewirken. Für die Bindung von PLC-δ_1(PH) an $InsP_3$ wurde *in vitro* eine K_d von 93 nM bestimmt (Hirose *et al.*, 1999). Andererseits ist in der gleichen Arbeit gezeigt worden, dass eine fluoreszenzmarkierte PLC-δ_1(PH) *in vivo* erst bei $InsP_3$-Konzentrationen von 10 µM halb-maximal transloziert. Damit erscheint es durchaus möglich, dass PLC-δ_1(PH)-YFP in lebenden Zellen nicht empfindlich genug ist, um eine Bildung von $InsP_3$ in nanomolaren Konzentrationen anzuzeigen, die ausreichen kann, um zur Freisetzung von Ca^{2+} über den $InsP_3$-Rezeptor zu führen (Meyer *et al.*, 1988; Mak *et al.*, 1998). Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass es bei Stimulation der Zellen mit geringen Agonistenkonzentrationen, die keine signifikante Translokation von PLC-δ_1(PH)-YFP auslösten (10–100 µM Carbachol, siehe Abb. 3.20, Seite 58), dennoch zu deutlichen Ca^{2+}-Signalen kam (siehe Abb. 3.15, Seite 53). Daher schließt das Fehlen zyklischer PLC-δ_1(PH)-Translokationen während Ca^{2+}-Oszillationen eine oszillatorische $InsP_3$-Bildung unterhalb des Nachweisbereichs von PLC-δ_1(PH)-YFP nicht aus. Allerdings spricht die beobachtete langsame, nicht oszillatorische Translokation der PKC-ε (Schaefer *et al.* (2001), siehe Abb. 1.4, Seite 15) gegen eine oszillatorische Bildung von Diacylglycerol unter diesen Bedingungen.

4.2.4 Implikationen für Phospholipase C-vermittelte Ca^{2+}-Oszillationen

Zusammenfassend sprechen diese Befunde dafür, dass die Carbachol-induzierten Ca^{2+}-Oszillationen in HEK293-Zellen nicht durch eine oszillatorische PLC-Aktivität zustande kommen, sondern sich im Sinne eines *second-messenger*-kontrollierten Oszillationsmechanismus bei konstanter $InsP_3$-Konzentration ausbilden. Da andererseits die Stimulation heterolog exprimierter metabotroper Glutamatrezeptoren in HEK293-Zellen zu rezeprorkontrollierten Ca^{2+}-Oszillationen mit oszillatorischer PLC-Aktivität führen kann (Dale *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001a), ist es im Lichte der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich, dass beide Typen von Ca^{2+}-Oszillatio-

nen im selben Zellmodell durch Stimulation verschiedener Rezeptoren ausgelöst werden können (Abb. 4.4). Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich ein natives Zellmodell findet, in dem die Stimulation verschiedener endogener Rezeptoren zur Auslösung der beiden verschiedenen Modi von Ca^{2+}-Oszillationen führen kann. Wäre ein solches Zellmodell identifiziert, könnte untersucht werden, ob die verschiedenen Oszillationsmodi zu einer differentiellen Aktivierung auf der Ebene der Ca^{2+}-, Diacylglycerol- oder PIP_2-abhängigen Effektoren und damit zu differentiellen zellulären Effekten führen können und somit ein Weg für die Zelle sind, differenziert auf verschiedene Stimuli zu reagieren (siehe Abb. 4.4).

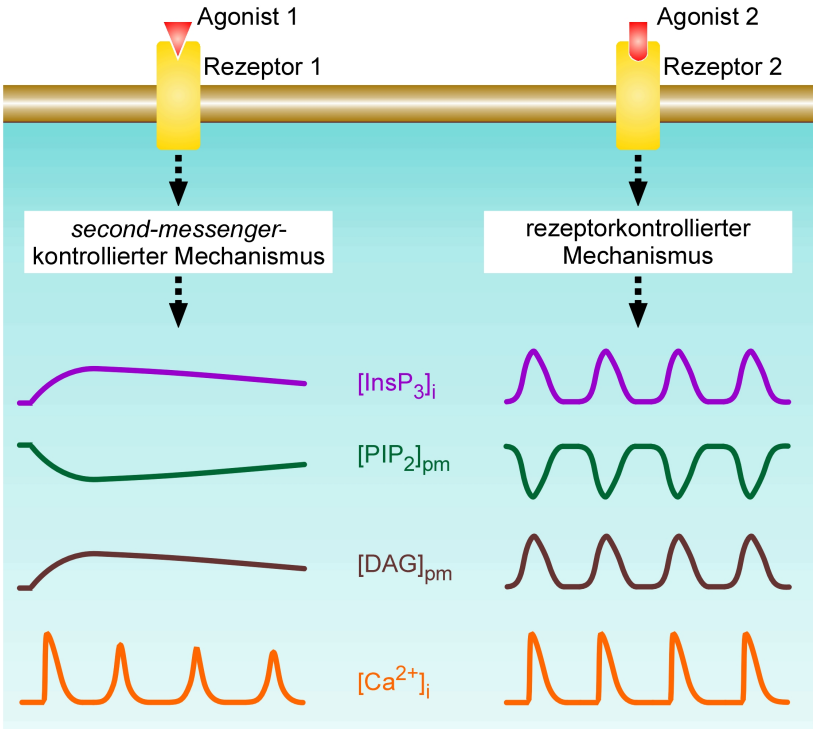

Abbildung 4.4: Verschiedene Modi von Ca^{2+}-Oszillationen zur differentiellen Signalübermittlung. Schematische Darstellung zweier verschiedener Phospholipase C-koppelnder Rezeptoren, deren Stimulation entweder zu *second-messenger*-kontrollierten oder zu rezeptorkontrollierten Ca^{2+}-Oszillationen führt. Die resultierenden Zeitverläufe der cytosolischen Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Konzentration ($[InsP_3]_i$), der plasmamembranären Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-Konzentration ($[PIP_2]_{pm}$), der plasmamembranären Diacylglycerol-Konzentration ($[DAG]_{pm}$) und der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) sind jeweils skizziert. Durch die unterschiedlichen Zeitverläufe der *second-messenger*-Konzentrationen können verschiedene zelluläre Effektoren je nach Oszillationsmodus entweder tonisch oder repetitiv aktiviert werden.

4.3 Phospholipase C-abhängige Modulation der Spannungsabhängigkeit von TRPC4

In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die rezeptorvermittelte Aktivierung des Kationenkanals TRPC4 in Form einer parallel zur PLC-Aktivierung stattfindenden Verschiebung seiner Spannungsabhängigkeit in Richtung physiologischer, negativer Membranpotentiale vollzieht. Diese bisher nicht beschriebene Spannungsabhängigkeit des klassischen TRP-Kanals konnte durch Aufzeichnung von Strom-Spanungs-Kennlinien und durch Spannungssprünge mit Analyse der Öffnungs- und Schließkinetiken charakterisiert werden.

4.3.1 Spannungsabhängigkeit von TRPC4

Die Strom-Spannungs-Kennlinie der von TRPC4 getragenen *whole-cell*-Ströme weist eine typische, als „doppelt-gleichrichtend“ beschriebene Form auf und entwickelt sich im Verlauf einer PLC-Aktivierung auf charakteristische Weise, wobei erst die Auswärts-, dann auch die Einwärtsströme zunehmen (siehe Abb. 3.22 und 3.23, Seite 61 und 62). Hier soll dargestellt werden, wie eine einfache Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des Ionenkanals zu diesem charakteristischen Bild führen kann.

Der makroskopische Strom (I_i), der durch ein Ensemble spannungsabhängiger Ionenkanale fließt, berechnet sich als

$$I_\mathrm{i} = N\gamma(V)P_\mathrm{O}(V)(V - V_\mathrm{e}) \tag{4.1}$$

wobei V das Membranpotential ist, N die Anzahl der Kanäle, $\gamma(V)$ die Leitfähigkeit der offenen Pore in Abhängigkeit von der Spannung, $P_\mathrm{O}(V)$ die (ebenfalls von der Spannung abhängende) Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und V_e das Umkehrpotential des Ionenstroms durch die Pore. Die Spannungsabhängigkeit eines Ionenkanals kommt dabei typischerweise durch eine sigmoidale Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit vom Membranpotential zustande (Bezanilla, 2000).

Die Strom-Spannungs-Kennlinie der offenen Pore von TRPC4, die durch Einzelkanalmessungen charakterisiert werden konnte, weist in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen die auch für die Ganzzellströme charakteristische flache Region im Bereich von etwa +10 bis +50 mV auf und ist ansonsten sowohl in Einwärts- als auch in Auswärtsrichtung annähernd linear (Schaefer *et al.*, 2000). In TRPC5, dem nächsten Verwandten von TRPC4, wird die flache Region durch spannungsabhängige Bindung von Mg^{2+}-Ionen an ein im cytosolischen C-Terminus des Kanalproteins lokalisiertes Aspartat vermittelt (Obukhov & Nowycky, 2005). Um zu zeigen, wie die gemessenen Ganzzell-Strom-Spannungs-Kennlinien durch eine Verschiebung der sigmoidalen Abhängigkeit der Offen-

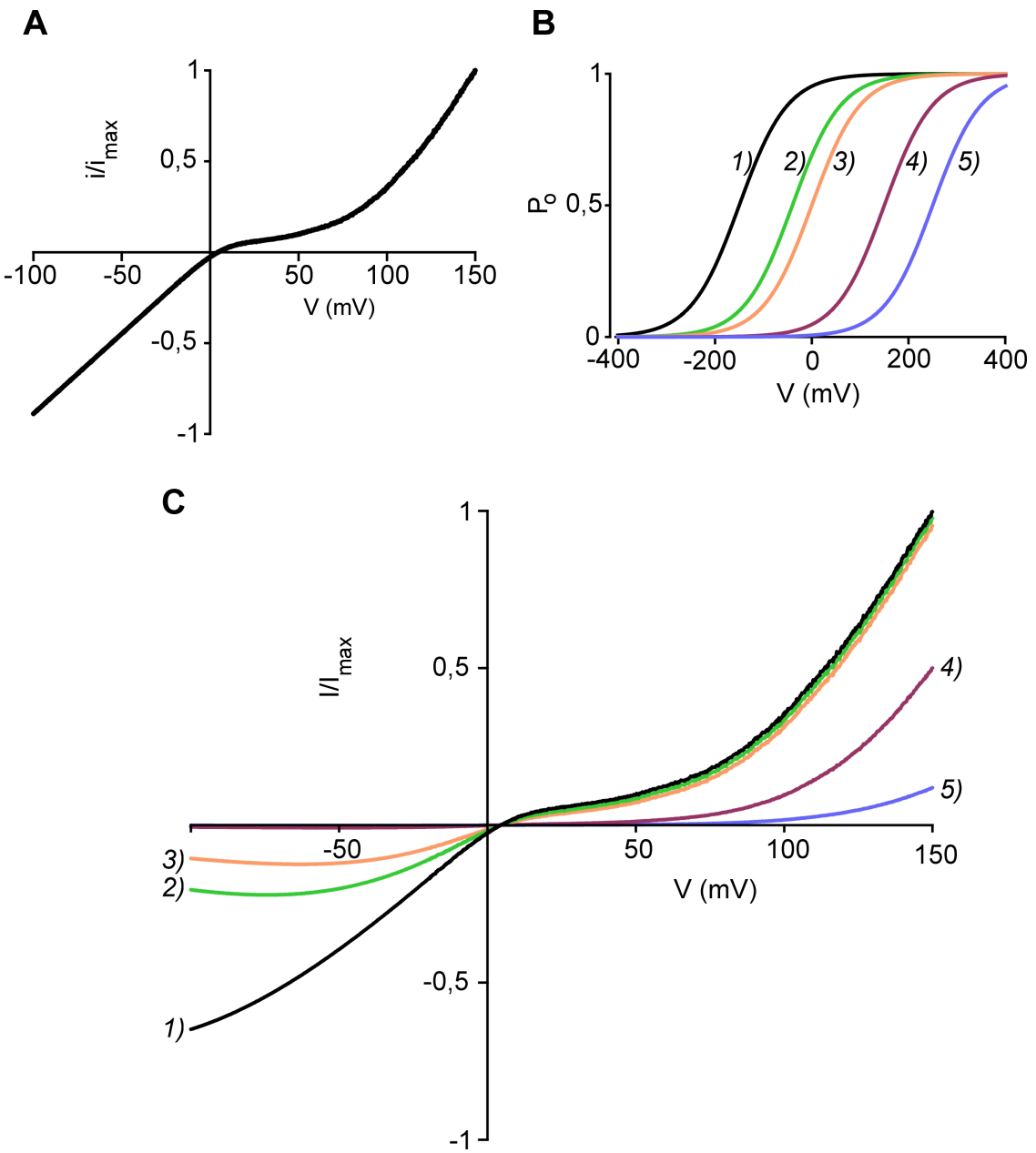

Abbildung 4.5: Simulierte Ganzzellströme durch den Kationenkanal TRPC4. (A) Aus der Ganzzell-Strom-Spannungs-Kenlinie des durch Histaminstimulation maximal aktivierten TRPC4 wurde eine hypothetische Strom-Spannungs-Kennlinie der Einzelkanalströme *i* generiert, indem die Einwärtsströme unter Verwendung der von -10 bis -30 mV herrschenden Steigung linear bis -100 mV extrapoliert wurden. Verschiedene spannungsabhängige Aktivierungskurven (B) wurden mit der in (A) gezeigten Kurve multipliziert, um die Strom-Spannungs-Kennlinien der Ganzzellströme *I* (C) für die verschiedenen Aktivierungskurven zu simulieren.

wahrscheinlichkeit vom Membranpotential zustande kommen können, wurde eine hypothetische Einzelzell-Strom-Spannungs-Kennlinie für TRPC4 generiert (Abb. 4.5 A). Dazu wurde die Strom-Spannungs-Kennlinie des durch Histaminstimulation voll aktivierten TRPC4 (siehe Abb. 3.22 C, Seite 61) im Bereich der Einwärtsströme durch Extrapolation linearisiert und auf die maximale

Stromstärke normiert dargestellt. Die Strom-Spannungs-Kennlinie des offenen Einzelkanals entspricht dem Produkt aus der spannungsabhängigen Leitfähigkeit der offenen Pore und der treibenden Kraft, also dem Term $\gamma(V)(V - V_e)$ in Gleichung 4.1. Da die Anzahl der Kanäle N aufgrund der Normierung vernachlässigt werden kann, ergibt sich nach Gleichung 4.1 der Ganzzellstrom als Produkt der Einzelkanal-Strom-Spannungs-Kennlinie mit der spannungsabhängigen Aktivierungskurve $P_o(V)$. Verschiedene spannungsabhängige Aktivierungskurven (Abb. 4.5 B) wurden mit der Einzelkanal-Strom-Spannungs-Kennlinie multipliziert und ergaben simulierte Ganzzell-Strom-Spannungs-Kennlinien (Abb. 4.5 C), die den im Verlauf einer PLC-Aktivierung gemessenen Kurven sehr nahe kommen (vgl. Abb. 3.22 C, Seite 61).

Auch die Charakterisierung der PLC-abhängigen Aktivierung von TRPC4 mit Spannungssprüngen (siehe Abb. 3.23 und 3.24, Seite 62 und 63) stützt das Bild von TRPC4 als spannungsabhängigem Ionenkanal. In Verlauf der PLC-Aktivierung verschiebt sich die Spannungsabhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit in Richtung negativer Membranpotentiale. Dabei nimmt die Geschwindigkeit der Aktivierung bei Sprüngen zu positiven Potentialen zu, während gleichzeitig die Geschwindigkeit der Deaktivierung bei Sprüngen zurück zu negativen Potentialen abnimmt.

4.3.2 Modulation der Spannungsabhängigkeit als Aktivierungsmechanismus

Der genaue Mechanismus der PLC-abhängigen Aktivierung von TRPC4 ist weiterhin ungeklärt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass das TRPC4 aktivierende Prinzip dazu in der Lage sein muss, die Spannungsabhängigkeit des Ionenkanals zu modulieren. Als mögliche physiologische Aktivatoren klassischer TRP-Kanäle werden einerseits freie Fettsäuren diskutiert, die aus dem PLC-abhängig gebildeten Diacylglycerol abgespalten werden könnten (Kiselyov & Muallem, 1999). Eine andere Möglichkeit wäre die Aktivierung der Kanäle durch den PLC-vermittelten Abbau von PIP_2, das den Kanal in ruhenden Zellen hemmen könnte (Clapham, 2003).

Sowohl für Fettsäuren (Visentin & Levi, 1998) als auch für PIP_2 (Suh & Hille, 2005) konnte gezeigt werden, dass sie die Spanungsabhängigkeit von Ionenkanälen modulieren können. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Spannungsabhängigkeit von TRPC4 durch solche Lipidmediatoren moduliert werden kann. Wenn eine solche Modulation möglich ist, könnte nach der Proteinregion gesucht werden, die die Bindung der Modulatoren vermittelt. Als Ausgangspunkte für eine solche Suche könnten beispielsweise die in den Homologen TRPV1 (Prescott & Julius, 2003) und TRPM8 (Rohács *et al.*, 2005) bereits charakterisierten, die Modulation dieser Ionenkanäle durch PIP_2 vermittelnden Regionen dienen.