

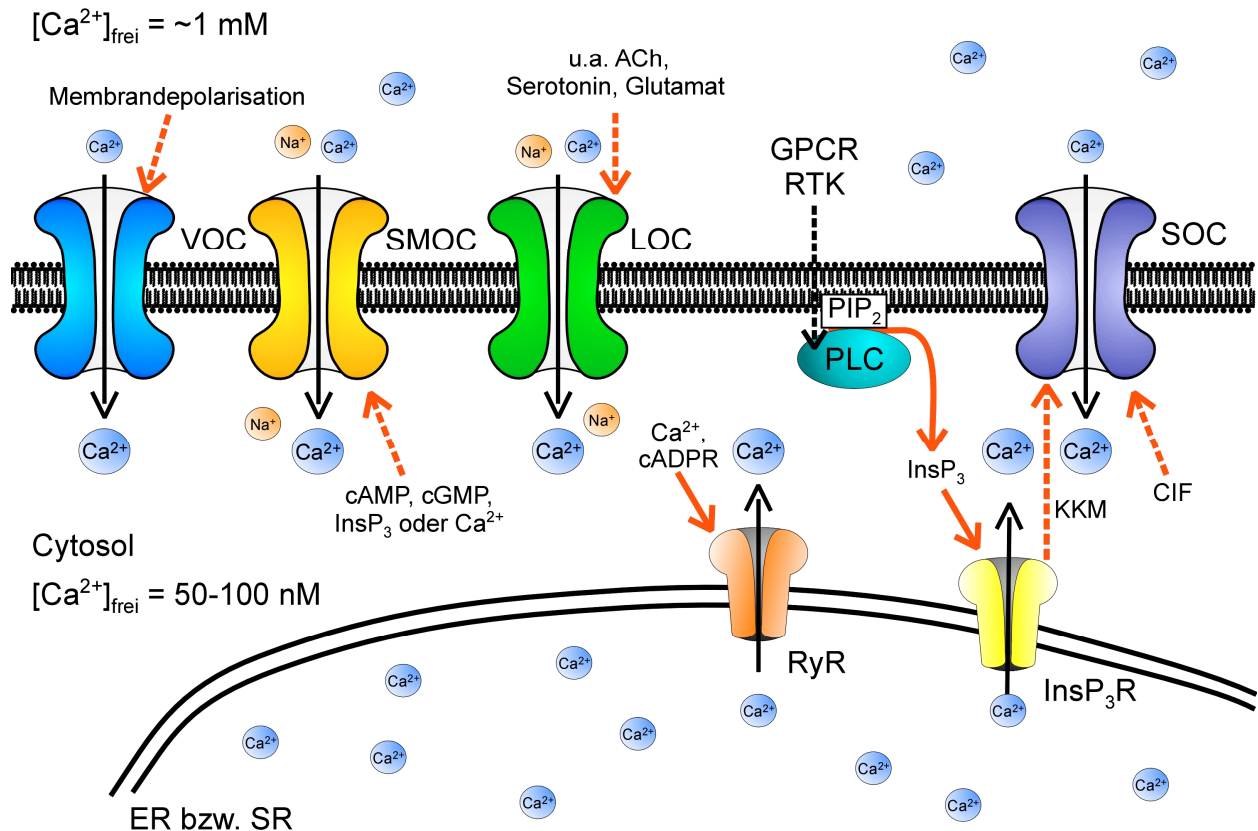
# 1. Einleitung

## 1.1. Calcium-Homöostase

Das divalente Calciumkation ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ist ein ubiquitär in eukaryoten Zellen genutzter intrazellulärer Botenstoff, der diverse physiologische Prozesse kontrolliert. Hierzu gehören u.a. die Ausschüttung von Neurotransmittern, die Kontraktion von Muskelzellen, die Sekretionstätigkeit endo- und exokriner Drüsen, die Gentranskription, die Zellproliferation, die Regulation von Ionenkanälen sowie einer Reihe von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen enzymatischen Stoffwechselprozessen (Ebashi, 1972; Llinás, 1982; Eckert und Chad, 1984; Carafoli und Penniston, 1986; Rasmussen, 1989; Rogers, 1989; Somlyo und Himpens, 1989; Pietrobon et al., 1990; Sheng et al., 1991; Bading et al., 1993; Ghosh und Greenberg; 1995; van Haasteren et al., 1999). Diese zellulären Effekte werden über einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) hervorgerufen, der auch als  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal bezeichnet wird. Die folgenden Daten sind den Übersichtsarbeiten von Tsien und Tsien, 1990; Clapham, 1995 und Berridge et al., 2000 entnommen. In ruhenden Zellen beträgt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um 50-100 nM. Nach Stimulation der Zellen durch diverse extrazelluläre Reize wie die Bindung von Liganden an Oberflächenrezeptoren, Depolarisation, mechanische sowie physikalische Stimuli kann die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Sekunden um das 100-fache ansteigen. Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kann durch Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern oder durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Medium erfolgen.

### 1.1.1. $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern

Die internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Quellen befinden sich innerhalb des interzellulären Membransystems, im endoplasmatischen Retikulum (ER), welches bei Muskelzellen als sarcoplasmatisches Retikulum (SR) bezeichnet wird. Im Lumen des ER bzw. SR wird  $\text{Ca}^{2+}$  durch Speicherproteine wie Calsequestrin und Calreticulin gepuffert, die eine geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität ( $K_d$  im mM-Bereich) jedoch eine hohe Kapazität mit ca. 50 Calciumionen pro Speicherprotein besitzen. Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus diesen internen Speichern wird durch verschiedene Kanäle kontrolliert, wobei die Familie der Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) und der Ryanodin-Rezeptoren (RyR) bislang am besten und weitesten untersucht wurden (Abb. E1). Die RyR werden im allgemeinen durch eine hohe  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aktiviert und für den Prozess der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzier-



**Abbildung E1: Mechanismen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung nach Zell-Stimulation**

In ruhenden Zellen beträgt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  um  $50-100 \text{ nM}$ . Nach Stimulation der Zelle kann extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  über plasmamembranäre Kationenkanäle in das Cytosol gelangen. Hierzu gehören spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle („voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels“, VOC), Liganden-gesteuerten Kanäle („ligand-operated channels“, LOC), über sekundäre Botenstoffe gesteuerte Kanäle („second messenger-operated channels“, SMOC) und speicher vermittelt regulierten Kanäle („store-operated channels“, SOC). Mit durchbrochenen roten Pfeilen sind die aktivierenden Reize für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über die Plasmamembran gekennzeichnet. Weiterhin wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum (ER bzw. SR) über Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR) in das Cytosol freigesetzt. Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) entsteht nach Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren (GPCR) und Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aus dem Membranlipid Phosphoinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) durch die Enzymaktivität von Phospholipasen C (PLC). Die durchgezogenen roten Pfeile markieren die Reize für den Einstrom aus internen Speichern. cADPR, cyclische ADP-Ribose; cAMP/cGMP, cyclisches Adenosin-/Guanosin-monophosphat; CIF,  $\text{Ca}^{2+}$ -Influxfaktor; KKM, Konformations-Kopplungs-Mechanismus.

ten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung („ $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release“, CICR) verantwortlich gemacht. Weiterhin werden die RyR durch cyclische ADP-Ribose (cADPR) stimuliert bzw. in ihrer Sensitivität gegenüber cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  moduliert. Die  $\text{InsP}_3\text{R}$  werden hingegen durch die Bindung von Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) geöffnet, das nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) oder Rezeptor-Tyrosinkinasen durch die enzymatische Aktivität von

Phospholipasen C aus Phosphoinositol-4,5-bisphosphat der Plasmamembran abgespalten wird. Zusätzlich werden die  $\text{InsP}_3\text{R}$  auch durch cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert, wobei je nach  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  die Wirkung stimulierend (100-300 nM) oder inhibierend ( $>300$  nM) sein kann und zwischen den unterschiedlichen  $\text{InsP}_3\text{R}$ -Isoformen variiert. Als weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Botenstoffe sind das Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotidphosphat (NAADP) und das Sphingosin-1-phosphat (S1P) beschrieben worden.

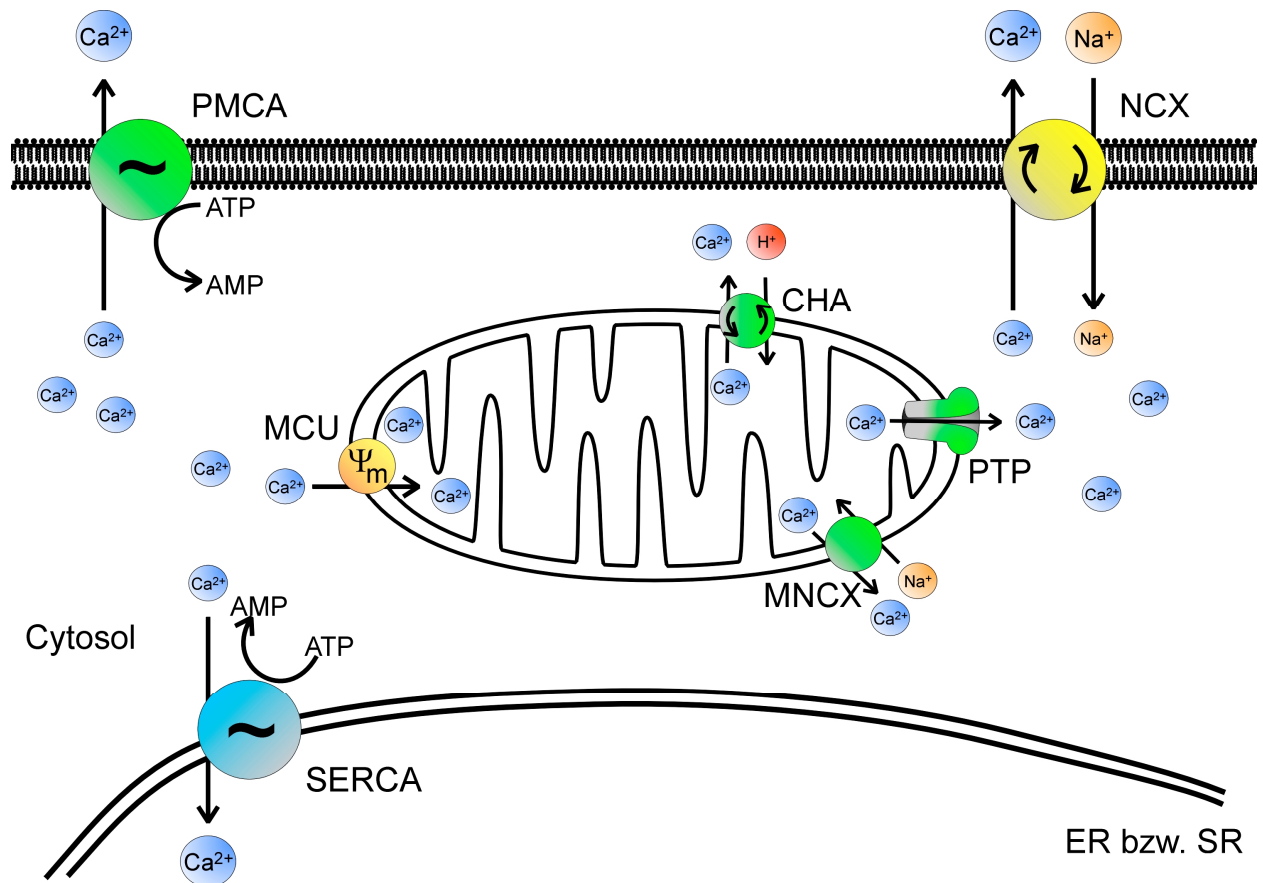
### ***1.1.2. $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über die Plasmamembran***

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Medium in das Cytosol wird über  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle gesteuert, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen in spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und spannungsunabhängige Kationenkanäle unterteilt werden können (Abb. E1). Spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden vorwiegend in erregbaren Zellen exprimiert, öffnen nach Membrandepolarisation und vermitteln einen selektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Tsien et al., 1995; Jones, 1998). Spannungsunabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle werden sowohl in neuronalen als auch nicht-neuronalen Zellen exprimiert und können auf der Basis ihrer Aktivierungsmechanismen in die drei Hauptgruppen der Liganden-gesteuerten Kanäle („ligand-operated channels“, LOC), der über sekundäre Botenstoffe gesteuerten Kanäle („second messenger-operated channels“, SMOC) und der speichervermittelt regulierten Kanäle („store-operated channels“, SOC) untergliedert werden. Die LOC, die auch als ionotrope Rezeptoren bezeichnet werden, werden nach direkter Bindung eines extrazellulären Liganden bzw. Agonisten an das Kanalprotein aktiviert (Neher und Sakman, 1976; Barnard 1992; Unwin, 1993). Zu dieser Gruppe gehören als Kationen-permeable Kanäle u.a. der nicotische Acetylcholinrezeptor, der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor, der 5-Hydroxytryptamin (5-HT<sub>3</sub>)-Rezeptor oder die purinergen P2X-Rezeptoren. Bei den SMOCs erfolgt die Öffnung des Kanals durch Bindung intrazellulärer sekundärer Botenstoffe („second messenger“). Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind die durch zyklische Nukleotide regulierten (CNG) Kanäle (Kaup et al., 1989; Yau, 1994; Biel et al., 1999), die Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ )-regulierten Kationenkanäle der Plasmamembran (Kuno und Gardner, 1987; Penner et al., 1988; Kiselyov et al., 1997) und die durch  $\text{Ca}^{2+}$  regulierten Kationenkanäle (von Tschanner et al., 1986; Partridge und Swandulla, 1988). Die Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher ist das aktivierende

Signal der SOC. Hierbei ist noch unklar, welche molekularen Aktivierungsmechanismen und Strukturen diesem Signalweg zugrunde liegen (Putney, 1986; Hoth und Penner, 1992; Zweifach und Lewis, 1993; Parkekh und Penner, 1997). Eine Hypothese besagt, dass die SOC in der Plasmamembran direkt mit den  $\text{InsP}_3\text{R}$  des ER interagieren. Durch die luminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Steuerung des  $\text{InsP}_3\text{R}$  und dessen Konformationsänderung sollen die SOC über die freie  $[\text{Ca}^{2+}]$  innerhalb der Speicher informiert werden (Konformations-Kopplungs-Mechanismus; Irvine, 1990). Weiterhin wird postuliert, dass bei der Speicherentleerung ein bislang nicht identifizierter, frei im Cytosol diffusibler „ $\text{Ca}^{2+}$ -Influxfaktor“ (CIF) gebildet wird, der an die SOC bindet und sie dadurch aktiviert (Randriamampita und Tsien, 1993).

### ***1.1.3. Calcium-Retention und -Extrusion***

Um im Ruhezustand die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf einem niedrigen basalen Niveau zu halten oder nach erfolgtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wieder auf den Grundzustand zu bringen, verfügen die Zellen über mehrere Mechanismen,  $\text{Ca}^{2+}$  passiv oder aktiv aus dem Cytosol zu entfernen (Abb. E2). Der Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  über die Plasmamembran zurück in den Extrazellulärraum kann zum einen über die in Eukaryoten ubiquitär vorkommende plasmamembranäre  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA; Carafoli, 1994; Penniston und Enyedi, 1998) und zum anderen über den sogenannten  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Blaustein und Lederer, 1999) erfolgen, der durch den elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten angetrieben und hauptsächlich in erregbaren Zellen exprimiert wird. Die PMCA gehört zur Familie der P-Typ Transport-ATPasen, die während ihres Reaktionszyklus autophosphoryliert werden und wird über eine Reihe von Faktoren wie Calmodulin, saure Phospholipide sowie die Proteinkinasen A und C reguliert. Weiterhin findet eine Sequestrierung von  $\text{Ca}^{2+}$  zurück ins ER bzw. SR statt, die über eine dort befindliche  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die SERCA („sarco-endoplasmatic reticulum ATPase“) vermittelt wird (Hussain und Inesi, 1999; Misquitta et al., 1999). Die schnelle Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien während des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals und die langsame Freigabe dieser Kationen in das Cytosol während der Erholungsphase sind weitere wichtige Komponenten bei der Modulation der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Thomas et al., 1996; Simpson und Russell, 1998; Berridge et al., 2000). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Mitochondrien erfolgt über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU), wobei der zur ATP-Synthese verwendete elektrochemische Protonengradient genutzt wird (Gunter et al., 1998; Budd, 1998). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -



**Abbildung E2: Mechanismen der Ca<sup>2+</sup>-Sequestrierung und -Extrusion**

Nach einem Ca<sup>2+</sup>-Signal und um eine [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> von etwa 50-100 nM in ruhenden Zellen aufrecht zu erhalten, wird Ca<sup>2+</sup> aus dem Cytosol über die plasmamembranäre Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) und über einen plasmamembranären Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) zurück in den Extrazellularraum transferiert oder über eine „sarco-endoplasmatic reticulum ATPase“ (SERCA) ins endoplasmatische oder sarkoplasmatische Retikulum (ER bzw. SR) transportiert. Weiterhin kann Ca<sup>2+</sup> über einen mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Uniporter (MCU) in den Mitochondrien aufgenommen werden, wobei der elektrochemische Protonengradient (Ψ<sub>m</sub>) als Triebkraft genutzt wird. Der Ausstrom mitochondrialer Ca<sup>2+</sup> zurück ins Cytosol erfolgt über einen mitochondrialen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (MNCX), einen Ca<sup>2+</sup>/2H<sup>+</sup>-Austauscher (CHA) oder eine als „permeability transition pore“ (PTP) bezeichnete Pore.

Efflux aus den Mitochondrien kann über drei unterschiedliche Mechanismen erfolgen, einen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (Baysal et al., 1994), einen Ca<sup>2+</sup>/2H<sup>+</sup>-Austauscher (Gunter et al., 1994) und über eine als „permeability transition pore“ (PTP) bezeichnete regulierte Pore (Ichas et al., 1997). Das aus den Mitochondrien ins Cytosol überführte Ca<sup>2+</sup> wird anschließend entweder ins ER oder über die Plasmamembran aus der Zelle heraus transportiert.

## 1.2. Die Familie der TRP-Kanäle

Die visuelle Signaltransduktion von Insekten unterscheidet sich grundlegend von jener im Säugetierauge. In den Stäbchen und Zapfen der Säugetier-Retina aktiviert das Rhodopsin über ein G-Protein der  $G_i$ -Subfamilie (Transducin) eine cGMP-Phosphodiesterase und führt durch Schließung cGMP-aktivierter  $Na^+$ -permeabler Kationenkanäle zu einem hyperpolarisierenden Rezeptorpotential. Im Facettenauge von Insekten hingegen aktiviert das Rhodopsin über ein G-Protein der  $G_q$ -Subfamilie eine Phospholipase C (PLC), wodurch eine Öffnung plasmamembranärer  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle erfolgt, die einen Licht-induzierten Strom (LIC, „light induced current“) vermitteln und damit ein depolarisierendes Rezeptorpotential generieren (Hardie und Minke, 1992; Ranganathan et al., 1995). Durch Isolierung spontaner Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die in Bezug auf den LIC einen auffälligen Phänotyp zeigten, konnten Gene identifiziert werden, deren Genprodukte im Phototransduktionsprozess involviert sind (Cosens und Manning, 1969; Minke et al., 1975). Eine visuelle Defektmutante zeichnete sich dadurch aus, dass sie bei einem tonischen Lichtreiz nur ein kurz anhaltendes, also ein transientes Rezeptorpotential zeigte anstelle des dauerhaften  $Ca^{2+}$ -Einstroms, der in Wildtyp Tieren für die tonische Phase des LIC verantwortlich ist. Dieser Phänotyp konnte auf ein mutiertes Gen zurückgeführt werden, das als *trp* („transient receptor potential“) bezeichnet wurde und für ein Kanalprotein kodiert, das eine evolutionäre Verwandtschaft zu Proteinen aus der Superfamilie hexahelikaler Kationenkanäle zeigt (Montell et al., 1985; Montell und Rubin, 1989; Hardie und Minke, 1992). Ein weiteres TRP-homologes Kanalprotein, TRPL (TRP-like; Philips et al., 1992), wird ebenfalls im Auge von *Drosophila* exprimiert. Weitere Arbeiten bestätigen, dass die Genprodukte der *trp*- und *trpl*-Gene nichtselektive  $Ca^{2+}$ -permeable Kationenkanäle bilden (Montell und Rubin, 1989; Hardie und Minke, 1992; Hu et al., 1994; Vaca et al., 1994; Niemeyer et al., 1996; Reuss et al., 1997). Der LIC ist in *trp/trpl*-Doppelmutanten nahezu vollständig aufgehoben (Niemeyer et al., 1996). Die *Drosophila* TRP- und TRPL-Kanäle stellen daher die molekulare Grundlage des lichtinduzierten Kationenstroms im Auge der Fruchtfliege dar. Als drittes und letztes Mitglied der klassischen TRP-Kanäle von *Drosophila melanogaster* wurde TRP- $\gamma$  kloniert (Xu et al., 2000).

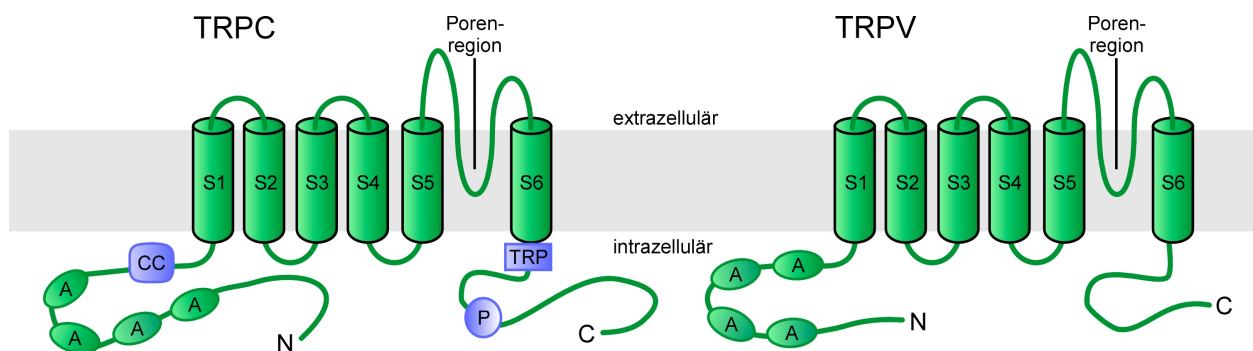
Bereits seit langer Zeit werden die molekularen Grundlagen des rezeptorvermittelten Kationeneinstroms in Säugetierzellen untersucht. Aufgrund der Ähnlichkeiten zum PLC-

abhängigen Kationeneinstrom bei der Phototransduktion in der Fruchtfliege wurden Säugerhomologe der *Drosophila* TRP-Kanäle gesucht. Bislang konnten insgesamt 56 verwandte Kationenkanäle, davon 28 Säugerisoformen auf Basis von Sequenzhomologie oder durch Expressionsklonierung gefunden werden, welche anhand phylogenetischer Analysen und durch die Existenz konservierter Domänen in 7 Subfamilien untergliedert sind (Clapham, 2003; Vriens et al., 2004a; Huang, 2004; Montell, 2005). Die Subfamilien wurden als TRPC („classical“ oder „canonical“ TRP-Kanäle) im Falle der den *Drosophila* TRP-Kanälen am nächsten verwandten Kanäle oder nach der Homologie zu den ersten klonierten Vertretern der anderen Subfamilien als TRPV (Vanilloidrezeptor-verwandt), TRPM (Melastatin-ähnlich), TRPP (PKD; „polycystic kidney disease“), TRPML (MLN; Mukolipidin), TRPN (NOMP-C; „no mechanoreceptor potential-C) und TRPA (ANKTM1; „ankyrin-like with transmembrane domain 1“) bezeichnet. Da in dieser Arbeit fast ausschließlich mit Säugerisoformen der TRPV-Subfamilie gearbeitet wurde und in der Diskussion auch auf Mitglieder der TRPC-Subfamilie Bezug genommen wird, werden die Mitglieder anderer Species und der übrigen TRP-Subfamilien TRPM, TRPP, TRPML, TRPN und TRPA bei den weiteren Ausführungen nicht näher beschrieben.

### ***1.2.1. Strukturelle Eigenschaften***

Alle TRPC- und TRPV-Kanaluntereinheiten besitzen eine Proteinstruktur mit cytosolischen N- und C-Termini, sechs putativen Transmembransegmenten und einer putativen Porenregion, welche aus einem kurzen hydrophoben Abschnitt zwischen dem 5. und 6. Transmembransegment besteht (Vannier et al., 1998; Clapham et al., 2003; Abb. E3). Die Struktur ähnelt somit jener der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle, der durch zyklische Nukleotide regulierten Kanäle (CNG) und der „hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels“ (HCN). Dem 4. Transmembransegment fehlen allerdings die positiv geladenen Aminosäurereste, die in den spannungsgesteuerten Ionenkanälen als Spannungssensor fungieren. Die Kanaluntereinheiten der TRPC- und TRPV-Subfamilien besitzen am N-Terminus mehrere Ankyrin-homologe Wiederholungen („ankyrin-repeats“), deren Funktion innerhalb der TRP-Kanäle noch nicht aufgeklärt ist. Einige der Ankyrin-homologen Wiederholungen können durch Bildung von coiled-coil Strukturen, die Interaktion zwischen TRP-Kanaluntereinheiten und der Ausbildung von Kanalkomplexen vermitteln. In Analogie zu den spannungsgesteuerten

Kaliumkanälen und CNG-Kanälen werden funktionelle TRP-Kanalkomplexe durch eine homo- bzw. auch heteromere Quartärstruktur aus vier Kanaluntereinheiten aufgebaut, wie dies bereits für Vertreter der TRPC- und einige Mitglieder der TRPV-Familie gezeigt werden konnte (Kedei et al., 2001; Hofmann et al., 2002; Hoenderop et al., 2003). Welche Domänen für die Zusammenlagerung erforderlich sind, ist bislang noch unbekannt. Zu den hochkonservierten Regionen innerhalb der TRPC-Subfamilie zählen zudem eine coiled-coil Domäne im cytosolischen N-Terminus, ein kurz hinter dem 6. Transmembransegment befindliches Motiv aus sechs Aminosäuren, das als TRP-Box bzw. nach der Abfolge der Aminosäuren als EWKFAR-Motiv bezeichnet wird sowie ein prolinreiches Motiv im cytosolischen C-Terminus.



**Abbildung E3: Schematische Darstellung der postulierten Domänenstruktur der TRPC- und TRPV-Subfamilie**

Alle TRPC- und TRPV-Kanaluntereinheiten enthalten 6 Transmembransegmente (S1-S6) mit einer putativen Porenregion zwischen dem 5. und 6. Transmembransegment und drei bis vier Ankyrin-homologe Wiederholungen (A). Die Mitglieder der TRPC-Subfamilie besitzen weiterhin eine coiled-coil Domäne (CC) im N-Terminus sowie eine TRP-Box (TRP) und eine prolinreiche Region (P) im C-Terminus.

### ***1.2.2. Biophysikalische und regulatorische Eigenschaften***

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Daten über die funktionellen und biophysikalischen Eigenschaften von TRP-Kanälen erhoben und in Übersichtsarbeiten u.a. von Vennekens et al. (2002), David E. Clapham (2003), Vriens et al. (2004a) und Craig Montell (2005), zusammengefasst worden. Die folgenden Ausführungen sollen einen kurzen Einblick in die bis heute vorliegenden und sehr umfangreichen Studien über die Vertreter der Säuger TRPC- und TRPV-Kanäle geben. Eine Zusammenfassung der hier aufgeführten Eigenschaften von TRPC- und TRPV-Kanaluntereinheiten kann der Tabelle EI entnommen werden.



Name	Regulationsmodelle	prädominante Expression
TRPC1	ROC (TRPC1/5-Heteromultimer), SOC	Herz, Gehirn, Hoden, Ovar
TRPC2	DAG, SOC	vomeronasales Organ, Hoden, Herz, Gehirn, Spermien
TRPC3	DAG, InsP <sub>3</sub> R, SOC	Gehirn, Plazenta, Herz, Muskel
TRPC4	ROC, SOC	Gehirn, Hoden, Retina, Nebennierenrinde, Endothelzellen
TRPC5	SOC, ROC	Gehirn
TRPC6	DAG	Lunge, Gehirn, Muskeln
TRPC7	DAG, SOC	Herz, Muskeln, Lunge, Auge, Gehirn
TRPV1	Hitze (>43°C), Vanilloide Anandamid, Protonen, PIP <sub>2</sub>	Gehirn, TG, DRG
TRPV2	Hitze (>52°C), Exocytose (WF)	DRG, Rückenmark, Gehirn, Milz, Dünn- und Dickdarm, Myocyten
TRPV3	Wärme (>30°-39°C)	DRG, TG, Keratinocyten, Zunge, Rückenmark, Gehirn
TRPV4	Osmolarität, 5',6'-EET, Phorbolester, Wärme (>27°C)	Niere, Lunge, Milz, Hoden, Leber Endothelzellen, Herz, DRG
TRPV5	Hyperpolarisation, niedrige [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Niere, Dünndarm, Plazenta, Pankreas
TRPV6	Hyperpolarisation, niedrige [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> I <sub>CRAC</sub>	Dünndarm, Pankreas, Plazenta, Prostata

**Tabelle E1: Regulationsmechanismen und Expressionsorte der TRPC- und TRPV-Kanäle**

**DAG:** Diacylglycerol; **5',6'-EET:** 5',6'-Epoxyeicosatetraensäure; **I<sub>CRAC</sub>:** „calcium release-activated calcium current“; **InsP<sub>3</sub>R:** Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor; **PIP<sub>2</sub>:** Phosphoinositol-4,5-bisphosphat; **ROC:** rezeptorgesteuert („receptor-operated channel“); **SOC:** speichervermittelt reguliert („store-operated channels“); **WF:** Wachstumsfaktor.

### *TRPV-Subfamilie*

Die Mitglieder der Familie Vanilloidrezeptor-verwandter TRP-Kanäle sind integrale Komponenten der Wärme- und Schmerzwahrnehmung und werden durch verschiedene physikalische sowie chemische Reize aktiviert. Die TRPV-Familie der Säuger umfasst zur Zeit 6 Mitglieder (TRPV1-TRPV6), wobei die TRPV-Kanäle 5 und 6 eine eigene Untergruppe bilden.

Die TRPV-Kanäle 1 bis 4 sind nichtselektive Kationenkanäle, die physiologische Temperatursensoren mit unterschiedlichen Schwellenwerten bilden (Caterina et al., 1997; Caterina et al., 1999; Smith et al., 2002; Watanabe et al., 2002a; Xu et al., 2002).

Der Vanilloidrezeptor 1, VR1 oder TRPV1, kann durch Temperaturen  $>42^{\circ}\text{C}$  sowie durch Capsaicin (Caterina et al., 1997), die Endocannabinoide Anandamid (Zygmunt et al., 1999; Olah et al., 2001a; Smart et al., 2000) und *N*-Arachidonoyl-dopamin (Huang et al., 2002) sowie durch Eicosanoide (Hwang et al., 2000) aktiviert werden. Zusätzlich wird TRPV1 durch ein saures extrazelluläres Milieu aktiviert bzw. gegenüber den zuvor genannten Stimuli sensibilisiert (Caterina et al. 1997; Tominaga et al., 1998), hervorgerufen durch Protonierung von Aminosäuren innerhalb der Porenregion (Jordt et al., 2000). Darüber hinaus stimulieren bzw. sensibilisieren inflammatorische Mediatoren wie Bradykinin, Serotonin, Histamin und Prostaglandin entweder durch PKC-abhängige Signalwege (Cesare et al., 1999; Premkumar und Ahern, 2000; Vellani et al., 2001), durch Aufhebung der Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-abhängigen Inhibition von TRPV1 (Chuang et al., 2001; Prescott und Julius, 2003), durch Bildung von 12-Lipoxygenase-Produkten (Shin et al., 2002) oder durch Proteinkinase A-vermittelte Phosphorylierung (Bhave et al., 2002) die Aktivität von TRPV1. Weiterhin führt die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an ein Segment im C-Terminus von TRPV1 zur Desensibilisierung des Kanals (Numazaki et al., 2003). TRPV1 wird hauptsächlich in sensorischen Neuronen der Hinterwurzelganglien exprimiert (Caterina et al., 1997; Caterina et al., 1999). Durch Studien an TRPV1-defizienten transgenen Mäusen, die einen Verlust der Vanilloid-induzierten nozizeptiven, inflammatorischen und hypothermischen Antworten aufweisen, konnte die physiologische Rolle von TRPV1 bei der durch Entzündungsmediatoren ausgelösten akuten thermischen Nozizeption und inflammatorischen Hyperalgesie beschrieben werden (Caterina et al., 2000, Davis et al., 2000).

TRPV2, der nächste Verwandte von TRPV1, wurde aus Hinterwurzelganglien der Ratte kloniert und wird durch extreme Hitze ( $>52^{\circ}\text{C}$ ) aktiviert (Caterina et al., 1999). Weiterhin wurde für TRPV2 ein durch Wachstumsfaktoren gesteuerter Einbau in die Plasmamembran gezeigt („secretion-coupling model“), aufgrund dessen er auch als „growth-factor-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel“ (GRC) bezeichnet wurde (Kanzaki et al., 1999; Boels et al., 2001). Da TRPV2 auch außerhalb sensorischer Neurone u.a. in der Milz, der Lunge und im Rückenmark

exprimiert wird (Caterina et al., 1999; Kanzaki et al., 1999; Lewinter et al., 2004), ist die physiologische Relevanz seiner Hitzesensitivität noch unklar.

Moderate Temperaturen aktivieren auch TRPV3 (>31°C) und TRPV4 (>25°C) (Smith et al., 2002; Xu et al., 2002; Peier et al., 2002; Güler et al., 2002). Die neuronale Expression von TRPV3 könnte sich zum Teil mit der von TRPV1 überschneiden, worauf die Möglichkeit einer Heteromultimerisierung dieser TRP-Kanaluntereinheiten in Erwägung gezogen wurde (Smith et al., 2002). TRPV3 wird weiterhin in Keratinocyten exprimiert (Peier et al., 2002; Chung et al., 2004), was die TRPV1/TRPV2-unabhängige Aktivität von wärmesensitiven Neuronen in der Haut erklären könnte (Woodbury et al., 2004). Wie das TRPV3-Signal zu den umliegenden Neuronen übertragen wird ist zur Zeit noch unklar. Weiterhin konnte eine Expression von TRPV3 in der Zunge und im Nervensystem nachgewiesen werden (Xu et al., 2002). Für TRPV4 wurde neben der Temperatursensitivität auch eine Aktivierung durch erniedrigte extrazelluläre Osmolarität beschrieben (Strotmann et al., 2000; Liedtke et al., 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von TRPV4 durch Hypotonizität sowie durch Anandamid und Arachidonsäure über die Bildung von 5',6'-Epoxyeicosatetraensäure vermittelt wird (Watanabe et al., 2003; Vriens et al., 2004b). Zusätzlich kann TRPV4 auch durch Phorbolsterderivate in einer PKC-unabhängigen Weise aktiviert werden (Watanabe et al., 2002b). Die Expression von TRPV4 konnte in einer Reihe von Geweben wie Niere, Leber, Herz, Lunge, Gehirn und Innenohr nachgewiesen werden (Wissenbach et al., 2000; Strotmann et al., 2000; Liedtke et al., 2000; Delany et al., 2001). TRPV4-defiziente Mäuse zeigen eine geringfügig verringerte renale Antwort auf Hypoosmolarität, wahrscheinlich aufgrund einer abnormen zentral kontrollierten Sekretion des Antidiuretischen Hormons (Liedtke und Friedman, 2003; Mizuno et al., 2003). Weiterhin konnte auch ein verändertes Verhalten gegenüber höheren Temperaturen in Abwesenheit von TRPV4 gezeigt werden (Lee et al., 2005).

Die TRPV-Kanäle 5 und 6 bilden innerhalb der TRPV-Familie eine eigenständige Untergruppe. Sie sind konstitutiv aktive, hoch  $\text{Ca}^{2+}$ -selektive Kationenkanäle mit einer geringen Einzelkanalleitfähigkeit, einer einwärts gleichrichtenden Strom-Spannungscharakteristik und werden durch eine erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration inhibiert (Hoenderop et al., 1999; Peng et al., 1999; Peng et al., 2000; Hoenderop et al., 2001; Hoenderop et al., 2002; den Dekker et al., 2003). Sie sind bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in der Niere und im Darm beteiligt und unterliegen im nativen

Gewebe einer transkriptionellen Kontrolle durch  $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die endogen zum Teil kolokalisiert vorliegenden TRPV5- und TRPV6-Kanaluntereinheiten auch Heteromultimere bilden (Hoenderop et al., 2003). TRPV6 wurde aufgrund seiner biophysikalischen Eigenschaften und der endogenen Expression in RBL-Zellen („rat basophilic leukemia“; eine basophile Mastzelllinie aus der Ratte) mit dem in RBL-Zellen beschriebenen  $I_{CRAC}$  („calcium release-activated calcium current“), in Verbindung gebracht (Clapham et al., 2001; Yue et al., 2001).  $I_{CRAC}$  ist eine hoch  $Ca^{2+}$ -selektive Leitfähigkeit, die durch Entleerung intrazellulärer Speicher oder durch eine erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktiviert wird und deren molekulare Identität noch nicht aufgeklärt ist (Lewis und Cahalan, 1989; Hoth und Penner, 1992). TRPV5 und TRPV6 sowie deren Heteromultimere zeigen jedoch eine spannungsabhängige Aktivierung, die beim nativen  $I_{CRAC}$  nicht beobachtet werden konnte (Voets et al., 2001; Bödding et al., 2002; Hoenderop et al., 2003; Bödding, 2005).

#### *TRPC-Subfamilie*

Innerhalb der TRPC-Subfamilie sind 7 Säugerhomologe, TRPC1 bis TRPC7, kloniert worden. Die TRPC-Kanäle sind nicht-selektive,  $Ca^{2+}$ -permeable Kationenkanäle und werden nach Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Rezeptortyrosinkinasen aktiviert („receptor-operated channel“; ROC), was sie somit zu molekularen Korrelaten des rezeptorvermittelten  $Ca^{2+}$ -Einstroms macht. Die zugrundeliegenden direkten Aktivierungsmechanismen werden zur Zeit noch sehr kontrovers diskutiert. Dabei scheint es nicht unerheblich zu sein, dass von allen TRPC-Isoformen, außer bei TRPC5, Spleißvarianten existieren, die sich meist durch Deletionen im N- oder C-Terminus unterscheiden.

Für TRPC1 konnte bislang kein eindeutiger Aktivierungsmechanismus nachgewiesen werden. Erste Arbeiten deuteten auf eine speicherabhängige Aktivierung hin (Zitt et al., 1996), die jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden konnte (Sinkins et al., 1998; Brereton et al., 2000). In Studien, bei der die Antisense-Strategie genutzt wurde, konnte jedoch eine Reduktion des durch Speicherentleerung ausgelösten  $Ca^{2+}$ -Einstroms gezeigt werden (Liu et al., 2000; Wu et al., 2000; Brough et al., 2001). In der Arbeit von Hofmann et al. (2002) lag TRPC1 jedoch im heterologen Expressionssystem retiniert vor und konnte lediglich durch Coexpression mit TRPC4 bzw. TRPC5 an die Plasmamembran gesteuert werden. In HEK293-

Zellen konnten heterooligomere Kanalkomplexe aus TRPC1 und TRPC5 durch G<sub>q</sub>-koppelnde Rezeptoren, nicht aber durch Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher aktiviert werden, wobei sich TRPC1/TRPC5-Heteromere durch eigenständige biophysikalische Eigenschaften auszeichnen (Strübing et al., 2001). Eine funktionelle Bedeutung könnten TRPC1/TRPC5-Kanalkomplexe im ZNS besitzen, da in Hirnhomogenaten der Ratte durch Immunpräzipitation entsprechende Heteromere nachgewiesen werden konnten (Strübing et al., 2001; Goel et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TRPC1 bei der Sekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas beteiligt ist (Sakura und Ashcroft, 1997) und in Purkinje Zellen des Cerebellums sowie in dopaminergen Neuronen nach Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren als wichtiger Modulator der synaptischen Aktivität fungiert (Bengtson et al., 2004; Kim et al., 2003; Tozzi et al., 2003).

TRPC2 liegt im Menschen und beim Rind als Pseudogen vor (Wes et al., 1995; Wissenbach et al., 1998). Bei Nagetieren konnte jedoch für TRPC2 eine Expression im Vomeronasalorgan (VNO) und eine Bedeutung bei der Pheromonperzeption nachgewiesen werden (Liman et al., 1999; Leybold et al., 2002). Das Ausschalten des TRPC2-Gens in Mäusen führte bei ihrem Paarungsverhalten zu einem Verlust der Geschlechtsspezifität (Stowers et al., 2002; Keverne, 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TRPC2 in vomeronasalen Neuronen durch Diacylglycerole aktiviert wird (Lucas et al., 2003). Weiterhin wurde TRPC2 eine Rolle in Spermien bei der Eizellbefruchtung zugewiesen (Jungnickel et al., 2001), jedoch konnte bei Mäusen keine Expression von TRPC2 in Testis nachgewiesen werden und die Fertilität in TRPC2-defizienten Tieren war unverändert (Stowers et al., 2002). Für TRPC2 wurde sowohl eine Aktivierung durch Rezeptorstimulation als auch durch Speicherentleerung gezeigt (Chu et al., 2002; Vannier et al., 1999). In verschiedenen heterologen Expressionssystemen konnte hingegen nur eine intrazelluläre Retention von TRPC2 und keine signifikante Funktion nachgewiesen werden (Hofmann et al., 2000). Die subzelluläre Zielsteuerung von nativ exprimiertem TRPC2 in VNO-Neuronen der Ratte erfolgte jedoch korrekt und zwar in den sensorischen Zilien (Liman et al., 1999). In den sensorischen Mikrovilli des VNO sind aber keine internen Ca<sup>2+</sup>-Speicher vorhanden, so dass hier eine speichervermittelte Aktivierung von TRPC2 ausgeschlossen werden kann.

TRPC3, TRPC6 und TRPC7 bilden aufgrund ihrer engen strukturellen Verwandtschaft eine

eigene Untergruppe und zeigen auch funktionell eine große Übereinstimmung. Alle drei Kanäle werden durch  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  blockiert. Erste Arbeiten zu TRPC3 beschrieben einen speicherabhängigen Aktivierungsmechanismus (Zhu et al., 1996; Preuss et al., 1997). Wenig später wurde jedoch eine Stimulation und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Potenzierung von TRPC3 unabhängig von der Entleerung intrazellulärer Speicher gezeigt (Zitt et al., 1997). Darauf folgende Untersuchungen zur Regulation dieser Kanalfamilie bestätigten diesen Befund und ergaben weiterhin, dass TRPC3, TRPC6 und TRPC7 unabhängig von Proteinkinasen C durch Stimulation der PLC und durch Diacylglycerole aktiviert werden (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999; McKay et al., 2000). Die Ergebnisse weiterer Arbeiten deuten auf eine negative Regulation der intrinsischen Kanalfunktion in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) und auf eine Aktivierung der Kanäle durch Interaktion mit dem  $\text{InsP}_3\text{R}$ , wobei sich die Interaktionsstellen auf TRPC3 für den  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Komplex und den  $\text{InsP}_3\text{R}$  überschneiden (Boulay et al., 1999; Kiselyov et al., 1998; Kiselyov et al., 1999; Zhang et al., 2001; Tang et al., 2001; Vazquez et al., 2001). Die funktionelle Relevanz dieser Protein-Protein-Wechselwirkung ist weiterhin umstritten, da auch in  $\text{InsP}_3\text{R}$ -defizienten DT40-Zellen (B-Lymphocyten des Huhns) eine Aktivierung von TRPC3 durch den endogenen B-Zell-Rezeptor beobachtet werden konnte (Venkatachalam et al., 2001). Die Mitglieder dieser Kanaluntergruppe werden u.a. in glatter Muskulatur, Gehirn, Herz und Lunge exprimiert (siehe Tabelle EI). Weitere Arbeiten zeigten, dass TRPC6 in glatten Gefäßmuskelzellen wahrscheinlich den nichtselektiven Kationenstrom nach Stimulation des  $\alpha 1$ -adrenergen Rezeptors vermittelt (Inoue et al., 2001) und in glatten Muskelzellen aus Ratten (A7r5-Zellen) beim rezeptorvermittelten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  involviert ist (Jung et al., 2002).

TRPC4 und TRPC5 bilden ebenfalls aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten eine weitere Kanaluntergruppe innerhalb der TRPC-Subfamilie. Die erste funktionelle Charakterisierung von heterolog exprimiertem bovinem TRPC4 ließ auf einen durch Speicherentleerung aktivierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Kationenkanal schließen (Warnat et al., 1999; Philipp et al., 1996; Philipp et al., 2000). Auch für TRPC5 wurde zunächst eine Aktivierbarkeit durch Speicherentleerung beschrieben (Philipp et al., 1998). In anderen Arbeiten konnten jedoch nicht-selektive Kationenströme in TRPC4- oder TRPC5-exprimierenden Zellen nach Stimulation  $\text{G}_q$ -koppelter Rezeptoren aufgezeigt werden (Okada et al., 1998; Obukhov und Nowycky, 2002;

Schaefer et al., 2000; Schaefer et al., 2002). Eine weitere Studie zeigte bei Expression von humanem TRPC4 in CHO-Zellen konstitutiv aktive Kationenströme (McKay et al., 2000). Mit Hilfe von Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung speichervermittelt regulierter Kanalkomplexe (SOCs) und die endotheliale Relaxation der Blutgefäße in der Abwesenheit von TRPC4 verändert sind (Freichel et al., 2001).

### **1.3. Das grün fluoreszierende Protein**

Das grün fluoreszierende Protein („green fluorescent protein“, GFP) wurde erstmals 1962 von Shimomura und Mitarbeitern entdeckt. Sie untersuchten Extrakte aus Quetschpräparaten der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* und isolierten daraus die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbare Oxoluciferase Aequorin sowie das daran assoziierte und nach UV-Bestrahlung grün fluoreszierende Protein (GFP). Kurz darauf wurde von der selben Arbeitsgruppe das Emissionsspektrum von GFP veröffentlicht (Johnson et al., 1962). Das Absorptionsspektrum und die Fluoreszenzquantenausbeuten des GFP sowie der strahlungslose Energietransfer zwischen Aequorin und GFP wurde dann 1974 von Morise und Mitarbeitern beschrieben. Nach weiterer Charakterisierung des GFP erfolgten die ausschlaggebenden Durchbrüche für die wissenschaftliche Bedeutung des GFP mit der Klonierung des *gfp*-Gens (Prasher et al., 1992) und seiner heterologen Expression (Chalfie et al., 1994; Inouye und Tsuji, 1994). Ab dieser Zeit wurde das GFP von Forschern genutzt, um in lebenden Zellen gentechnische Experimente wie die Genexpression, subzelluläre Lokalisation und Interaktion von Proteinen sowie Signalwege sichtbar zu machen.

Folgende Übersichtsartikel über das GFP und GFP-verwandte fluoreszierende Proteine und ihre wissenschaftliche Verwendung wurden für die Ausarbeitung verwendet: Cubitt et al., 1995; Tsien, 1998; Matz et al., 2002; Chudakov und Lukyanov, 2003; Miyawaki et al., 2003; Griesbeck, 2004; Zaccolo, 2004.

#### **1.3.1. Proteinstruktur und Fluoreszenzspektren**

GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat ein relatives Molekulargewicht von 26,9 kDa (Pendergast und Mann, 1978). Obwohl GFP 1974 bereits kristallisiert (Morise et al., 1974) und Beugungsbilder im Jahre 1988 veröffentlicht wurden (Perozzo et al., 1988), wurde die Röntgenstruktur des GFP erst 1996 unabhängig von zwei Arbeitsgruppen gelöst (Ormö et al.,

1996; Yang et al., 1996). GFP besteht aus einer sogenannten „ $\beta$ -Tonne“, die aus 11 antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut ist. Eine  $\alpha$ -Helix verläuft entlang seiner Achse in der Mitte des Zylinders. Das Chromophor befindet sich innerhalb der  $\alpha$ -Helix im Zentrum des Zylinders (Shimomura et al., 1979) und wird aus den Aminosäuren Ser-65, Tyr-66 und Gly-67 des nativen Proteins gebildet. Der zur Zeit angenommene autokatalytische Mechanismus besagt, dass nach einem nukleophilen Angriff der Aminogruppe des Gly-67 auf die Carbonylgruppe des Ser-65, einer Dehydratation und nachfolgenden Oxidation das Chromophor 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidinon entsteht (Heim et al., 1994). Die Fluoreszenzausbeute des wildtypischen GFP ist relativ gering, des weiteren neigt es zur Bildung von Homomultimeren (Ward et al., 1982). Zur Verbesserung des Expressionsniveaus und der Quantenausbeuten sowie zur Senkung der Proteinaggregation in Säugerzellen als auch zur Erweiterung des Farbspektrums wurden durch chemische Mutagenese vielfältige Farbvarianten des GFP erzeugt, deren Fluoreszenz von blau bis gelb reicht (Tsien, 1998; Patterson et al., 2001; Zhang et al., 2002). Hierzu gehören u.a. die gentechnisch verbesserten Varianten EBFP, ECFP, EGFP und EYFP („enhanced blue/cyan/green/yellow fluorescent protein“; Miyawaki et al., 1997; Yang et al., 1998).

### ***1.3.2. Nachweis der Proteinlokalisierung und -interaktion***

Da das GFP und dessen Varianten auch im heterologen Expressionssystem eine direkt sichtbare Fluoreszenz aufweisen und sich sowohl N- als auch C-terminal mit Proteinen koppeln lassen, ohne dabei ihre spektralen Eigenschaften zu verändern, können sie in lebenden Zellen für eine Vielzahl von experimentellen Anwendungen genutzt werden. Hierzu zählt zum einen die *in vivo*-Visualisierung von Proteinexpression und -lokalisierung. Erste Arbeiten sind hierzu bereits 1994 veröffentlicht worden (Chalfie et al., 1994; Wang und Hazelrigg, 1994). Durch Verknüpfung von GFP-Varianten mit entsprechenden Ziel- bzw. Signalsequenzen lassen sich auch subzelluläre Strukturen markieren (De Giorgi et al., 1996; Kalish et al., 1996; Shulga et al., 1996; Cole et al., 1996; Roderick et al., 1997; Wiemer et al., 1997; Llopis et al., 1998). Die Lokalisierung und Verfolgung eines zu charakterisierenden Proteins kann somit relativ zu intrazellulären Strukturen untersucht werden, wenn das betreffende Protein und die Struktur mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen markiert wurden (Lippincott-Schwartz et al., 2000). Die Grundlage für die Untersuchung von Proteininteraktionen mittels GFP-Varianten ist der Fluoreszenz-Resonanz-



Energietransfer (FRET). Als FRET wird der strahlungslose Energietransfer zwischen zwei Chromophoren bezeichnet. Dies ist nur dann möglich, wenn das Absorptionsspektrum des einen Fluorochroms (Donor) mit dem Emissionsspektrum des anderen Fluorochroms (Akzeptor) überlappt, und beide in genügend enger räumlicher Beziehung zueinander stehen (Förster et al., 1948; Stryer et al., 1978; siehe Methoden 3.4.3.). Die FRET-Effizienz ist erst unterhalb eines Abstands der Fluorochrome von ca. 10-12 nm nachweisbar, wobei die Radien der fluoreszierenden Proteine selbst bereits ca. 4,5-5 nm einnehmen. Somit lässt sich eine Interaktion von Proteinen in lebenden Zellen untersuchen, wenn die zwei betreffenden Proteine mit FRET-geeigneten GFP-Varianten gekoppelt wurden.

### ***1.3.3. Intrazelluläre pH- und [Cl<sup>-</sup>]-Messung mittels intrinsischer Eigenschaften der Fluorochrome***

Das GFP selbst und einige GFP-Mutanten weisen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber pH-Veränderungen auf (Ward et al., 1982; Llopis et al., 1998; Elsliger et al., 1999; Miyawaki et al., 1999; Matsuyama et al., 2000; Wachter et al., 2000), wobei sie sich in ihren pK<sub>a</sub>-Werten unterscheiden. Der Mechanismus hierfür ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit wäre der Verlust der Hydroxylgruppe am Threonin-203, was zu einer Destabilisierung der Phenolatform des Chromophors führt. Durch Fusion der Fluoreszenzproteine mit geeigneten Signalsequenzen konnte die pH-Sensitivität der Fluorochrome bereits für die Bestimmung des pH in verschiedenen Zellorganellen und -kompartimenten genutzt werden (Kneen et al., 1998; Llopis et al., 1998; Robey et al., 1998; Miesenböck et al., 1998).

Weiterhin wird die Fluoreszenz des YFP durch variierende Anionen-Konzentrationen wie F<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> und Cl<sup>-</sup> beeinflusst (Wachter und Remington, 1999; Jayaraman et al., 2000; Wachter et al., 2000). Die Sensitivität des YFP gegenüber diesen Anionen beruht auf ihrer Bindung nahe des Chromophors im Grundzustand (Jayaraman et al., 2000), was die Ionisationskonstante des Chromophors und somit den pK<sub>a</sub> und die Fluoreszenzemission beeinflusst. Die YFP-Mutante YFP-H148Q sowie ein Fusionsprotein aus ECFP und EYFP („Clomeleon“) wurden bereits für die Bestimmung intrazellulärer Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen genutzt (Jayaraman et al., 2000; Kuner und Augustine, 2000). Aufgrund der geringen Sensitivität des YFP-H148Q gegenüber Cl<sup>-</sup> (K<sub>d</sub> > 100 mM) wurden u.a. für die Bestimmung der Cl<sup>-</sup>-Konzentration in subzellulären Strukturen und

für die Beobachtung von Zelltransportprozessen GFP-Mutanten mit höherer Cl<sup>-</sup>-Sensitivität kloniert (Gaietta et al., 2001).

Da die pH- und Cl<sup>-</sup>-Sensitivität bei einigen Anwendungen der Fluoreszenzproteine, wie bei der FRET-basierten Ca<sup>2+</sup>-Messung (Miyawaki et al., 1997; Miyawaki et al., 1999), zu Störungen führen kann, wurden weitere GFP-Varianten wie das pH-resistente CGFP („cyan-green fluorescent protein“; Sawano und Miyawaki, 2000) und die Cl<sup>-</sup>-insensitiven GFP-Formen Citrine (Griesbeck et al., 2001) und Venus (Nagai et al., 2002) hergestellt.