

Berichte aus der Biologie

Inka Heiner

**Rolle und Regulation von Calcium-permeablen
Kationenkanälen der TRP Familie
in neutrophilen Granulozyten**

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag
Aachen 2003

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Heiner, Inka:

Rolle und Regulation von Calcium-permeablen Kationenkanälen der TRP
Familie in neutrophilen Granulozyten/Inka Heiner.

Aachen: Shaker, 2003

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2003

ISBN 3-8322-1798-3

Copyright Shaker Verlag 2003

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-1798-3

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Infektionen, da sie die ersten Zellen des unspezifischen Immunsystems sind, die zu einem Infektionsherd gelangen. Eine der charakteristischen Reaktionen bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten ist die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Diese wird durch die Bindung von chemotaktisch aktiven Substanzen wie dem Chemokin IL-8 oder dem Tripeptid fMLP an G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren ausgelöst. Über eine Signaltransduktionskette wird unter anderem die PLC aktiviert und der sekundäre Botenstoff IP_3 gebildet. IP_3 bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Die zweite Komponente, die zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beiträgt, ist der Influx von Ca^{2+} über die Plasmamembran. Die molekularen Grundlagen des Ca^{2+} -Influx sind neutrophilen Granulozyten, wie in den meisten elektrisch nicht erregbaren Zellen, bislang nicht ausreichend charakterisiert. Vertreter einer Genfamilie mit Homologie zu einem Gen aus *D. melanogaster*, dass in der *transient receptor potential* (trp) Mutante defekt ist, könnten eine Rolle bei der Vermittlung von Ca^{2+} -Influx spielen. Für die meisten TRP Mitglieder aus Säugern wurde gezeigt, dass sie Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle oder zumindest Untereinheiten dieser Kanäle codieren, deren Aktivierungs- und Regulationsmechanismen sowie die biophysikalischen Eigenschaften der resultierenden Ströme jedoch abhängig vom jeweiligen Expressionssystem äußerst variabel sein können.

Daher wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster der TRP Kanäle in neutrophilen Granulozyten und ihrem Zellkulturmodell HL-60 Zellen mit Hilfe einer RT-PCR Analyse untersucht. Dazu wurde die mRNA aus humanen neutrophilen Granulozyten, die durch Dichtegradienten Zentrifugation und mittels Magnet-gekoppelten anti-CD15 Antikörpern aus peripherem Blut gewonnen wurden, isoliert. Für folgende TRP Mitglieder wurden mRNA Transkripte in neutrophilen Granulozyten und in HL-60 Zellen nachgewiesen: LTRPC2, VR1, VRL1, ECaC1 und ECaC2. TRPC6 wurde ausschließlich in neutrophilen Granulozyten gefunden, wohingegen TRPC1, TRPC2, TRPC3, MLSN1 und MTR1 nur in HL-60 Zellen detektiert werden konnten.

Da die heterologe Überexpression von LTRPC2 zum Auftreten charakteristischer Ströme geführt hat, konnte in dieser Arbeit die funktionelle Expression dieses Kanals in neutrophilen Granulozyten durch die Demonstration von Strömen mit den gleichen regulatorischen und biophysikalischen Eigenschaften, wie sie in den transfizierten Zellen beschrieben wurden, nachgewiesen werden. Durch die intrazelluläre Gabe von ADPR und NAD wurden in *Patch-Clamp* Experimenten mit neutrophilen Granulozyten und HL-60 Zellen charakteristische Ströme induziert, und es konnten Einzelkanalereignisse aufgelöst werden, die identisch zu denen in LTRPC2-transfizierten Zellen waren. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit mit LTRPC2 in neutrophilen Granulozyten und HL-60 Zellen ein Ca^{2+} -permeabler Kationenkanal identifiziert, der als Eintrittsweg für die zur Zellaktivierung erforderlichen Ca^{2+} -Ionen dienen kann, und der während verschiedenen Stadien im Verlauf der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch seine unterschiedlichen Stimuli, ADPR, H_2O_2 und NAD, möglicherweise differentiell aktivierbar ist.