

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

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Inka Heiner

aus Fulda

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Andreas Lückhoff
Universitätsprofessor Dr. Fritz Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 2003

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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Heiner I., Eisfeld J., Halaszovich C. R., Wehage E., Jüngling E., Zitt C. and Lückhoff A. (2003). Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through LTRPC2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem. J.* **371**: 1045-1053

Heiner I., Eisfeld J. and Lückhoff A. (2003). Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell Calcium* **33**: 533-40

Wehage E., Eisfeld J., Heiner I., Jüngling E., Zitt C., and Lückhoff A. (2002). Activation of the Cation Channel Long Transient Receptor Potential Channel 2 (LTRPC2) by Hydrogen Peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* **277**: 23150-23156

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	CALCIUM ALS INTRAZELLULÄRER BOTENSTOFF.....	1
1.1.1	Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern.....	2
1.1.2	Calcium-Influx.....	3
1.2	DIE ROLLE VON CALCIUM BEI DER AKTIVIERUNG VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	4
1.2.1	Die Funktion der neutrophilen Granulozyten bei der unspezifischen Immunabwehr ..	5
1.2.2	Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in neutrophilen Granulozyten	7
1.3	CALCIUM-PERMEABLE KATIONENKANÄLE DER TRP FAMILIE	8
1.3.1	TRPC Subfamilie	10
1.3.2	TRPV Subfamilie	10
1.3.3	TRPM Subfamilie	11
2	ZIELE DER ARBEIT.....	14
3	MATERIAL UND METHODEN.....	16
3.1	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
3.2	OLIGONUKLEOTIDE	16
3.3	VEKTOREN.....	17
3.4	BAKTERIENSTÄMME.....	18
3.5	MEDIEN UND LÖSUNGEN	18
3.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	19
3.6.1	Kultivierung prokaryotischer Zellen	19
3.6.2	Herstellung elektrokompetenter E. coli.....	19
3.6.3	Elektroporation von E. coli	20
3.6.4	Transformation chemisch kompetenter E. coli.....	20
3.6.5	Isolierung von Plasmid-DNA	21
3.6.6	Restriktion von DNA.....	21
3.6.7	Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Agarosegelelektrophorese.....	21
3.6.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
3.6.9	DNA-Ligation	22
3.6.10	DNA-Sequenzierung	22
3.6.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
3.6.12	Präparation von RNA und mRNA-Isolierung.....	23

3.6.13	<i>DNase-Verdau</i>	24
3.6.14	<i>Reverse Transkription</i>	24
3.6.15	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	25
3.6.16	<i>Klonierung von PCR-Produkten</i>	25
3.7	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	26
3.7.1	<i>Kultivierung eukaryotischer Zelllinien</i>	26
3.7.2	<i>Differenzierung von HL-60 Zellen</i>	26
3.7.3	<i>Transfektion</i>	27
3.7.4	<i>Isolierung neutrophiler Granulozyten aus humanem Blut</i>	27
3.7.5	<i>Panoptische Färbung nach Pappenheim</i>	31
3.8	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN	31
3.9	MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN FREIEN CALCIUMKONZENTRATION	33
4	ERGEBNISSE	35
4.1	RT-PCR ANALYSE DES EXPRESSIONSMUSTERS VON TRP KANÄLEN IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN UND IN HL-60 ZELLEN	35
4.1.1	<i>Primer Auswahl und Etablieren der PCR-Bedingungen</i>	35
4.1.2	<i>Expressionsmuster von TRP Kanälen in humanen neutrophilen Granulozyten</i>	36
4.1.3	<i>Expressionsmuster von TRP Kanälen in HL-60 Zellen</i>	38
4.2	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON KATIONENSTRÖMEN IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN UND IN HL-60 ZELLEN	41
4.2.1	<i>Kationenströme in neutrophilen Granulozyten und HL-60 Zellen induziert durch ADPR und NAD</i>	41
4.2.2	<i>Einzelkanalereignisse in LTRPC2-transfizierten HEK 293 Zellen induziert durch ADPR</i>	45
4.2.3	<i>Einzelkanalereignisse in neutrophilen Granulozyten induziert durch ADPR und NAD</i>	46
4.2.4	<i>Speicherabhängige Calcium-selektive Ströme in HL-60 Zellen</i>	49
4.2.5	<i>Ionomycin-induzierte Ströme in HL-60 Zellen</i>	50
4.2.6	<i>Magnesium-Nukleotid-regulierte Ströme in neutrophilen Granulozyten</i>	52
4.2.7	<i>Charakteristische Stimuli für weitere TRP Kanäle, die in neutrophilen Granulozyten und in HL-60 Zellen keine Ströme induzieren</i>	54

5	DISKUSSION.....	55
5.1	EXPRESSION VON TRP KANÄLEN IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN UND IN HL-60 ZELLEN	55
5.2	LTRPC2 UND SEINE FUNKTION ALS CALCIUM-PERMEABLER KATIONENKANAL IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	60
5.2.1	<i>Wasserstoffperoxid und seine Relevanz als physiologischer Stimulus endogener LTRPC2 Kanäle in neutrophilen Granulozyten.....</i>	64
5.2.2	<i>Mögliche Rolle für ADPR als sekundärer Botenstoff, der LTRPC2 in neutrophilen Granulozyten aktiviert.....</i>	67
5.2.3	<i>Potentielle Aktivierungswege des LTRPC2 in neutrophilen Granulozyten</i>	68
5.3	SPEICHERABHÄNGIGER CALCIUM-INFLUX IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN...	71
5.4	STIMULI FÜR VR1 UND TRPC6 HABEN KEINEN EFFEKT AUF STRÖME IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	72
5.5	MÖGLICHE BEDEUTUNG DES LTRPC7 FÜR NEUTROPHILE GRANULOZYTEN ALS MAGNESIUM-NUKLEOTID-REGULIERTER KANAL	74
5.6	AUSBLICK.....	74
6	ZUSAMMENFASSUNG	77
7	LITERATURVERZEICHNIS	79