

Torben M. Rixecker

Dr. med.

Analyse der subzellulären Lokalisation des Transient Receptor Potential Channels M4 (TRPM4) vor und nach $Fc\epsilon$ -Rezeptor-I-Stimulation in primären peritonealen Mastzellen

Fach/Einrichtung: Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. Marc Freichel

TRP-Proteine regulieren als Ionenkanäle des endomembranösen Systems einer Zelle lokale Ca^{2+} -Signale und sind somit an verschiedensten Zellfunktionen beteiligt. TRPM4 ist dabei ein Ca^{2+} -aktivierter monovalenter Kationenkanal, der den transmembranären Ca^{2+} -Einstrom nach seiner Aktivierung über eine Veränderung des Membranpotentials beeinflusst. In Mastzellen führt der durch TRPM4 vermittelte Kationeneinstrom zu einer der initialen Hyperpolarisation entgegenwirkenden Depolarisation und damit zur Verminderung der Triebkraft des die Exozytose fördernden Ca^{2+} -Einstroms und zur Limitierung der Mastzellaktivierung. TRPM4 ist in Mastzellen demnach bislang als ein in der Plasmamembran wirkender Ionenkanal beschrieben. Dennoch gibt es Hinweise auf eine primär intrazelluläre Lokalisation des Proteins in anderen Zellsystemen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei virale Vektoren zur subzellulären Lokalisationsanalyse von TRPM4 hergestellt und die subzelluläre Lokalisation des viral exprimierten TRPM4-EYFP-Fluoreszenzproteins in primären peritonealen Mastzellen von Mäusen mittels Konfokalmikroskopie und Kollokalisationsanalysen u.a. mit Synaptobrevin2, einem in Mastzellen exprimierten vesikulären SNARE-Protein, untersucht. Dabei fiel neben der vornehmlich intrazellulären Lokalisation von TRPM4-EYFP eine signifikante Zunahme der Kollokalisation mit Synaptobrevin2 durch Koexpression beider Proteine in der Plasmamembran der Mastzellen bei Verwendung stärkerer Poly-L-Lysin-Beschichtungsprotokolle zur Adhäsion der Zellen auf. Schließlich wurde eine TRPM4-Translokation in die Plasmamembran unter starker Poly-L-Lysin-Exposition nachgewiesen. Poly-L-Lysin ist schon länger als starkes Mastzellstimulans bekannt, wird aber in niedrigen Konzentrationen üblicherweise zur Adhäsion dieser Zellen eingesetzt. Seine mastzellstimulatorische Eigenschaft beruht dabei ähnlich der von Compound 48/80 oder Anaphylatoxinen auf seinem polykationischen Charakter. Die Hypothese einer stimulationsbedingten Translokation von TRPM4 in die Plasmamembran konnte auch nach Allergenstimulation der Mastzellen bekräftigt werden. Hierbei zeigte sich eine signifikante

Zunahme der plasmamembranären TRPM4-EYFP-Fluoreszenz nach der durch $Fc\epsilon$ -Rezeptor-I ($Fc\epsilon$ RI) - Stimulation vermittelten Allergenexposition der Mastzellen.

Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Rekrutierung von TRPM4 Kanalproteinen aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran zur Wirkungsweise von TRPM4 als ein den Ca^{2+} -Einstrom limitierender Ionenkanal während der Mastzellstimulation beiträgt. Durch die Kinetik der Rekrutierung von TRPM4-Kanälen kann erklärt werden, warum bei Messungen des TRPM4-vermittelten Einwärtsstroms in Mastzellen bis zum Erreichen des Maximums eine Latenz von mehreren Minuten beobachtet wurde und warum TRPM4 bei anhaltender Zellstimulation vor einer Ca^{2+} -Überladung schützt, ohne den für die initiale Degranulation nötigen Ca^{2+} -Einstrom zu unterbinden.