



Universiteit
Leiden
The Netherlands

TRPM7, Calcium and the cytoskeleton

Langeslag, Michiel

Citation

Langeslag, M. (2006, October 11). *TRPM7, Calcium and the cytoskeleton*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4863>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4863>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Samenvatting

Ionen spelen een belangrijke rol in tal van cellulaire processen. Ze fungeren o.a. als regulatoren van enzymen of als zogenaamde ‘tweede boodschapper’: veranderingen in ion concentraties binnen de cel (intracellulair) worden geïnduceerd door stimulansen (zoals een hormoon) aan de buitenkant van de cel. Daarom houden cellen een strikt gereguleerde gradiënt van ionen over de plasma-membraan in stand. Natrium en kalium ionen zijn de belangrijkste ionen in het bepalen van de membraan potentiaal van cellen, terwijl calcium (Ca^{2+}) en magnesium (Mg^{2+}) ionen vele enzymen en cellulaire processen reguleren. De plasma-membraan is opgebouwd uit vetten en ionen kunnen deze barrière niet passeren. Zodoende hebben cellen gespecialiseerde ion transporters en kanalen geëvolueerd om de verdeling van ionen over de plasma-membraan te kunnen reguleren.

TRPM7 ion kanalen worden in elke type cel tot expressie gebracht en hebben een cruciale rol in de interne Mg^{2+} balans van cellen. Dit kanaal laat divalente ionen door, zoals Ca^{2+} en Mg^{2+} . Bovendien heeft het TRPM7 kanaal een unieke eigenschap: het bezit een intrinsiek α -kinase domein aan de C-terminus.

Het is bekend dat TRPM7 kanalen geactiveerd kunnen worden door depletie van intern Mg^{2+} en/of magnesium-nucleotiden in “whole-cell” patch-clamp experimenten (een methode waarbij de inhoud van een cel wordt gedialyseerd). Activatie van TRPM7 stromen door agonist-geïnduceerde ‘tweede boodschapper’ cascades was nog niet bekend. In **Hoofdstuk II** beschrijven we dat receptor gemedieerde signaal transductie in staat is om TRPM7 kanalen te activeren in intacte cellen. In wildtype N1E-115 neuroblastoma cellen veroorzaakt stimulatie van G-eiwit gekoppelde receptoren die fosfolipase C activeren een enkelvoudige Ca^{2+} verhoging vanuit het endoplasmatisch reticulum, zoals gemeten met fluorescente Ca^{2+} indicatoren. In cellen geïnficeerd door een virus met TRPM7 wordt deze Ca^{2+} transient gevolgd door een tweede, trage fase van Ca^{2+} verhoging die het resultaat is van Ca^{2+} influx door TRPM7 kanalen. Activatie van TRPM7 door PLC-activerende stimuli is ook te meten in “perforated-patch” experimenten (een meetmethode waarbij de inhoud van de cel intact blijft). In dit hoofdstuk laten we verder zien dat opening van TRPM7 specifiek is voor PLC-

gekoppelde stimuli: door gebruik te maken van een aantal verschillende fluorescente indicatoren (“FRET assays”) bepalen we dat er een zeer goede correlatie is tussen TRPM7 opening en PLC activatie, maar niet met andere boodschappers zoals cyclisch AMP en cyclisch GMP.

Het hierboven beschreven resultaat is in tegenstelling met resultaten van andere groepen die beschreven dat activatie van PLC juist leidt tot sluiting van TRPM7 in de zogeheten ‘whole-cell’ patch clamp configuratie. In **Hoofdstuk III** gaan we verder in op deze paradox. We tonen aan dat het verschil is terug te leiden tot een verschil in de meetmethode. Wij gebruiken minimaal invasieve methoden zoals Ca^{2+} metingen en perforated patch clamping, die het normale functioneren van de cel intact laten. We laten zien dat het remmend effect van PLC alleen gevonden wordt in whole-cell metingen waarbij de intracellulaire Mg^{2+} concentratie arteficieel laag wordt gehouden. Om dit overtuigend aan te tonen hebben we een methode ontwikkeld om ook in perforated patches de intracellulaire Mg^{2+} concentratie te kunnen verlagen: voorbehandeling met een membraan permeabele Mg^{2+} buffer. De aldus geïnduceerde stromen zijn biofysisch en farmacologisch identiek aan de TRPM7 stromen in whole-cell geactiveerd door Mg^{2+} depletie. De data uit dat hoofdstuk laten verder zien dat het langzaam verloren gaan van het membraan lipide PIP2 waarschijnlijk ten grondslag ligt aan het arteficiële whole-cell resultaat.

De milde overexpressie van TRPM7 in neuroblastoma cellen induceert spreiding van cellen, versterkte adhesie van cellen en de formatie van focale adhesie structuren. In **Hoofdstuk IV** laten we zien dat al deze kenmerken worden versterkt na PLC gemedieerde TRPM7 activatie. Het onderliggende mechanisme is een Ca^{2+} - en kinase-afhankelijke associatie met het actomyosine cytoskelet. Deze associatie van het kinase domein en het cytoskelet resulteert in fosforylering van Myosine IIA en verlaagd daardoor de spanning van het actomyosine cytoskelet. Bovendien worden er podosomen gevormd, zowel *de novo* als uit bestaande ‘focal adhesion’ structuren. TRPM7 reguleert dus cel adhesie door de contractiliteit van het actomyosine cytoskelet te veranderen.

In **Hoofdstuk V**, ten slotte, beschrijven we een tweede, Ca^{2+} -afhankelijk, signaal dat het actine cytoskelet beïnvloedt. In prostaat carcinoma cellen leidt verhoging van de intracellulaire Ca^{2+} concentratie, hetzij door receptor stimulatie hetzij met farmacologische methoden, tot activatie van het kleine G-eiwit Rac. Dit eiwit veroorzaakt uitgroei van zogeheden lamellipodia: dynamische,

platte structuren in de membraan die veel actine bevatten. De experimenten beschreven in dit hoofdstuk laten zien dat Ca^{2+} verhoging een kinase (een zogeheten conventionele PKC) geactiveert dat een activator van RAC (RhoGDI α) fosforyleert waardoor Rac naar de plasma membraan transloceert.

We concluderen dat TRPM7, dat een ion kanaal en kinase combineert, het cytoskelet op meerdere manieren beïnvloed.