

Elektrophysiologische
Charakterisierung von TRPM3
Ionenkanälen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

der Doktorin der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von

Sabine Petra Loch

Saarbrücken

2007

Tag des Kolloquiums:

14.12.2007

Dekan:

Prof. Dr. U. Müller

Berichterstatter:

Prof. Dr. V. Flockerzi

Prof. Dr. R.W. Hartmann

Für meine Familie

Lernen ist wie Rudern gegen den Strom,

hört man einmal auf, so treibt man zurück.

(Unbekannt)

Zusammenfassung

Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die in den Zellmembranen nur für bestimmte Ionen durchlässige Poren bilden. Für das Verständnis der physiologischen Funktion eines Ionenkanals ist die Kenntnis seiner Aktivierungs- und Regulationsmechanismen sowie seiner Selektivitätseigenschaften von grundlegender Bedeutung. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden diese Eigenschaften des Kationenkanals TRPM3 elektrophysiologisch untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine bestimmte Spleißvariante des TRPM3-Kanals durch die Neurosteroiden Pregnenolonsulfat, Pregnenolon, DHEA und DHEA-Sulfat sowie den L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker Nifedipin in mikromolaren Konzentrationen aktiviert wird. Dabei aktivieren Neurosteroiden TRPM3 ausschließlich von der extrazellulären Seite her, binden an eine von Nifedipin abweichende Bindungsstelle und beeinflussen die Eigenschaften des Selektivitätsfilters von TRPM3 nur geringfügig. Weiterhin zeigen die Daten, dass die steroid-aktivierten Kanäle eine hohe Permeabilität für divalente Kationen, insbesondere für Ca^{2+} und Zn^{2+} , aufweisen. Unter physiologischen Bedingungen werden ca. 24% des Stromes durch TRPM3-Kanäle von Ca^{2+} getragen. Weiterhin wird die Aktivität der TRPM3-Kanäle durch verschiedenste intra- und extrazelluläre Kationen beeinflusst. Die hier dargestellten biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften von TRPM3 bilden das Fundament für die zukünftige Identifizierung endogener TRPM3-Kanäle und für die Aufklärung ihrer physiologischen Funktion.

Summary

Ion channels are transmembrane proteins that provide pathways for the movement of ions across cellular membranes. In order to understand the physiological function of an ion channel, the mechanisms of its activation and regulation as well as its selectivity must be known. In the present study, these properties were investigated electrophysiologically for TRPM3 cation channels. A specific splice variant of TRPM3 can be activated with micromolar concentrations of the neurosteroids pregnenolone sulfate, pregnenolone, DHEA and DHEA sulfate as well as the L-type Ca^{2+} channel blocker nifedipine. However, neurosteroids activate TRPM3 channels exclusively from the extracellular side, bind to TRPM3 at a location different from the nifedipine binding site and have only minor effects on the properties of the selectivity filter of TRPM3. The data also show that TRPM3 channels are highly permeable for divalent cations, especially for Ca^{2+} and Zn^{2+} . Approximately 24% of the current through TRPM3 channels is carried by Ca^{2+} under physiological conditions. Moreover, the activity of TRPM3 channels is influenced by various intra- and extracellular cations. The biophysiological and pharmacological properties of TRPM3 channels determined in this thesis provide the basis for future studies trying to identify endogenous TRPM3 channels and to elucidate their physiological functions.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Ionenkanäle	1
1.2 Die TRP-Protein-Familie	2
1.2.1 TRPM3	5
1.2.2 Die TRPC-Unterfamilie	8
1.2.3 Die TRPV-Unterfamilie	9
1.2.4 Die TRPM-Unterfamilie	11
1.3 Neurosteroidoide	16
1.4 1,4-Dihydropyridine	18
2 Fragestellung	20
3 Materialien und Methoden	21
3.1 Materialien	21
3.1.1 Chemikalien	21
3.1.2 Lösungen	21
3.1.3 Zellmedien und Zellmedienzusätze	22
3.1.4 Zelllinien	22
3.1.5 cDNAs	23
3.2 Methoden	23
3.2.1 Zellkultur und Zelltransfektion	23
3.2.2 Patch-clamp-Technik	25
3.2.3 Auswertung und Statistik	27
4 Aktivierung von TRPM3	28
4.1 Zusammenfassung	28

4.2	Einleitung	29
4.3	Materialien und Methoden	31
4.3.1	Materialien	31
4.3.2	Methoden	32
4.4	Ergebnisse	35
4.5	Diskussion	47
5	Permeabilität und Selektivität von TRPM3	54
5.1	Zusammenfassung	54
5.2	Einleitung	55
5.3	Materialien und Methoden	56
5.3.1	Materialien	56
5.3.2	Methoden	60
5.4	Ergebnisse	62
5.5	Diskussion	70
6	Interaktionen zwischen Kationen in der TRPM3-Pore	78
6.1	Zusammenfassung	78
6.2	Einleitung	79
6.3	Materialien und Methoden	80
6.3.1	Materialien	80
6.3.2	Methoden	85
6.4	Ergebnisse	94
6.5	Diskussion	106
7	Regulation der TRPM3 Kanalaktivität durch Kationen	110
7.1	Zusammenfassung	110
7.2	Einleitung	111
7.3	Materialien und Methoden	113
7.3.1	Materialien	113
7.3.2	Methoden	118
7.4	Ergebnisse	121
7.5	Diskussion	131
8	Literaturverzeichnis	137

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
A ⁺	Ammonium-Ion
ADP	Adenosindiphosphat
Allopreg	Allopregnanolon
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-propionsäure
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
ASIC	Acid Sensing Ion Channel
Asp ⁻	Aspartat-Ion
ATP	Adenosintriphosphat
Ba ²⁺	Barium-Ion
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
bzw.	beziehungsweise
C	Coulomb
Ca ²⁺	Calcium-Ion
Cd ²⁺	Cadmium-Ion
CD38	Cluster of Differentiation 38
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CNG	Cyclic Nucleotide Gated
Co ²⁺	Cobald-Ion
Cort	Corticosteron
Cs ⁺	Cäsium-Ion
CsCl	Cäsiumchlorid
d	Durchmesser
DAG	Diacylglycerol
d.h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMA ⁺	Dimethylammonium-Ion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	Dorsal Root Ganglion
EC ₅₀	effektive Konzentration, die zu einer 50%igen Aktivierung des Ionenkanals führt

EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
5',6'-EET	5',6'-Epoxyeicosatriensäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E_{rev}	Umkehrpotential
Est	Estradiol
F	Faraday Konstante
ΔF	Fluoreszenzintensitätsänderung
$^{\circ}C$	Grad Celsius
g	Gramm
G	Leitfähigkeit
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gd^{3+}	Gadolinium-Ion
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz
Glu	Glutamat
h	Hillkoeffizient
HCN	Hyperpolarisation activated Cyclic Nucleotide gated
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HSH	Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie
5-HT	5-Hydroxytryptamin bzw. Serotonin
IC_{50}	effektive Konzentration, die zu einer 50%igen Hemmung des Ionenkanals führt
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
J	Joule
K	Kelvin
K^+	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
kHz	Kiloherz
La^{3+}	Lanthan-Ion
Li^+	Lithium-Ion
M	Menthol
MagNum	Magnesium Nucleotide regulated Metal current

max	Maximum
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgATP	Magnesiumadenosintriphosphat
MIC	Magnesium Inhibited Current
min	Minute
ml	Milliliter
μm	Mikrometer
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
MMA ⁺	Monomethylammonium-Ion
Mn ²⁺	Mangan-Ion
mosmol	Milliosmol
ms	Millisekunde
μs	Mikrosekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl
nA	Nanoampere
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
$\beta\text{-NAD}$	β -Nicotinamidadenindinukleotid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nC	Nanocoulomb
ng	Nanogramm
NH ₄ ⁺	Ammonium-Ion
Ni ²⁺	Nickel-Ion
Nic	Nicardipin
Nif	Nifedipin
Nim	Nimodipin
Nit	Nitrendipin
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDG ⁺	N-Methyl-D-Glucamin-Ion

O ₂	Sauerstoff
PAORAC	Proton Activated Outwardly Rectifying Anion Current
PBS	Phosphate Buffered Saline
4 α -PDD	4 α -Phorbol-12,13-didecanoat
Pf	fraktioneller Calciumstrom
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PIP ₂	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
Preg	Pregnenolon
pS	Pikosiemens
PS	Pregnenolonsulfat
Prog	Progesteron
R	allgemeine Gaskonstante
RBL	Rat Basophilic Leukemia
RR	Rutheniumrot
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean
SERCA-ATPase	Sarkoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase
Sr ²⁺	Strontium-Ion
T	Temperatur
TeMA ⁺	Tetramethylammonium-Ion
3 α , 5 α -THDOC	3 α , 5 α -Tetrahydrodesoxycorticosteron
3 α , 5 α -THP	3 α , 5 α -Tetrahydroprogesteron
3 α , 5 β -THP	3 α , 5 β -Tetrahydroprogesteron
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	α , α , α -Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrMA ⁺	Trimethylammonium-Ion
TRP	Transient Receptor Potential
u.a.	unter anderem
V	Volt
vgl.	vergleiche
Zn ²⁺	Zink-Ion
Zn(OH) ₂	Zinkhydroxid
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind transmembranäre Proteine bzw. Proteinkomplexe, die ionendurchlässige Poren bilden und so das Einströmen von Ionen in die Zelle bzw. das Ausströmen von Ionen aus der Zelle entlang eines elektrochemischen Gradienten ermöglichen [69].

Ionenkanäle spielen eine herausragende Rolle bei der zellulären Signalverarbeitung [69]. Sie ermöglichen die Kommunikation der Zellen untereinander, vermitteln und regulieren die elektrische Erregbarkeit der Zellen und sind notwendig für so wichtige Vorgänge wie Zellvolumenregulation, Zellproliferation und Zelltod, Muskelkontraktion, Blutdruckregulation, Neurotransmitter- und Hormonsekretion [5, 69].

Ionenkanäle können anhand ihres Aktivierungsmechanismus in spannungsgesteuerte („voltage-operated channels“) und ligandengesteuerte („ligand-operated channels“) Ionenkanäle unterteilt werden [69]. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle verfügen über einen Spannungssensor, der auf Veränderungen in der Membranspannung mit einer Konformationsänderung reagiert und zur Öffnung des spannungsgesteuerten Ionenkanals führt. Zwischen spannungsgesteuerten Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen kann hierbei unterschieden werden [69]. Ligandengesteuerte Ionenkanäle verfügen über spezifische Liganden-Bindungsstellen, die sowohl extra- als auch intrazellulär gelegen sein können. Verschiedenste exogene und endogene Liganden (Neurotransmitter, Lipide und Produkte des Lipidstoffwechsels, Nucleotide und deren Metaboliten, anorganische Kationen, Protonen, natürliche und synthetische organische Produkte) führen nach Bindung an diese spezifischen Bindungsstellen zu einer Konformationsänderung des ligandengesteuerten Ionenkanals und zu dessen Öffnung [69]. Neben den spannungsgesteuerten und ligandengesteuerten Ionenkanälen existieren auch noch Ionenkanäle, die direkt durch mechanische Reize geöffnet werden. Diese Ionenkanäle werden zu den mechanosensitiven Ionenkanälen gezählt [64, 172, 173].

Auch eine Einteilung der Ionenkanäle anhand ihres Selektivitätsverhaltens in selektive und nichtselektive Ionenkanäle ist möglich [27]. Selektive Ionenkanäle sind für ein bestimmtes Ion wie beispielsweise Na^+ , K^+ oder Ca^{2+} weitestgehend selektiv permeabel. Nichtselektive Ionenkanäle sind dagegen für mehrere Ionen permeabel.

Die Selektivität eines Ionenkanals wird unter anderem durch den Durchmesser der Kanalpore und durch die Ladungsverteilung in der Kanalpore bestimmt. Die Selektivität eines Ionenkanals kommt hierbei folgendermaßen zustande: Beim Durchtritt durch die Kanalpore müssen die Ionen, die in wässriger Lösung von einer Hydrathülle umgeben sind, diese teilweise oder ganz abstreifen. Um den mit dem Abstreifen der Hydrathülle verbundenen Energieaufwand zu kompensieren, müssen die Wechselwirkungen der Ionen

mit den Wassermolekülen durch ähnlich artige, energetisch günstige Wechselwirkungen mit der Kanalpore ersetzt werden. Die Wechselwirkungen dürfen hierbei nicht zu stark sein, da die Verweildauer der Ionen in der Pore ansonsten zu lange wäre und dadurch die hohen Durchflussraten der Ionenkanäle von 10^4 - 10^8 Ionen pro Sekunde nicht zustande kämen. Bei selektiven K^+ -Kanälen übernehmen Carbonylsauerstoffe des Peptidrückgrates [27] und bei selektiven Ca^{2+} -Kanälen Carboxylsauerstoffe der Peptidseitenketten [158] diese Funktion. Sie bilden den sogenannten Selektivitätsfilter des Ionenkanals aus. Ist nun die energetische Kompensation d.h. die Imitierung der Hydrathülle durch die Carbonyl- bzw. Carboxylsauerstoffe im Selektivitätsfilter für ein bestimmtes Ion optimaler als für ein anderes, wird dieses bevorzugt Wechselwirkungen mit diesen eingehen und den Ionenkanal bevorzugt permeieren [55]. Die hohen Durchflussraten der Ionenkanäle von 10^4 - 10^8 Ionen pro Sekunde, die trotz dieser hohen Selektivitäten erzielt werden, lassen sich allerdings nicht mit einer einzigen Ionenbindungsstelle in der Pore erklären. Aufgründessen wird angenommen, dass mehrere Ionenbindungsstellen in den Poren der Ionenkanäle existieren. Besetzt das für einen Ionenkanal selektiv permeable Ion eine Ionenbindungsstelle in der Pore, so blockiert es die Passage der anderen Ionen. Erst wenn eine zweite Bindungsstelle in der Pore durch ein weiteres für den Ionenkanal permeables Ion besetzt wird, kann dieses Ion durch die auftretende elektrostatische Abstoßung die Interaktion mit der Ionenbindungsstelle überwinden und den Ionenkanal verlassen. Im Falle von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen konnte mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese allerdings nur eine hochaffine Ca^{2+} -Bindungsstelle identifiziert werden. Diese wird durch einen Ring von vier Glutamateresten gebildet [158]. Aufgründessen wurden Modelle entwickelt, bei denen diese hochaffine Ca^{2+} -Bindungsstelle zusätzlich noch von zwei schwachaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen umgeben ist. [27, 158]

Eine sehr heterogene Familie von Kationenkanälen, deren Mitglieder sich sowohl in ihren Aktivierungsmechanismen als auch in ihren Permeations- und Selektivitätseigenschaften stark voneinander unterscheiden, bildet die TRP-Proteinfamilie, die nun in den folgenden Abschnitten vorgestellt wird.

1.2 Die TRP-Protein-Familie

Die Bezeichnung TRP leitet sich von einer *Drosophila*-Mutante ab, die auf einen anhaltenden Lichtreiz hin im Gegensatz zum Wildtypen in ihren Photorezeptorzellen nur ein transientes Rezeptorpotential aufbaut [28]. Diese Mutante ist in einem Gen defizient, das aufgrund des Phänotyps auch als „transient receptor potential“ kurz „trp“ Gen bezeichnet wird [113, 117]. Entscheidende Hinweise, dass dieses Gen für einen Ca^{2+} -Kanal bzw.

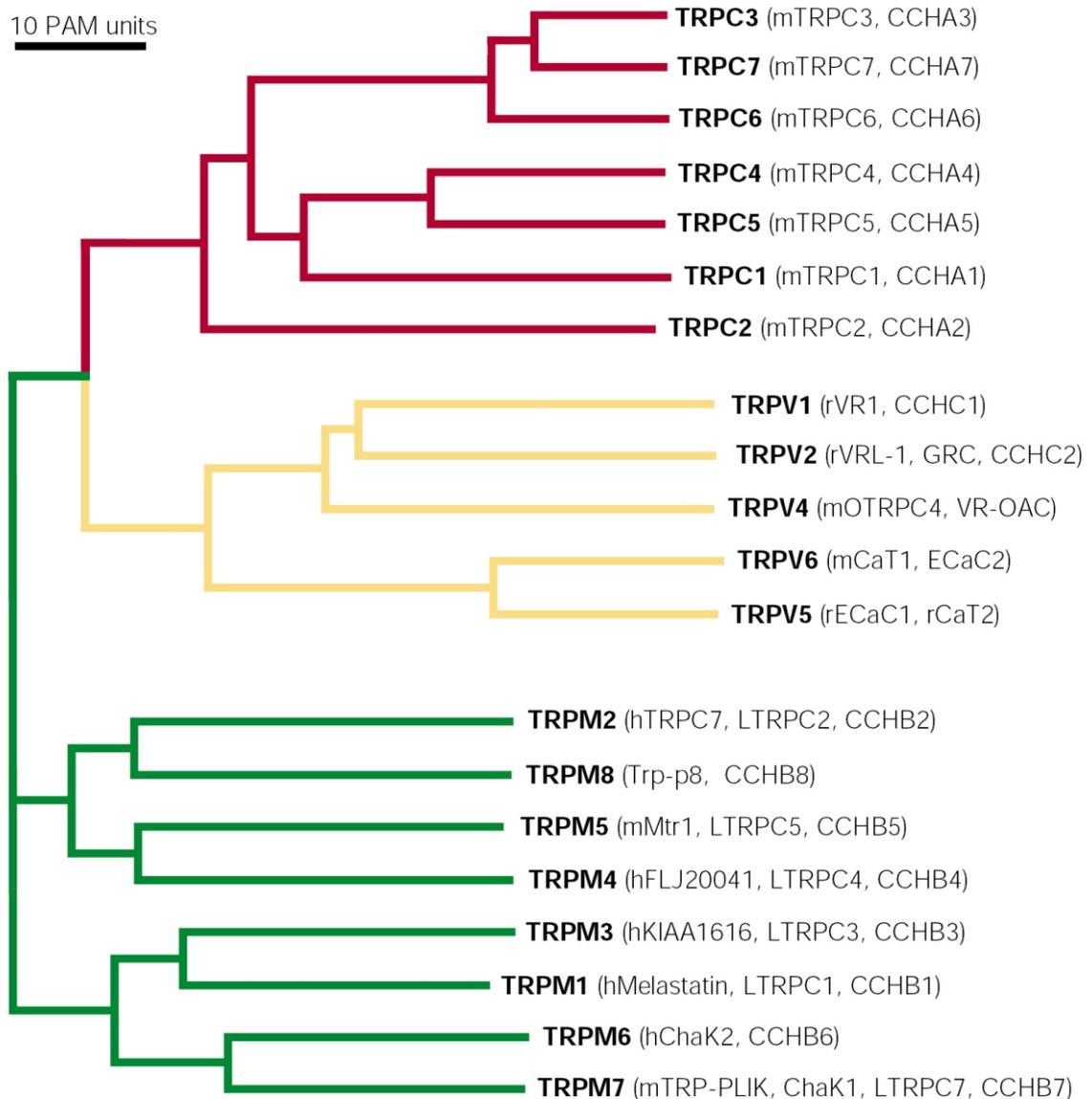


Abb. 1.1: Phylogenetischer Überblick über die Mitglieder der TRPC-, TRPV- und TRPM-Proteinfamilie in Säugetieren. Abbildung übernommen aus Clapham et al., 2001[24].

einen Ca^{2+} -Transporter kodiert, lieferten im folgenden die Entdeckungen, dass der Phänotyp durch eine um den Faktor 10 reduzierte Ca^{2+} -Permeabilität der Plasmamembran bedingt [67] und durch Lanthan, einen unspezifischen Ca^{2+} -Kanalb blocker, sowie Ca^{2+} -Entzug nachgeahmt wird [72]. Auch wurden bei der Reanalyse der Proteinsequenz Homologien zu spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen aufgedeckt [141].

Nach der Entdeckung des TRP-Proteins in *Drosophila melanogaster* begann eine intensive Suche nach homologen Proteinen in anderen Spezies. Vertreter wurden hierbei in einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen wie Würmern, Fliegen und Säugetieren ent-

deckt [118]. Die TRP-Protein-Familie in Säugetieren umfasst derzeit 28 Mitglieder [25, 150]. Diese werden aufgrund von Sequenzhomologien in die folgenden sechs Unterfamilien unterteilt [24]: TRPC-Unterfamilie (classical, canonical), TRPV-Unterfamilie (vanilloid), TRPM-Unterfamilie (melastatin), TRPA-Unterfamilie (ankyrin), TRPP-Unterfamilie (polycystin) und TRPML-Unterfamilie (mucolipin). Daneben existiert noch eine weitere TRP-Unterfamilie, die TRPN-Unterfamilie, von der aber bislang noch kein Vertreter in Säugetiergenomen identifiziert wurde [116].

Allen TRP-Proteinen gemeinsam ist ihr Aufbau aus sechs mutmaßlichen Transmembrandomänen (S1-S6), die über intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die Schleife zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne scheint dagegen membranständig und an der Ausbildung der Kanalpore beteiligt zu sein [25, 132]. In Analogie zu den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen sowie HCN- und CNG-Kanälen wird angenommen, dass sich vier TRP-Proteine zu einem funktionsfähigen Kanal zusammenlagern. Eine Tetramerisierung sowohl von identischen (Homomultimere) als auch nichtidentischen (Heteromultimere) TRP-Protein-Untereinheiten ist hierbei möglich [160]. Der N- und der C-Terminus der TRP-Proteine sind jeweils cytosolisch gelegen und differieren im Gegensatz zu den Transmembrandomänen stark zwischen den einzelnen Unterfamilien. Sogenannte Ankyrin-Repeats - 33 Aminosäurereste lange, zu einer β - α - α - β -Struktur gefaltete Sequenzen - finden sich im N-Terminus von TRPC- (3-4) und TRPV-Proteinen (3-5), fehlen jedoch bei TRPM-Proteinen. Sie spielen vermutlich eine Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen [42, 99]. Der C-Terminus der TRP-Proteine ist sehr variabel und zeigt einige weitere interessante Strukturmerkmale. TRPC-Proteine besitzen neben IP_3 -Rezeptor- und Calmodulin-Bindungsmotiven auch noch nahe der sechsten Transmembrandomäne das Aminosäuremotiv EWKFAR, auch TRP-Motiv genannt, das auch in TRPM- und TRPV-Proteinen konserviert ist. Eine sich an dieses TRP-Motiv anschließende prolinreiche Region findet sich dagegen nur bei TRPC- und TRPM-Proteinen wieder. Ihre Funktion ist noch ungeklärt. TRPM-Proteine weisen im C-Terminus zudem noch eine coiled-coil-Domäne auf, die zumindest bei TRPM8 eine Rolle bei der Zusammenlagerung der Kanaluntereinheiten spielt [41, 181]. Auch der N-Terminus von TRPC-Proteinen weist eine solche coiled-coil-Domäne auf. Drei Mitglieder der TRP-Proteinfamilie - TRPC4, TRPC5 und TRPV3 - besitzen desweiteren noch eine PDZ-Domäne im C-Terminus und sind folglich vermutlich Teil eines multimolekularen Signalkomplexes [25]. Der Name PDZ setzt sich aus den Namen von drei Proteinen, die eine solche 90 Aminosäurereste lange Domäne enthalten, zusammen (PSD95, Drosophila discs-large tumor suppressor protein, Zo-1).

Alle Mitglieder der TRP-Proteinfamilie bilden Kationenkanäle aus. Mit Ausnahme von TRPM4 und TRPM5, die ausschließlich für monovalente Kationen permeabel sind, stel-

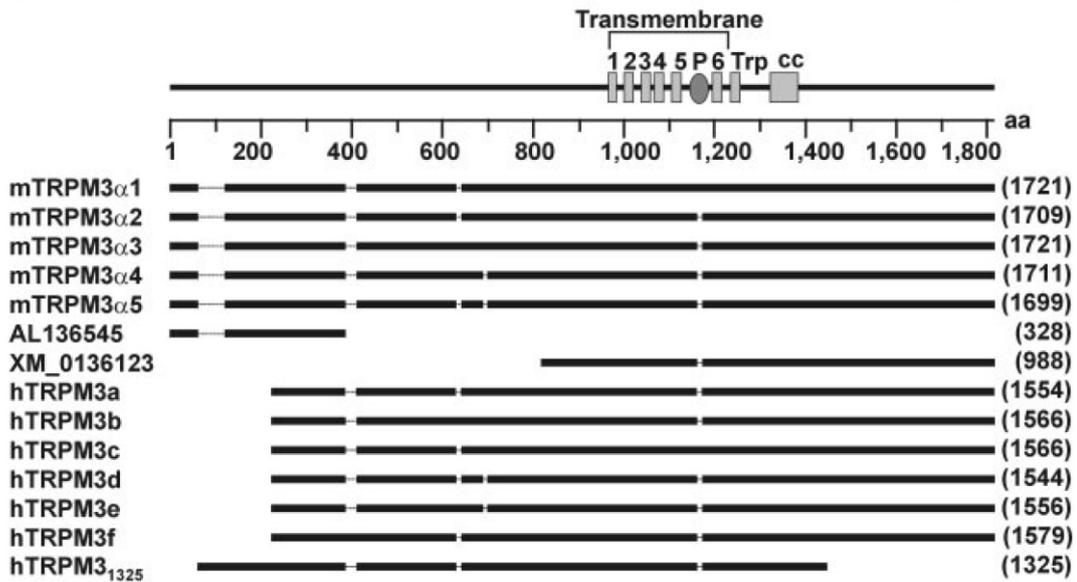


Abb. 1.2: Überblick über die humanen und murinen Spleißvarianten von TRPM3. Abbildung übernommen aus Oberwinkler et al., 2005 [129].

len sie divalent permeable Kationenkanäle dar, die in einem unterschiedlichen Maß für Ca^{2+} permeabel sind ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} = 0,1$ bis > 100 [132]). Auch TRPM3, der in der vorliegenden Promotionsarbeit elektrophysiologisch charakterisiert wurde, bildet einen Ca^{2+} -permeablen Kationenkanal aus. Der nachfolgende Abschnitt fasst die wichtigsten Ergebnisse der bislang über TRPM3 veröffentlichten Studien zusammen.

1.2.1 TRPM3

TRPM3 zählt neben TRPM1 zu den bislang am schlechtesten charakterisierten Mitgliedern der gesamten TRP-Proteinfamilie. Auch weist er die größte bisher für einen TRP-Kanal beschriebene Anzahl an Spleißvarianten auf. Neben fünf murinen Spleißvarianten (TRPM3 α 1-5 [129]) sind noch sieben humane Spleißvarianten (TRPM3a-f [97], TRPM3 [59]) bekannt (siehe Abbildung 1.2). Die fünf murinen Spleißvarianten sind zwischen 1699-1721 Aminosäuren lang und unterscheiden sich ausschließlich durch die Ab- bzw. Anwesenheit von vier 10-25 Aminosäure langen Sequenzen innerhalb des N-Terminus und der mutmaßlichen Porenregion. Die sechs von Lee et al. klonierten, humanen Spleißvarianten - TRPM3a-f - besitzen im Vergleich zu den murinen Spleißvarianten einen um 155 Aminosäuren verkürzten N-Terminus und haben eine Länge von 1544-1579 Aminosäuren. Die von Grimm et al. klonierte, humane Spleißvariante TRPM3 besitzt neben einem veränderten N-Terminus auch noch einen um ca. 350 Aminosäuren verkürzten C-Terminus und ist nur 1325 Aminosäuren lang. Im folgenden wird diese Spleißvariante zur besseren

Abgrenzung von den übrigen Spleißvarianten als TRPM3₁₃₂₅-Spleißvariante bezeichnet. Wie auch die murinen Spleißvarianten unterscheiden sich die humanen Spleißvarianten untereinander durch die Ab- bzw. Anwesenheit von vier 10-25 Aminosäuren langen Sequenzen innerhalb des N-Terminus und der mutmaßlichen Porenregion [130]. Von den sieben humanen Spleißvarianten wurden bislang nur die TRPM3a-Spleißvariante und die TRPM3₁₃₂₅-Spleißvariante funktionell charakterisiert. Erstere führte nach heterologer Expression in HEK293-Zellen, deren Ca²⁺-Speicher durch unterschiedliche Vorbehandlungen (Hemmung der SERCA-ATPase mit Thapsigargin, Stimulation der Muskarinrezeptoren mit Carbachol, Entzug des extrazellulären Ca²⁺) entleert wurden, zu einem konstitutiven, Ca²⁺-abhängigen Ca²⁺-Einstrom, der durch 100 μM Gd³⁺ partiell hemmbar war [97]. Die TRPM3₁₃₂₅-Spleißvariante bildete nach heterologer Expression in HEK293-Zellen ebenfalls einen konstitutiv aktiven Kationenkanal aus. Die konstitutive Aktivität wurde in Ca²⁺-Imaging-Experimenten in Form eines konstitutiven Ca²⁺-Einstroms und in Mn²⁺-Quench-Experimenten in Form eines konstitutiven Mn²⁺-Einstroms nachgewiesen [59]. Der Mn²⁺-Einstrom war hierbei durch 100 μM Gd³⁺ und 100 μM La³⁺, nicht jedoch durch SK&F96325 hemmbar. Konstitutive Ströme waren auch in Patch-clamp-Experimenten messbar, wobei sie keine klare Rektifizierung zeigten. Die ebenfalls bestimmte Einzelkanalleitfähigkeit war nur geringfügig abhängig vom Membranpotential, sehr wohl aber von der extrazellulären Kationenspezies und lag für 140 mM Cs⁺ bei 133 pS, für 140 mM Na⁺ bei 83 pS und für 100 mM Ca²⁺ bei 65 pS [59]. Unterschiedliche zur Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher führende Vorbehandlungen (Hemmung der SERCA-ATPase mit Thapsigargin, Stimulation der Muskarinrezeptoren mit Carbachol, Stimulation der Histaminrezeptoren mit Histamin) zeigten hier keinen Effekt. Extrazellulär applizierte hypoosmotische Lösungen, die mit einer Zellschwellung einhergehen, führten jedoch zur Aktivierung der TRPM3₁₃₂₅-Spleißvariante [59]. In Ca²⁺-Imaging-Experimenten war mit Applikation einer hypoosmotischen Lösung (200 mosm) eine Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, die nicht durch 1 μM Rutheniumrot beeinflusst wurde, und mit Applikation einer hyperosmotischen Lösung eine Abnahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beobachtbar. Hypotonizitätsaktivierte Ströme waren in Patch-clamp-Experimenten nur in der perforated-Patch-Konfiguration, nicht jedoch in der whole-cell-Konfiguration nachweisbar, wobei weniger als 50% der Zellen eine Antwort auf die hypoosmotische Lösung zeigten [59]. Zusätzlich führte auch noch extrazellulär appliziertes D-Erythro-Sphingosin zur Aktivierung der TRPM3₁₃₂₅-Spleißvariante [58]. In Ca²⁺-Imaging-Experimenten war mit Applikation von D-Erythro-Sphingosin eine Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beobachtbar. Der Effekt war spezifisch für TRPM3, dosisabhängig (EC₅₀ = 12 μM) und erst nach einer Latenzzeit von 20-30 Sekunden zu beobachten. Ca²⁺-Speicher und IP₃-Rezeptoren scheinen in den Effekt

nicht involviert zu sein. Auch scheint er unabhängig von der Aktivität der Proteinkinase C zu sein. Neben D-Erythro-Sphingosin führten auch Dihydro-D-Erythro-Sphingosin und N,N-Dimethyl-D-Erythro-Sphingosin zu einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Sphingosin-1-P, Ceramide sowie verschiedenste Metaboliten des Phospholipase C- und Phospholipase A₂-Weges waren dagegen unwirksam. D-Erythro-Sphingosin-induzierte Ströme zeigten in Patch-clamp-Experimenten eine schwache Spannungsabhängigkeit, eine schwache Auswärtsrektifizierung und wurden sowohl durch monovalente als auch divalente Kationen getragen. Die Stromgrößen waren im Vergleich zu der hohen, unter gleichen Messbedingungen gemessenen Einzelkanalleitfähigkeit von 73 pS nur sehr klein (< 250 nA bei -80 mV) [58]. Von den murinen Spleißvarianten wurden bislang nur die TRPM3 α 1- und TRPM3 α 2-Spleißvariante funktionell charakterisiert. Beide Spleißvarianten unterscheiden sich ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne voneinander. Bei TRPM3 α 2 ist hier eine 12 Aminosäuren lange Sequenz deletiert und ein Alanin durch Prolin substituiert. Folglich besitzt TRPM3 α 2 gegenüber TRPM3 α 1 eine verkürzte Pore [129]. Auch die beiden bereits funktionell charakterisierten humanen Spleißvarianten weisen eine solche verkürzte Pore auf [130]. Infolge dieses Unterschiedes in der mutmaßlichen Porenregion zeigen TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 unterschiedliche Ionenselektivitäten. Bi-ionische Umkehrpotentialmessungen zeigten, dass TRPM3 α 2 eine im Vergleich zu TRPM3 α 1 deutlich höhere Permeabilität für divalente Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) aufweist. Divalente Einwärtsströme waren bei TRPM3 α 2 im Gegensatz zu TRPM3 α 1 nachweisbar, allerdings nur in Gegenwart extrem hoher Konzentrationen an Ca^{2+} und Mg^{2+} . Daneben zeigen beide Spleißvarianten auch noch eine unterschiedliche Regulation durch extrazelluläre, monovalente Kationen (Na^+ , K^+). Extrazelluläre, monovalente Kationen hemmen ausschließlich den Auswärtsstrom von TRPM3 α 2, nicht jedoch den von TRPM3 α 1. Der hemmende Effekt von Na^+ ist hierbei stärker als der von K^+ . Trotz dieser Unterschiede weisen TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 jedoch auch noch Gemeinsamkeiten auf. Beide zeigen eine konstitutive Aktivität, eine auswärtsrektifizierende Strom-Spannungsbeziehung, eine schwache Spannungsabhängigkeit und eine Hemmung durch intrazelluläres Mg^{2+} und extrazelluläre, divalente Kationen [129]. Exprimiert werden TRPM3-Kanäle beim Menschen im Sammelrohr der Niere sowie in verschiedenen Teilen des Rückenmarks und des Gehirns [59, 97]. Bei der Maus werden TRPM3-Kanäle im Choroiden Plexus und in anderen Teilen des Gehirns exprimiert [129]. Im Gegensatz zum Menschen sind in der Niere der Maus keine TRPM3-Transkripte zu finden [59]. Daneben finden sich TRPM3-Transkripte noch in Hoden, Eierstöcken, Pankreas, Leber und Auge [46, 59, 90, 97, 129]. Aufgrund seiner hohen Expression in der Niere des Menschen wird TRPM3 eine Rolle bei der renalen Ca^{2+} -Homeostase [59] und aufgrund seiner hohen Expression im Choroiden Plexus der Maus eine Rolle bei

der Kationenhomeostase der Zerebrospinalflüssigkeit zugeschrieben [129]. Da D-Erythro-Sphingosin in vivo mit der Regulation des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und dem Zelltod in Verbindung gebracht wird, ist TRPM3 möglicherweise auch in einen oder mehrere dieser Prozesse involviert [58].

Da die in der vorliegenden Promotionsarbeit ausgearbeiteten funktionellen Eigenschaften von TRPM3 mit denen anderer Mitglieder der TRPM-, TRPC- und TRPV-Unterfamilie verglichen werden, werden in den folgenden Abschnitten die Mitglieder dieser drei Unterfamilien vorgestellt.

1.2.2 Die TRPC-Unterfamilie

Die TRPC-Unterfamilie, deren Mitglieder den höchsten Verwandtschaftsgrad zu *Drosophila* TRP aufweisen und aufgrunddessen als erstes in Säugetieren entdeckt wurden, umfasst derzeit sieben Proteine, TRPC1-TRPC7. Diese bilden nichtselektive, Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle aus, die eine Phospholipase C-abhängige Aktivierung zeigen. Der genaue auf die Phospholipase C-Aktivierung folgende Mechanismus, der zur Aktivierung der TRPC-Proteine führt, wird aufgrund der widersprüchlichen Datenlage allerdings noch kontrovers diskutiert. Zur Debatte stehen sowohl speicherunabhängige als auch speicherabhängige Mechanismen (rezeptorvermittelte bzw. speicher-vermittelte Aktivierung). Aufgrund von funktionellen und strukturellen Ähnlichkeiten können die Mitglieder der TRPC-Unterfamilie nochmals in die folgenden vier Untergruppen unterteilt werden: TRPC1, TRPC2, TRPC4/TRPC5, TRPC3/TRPC6/TRPC7.

TRPC1, das Gründungsmitglied der TRPC-Proteinfamilie, war der erste Ionenkanal, der in Säugetieren identifiziert wurde [199]. Ob es sich hierbei allerdings um einen funktionsfähigen Ionenkanal handelt, ist noch umstritten. Neben Daten, die seine Funktionsunfähigkeit im heterologen Expressionssystem belegen [169], existieren zahlreiche Studien, die seine Funktion als speicher-aktivierten bzw. rezeptor-aktivierten Ionenkanal bestätigen [212]. Aufgrund seiner ubiquitären Expression und seiner Fähigkeit mit TRPC4 und TRPC5 zu heteromultimerisieren wird vermutet, dass TRPC1 in zahlreichen Geweben Komponente eines solchen heteromeren Komplexes ist [169, 170].

Über TRPC2, den zweiten Vertreter der TRPC-Proteinfamilie, sind bislang nur wenige Daten verfügbar. Während das *trpC2* Gen im Menschen ein Pseudogen ist [185], kodiert es in den Geweben von Maus und Ratte für einen funktionsfähigen Kationenkanal, der in vivo durch DAG aktiviert wird [108]. Da TRPC2 vornehmlich in den Mikrovilli der Rezeptorzellen des vomeronasalen Organs der Ratte und der Maus exprimiert wird und TRPC2-defiziente Mäuse zudem nicht fähig sind, die sexuelle Identität ihrer Artgenossen

zu erkennen, wird vermutet, dass TRPC2 an der Pheromonwahrnehmung beteiligt ist [98, 104, 108, 167]. Daneben findet man TRPC2 noch im Kopf muriner Spermatozyten [85]. Eine wichtige Rolle bei der Akrosomenreaktion kann jedoch aufgrund der nachgewiesenen Fertilität TRPC2-defizienter Mäuse ausgeschlossen werden [98, 167].

TRPC4 und TRPC5, die TRPC1 am nächsten stehen, weisen untereinander eine hohe Homologie auf (64% Identität) und werden aufgrundessen zu einer Untergruppe zusammengefasst. Sie stellen beide nichtselektive Kationenkanäle dar, für deren Aktivierung die Aktivität der Phospholipase C erforderlich ist. Die Phospholipase C-vermittelte Hydrolyse von PIP₂ zu DAG und IP₃ scheint bei der Aktivierung von TRPC4 und TRPC5 allerdings keine Rolle zu spielen, da DAG und IP₃ alleine zu keiner Aktivierung führen [76, 131, 159]. Abweichend von den anderen TRP-Proteinen zeigen TRPC4 und TRPC5 in Gegenwart mikromolarer Konzentrationen an Lanthanoiden eine Potenzierung. In Gegenwart millimolarer Konzentrationen werden jedoch auch sie durch Lanthanoide gehemmt [84, 159, 169]. TRPC4 und TRPC5 werden in zahlreichen Geweben exprimiert. Besonders hohe Konzentrationen findet man hierbei im Gehirn. Aufgrund ihrer überlappenden Expression wird vermutet, dass sie heteromultimere Komplexe miteinander sowie mit TRPC1 bilden. Bereits gezeigt werden konnte, dass Heteromultimere aus TRPC1 und TRPC4 bzw. TRPC1 und TRPC5 sich deutlich in ihren biophysikalischen Eigenschaften von den jeweiligen Homomultimeren unterscheiden [169, 170]. TRPC4 spielt sowohl bei der Vasoregulation [49] als auch bei der mikrovaskulären Permeabilität der Lunge eine entscheidende Rolle [177]. TRPC5, der in hippokampalen Wachstumskegeln exprimiert wird, scheint an der Modulation des Neuritenwachstums beteiligt zu sein [57].

TRPC3, TRPC6 und TRPC7, die untereinander 65-78% Identität aufweisen, bilden eine weitere Untergruppe. Sie stellen ebenfalls nichtselektive Kationenkanäle dar, die eine Phospholipase C-abhängige Aktivierung zeigen [76]. Im Gegensatz zu TRPC4 und TRPC5 werden sie durch DAG aktiviert [76]. TRPC3, TRPC6 und TRPC7 zeigen eine hohe Expression in glatten Muskelzellen und Herzmuskelzellen, was sie zu möglichen Kandidaten für einen dort exprimierten, nichtselektiven Kationenkanal macht. Analog dazu konnte bereits nachgewiesen werden, dass TRPC6 ein essentieller Bestandteil des α 1-Adrenorezeptor-aktivierten Kationenkanals in der Portalvene des Kaninchens ist [81]. Daneben spielen die drei wahrscheinlich noch eine Rolle bei der Regulation des vaskulären Tonus, des Atemwegswiderstandes und der Herzfunktion [33].

1.2.3 Die TRPV-Unterfamilie

Die TRPV-Unterfamilie, die im Bereich der fünften und sechsten Transmembrandomäne 25% Identität zur TRPC-Unterfamilie aufweist, umfasst bei Säugetieren sechs Proteine

(TRPV1-TRPV6). Diese können aufgrund von funktionellen Ähnlichkeiten nochmals in die folgenden zwei Untergruppen unterteilt werden: TRPV1-TRPV4 und TRPV5/TRPV6. Während TRPV5 und TRPV6 konstitutiv aktive, Ca^{2+} -selektive, einwärtsrektifizierende Kationenkanäle darstellen, handelt es sich bei TRPV1-TRPV4 um schwach Ca^{2+} -selektive, auswärtsrektifizierende Kationenkanäle, die durch Wärme bzw. Hitze aktiviert werden. Gemeinsam ist allen Mitglieder der TRPV-Unterfamilie die Hemmung durch Rutheniumrot [150].

Das Gründungsmitglied der TRPV-Proteinfamilie TRPV1, auch bekannt unter dem Synonym Capsaicin- bzw. Vanilloidrezeptor 1, das bei der Suche nach einem Rezeptor für vanilloide Substanzen mittels einer Expressions-Klonierungsstrategie identifiziert wurde [18], ist der am vollständigsten untersuchte Kationenkanal dieser Familie. Eine Vielzahl verschiedenster Stimuli führen zu seiner Aktivierung. Zu seinen Agonisten zählen neben moderater Hitze ($> 43^\circ\text{C}$) auch Capsaicin, Resiniferatoxin, Protonen, Endocannabinoide wie Anandamid, Eicosanoide und 2-APB [20, 78]. TRPV1 wird in zahlreichen Geweben exprimiert. Seine Funktion wurde bisher allerdings am besten in sensorischen Neuronen, in denen er als erstes identifiziert wurde, untersucht [18, 178]. Da TRPV1-defiziente Mäuse in nozizeptiven, inflammatorischen und thermoregulatorischen Tests eine reduzierte Sensitivität auf vanilloide Substanzen zeigten, wird TRPV1 eine Rolle bei der Wahrnehmung von Schmerzen zugeschrieben [17]. Auch konnte gezeigt werden, dass TRPV1 eine wichtige Rolle bei der thermalen Hyperalgesie spielt [30]. Daneben scheint TRPV1 noch an zahlreichen weiteren physiologischen Prozessen beteiligt zu sein, wie Satttheit [2], Hormodulation [210], Motilität der Harnblase [12] und des Gastrointestinaltraktes [51].

TRPV2 wird neben noxischer Hitze ($> 52^\circ\text{C}$) [19] auch noch durch 2-APB [78] und hypoosmotisch-bedingte Zellschwellung aktiviert [120]. Exprimiert wird TRPV2 vornehmlich in DRG-Neuronen, wo er vermutlich die Wahrnehmung noxischer Hitze vermittelt.

Für TRPV3 konnte neben einer Aktivierung durch nichtnoxische Hitze ($> 30^\circ\text{C}$) [166, 201] auch eine Aktivierung durch 2-APB [23, 78] und Campher [119] nachgewiesen werden. TRPV3 zeigt eine hohe Expression in Haut, Zunge und ZNS [166, 201]. Da TRPV1 ebenfalls im ZNS exprimiert wird, besteht die Möglichkeit dort mit diesem zu heteromultimerisieren [166]. Wie beim Menschen wird TRPV3 in der Maus auch in den Keratinozyten der Haut exprimiert [134]. Da TRPV3-defiziente Mäuse eine veränderte thermale Präferenz zeigen, ist er vermutlich wichtig für die Temperaturwahrnehmung [119].

TRPV4 wird neben moderater Hitze ($> 27^\circ\text{C}$) noch durch hypotone Lösung, Arachidonsäure, Anandamid und den Phorbolster 4α -PDD aktiviert [171, 192, 195]. Die Aktivierung durch hypotone Lösung ist hierbei auf die schwellungsinduzierte Produktion von 5'6' -Epoxyeicosatriensäure (5'6' -EET) zurückzuführen, die TRPV4 direkt aktiviert [192]. Die Aktivierung durch Arachidonsäure und Anandamid verläuft ebenfalls über 5'6' -

Epoxyeicosatriensäure (5´6´-EET) [196]. Da Mutationen in der dritten Transmembrandomäne nur die Aktivierung durch Hitze und 4 α -PDD, nicht jedoch die Aktivierung durch hypotone Lösungen beeinträchtigen, scheinen noch weitere Mechanismen an der Aktivierung von TRPV4 beteiligt zu sein [192]. Eine allosterische Wechselwirkung zwischen den einzelnen Aktivierungsmechanismen ist hierbei wahrscheinlich, da Hitze und hypotone Lösung TRPV4 synergistisch aktivieren [101]. Desweiteren erfordert die Aktivierung durch Hitze [197], nicht jedoch die Aktivierung durch hypotone Lösung, intakte Ankyrin-Repeats im N-Terminus [101]. Im Gegensatz zu TRPV1, TRPV2 und TRPV3 ist TRPV4 insensitiv gegenüber einer Aktivierung mit 2-APB [78]. TRPV4-defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Sensitivität gegenüber Druck und Osmolarität, eine veränderte thermale Präferenz sowie einen Gehörverlust [96, 102, 174, 175].

TRPV5 und TRPV6 weisen untereinander 66-74% Identität auf, weichen aber deutlich in ihrer Aminosäuresequenz von den übrigen Mitgliedern der TRPV-Proteinfamilie ab (20-24% Identität). Aufgrunddessen bilden sie eine eigenständige Untergruppe. Funktionell unterscheiden sich TRPV5 und TRPV6 noch in folgenden drei Punkten von diesen: Sie zeigen 1. eine starke Einwärtsrektifizierung, 2. eine hohe konstitutive Aktivität, die durch intra- und extrazelluläres Ca²⁺ [186] sowie durch Calmodulin [125] reguliert wird, und 3. eine hohe Ca²⁺-Selektivität ($P_{Ca}:P_{Na} > 100$) [186, 206]. Für die hohe Ca²⁺-Selektivität sind die negativ geladenen Aspartatreste in Position 542 (TRPV5) bzw. Position 541 (TRPV6) verantwortlich [127, 189]. Im heterologen Expressionssystem bilden TRPV5 und TRPV6 sowohl homo- als auch heteromultimere Komplexe aus [75]. Bei TRPV6 sind hierbei die N-terminalen Ankyrin-Repeats maßgeblich an der Zusammenlagerung der Kanaluntereinheiten und an der Stabilisierung des Kanalkomplexes beteiligt [42]. Da die Expressionsmuster von TRPV5 und TRPV6 nicht vollständig überlappen - TRPV5 wird vornehmlich in der Niere und im Darm [73] und TRPV6 vornehmlich in der Plazenta und im Darm exprimiert [71, 136] - bleibt abzuwarten, inwieweit die im heterologen Expressionssystem beobachteten TRPV5/TRPV6-Heteromultimere auch in vivo eine Rolle spielen. Bisweilen wird angenommen, dass TRPV5 und TRPV6 für die Vitamin D stimulierte Ca²⁺-Aufnahme in die Epithelien von Darm, Niere und Plazenta verantwortlich sind. In der Tat zeigen TRPV5-defiziente Mäuse trotz erhöhter Vitamin D-Level eine verminderte Ca²⁺-Resorption sowie eine Hypercalciurie [74, 183].

1.2.4 Die TRPM-Unterfamilie

Die TRPM-Unterfamilie, die im Bereich der fünften und sechsten Transmembrandomäne 20% Identität mit der TRPC-Unterfamilie aufweist, besteht aus acht Mitgliedern. Diese können aufgrund von strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten nochmals in

die folgenden vier Untergruppen unterteilt werden: TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5, TRPM6/TRPM7 und TRPM2/TRPM8. Die TRPM-Proteinfamilie bildet insgesamt eine sehr heterogene Unterfamilie von Kationenkanälen, die sich sowohl in ihren Selektivitäten als auch in ihren Aktivierungsmechanismen und ihren Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskinetiken sehr stark voneinander unterscheiden. Die Heterogenität wird durch die Bildung von Heteromultimeren sowie das Auftreten von Spleißvarianten nochmals erhöht. Spleißvarianten wurden bislang für alle TRPM-Proteine bis auf TRPM7 identifiziert [105]. Sie können zum einen selbst aber auch in Kombination mit Vollängen-Isoformen Ionenkanäle mit neuen biophysikalischen Eigenschaften bilden und zum anderen die Aktivität des Vollängen-Ionenkanals durch einen dominant-negativen Effekt unterbinden [203]. Drei Mitglieder der TRPM-Proteinfamilie (TRPM2, TRPM6 und TRPM7) heben sich außerdem durch die Anwesenheit einer C-terminalen Enzymdomäne von den übrigen TRP-Proteinen ab. TRPM2 weist hierbei C-terminal eine Nukleosiddiphosphat-Pyrophosphatase-Domäne auf, die spezifisch ADP-Ribose bindet. Währenddessen enthalten TRPM6 und TRPM7 im C-Terminus eine atypische α -Proteinkinase-Domäne, die ATP bindet und dieses zu ADP und P_i hydrolisiert.

TRPM1 (Melastatin), der Namensgeber der TRPM-Proteinfamilie, sowie zahlreiche Isoformen von TRPM1 wurden zunächst in murinen B16 Melanomzelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotential identifiziert [35, 43]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression von TRPM1 mit dem Metastasierungspotential invers korreliert, d.h. stark metastasierende Zellen eine reduzierte Expression von TRPM1 aufweisen. Aufgrunddessen wird TRPM1 die Rolle eines Tumorsuppressors zugeschrieben. Genutzt wird dieser Befund in der Klinik. Hier dient die TRPM1-Expression bei Patienten mit malignen Melanomen als prognostischer Marker für Metastasen [34]. Neben seiner Expression in murinen Melanomzelllinien wird TRPM1 noch in den Melanozyten der Haut sowie im Auge exprimiert [105]. Ob TRPM1 einen funktionsfähigen Ionenkanal bildet, ist noch ungeklärt.

TRPM2, das zweite Mitglied der TRPM-Proteinfamilie, zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass er neben seiner Ionenkanaldomäne noch eine C-terminale Enzymdomäne besitzt. Diese weist eine hohe Homologie zur NUTD9-Hydrolase-Familie auf und ist in der Lage als ADP-Ribose-Pyrophosphatase zu fungieren, d.h. ADP-Ribose zu binden und anschließend zu AMP und Ribose-5-P zu hydrolisieren. Da erhöhte Konzentrationen an ADP-Ribose ($EC_{50} = 100 \mu\text{M}$) auch zu einer Aktivierung von TRPM2 führen, wird ein Zusammenhang zwischen enzymatischer Aktivität und Öffnung des Ionenkanals vermutet [137]. Neben ADP-Ribose konnte auch für β -NAD [157], cADP-Ribose [86] und H_2O_2 [66, 198] eine Aktivierung von TRPM2 nachgewiesen werden. Da ADP-Ribose sowohl aus β -NAD als auch cADP-Ribose mit Hilfe von CD38 gebildet werden kann, handelt es hierbei vermutlich nur um eine indirekte Aktivierung. Auch für H_2O_2 und andere reaktive

O₂-Spezies wird neben einer direkten noch eine indirekte Aktivierung diskutiert. Hierbei wird angenommen, dass reaktive O₂-Spezies zum einen ADP-Ribose aus Mitochondrien freisetzen [138] und zum anderen die Aktivität von Poly-ADP-Ribose-Polymerasen in der Zelle erhöhen, was zu einer verstärkten Bildung von Poly-ADP-Ribose führt. Diese wird anschließend durch Poly-ADP-Glykohydrolasen wieder abgebaut, wobei ADP-Ribose freigesetzt wird [45]. Exprimiert wird TRPM2 in den Mikroglia-Zellen des Gehirns [89]. Daneben sind Transkripte noch in zahlreichen anderen Geweben (Knochenmark, Herz, Leber, Lunge, Milz, Pankreas) sowie Zellen des Immunsystems (Monozyten, Leukozyten, Makrophagen, Neutrophile) zu finden [139]. Neben seiner Funktion als zellulärer Redox-sensor, wird TRPM2 noch eine Rolle bei der Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas zugeschrieben [80].

TRPM4-Kanäle sind sowohl in erregbaren als auch nichterregbaren Zellen zahlreicher Gewebe zu finden. Sie stellen Ca²⁺-aktivierte, nichtselektive Kationenkanäle dar, die für monovalente, nicht jedoch für divalente Kationen permeabel sind [94]. Die berichteten Ca²⁺-Konzentrationwerte, die zur halbmaximalen Aktivierung erforderlich sind, schwanken hierbei erheblich. Obwohl TRPM4 für Ca²⁺ impermeabel ist, spielt er vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. In nichterregbaren Zellen führt das durch TRPM4 einströmende Na⁺ zu einer Depolarisation der Plasmamembran, die wiederum die treibende Kraft für den Ca²⁺-Einstrom durch sogenannte speicheraktivierte Ca²⁺-Kanäle reduziert. In erregbaren Zellen ist TRPM4 für die Dauer, Frequenz und Form von Aktionspotentialen und für die Aufrechterhaltung des Ca²⁺-Einstroms durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle, d.h. sogenannte Ca²⁺-Oszillationen, wichtig. In Abhängigkeit vom Zelltyp kann TRPM4 somit den Ca²⁺-Einstrom zum einen unterdrücken und zum anderen fördern [95, 140].

Das Gen, das für TRPM5 kodiert, wurde bei der funktionellen Analyse einer chromosomalen Region, die mit zahlreichen Tumoren in Verbindung gebracht wird, identifiziert. Ob TRPM5 allerdings bei der Tumorgenese eine Rolle spielt ist noch ungeklärt [146]. Exprimiert wird TRPM5 in Geweben, die an der Geschmackswahrnehmung beteiligt sind [147]. Daneben finden sich auch noch Transkripte in zahlreichen weiteren fetalen und adulten Geweben (Herz, Gehirn, Leber, Niere, Darm, Lunge [146]). Die Resultate funktioneller Studien zu TRPM5 unterscheiden sich erheblich. Neben einer rezeptor-vermittelten Aktivierung wird auch noch eine direkte Aktivierung durch Ca²⁺ diskutiert [77, 147]. Analog zu TRPM4 schwanken die Ca²⁺-Konzentrationwerte, die zur halbmaximalen Aktivierung erforderlich sind, stark [77, 107, 145]. Auch die biophysikalischen Eigenschaften von TRPM5 ähneln denen von TRPM4. TRPM5 unterscheidet sich allerdings in seinen Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken sowie in seiner Ca²⁺-Sensitivität von diesem [182]. Zudem zeigt TRPM5 eine Ca²⁺-abhängige Inaktivierung, der durch Zugabe von PIP₂ entgegen-

gewirkt werden kann [107]. Aufgrund seiner ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften scheint er in der Zelle dem gleichen Zweck zu dienen wie TRPM4, nämlich der Depolarisation der Plasmamembran. Aufgrund seiner Expression in Geschmacksrezeptorzellen der Zunge [147, 209] und in β -Zellen des Pankreas [145] wird TRPM5 noch eine Rolle bei der Geschmackswahrnehmung von Süßstoffen, Bitterstoffen und Aminosäuren sowie bei der Regulation der Insulinfreisetzung zugeschrieben. Die Rolle bei der Geschmackswahrnehmung konnte mit Hilfe von TRPM5-defizienten Mäusen bestätigt werden [29, 209].

TRPM6 steht TRPM7 sowohl in seinen strukturellen als auch in seinen funktionellen Eigenschaften sehr nahe. Wie TRPM7 zeichnet auch er sich durch die Anwesenheit einer C-terminalen Enzymdomäne aus, die die Eigenschaften einer atypischen α -Proteinkinase besitzt. Elektrophysiologische Studien von TRPM6 lieferten bisweilen kontroverse Ergebnisse. Während in einer Studie nach heterologer Expression große TRPM6-vermittelte Ströme nachgewiesen wurden, die nicht von TRPM7 unterscheidbar waren (Hemmung durch intrazelluläres Mg^{2+} /MgATP, Selektivität für Ca^{2+} und Mg^{2+} , auswärtsrektifizierende Strom-Spannungsbeziehung) [190], zeigte eine andere Studie eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation von TRPM6. Erst die Koexpression von TRPM7, die mit der Bildung von TRPM6/TRPM7-Heteromultimeren einhergeht, führte zu messbaren Strömen. Die TRPM6/TRPM7-vermittelten Ströme waren hierbei deutlich größer als die TRPM7-vermittelten Ströme. Infolgedessen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass TRPM7 für die Translokation von TRPM6 zur Plasmamembran unabdingbar ist [22]. Im Gegensatz zu TRPM7 wird TRPM6 nicht ubiquitär exprimiert, sondern ist vornehmlich in der Niere und im Darm zu finden. Hier scheint TRPM6 in den aktiven, transzellulären Mg^{2+} -Transport involviert zu sein. Mutationen im *trpM6*-Gen sind für die autosomal-dominante Form von HSH (Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie) verantwortlich. HSH-Patienten zeigen aufgrund einer reduzierten intestinalen und renalen Mg^{2+} -(Re)Absorption deutlich erniedrigte Serum- Mg^{2+} -Spiegel und sind auf die lebenslange Einnahme hoher Mg^{2+} -Dosen angewiesen. Eine Kompensation des Mg^{2+} -Defizits auf diesem Wege ist möglich, da die passiven, parazellulären Aufnahmemechanismen nicht beeinträchtigt sind [161, 194]. Initial wurde TRPM7 als Ca^{2+} -permeabler, nichtselektiver Kationenkanal beschrieben, der durch intrazelluläres ATP aktiviert wird und für dessen Kanalaktivität die Kinasedomäne erforderlich ist [154]. Im folgenden zeigte sich jedoch, dass diese Beschreibung nicht zutreffend ist. Entgegen dieser initialen Beschreibung bildet TRPM7 einen Kationenkanal, der sich durch eine intrazelluläre Mg^{2+} -Hemmung ($IC_{50} = 6$ mM) auszeichnet [88, 122]. In weiteren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass TRPM7 nicht nur für Mg^{2+} und Ca^{2+} permeabel ist, sondern zusätzlich auch noch für weitere Spuren- und Schwermetalle (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+}) [115]. In Abwesenheit von divalenten Kationen wird TRPM7 monovalent permeabel. Gleichzeitig ist eine Linearisierung der ansonsten

stark auswärtsrektifizierenden Strom-Spannungsbeziehung beobachtbar. Der starken Auswärtsrektifizierung von TRPM7 in Gegenwart von divalenten Kationen liegt somit keine Spannungsabhängigkeit zugrunde, sondern eine Hemmung des monovalenten Einwärtsstromes durch divalente Kationen [122]. Die Kinasedomäne scheint zwar eine bedeutende Rolle bei der Determination der Mg^{2+} -Sensitivität von TRPM7 zu spielen, ist jedoch entgegen der initialen Beschreibung für die Kanalaktivität nicht erforderlich [111, 162]. Neben intrazellulärem $Mg^{2+}/MgATP$ wird die Kanalaktivität von TRPM7 auch noch durch PIP_2 reguliert [93, 153]. Eine positive und negative Modulation durch cAMP konnte ebenfalls schon gezeigt werden [176]. Während Polykationen (Spermin, Spermidin) zu einer Hemmung des TRPM7-Stromes führen, potenzieren Protonen diesen. Hierbei wird angenommen, dass die Protonen die Hemmung des monovalenten Einwärtsstromes durch divalente Kationen aufheben, indem sie mit diesen um die Bindungsstelle in der Pore konkurrieren [82]. Funktionell scheint TRPM7 wichtig für die Überlebensfähigkeit der Zellen zu sein. Zellen, in denen TRPM7 gezielt herunterreguliert wurde, stoppen zunächst ihr Wachstum und sterben schließlich ab [122]. Da das Wachstum und die Überlebensfähigkeit jedoch durch extrazelluläre Mg^{2+} -Gaben, nicht jedoch durch extrazelluläre Ca^{2+} -Gaben aufrechterhalten werden konnten, scheint TRPM7 insbesondere für die zelluläre Mg^{2+} -Aufnahme verantwortlich zu sein [162]. Ob TRPM7 auch für die zelluläre Ca^{2+} -Aufnahme physiologisch relevant ist, ist noch unbekannt. Die Ca^{2+} -Aufnahme via TRPM7 könnte möglicherweise eine Rolle bei oxidativem und metabolischem Stress spielen [1]. Erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen leiten hier die Apoptose der Zellen ein und führen schließlich zu deren Zelltod.

TRPM8 wurde ursprünglich bei der Suche nach Genen, die bei bösartiger Entartung der Prostata hochreguliert sind, entdeckt [180]. Im folgenden konnte jedoch seine Anwesenheit auch in primären, sensorischen Neuronen gezeigt werden. Während seine Funktion in der Prostata und seine dortige mögliche Rolle bei der Tumorgenese noch weitestgehend unbekannt sind, bestärkt seine Anwesenheit in kälte-sensitiven Neuronen seine Rolle bei der Temperatur- und Schmerzwahrnehmung [112, 114, 133]. Neben Kälte (8-28 °C) führen auch kühlende Agentien wie Menthol und Icilin zur Aktivierung von TRPM8 [14, 112, 133, 191]. Im aktivierten Zustand ist TRPM8 durch eine stark auswärtsrektifizierende Strom-Spannungsbeziehung charakterisiert [112]. Der starken Auswärtsrektifizierung liegt hierbei eine spannungsabhängige Modulation der Kanalaktivität zugrunde [191]. Die Kanalaktivität von TRPM8 wird daneben auch noch durch die intrazelluläre PIP_2 -Konzentration und den intrazellulären pH-Wert reguliert. Erniedrigungen der intrazellulären PIP_2 -Konzentration führen zu einer Hemmung von TRPM8 [151]. Erniedrigungen des intrazellulären pH-Wertes führen ausschließlich zu einer Hemmung der Kälte- und Icilinantwort, nicht jedoch der Mentholantwort [3].

Wie aus den vorangegangenen Abschnitten über die TRPC-, TRPV- und TRPM-Unterfamilie hervorgeht, sind an der Aktivierung und Regulation der TRP-Kanäle eine Vielzahl endogener und exogener Substanzen beteiligt. Der Einfluss der an der Modulation verschiedenster Neurotransmitter-Rezeptoren im Gehirn beteiligter Neurosteroiden auf TRP-Kanäle wurde bislang allerdings kaum untersucht, obwohl die Expression vieler TRP-Kanäle dort bereits nachgewiesen wurde. Lediglich für TRPV1 wurde bislang eine Hemmung durch das Neurosteroid Pregnenolonsulfat beschrieben [21]. Die von verschiedenen Arbeitsgruppen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesene Expression von TRPM3 im Gehirn war der Anlass für die Untersuchung des Einflusses von Neurosteroiden auf TRPM3.

1.3 Neurosteroiden

Neurosteroiden sind Steroiden, die im Nervensystem von Nervenzellen und Gliazellen de-novo aus Cholesterol oder einem anderen frühen Vorläufersteroid synthetisiert werden. Zu ihnen zählen Pregnenolon, Pregnenolonsulfat, Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat, Allopregnanolon und Progesteron sowie deren reduzierte Metaboliten [165].

Erste Hinweise auf die im Nervensystem stattfindende Steroidsynthese lieferten die im Gehirn von Ratten nachgewiesenen hohen Konzentrationen von Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron sowie von deren Sulfat- und Lipoidderivaten [8]. Diese Konzentrationen überschritten deutlich die im Plasma anzutreffenden Konzentrationen und waren auch nach Kastration und Adrenalektomie noch über einen längeren Zeitraum nachweisbar. Auch zirkadiane Schwankungen in den zerebralen Konzentrationen von Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron, die nicht mit den Plasmakonzentrationen korrelierten, sprachen für eine im Nervensystem stattfindende Steroidsynthese [8]. Eine Bestätigung dieser Hinweise wurde schließlich durch den Nachweis der Expression sowie der funktionellen Aktivität des Schlüsselenzyms der Steroidsynthese P450_{scc} im Gehirn der Ratte erbracht [53]. Ausführliche Untersuchungen zeigten im folgenden, dass auch die übrigen an der klassischen Steroidsynthese beteiligten Enzyme im Nervensystem präsent sind.

Während in älteren Publikationen Pregnenolonsulfat als das im Gehirn am meisten vorkommende Neurosteroid beschrieben wurde, zeigen neuere Publikationen, dass Pregnenolon in seiner sulfatierten Form kaum dort anzutreffen ist. Ein lipoidales Pregnenolonderivat, dessen genaue chemische Struktur bisweilen noch nicht aufgeklärt wurde, scheint dagegen in deutlich höheren Konzentrationen im Nervensystem vorzukommen [103].

Aufgrund ihrer Synthese im Nervensystem wirken Neurosteroiden im Gegensatz zu den klassischen Steroidhormonen der Gonaden (Ovarien, Testes) und der Nebenniere, die ihr Zielorgan über die Blutbahn erreichen (endokrine Wirkweise), direkt am Ort ihrer Bil-

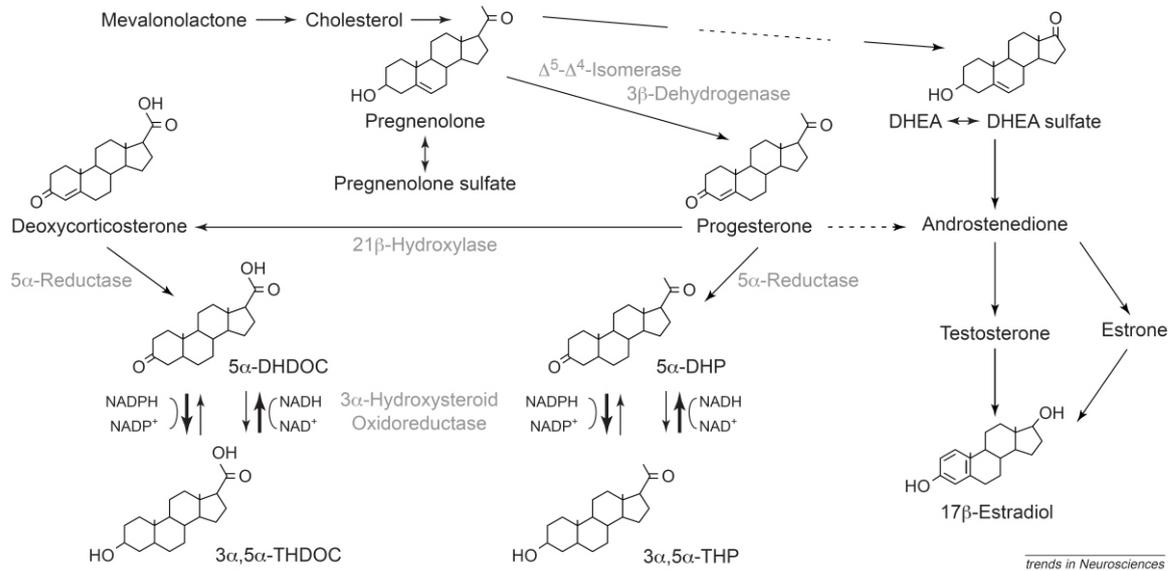


Abb.1.3: Überblick über die Biosynthese und den Metabolismus der Neurosteroiden im Gehirn. Abbildung übernommen aus Rupprecht und Holsboer, 1999 [155].

dung (autokrine bzw. parakrine Wirkweise). Aus diesem Grund können im Nervensystem lokal auch deutlich höhere Konzentrationen erreicht werden als im Plasma [165].

Im Gegensatz zu den klassischen Steroidhormonen üben Neurosteroiden im Nervensystem zahlreiche nichtgenomische Effekte aus. Durch Interaktion mit verschiedensten ionotropen und metabotropen Neurotransmitter-Rezeptoren (NMDA-, AMPA-, Kainat-, Sigma1-, GABA_A-, Glycin-, nikotinischer Acetylcholin-, 5HT₃-, Oxytocin-Rezeptor) modulieren sie zum einen die Aktivität und Plastizität von Neuronen und zum anderen die Neurotransmitter- und Neuropeptidfreisetzung [155, 165]. Aufgrund dessen werden ihnen neurotrophische und neuroprotektive, aber auch anästhetische, anxiolytische, antipsychotische, antikonvulsive, antidepressive, hypnotische, sedative, schlafmodulierende und gedächtnisfördernde Eigenschaften zugeschrieben [155] [165]. Außerdem scheinen sie noch im Nervensystem bei der Myelinisierung der Nerven eine wichtige Rolle zu spielen [165]. Im Gegensatz zu den genomischen Effekten der klassischen Steroide, die erst nach mehreren Stunden einsetzen, beanspruchen diese nichtgenomischen Effekte der Neurosteroiden nur wenige Minuten [155]. Über nichtgenomische Effekte von Neurosteroiden in der Peripherie ist bisweilen nur wenig bekannt.

Auch der Einfluss der zu den L-Typ Ca²⁺-Kanalblockern zählenden 1,4-Dihydropyridine auf TRP-Kanäle wurde bislang kaum untersucht, obwohl mit Ausnahme von TRPM4 und TRPM5 alle TRP-Kanäle Ca²⁺-permeable Kationenkanäle ausbilden und bislang für die meisten TRP-Kanäle noch keine spezifischen Antagonisten zur Verfügung stehen. Le-

diglich für TRPV5, TRPV6 und TRPC5 wurde gezeigt, dass 1,4-Dihydropyridine keine bzw. nur eine schwach antagonistische Wirkung auf diese ausüben [135, 136, 202]. Die für TRPM3 bereits gezeigte Ca^{2+} -Permeabilität war der Grund für die Untersuchung des Einflusses von 1,4-Dihydropyridinen auf TRPM3.

1.4 1,4-Dihydropyridine

1,4-Dihydropyridine gehören zu der großen Gruppe der Ca^{2+} -Kanalblocker [121]. Ihre Synthese wurde erstmals 1882 von A. Hantzsch beschrieben [65]. Ihr pharmakologisches Potential und ihr therapeutischer Nutzen bei koronaren Herzerkrankungen wurde allerdings erst nahezu hundert Jahre später von der Bayer AG erkannt [13]. Diese brachte 1975 Nifedipin als ersten Vertreter der 1,4-Dihydropyridine unter den Handelsnamen Adalat[®] auf den Markt.

Die Wirkung der 1,4-Dihydropyridine beruht auf einer Hemmung des transmembranären Ca^{2+} -Einstromes durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in die Gefäßmuskelzellen [121]. 1,4-Dihydropyridine binden hierbei an den im inaktiven Zustand befindlichen, spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanal. Die hochaffine Bindungsstelle der 1,4-Dihydropyridine ist auf der $\alpha 1$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals lokalisiert. Durch Stabilisierung dieses inaktiven Zustandes wird die Anzahl an aktivierbaren Ca^{2+} -Kanälen und damit auch der Ca^{2+} -Einstrom in den Intrazellularraum vermindert, was zu einer verminderten Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen Myosin-ATPase führt. Infolgedessen kommt es zu einer Gefäßerweiterung und peripheren Gefäßwiderstandsabnahme. Die Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes führt schließlich zur Blutdrucksenkung und ist für die Wirksamkeit bei Hypertonie und Angina pectoris entscheidend. Durch die Blutdruckabnahme nimmt auch der linksventrikuläre Füllungsdruck ab, wodurch das Herz indirekt entlastet wird [121].

Strukturvariationen in Position 3 und 5 des 1,4-Dihydropyridinrings als auch im Substitutionsmuster des Phenylringes von Nifedipin führten in den folgenden Jahren zu einer Vielzahl von weiteren 1,4-Dihydropyridinen, die sich sowohl in ihrer qualitativen als auch in ihrer quantitativen Wirkung von diesem unterscheiden [54]. Chirale 1,4-Dihydropyridine, die zur zweiten und dritten Generation der 1,4-Dihydropyridine zählen und in Position 3 und 5 des 1,4-Dihydropyridinringes mit zwei unterschiedlichen Estern ausgestattet sind, sind hierbei pharmakologisch wirksamer als das achirale Nifedipin. Das S-Enantiomer stellt von beiden Enantiomeren in der Regel das wirksamere Enantiomer dar. Der Austausch des voluminöseren Esters im S-Enantiomer gegen Wasserstoff bzw. eine Nitrogruppe führt zu Ca^{2+} -Kanalaktivatoren. Diese stabilisieren den offenen Zustand des spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanals und ermöglichen so den Ca^{2+} -Einstrom über einen längeren Zeitraum.

Bei Ca^{2+} -Kanalaktivatoren haben die beiden Enantiomere zum Teil auch qualitativ unterschiedliche Wirkungen, d.h. das S-Enantiomer zeigt eine agonistische, das R-Enantiomer dagegen eine schwach antagonistische Wirkung [54].

2 Fragestellung

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Mitglieder der TRP-Proteinfamilie wurden ausnahmslos in den letzten 10-15 Jahren in Säugetieren identifiziert. Viele Mitglieder sind bis zum heutigen Zeitpunkt allerdings bezüglich ihrer Aktivierungs- und Regulationsmechanismen sowie Selektivitäts- und Permeationseigenschaften nur unzureichend charakterisiert. Einer der am schlechtesten charakterisierten Mitglieder stellt TRPM3 dar. Zwei der an unserem Institut von der Arbeitsgruppe S. Philipp klonierten fünf murinen Spleißvarianten - TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 - wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit nach heterologer Expression in HEK293-Zellen diesbezüglich elektrophysiologisch untersucht. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf die TRPM3 α 2-Spleißvariante gelegt. Diese unterscheidet sich ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne von der TRPM3 α 1-Spleißvariante und zeigt infolgedessen eine veränderte Ionenselektivität und veränderte Regulation durch extrazelläre, monovalente Kationen. Aufbauend auf in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführten Ca²⁺-Imaging- und Patch-clamp-Messungen sollten folgende Teilprojekte bearbeitet werden: (1) Überprüfung der Aktivierbarkeit von TRPM3 α 2 durch das Neurosteroid Pregnenolonsulfat sowie weiterer Neurosteroiden und durch das 1,4-Dihydropyridin Nifedipin sowie weiterer 1,4-Dihydropyridine und Ausarbeitung der Spezifität und Dosisabhängigkeit der Aktivierung; (2) Untersuchung der Permeabilität von TRPM3 α 2 für monovalente und divalente Kationen und Vergleich mit der von TRPM3 α 1; (3) Untersuchung der Interaktion permeierender Kationen durch TRPM3 α 2; (4) Untersuchung der Regulation von TRPM3 α 2 durch intrazelluläres Mg²⁺, extrazelluläre, monovalente Kationen, extrazelluläre Protonen sowie Lanthanoide und Rutheniumrot und Vergleich mit der von TRPM3 α 1. Durch Bearbeitung dieser Teilprojekte sollten Einblicke in die Aktivierungs- und Regulationsmechanismen sowie in die Poreneigenschaften von TRPM3 - insbesondere der TRPM3 α 2-Spleißvariante - gewonnen werden. Die Kenntnis der Aktivierungs- und Regulationsmechanismen bildet eine wichtige Grundlage für die Identifizierung endogener TRPM3 α 2-Kanäle sowie die Aufklärung von deren Funktion. Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen der TRPM3 α 2- und der TRPM3 α 1-Spleißvariante aber auch zu weiteren Mitgliedern der TRP-Proteinfamilie erlauben desweiteren eine Unterscheidung der TRP-Kanäle voneinander und erleichtern durch Vergleiche die Aufklärung struktureller und funktioneller Eigenschaften.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Mit Ausnahme von Allopregnanolon (Calbiochem, San Diego, USA) wurden alle in der vorliegenden Promotionsarbeit eingesetzten pharmakologisch wirksamen Substanzen (Corticosteron, Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat, Östradiol, Menthol, Nicardipin, Nifedipin, Nimodipin, Nitrendipin, Pregnenolon, Pregnenolonsulfat, Progesteron, N-Vanilloylnonamid) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Pregnenolonsulfat wurde zusätzlich noch von Steraloids (Newport, Rhode Island, USA) erworben. Sonstige Chemikalien, die zur Herstellung der Lösungen verwendet wurden, wurden in den höchsten Reinheitsstufen von Acros Organics (Geel, Belgien), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland), Calbiochem (SanDiego, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Gerbu Biotechnik (Gaiberg, Deutschland), Grüssing (Filsum, Deutschland), Riedel-de-Haën (Seelze, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) geliefert.

3.1.2 Lösungen

LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Tabelle 3.1: PBS pH 7,4

Salz	Konzentration	
	[g/l]	[mmol/l]
NaCl	8,00	136,9
KCl	0,20	2,7
KH ₂ PO ₄	0,20	1,5
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,44	8,1

Die PBS pH 7,4-Lösung wurde bei 121 °C und 1 bar 20 min autoklaviert.

Trypsin/EDTA

Die 10x Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde 1:10 in PBS pH 7,4 verdünnt.

LÖSUNGEN FÜR DIE ELEKTROPHYSIOLOGIE

Die extra- und intrazellulären Lösungen, die für die elektrophysiologischen Messungen

eingesetzt wurden, sind zur besseren Übersicht in den jeweiligen Kapiteln, in denen sie Verwendung fanden, aufgeführt.

Die Einstellung der Osmolalität erfolgte mit einem Gefrierpunktsmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin, Deutschland) und die Einstellung des pH-Wertes mit einem pH-Meter (pH-Meter pH523, WTW, Weilheim, Deutschland).

Mit Ausnahme der ATP-haltigen Lösungen, die bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt wurden, wurden die extra- und intrazellulären Lösungen bei $+4\text{ °C}$ im Kühlschrank gelagert.

3.1.3 Zellmedien und Zellmedienzusätze

Alle Zellmedium und Zellmedienzusätze wurden von Invitrogen (San Diego, USA) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

3.1.4 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Patch-clamp-Messungen verwendet:

- HEK293-Zelllinie (human embryonic kidney cell line) [56]
Bezugsquelle: ATCC CLR 1573
- RBL2H3-Zelllinie (rat basophilic leukemia cell line)
Bezugsquelle: Professor Dr. K. Aktories, Freiburg
- COS7-Zelllinie (african green monkey kidney cell line) [52]
Bezugsquelle: ATCC CRL 1651
- INS1-Zelllinie (rat insulinoma cell line) [4]
Bezugsquelle: Professor Dr. P.O. Berggren, Stockholm

Zusätzlich zu diesen Zelllinien standen noch folgende stabil transfizierte HEK293-Zelllinien für die Patch-clamp-Messungen zur Verfügung:

- stabil mit TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 transfizierte HEK293-Zelllinie
(zur Verfügung gestellt von Dr. S. Philipp [129])
Den cDNAs von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 waren hierbei im Leseraster am 5'-Ende ein Myc-Tag und am 3'-Ende eine Sequenz, die für das Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) kodiert, angegliedert.
- stabil mit TRPM8 transfizierte HEK293-Zelllinie
(zur Verfügung gestellt von Dr. U. Wissenbach [41])

3.1.5 cDNAs

Für die transiente Transfektion standen folgende cDNAs zur Verfügung:

- cDNA von Maus TRPM3 α 1 im pcAGGS IRES GFP-Vektor mit Myc-Tag (erhalten von Dr. S. Philipp)
Der cDNA von TRPM3 α 1 war hierbei im Leseraster am 5'-Ende ein Myc-Tag angegliedert.
- cDNA von Maus TRPM3 α 1 im pcAGGS IRES GFP-Vektor ohne Myc-Tag (erhalten von Dr. S. Philipp)
- cDNA von Maus TRPM3 α 2 im pcAGGS IRES GFP-Vektor mit Myc-Tag (erhalten von Dr. S. Philipp)
Der cDNA von TRPM3 α 2 war hierbei im Leseraster am 5'-Ende ein Myc-Tag angegliedert.
- cDNA von Maus TRPM3 α 2 im pcAGGS IRES GFP-Vektor ohne Myc-Tag (erhalten von Dr. S. Philipp)
- cDNA von Ratte TRPV1 im pcDNA3-Vektor (erhalten von Dr. B. Niemeyer, zur Verfügung gestellt von Professor Dr. M. Caterina, Baltimore)
Der cDNA von TRPV1 war hierbei im Leseraster am 3'-Ende eine Sequenz angegliedert, die für das Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) kodiert.
- cDNA der α 1c-Untereinheit des spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanals aus der Maus im pcAGGS-Vektor (erhalten von S. Link und Prof. Dr. V. Flockerzi, noch nicht veröffentlicht)
- cDNA der β 2.3-Untereinheit des spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanals aus der Maus im pcAGGS-Vektor (erhalten von S. Link und Prof. Dr. V. Flockerzi, noch nicht veröffentlicht)
- cDNA des Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) im pcDNA3-Vektor

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur und Zelltransfektion

Alle im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm² großen Gewebekulturflaschen in einer befeuchteten, 5% CO₂-enthaltenden Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Hierzu wurden die nachfolgend aufgeführten Kulturmedien verwendet:

- HEK293-Zelllinie bzw. stabil transfizierte HEK293-Zelllinie :
Minimum essential medium (MEM) mit Earle´s Salzen + L-Glutamin, supplementiert mit 10% fötalem Rinderserum. Dem Kulturmedium der stabil transfizierten HEK293-Zellen wurde zusätzlich noch 1% Geneticin (G418) zugesetzt.
- RBL2H3-Zelllinie:
Minimum essential medium (MEM) alpha mit Earle´s Salzen + L-Glutamin, ohne Ribonukleotide/Desoxyribonukleotide, supplementiert mit 15% fötalem Rinderserum, 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) und 1% L-Glutamin
- COS-Zelllinie:
Dubecco´s modifiziertes Eagle Medium mit 4500 mg D-Glucose, L-Glutamin + Natriumpyruvat, supplementiert mit 10% fötalem Rinderserum
- INS1-Zelllinie:
RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% fötalem Rinderserum, 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin), 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES und 50 μ M β -Mercaptoethanol

Zur Reduktion der Zelldichte wurden die Zellen zwei- bis dreimal wöchentlich mit Trypsin/EDTA passagiert.

Während die stabil transfizierten HEK293-Zellen nach Trypsinierung mit Trypsin/EDTA und anschließender Ausplattierung in Kulturschälchen mit einem Durchmesser von 35 mm direkt für die Patch-clamp-Messungen genutzt werden konnten, wurden die Zellen der übrigen Zelllinien zunächst einer transienten Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Polyfect (Quiagen, Hilden, Deutschland) unterzogen. Hierbei handelt es sich um ein Dendrimer, an dessen verzweigten Enden positiv geladene Aminogruppen gebunden sind, die mit der negativ geladenen cDNA interagieren. Die daraus resultierenden kompakten Strukturen aus Polyfect und cDNA werden nach Bindung an die Zelloberfläche der Zellen über unspezifische Endocytose in diese aufgenommen. Für die transiente Transfektion wurden die Zellen nach Trypsinierung mit Trypsin/EDTA ebenfalls in Kulturschälchen mit einem Durchmesser von 35 mm ausplattiert und bis zu einer Zelldichte von 70-80% heranwachsen gelassen. Diese wurde in Abhängigkeit von der Zelllinie 1-2 Tage nach Ausplattierung erreicht. Zur transienten Transfektion wurde in einem 1 ml Eppendorf-Gefäß zunächst 100 μ l OptiMEM (Invitrogen, San Diego, USA) vorgelegt und anschließend 3 μ g der entsprechenden cDNA und 9 μ l Polyfect zupipettiert. Nach kurzem Mischen wurde das Gemisch aus cDNA und Polyfect dann 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 2 ml PBS pH 7,4

gewaschen und mit 1,5 ml frischem Kulturmedium versehen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch aus cDNA und Polyfect mit 0,6 ml frischem Kulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. 24-48 Stunden nach der transienten Transfektion wurden die transfizierten Zellen zur Reduktion der Zelldichte erneut mit Trypsin/EDTA trypsiniert und dünn in Kulturschälchen mit einem Durchmesser von 35 mm für die Patch-clamp-Messungen ausplattiert.

Unmittelbar vor den Patch-clamp-Messungen, die in der Regel 12-24 Stunden nach Ausplattierung erfolgten, wurden die Zellen dreimal mit der Standardbadlösung gewaschen. Für die anschließend bei Raumtemperatur durchgeführten Patch-clamp-Messungen wurden nur einzeln liegende, nicht mit anderen Zellen in Kontakt stehende Zellen verwendet.

3.2.2 Patch-clamp-Technik

Die Patch-clamp-Technik, die 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt wurde und für die sie 1991 den Nobelpreis in Physiologie und Medizin erhielten, zählt heute zu den Standardmessverfahren der Elektrophysiologie. Mit ihrer Hilfe können Ionenkanäle in den Plasmamembranen der Zellen charakterisiert werden.

Eine ausführliche Beschreibung der Patch-clamp-Technik findet sich bei Hamill et al., 1981 [63]. Für die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Patch-clamp-Messungen wurde ausschließlich die dort beschriebene tight-seal, whole-cell-Konfiguration genutzt. Die einzelnen Schritte, die zum Erreichen dieser Konfiguration erforderlich sind, sollen im folgenden kurz beschrieben werden.

In einem ersten Schritt wird zunächst die sogenannte Patch-clamp-Pipette vorsichtig auf die Zelloberfläche der intakten Zelle aufgesetzt und anschließend ein leichter Unterdruck an deren hinteren Ende angelegt. Dieser bewirkt, dass die Zellmembran etwas in die Patch-clamp-Pipette hineingezogen wird und sich ein enger Kontakt zwischen dieser und der Glaswand der Patch-clamp-Pipette ausbildet. Da hierbei Abdichtwiderstände in der Größenordnung von mehreren Gigaohms erreicht werden, spricht man auch von einem Gigaseal. Mit der Ausbildung des Gigaseals ist die sogenannte „cell-attached“- bzw. „on-cell“-Konfiguration erreicht. In einem zweiten Schritt wird nun durch erneutes Anlegen eines etwas stärkeren Unterdrucks die Zellmembran unterhalb der Patch-clamp-Pipette aufgebrochen, während der Gigaseal erhalten bleibt. Durch diesen Vorgang wird die „whole-cell“-Konfiguration erreicht. In dieser Konfiguration wird von der gesamten Zellmembran abgeleitet. Gleichzeitig bietet diese Konfiguration die Möglichkeit, über die Zusammensetzung der Pipettenlösung die Zelle von innen her zu manipulieren.

Die für die Patch-clamp-Messungen benötigten Patch-clamp-Pipetten wurden aus dünnwandigem (Kimax-51, Kimble, New Jersey, USA) bzw. aus dickwandigem Borsilikatglas

(GB150T-8P, Science Products, Hofheim, Deutschland) mit Hilfe eines vertikalen (Feinmechanik H. Orcherzki, Homburg/Saar, Deutschland) bzw. horizontalen Pullers (DMZ Universal Puller, Zeitz, München, Deutschland) durch zweimaliges Erhitzen und Ausziehen hergestellt. Zur Verbesserung des Seals wurden die Öffnungen zum Teil durch nochmaliges kurzes Erhitzen poliert. Unmittelbar vor der jeweiligen Patch-clamp-Messung wurden die Patch-clamp-Pipetten mit der gewünschten intrazellulären Lösung befüllt und zur Reduktion der kapazitiven Transienten mit Sigmacote (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) beschichtet. Die Pipettenwiderstände lagen nach Eintauchen in die Standardbadlösung bei 2-5 M Ω .

Im folgenden soll der Aufbau der Patch-clamp-Messstände, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit für die Patch-clamp-Messungen verwendet wurden, kurz beschrieben werden. Auf dem Objektisch eines invertierten Mikroskopes (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen, Deutschland bzw. Nikon Eclipse TE 2000U, Nikon, Düsseldorf, Deutschland), das auf einem schwingungsgedämpften Tisch stand und ferner von einem Faraday'schen Käfig umgeben war, war eine Kammer angebracht, in die das Kulturschälchen mit den Zellen eingesetzt wurde. Eine Verschiebung der Kammer in xy-Richtung war hierbei möglich. Der Patch-clamp-Vorverstärker, auch „Headstage“ genannt, befand sich auf einem Halter, der an einem in xyz-Richtung steuerbaren Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) am Mikroskop befestigt war. An dem Vorverstärker war ein Elektrodenhalter mit einem chloridierten Silberdraht befestigt, auf den die mit intrazellulärer Lösung befüllten Patch-clamp-Pipetten aufgesteckt wurden. Als Referenzelektrode diente ein chloridierter Silberdraht, der in die Standardbadlösung eingetaucht wurde. In späteren Patch-clamp-Experimenten wurde dieser durch eine handgefertigte Agarbrücke ersetzt. Zur Herstellung der Agarbrücke wurde 1% Agarose in Standardbadlösung aufgeköcht und im noch flüssigen Zustand in einen PAE-Schlauch (neoLab-PAE-Mikroschlauch 0,86 x 1,52 mm, neoLab, Heidelberg, Deutschland) gefüllt. Der Vorverstärker war an den Hauptverstärker (EPC9 bzw. EPC10, HEKA, Lambrecht, Deutschland) angeschlossen, der von einem Computer angesteuert wurde. Ein handgefertigtes, gravitationsgetriebenes Perfusionssystem mit geringem Totvolumen, das den schnellen Austausch der extrazellulären Lösungen ermöglichte, wurde mit Hilfe eines handbetriebenen, ebenfalls am Mikroskop befestigten Mikromanipulator, mit seiner Öffnung unmittelbar vor der jeweiligen Zelle plaziert (Abstand < 200 μ m). Die Halterung des Perfusionssystem war am Faraday'schen Käfig befestigt.

Die Standard tight-seal, whole-cell Patch-clamp-Messungen wurden unter der Kontrolle der Pulse bzw. Patchmaster Software (HEKA, Lambrecht, Deutschland) durchgeführt. Die Datenaquisition erfolgte hierbei in Intervallen von höchstens 100 μ s mit einer Filterfrequenz von 2,9 kHz. Die Filterung wurde vor Digitalisierung der Signale vorgenommen.

Die digitalisierten Daten wurden anschließend noch um die Potentialdifferenz zwischen der Standardbadlösung und der intrazellulären Lösung (das sogenannte „Liquid junction potential“), nicht jedoch um die Potentialdifferenz zwischen den eingesetzten extrazellulären Lösungen, korrigiert. Ebenso wurde auf die Korrektur des Oberflächenpotentials (das sogenannte „Surface potential“) verzichtet. Die Kalkulation des „Liquid junction potentials“ erfolgte mit Clampex 8.1 (Axon instruments, Union City, Kanada). Zur Bestimmung der Strom-Spannungscharakteristika wurden Spannungsrampen im Bereich von -115 mV bis $+85$ mV (schon „Liquid junction potential“ korrigiert) appliziert. Ausgehend von einem Haltepotential von -15 mV wurde die Spannung nach einem Sprung zu -115 mV über einen Zeitraum von 200 ms auf $+85$ mV erhöht (Rate: 1 mV/ms). Sowohl die Zellkapazität als auch der Serienwiderstand wurden vor jeder applizierten Spannungsrampe automatisch kompensiert. Eine 80% Reduktion des gemessenen Serienwiderstandes wurde elektronisch durchgeführt. Die gemessenen Stromantworten auf die applizierten Spannungen wurden als Strom-Spannungskennlinien dargestellt.

3.2.3 Auswertung und Statistik

Die Ströme bei Spannungen von -80 und $+80$ mV sowie die Umkehrpotentiale wurden nachträglich aus den Strom-Spannungskennlinien extrahiert. Zur weiteren Auswertung wurden die Daten in IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) importiert. Die statistische Auswertung erfolgte in Microsoft Excel und die Kurvenanpassung in GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA). Die Abbildungen wurden in Microcal Origin (OriginLab Corporation, Northampton, USA) angefertigt.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz zwischen den Mittelwerten wurde unter Verwendung eines zweiseitigen, gepaarten bzw. ungepaarten T-Tests nach Student ermittelt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bei $P < 0,05$ angesehen. Statistisch signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ wurden mit *, von $P < 0,01$ mit ** und von $P < 0,001$ mit *** gekennzeichnet.

4 Aktivierung von TRPM3

4.1 Zusammenfassung

Neurosteroiden sind im Nervensystem an der Modulation zahlreicher ionotroper Neurotransmitter-Rezeptoren beteiligt. In diesem Kapitel wurde ihre Wirkung auf den im Gehirn exprimierten, Ca^{2+} -permeablen Kationenkanal TRPM3 α 2 mit Hilfe der Elektrophysiologie untersucht. Gezeigt werden konnte, dass Pregnenolonsulfat TRPM3 α 2 spezifisch aktivierte, da weder TRPM3 α 1 - eine weitere sich ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion von TRPM3 α 2 unterscheidende TRPM3-Spleißvariante - noch weitere Mitglieder der TRPM-Proteinfamilie (TRPM7, TRPM8) eine Aktivierung zeigten. Mit Ausnahme von TRPM7 wurde hier in Gegenwart von μM -Konzentrationen an Pregnenolonsulfat eine Hemmung beobachtet. Die Pregnenolonsulfat strukturell sehr nahe stehenden Neurosteroiden Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolon führten ebenfalls zu einer Aktivierung von TRPM3 α 2, die im Vergleich zu Pregnenolonsulfat allerdings deutlich schwächer war. Andere getestete Steroide (Allopregnanolon, Corticosteron, Progesteron, Östradiol) erwiesen sich dagegen als nahezu unwirksam. Die Aktivierung durch Pregnenolonsulfat war reversibel und konzentrationsabhängig (EC_{50} -Werte: 23 μM (-80 mV) und 12 μM (+80 mV), Hillkoeffizienten: 1,7 und 1,8) und wurde nur in Gegenwart von extrazellulärem, nicht jedoch in Gegenwart von intrazellulärem Pregnenolonsulfat beobachtet. Infolgedessen scheint Pregnenolonsulfat TRPM3 α 2 ausschließlich von der extrazellulären Seite her anzugreifen. Interessanterweise aktivierte auch der L-Typ Ca^{2+} -Kanallocker Nifedipin TRPM3 α 2 reversibel und konzentrationsabhängig (EC_{50} -Werte: 34 μM (-80 mV) und 32 μM (+80 mV), Hillkoeffizienten: 1,9 und 1,8). Andere getestete L-Typ Ca^{2+} -Kanallocker zeigten dagegen nur eine schwache (Nitrendipin, Nimodipin) bzw. keine Aktivierung (Nifedipin). Die Aktivierung war auch hier spezifisch für TRPM3 α 2, da TRPM3 α 1, TRPM7 und TRPM8 keine vergleichbare Aktivierung zeigten. Bei gleichzeitiger Applikation von Pregnenolonsulfat und Nifedipin wurde eine Potenzierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes in Form eines supraadditiven Effektes beobachtet. Bei gleichzeitiger Applikation von Pregnenolonsulfat und Nimodipin kam es dagegen zu einer Hemmung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes. Folglich scheinen 1,4-Dihydropyridine an eine von Pregnenolonsulfat abweichende Bindungsstelle zu binden.

Die hier gezeigte Aktivierung durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin bildet sowohl für die weitere Charakterisierung von TRPM3 α 2 als auch für die Identifizierung endogener TRPM3 α 2-Kanäle und die Aufklärung von deren Funktion eine wichtige Grundlage.

4.2 Einleitung

TRPM3, der bezüglich seiner biophysikalischen Eigenschaften und seiner Funktion zu den am schlechtesten charakterisierten Mitgliedern der gesamten TRP-Proteinfamilie zählt, weist die größte bislang für einen TRP-Kanal beschriebene Anzahl an Spleißvarianten auf. Neben sieben humanen Spleißvarianten (TRPM3a-f [97], TRPM3₁₃₂₅ [59]) sind noch fünf murine Spleißvarianten (TRPM3 α 1-5 [129]) bekannt. Zwei dieser murinen Spleißvarianten - TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 - unterscheiden sich ausschließlich innerhalb der mutmaßlichen Porenregion zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne voneinander. Bei TRPM3 α 2 ist hier eine 12 Aminosäuren lange Sequenz deletiert und zusätzlich ein Alanin durch Prolin substituiert. Dieser Unterschied hat eine veränderte Ionenselektivität von TRPM3 α 2 zur Folge. Im Vergleich zu TRPM3 α 1, der nur eine geringe Permeabilität für divalente Kationen aufweist, zeichnet sich TRPM3 α 2 durch eine höhere Permeabilität für divalente Kationen aus [129] (siehe auch Kapitel 5). Diese hohe Permeabilität für divalente Kationen ermöglichte es, mit diesem Kanal Ca²⁺-Imaging-Experimente durchzuführen. Da die Kenntnis spezifischer Agonisten und Antagonisten für die weitere Charakterisierung von TRPM3 α 2 sowie für die Aufklärung von dessen Funktion unumgänglich ist, wurden auf diesem Wege verschiedenste Substanzen auf ihre agonistische bzw. antagonistische Wirkung hin getestet. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf Substanzen gelegt, die ihre Wirkung im Gehirn entfalten, da die Expression von TRPM3 dort besonders hoch ist [46, 59, 90, 97, 129]. Neben Aminosäuren und Neurotransmittern wurden auch Neurosteroiden getestet (siehe Tabelle 4.1).

Neurosteroiden sind Steroidhormone, die im Nervensystem von Neuronen und Gliazellen de-novo aus Cholesterol oder einem anderen frühen Vorläufersteroid synthetisiert werden und dort einen physiologischen Effekt haben [165]. Im Gegensatz zu den klassischen Steroidhormonen der Gonaden (Ovarien, Testes) und der Nebenniere, die ihr Zielorgan über die Blutbahn erreichen (endokrine Wirkweise), wird angenommen, dass Neurosteroiden direkt in einer parakrinen und autokrinen Weise am Ort ihrer Bildung wirken [165]. Neben den klassischen genomischen Effekten, d.h. der Regulation der Gentranskription, können sie im Nervensystem durch Interaktion mit verschiedensten, membranständigen Neurotransmitter-Rezeptoren (NMDA-, AMPA-, Kainat-, Sigma1-, GABA_A-, Glycin-, nikotinischer Acetylcholin-, 5HT₃-, Oxytocin-Rezeptoren) noch zusätzlich zahlreiche nicht-genomische Effekte ausüben [155]. Hierzu zählen u.a. die Modulation der Aktivität und Plastizität von Neuronen und die Modulation der Neurotransmitter- und Neuropeptidfreisetzung. Aus diesem Grunde werden ihnen neuroprotektive, neurotrophische, anästhetische, anxiolytische, antipsychotische, antikonvulsive, antidepressive, hypnotische, sedative, schlafmodulierende und gedächtnisfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Wäh-

Substanzklasse	Substanz
Neurosteroide +Synthesestufen +Metaboliten	Cholesterol, Cholesterolsulfat, Pregnenolon, Pregnenolonsulfat, Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat, 7 α -Hydroxydehydroepiandrosteron, Progesteron, Allopregnanolon, Epiallopregnanolon, Androstendion, Testosteron, Estron, Estradiol, Estriol, Cortisol, Corticosteron, Aldosteron
L-Typ Ca ²⁺ -Blocker	Diltiazem, Nifedipin, Nicardipin, Nimodipin, Nitrendipin, Verapamil

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der im Ca²⁺-Imaging-Experiment getesteten Neurosteroide und 1,4-Dihydropyridine.

rend die genomischen Effekte relativ langsam (Minuten-Stunden) sind und sehr lange andauern (Tage-Monate) können, setzen diese nichtgenomischen Effekte relativ schnell (Millisekunden-Sekunden) ein [155, 165]. Die Wirkung von Neurosteroiden auf TRP-Kanäle - eine große, heterogene Familie von Kationenkanälen - wurde bislang kaum untersucht, obwohl die Expression vieler TRP-Kanäle im zentralen und peripheren Nervensystem bereits nachgewiesen wurde. Lediglich für TRPV1 wurde bislang eine Hemmung durch Pregnenolonsulfat beschrieben [21].

Bei der Suche nach spezifischen TRPM3 α 2-Agonisten, bei der auch die in Tabelle 4.1 aufgeführten Neurosteroide in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe von Ca²⁺-Imaging-Experimenten auf ihre agonistische Wirkung hin geprüft wurden, führten vier der getesteten Neurosteroide - Pregnenolonsulfat, Pregnenolon, Dehydroepiandrosteronsulfat und Dehydroepiandrosteron - zu einem erhöhten Ca²⁺-Signal. Die getesteten Aminosäuren und Neurotransmitter sowie andere Steroide zeigten dagegen keinen Effekt [193]. Bei der Suche nach spezifischen Antagonisten wurden auch die spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanalblocker Verapamil, Diltiazem und Nifedipin getestet. Während Verapamil und Diltiazem keine Wirkung auf TRPM3 α 2 ausübten, führte Nifedipin überraschenderweise ebenfalls zu einem erhöhten Ca²⁺-Signal. Die drei von Nifedipin abgeleiteten 1,4-Dihydropyridine Nicardipin, Nimodipin und Nitrendipin, die sich ausschließlich in den Alkylresten in Position 3 und 5 des 1,4-Dihydropyridinringes und im Substitutionsmuster des Phenylringes von diesem unterscheiden, zeigten dagegen keinen Effekt [193].

In diesem Kapitel wurde nun die agonistische Wirkung der Neurosteroide Pregnenolonsulfat, Pregnenolon, Dehydroepiandrosteronsulfat und Dehydroepiandrosteron sowie des 1,4-Dihydropyridins Nifedipin mit Hilfe der Elektrophysiologie näher untersucht. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf die Spezifität und die Dosisabhängigkeit der Aktivierung gelegt, da diese für die Beantwortung der Frage nach der physiologischen Funktion von TRPM3-

Kanälen eine bedeutende Rolle spielen.

4.3 Materialien und Methoden

4.3.1 Materialien

Mit Ausnahme der extra- und intrazellulären Lösungen, die für die elektrophysiologischen Messungen eingesetzt wurden, sind die übrigen in diesem Kapitel verwendeten Materialien in Kapitel 3 Abschnitt 3.1 aufgeführt.

LÖSUNGEN FÜR DIE ELEKTROPHYSIOLOGIE

In allen Experimenten wurde als extrazelluläre Lösung die in Tabelle 4.2 aufgeführte Standardbadlösung und als intrazelluläre Lösung eine der in Tabelle 4.3 aufgeführten divalentfreien, Cs⁺-haltigen intrazellulären Lösungen verwendet.

Extrazelluläre Lösungen

Tabelle 4.2: **Standard-Badlösung**

Nr	Na ⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	K ⁺ [mM]	Ca ²⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
E1	142-149	10	3	2	2	160-167	10	3-15

pH-Wert: 7,2-7,3 (eingestellt mit NaOH)

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321-333 (eingestellt mit D-Glucose)

Intrazelluläre Lösungen

Tabelle 4.3: **Intrazelluläre Lösungen**

Nr	Cs ⁺ [mM]	Asp ⁻ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EGTA [mM]	EDTA [mM]	BAPTA [mM]	ATP [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
I1	165-173	100	45-46	10	-	-	-		0-3
I2	187-189	80	45	-	5	10	4 (Na)	10	-
I3	189-192	80	45	-	5	10	4 (Tris)	10	-

pH-Wert: 7,2-7,3 (eingestellt mit CsOH)

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 303-309 (eingestellt mit D-Glucose)

Stocklösungen

Die zu testenden Substanzen wurden in Wasser (Pregnenolonsulfat: 0,35 mM bzw. 3,5 mM), absolutem Ethanol (Allopregnanolon: 50 mM, Corticosteron: 25 mM, Menthol: 500 mM, Nifedipin: 25 mM, Progesteron: 25 mM), DMSO (Dehydroepiandrosteron: 50 mM bzw. 200 mM, Dehydroepiandrosteronsulfat: 50 mM, Estradiol: 50 mM, Nicardipin: 50 mM, Nifedipin: 21 mM, 50 mM bzw. 100 mM, Nimodipin: 21 mM bzw. 50 mM, Nifedipin: 50 mM, Pregnenolon: 50 mM, Pregnenolonsulfat: 50 mM) oder direkt in der Standardbadlösung E1 (Dehydroepiandrosteronsulfat: 3,5 mM) gelöst. Die für die Patch-clamp-Messungen verwendeten Lösungen wiesen infolgedessen DMSO-Konzentrationen von 0,1% und Ethanolkonzentrationen von 0,01-0,14% auf. Diese Konzentrationen an DMSO und Ethanol führten in HEK293-Zellen sowie TRPM3 α 2 und TRPM3 α 1 exprimierenden HEK293-Zellen zu keinem Effekt. Höhere Konzentrationen an Ethanol übten dagegen einen Effekt auf HEK293-Zellen aus und führten in TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen in Kombination mit Nifedipin bzw. Pregnenolonsulfat zu einer Potenzierung des TRPM3 α 2-Stromes. In den aus den wässrigen Pregnenolonsulfat-Stocklösungen hergestellten Pregnenolonsulfat-haltigen Standardbadlösungen waren die Ionenkonzentrationen um 0,01-4% niedriger als in Tabelle 4.2 angegeben.

4.3.2 Methoden

Die nachfolgend gezeigten tight-seal, whole-cell Patch-clamp-Messungen wurden, wie in Kapitel 3 Abschnitt 3.2 beschrieben, durchgeführt.

EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

Aktivierung von TRPM3 α 2 durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin

Zur Überprüfung der Aktivierbarkeit von TRPM3 α 2 durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin wurden als extrazelluläre Lösungen neben der Standardbadlösung (Lösung E1) noch eine 10,5 μ M Pregnenolonsulfat-enthaltende und eine 100 μ M Nifedipin-enthaltende Standardbadlösung eingesetzt. Die Pregnenolonsulfat-haltige und die Nifedipin-haltige Standardbadlösung wurden in zwei unabhängigen Experimenten für jeweils 10 Sekunden appliziert. Als intrazelluläre Lösung wurde in diesen Experimenten die Lösung I1 verwendet.

Wirkung weiterer Steroide auf TRPM3 α 2

Zur Untersuchung der agonistischen Wirkung weiterer Steroide auf TRPM3 α 2 wurden der Standardbadlösung (Lösung E1) 50 μ M Pregnenolon, 50 μ M Dehydroepiandrosteron-

sulfat, 50 μM Dehydroepiandrosteron und 50 μM Östradiol bzw. 35 μM Progesteron, 35 μM Allopregnanolon und 35 μM Corticosteron zugesetzt. Eine Reduktion der zugesetzten Steroidkonzentration von 50 μM auf 35 μM war bei Progesteron, Allopregnanolon und Corticosteron aufgrund der äußerst geringen Wasserlöslichkeit und des Auftretens von Präzipitationen erforderlich. Die Applikation der steroid-haltigen Lösungen erfolgte für jeweils 10 Sekunden. 50 bzw. 35 μM Pregnenolonsulfat wurden in allen Experimenten zum Vergleich immer mit vermessen und dienten bei der späteren Auswertung als Bezugswert. Als intrazelluläre Lösungen wurden in diesen Experimenten die Lösungen I2 und I3 verwendet.

Wirkung weiterer 1,4-Dihydropyridine auf TRPM3 α 2

Zur Untersuchung der agonistischen Wirkung weiterer 1,4 Dihydropyridine auf TRPM3 α 2 wurden der Standardbadlösung (Lösung E1) 50 μM Nicardipin, 50 μM Nimodipin, 50 μM Nitrendipin und 50 μM Nifedipin zugesetzt. Die Applikation der 1,4-Dihydropyridin-haltigen Lösungen erfolgte für jeweils 10 Sekunden. 35 μM Pregnenolonsulfat wurde in allen Experimenten zum Vergleich immer mit vermessen und diente bei der späteren Auswertung als Bezugswert. Als intrazelluläre Lösung wurde in diesem Experiment die Lösung I3 verwendet.

Spezifität der Aktivierung

Zur Überprüfung der Aktivierbarkeit von TRPM3 α 2 in RBL2H3-Zellen und COS7-Zellen wurden neben der Standardbadlösung (Lösung E1) noch eine 50 μM Nifedipin-enthaltende und eine 35 μM Pregnenolonsulfat-enthaltende Standardbadlösung eingesetzt. Beide Lösungen wurden für jeweils 15 Sekunden appliziert. Als intrazelluläre Lösung wurde in diesem Experiment die Lösung I1 verwendet.

Zur Untersuchung der agonistischen Wirkung von Nifedipin auf TRPM3 α 1 wurde wie auch bei TRPM3 α 2 als extrazelluläre Lösung neben der Standardbadlösung (Lösung E1) noch eine 100 μM Nifedipin-enthaltende Standardbadlösung eingesetzt. Die Applikation der Nifedipin-haltigen Standardbadlösung erfolgte nach maximaler Aktivierung des TRPM3 α 1-Stromes für jeweils 10 Sekunden. Als intrazelluläre Lösung wurde in diesem Experiment die Lösung I1 verwendet. Zur Untersuchung der agonistischen Wirkung von Nifedipin und Pregnenolonsulfat auf TRPM8 wurden neben der Standardbadlösung (Lösung E1) noch eine 50 μM Nifedipin-enthaltende und eine 35 μM Pregnenolonsulfat-enthaltende Standardbadlösung eingesetzt. Beide Lösungen wurden für jeweils 10 Sekunden appliziert. Die zusätzliche Applikation einer 50 μM Menthol-enthaltenden Standardbadlösung diente der Verifizierung der TRPM8-Expression. Als intrazelluläre Lösung wurde in diesem Experiment die Lösung I3 verwendet.

Dosisabhängigkeit der Aktivierung

Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Aktivierung von TRPM3 α 2 durch Pregnenolonsulfat, Pregnenolon, Dehydroepiandrosteronsulfat, Dehydroepiandrosteron und Nifedipin wurden der Standardbadlösung (Lösung E1) Pregnenolonsulfat-Konzentrationen zwischen 0,035 und 140 μ M, Pregnenolon-Konzentrationen zwischen 1 und 100 μ M, Dehydroepiandrosteronsulfat-Konzentrationen zwischen 1,96 und 3500 μ M, Dehydroepiandrosteron-Konzentrationen zwischen 1 und 200 μ M und Nifedipin-Konzentrationen zwischen 1 und 100 μ M zugesetzt. Mit Ausnahme der Pregnenolon-haltigen Standardbadlösungen, die aufgrund der verlangsamten Aktivierung für 20 Sekunden appliziert wurden, erfolgte die Applikation der übrigen Lösungen für jeweils 10-15 Sekunden. Die 3,5 μ M Pregnenolonsulfat-, 10 μ M Pregnenolon-, 49 μ M Dehydroepiandrosteronsulfat-, 50 μ M Dehydroepiandrosteron- und 25 μ M Nifedipin-enthaltende Standardbadlösung wurde in den entsprechenden Experimenten zum Vergleich immer mit vermessen und diente bei der späteren Auswertung als Bezugswert. Durch die auf die 3,5 μ M Pregnenolonsulfat-, 10 μ M Pregnenolon-, 49 μ M Dehydroepiandrosteronsulfat-, 50 μ M Dehydroepiandrosteron- und 25 μ M Nifedipin-enthaltende Standardbadlösung bezogenen Werte wurden anschließend mit GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA) Hillfunktionen gefittet, wobei die Minima konstant bei Null gehalten wurden. Anschließend wurden die auf die 3,5 μ M Pregnenolonsulfat-, 10 μ M Pregnenolon-, 49 μ M Dehydroepiandrosteronsulfat-, 50 μ M Dehydroepiandrosteron- und 25 μ M Nifedipin-enthaltende Standardbadlösung bezogenen Werte zur besseren Übersicht noch durch die aus den Fits erhaltenen Maxima geteilt. Als intrazelluläre Lösungen wurden in diesen Experimenten die Lösungen I2 und I3 verwendet.

Angriffspunkt von Pregnenolonsulfat

Zur Klärung der Frage, ob Pregnenolonsulfat nicht nur bei extrazellulärer sondern auch bei intrazellulärer Applikation zur Aktivierung von TRPM3 α 2 führt, wurden als intrazelluläre Lösungen abwechselnd die Lösung I2 und die Lösung I2 unter Zusatz von 35 μ M Pregnenolonsulfat eingesetzt. Nach Übergang in die whole-cell-Konfiguration wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten die Entwicklung des TRPM3 α 2 Ein- und Auswärtsstromes beobachtet. Bei einem durchschnittlichen Serienwiderstand von $4,6 \pm 0,7$ M Ω (n = 12) sollte sich innerhalb dieser 5 Minuten die jeweilige intrazelluläre Lösung zu über 99,8% mit dem Zytosol der Zelle ausgetauscht haben und mögliche Unterschiede infolge der unterschiedlichen intrazellulären Lösungen erkennbar sein. Für diese Abschätzung wurde die von Pusch und Neher [148] ermittelte Diffusionskonstante von Pyranin, das mit Mr = 405 g/mol ein ähnliches Molekulargewicht wie Pregnenolonsulfat (Mr = 418,5 g/mol) aufweist, herangezogen. Zur Verifizierung der Aktivierbarkeit von TRPM3 α 2 wurde nach 100 und 200 Sekunden für jeweils 10 Sekunden extrazellulär noch eine 35 μ M Pregnenolonsulfat-

enthaltende Standardbadlösung appliziert.

Interaktion von Pregnenolonsulfat und 1,4-Dihydropyridinen

Zur Untersuchung der Interaktion von Pregnenolonsulfat und Nifedipin kamen als extrazelluläre Lösungen neben der Standardbadlösung (Lösung E1) noch eine Pregnenolonsulfat-haltige, eine Nifedipin-haltige und eine Pregnenolonsulfat- und Nifedipin-haltige Standardbadlösung zum Einsatz. Die eingesetzten Konzentrationen an Nifedipin und Pregnenolonsulfat betragen $21 \mu\text{M}$ und lagen somit nahe den ermittelten EC_{50} -Werten (PS: $\text{EC}_{50} = 23 \mu\text{M}$ bei -80 mV , $\text{EC}_{50} = 12 \mu\text{M}$ bei $+80 \text{ mV}$; Nif: $\text{EC}_{50} = 34 \mu\text{M}$ bei -80 mV , $\text{EC}_{50} = 32 \mu\text{M}$ bei $+80 \text{ mV}$) im linearen Bereich der ansonsten sigmoid verlaufenden Dosis-Wirkungskurven, was für die spätere Beurteilung des Effektes - kein Effekt, additiver Effekt oder supraadditiver Effekt - von Bedeutung ist. Zur Untersuchung der Interaktion von Pregnenolonsulfat und Nimodipin wurden Lösungen, die anstelle von Nifedipin Nimodipin enthielten, eingesetzt. Die Lösungen wurden im ersten Experiment für 10 Sekunden und im zweiten Experiment für 10-15 Sekunden appliziert. Als intrazelluläre Lösung wurde in beiden Experimenten die Lösung I3 verwendet.

4.4 Ergebnisse

Aktivierung von TRPM3 α 2 durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin

Die agonistische Wirkung des Neurosteroids Pregnenolonsulfat und des 1,4-Dihydropyridins Nifedipin auf die TRPM3 α 2-Spleißvariante, die in den oben beschriebenen Ca^{2+} -Imaging-Experimenten beobachtet wurde [193], sollte im folgenden mit Hilfe der Elektrophysiologie bestätigt werden. Hierzu wurden whole-cell Patch-clamp-Messungen an HEK293-Zellen, die die TRPM3 α 2-Spleißvariante transient überexprimierten, durchgeführt. Da bereits gezeigt werden konnte, dass TRPM3 durch intrazelluläres Mg^{2+} gehemmt wird [129] (siehe auch Kapitel 7), wurden für diese als auch alle folgenden Patch-clamp-Messungen ausschließlich Mg^{2+} -freie intrazelluläre Lösungen verwendet. Die Applikation einer $10,5 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat-enthaltenden Standardbadlösung führte in den TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen zur Aktivierung eines auswärtsrektifizierenden Stromes, dessen Umkehrpotential bei ca. 0 mV lag (Abbildung 4.1A und B). Die Latenzzeit, die zwischen dem Lösungsmittelwechsel und der Entwicklung des auswärtsrektifizierenden Stromes lag, betrug nur wenige Sekunden und rührte wahrscheinlich zum größten Teil vom Todvolumen des Perfusionssystems her. Der erneute Wechsel zur Standardbadlösung führte zur Inaktivierung des auswärtsrektifizierenden Stromes. In Kontrollzellen war mit $10,5 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat kein derartiger, auswärtsrektifizierender Strom messbar (Abbildung 4.1C). Auch Nifedipin führte in den TRPM3 α 2 exprimieren-

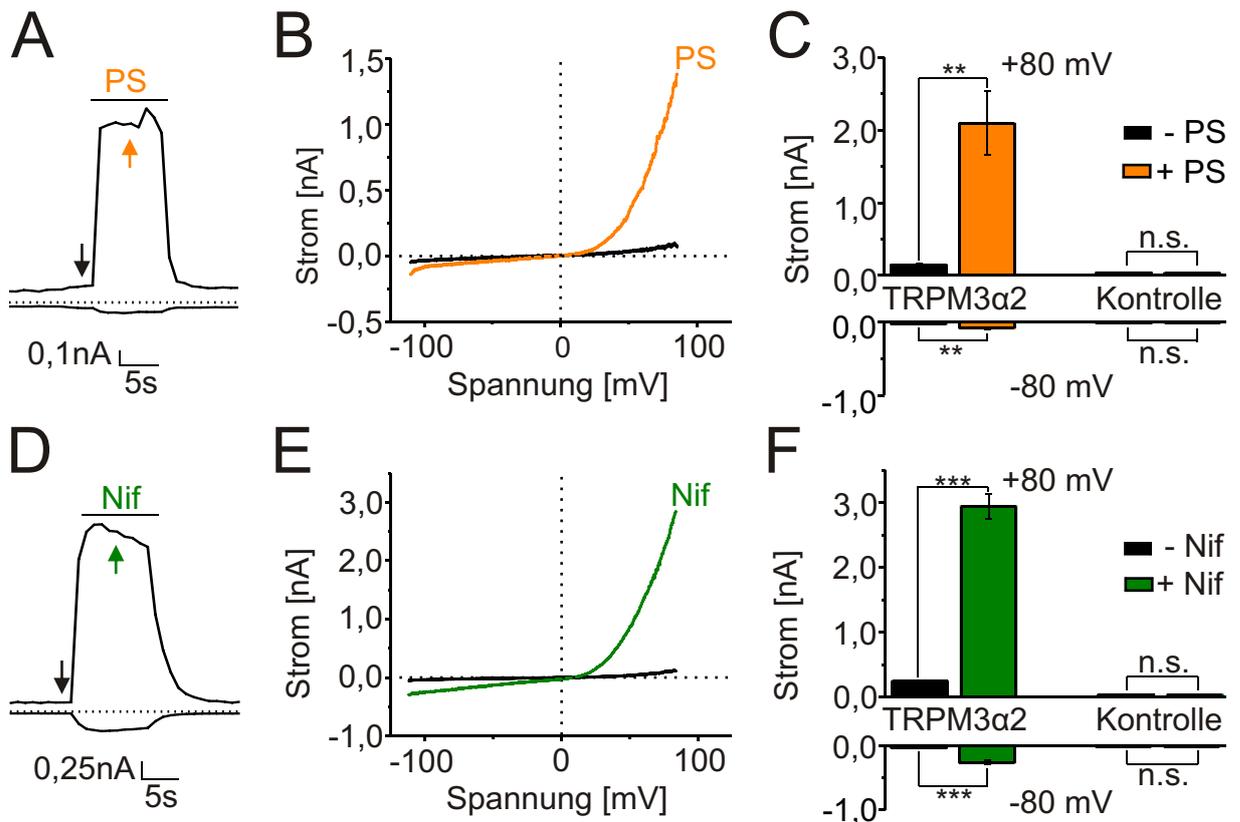


Abb. 4.1: **Aktivierung von TRPM3 α 2 mit Pregnenolonsulfat und Nifedipin (A,D)** Strom einer TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von $10,5 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS) (A) und $100 \mu\text{M}$ Nifedipin (Nif) (D). (B,E) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation von Pregnenolonsulfat (B) und Nifedipin (E) zu den angegebenen Zeitpunkten (Pfeile in Abbildung A und D). (C,F) Statistische Auswertung der Ströme in TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen und in Kontrollzellen vor und während der Applikation von Pregnenolonsulfat ($n \geq 6$) (C) und Nifedipin ($n \geq 7$) (F). Ermittlung der Signifikanzen unter Verwendung eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests nach Student.

den HEK293-Zellen zu einer analogen Aktivierung (Abbildung 4.1D und E). Die eingesetzte Konzentration an Nifedipin war mit $100 \mu\text{M}$ allerdings deutlich höher als die von Pregnenolonsulfat. Auch hier war in Kontrollzellen kein derartiger, auswärtsrektifizierender Strom nachweisbar (Abbildung 4.1F).

Wirkung weiterer Steroide auf TRPM3 α 2

In den Ca^{2+} -Imaging-Experimenten wurden nach Identifizierung von Pregnenolonsulfat als TRPM3 α 2-Agonist noch weitere Steroide auf ihre agonistische Wirkung hin getestet. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf dessen Synthesestufen und dessen Metaboliten gelegt (siehe Tabelle 4.1). Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat, die ebenfalls zu den Neurosteroiden zählen, erwiesen sich in den Ca^{2+} -Imaging-

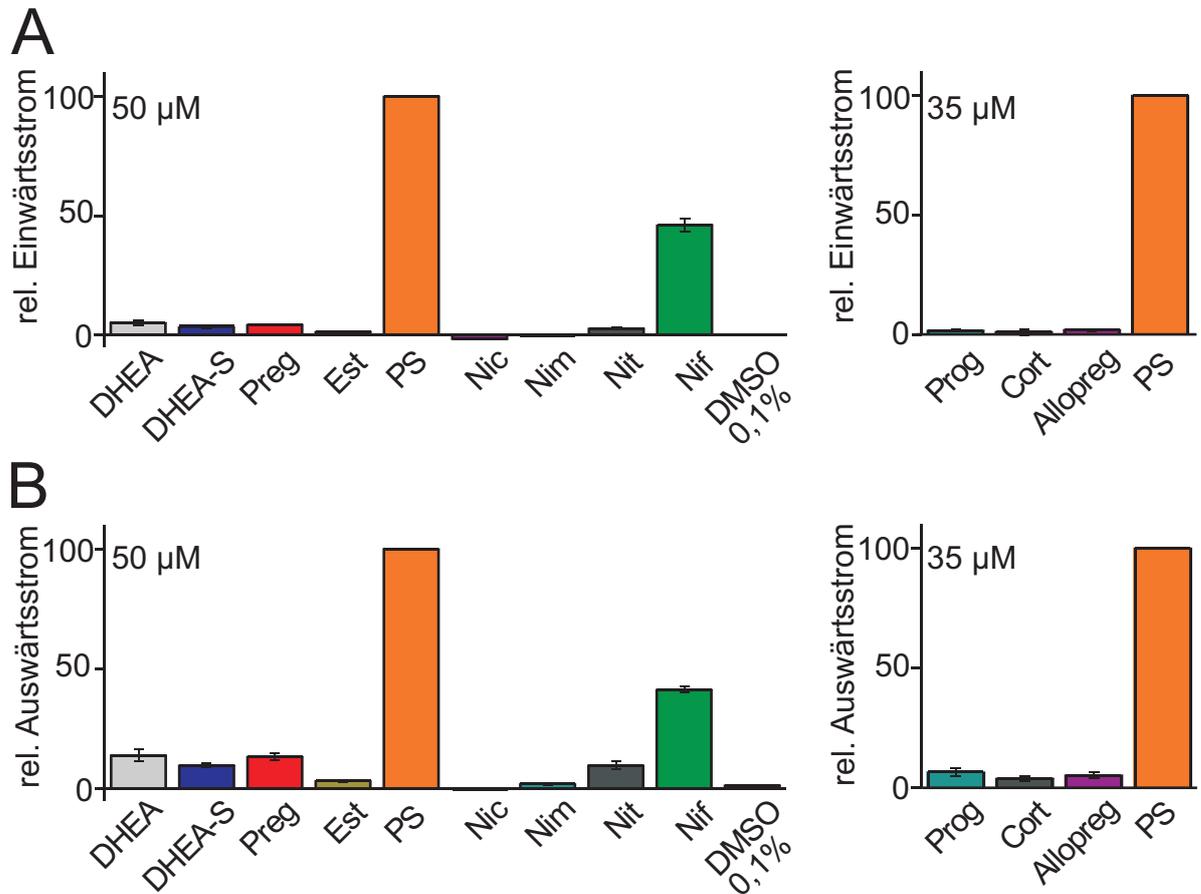


Abb. 4.2: **Wirkung weiterer Steroide und 1,4-Dihydropyridine auf TRPM3 α 2** (A,B) Stromantworten bei -80 (A) und $+80$ mV (B) während der Applikation weiterer Steroide und 1,4-Dihydropyridine normalisiert auf die entsprechende Stromantwort von Pregnenolonsulfat (PS) ($n \geq 6$). Dehydroepiandrosteron (DHEA), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S), Pregnenolon (Preg), Östradiol (Est), Nicardipin (Nic), Nimodipin (Nim), Nitrendipin (Nit), Nifedipin (Nif) wurden in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ und Progesteron (Prog), Corticosteron (Cort), Allopregnanolon (Allopreg) in einer Konzentration von $35 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die $50 \mu\text{M}$ Lösungen enthielten zusätzlich noch $0,1\%$ DMSO und die $35 \mu\text{M}$ Lösungen zusätzlich noch $0,01-0,14\%$ Ethanol.

Experimenten auch als wirksam. Alle übrigen getesteten Steroide waren dagegen unwirksam [193]. Im folgenden wurden Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat sowie einige weitere ausgewählte Steroide (Allopregnanolon, Progesteron, Östradiol, Corticosteron) auch in whole-cell Patch-clamp-Messungen auf eine agonistische Wirkung hin geprüft. Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat und Östradiol wurden hierbei in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ und Allopregnanolon, Progesteron und Hydrocortison in einer Konzentration von $35 \mu\text{M}$ eingesetzt. Sowohl bei Pregnenolon als auch bei Dehydroepiandrosteron und Dehydroepi-

androsteronsulfat konnte ebenfalls eine agonistische Wirkung festgestellt werden (Abbildung 4.2A und B). Diese war allerdings deutlich schwächer als bei Pregnenolonsulfat. Die Stromantworten, die bei Applikation von Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat erreicht wurden, betragen bei -80 mV lediglich 3,3-5,2% und bei $+80$ mV lediglich 9,6-13,8% der entsprechenden Stromantwort auf Pregnenolonsulfat. Auch die übrigen getesteten Steroide übten einen schwach agonistischen Effekt auf TRPM3 α 2 aus (Abbildung 4.2A und B). Die Stromantworten, die bei Applikation von Östradiol, Progesteron, Corticosteron und Allopregnanolon erreicht wurden, betragen bei -80 mV $\leq 1,7\%$ und bei $+80$ mV $\leq 6,6\%$ der entsprechenden Stromantwort auf Pregnenolonsulfat. Diese beobachteten niedrigen Stromantworten bei -80 mV erklären auch, warum im Ca^{2+} -Imaging-Experiment keine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet wurde. Folgende Aktivierungsreihenfolge konnte für die getesteten Steroide festgehalten werden: Pregnenolonsulfat \gg Dehydroepiandrosteron \approx Pregnenolon $>$ Dehydroepiandrosteronsulfat $>$ Allopregnanolon \approx Progesteron \approx Östradiol \approx Corticosteron. Signifikante Einwärtsströme gegenüber der Standardbadlösung waren neben Pregnenolonsulfat auch noch bei Pregnenolon, Allopregnanolon, Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat und Estradiol nachweisbar. Signifikante Auswärtsströme zeigten sich neben Pregnenolon, Allopregnanolon, Pregnenolonsulfat, Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat und Estradiol zusätzlich noch bei Progesteron und Corticosteron.

Wirkung weiterer 1,4-Dihydropyridine auf TRPM3 α 2

Die drei von Nifedipin abgeleiteten 1,4-Dihydropyridine Nimodipin, Nicardipin und Nitrendipin, die sich ausschließlich in den Alkylresten in Position 3 und 5 und im Substitutionsmuster des Phenylringes von diesem unterscheiden, wurden im Ca^{2+} -Imaging-Experiment ebenfalls auf eine agonistische Wirkung hin getestet. Im Gegensatz zu Nifedipin, das TRPM3 α 2 sowohl in den Ca^{2+} -Imaging-Experimenten als auch in den Patch-clamp-Experimenten deutlich aktivierte, übte jedoch keine dieser Substanzen im Ca^{2+} -Imaging-Experiment einen agonistischen Effekt auf TRPM3 α 2 aus [193]. Im folgenden wurden Nimodipin, Nicardipin und Nitrendipin auch in whole-cell Patch-clamp-Messungen auf eine agonistische Wirkung hin geprüft. Sie wurden hierbei in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ eingesetzt. Während Nicardipin keinerlei Effekt zeigte, übten Nimodipin und Nitrendipin jedoch eine agonistische Wirkung auf TRPM3 α 2 aus. Die agonistische Wirkung von Nitrendipin und Nimodipin war allerdings deutlich schwächer als die von Nifedipin und Pregnenolonsulfat (Abbildung 4.2A und B). Die Stromantworten, die während der Applikation von Nitrendipin und Nimodipin erreicht wurden, betragen bei -80 mV $\leq 2,8\%$ und bei $+80$ mV 1,8-9,6% der entsprechenden Stromantwort auf Pregnenolon-

sulfat. Für die getesteten 1,4-Dihydropyridine ergab sich folgende Aktivierungsreihenfolge: Nifedipin \gg Nitrendipin $>$ Nimodipin $>$ Nicardipin. Während alle getesteten 1,4-Dihydropyridine signifikante Einwärtsströme gegenüber der Standardbadlösung zeigten, waren signifikante Auswärtsströme nur bei Nifedipin, Nitrendipin und Nimodipin feststellbar. Die im Vergleich zu Nifedipin nur sehr niedrigen Einwärtsströme bei Applikation von Nimodipin, Nicardipin und Nitrendipin erklären wiederum, warum im Ca^{2+} -Imaging-Experiment keine TRPM3 α 2-Aktivierung festgestellt wurde.

Spezifität der Aktivierung

Die oben gezeigte, relativ schnelle Aktivierung von TRPM3 α 2 durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin (Abbildung 4.1) lässt vermuten, dass es sich um eine direkte Aktivierung handelt. Entgegen dieser Vermutung könnten Pregnenolonsulfat und Nifedipin jedoch auch modulatorisch in eine oder mehrere der zahlreichen, zellulären Signaltransduktionskaskaden eingreifen und somit TRPM3 α 2 nur indirekt aktivieren. So konnte beispielweise schon gezeigt werden, dass G-Protein-gekoppelte Mechanismen bei der neurosteroidalen Modulation von Ca^{2+} -Kanälen und Kainat-Rezeptoren eine Rolle spielen [44, 60]. Da Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen mit unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden ausgestattet sind und da sowohl für die obigen Experimente als auch für die Ca^{2+} -Imaging-Experimente ausschließlich HEK293-Zellen verwendet wurden, könnte die Aktivierung durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin auch durch eine für HEK293-Zellen spezifische Signaltransduktionskaskade verursacht werden. Um dies auszuschließen, wurden whole-cell Patch-clamp-Messungen an RBL2H3-Zellen und COS7-Zellen, die TRPM3 α 2 transient überexprimierten, durchgeführt. Die Applikation einer 35 μM Pregnenolonsulfat- bzw. 50 μM Nifedipin-enthaltenen Standardbadlösung führten auch hier zu einer Aktivierung eines auswärtsrektifizierenden TRPM3 α 2-Stromes (Abbildung 4.3A-D). Analog zu den HEK293-Zellen waren in den RBL2H3- und COS7-Zellen die Pregnenolonsulfat-induzierten Ein- und Auswärtsströme trotz geringerer eingesetzter Konzentrationen größer als die Nifedipin-induzierten Ein- und Auswärtsströme. Im Vergleich zu den HEK293-Zellen war das Expressionsniveau von TRPM3 α 2 in den COS7-Zellen allerdings deutlich niedriger, was sich in den niedrigeren COS7-Zellantworten widerspiegelt (Abbildung 4.3E). Die gemittelten RBL2H3-Antworten lagen dagegen in derselben Größenordnung wie die HEK293-Antworten, obwohl die Anzahl an transfizierten RBL2H3-Zellen deutlich geringer war als die an transfizierten HEK293- und COS7-Zellen. Im Gegensatz zu den HEK293-Antworten zeigten die RBL2H3-Antworten jedoch eine größere Variabilität. Aus diesem Grund wurden HEK293-Zellen als Überexpressionssystem beibehalten. Eine Aktivierung von TRPM3 α 2 durch eine für HEK293-Zellen spezifische Signaltransduktionskaskade kann infolge dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden.

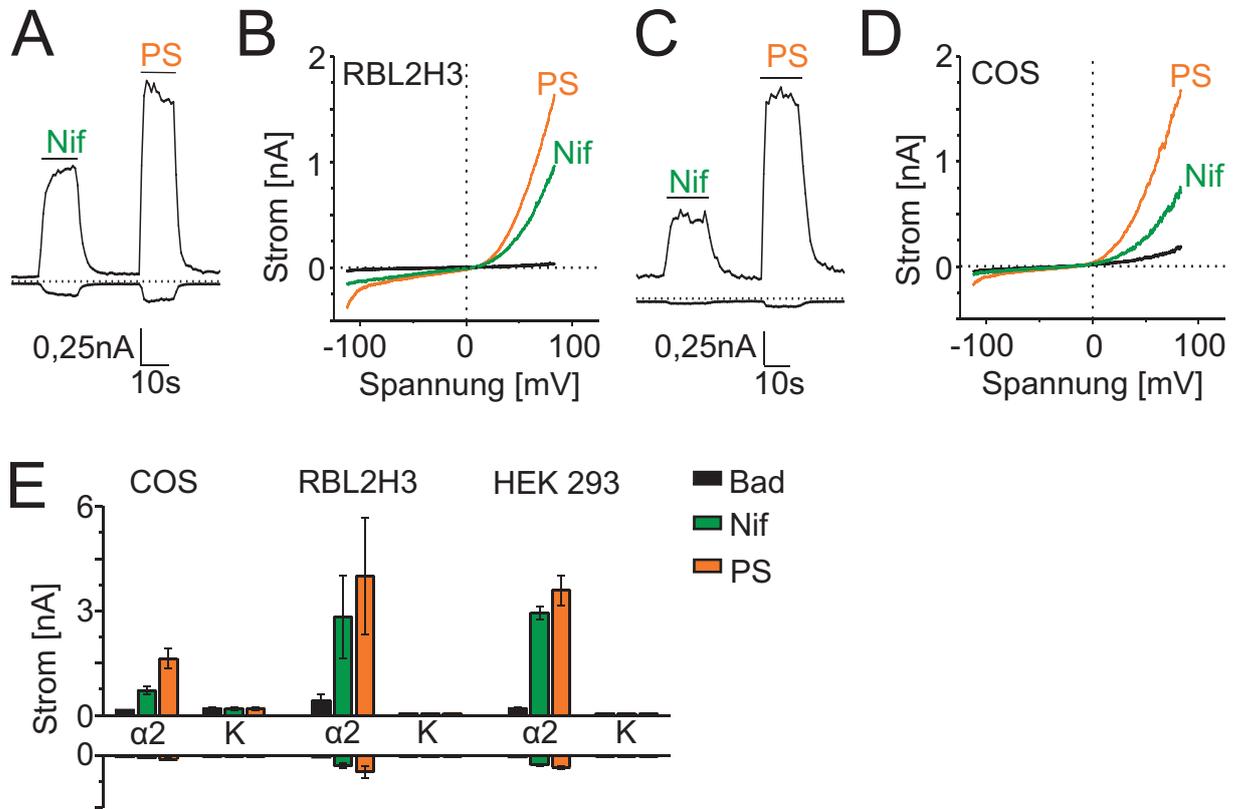


Abb. 4.3: **Aktivierung von TRPM3 α 2 mit Pregnenolonsulfat und Nifedipin in RBL2H3- und COS7-Zellen** (A,C) Strom einer TRPM3 α 2 exprimierenden RBL2H3-Zelle (A) und einer TRPM3 α 2 exprimierenden COS7-Zelle (C) bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von $50 \mu\text{M}$ Nifedipin (Nif) und $50 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS). (B,D) Strom-Spannungsbeziehung von TRPM3 α 2 in der RBL2H3-Zelle (B) und in der COS7-Zelle (D) vor und während der Applikation von Nifedipin und Pregnenolonsulfat. (E) Statistische Auswertung der Ströme in TRPM3 α 2 exprimierenden RBL2H3-, COS7- und HEK293-Zellen und in den entsprechenden Kontrollzellen (K) ($n \geq 5$) vor und während der Applikation von Nifedipin und Pregnenolonsulfat.

Im folgenden stellte sich zusätzlich noch die Frage, ob die Aktivierung durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin für die TRPM3 α 2-Spleißvariante spezifisch ist. Hierzu wurde zunächst die transient in HEK293-Zellen überexprimierte TRPM3 α 1-Spleißvariante auf eine Aktivierung hin getestet. Diese unterscheidet sich von der TRPM3 α 2-Spleißvariante ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne. Die extrazellulären Lösungen, die zur Aktivierung der TRPM3 α 2-Spleißvariante eingesetzt wurden, fanden auch hier Verwendung. Während Pregnenolonsulfat zu einer Hemmung der TRPM3 α 1-Spleißvariante führte (Daten nicht gezeigt), übte Nifedipin einen weitaus komplexeren Effekt auf diese aus. Die Applikation der Nifedipin-haltigen

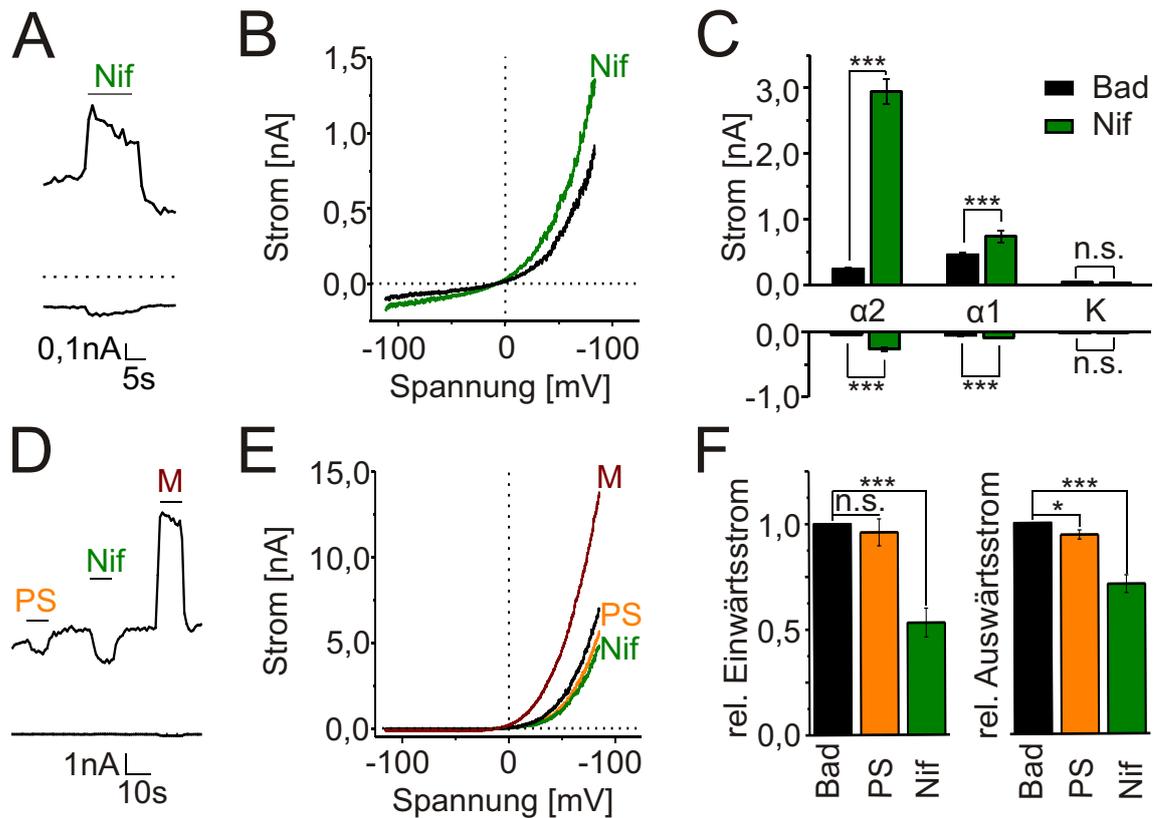


Abb. 4.4: **Wirkung von Pregnenolonsulfat und Nifedipin auf TRPM3 α 1 und TRPM8** (A) Strom einer TRPM3 α 1 transient überexprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von $100 \mu\text{M}$ Nifedipin (Nif). (B) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation von Nifedipin. (C) Statistische Auswertung der Ströme in TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen sowie in Kontrollzellen (K) ($n \geq 7$) vor und während der Applikation von Nifedipin. (D) Strom einer TRPM8 stabil überexprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS), $50 \mu\text{M}$ Nifedipin (Nif) und $50 \mu\text{M}$ Menthol (M). (E) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation von Pregnenolonsulfat, Nifedipin und Menthol. (F) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (D) normalisiert auf die nicht-aktivierten TRPM8-Stromantworten ($n = 7$). Ermittlung der Signifikanzen in (C) und (F) unter Verwendung eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests nach Student.

Standardbadlösung führte hier zunächst zu einer Aktivierung, auf die jedoch eine schnelle Inaktivierung folgte. Die in Gegenwart von Nifedipin beobachtete initiale Aktivierung der TRPM3 α 1-Spleißvariante war deutlich geringer als die in Gegenwart von Nifedipin beobachtete Aktivierung der TRPM3 α 2-Spleißvariante (Abbildung 4.4A-C).

Zusätzlich wurde auch noch ein weiteres Mitglied der TRPM-Proteinfamilie - TRPM8 - auf eine Aktivierung durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin hin geprüft. TRPM8 wurde hierbei sowohl durch $50 \mu\text{M}$ Nifedipin als auch durch $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat gehemmt, wobei in Gegenwart von Nifedipin eine deutlich stärkere Hemmung zu beobachten war

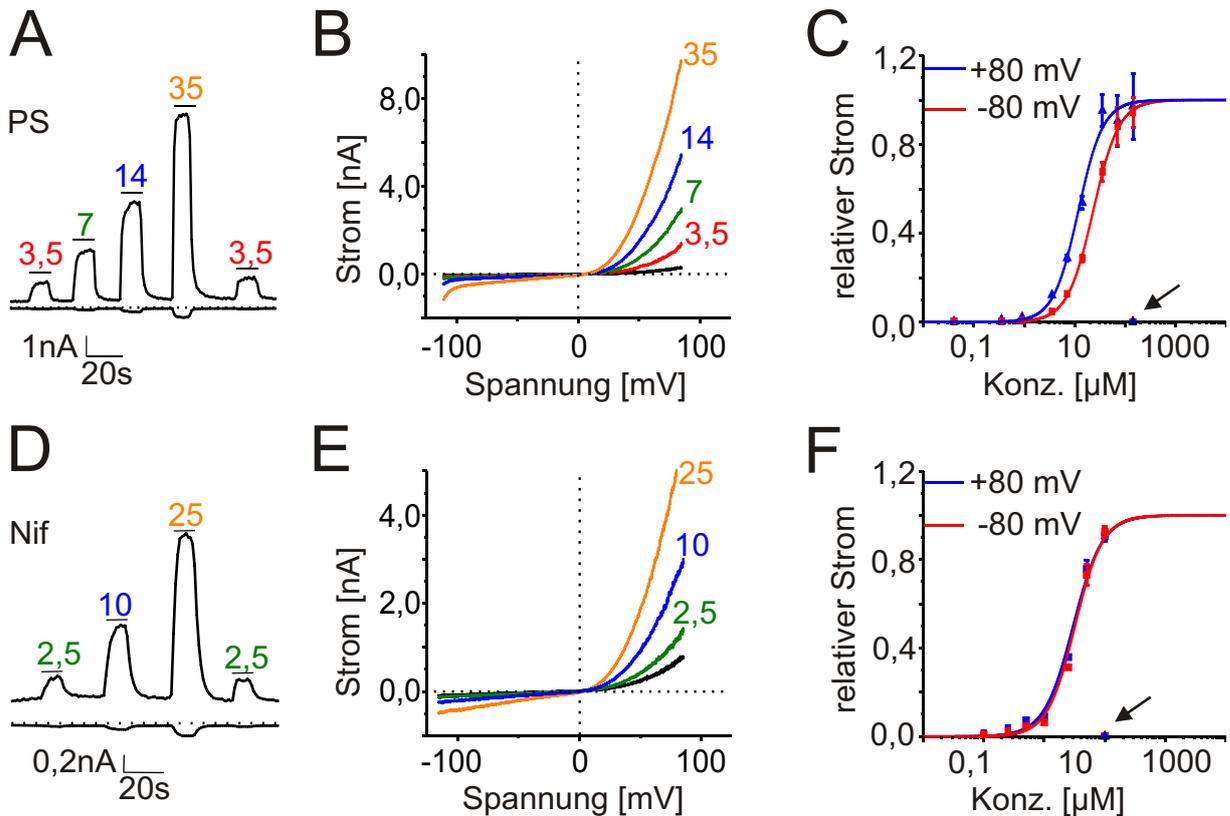


Abb. 4.5: **Dosisabhängigkeit der TRPM3 α 2-Aktivierung mit Nifedipin und Pregnenolonsulfat** (A,D) Strom bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von unterschiedlichen Konzentrationen (in μM) an Pregnenolonsulfat (PS) (A) und Nifedipin (Nif) (D). (B,E) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation der unterschiedlichen Pregnenolonsulfat- (B) und Nifedipin-Konzentrationen (E). (C,F) Dosiswirkungskurven von Pregnenolonsulfat ($n \geq 5$) (C) und Nifedipin ($n \geq 7$) (F). Die durch die normalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: PS: $EC_{50} = 23 \mu\text{M}$, $h = 1,7$ (-80 mV); $EC_{50} = 12 \mu\text{M}$, $h = 1,8$ ($+80$ mV); Nif: $EC_{50} = 34 \mu\text{M}$, $h = 2,4$ (-80 mV); $EC_{50} = 32 \mu\text{M}$, $h = 2,2$ ($+80$ mV). Mit der höchsten Konzentration an eingesetztem Pregnenolonsulfat ($n = 9$) und Nifedipin ($n = 7$) vermessene Kontrollzellen zeigten keinen Effekt (mit Pfeil gekennzeichnet).

als in Gegenwart von Pregnenolonsulfat. Zur Verifizierung der Expression wurde TRPM8 zusätzlich noch mit einer $50 \mu\text{M}$ Menthol-enthaltenden Standardbadlösung stimuliert (Abbildung 4.4D-E). Diese Daten zeigen zusammen mit den bereits veröffentlichten Daten zur Hemmung von TRPV1 durch Pregnenolonsulfat [21], dass die Aktivierung durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin ein spezifisches Merkmal von TRPM3 α 2 ist.

Dosisabhängigkeit der TRPM3 α 2-Aktivierung

Im folgenden wurden die EC_{50} -Werte der TRPM3 α 2-Aktivierung durch Pregnenolonsulfat und Nifedipin bestimmt. Da die bislang eingesetzten Konzentrationen an Pregnenolonsul-

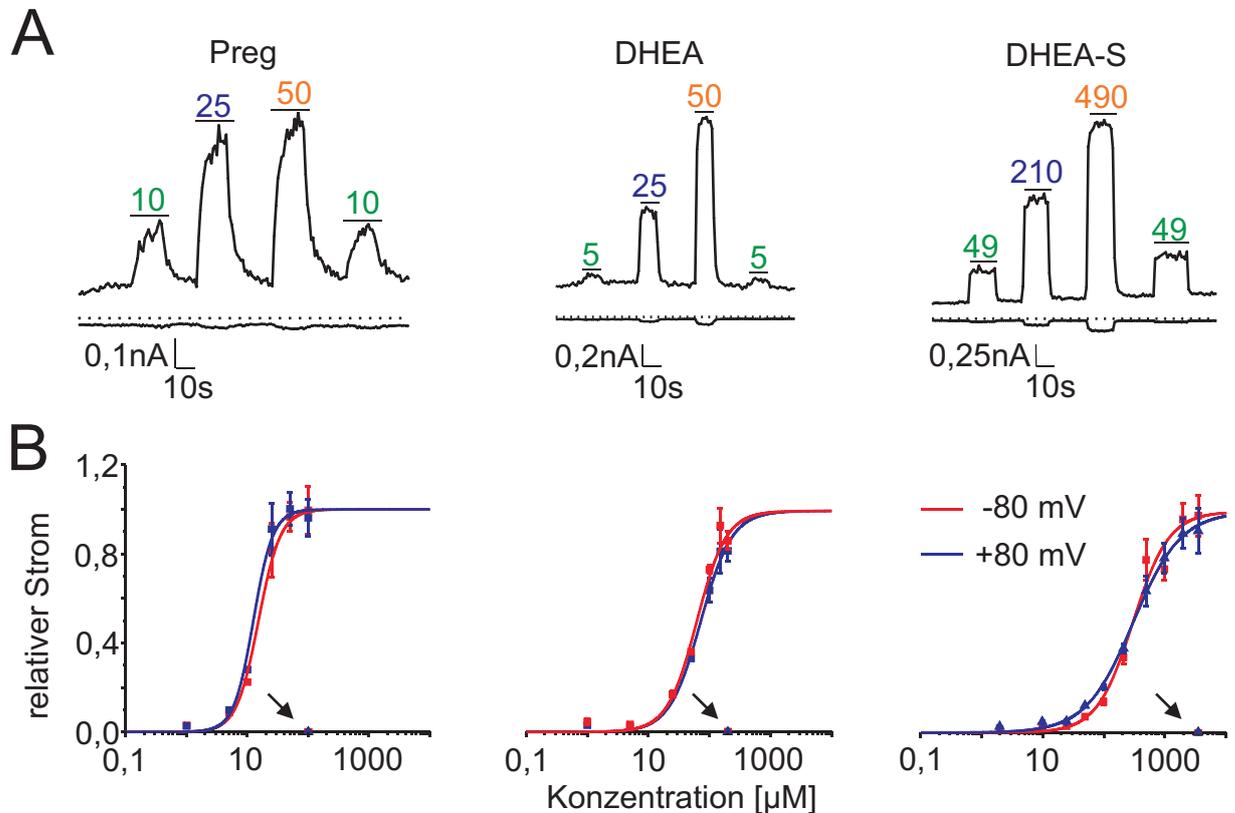


Abb. 4.6: **Dosisabhängigkeit der TRPM3 α 2-Aktivierung mit Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat** (A) Ströme von TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen bei -80 und $+80$ mV während der Applikation unterschiedlicher Konzentrationen an Pregnenolon (Preg), Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) (in μM). (B) Dosiswirkungskurven von Preg, DHEA und DHEA-S ($n \geq 5$). Die durch die normalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: Preg: $EC_{50} = 15 \mu\text{M}$, $h = 2,9$ (-80 mV); $EC_{50} = 13 \mu\text{M}$, $h = 3,4$ ($+80$ mV); DHEA: $EC_{50} = 63 \mu\text{M}$, $h = 2,1$ (-80 mV); $EC_{50} = 70 \mu\text{M}$, $h = 1,7$ ($+80$ mV); DHEA-S: $EC_{50} = 299 \mu\text{M}$, $h = 1,5$ (-80 mV); $EC_{50} = 303 \mu\text{M}$, $h = 1,1$ ($+80$ mV). Mit der höchsten Konzentration an eingesetztem Preg, DHEA und DHEA-S vermessene Kontrollzellen ($n \geq 7$) zeigten keinen Effekt (mit Pfeil gekennzeichnet).

fat ($10,5\text{-}35 \mu\text{M}$) und Nifedipin ($50\text{-}100 \mu\text{M}$) deutlich über den physiologisch nachweisbaren Konzentrationen von Pregnenolonsulfat im Serum und Gehirn (Serum: $50\text{-}150 \text{ ng/ml}$ (entspricht: $120\text{-}360 \text{ nM}$) [31, 103], Gehirn: $16 \text{ ng/g} = 35 \text{ nM}$ [26]) und den therapeutisch erreichbaren Konzentrationen von Nifedipin (162 nM bei einer oralen Dosis von 10 mg [48]) lagen, interessierte es insbesondere auch, ab welcher Konzentrationen bereits eine Aktivierung von TRPM3 α 2 zu beobachten ist. Wie in Abbildung 4.5A und B erkennbar, wurden mit zunehmender Konzentration an Pregnenolonsulfat bzw. Nifedipin auch höhere TRPM3 α 2-Antworten erhalten. Mit Pregnenolonsulfat konnte bereits ab $0,35 \mu\text{M}$

und mit Nifedipin ab 1 μM eine Aktivierung beobachtet werden. Nach halblogarithmischer Auftragung der normalisierten TRPM3 α 2-Stromantworten gegen die eingesetzten Pregnenolonsulfat- bzw. Nifedipin-Konzentrationen wurde durch die so erhaltenen Punkte eine Hillfunktion gefittet. Die aus dem Fit erhaltenen Hillkoeffizienten waren sowohl für Pregnenolonsulfat als auch für Nifedipin größer als eins (Pregnenolonsulfat: 1,7-1,8; Nifedipin: 2,2-2,4). Die aus dem Fit erhaltenen EC_{50} -Werte lagen für Pregnenolonsulfat bei 23 μM (-80 mV) und 12 μM ($+80$ mV) und für Nifedipin bei 34 μM (-80 mV) und 32 μM ($+80$ mV) und zeigten somit nur eine geringe Abhängigkeit von der Spannung (Abbildung 4.5C). Zusätzlich zu den TRPM3 α 2 exprimierenden Zellen wurden auch noch Kontrollzellen mit der höchsten verwendeten Konzentration an Pregnenolonsulfat bzw. Nifedipin vermessen. In diesen Kontrollzellen war keinerlei Pregnenolonsulfat- bzw. Nifedipin-Effekt beobachtbar (Abbildung 4.5C).

Im folgenden wurde die Aktivierung durch Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat, die ebenfalls eine agonistische Wirkung auf TRPM3 α 2 ausübten (Abbildung 4.2), noch näher untersucht. Die Applikation von Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat führte analog zu Pregnenolonsulfat auch zur Aktivierung eines auswärtsrektifizierenden TRPM3 α 2-Stromes, der nach Wechsel zur Standardbadlösung wieder inaktivierte und eine Konzentrationsabhängigkeit zeigte (Abbildung 4.6A). Die Zeit, die zur vollständigen Aktivierung bzw. Inaktivierung benötigt wurde, lag bei Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat im Bereich von wenigen Sekunden, war bei Pregnenolon allerdings etwas verlängert (Abbildung 4.6A). Bei der Auswertung der Dosiswirkungskurven zeigte sich desweiteren, dass die EC_{50} -Werte für Dehydroepiandrosteron (EC_{50} bei -80 mV: 63 μM und bei $+80$ mV: 70 μM) und Dehydroepiandrosteronsulfat (EC_{50} bei -80 mV: 299 μM und bei $+80$ mV: 303 μM) deutlich höher lagen als die für Pregnenolon (EC_{50} bei -80 mV: 15 μM und bei $+80$ mV: 13 μM) und Pregnenolonsulfat (siehe oben). Die EC_{50} -Werte zeigten auch hier nur eine geringe Abhängigkeit von der Spannung. Die aus den Dosis-Wirkungskurven erhaltenen Hillkoeffizienten lagen für Dehydroepiandrosteron bei 2,1 (-80 mV) und 1,7 ($+80$ mV), für Dehydroepiandrosteronsulfat bei 1,5 (-80 mV) und 1,1 ($+80$ mV) und bei Pregnenolon bei 2,9 (-80 mV) und 3,4 ($+80$ mV) (Abbildung 4.6B). In Kontrollzellen, die mit der höchsten verwendeten Konzentration an Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat vermessen wurden, war keinerlei agonistischer Effekt beobachtbar (Abbildung 4.6B).

Angriffspunkt von Pregnenolonsulfat

Bei den bisher gezeigten Patch-clamp-Messungen wurde Pregnenolonsulfat ausschließlich von der extrazellulären Seite her appliziert. Aufgrunddessen stellte sich nun die Frage, ob Pregnenolonsulfat auch bei intrazellulärer Applikation zu einer Aktivierung von

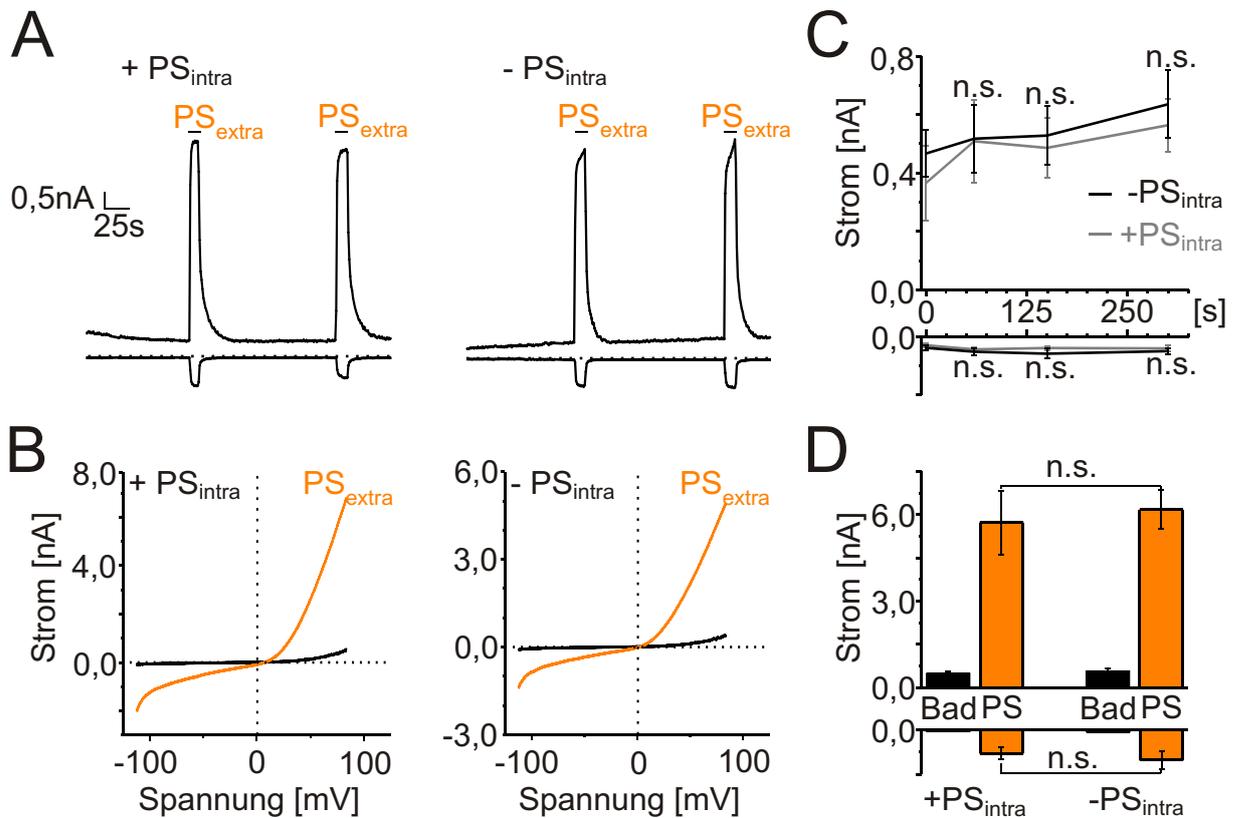


Abb. 4.7: **Angriffspunkt von Pregnenolonsulfat** (A) Ströme bei -80 und $+80$ mV unter Verwendung einer intrazellulären Lösung mit bzw. ohne Zusatz von $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS) ($n = 6$). Zusätzlich wurde in diesem Experiment zur Kontrolle der TRPM3 α 2-Expression noch $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS) extrazellulär appliziert. (B) Strom-Spannungsbeziehungen vor und während der Applikation von Pregnenolonsulfat unter Verwendung einer intrazellulären Lösung mit bzw. ohne Zusatz von Pregnenolonsulfat. (C) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) nach 0, 60, 150 und 300 Sekunden. (D) Statistische Auswertung der Stromantworten unmittelbar vor und während der extrazellulären Applikation von Pregnenolonsulfat. Ermittlung der Signifikanzen unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten T-Tests nach Student.

TRPM3 α 2 führt. Um diese Frage zu klären, wurden der intrazellulären Lösung $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat zugesetzt und nach Übergang in die whole-cell-Konfiguration die Entwicklung des Ein- und Auswärtsstromes über einen Zeitraum von 5 Minuten beobachtet. Innerhalb dieses Zeitraumes sollte sich die intrazelluläre Lösung nahezu vollständig mit dem Zytosol der Zelle ausgetauscht haben [148].

Im Gegensatz zur extrazellulären Applikation führte jedoch die intrazelluläre Applikation von Pregnenolonsulfat zu keiner Aktivierung von TRPM3 α 2 (Abbildung 4.7A und C). Sowohl die Ein- als auch die Auswärtsströme unterschieden sich nicht signifikant von den Ein- und Auswärtsströmen parallel vermessener TRPM3 α 2-Zellen, die nicht mit Pregnenolon-

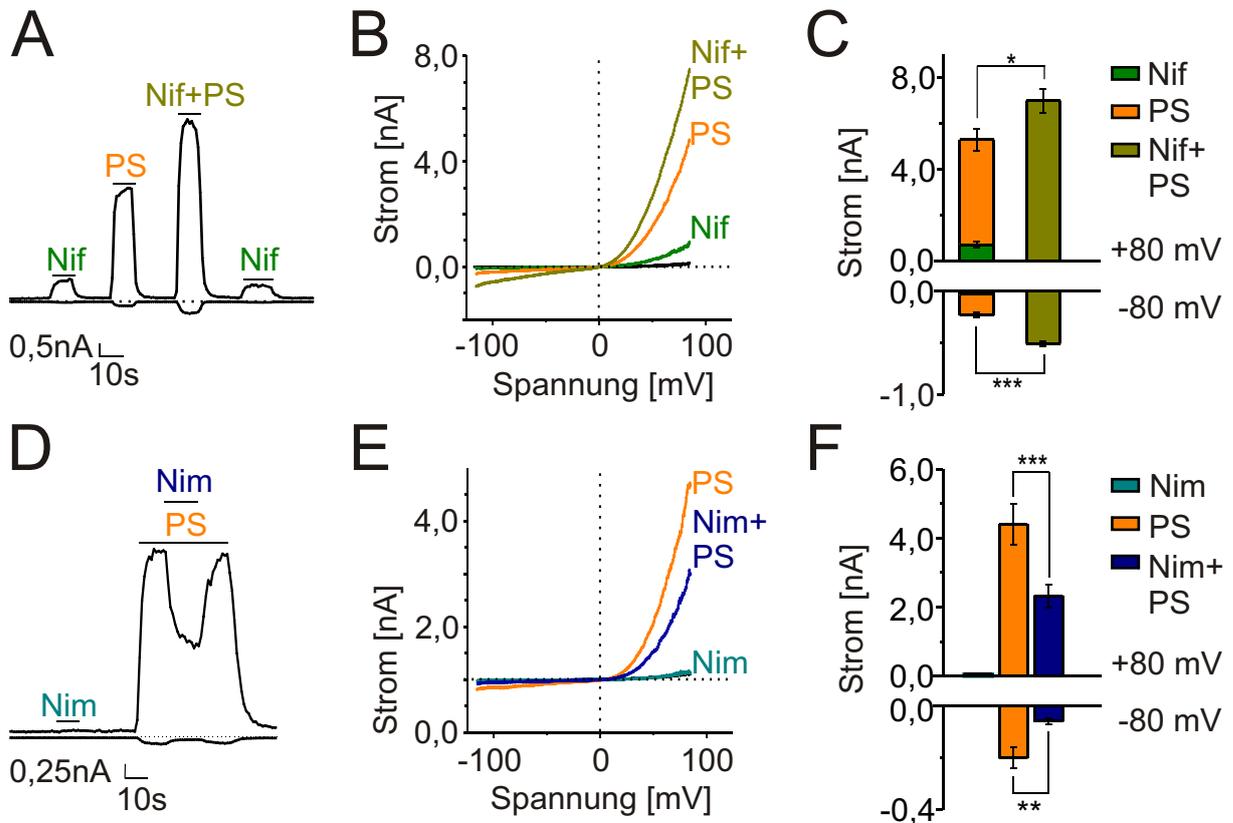


Abb. 4.8: **Interaktionen zwischen Pregnenolonsulfat und 1,4-Dihydropyridinen** (A,D) Strom einer TRPM3α2 exprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von $21 \mu\text{M}$ Nifedipin (Nif), $21 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS) und $21 \mu\text{M}$ Nifedipin + $21 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (A) bzw. von $21 \mu\text{M}$ Nimodipin (Nim), $21 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS) und $21 \mu\text{M}$ Nimodipin + $21 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (D). (B,E) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation von Nifedipin, Pregnenolonsulfat und Nifedipin + Pregnenolonsulfat (B) bzw. Nimodipin, Pregnenolonsulfat und Nimodipin + Pregnenolonsulfat (E). (C,F) Statistische Auswertung aus (A) für $n = 7$ Zellen bzw. (D) für $n = 8$ Zellen. Ermittlung der Signifikanzen unter Verwendung eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests nach Student.

sulfat infundiert wurden (Abbildung 4.7A und C). Zur Verifizierung der Aktivierbarkeit von TRPM3α2 wurde $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat zusätzlich noch extrazellulär appliziert. Hier führte Pregnenolonsulfat wie erwartet zur Aktivierung des auswärtsrekifizierenden TRPM3α2-Stromes (Abbildung 4.7). Eine Hemmung von TRPM3α2 durch intrazelluläres Pregnenolonsulfat wurde nicht beobachtet (Abbildung 4.7B und D). Folglich greift Pregnenolonsulfat TRPM3α2 ausschließlich von der extrazellulären Seite her an.

Interaktion von Pregnenolonsulfat mit 1,4-Dihydropyridinen

Im folgenden wurde untersucht, ob die beiden für TRPM3α2 gefundenen Agonisten Pregnenolonsulfat und Nifedipin bei gleichzeitiger Applikation einen synergistischen Effekt

auf TRPM3 α 2 ausüben. Laut Mutschler [121] liegt ein Synergismus dann vor, wenn bei gleichzeitiger Applikation von zwei oder mehr pharmakologisch wirksamen Substanzen der gemessene Effekt der Kombination größer ist als der der Einzelsubstanzen. Addieren sich die Einzeleffekte auf, d.h. entspricht der Gesamteffekt der Summe der Einzeleffekte, so spricht man von einem additiven Synergismus. Ist der Gesamteffekt größer, als es aufgrund der Einzeleffekte zu erwarten wäre, spricht man von einem überadditiven Effekt. Bei gleichzeitiger Applikation von 21 μ M Pregnenolonsulfat und 21 μ M Nifedipin waren deutlich größere TRPM3 α 2 Ein- und Auswärtsströme beobachtbar als bei alleiniger Applikation von 21 μ M Pregnenolonsulfat bzw. 21 μ M Nifedipin (Abbildung 4.8A und B). Die statistische Auswertung zeigte, dass sowohl der Einwärtsstrom als auch der Auswärtsstrom bei Applikation der Kombination signifikant größer war als die Summe der Ein- bzw. Auswärtsströme bei Applikation der Einzelsubstanzen (Abbildung 4.8C). Somit liegt hier ein überadditiver Synergismus vor. Dieser überadditive Synergismus deutet darauf hin, dass Nifedipin eine von den Neurosteroiden abweichende Bindungsstelle besitzt. Nimodipin, das alleine nur einen geringen agonistischen Effekt auf TRPM3 α 2 ausübte (Abbildung 4.2), führte dagegen bei gleichzeitiger Applikation von Pregnenolonsulfat zu einer partiellen Hemmung des Pregnenolonsulfat-aktivierten TRPM3 α 2-Stromes (Abbildung 4.8D-F). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Nifedipin ist anzunehmen, dass Nimodipin an dieselbe Bindungsstelle wie Nifedipin bindet. Eine direkte Konkurrenz zwischen Nimodipin und Pregnenolonsulfat um die Neurosteroid-Bindungsstelle kann jedoch aufgrund der hier beobachteten partiellen Hemmung des Pregnenolonsulfat-aktivierten TRPM3 α 2-Stromes nicht ausgeschlossen werden.

4.5 Diskussion

Neurosteroiden - darunter auch Pregnenolonsulfat, Pregnenolon, Dehydroepiandrosteronsulfat und Dehydroepiandrosteron - sind im Nervensystem an der Modulation zahlreicher Neurotransmitter-Rezeptoren beteiligt (siehe Tabelle 4.4). In diesem Kapitel wurde die Aktivierung von TRPM3 α 2 durch Neurosteroiden, die im Ca²⁺-Imaging-Experiment bereits gezeigt werden konnte [193], bezüglich ihrer Spezifität und Dosisabhängigkeit näher charakterisiert.

Pregnenolonsulfat führte in den durchgeführten Patch-clamp-Messungen zu einer sehr raschen Aktivierung von TRPM3 α 2. TRPM3 α 2-Antworten waren nach Umschalten des Perfusionssystems, d.h. nach Wechsel zur Pregnenolonsulfat-haltigen Standardbadlösung innerhalb weniger Sekunden beobachtbar. Da die Pregnenolonsulfat-haltige Standardbadlösung nach Verlassen des Perfusionssystems noch eine gewisse Zeit bis zum Erreichen der Zelle benötigte, ist davon auszugehen, dass TRPM3 α 2 in Wirklichkeit noch rascher auf

AKTIVIERUNG VON TRPM3

Rezeptor	Steroid	Modulation	wirksame Konzentration
GABA _A	3 α , 5 α -THP	positiv	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M
	3 α , 5 β -THP	positiv	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M
	3 α , 5 α -THDOC	positiv	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M
	PS	negativ	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
	DHEA-S	negativ	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
n-Acetylcholin	Progesteron	negativ	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M
	3 α , 5 β -THP	negativ	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴ M
Glycin	Progesteron	negativ	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
	PS	negativ	10 ⁻⁴ M
5-HT ₃	17 α -/ β -Estradiol	negativ	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M
	Progesteron	negativ	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁴ M
	Testosteron	negativ	10 ⁻⁵ M
	3 α , 5 α -THP	negativ	10 ⁻⁵ M
	PS	-	10 ⁻⁵ M
NMDA	17 β -Estradiol	negativ	5x10 ⁻⁵ M
	Pregnanolonsulfat	negativ	10 ⁻⁶ -10 ⁻³ M
	Pregnanolonhemisuccinat	negativ	10 ⁻⁴ M
	PS	positiv	10 ⁻⁶ -10 ⁻³ M
AMPA	PS	negativ	10 ⁻⁴ M
Kainat	PS	negativ	10 ⁻⁴ M
	17 β -Estradiol	positiv	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁵ M
	Progesteron	positiv	10 ⁻⁵ -10 ⁻³ M
Oxytocin	Progesteron	negativ	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁶ M
Sigma Typ1	DHEA-S	positiv	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁵ M
	PS	negativ	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁵ M
	Progesteron	Antagonist	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁶ M

Tabelle 4.4: Übersicht über die nichtgenomischen Effekte der verschiedenen Neurosteroiden. Abbildung übernommen aus Rupprecht und Holsboer, 1999 [155].

dieses antwortet. Diese rasche Aktivierung spricht gegen einen modulatorischen Eingriff von Pregnenolonsulfat in eine oder mehrere der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden (indirekte Aktivierung), sondern deutet vielmehr auf eine direkte Interaktion mit TRPM3 α 2 (direkte Aktivierung) hin.

Von den übrigen getesteten Neurosteroiden bzw. Steroiden führten Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolon ebenfalls zu einer Aktivierung von TRPM3 α 2. Die Aktivierung war im Vergleich zu Pregnenolonsulfat allerdings deutlich schwächer. Aufgründessen stellen sie vermutlich im Gegensatz zu Pregnenolonsulfat keine vollen, sondern nur partielle Agonisten von TRPM3 α 2 dar.

Die aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelten EC₅₀-Werte lagen für alle vier agonistisch wirkenden Neurosteroiden im mikromolaren Bereich (PS: EC₅₀ = 22,9 μ M bei -80 mV,

$EC_{50} = 11,7 \mu\text{M}$ bei +80 mV; Preg: $EC_{50} = 15,2 \mu\text{M}$ bei -80 mV, $EC_{50} = 12,5$ bei +80 mV; DHEA: $EC_{50} = 62,0$ bei -80 mV, $EC_{50} = 72,0 \mu\text{M}$ bei +80 mV; DHEA-S: $EC_{50} = 299,0 \mu\text{M}$ bei -80 mV, $EC_{50} = 303,0 \mu\text{M}$ bei +80 mV). Da laut Hersteller- und Literaturangaben zahlreiche der getesteten Steroide (insbesondere die nicht-sulfatierten Formen) in wässriger Lösung praktisch unlöslich sind, wurden zur Erhöhung der Löslichkeit und zur Verminderung von Präzipitationen zunächst Stocklösungen in DMSO bzw. Ethanol hergestellt und erst unmittelbar vor den eigentlichen Patch-clamp-Messungen die benötigte Konzentration der entsprechenden extrazellulären Lösung zugesetzt. Trotzdem wurden insbesondere bei den hochkonzentrierten Lösungen aller getesteten Steroide mit Ausnahme von Pregnenolonsulfat Präzipitationen beobachtet. Aus diesem Grund sind insbesondere die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten EC_{50} -Werte von Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat fraglich. Die hier beobachtete Sättigung der Dosiswirkungskurve könnte demnach nicht auf eine Sättigung der TRPM3 α 2-Bindungsstelle, sondern auf eine Sättigung der Lösung zurückzuführen sein. In diesem Falle würden die ermittelten EC_{50} -Werte unterschätzt werden und eigentlich noch höher liegen. Auch die Hillkoeffizienten, die über eins lagen, würden sich aufgrund des flacheren Kurvenverlaufs erniedrigen. Wie in Tabelle 4.4 erkennbar, erfordert auch die negative Modulation der verschiedenen Neurotransmitter-Rezeptoren im Gehirn in der Regel Neurosteroid-Konzentrationen im mikromolaren Bereich. Vergleicht man die zur halbmaximalen Aktivierung von TRPM3 α 2 erforderlichen Konzentrationen an Pregnenolonsulfat, Pregnenolon, Dehydroepiandrosteronsulfat und Dehydroepiandrosteron allerdings mit den physiologischen Konzentrationen im Serum (PS: 50-150 ng/ml (entspricht: 120-360 nM), DHEA-S: 1-3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (entspricht: 260-770 nM) [10, 31]), so ist festzustellen, dass die hier ermittelten EC_{50} -Werte deutlich über diesen Konzentrationen liegen. Auch die niedrigste Neurosteroidkonzentration unter der eine TRPM3 α 2-Antwort beobachtbar war (350 nM bei Pregnenolonsulfat und 1 μM bei Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat), lag zum Teil noch über dieser Konzentration. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass sowohl im Gehirn als in anderen Organen (Gonaden, Nebenniere) aufgrund der dort stattfindenden Neurosteroidsynthese lokal höhere Konzentrationen an Neurosteroiden anzutreffen sind. Unterschiede in den zellulären und subzellulären Neurosteroidkonzentrationen sind in bestimmten Teilen des Gehirns infolge unterschiedlicher Synthese- und Metabolisierungsraten ebenfalls zu erwarten. Auch eine Akkumulation der Neurosteroiden ist aufgrund ihrer hohen Lipophilie denkbar. Über diese zellulären und subzellulären Verteilungen im Gehirn ist allerdings bisweilen nur wenig bekannt. Ein Grund hierfür ist, dass die Konzentrationsmessungen meist auf Messungen von Homogenaten kompletter Gehirne bzw. Gehirnteile beruhen. Zahlreiche physiologische (z.B. Schwangerschaft) als auch pathologische Faktoren (z.B. Stress, Krankheiten) könnten die Neu-

rosteroidkonzentration zusätzlich noch beeinträchtigen. Bereits gezeigt werden konnte, dass sich im Laufe der Entwicklung die Neurosteroidkonzentration ändert. Besonders hohe Konzentrationen wurden hierbei unmittelbar vor bzw. nach der Geburt und in der Pubertät gefunden [31, 32]. Neben der Neurosteroidkonzentration könnte sich im Laufe der Entwicklung jedoch auch das Expressionsniveau bzw. der Phosphorylierungs- bzw. Glykosylierungszustand von TRPM3 α 2 ändern. Bereits gezeigt werden konnte, dass die Interaktion der Neurosteroiden mit dem GABA_A-Rezeptor durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung reguliert wird [9]. Während in älteren Publikationen Pregnenolonsulfat als das im Gehirn am meisten vorkommende Neurosteroid beschrieben wurde [26, 109], zeigen neuere Publikationen, dass Pregnenolon in seiner sulfatierten Form jedoch kaum im Gehirn anzutreffen ist [103]. Ein lipoidales Pregnenolonderivat, dessen genaue chemische Struktur bisweilen noch nicht aufgeklärt wurde, scheint dagegen in deutlich höheren Konzentrationen im Gehirn vorzukommen. Möglicherweise stellt dieses lipoidale Pregnenolonderivat und nicht Pregnenolonsulfat den eigentlichen, endogenen Agonisten von TRPM3 α 2 dar [103].

Bei der Frage nach der physiologischen Relevanz der TRPM3 α 2-Aktivierung durch Neurosteroiden spielt neben deren Konzentration auch noch deren Spezifität eine bedeutende Rolle. Da weder die TRPM3 α 1-Spleißvariante noch weitere Mitglieder der TRPM-Proteinfamilie (TRPM8, TRPM7 (unveröffentlichte Daten Sachar Lambert)) durch Pregnenolonsulfat aktiviert wurden, scheint die Aktivierung für TRPM3 α 2 spezifisch zu sein. Das Pregnenolonsulfat zu keiner Aktivierung von TRPM7 führte, ist insofern auch noch von Bedeutung, da endogen in praktisch allen Zellen, so auch HEK293-, COS7- und RBL2H3-Zellen, ein Strom vorkommt, der dieselben biophysikalischen Eigenschaften wie dieser aufweist [122]. Da dieser endogene Strom durch intrazelluläres Mg²⁺ gehemmt wird, trägt er auch die Bezeichnung MIC- (= „Magnesium Inhibited Current“) bzw. MagNuM-Strom (= „Magnesium Nucleotide regulated Metal current“). Auch für die TRPM3 α 1- und TRPM3 α 2-Spleißvariante wurde bereits eine Hemmung durch intrazelluläres Mg²⁺ beschrieben [129] (siehe auch Kapitel 7). Aus diesen Gründen wurden für die oben aufgeführten Patch-clamp-Messungen ausschließlich Mg²⁺-freie, intrazelluläre Lösungen verwendet. Um den Einfluss des MIC- bzw. MagNuM-Stromes auf die Patch-clamp-Messungen möglichst gering zu halten, wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen: (1) wurden die Patch-clamp-Messungen immer möglichst kurz gehalten, d.h. in der Regel 90-120 Sekunden nach Übergang in die whole-cell-Konfiguration beendet. Da der endogene MIC- bzw. MagNuM-Strom im Gegensatz zum TRPM3 α 2-Strom erst nach ca. 90-100 Sekunden aktiviert und die halbmaximale Aktivierung erst nach 220 Sekunden erreicht [6], sollte innerhalb dieses gewählten Zeitfensters dessen Einfluss auf die TRPM3 α 2-Messungen noch möglichst gering sein. (2) wurden parallel zu den TRPM3 α 2-exprimierenden Zel-

len immer Kontrollzellen unter identischen Messbedingungen vermessen. Die vermessenen Kontrollzellen zeigten keinen Effekt bei Applikation der Pregnenolonsulfat-haltigen Lösungen. Folglich übt Pregnenolonsulfat auch keinen Effekt auf den endogenen MIC- bzw. MagNum-Strom aus. Eine Hemmung durch Pregnenolonsulfat, wie sie bei TRPM8 beobachtet wurde, wurde auch schon für TRPV1 gezeigt [21].

Da Pregnenolonsulfat nur von der extrazellulären, nicht jedoch von intrazellulären Seite zu einer Aktivierung von TRPM3 α 2 führte, muss gefordert werden, dass dessen Bindungsstelle extrazellulär lokalisiert ist. Aminosäurereste in den extrazellulär gelegenen Schleifen als auch in den angrenzenden Transmembrandomänen stellen mögliche Kandidaten für eine solche Pregnenolonsulfat-Bindungsstelle dar. Da sowohl die geladene, hydrophile Sulfatgruppe als auch das ungeladene, hydrophobe Steroidgerüst mit diesen interagieren könnten, kommen sowohl geladene als auch ungeladene Aminosäurereste hierfür in Frage. Bislang existieren allerdings noch keine Anhaltspunkte über die molekularen und strukturellen Voraussetzungen, die für die Pregnenolonsulfat-Bindung an TRPM3 α 2 erforderlich sind. Denkbar wäre auch, dass Pregnenolonsulfat seine Wirkung nicht über die Bindung an eine diskrete Bindungsstelle sondern über einen unspezifischen Membraneffekt vermittelt, d.h. sich aufgrund seiner Hydrophobizität in die Plasmamembran einlagert und über sterische Effekte zu einer Öffnung von TRPM3 α 2 führt.

Die agonistische Wirkung von Nifedipin auf TRPM3 α 2, die bei der Suche nach spezifischen Antagonisten in den vorangegangenen Ca²⁺-Imaging-Experimenten aufgedeckt wurde [193], konnte in diesen Kapitel ebenfalls bestätigt werden. Nitrendipin und Nimodipin zeigten ebenfalls eine schwache agonistische Wirkung, Nicardipin jedoch nicht.

Eingesetzt werden 1,4-Dihydropyridine heutzutage bei der Behandlung von Hypertonie und Angina pectoris. Sie wirken hierbei über eine allosterische Blockade von spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanälen. Die unter Behandlung von Nifedipin erreichbaren Plasmakonzentrationen liegen hierbei im nanomolaren Bereich (162 nM bei einer oralen Dosis von 10 mg [48]). Die aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelten EC₅₀-Werte für Nifedipin (EC₅₀ = 32 μ M bei -80 mV, EC₅₀ = 30 μ M bei +80 mV) lagen allerdings deutlich über dieser Plasmakonzentration, sodass davon auszugehen ist, dass es unter der Behandlung mit Nifedipin zu keiner Aktivierung von TRPM3 α 2 kommt. Trotzdem ist es denkbar, dass Nifedipin zu einer Modulation der Neurosteroidantwort führt. In der Tat konnte bei gleichzeitiger Applikation von Nifedipin eine positive Modulation des Neurosteroid-induzierten TRPM3 α 2-Stromes in Form eines supraadditiven Effektes beobachtet werden. Diese positive Modulation deutet ebenfalls darauf hin, dass Nifedipin an eine von den Neurosteroiden abweichende Bindungsstelle bindet.

Abweichend von der allosterischen Blockade spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle konnte neben der hier beobachteten Aktivierung von TRPM3 α 2 für Nifedipin bereits eine Faszilli-

tierung der spontanen Neurotransmitterfreisetzung bei Rattenneuronen im supraoptischen Nukleus gezeigt werden [70]. Da dieser Effekt allerdings Ca^{2+} -unabhängig war, ist eine Beteiligung von TRPM3 α 2 unwahrscheinlich. Ein ähnlicher Effekt wurde desweiteren auch schon in Nervenendigungen von Motorneuronen neonataler Ratten beschrieben [142]. Die hier beobachtete Speicherabhängigkeit schließt allerdings auch in diesem Fall eine Beteiligung von TRPM3 α 2 weitestgehend aus.

1,4-Dihydropyridine zeichnen sich durch eine geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen aus. Zur Erhöhung der Löslichkeit und Verringerung von Präzipitationen wurden aufgrunddessen analog zu den Neurosteroiden zunächst Stocklösungen der entsprechenden 1,4-Dihydropyridine in DMSO hergestellt und erst unmittelbar vor den eigentlichen Patch-clamp-Messungen die benötigte Konzentration der entsprechenden extrazellulären Lösung zugesetzt. Trotzdem wurden auch hier insbesondere bei den höher konzentrierten Lösungen Präzipitationen beobachtet. Aus diesen Grund sind auch hier die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten EC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten für Nifedipin fraglich.

Zusätzlich sind 1,4-Dihydropyridine in gelöster Form noch sehr lichtempfindlich. Die Lichtempfindlichkeit ist hierbei bei Nifedipin deutlich stärker ausgeprägt als bei Nicardipin, Nimodipin und Nitrendipin [156]. Bereits gezeigt werden konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen, dass Nifedipin bei Einwirkung von Licht in das stabilere Nitrosophenylpyridin-Derivat übergeht. Für die Bildung des Nitrosophenylpyridin-Derivats wird eine intramolekulare Redoxreaktion zwischen Nitrogruppe und Dihydropyridingruppe angenommen. Hierbei wird die Nitrogruppe zur Nitrosogruppe reduziert und der Dihydropyridinring zum Pyridinring oxidiert. Neben dem Nitrosophenylpyridin-Derivat können in geringerem Umfang auch noch andere Abbauprodukte gebildet werden. Die Art und Menge der gebildeten Abbauprodukte wird allerdings noch durch zahlreiche weitere Faktoren bestimmt (Temperatur, pH-Wert, Lösungsmittel, Anwesenheit von Oxidationsmitteln) [39]. Um den oben beschriebenen Abbau von Nifedipin als auch der übrigen 1,4-Dihydropyridine möglichst gering zu halten, wurden deren Lösungen unmittelbar vor den jeweiligen Patch-clamp-Messungen immer frisch hergestellt und durch Alufolie weitestgehend vor Lichteinwirkung geschützt. Die Patch-clamp-Messungen wurden anschließend in einem verdunkelten Raum durchgeführt. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eines oder mehrere der oben beschriebenen Abbauprodukte gebildet wurden. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Nifedipin, Nicardipin und Nimodipin nicht selbst, sondern eines ihrer Abbauprodukte für die Aktivierung von TRPM3 α 2 verantwortlich ist.

Die Aktivierung durch Pregnenolonsulfat konnte in den folgenden Kapiteln zur weiteren Charakterisierung von TRPM3 α 2 genutzt werden. Außerdem kann sie zur weiteren Abgrenzung von TRPM3 α 1 dienen, da dieser eine Hemmung und keine Aktivierung

durch Pregnenolonsulfat zeigt. Auch die Identifizierung von TRPM3 α 2-Strömen in nativen Geweben ist mit Hilfe von Pregnenolonsulfat und Nifedipin möglich. Nachgewiesen werden konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits Pregnenolonsulfat- und Nifedipin-induzierte Ströme in einer Hypophysenzelllinie der Ratte (GH3-Zellen) sowie in akut präparierten Hypophysenzellen der Maus (unveröffentlichte Daten Johannes Oberwinkler) als auch in einer pankreatischen β -Zelllinie der Ratte (INS1-Zellen) sowie in akut präparierten pankreatischen β -Zellen der Maus [168]. Diese zeigten dieselben biophysikalischen Eigenschaften wie die TRPM3 α 2-Ströme im heterologen Expressionssystem (siehe auch Kapitel 7). Da die Expression von TRPM3 in der Hypophyse und im Pankreas zudem schon durch verschiedene Arbeitsgruppen mittels RT-PCR gezeigt werden konnte [46, 59], stellt TRPM3 α 2 einen aussichtsreichen Kandidaten für diese endogenen Ströme dar. Auch lassen diese Ergebnisse erste Schlüsse über die mögliche Funktion von TRPM3 α 2 in diesen beiden Geweben zu. So könnte TRPM3 α 2 in der Hypophyse an der Sekretion von Hypophysenhormonen (Corticotropin, Follitropin, Lutropin, Melanotropin, Somatotropin, Thyrotropin und Prolactin) und im Pankreas an der Sekretion von Insulin beteiligt sein. Die hier erhobenen Daten bilden somit eine wichtige Grundlage, um der Frage nach der Funktion von TRPM3 α 2 in diesen Geweben in Zukunft nachzugehen.

5 Permeabilität und Selektivität von TRPM3

5.1 Zusammenfassung

Ionenkanäle sind membranständige Proteine, die es Ionen erlauben, die für sie ansonsten impermeablen, biologischen Membranen bestehend aus einer Lipiddoppelschicht zu durchqueren. Ionenkanäle sind meist nur für bestimmte Ionen selektiv permeabel. Diese Selektivität ist für so wichtige physiologische Phänomene wie die Generation von Aktionspotentialen, die neuro-endokrine Sekretion und die Muskelkontraktion essentiell. Hierbei kann zwischen Ionenkanälen mit ganz unterschiedlichen Permeationsprofilen und Selektivitäten, die durch die geometrischen Verhältnisse und die Ladungsverteilungen im engsten Teil der ionenleitenden Pore - dem sogenannten Selektivitätsfilter - zustande kommen, unterschieden werden. Um die physiologische Funktion eines Ionenkanals zu verstehen, ist eine genaue Kenntnis des Permeationsprofils nötig, das sich experimentell durch elektrophysiologische Messungen bestimmen lässt.

Im vorliegenden Kapitel wurden die Poreneigenschaften von zwei TRPM3-Kanälen, die als TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 bezeichnet und durch alternatives Spleißen gebildet werden, durch elektrophysiologische Messungen der Stromgrößen und der Umkehrpotentiale unter bi-ionischen Bedingungen bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass TRPM3 α 2-Kanäle für alle getesteten divalenten Kationen eine höhere Permeabilität aufwiesen als für monovalente Kationen, die alle ungefähr die gleiche relative Permeabilität zeigten. Bei TRPM3 α 1-Kanälen war dagegen Gegenteiliges beobachtbar, nur sehr kleine divalente Ströme waren hier messbar. Interessanterweise zeigten TRPM3 α 2-Kanäle eine höhere Permeabilität für Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ und Zn²⁺ als für Ba²⁺. Dies unterscheidet sie von den nahe verwandten TRPM7-Kanälen, bei denen Ba²⁺ die höchste Permeabilität aufweist. Untersuchungen mit unterschiedlich großen quartären Ammoniumverbindungen zeigten, dass TRPM3 α 2-Kanäle einen relativ großen Porendurchmesser von ca. 7,1 Å besitzen, konsistent zu ihrem unselektiven Permeationsprofil. Die Permeationseigenschaften der konstitutiv aktiven TRPM3 α 2-Kanäle unterschieden sich nur geringfügig von denen der agonist-aktivierten TRPM3 α 2-Kanäle. Die beobachteten Unterschiede sind zumindest zum Teil auf experimentelle Unzulänglichkeiten zurückzuführen. Die Eigenschaften des Selektivitätsfilters von TRPM3 α 2 ändern sich folglich durch Bindung des Agonisten nicht oder nur geringfügig.

Die hier bestimmten Permeationseigenschaften zeigen, dass TRPM3-Kanäle einen einzigartigen Selektivitätsfilter besitzen, erlauben daher die Abgrenzung dieser Kanäle von anderen Kationenkanälen und lassen Rückschlüsse auf ihre Funktion in vivo zu.

5.2 Einleitung

Die TRPM-Proteinfamilie bildet eine sehr heterogene Familie von Kationenkanälen. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihren Aktivierungs- und Regulationsmechanismen, sondern auch in ihren Permeations- und Selektivitätseigenschaften. Während zwei Mitglieder der TRPM-Proteinfamilie - TRPM4 und TRPM5 - monovalentspezifische, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -impermeable Kationenkanäle darstellen [77, 94], handelt es sich bei den übrigen Mitgliedern um unselektive, mehr oder weniger Ca^{2+} - und Mg^{2+} -permeable Kationenkanäle ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 0,1-10$ [132]). Die beiden Mitglieder TRPM6 und TRPM7 sind neben Ca^{2+} und Mg^{2+} zusätzlich auch noch für eine Vielzahl weiterer Spuren- und Schwermetalle wie Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} und Sr^{2+} permeabel und es wird angenommen, dass diese Proteine bei physiologischen, hyperpolarisierten Membranpotentialen nur divalente Kationen leiten [100, 115, 179, 190]. Am Beispiel von TRPM3, einem weiteren Mitglied der TRPM-Proteinfamilie, konnte erstmals auch gezeigt werden, dass die Permeations- und Selektivitätseigenschaften eines Ionenkanals durch alternatives Spleißen in der mutmaßlichen Porenregion reguliert werden können [129]. Die TRPM3-Kanäle mit der längeren Pore, auch TRPM3 α 1-Kanäle genannt, wiesen im Vergleich zu denen mit der kürzeren Pore, auch TRPM3 α 2-Kanäle genannt, eine deutlich geringere Permeabilität für die beiden divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} auf. Die unterschiedlichen Permeations- und Selektivitätseigenschaften der beiden Spleißvarianten sind aus den nachfolgenden zwei Gründen zusätzlich noch von Bedeutung. Zum einen erlaubten sie den direkten Beweis, dass rekombinante TRPM3-Kanäle in der Lage sind membranständige, ionenleitende Poren zu bilden und zum zweiten zeigten sie, dass die mutmaßliche Porenregion, die aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zu den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne vermutet wurde, auch dort lokalisiert ist. Auch für ein weiteres Mitglied der TRPM-Proteinfamilie - TRPM4 - konnte dies schon mit Hilfe von Substitutions- und Mutationsanalysen bestätigt werden [126]. Für TRPM1, der TRPM3 innerhalb der TRPM-Proteinfamilie am nächsten steht, wurden in der Ratte ebenfalls schon zwei Spleißvarianten identifiziert, die sich ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion zwischen fünfter und sechster Porenregion voneinander unterscheiden [105]. Diese wurden allerdings noch nicht elektrophysiologisch charakterisiert, sodass bisher noch unklar ist, ob sich auch diese Spleißvarianten in ihren Permeations- und Selektivitätseigenschaften unterscheiden.

Um zukünftig TRPM3 α 2-Kanäle von TRPM3 α 1-Kanälen, aber auch anderen TRP-Kanälen besser abgrenzen und zusätzlich noch Rückschlüsse auf deren Funktion *in vivo* ziehen zu können, wurden in diesem Kapitel zum ersten deren Porendurchmesser und zum zweiten deren Permeations- und Selektivitätseigenschaften näher untersucht. Die Ab-

schätzung des Porendurchmessers von Kationenkanälen erfolgt in der Regel mit Hilfe von Kationen unterschiedlicher Größe. Quartäre Ammoniumverbindungen haben sich hierbei in der Vergangenheit besonders bewährt [16, 190, 205]. Aufgrunddessen wurden sie auch hier zur Abschätzung des Porendurchmessers von TRPM3 α 2 eingesetzt. Die Gründe, die für einen Einsatz quartärer Ammoniumverbindungen sprechen, sind nachfolgend nochmals kurz aufgeführt: (1) Sie liegen bei physiologischen pH-Werten von 7,2-7,3 zu über 95% in ionisierter Form vor, sodass kein pH-Wert-Wechsel erforderlich ist. Auch Komplikationen, die mit einem pH-Wert-Wechsel einhergehen (wie pH-Wert-induzierte Veränderungen des Ionenkanals), entfallen [16]. (2) Ihre Molekülgröße kann durch Substitution der Wasserstoffatome gegen Alkylgruppen schrittweise vergrößert werden, ohne dass es zu größeren Modifikationen in der dreidimensionalen Struktur kommt [16]. Die Alkylgruppen schirmen zudem die positive Ladung des Stickstoffs ab und erschweren somit die Interaktion der quartären Ammoniumverbindungen mit den negativ geladenen Aminosäureresten in der Pore. Die Untersuchung der Permeabilität mono- und divalenter Kationen durch TRPM3 α 2 wurde sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit des TRPM3 α 2 Agonisten Pregnenolonsulfat durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Poreneigenschaften nach Bindung von Pregnenolonsulfat ändern. Auch wurden die Unterschiede zwischen TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 im Hinblick auf die Permeation monovalenter und divalenter Kationen noch weiter ausgearbeitet.

5.3 Materialien und Methoden

5.3.1 Materialien

Mit Ausnahme der extra- und intrazellulären Lösungen, die für die elektrophysiologischen Messungen eingesetzt wurden, sind die übrigen in diesem Kapitel verwendeten Materialien in Kapitel 3 Abschnitt 3.1 aufgeführt.

LÖSUNGEN FÜR DIE ELEKTROPHYSIOLOGIE

In allen Experimenten wurde als extrazelluläre Lösung die in Tabelle 5.1 aufgeführte Standardbadlösung (Lösung E1) und als intrazelluläre Lösung eine der in Tabelle 5.8 aufgeführten divalentfreien, Cs⁺-haltigen intrazellulären Lösungen (Lösung I1-I3) verwendet. Zur Bestimmung der bi-ionischen Umkehrpotentiale monovalenter Kationen wurden divalentfreie Lösungen, die mit Ausnahme der MMA⁺- und TrMA⁺-Lösungen (Lösung 2.2, 2.3, 2.5 und 2.6) und der K⁺-Lösung (Lösung 3.4) ausschließlich eines der zu testenden, monovalenten Kationen enthielten (Lösung E2.1-E2.4, Lösung E3.1-3.8), eingesetzt (Tabelle 5.2 und Tabelle 5.3). Zusätzlich enthielten sie noch HEPES zur Stabilisierung des

pH-Wertes sowie EGTA und EDTA zur Komplexbildung möglicher im entionisierten Wasser vorkommender Spuren an divalenten Kationen, die die Bestimmung der bi-ionischen Umkehrpotentiale negativ beeinflussen könnten. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 erfolgte entweder mit HCl oder den entsprechenden Hydroxiden des monovalenten Kations und die Einstellung der Osmolalität auf 320-330 mosmol · kg⁻¹ mit D-Glucose. Da die Hydroxide von MMA⁺ und TrMA⁺ nicht zur Verfügung standen, wurde der pH-Wert mit NMDG⁺ eingestellt. 14 mM NMDG⁺ waren hierzu erforderlich (Lösung 2.3 und 2.6). Durch Entfernung von EGTA und EDTA aus diesen Lösungen konnte die zur Einstellung des pH-Werts benötigte NMDG⁺-Konzentration auf 4 mM reduziert werden (Lösung 2.2 und 2.5). Dies ist insofern von Bedeutung, da NMDG⁺ eine hemmende Wirkung auf TRPM3 α 2 ausübt (siehe Kapitel 7). Der divalentfreien K⁺-Lösung (Lösung 3.4) wurde zusätzlich noch 2 mM CsCl zur Hemmung der endogen in HEK293-Zellen vorkommenden K⁺-Kanäle zugesetzt. Zur Bestimmung der bi-ionischen Umkehrpotentiale divalenter Kationen wurde monovalentfreie Lösungen, die ausschließlich eines der zu testenden, divalenten Kationen in einer Konzentration von 2 mM (Lösung E4.1-E4.2), 10 mM (Lösung E5.1-E5.7), 60 mM (Lösung E6.1-E6.3) oder 120 mM (Lösung E7.1-E7.5) enthielten, eingesetzt (Tabelle 5.4, 5.5, 5.6 und 5.7). Auch die monovalentfreien Lösungen enthielten zur Stabilisierung des pH-Wertes HEPES. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte hier mit NMDG⁺, da die Hydroxide der divalenten Kationen nicht zur Verfügung standen und zudem zumeist in Wasser praktisch unlöslich sind. Der pH-Wert der 10 mM Zn²⁺-Lösung (Lösung 5.7) konnte nur auf pH 7,15 eingestellt werden, da es bei pH-Werten höher 7,15 zur Ausfällung von schwerlöslichem Zn(OH)₂ kam. Auch die Einstellung des pH-Werts der 120 mM Zn²⁺- und 120 mM Ni²⁺-Lösung war nicht möglich, ohne dass es zur Ausfällung von schwerlöslichen Hydroxiden kam. Aufgrunddessen wurde auf die Vermessung dieser beiden Lösungen verzichtet. Die Einstellung der Osmolalität der monovalentfreien Lösungen erfolgte anstelle von D-Glucose mit Mannit. Mannit besitzt gegenüber D-Glucose den Vorteil, dass es in geringerem Maße den Energiestoffwechsel der Zellen beeinflusst, was aufgrund der hier eingesetzten hohen Konzentrationen von Bedeutung war.

Extrazelluläre Lösungen

Tabelle 5.1: **Standard-Badlösung**

Nr	Na ⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	K ⁺ [mM]	Ca ²⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
E1	142-149	10	3	2	2	160-167	10	3-15

pH-Wert: 7,2-7,3

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321-333

Tabelle 5.2: **Divalente Lösungen E2**

Nr	Ion	X [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EGTA [mM]	EDTA [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
E2.1	NH ₄ ⁺	145	-	121	2	2	10	70
E2.2	MMA ⁺	145	14	145	2	2	10	30
E2.3	MMA ⁺	145	4	145	-	-	10	40
E2.4	DMA ⁺	145	-	129	2	2	10	60
E2.5	TrMA ⁺	145	14	145	2	2	10	30
E2.6	TrMA ⁺	145	4	145	-	-	10	40
E2.7	TeMA ⁺	145	-	132	2	2	10	70
E2.8	NMDG ⁺	145	-	134	2	2	10	30

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321-328

Tabelle 5.3: **Divalentfreie Lösungen E3**

Nr	Ion	X [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EGTA [mM]	EDTA [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
E3.1	Cs ⁺	145	-	128-130	2	2	10	60-63
E3.2	Na ⁺	145-158	-	130-145	2	2	10	30-53
E3.3	Li ⁺	145	-	131	2	2	10	45
E3.4	K ⁺	160	-	145	2	2	10	30

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 323-327

Tabelle 5.4: **Monovalentfreie Lösung 2 mM E4**

Nr	Ion	X [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
E4.1	Ca ²⁺	2	3-4	4	10	288-295
E4.2	Mg ²⁺	2	3-4	4	10	295

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 323-335

Tabelle 5.5: Monovalentfreie 10 mM Lösungen E5

Nr	Ion	X [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
E5.1	Ca ²⁺	10	3-4	20	10	265-267
E5.2	Sr ²⁺	10	4	20	10	265
E5.3	Ba ²⁺	10	4	20	10	265
E5.4	Mg ²⁺	10	4	20	10	265
E5.5	Mn ²⁺	10	4	20	10	265
E5.6	Ni ²⁺	10	4	20	10	265
E5.7	Zn ²⁺	10	3	20	10	265

pH-Wert: 7,2 - 7,3 (Ausnahme: pH-Wert der Zn²⁺-Lösung: 7,15)

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321-328

Tabelle 5.6: Monovalentfreie 60 mM Lösungen E6

Nr	Ion	X [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
E6.1	Ba ²⁺	60	4	120	10	157
E6.2	Mg ²⁺	60	4	120	10	143
E6.3	Mn ²⁺	60	4	120	10	148

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 324-328

Tabelle 5.7: Monovalentfreie 120 mM Lösungen E7

Nr	Ion	X [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
E7.1	Ca ²⁺	113-120	4	226-240	9-10	-
E7.2	Sr ²⁺	120	5	240	10	-
E7.3	Ba ²⁺	120	4	240	10	-
E7.4	Mg ²⁺	112	3	223	9	-
E7.5	Mn ²⁺	120	5	241	10	-

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 318-329

Intrazelluläre Lösungen

Tabelle 5.8: Intrazelluläre Lösungen

Nr	Cs ⁺ [mM]	Asp ⁻ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EGTA [mM]	EDTA [mM]	BAPTA [mM]	ATP [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
I1	165-173	100	45-46	10	-	-	-		0-3
I2	187-189	80	45	-	5	10	4 (Na)	10	-
I3	189-192	80	45	-	5	10	4 (Tris)	10	-

pH-Wert: 7,2-7,3

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 303-309

Stocklösungen

Pregnenolonsulfat wurde in Wasser gelöst (Stocklösung: 3,5 mM). Die Ionenkonzentrationen der 10,5 μ M und 35 μ M Pregnenolonsulfat-haltigen Lösungen lagen aufgrunddessen um 0,3% und 1% niedriger als angegeben.

5.3.2 Methoden

Die nachfolgend gezeigten tight-seal, whole-cell Patch-clamp-Messungen wurden, wie in Kapitel 3 Abschnitt 3.2 beschrieben, durchgeführt.

EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

Bestimmung der relativen Permeabilitäten

Zur Bestimmung der relativen Permeabilitäten der monovalenten Kationen wurden divalentfreie Lösungen (Tabelle 5.2 - Tabelle 5.3) und zur Bestimmung der relativen Permeabilitäten der divalenten Kationen monovalentfreie Lösungen (Tabelle 5.4 - Tabelle 5.7) eingesetzt. Zur Bestimmung der relativen Permeabilitäten in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat wurden den divalentfreien Lösungen 35 μ M und den monovalentfreien Lösungen mit Ausnahme der 60 mM Ba²⁺-Lösung 10,5 μ M Pregnenolonsulfat zugesetzt (60 mM Ba²⁺-Lösung: 35 μ M Pregnenolonsulfat). Die Applikation der mono- und divalentfreien Lösungen erfolgte während des Experimentes für jeweils 10-20 Sekunden. Als intrazelluläre Lösung wurde in diesen Experimenten eine der divalentfreien, Cs⁺-haltigen Lösungen (Lösung I1-I3) eingesetzt. Die Umkehrpotentiale wurden nach Abschluss des Experimentes aus den auf die applizierten Spannungen gemessenen Stromantworten extrahiert und um die Potentialdifferenz zwischen Standardbadlösung (Lösung E1) und der jeweiligen intrazellulären Lösung (Lösung I1-I3) korrigiert (englisch „Liquid junction potential“). Zu-

sätzlich wurde noch das Umkehrpotential des Differenzstromes (I_{Mono} mit PS - I_{Mono} ohne PS bzw. I_{Div} mit PS - I_{Div} ohne PS, im folgenden abgekürzt mit ΔPS) bestimmt, um eine Aussage über die Umkehrpotentiale unter ausschließlich Pregnenolonsulfat-stimulierten Bedingungen machen zu können. Dieses wurde ebenfalls um die Potentialdifferenz zwischen Standardbadlösung (Lösung E1) und der jeweiligen intrazellulären Lösung (Lösung I1-I3) korrigiert. Anschließend wurden die relativen Permeabilitäten der monovalenten und divalenten Kationen gegenüber Cs^+ aus den ermittelten Umkehrpotentialen unter Verwendung der Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)-Spannungsgleichung bestimmt. Hierbei handelt es sich eine erweiterte Fassung der Nernst'schen Gleichung, die eine unabhängige Permeation der Ionen durch die Ionenkanäle in der Membran annimmt.

Relative Permeabilität monovalenter Kationen [69]:

$$\frac{P_{\text{Mono}}}{P_{\text{Cs}^+}} = \frac{[\text{Cs}^+]}{[\text{Mono}]} \cdot e^{\frac{E_{\text{rev}}F}{RT}} \quad (5.1)$$

Relative Permeabilität divalenter Kationen [69]:

$$\frac{P_{\text{Div}}}{P_{\text{Cs}^+}} = \frac{[\text{Cs}^+]}{4[\text{Div}]} \cdot e^{\frac{E_{\text{rev}}F}{RT}} \left(e^{\frac{E_{\text{rev}}F}{RT}} + 1 \right) \quad (5.2)$$

[Mono] und [Div] stehen für die eingesetzten Konzentrationen der extrazellulären, monovalenten und divalenten Kationen in mmol/l und $[\text{Cs}^+]$ für die eingesetzte, intrazelluläre Cs^+ -Konzentration in mmol/l. E_{rev} bezeichnet das ermittelte bi-ionische Umkehrpotential in Volt, F die Faraday Konstante ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), R die allgemeine Gaskonstante ($8,3145 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) und T die absolute Temperatur in Kelvin.

Abschätzung des Porendurchmessers

Zur Abschätzung des Porendurchmessers wurden die relativen Permeabilitäten der quartären Ammoniumverbindungen unterschiedlicher Größe herangezogen. Diese wurden gegen die entsprechenden Molekülgrößen der quartären Ammoniumverbindungen aufgetragen. Durch die so erhaltenen Datenpunkte wurde anschließend unter Verwendung der Volumenausschluss-Gleichung (inklusive Kompensation des Reibungswiderstandes [36]) eine Kurve gefittet. Der Fit erfolgte mit GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA).

$$\frac{P_X}{P_{\text{Cs}^+}} = \frac{k}{a} \left(1 - \frac{a}{d} \right)^2 \quad (5.3)$$

a steht hierbei für den Durchmesser der quartären Ammoniumverbindung, d für den zu ermittelnden Durchmesser der Pore und k für eine Konstante.

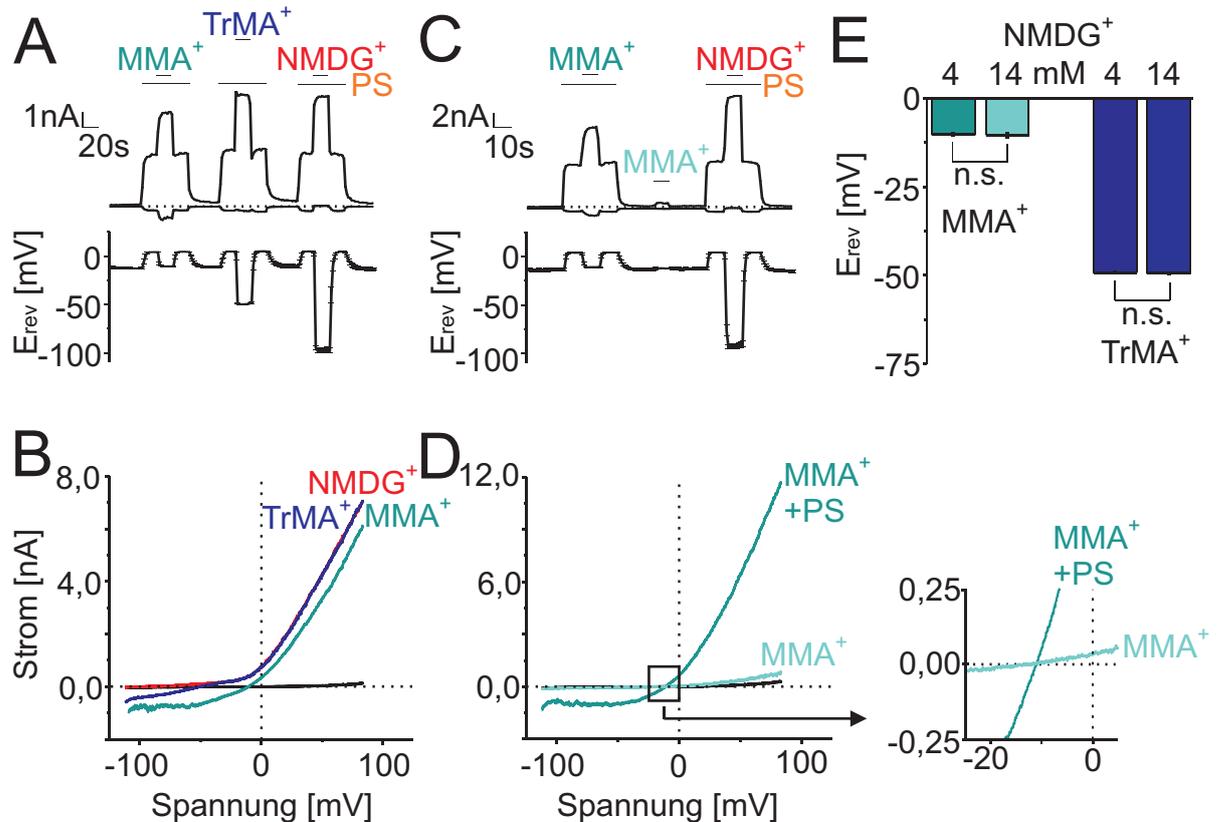


Abb. 5.1: **Bestimmung der bi-ionischen Umkehrpotentiale der quartären Ammoniumverbindungen für TRPM3 α 2** (A) Strom einer TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer Monomethylammonium- (MMA⁺), Trimethylammonium- (TrMA⁺) und N-Methyl-D-Glucamin- (NMDG⁺) Lösung in Anwesenheit von 35μ M Pregnenolonsulfat (PS) sowie die entsprechenden gemittelten bi-ionischen Umkehrpotentiale für $n = 8$ Zellen. (B) Strom-Spannungsbeziehung während der Applikation der MMA⁺-, TrMA⁺- und NMDG⁺-Lösung. (C) Strom einer TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer MMA⁺-Lösung in Ab- und Anwesenheit von 35μ M Pregnenolonsulfat sowie die entsprechenden bi-ionische Umkehrpotentiale für $n = 8$ Zellen. (D) Strom-Spannungsbeziehung während der Applikation der (MMA⁺)-Lösung in Ab- und Anwesenheit von Pregnenolonsulfat. Das rechte Achsenkreuz zeigt dieselben Daten vergrößert. (E) Statistischer Vergleich der bi-ionischen Umkehrpotential einer 4 und 14 mM NMDG⁺-haltigen MMA⁺-Lösung sowie einer 4 und 14 mM NMDG⁺-haltigen TrMA⁺-Lösung ($n = 7$). Ermittlung der Signifikanzen unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten T-Tests nach Student.

5.4 Ergebnisse

Abschätzung des Porendurchmessers von TRPM3 α 2

Zur Abschätzung des Porendurchmessers von TRPM3 α 2 wurden zunächst sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat die bi-ionischen Um-

kehrpotentiale von N-Methyl-D-Glucamin (NMDG⁺: Ø = 6,8 Å) und den nachfolgend aufgeführten quartären Ammoniumverbindungen bestimmt: Ammonium (NH₄⁺: Ø = 3,4 Å), Monomethylammonium (MMA⁺: Ø = 3,6 Å), Dimethylammonium (DMA⁺: Ø = 4,6 Å), Trimethylammonium (TrMA⁺: Ø = 5,2 Å), Tetramethylammonium (TeMA⁺: Ø = 5,8 Å) [190]. In Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat konnte hierbei mit zunehmender Molekülgröße neben der Abnahme der Einwärtsströme auch eine Abnahme der bi-ionischen Umkehrpotentiale beobachtet werden (Abbildung 5.1A und B). In Gegenwart von NMDG⁺ war kein signifikanter Einwärtsstrom mehr messbar. Auch das Umkehrpotential von NMDG⁺ lag mit -95 mV bei sehr negativen Spannungen (Abbildung 5.1A und B). Abbildung 5.2A zeigt zusammenfassend die für die eingesetzten quartären Ammoniumverbindungen erhaltenen bi-ionischen Umkehrpotentiale in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat. Zwischen den Umkehrpotentialen, die mit der 4 mM NMDG⁺-haltigen und der 14 mM NMDG⁺-haltigen Monomethylammonium-Lösung bzw. Trimethylammonium-Lösung bestimmt wurden, waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Abbildung 5.1E). Folglich beeinflusste das in diesen Lösungen enthaltene NMDG⁺ die Umkehrpotentiale nicht. Auch in Abwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat konnte mit zunehmender Molekülgröße eine Abnahme der bi-ionischen Umkehrpotentiale beobachtet werden (Abbildung 5.2A). Signifikante Unterschiede zwischen den bi-ionischen Umkehrpotentialen in An- und Abwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat wurden bei MMA⁺, DMA⁺, TeMA⁺ und NMDG⁺ festgestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den bi-ionischen Umkehrpotentialen in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat und den Umkehrpotentialen der entsprechenden Differenzströme (I_{Mono} mit PS - I_{Mono} ohne PS), war nur bei MMA⁺ und NMDG⁺ nachweisbar (Abbildung 5.2A).

Aus den ermittelten bi-ionischen Umkehrpotentialen wurden anschließend die relativen Permeabilitäten gegenüber Cs⁺ bestimmt. Auch hier konnte mit zunehmender Molekülgröße eine Abnahme der relativen Permeabilitäten festgestellt werden (Abbildung 5.2). Nach Auftragung der relativen Permeabilitäten gegen die entsprechenden Molekülgrößen, konnten durch die so erhaltenen Datenpunkte unter Verwendung der Volumenausschluss-Gleichung (inklusive Kompensation des Reibungswiderstandes) Kurven gefittet werden (Abbildung 5.2C). Der Fit lieferte einen TRPM3α2-Porendurchmesser von 7,12 Å (95% Konfidenzintervall: 5,66-8,58; im folgenden mit KI abgekürzt) für die Datenpunkte in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat, von 7,45 Å (KI: 5,14-9,76) für die Datenpunkte in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat und von 7,05 Å (KI: 6,54-7,56) für die Datenpunkte der Differenzströme. Die Unterschiede zwischen den aus den Fits erhaltenen TRPM3α2-Porendurchmessern ergeben sich aus den unterschiedlichen für TeMA⁺ und NMDG⁺ ermittelten bi-ionischen Umkehrpotentialen, deren Bestimmung, insbesondere in Abwesen-

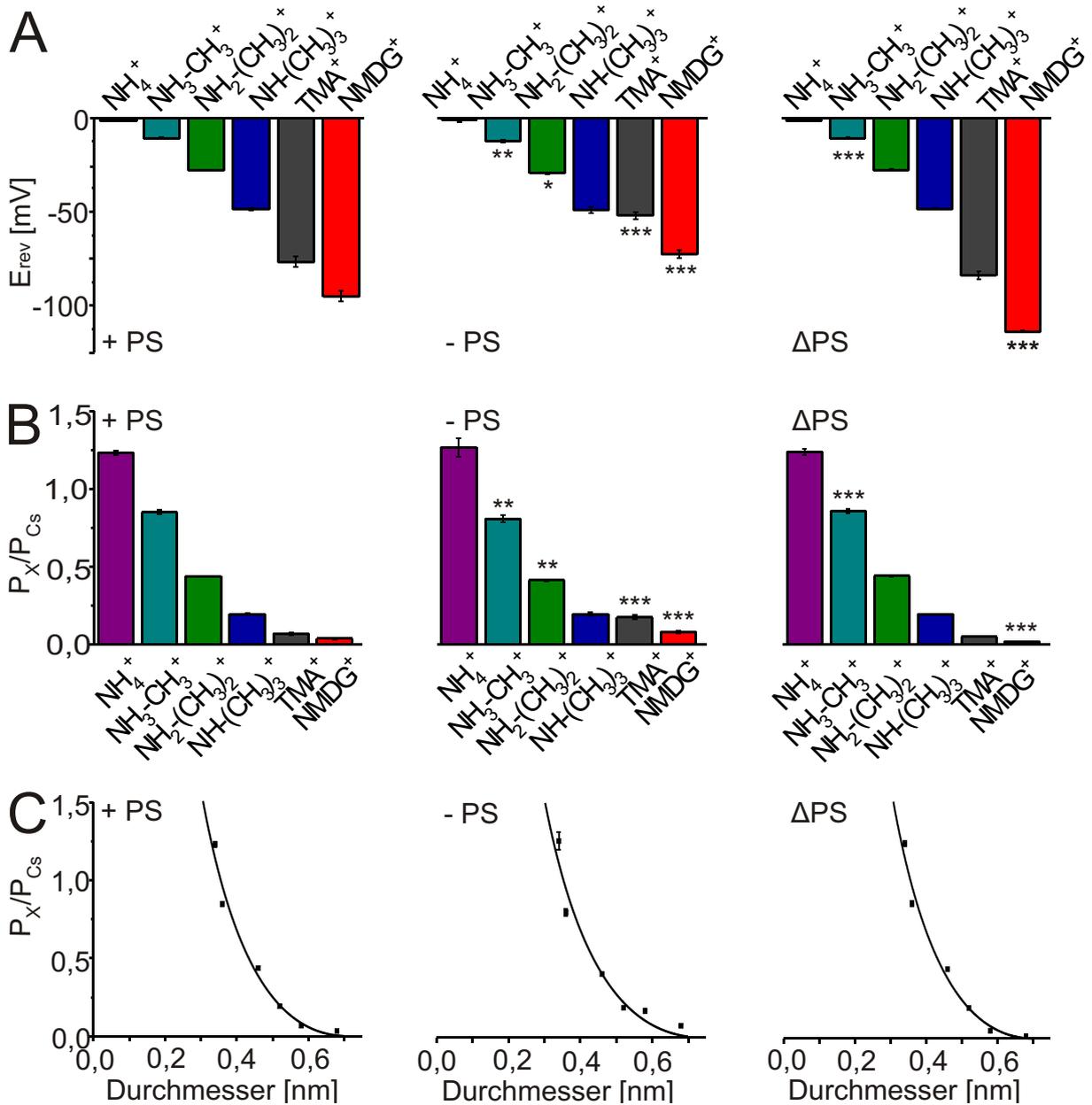


Abb. 5.2: **Abschätzung des Porendurchmessers von TRPM3 α 2** (A) Zusammenfassung der aus den TRPM3 α 2-Stromantworten ermittelten bi-ionischen Umkehrpotentiale der quartären Ammoniumverbindungen (+PS, -PS, Δ PS) ($n \geq 8$). (B) Zusammenfassung der aus den bi-ionischen Umkehrpotentialen aus (A) berechneten relativen Permeabilitäten (+PS, -PS, Δ PS) ($n \geq 8$). Signifikanzen: +PS zu -PS, +PS zu Δ PS, ermittelt mit Hilfe eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests nach Student. (C) Abschätzung des TRPM3 α 2-Porendurchmessers mit Hilfe der Volumenausschluss-Gleichung. Die Abschätzungen lieferten TRPM3 α 2-Porendurchmesser von 7,12 Å (+PS), 7,45 Å (-PS) und 7,05 Å (Δ PS) ($n \geq 8$).

heit von Pregnenolonsulfat aufgrund der flachen Stromverläufe, der geringen Stromgrößen und dem damit verbundenen erhöhten Rauschen, Schwierigkeiten bereitete. Der Porendurchmesser scheint sich in Anbetracht der ermittelten 95% Konfidenzintervalle folglich

in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat nicht bzw. nur geringfügig von dem in Abwesenheit von Pregneolonsulfat zu unterscheiden.

Permeabilität divalenter Kationen durch TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2

Die TRPM3 α 2-Spleißvariante weist im Gegensatz zur TRPM3 α 1-Spleißvariante eine deutlich höhere Permeabilität für die beiden divalenten Kationen Ca²⁺ und Mg²⁺ als für die monovalenten Kationen Na⁺ und K⁺ auf [129]. Im folgenden wurde geprüft, ob sie neben Ca²⁺ und Mg²⁺ auch noch für weitere divalente Kationen (Ba²⁺, Sr²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ und Ni²⁺) permeabel ist. Auch die TRPM3 α 1-Spleißvariante wurde auf die Permeabilität dieser divalenten Kationen hin untersucht. Eingesetzt wurden hierbei sowohl 10 mM als auch 120 mM Lösungen der entsprechenden divalenten Kationen. Für die Patch-clamp-Messungen mit den 120 mM Lösungen wurden anstelle der bisher immer verwendeten transient transfizierten TRPM3 α 2- und TRPM3 α 1-Zellen stabil transfizierte Zellen verwendet.

Abbildung 5.3A, B und Abbildung 5.3C, D zeigen die Stromgrößen der TRPM3 α 2- und TRPM3 α 1-Einwärtsströme, die mit den 10 mM und 120 mM Ca²⁺-, Sr²⁺- und Ba²⁺-Lösungen erreicht wurden. Während in den TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen bei Applikation der 10 mM und 120 mM Lösungen eine Zunahme des Einwärtsstromes gegenüber der Standardbadlösung beobachtet wurde, war in den entsprechenden TRPM3 α 1 exprimierenden HEK293-Zellen eine Abnahme des Einwärtsstromes feststellbar. Bei Auswertung der Ca²⁺-, Sr²⁺- und Ba²⁺-Umkehrpotentiale war ausgehend von dem Umkehrpotential unter Standardbadlösungsbedingungen bei TRPM3 α 2 eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu positiveren Potentialen und bei TRPM3 α 1 eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Potentialen beobachtbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass TRPM3 α 2 eine hohe und TRPM3 α 1 nur eine geringe Permeabilität für die divalenten Kationen Ca²⁺, Sr²⁺ und Ba²⁺ besitzt.

Abbildung 5.3C und Abbildung 5.3F zeigen zusammenfassend die mit den 10 mM ($n \geq 7$) und 120 mM ($n \geq 5$) Lösungen erzielten Stromgrößen der TRPM3 α 2- und TRPM3 α 1-Einwärtsströme. Signifikante TRPM3 α 2-Einwärtsströme waren in TRPM3 α 2 transfizierten HEK293-Zellen gegenüber nicht transfizierten HEK293-Zellen bei Applikation aller eingesetzten 10 mM und 120 mM Lösungen nachweisbar. Zusätzlich wurde in den TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen bei Applikation der 120 mM Lösungen noch eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu positiveren Potentialen beobachtet (Abbildung 5.3G). Infolgedessen scheint TRPM3 α 2 für alle hier getesteten divalenten Kationen permeabel zu sein, allerdings in einem unterschiedlichen Maße. Anhand der Stromgröße der TRPM3 α 2-Einwärtsströme konnte für die divalenten Kationen folgende Permeationsreihenfolge festgehalten werden: Ca²⁺ > Mn²⁺ \geq Zn²⁺ > Mg²⁺ > Sr²⁺ > Ni²⁺ > Ba²⁺.

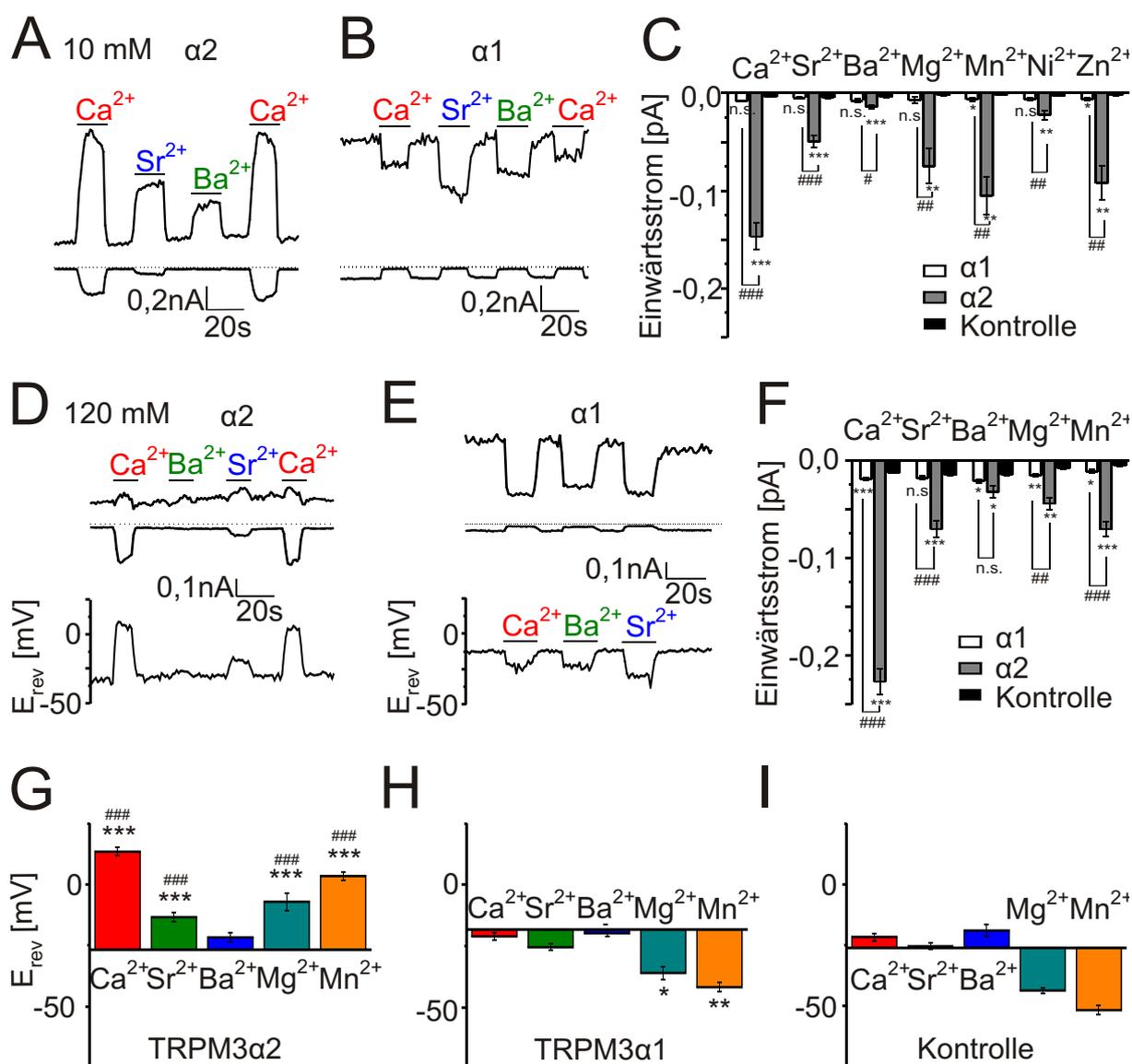


Abb. 5.3: **Permeabilität divalenter Kationen durch TRPM3 $\alpha 1$ und TRPM3 $\alpha 2$** (A,B,D,E) Ströme einer TRPM3 $\alpha 2$ (A,D) und einer TRPM3 $\alpha 1$ (B,E) exprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer 10 (A,B) und 120 mM (D,E) Ca^{2+} -, Sr^{2+} - und Ba^{2+} -Lösung sowie die mit der 120 mM Ca^{2+} -, Sr^{2+} - und Ba^{2+} -Lösung erhaltenen Umkehrpotentiale. (C,F) Zusammenfassung der mit den 10 (C) und 120 mM (F) divalenten Lösungen erhaltenen TRPM3 $\alpha 2$ -, TRPM3 $\alpha 1$ - und Kontroll-Stromantworten bei -80 mV. (G,H,I) Zusammenfassung der mit den 120 mM divalenten Lösungen erhaltenen Umkehrpotentiale von TRPM3 $\alpha 2$ -, TRPM3 $\alpha 1$ - und nicht-transfizierten Kontrollzellen. Die Basis der Balken entsprechen den Umkehrpotentialen der Standardbadlösung in den TRPM3 $\alpha 2$ -, TRPM3 $\alpha 1$ - und Kontrollzellen (Signifikanzen: * TRPM3 $\alpha 2$, TRPM3 $\alpha 1$ zu Kontrolle; # TRPM3 $\alpha 1$ zu TRPM3 $\alpha 2$, ermittelt mit Hilfe eines zweiseitigen, ungepaarten T-Tests nach Student).

Signifikante TRPM3 $\alpha 1$ -Einwärtsströme waren in TRPM3 $\alpha 1$ transfizierten HEK293-Zellen gegenüber nicht transfizierten HEK293-Zellen bei Applikation der 10 mM Mn^{2+} - und

Zn²⁺-Lösung und bei Applikation der 120 mM Ca²⁺-, Mn²⁺-, Mg²⁺- und Ba²⁺-Lösung nachweisbar. Im Gegensatz zu den TRPM3α2 exprimierenden HEK293-Zellen war in den TRPM3α1 exprimierenden HEK293-Zellen bei Applikation der 120 mM Lösungen allerdings eine Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Potentialen feststellbar (Abbildung 5.3H). Auch waren die Einwärtsströme und Umkehrpotentiale in den TRPM3α1 exprimierenden HEK293-Zellen im Vergleich zu denen der TRPM3α2 exprimierenden HEK293-Zellen signifikant niedriger. Folglich zeigt auch TRPM3α1 eine Permeabilität für divalente Kationen, allerdings eine deutlich geringere als TRPM3α2.

Eine Hemmung der Cs⁺-getragenen TRPM3α2- und TRPM3α1-Auswärtsströme, wie sie bereits für Ca²⁺ und Mg²⁺ beschrieben wurde [129], wurde auch hier sowohl in den TRPM3α2 als auch in den TRPM3α1 exprimierenden HEK293-Zellen für alle eingesetzten divalenten Kationen beobachtet (Abbildungen 5.3A-D).

Vergleich der Permeabilität mono- und divalenter Kationen durch TRPM3α2 in Ab- und Anwesenheit von Pregnenolonsulfat

Im folgenden wurden die relativen Permeabilitäten mono- und divalenter Kationen durch TRPM3α2 in Ab- und Anwesenheit des TRPM3α2-Agonisten Pregnenolonsulfat miteinander verglichen. Unterschiede in den relativen Permeabilitäten sowie Unterschiede in den anhand der Stromgröße und der Umkehrpotentiale ermittelten Rangfolgen in Abwesenheit und in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat waren hierbei von Interesse, da sie auf eine mögliche Konformationsänderung von TRPM3α2 nach Bindung von Pregnenolonsulfat und eine mögliche Veränderung von dessen Poreneigenschaften hindeuten.

Um die relativen Permeabilitäten der mono- und divalenten Kationen in Ab- und Anwesenheit direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Lösungen der mono- und divalenten Kationen mit und ohne Zusatz von Pregnenolonsulfat immer gleichzeitig vermessen. Der Verlauf einer solchen Messung ist in Abbildung 5.4A und B für divalente Kationen am Beispiel von Ca²⁺ und in Abbildung 5.4D und E für monovalente Kationen am Beispiel von Li⁺ gezeigt. Abbildung 5.4C und Abbildung 5.4F fassen die mit den mono- und divalenten Lösungen erzielten Stromgrößen der TRPM3α2-Einwärtsströme in Anwesenheit und in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat zusammen. Die TRPM3α2-Einwärtsströme waren für alle hier eingesetzten mono- und divalenten Kationen in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat signifikant größer als in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat. Unterschiede in der Rangfolge der Größe der Einwärtsströme in Abwesenheit (Cs⁺ > K⁺ > Li⁺ > Na⁺ bzw. Ca²⁺ > Mn²⁺ ≥ Zn²⁺ > Mg²⁺ > Ni²⁺ > Ba²⁺) und in Anwesenheit (Cs²⁺ ≫ K⁺ ≥ Li⁺ > Na⁺ bzw. Ca²⁺ > Mn²⁺ ≥ Zn²⁺ > Mg²⁺ > Ni²⁺ > Ba²⁺) von Pregnenolonsulfat waren jedoch nicht feststellbar.

Abbildung 5.5A und Abbildung 5.5B zeigen zusammenfassend die aus den bi-ionischen

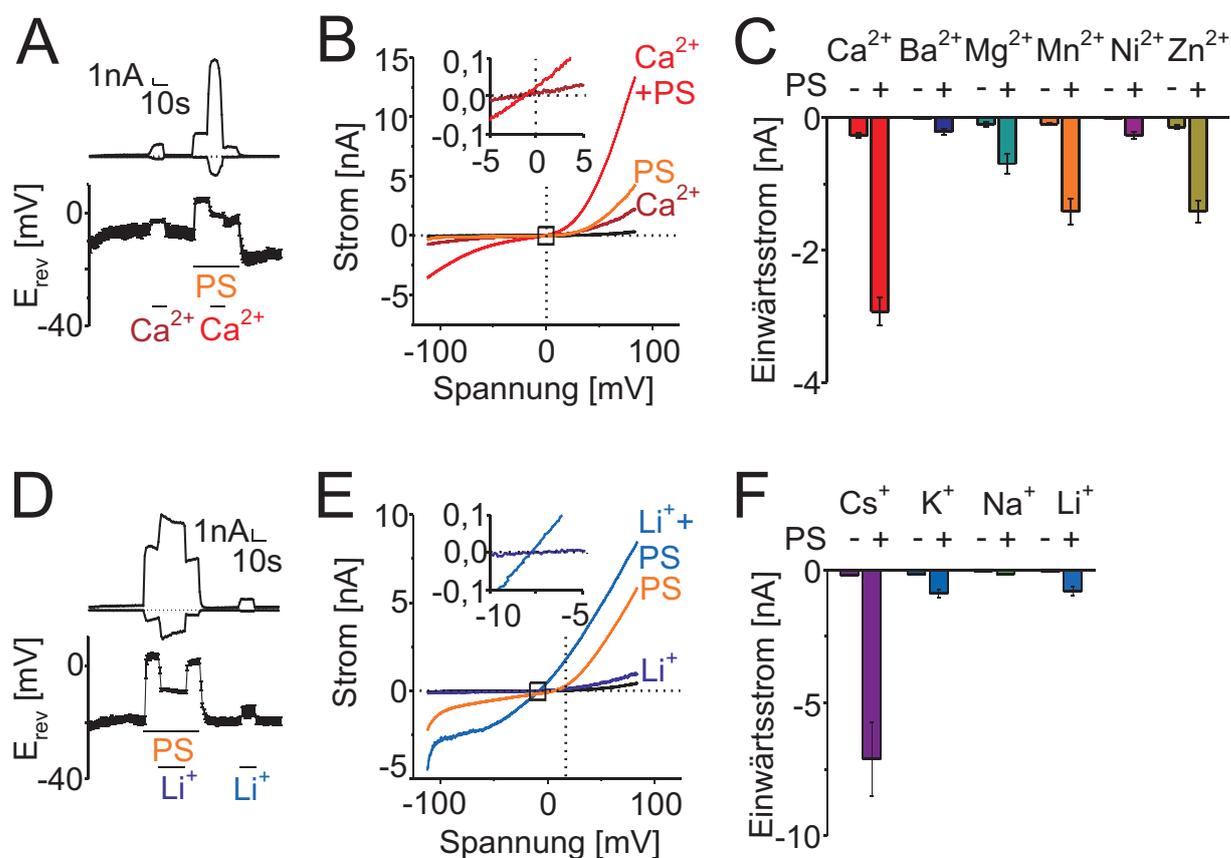


Abb. 5.4: **Vergleich der Permeabilität mono- und divalenter Kationen durch TRPM3 α 2 in Ab- und Anwesenheit von Pregnenolonsulfat** (A,D) Strom einer TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer 10 mM Ca^{2+} -Lösung mit und ohne Zusatz von $10,5$ μM Pregnenolonsulfat (PS) (A) bzw. der Applikation einer 145 mM Li^+ -Lösung mit und ohne Zusatz von 35 μM Pregnenolonsulfat (D) sowie die entsprechenden gemittelten Umkehrpotentiale für $n = 7$ bzw. $n = 8$ Zellen. (B,E) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation der 10 mM Ca^{2+} -Lösung (B) bzw. der 145 mM Li^+ -Lösung (E) mit und ohne Zusatz von Pregnenolonsulfat. Einsätze: Vergrößerung der Strom-Spannungsbeziehungen im Bereich der Umkehrpotentiale. (C,F) Zusammenfassung der Stromantworten divalenter ($n \geq 7$) (C) und monovalenter ($n \geq 6$) Kationen (F) mit und ohne Zusatz von Pregnenolonsulfat.

Umkehrpotentialen bestimmten relativen Permeabilitäten der mono- und divalenten Kationen in Abwesenheit und in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat. Die ermittelten relativen Permeabilitäten der monovalenten Kationen ($-\text{PS}$: $P_{\text{Mono}}/P_{\text{Cs}} = 0,7-1,0$; $+\text{PS}$: $P_{\text{Mono}}/P_{\text{Cs}} = 0,8-1,0$) waren hierbei im Vergleich zu denen der divalenten Kationen ($-\text{PS}$: $P_{\text{Div}}/P_{\text{Cs}} = 2,1-9,1$, $+\text{PS}$: $P_{\text{Div}}/P_{\text{Cs}} = 4,4-12,8$) deutlich kleiner. Auch unterschieden sie sich im Gegensatz zu den relativen Permeabilitäten der divalenten Kationen nur geringfügig voneinander. Die für die divalenten Kationen anhand der relativen Permeabilitäten aufstellbaren

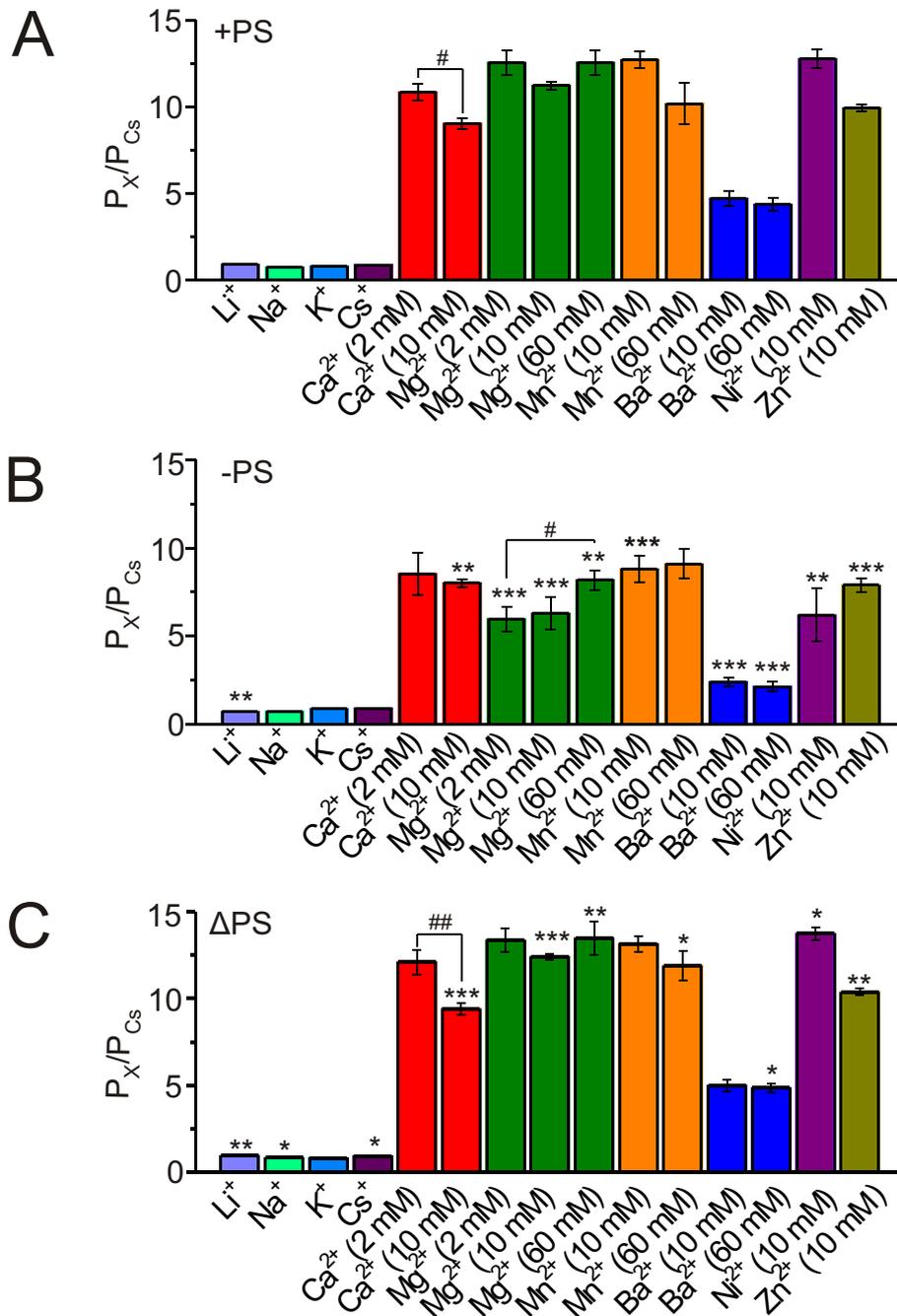


Abb. 5.5: **Zusammenfassung der relativen Permeabilitäten mono- und divalenter Kationen** Zusammenfassung der aus den bi-ionischen Umkehrpotentialen der Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromantworten (A), der konstitutiven TRPM3 α 2-Stromantworten (B) bzw. der Differenz-Stromantworten (C) ermittelten relativen Permeabilitäten mono- und divalenter Kationen (n \geq 6). Signifikanzen: ermittelt mit Hilfe eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests: (*: +PS zu -PS, +PS zu Δ PS) bzw. ungepaarten T-Tests (#) nach Student.

Permeationsreihenfolgen (-PS: 10 mM: Mn²⁺ \approx Ca²⁺ \approx Zn²⁺ > Mg²⁺ > Ni²⁺ > Ba²⁺, +PS: 10 mM: Ni²⁺ \approx Mg²⁺ \approx Mn²⁺ \approx Ca²⁺ \approx Zn²⁺ > Ba²⁺) unterschieden sich mit

Ausnahme von Ni^{2+} nicht von den oben anhand der Stromgrößen der Einwärtsströme aufgestellten Rangfolgen in Ab- und Anwesenheit von Pregnenolonsulfat. Unterschiede zwischen den Rangfolgen in Ab- und Anwesenheit von Pregnenolonsulfat waren mit Ausnahme von Ni^{2+} auch nicht feststellbar. Zwischen den relativen Permeabilitäten, die mit niedrigeren bzw. höheren Konzentrationen des entsprechenden divalenten Kations bestimmt wurden, waren in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat mit Ausnahme von Mg^{2+} (2 mM, 60 mM) und in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat mit Ausnahme von Ca^{2+} (2 mM, 10 mM) keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Beim direkten Vergleich der relativen Permeabilitäten der entsprechenden mono- und divalenten Kationen in Abwesenheit und in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat zeigte sich jedoch, dass die relativen Permeabilitäten der monovalenten Kationen mit Ausnahme von Cs^+ , K^+ und Na^+ und der divalenten Kationen mit Ausnahme von 2 mM Ca^{2+} und 60 mM Mn^{2+} in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat signifikant kleiner waren als die entsprechenden relativen Permeabilitäten der mono- und divalenten Kationen in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat. Die aus den bi-ionischen Umkehrpotentialen der Differenzströme bestimmten relativen Permeabilitäten der mono- und divalenten Kationen unterschieden sich mit Ausnahme von K^+ , 2 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie 10 mM Ba^{2+} und Mn^{2+} ebenfalls signifikant von den relativen Permeabilitäten der entsprechenden mono- und divalenten Kationen in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat (Abbildung 5.5C).

Da die hier beobachteten Unterschiede vermutlich zum größten Teil auf experimentelle Unzulänglichkeiten zurückzuführen sind, scheinen sich die Eigenschaften des Selektivitätsfilters von TRPM3 α 2 folglich in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat nicht oder nur geringfügig zu ändern.

5.5 Diskussion

Um einen Einblick in die Poreneigenschaften von TRPM3 α 2 zu erhalten, wurden in diesem Kapitel zum einen der Porendurchmesser und zum anderen die Permeations- und Selektivitätseigenschaften von TRPM3 α 2 bestimmt. Dies wurde mittels Messung der Stromgröße der Einwärtsströme und der Bestimmung der Umkehrpotentiale unter ausschließlich bi-ionischen Bedingungen erreicht. Die Bestimmung der Umkehrpotentiale gestaltete sich jedoch insbesondere in Abwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat als schwierig, da die Stromgrößen der nicht Pregnenolonsulfat-induzierten Ströme nur sehr klein und die Stromverläufe im Bereich der Umkehrpotentiale nur sehr flach waren. Infolgedessen zeigen die ermittelten bi-ionischen Umkehrpotentiale insbesondere in Abwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat eine deutliche Abhängigkeit von der Stromgröße (siehe un-

ten). Weiterhin kann auch eine Beeinträchtigung des Umkehrpotentials durch endogene in HEK293-Zellen vorkommende Ströme wie beispielsweise Ca^{2+} -aktivierte K^+ - und Cl^- -Ströme sowie den sogenannten MIC- (= „Magnesium Inhibited Current“) bzw. MagNuM- (= „Magnesium Nucleotide regulated Metal current“) Strom nicht ausgeschlossen werden. Eine Aktivierung des MIC- bzw. MagNuM-Stromes war jedoch insbesondere aufgrund der hier verwendeten Mg^{2+} -freien, intrazellulären Lösung zu erwarten. Um den Einfluss des MIC- bzw. MagNuM-Stromes auf die Patch-clamp-Messungen möglichst gering zu halten, wurden die Patch-Clamp-Messungen immer möglichst kurz gehalten, d.h. in der Regel 90-120 Sekunden nach Übergang in die whole-cell-Konfiguration beendet. Da der endogene MIC- bzw. MagNuM-Strom im Gegensatz zum TRPM3 α 2-Strom erst nach ca. 90-100 Sekunden aktiviert und die halbmaximale Aktivierung erst nach 220 Sekunden erreicht [6], sollte innerhalb dieses gewählten Zeitfensters dessen Einfluss auf die TRPM3 α 2-Messungen noch gering sein. Außerdem wurden parallel zu den TRPM3 α 2-exprimierenden Zellen meist immer Kontrollzellen unter identischen Messbedingungen vermessen. Auch die in Gegenwart sehr hoher Konzentrationen an divalenten Kationen beobachtete Inaktivierung der TRPM3 α 2-Kanäle, insbesondere bei Applikation der Ca^{2+} -haltigen Lösungen, könnte zu Verschiebungen des Umkehrpotentials geführt haben. Die unterschiedlich hohen Konzentrationen der divalenten Kationen (2 mM, 10 mM und 60 mM) und des Agonisten Pregnenolonsulfat (10,5 μM und 35 μM) übten dagegen keinen Effekt auf das Umkehrpotential aus. Mit Ausnahme der 2 mM und 10 mM Ca^{2+} -Lösung in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat und der 2 mM und 60 mM Mn^{2+} -Lösung in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit unterschiedlichen Konzentrationen an divalenten Kationen ermittelten Umkehrpotentialen feststellbar. Die Abweichungen bei den unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen wurden vermutlich von den oben genannten Faktoren (Aktivierung Ca^{2+} -aktivierter, endogener Kanäle, Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung) verursacht. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den Umkehrpotentialen der 10 mM Ba^{2+} -Lösung unter Zusatz von 10,5 μM Pregnenolonsulfat und der 60 mM Ba^{2+} -Lösung unter Zusatz von 35 μM Pregnenolonsulfat.

Die im ersten Teil des Kapitels mit Hilfe von quartären Ammoniumverbindungen unterschiedlicher Größe durchgeführte Abschätzung des Porendurchmessers von TRPM3 α 2 lieferte einen Porendurchmesser von 7,12 Å (95% KI: 5,66-8,58) in Anwesenheit und 7,45 Å (95% KI: 5,14-9,76) in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat sowie einen Porendurchmesser von 7,05 Å (95% KI: 6,54-7,56) unter ausschließlich Pregnenolonsulfat-induzierten Bedingungen. Der Unterschied zwischen den ermittelten Porendurchmessern ist vermutlich auf die oben erwähnten und unten beschriebenen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der bi-ionischen Umkehrpotentiale von TeMA^+ und NMDG^+ zurückzuführen. Insbesondere der flache Stromverlauf im Bereich des TeMA^+ - und NMDG^+ -Umkehrpotentials und

die geringen Stromgrößen der TeMA⁺- und NMDG⁺-getragenen TRPM3α2-Ströme sowie das damit verbundene, erhöhte Rauschen erschwerten in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat eine korrekte Bestimmung der bi-ionischen Umkehrpotentiale. Auch war bei diesen beiden quartären Ammoniumverbindungen eine deutliche Abhängigkeit des bi-ionischen Umkehrpotentials von der Stromgröße beobachtbar (Abbildung 5.6).

Der sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat abgeschätzte Porendurchmesser von TRPM3α2 liegt mit 7,05-7,45 Å deutlich über den ermittelten Porendurchmessern der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle (L-Typ: 6,2 Å, T-Typ: 5,1 Å [16]) sowie des TRPV6-Kanals (5,4 Å [188]). Im Gegensatz zu TRPV6 scheint TRPV1 dagegen einen etwas größeren Porendurchmesser als TRPM3α2 aufzuweisen, da er im aktivierten Zustand im Gegensatz zu TRPM3α2 selbst für NMDG⁺ (6,8 Å) noch permeabel ist [68]. TRPV1 stellt wie TRPM3α2 einen unselektiven Kationenkanal dar, der ebenfalls eine deutlich höhere Permeabilität für divalente Kationen als für monovalente Kationen zeigt (P_{Ca}:P_{Na} = 10 [18]). Die Porendurchmesser von TRPV5 und TRPM6 liegen mit 7,5 Å und 11,5 Å ebenfalls über dem hier ermittelten Porendurchmesser von TRPM3α2 [179, 205]. Da der Porendurchmesser von TRPM6 mit 11,5 Å allerdings nahezu doppelt so groß ist wie die der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle und auf eine riesige Pore hindeutet, ist fraglich, ob nicht auch hier bei der Bestimmung der bi-ionischen Umkehrpotentiale Schwierigkeiten aufgetreten sind. Eine Abhängigkeit des bi-ionischen Umkehrpotentials von der Stromgröße, wie sie hier für TeMA⁺ und NMDG⁺ gezeigt wurde, wurden dort als mögliche Fehlerquellen nicht in Erwägung gezogen. Da für TRPM6 bislang auch noch kein spezifischer Agonist zur Verfügung steht, wurden die bi-ionischen Umkehrpotentiale dort auch nur unter nicht Agonist-stimulierten Bedingungen bestimmt. Von den übrigen Mitgliedern der TRP-Proteinfamilie liegen bisweilen noch keine Daten zum Porendurchmesser vor, sodass keine weiteren Vergleiche möglich sind.

Bei der im zweiten Teil dieses Kapitels durchgeführten Untersuchung der Permeations- und Selektivitätseigenschaften von TRPM3α2 zeigte sich sowohl bei der Auswertung der Stromgrößen der Einwärtsströme als auch bei der Auswertung der Umkehrpotentiale und der relativen Permeabilitäten gegenüber Cs⁺, dass TRPM3α2 neben Ca²⁺ und Mg²⁺ [129] noch für zahlreiche weitere divalente Kationen (Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺) permeabel ist. Anhand der Stromgröße der Einwärtsströme und der Umkehrpotentiale konnte für TRPM3α2 folgende Permeationsreihenfolge aufgestellt werden: Ca²⁺ > Mn²⁺ ≥ Zn²⁺ > Mg²⁺ > Sr²⁺ > Ni²⁺ > Ba²⁺. Die ermittelte Permeationsreihenfolge scheint hierbei unabhängig von der Konzentration des jeweiligen divalenten Kations zu sein, da sie sich zwischen den 10 mM und 120 mM Lösungen nicht unterschied. Neben divalenten Kationen zeigte TRPM3α2 auch eine Permeabilität gegenüber monovalenten Kationen (Li⁺, Na⁺, K⁺, Cs⁺). Anhand der Stromgröße

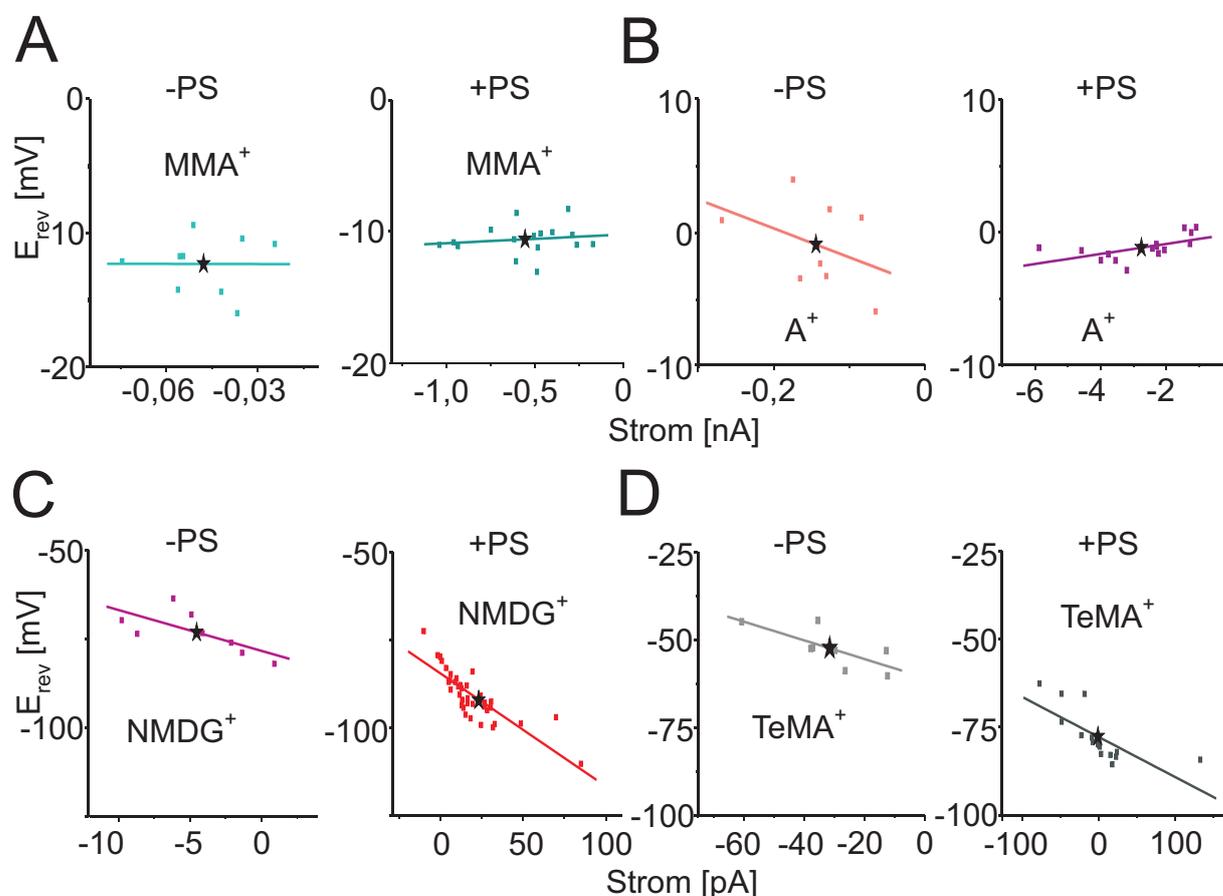


Abb. 5.6: **Abhängigkeit des bi-ionischen Umkehrpotentials von der Stromgröße bei ausgewählten quartären Ammoniumverbindungen** Abhängigkeit des Umkehrpotentials von (A) MMA^+ (B) A^+ (C) NMDG^+ und (D) TeMA^+ von der Stromgröße bei -80 mV in Ab- und in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat (PS). Gerade: linearer Fit durch die Datenpunkte; Stern: Mittelwert der Datenpunkte.

der Einwärtsströme konnte für diese folgende Permeationsreihenfolge festgehalten werden: $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+$ (Eisenman-Sequenz X). Die relativen Permeabilitäten der monovalenten Kationen gegenüber Cs^+ waren im Vergleich zu den relativen Permeabilitäten der divalenten Kationen gegenüber Cs^+ deutlich kleiner. Auch unterschieden sie sich im Gegensatz zu den relativen Permeabilitäten der divalenten Kationen nur geringfügig voneinander. Die unterschiedliche Stromgröße der Einwärtsströme von Li^+ , Na^+ , K^+ und Cs^+ ($\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+$) und die hier ermittelten nahezu gleichen relativen Permeabilitäten ($\text{Li}^+ \approx \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ \approx \text{Cs}^+$) können mit unterschiedlichen Durchflussraten durch TRPM3 α 2 infolge unterschiedlicher Bindungsaffinitäten zum Selektivitätsfilter erklärt werden. Auch die unterschiedliche Größe der Einwärtsströme von Mn^{2+} , Ca^{2+} und Zn^{2+} ($\text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} \geq \text{Zn}^{2+}$) und die hier ermittelten nahezu gleichen relativen Permea-

bilitäten ($\text{Mn}^{2+} \approx \text{Ca}^{2+} \approx \text{Zn}^{2+}$) können darauf zurückgeführt werden.

Beim direkten Vergleich der relativen Permeabilitäten in Anwesenheit und in Abwesenheit des TRPM3 α 2 Agonisten Pregnenolonsulfat konnten sowohl bei den monovalenten als auch bei den divalenten Kationen Unterschiede festgestellt werden. Die relativen Permeabilitäten in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat waren mit Ausnahme von Cs^+ , K^+ , Na^+ , 2 mM Ca^{2+} und 60 mM Mn^{2+} signifikant niedriger als die relativen Permeabilitäten in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat. Auch eine veränderte Stellung von Ni^{2+} in der Permeationsreihenfolge war in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat feststellbar. Aufgrund der nachfolgend aufgeführten Gründe ist jedoch davon auszugehen, dass sich die Permeationseigenschaften von TRPM3 α 2 in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat nicht wesentlich ändern, sondern die beobachteten Unterschiede eher auf die zu anfangs beschriebenen experimentellen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der bi-ionischen Umkehrpotentiale zurückzuführen sind. (1) zeigen die anhand der Stromgröße der Einwärtsströme und anhand der relativen Permeabilitäten ermittelten Permeationsreihenfolgen (Ausnahme: relative Permeabilität von Ni^{2+}) keine Unterschiede und (2) ist auch keine signifikante Erhöhung der relativen Permeabilitäten von Cs^+ , K^+ , Na^+ , 2 mM Ca^{2+} und 60 mM Mn^{2+} in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat feststellbar. Die in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat beobachtbaren starken Abhängigkeiten der bi-ionischen Umkehrpotentiale der divalenten Kationen und in einem geringeren Ausmaß auch der monovalenten Kationen von der Stromgröße, wie Abbildung 5.7 für verschiedene getestete mono- und divalente Kationen zeigt, sprechen ebenfalls dafür. Auch bei Ni^{2+} ist eine solche Abhängigkeit feststellbar (Abbildung 5.7C). Daneben könnten zusätzlich auch noch geringfügigste Veränderungen in der Aktivität der oben bereits erwähnten endogenen Ströme sowie die in Gegenwart sehr hoher Konzentrationen an divalenten Kationen beobachtete Inaktivierung der TRPM3 α 2-Kanäle zu Verschiebungen des Umkehrpotentials geführt haben.

Eine veränderte Permeabilität von Ionenkanälen für mono- und divalente Kationen in Anwesenheit des entsprechenden Agonisten wurde schon für CNG-Kanäle gezeigt. Veränderungen in der cGMP-Konzentration führten hier zu einer veränderten Permeabilität von divalenten, nicht jedoch von monovalenten Kationen. Mit zunehmender cGMP-Konzentration, d.h. mit zunehmender Öffnungswahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle, wurde eine zunehmende Selektivität für divalente gegenüber monovalenten Kationen beobachtet. Erklärt wird diese Beobachtung mit der Existenz von zwei Leitfähigkeitszuständen der CNG-Kanäle, die unterschiedliche Ionenselektivitäten aufweisen [62]. Die vorliegenden Ergebnisse ergaben aber keinen zweifelsfreien Hinweis für einen solchen Verhalten bei TRPM3 α 2-Kanälen.

Beim Vergleich der hier für TRPM3 α 2 ermittelten Permeations- und Selektivitätseigenschaften mit denen anderer TRP-Kanäle fallen Gemeinsamkeiten mit TRPM6 und TRPM7,

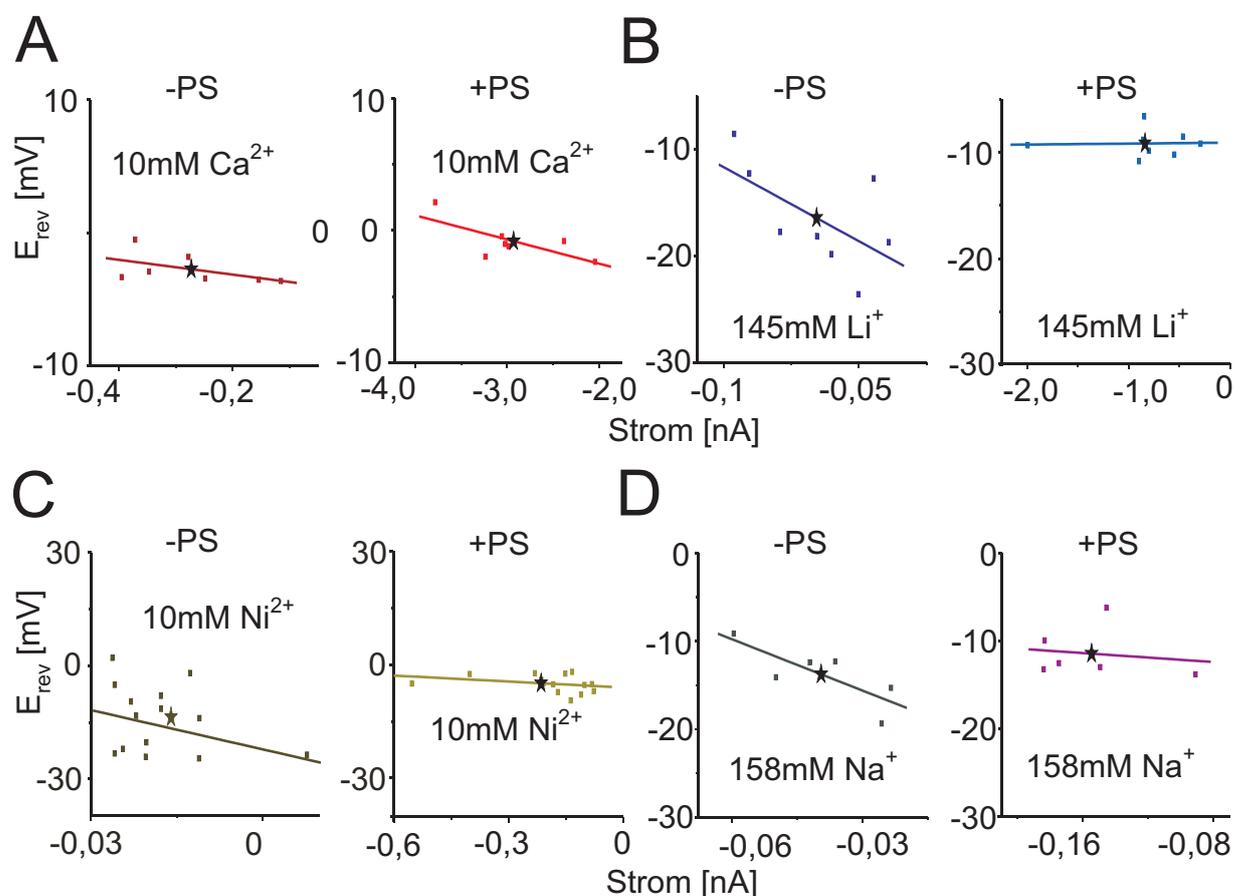


Abb. 5.7: **Anhängigkeit des bi-ionischen Umkehrpotentials von der Stromgröße bei ausgewählten Alkali-, Erdalkali- und Übergangsmetallen** Abhängigkeit des Umkehrpotentials von (A) Ca^{2+} (B) Li^{+} (C) Ni^{2+} und (D) Na^{+} von der Stromgröße bei -80 mV in Ab- und Anwesenheit von Pregnenolonsulfat (PS). Gerade: linearer Fit durch die Datenpunkte; Stern: Mittelwert der Datenpunkte.

zwei TRPM3 sehr nahe stehenden Ionenkanälen, ins Auge. Auch diese sind neben Ca^{2+} und Mg^{2+} noch für eine Vielzahl weiterer divalenter Kationen permeabel [100, 115, 190]. Die für TRPM6 anhand der relativen Permeabilitäten gegenüber Na^{+} und für TRPM7 anhand der Größe der Einwärtsströme ermittelten Permeationsreihenfolgen unterscheiden sich jedoch deutlich von der von TRPM3 α 2 (TRPM7: $Zn^{2+} \approx Ni^{2+} > Ba^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} \geq Mn^{2+} \geq Sr^{2+} \geq Cd^{2+} \geq Ca^{2+}$ [115]; TRPM6: $Ba^{2+} \geq Ni^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ [190]). Unterschiede finden sich hier insbesondere in der Permeabilität von Ca^{2+} und Ba^{2+} . Während TRPM3 α 2 eine sehr hohe Permeabilität für Ca^{2+} und nur eine sehr geringe Permeabilität für Ba^{2+} aufweist, zeigen TRPM6 und TRPM7 gegenteiliges. Einer sehr hohen Permeabilität für Ba^{2+} steht hier eine deutlich geringere Permeabilität für Ca^{2+} gegenüber. Aufgrund seiner von TRPM6 und TRPM7 abweichenden Permeabilitätsreihenfolge

kann TRPM3 α 2 eindeutig von diesen abgegrenzt werden. Dies ist insofern von Bedeutung, da die hier als Überexpressionssystem eingesetzten HEK293-Zellen einen endogenen Strom, auch MIC- bzw. MagNuM-Strom genannt, zeigen, der dieselben biophysikalischen Eigenschaften wie TRPM7 aufweist und wahrscheinlich durch diesen kodiert wird.

Im Vergleich zu TRPM3 α 2 zeigte TRPM3 α 1 nur eine äußerst geringe Permeabilität für divalente Kationen, erkennbar an der Abnahme des Einwärtsstromes und der Verschiebung des Umkehrpotentials zu negativeren Potentialen in Gegenwart divalenter Kationen.

Die erhöhte Permeabilität von TRPM3 α 2 für divalente Kationen, insbesondere Ca²⁺, Mg²⁺ und Zn²⁺, könnte auch von physiologischer Bedeutung sein. Alle drei divalenten Kationen sind für eine Vielzahl zellulärer Funktionen von essentieller Bedeutung.

Ca²⁺, einer der wichtigsten intrazellulären Botenstoffe, spielt u.a. bei folgenden zellulären Prozessen eine bedeutende Rolle: der Fertilization, der Proliferation, der Entwicklung, der Differenzierung, der Kontraktion, der Sekretion, der Apoptose und der Nekrose [11].

Aufgrund seiner Expression in der Niere wurde TRPM3 infolgedessen schon eine Rolle bei der renalen Ca²⁺-Homeostase [59] und aufgrund seiner Expression im Choroiden Plexus eine Rolle bei der zerebrospinalen Ca²⁺-Homeostase [129] zugeschrieben.

Die höchste Konzentration an Zn²⁺ findet sich im menschlichen Körper in den β -Zellen des Pankreas [207]. Zink scheint hier eine wichtige Rolle bei der Insulinspeicherung und Insulinsekretion zu spielen. So wird Insulin in den sekretorischen Vesikeln in Form eines kristallinen, hexameren Insulin-Zn²⁺-Komplexes gespeichert [40]. In kristalliner Form ist Insulin vor den Abbau durch Proteasen geschützt und damit stabiler und länger speicherfähig. Aus den sekretorischen Vesikeln kann Insulin durch Exozytose freigesetzt werden. Der maßgebliche Auslöser hierfür ist die im Blut zirkulierende Glucose, die insulinunabhängig in die β -Zellen mit Hilfe des Glucosetransporters GluT2 aufgenommen und intrazellulär hauptsächlich über den Glykolyseweg metabolisiert wird. Der daraus resultierende Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses führt zu einer Schließung ATP-abhängiger K⁺-Kanäle in der Plasmamembran, wodurch eine Depolarisation der Zelle eingeleitet wird. Die Depolarisation führt zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen und damit zu einem Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration löst schließlich die Fusion der Insulinvesikel mit der Plasmamembran und somit die Insulinsekretion aus. Neben Insulin wird hierbei auch Zn²⁺ freigesetzt. Bereits gezeigt werden konnte, dass dieses freigesetzte Zn²⁺ modulatorisch in diesen Vorgang eingreifen kann, indem es die ATP-abhängigen K⁺-Kanäle aktiviert [7]. Aufgrund seiner Expression in den β -Zellen des Pankreas und aufgrund seiner hohen Zn²⁺-Permeabilität könnte TRPM3 α 2 an der Wiederaufnahme des Zn²⁺ in die β -Zellen beteiligt sein, zumal Pregnenolonsulfat-induzierte Ströme, die dieselben biophysikalischen Eigenschaften wie

TRPM3 α 2 besaßen, bereits in unserer Arbeitsgruppe in akut präparierten β -Zellen des Pankreas nachgewiesen werden konnten [168].

6 Interaktionen zwischen Kationen in der TRPM3-Pore

6.1 Zusammenfassung

Na^+ stellt mit einer Konzentration von 130-150 mM das häufigste und bedeutendste Kation des Extrazellularraumes dar. Neben der Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit der Zellen sowie deren Volumen- und Osmoregulation spielt es auch noch eine bedeutende Rolle bei der Informationsvermittlung der Zellen untereinander. Aufgrunddessen wurde im ersten Teil dieses Kapitels seine Permeation durch TRPM3 α 2 - einen unter physiologischen Bedingungen unselektiven, Ca^{2+} -permeablen Kationenkanal der TRP-Proteinfamilie - mit Hilfe der Elektrophysiologie untersucht. Gezeigt wurde, dass Na^+ deutlich geringere Ein- und Auswärtsströme durch TRPM3 α 2 trägt als Cs^+ . Die daraus abgeleitete Hypothese, dass Na^+ durch verstärkte elektrostatische Wechselwirkungen mit der TRPM3 α 2-Pore eine verlangsamte Permeation durch diese zeigt und infolgedessen auch die Permeation weiterer mono- und divalenter Kationen durch diese behindert („permeante Blocker“-Hypothese), konnte durch Untersuchung des anomalen Molfraktionsverhaltens zwischen Na^+ und Cs^+ und der Spannungsabhängigkeit der Na^+ -Hemmung jedoch nicht bestätigt werden. Ein anomales Molfraktionsverhalten sowie eine spannungsabhängige Hemmung mit „punch-through“-Effekt bei positiven Potentialen, wie sie für einen permeanten Blocker erwartet wurden, waren nicht beobachtbar. Das in Gegenwart von Na^+ beobachtete starke Rauschen der TRPM3 α 2-Ströme deutet darauf hin, dass die geringen Na^+ -getragenen Ein- und Auswärtströme möglicherweise auch auf eine verstärkte Inaktivierung des TRPM3 α 2-Kanals in Gegenwart von Na^+ zurückzuführen sind. Der verstärkten Inaktivierung, d.h. verringerten Offenzeit, könnte eine Destabilisierung des TRPM3 α 2-Kanals nach Bindung von Na^+ zugrundeliegen. Die Bestätigung dieser Hypothese könnten zukünftige Einzelkanalmessungen erbringen. Im Gegensatz zu Na^+ konnte dagegen in Gegenwart von Ca^{2+} ein anomales Molfraktionsverhalten sowie eine spannungsabhängige Hemmung mit „punch-through“-Effekt bei positiven Potentialen nachgewiesen werden. Der ermittelte IC_{50} -Wert der Ca^{2+} -Hemmung von 1,2 mM (bei -80 mV) weist auf eine schwachaffine Ca^{2+} -Bindungsstelle in der TRPM3 α 2-Pore hin. Trotz dieser schwachaffinen Ca^{2+} -Bindungsstelle, liegt der im zweiten Teil dieses Kapitels mit Hilfe einer Kombination aus Patch-clamp- und Ca^{2+} -Imaging-Technik bestimmte fraktionelle Calciumstrom für TRPM3 α 2 unter physiologischen Bedingungen mit 24,3% im Vergleich zu den ebenfalls bestimmten fraktionellen Calciumströmen von TRPM8 und TRPV1 sehr hoch. Die nach Entfernung des extrazellulären Mg^{2+} beobachtete Zunahme des fraktionellen Calciumstromes zeigt, dass Mg^{2+} mit Ca^{2+} um die Permeation durch TRPM3 α 2 konkurriert und TRPM3 α 2 unter physiologischen Bedingungen auch Mg^{2+} permeabel ist.

6.2 Einleitung

TRPM3 α 2 - eine der fünf bisher identifizierten murinen TRPM3-Spleißvarianten - bildet einen nichtselektiven Kationenkanal, der, wie in Kapitel 4 gezeigt, sowohl durch Pregnenolonsulfat als auch Nifedipin aktiviert wird. Neben monovalenten Kationen ist er, wie in Kapitel 5 gezeigt, auch noch für eine Vielzahl von divalenten Kationen permeabel. Um den TRPM3 α 2 zugrundeliegenden Permeationsmechanismus mono- und divalenter Kationen besser verstehen zu können, wurden in diesem Kapitel die Interaktionen permeierender Kationen untereinander sowie deren mögliche Interaktion mit dem Selektivitätsfilter in der Pore elektrophysiologisch untersucht. Welche Aminosäuren in der mutmaßlichen Porenregion von TRPM3 α 2 am Aufbau des Selektivitätsfilter beteiligt sind, wurde bislang noch nicht aufgeklärt. Bereits gezeigt werden konnte allerdings, dass die Ca²⁺-Selektivität von TRPV5 und TRPV6 - zwei weiteren Mitgliedern der TRP-Familie - durch einen Ring von vier Aspartatresten in der mutmaßlichen Porenregion (Asp⁵⁴² bei TRPV5, Asp⁵⁴¹ bei TRPV6 [127, 189]) bedingt wird. Bei spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen übernehmen Glutamatreste diese Rolle [158]. Auch bei den divalent-permeablen TRPM-Kanälen sind vermutlich Glutamatreste für die Ca²⁺-Permeabilität verantwortlich. Gezeigt werden konnte dies mit Hilfe des Ca²⁺-impermeablen TRPM4-Kanals. Hier führte die Substitution von Glutamin (Gln⁹⁷⁷) durch Glutamat, der korrespondierenden Aminosäure in den divalent-permeablen TRPM-Kanälen, zu einer Pore mit moderater Ca⁺-Permeabilität [126]. In Abwesenheit von divalenten Kationen sind die Ca²⁺-permeablen TRPM-Kanäle wie auch die spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle monovalent permeabel und zeigen große monovalente Einwärtsströme. Sowohl die spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle als auch TRPV5 und TRPV6 zeigen hierbei zusätzlich noch ein Phänomen, das auch als anomales Molfraktionsverhalten (englisch „anomalous mole fraction behaviour“) bezeichnet wird. In Gegenwart geringer Konzentrationen an divalenten Kationen ist hier zunächst eine Abnahme des Einwärtsstromes beobachtbar, in Gegenwart höherer Konzentrationen jedoch wieder Zunahme. Erklärt wird dieses Phänomen folgendermaßen: Zunächst werden die monovalenten Einwärtsströme durch Ca²⁺ gehemmt, da dieses aufgrund seiner erhöhten Affinität zum Selektivitätsfilter bevorzugt an diesen bindet. Da das an den Selektivitätsfilter gebundene Ca²⁺ hierbei nur durch die elektrostatische Abstoßung eines zweiten divalenten, jedoch nicht eines monovalenten Kations wieder aus diesem verdrängt werden kann, ist zunächst eine Abnahme des Einwärtsstromes beobachtbar. Eine weitere Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration führt schließlich jedoch zur Bindung eines weiteren Ca²⁺ an die extrazelluläre Seite der Kanalpore und infolge der auftretenden elektrostatischen Abstoßung zur Verdrängung des im Selektivitätsfilter befindlichen Ca²⁺ in Richtung Zytosol. Aufgrund des verstärkt einströmenden Ca²⁺ ist nun eine Zunahme des Einwärtsstromes

zu beobachten.

Im zweiten Teil dieses Kapitels wurde der Anteil des Gesamtstromes, der unter physiologischen Bedingungen durch Ca^{2+} getragen wird, bestimmt. Dieser auch als fraktionelle Calciumstrom bezeichnete Anteil des Gesamtstromes kann nicht aus den bereits in Kapitel 5 ermittelten relativen Permeabilitäten hervorgesagt werden, da bei deren Bestimmung aufgrund der stark reduzierten Messbedingungen (bi-ionische Messbedingungen) Interaktionen zwischen permeierenden Kationen nicht erfasst werden. Die Kenntnis des fraktionellen Calciumstromes ist insofern von Bedeutung, da Ca^{2+} eines der wichtigsten intrazellulären Signalmoleküle darstellt und an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt ist. Zu diesen Prozessen zählen u.a. die Aktivierung intrazellulärer Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktionskaskaden, aber auch die Aktivierung und Inaktivierung von Ionenkanälen [11]. Für eine Vielzahl von Ionenkanälen wurde aufgrunddessen schon der fraktionelle Calciumstrom bestimmt. Die ermittelten fraktionellen Calciumströme lagen für NMDA-Rezeptoren zwischen 8,0-14,1%, für AMPA-Rezeptoren zwischen 0,5-4,0%, für Kainatrezeptoren zwischen 0,2-2,0%, für nikotinische Acetylcholin-Rezeptorkanäle zwischen 2,5-4,7%, für P2X-Rezeptorkanäle zwischen 2,7-15,0%, für CNG-Kanäle bei 65,0-67,0% und für 5HT_3 -Rezeptorkanäle bei 4,7% [15, 37, 38]. Auch für ein Mitglied der TRP-Proteinfamilie - TRPV1 - wurde bereits der fraktionelle Calciumstrom bestimmt. TRPV1 bildet wie TRPM3 α 2 einen nichtselektiven Kationenkanal aus, der eine höhere Permeabilität für divalente als für monovalente Kationen aufweist ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 10:1$ [18]). Der für TRPV1 ermittelte fraktionelle Calciumstrom lag aber nur bei 3,5-4,3% [38, 208]. Zudem konnte bereits für verschiedene Kationenkanäle gezeigt werden, dass der fraktionelle Calciumstrom von einer Vielzahl von Faktoren wie beispielsweise der Spannung [37], des extrazellulären pH-Werts [208], der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [37] sowie der An- und Abwesenheit weiterer mono- und divalenter Kationen [37] abhängig ist. Aufgrunddessen wurde auch hier noch die Abhängigkeit des fraktionellen Calciumstromes von der Spannung und der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration untersucht. Gezielte Veränderungen der ionalen Zusammensetzung der extrazellulären Lösungen ermöglichten es auch, Einblicke in den TRPM3 α 2 zugrundeliegenden Permeationsmechanismus mono- und divalenter Kationen zu gewinnen.

6.3 Materialien und Methoden

6.3.1 Materialien

Mit Ausnahme der extra- und intrazellulären Lösungen, die für die elektrophysiologischen Messungen eingesetzt wurden, sind die übrigen in diesem Kapitel verwendeten Materialien in Kapitel 3 Abschnitt 3.1 aufgeführt.

LÖSUNGEN FÜR DIE ELEKTROPHYSIOLOGIE

In allen Experimenten wurde als extrazelluläre Lösung die in Tabelle 6.1 aufgeführte Standardbadlösung (Lösung E1) verwendet.

Zur Untersuchung der Permeation monovalenter extrazellulärer Kationen durch TRPM3 α 2 wurden divalentfreie Lösungen (Lösung E11.1-E11.4), die mit Ausnahme der K⁺-Lösung (Lösung E11.4) ausschließlich eines der zu testenden, monovalenten Kationen enthielten, eingesetzt (Tabelle 6.5). Die K⁺-Lösung enthielt zusätzlich noch 2 mM CsCl zur Hemmung der endogen in HEK293-Zellen exprimierten K⁺-Kanäle. Zur Komplexierung möglicher im entionisierten Wasser vorkommender Spuren an divalenten Kationen war in diesen Lösungen zusätzlich noch EGTA und EDTA und zur Stabilisierung des pH-Wertes HEPES enthalten. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 erfolgte mit HCl bzw. den entsprechenden Hydroxiden der monovalenten Kationen und die Einstellung der Osmolalität auf 320-330 mosmol · kg⁻¹ mit D-Glucose. Als intrazelluläre Lösung wurde eine ausschließlich Cs⁺-haltige Lösung (Lösung I3-I4) verwendet (Tabelle 6.7). Zur Untersuchung der Permeation monovalenter intrazellulärer Kationen durch TRPM3 α 2 wurde Cs⁺ in der intrazellulären Lösung (Lösung I1) durch Na⁺ (Lösung I2) ersetzt (Tabelle 6.6). Als extrazelluläre Lösung wurde die in Tabelle 6.5 aufgeführte 10 mM Ca²⁺-Lösung (Lösung E4) eingesetzt. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 erfolgte hier mit NMDG⁺, da Ca(OH)₂ in Wasser praktisch unlöslich ist. Zur Einstellung der Osmolalität auf 320-330 mosmol · kg⁻¹ wurde Mannit eingesetzt, da dieses im Gegensatz zu D-Glucose den Energiestoffwechsel der Zelle in geringerem Ausmaß beeinflusst.

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Na⁺ und Ca²⁺ bzw. zwischen Cs⁺ und Ca²⁺ wurden eine divalent- und EGTA/EDTA-freie Na⁺-Lösung (Lösung E7) und eine divalent- und EGTA/EDTA-freie Cs⁺-Lösung (Lösung E8) hergestellt (Tabelle 6.4). Beiden Lösungen wurden anschließend unterschiedliche Konzentrationen an Ca²⁺ (0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3,5 mM und 5 mM) in Form von CaCl₂ zugesetzt.

Zur Untersuchung der zwischen Cs⁺ und Na⁺ auftretenden Interaktionen wurden eine divalentfreie Na⁺-Lösung (Lösung E5) und eine divalentfreie Cs⁺-Lösung (Lösung E6), die zur Komplexierung möglicher im entionisierten Wasser vorkommender Spuren an divalenten Kationen noch zusätzlich EGTA und EDTA enthielten, hergestellt (Tabelle 6.4). Anschließend wurden beide Lösungen in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt. Die finalen Na⁺- und Cs⁺-Konzentrationen der so hergestellten Lösungen wurde mit Hilfe des Mischungskreuzes berechnet.

Zur Untersuchung des Einflusses von Na⁺ auf den Cs⁺-getragenen bzw. den Ca²⁺-getragenen TRPM3 α 2-Strom wurden Cs⁺-haltige bzw. Ca²⁺-haltige Lösungen mit unterschiedlichen Na⁺-Konzentrationen eingesetzt. Die unterschiedlich Na⁺-haltigen Cs⁺-Lösungen

wurden durch Mischen der in Tabelle 6.4 aufgeführten divalentfreien Lösung E9 und E10 und die unterschiedlich Na⁺-haltigen Ca²⁺-Lösungen durch Mischen der in Tabelle 6.2 aufgeführten 5 mM Ca²⁺-Lösungen E2 und E3 erhalten. Die finalen Na⁺-Konzentration der so hergestellten Lösungen wurde auch hier mit Hilfe des Mischungskreuzes berechnet. Die pH-Werte der in den Interaktionsversuchen eingesetzten Ausgangslösungen betragen 7,2 (eingestellt mit HCl bzw. NMDG⁺) und die Osmolalitäten 320-330 mosmol · kg⁻¹ (eingestellt mit D-Glucose oder Mannit). Als intrazelluläre Lösung wurde eine der in Tabelle 6.7 aufgeführten ATP-haltigen, intrazellulären Lösungen (Lösung E3-E4) verwendet.

Extrazelluläre Lösungen

Tabelle 6.1: **Standard-Badlösung**

Nr	Na ⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	K ⁺ [mM]	Ca ²⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
E1	142-149	10	3	2	2	160-167	10	3-15

pH-Wert: 7,2-7,3

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321-333

Tabelle 6.2: **5 mM Ca²⁺-Lösungen**

Nr	Ca ²⁺ [mM]	Na ⁺ [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
E2	5	148,6	-	155	10	30
E3	5	3,5	-	10	10	285

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 328-330

Tabelle 6.3: **10 mM Ca²⁺-Lösungen**

Nr	Ca ²⁺ [mM]	Na ⁺ [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
E4	10	-	3-4	20	10	265-267

pH-Wert: 7,2-7,3

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 322-327

Tabelle 6.4: **Divalentfreie Lösungen E5-E10**

Nr	Na ⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EGTA [mM]	EDTA [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]	Mannit [mM]
E5	145	-	130	2	2	10	53	-
E6	-	145	128-130	2	2	10	60-63	-
E7	145	-	140	-	-	10	55	-
E8	-	145	141	-	-	10	55	-
E9	70	100	156	2	2	10	-	15
E10	-	100	86	2	2	10	-	140

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 320-330

Tabelle 6.5: **Divalentfreie Lösungen E11**

Nr	Ion	X [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EGTA [mM]	EDTA [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
E11.1	Cs ⁺	145	-	128-130	2	2	10	60-63
E11.2	Na ⁺	145-158	-	130-145	2	2	10	30-53
E11.3	Li ⁺	145	-	131	2	2	10	45
E11.4	K ⁺	160	-	145	2	2	10	30

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 320-330

Intrazelluläre Lösungen

Tabelle 6.6: **Intrazelluläre Lösungen ohne ATP**

Nr	Cs ⁺ [mM]	Na ⁺ [mM]	Asp ⁻ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EGTA [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
I1	165-173	-	100	45-46	10	10	0-3
I2	-	168	100	45	10	10	-

pH-Wert: 7,2-7,3

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 304-309

Tabelle 6.7: **Intrazelluläre Lösung mit ATP**

Nr	Cs ⁺ [mM]	Asp ⁻ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EDTA [mM]	BAPTA [mM]	ATP [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
I3	187-189	80	45	5	10	4	10	-
I4	189-192	80	45	5	10	4	10	-

pH-Wert: 7,2-7,3

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 303-309

Stocklösungen

Pregnenolonsulfat wurde in Wasser (Stocklösung: 3,5 mM) bzw. in DMSO (Stocklösung: 21 mM) gelöst. Die Ionenkonzentrationen in den 7 μ M, 10,5 μ M, 21 μ M und 35 μ M Pregnenolonsulfat-haltigen Lösungen waren unter Verwendung der wässrigen Stocklösung aufgrunddessen um 0,2%, 0,3%, 0,6% und 1% niedriger als angegeben.

Die finale DMSO-Konzentration betrug in den 21 μ M Pregnenolonsulfat-haltigen Lösungen 0,1%.

LÖSUNGEN FÜR DIE BESTIMMUNG DES FRAKTIONELLEN CALCIUM-STROMES

Zur Bestimmung der fraktionellen Calciumströme von TRPM3 α 2, TRPM8 und TRPV1 wurde als intrazelluläre Lösung eine divalentfreie, Cs⁺-haltige Lösung (Lösung I5) unter Zusatz von 1 mM K₅FURA2 (Invitrogen, San Diego, USA) und als extrazelluläre Lösung die Standardbadlösung (Lösung E1) eingesetzt. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 erfolgte bei der Standardbadlösung mit NaOH und die Einstellung der Osmolalität auf 320-340 mosmol · kg⁻¹ mit D-Glucose. Ihr wurden zur Aktivierung von TRPM3 α 2 zusätzlich noch 35 μ M Pregnenolonsulfat, zur Aktivierung von TRPM8 zusätzlich noch 500 μ M Menthol und zur Aktivierung von TRPV1 zusätzlich noch 1 μ M N-Vanilloylnonamid zugesetzt. Die Aktivierung von TRPV1 erfolgte außerdem noch mit einer Standardbadlösung pH 5,5 (Lösung E12), die zur Stabilisierung des pH-Wertes anstelle von HEPES (optimaler pH-Bereich zwischen pH 6,8-8,2) MES (optimaler pH-Bereich zwischen pH 5,5-6,7) enthielt.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des fraktionellen Calciumstromes von der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurde die Ca²⁺-Konzentration in der Standardbadlösung von 2 mM auf 0,5 mM (Lösung E13) erniedrigt bzw. auf 5 mM (Lösung E14) und 10 mM (Lösung E15) erhöht. Durch gleichzeitige Erhöhung bzw. Erniedrigung der D-

Glucose-Konzentration betrug die Osmolarität auch in diesen Lösungen zwischen 320-340 mosmol · kg⁻¹. Zur Untersuchung des Einflusses von extrazellulärem Na⁺ bzw. von extrazellulärem Mg²⁺ auf den fraktionellen Calciumstrom wurde in der Standardbadlösung Na⁺ durch Cs⁺ (Lösung E17) bzw. Mg²⁺ durch D-Glucose (Lösung E16) ersetzt.

Tabelle 6.8: Extrazelluläre Lösungen

Nr	Na ⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	K ⁺ [mM]	Ca ²⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	MES [mM]	D-Glucose [mM]
E12	147	10	3	2	2	166	-	10	9-12
E13	149	10	3	0.5	2	163	10	-	15
E14	149	10	3	5	2	172	10	-	-
E15	149	10	3	10	2	182	10	-	-
E16	149	10	3	2	-	162	10	-	16
E17	-	159	3	2	2	166	10	-	10

pH-Wert: 7,2-7,3 (Ausnahme: Lösung E12: pH = 5,5)

Osmolarität [mosmol · kg⁻¹]: 321-340

Tabelle 6.9: Intrazelluläre Lösungen

Nr	Cs ⁺ [mM]	Na ⁺ [mM]	Asp ⁻ [mM]	Cl ⁻ [mM]	ATP [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
I5	156	4	100	45	8	10	15-18

pH-Wert: 7,2

Osmolarität [mosmol · kg⁻¹]: 306-307

Stocklösungen

Pregnenolonsulfat wurde in Wasser gelöst (Stocklösung: 3,5 mM). Die Ionenkonzentrationen der 35 μM Pregnenolonsulfat-haltigen Lösungen waren aufgrunddessen um 1% niedriger als angegeben.

N-Vanilloylnonamid und Menthol wurden in absolutem Ethanol gelöst. Die finale Ethanolkonzentration betrug bei der 1 μM N-Vanilloylnonamid-haltigen Standardbadlösung 0,002% (Stocklösung: 50 mM) und bei der 500 μM Menthol-haltigen Standardbadlösung 0,1% (Stocklösung: 500 mM).

6.3.2 Methoden

Die nachfolgend gezeigten tight-seal, whole-cell Patch-clamp-Messungen wurden, wie in Kapitel 3 Abschnitt 3.2 beschrieben, durchgeführt.

EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

Permeation monovalenter Kationen durch TRPM3 α 2

Zur Bestimmung der Permeation monovalenter, extrazellulärer Kationen durch TRPM3 α 2 kamen divalentfreie Lösungen (Lösung E11.1-E11.4), die ausschließlich eines der zu testenden monovalenten Kationen enthielten, mit und ohne Zusatz von 35 μ M Pregnenolonsulfat zum Einsatz. Als intrazelluläre Lösung wurde eine divalentfreie, Cs⁺-haltige Lösung (Lösung I3-I4) verwendet. Zur Bestimmung der Permeation monovalenter, intrazellulärer Kationen durch TRPM3 α 2 wurde eine intrazelluläre, divalentfreie Cs⁺-haltige (Lösung I1) und eine intrazelluläre, divalentfreie Na⁺-haltige Lösung (Lösung I2) eingesetzt. Als extrazelluläre Lösungen wurde eine 10 mM Ca²⁺-Lösung (Lösung E3) mit und ohne Zusatz von 10,5 μ M Pregnenolonsulfat und die Standardbadlösung (Lösung E1) mit Zusatz von 10,5 μ M Pregnenolonsulfat verwendet. Die Applikation der extrazellulären Lösungen erfolgte in den jeweiligen Experimenten für jeweils 10-20 Sekunden.

Interaktion permeierender Ionen

Zur Untersuchung der zwischen Ca²⁺ und Cs⁺ bzw. Ca²⁺ und Na⁺ auftretenden Interaktionen wurde eine Cs⁺-haltige Lösung (Lösung E7) bzw. eine Na⁺-haltige Lösung (Lösung E8) unter Zusatz von unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen und zur Untersuchung der zwischen Cs⁺ und Na⁺ auftretenden Interaktion eine Cs⁺- und eine Na⁺-haltige Lösung (Lösung E6, Lösung E5) sowie die daraus hergestellten Lösungen verwendet. Zusätzlich wurden diesen Lösungen noch 21 μ M Pregnenolonsulfat zugesetzt. Die Applikation der Lösungen erfolgte nach maximaler Aktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes für jeweils 10 Sekunden. Die Stromgröße des TRPM3 α 2-Stromes, die nach Applikation der Lösung E7, E8 bzw. E6 erzielt wurde, diente bei der nachfolgenden Auswertung des Experiments als Bezugswert. Durch die auf die Lösung E7, E8 bzw. E6 bezogenen Werte wurde anschließend mit GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA) eine Hillfunktion gefittet, wobei zur Untersuchung der Interaktion zwischen Ca²⁺ und Na⁺ das Minimum konstant bei 0% und das Maximum konstant bei 100%, zwischen Ca²⁺ und Cs⁺ nur das Minimum konstant bei 100% und zwischen Na⁺ und Cs⁺ nur das Maximum konstant bei 100% gehalten wurde.

Zur Untersuchung des Einflusses von extrazellulärem Na⁺ auf den Cs⁺-getragenen Einwärtsstrom von TRPM3 α 2 wurden die divalentfreien Lösungen E9-E10 und die daraus hergestellten Lösungen eingesetzt. Zusätzlich wurde diesen Lösungen noch 21 μ M Pregnenolonsulfat zugesetzt. Die Applikation der Lösungen erfolgte nach maximaler Aktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes für jeweils 10 Sekunden. Die Stromgröße des TRPM3 α 2-Stromes, die nach Applikation der Lösung E10 erzielt wur-

de, diene bei der nachfolgenden Auswertung des Experiments als Bezugswert. Durch die auf die Lösung E10 bezogenen Werte wurde anschließend auch mit GraphPad Prism eine Hillfunktion gefittet, wobei das Minimum konstant bei 0% und das Maximum konstant bei 100% gehalten wurde.

Zur Untersuchung des Einflusses von extrazellulärem Na^+ auf den Ca^{2+} -getragenen Einwärtsstrom von TRPM3 α 2 wurden die 5 mM Ca^{2+} -Lösungen E2-E3 und die daraus hergestellten Lösungen verwendet. Zusätzlich wurde den Lösungen noch 7 μM Pregnenolonsulfat zugesetzt. Anstelle einer 7 μM Pregnenolonsulfat-enthaltenden Standardbadlösung wurde in diesem Experiment eine 7 μM Pregnenolonsulfat-enthaltende, divalentfreie Na^+ -Lösung (Lösung E5) verwendet, um eine Inaktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes weitestgehend zu verhindern. Auch die Reduktion der zugesetzten Pregnenolonsulfat-Konzentration von 21 μM auf 7 μM erfolgte aus diesem Grund. Die unterschiedlichen 5 mM Ca^{2+} -Lösungen wurden nach maximaler Aktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes für jeweils 7-10 Sekunden appliziert. Die Stromgröße des TRPM3 α 2-Stromes, die nach Applikation der Lösung E2 erzielt wurde, diene bei der nachfolgenden Auswertung des Experiments als Bezugswert. Durch die auf die Lösung E2 bezogenen Werte wurde anschließend auch mit GraphPad Prism eine Hillfunktion gefittet, wobei das Minimum konstant bei 0% gehalten wurde. Zur besseren Übersicht wurden die auf die Lösung E2 bezogenen Werte noch auf das aus dem Fit erhaltene Maximum normalisiert. Als intrazelluläre Lösung wurde in allen Experimenten eine divalentfreie Cs^+ -haltige Lösung (Lösung I4) eingesetzt.

Fraktioneller Calciumstrom

Definition

Unter dem fraktionellen Calciumstrom wird der Anteil des Gesamtstromes verstanden, der durch Ca^{2+} getragen wird:

$$P_f = \frac{I_{\text{Ca}}}{I_{\text{Gesamt}}} \quad (6.1)$$

Theorie

Zur Bestimmung des fraktionellen Calciumstroms wird eine von Zhou und Neher im Jahre 1993 eingeführte Kombination aus whole-cell Patch-clamp-Technik und Ca^{2+} -Imaging-Technik eingesetzt [211]. Hierbei wird simultan der Gesamtstrom durch den Ionenkanal von Interesse und die Änderung der Fluoreszenzintensität eines fluoreszenten Ca^{2+} -Indikators bestimmt. Die Änderung der Fluoreszenzintensität ist hierbei direkt proportional zur Menge des einströmenden Ca^{2+} , d.h. direkt proportional zum Integral des Stromes:

$$\Delta F \sim \int I_{Ca} dt \quad (6.2)$$

Diese direkte Proportionalität ist nur gegeben, wenn eine ausreichend hohe Konzentration an fluoreszenten Ca^{2+} -Indikator eingesetzt wird. Bewährt hat sich hierbei eine Konzentration von 1 mM [37, 163, 164, 187, 208, 211].

Durch Einführung des Proportionalitätsfaktors k wird folgende Gleichung erhalten:

$$\Delta F = k \int I_{Ca} dt \quad (6.3)$$

Für einen selektiven Ca^{2+} -Kanal, der unter physiologischen Bedingungen ausschließlich für Ca^{2+} permeabel ist und bei dem folglich der gesamte Strom nur durch Ca^{2+} getragen werden, gilt:

$$\Delta F_{Ca} = k_{Ca} \int I_{Ca} dt \quad (6.4)$$

Für einen nichtselektiven Ca^{2+} -Kanal, der unter physiologischen Bedingungen neben Ca^{2+} auch noch für weitere mono- und divalente Kationen permeabel ist und bei dem folglich der Gesamtstrom nicht nur durch Ca^{2+} , sondern auch noch durch weitere anwesende monovalente und divalente Kationen getragen wird, gilt:

$$\Delta F_{mix} = k_{mix} \int I_{mix} dt \quad (6.5)$$

Aus diesen beiden Gleichungen lässt sich der fraktionelle Calciumstrom nun folgendermaßen bestimmen:

$$P_f = \frac{k_{mix}}{k_{Ca}} = \frac{\Delta F_{mix} \int I_{Ca} dt}{\Delta F_{Ca} \int I_{mix} dt} \quad (6.6)$$

Kalibrierung - Bestimmung von k_{Ca}

Folgende drei Methoden stehen zur Bestimmung von k_{Ca} zur Verfügung:

1. Verwendung von ionischen Bedingungen, die es nur Ca^{2+} erlauben in die Zelle hineinzuströmen und keinem anderen Ion aus der Zelle hinaus [164, 187]; eingesetzt wird hierbei in der Regel eine intrazelluläre, NMDG⁺-haltige und eine extrazelluläre, Ca^{2+} -haltige Lösung.
2. Verwendung eines Haltepotentials, bei dem die monovalenten Ein- und Auswärts-

ströme ausgeglichen und folglich nicht messbar sind [164];

3. Verwendung eines Ionenkanals, der nur für Ca^{2+} permeabel ist [37, 123];

In Frage kommen hierbei heterolog und endogen exprimierte, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle.

Voraussetzungen

Für eine korrekte Bestimmung des fraktionellen Calciumstromes müssen folgende zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

1. rasche Aktivierung des Ionenkanals durch einen Spannungspuls oder durch einen Agonisten

2. hohe intrazelluläre Konzentration des fluoreszenten Ca^{2+} -Indikator

Eine hohe intrazelluläre Konzentration des fluoreszenten Ca^{2+} -Indikator ist erforderlich, da das gesamte in die Zelle einströmende Ca^{2+} an diesen gebunden werden muss. Bei einer zu niedrig gewählten Konzentration würde der fraktionelle Calciumstrom aufgrund der verstärkten Bindung des einströmenden Ca^{2+} an endogene Ca^{2+} -Puffer, dessen verstärkte Aufnahme in die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, dessen verstärkte Ausschleusung aus der Zelle und dessen verstärkten Diffusion in die Patch-Pipette unterschätzt werden.

Durchführung

Der zur Bestimmung des fraktionellen Calciumstromes verwendete Patch-clamp-Messstand war zusätzlich noch mit einem Monochromator (Polychrome IV, T.I.L.L. Photonics, Gräfelfing, Deutschland), der das zur Anregung von FURA2 benötigte monochromatische Licht der Wellenlänge 380 nm erzeugte; mit einer Photodiode, die das von der angeregten, mit FURA2 beladenen Zelle emittierte Licht der Wellenlänge 510 nm detektierte; sowie mit einem Viewfinder (Viewfinder III, T.I.L.L. Photonics), einer Kamera (T.I.L.L. Photonics) und einem Monitor (Monacor, Bremen, Deutschland), die die Auswahl und Sichtbarmachung des Messbereiches ermöglichten, ausgestattet. Im Strahlengang des Mikroskopes waren folgende Filter angebracht: HC-Beamsplitter 409 (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland), SP 410 (T.I.L.L. Photonics): Anregungsfilter, HC-Bandpass 523/35 (AHF Analysentechnik): Emissionsfilter, UV-NIR Neutralfilter 1.0 (AHF Analysentechnik) zur Verringerung der FURA2-Bleichung.

Durchführung der Messungen:

1. Auswahl der Zelle

Für die fraktionellen Calciumstrom-Messungen wurden ausschließlich einzeln liegende, nicht mit anderen Zellen in Kontakt stehende Zellen ausgewählt. Vor die

ausgewählte Zelle wurde in einem Abstand von weniger als 200 μm die Öffnung des handgefertigten, gravitationsgetriebenen Perfusionssystems, das den schnellen Austausch der extrazellulären Lösung ermöglichte, plaziert. Anschließend wurde durch Anpassung der Blende der von der Photodiode zu messende Bereich so eingegrenzt, dass er nur die ausgewählte Zelle samt Zellfortsätzen umfasste.

2. Etablierung der cell-attached-Konfiguration

3. Etablierung der whole-cell-Konfiguration

4. Start der Fluoreszenzintensitäts- und Strommessung

FURA2 hat gegenüber anderen fluoreszenten Ca^{2+} -Indikatoren den Vorteil, dass es auch in Ca^{2+} ungebundener Form fluoresziert. Dieser Vorteil wurde hier genutzt, um die Beladung der Zelle mit FURA2 nach Übergang in die whole-cell-Konfiguration mitzuverfolgen. Zwischen 2-6 Minuten wurden zur vollständigen Beladung der Zellen benötigt. Während der Beladung wurde neben der Fluoreszenzintensität gleichzeitig noch zur Überprüfung der Vitalität der Zellen und zur Kontrolle des Seals der whole-cell-Strom gemessen. Hierzu wurden Spannungsrampen im Bereich von -115 mV bis $+85$ mV (schon „Liquid junction potential“ korrigiert) über einen Zeitraum von 200 ms appliziert.

5. Durchführung der Experimente

Nach vollständiger Beladung der Zelle wurde das eigentliche Experiment durchgeführt. Hierbei wurde der entsprechende Agonist für 1000 ms appliziert. Während der Applikation des Agonisten wurde die Zelle soweit nicht anders angegeben bei einem konstanten Haltepotential von -75 mV (schon „Liquid junction potential“ korrigiert) gehalten.

6. Auswertung der Experimente

Die Auswertung der Experimente erfolgte in IgorPro (WaveMetrics, Lake Oswego, USA). In Abbildung 6.1 werden die einzelnen Auswertungsschritte gezeigt:

A Basislinienkorrektur der Stromkurve

B Integration und Inversion der Stromkurve

C Basislinienkorrektur und Inversion der Fluoreszenzkurve

D Auftragung der invertierten Fluoreszenzkurve gegen die integrierte und invertierte Stromkurve sowie Überlagerung der invertierten Fluoreszenzkurve und der mit k_{Ca} bzw. k_{mix} multiplizierten, integrierten und invertierten Stromkurve als Kontrolle

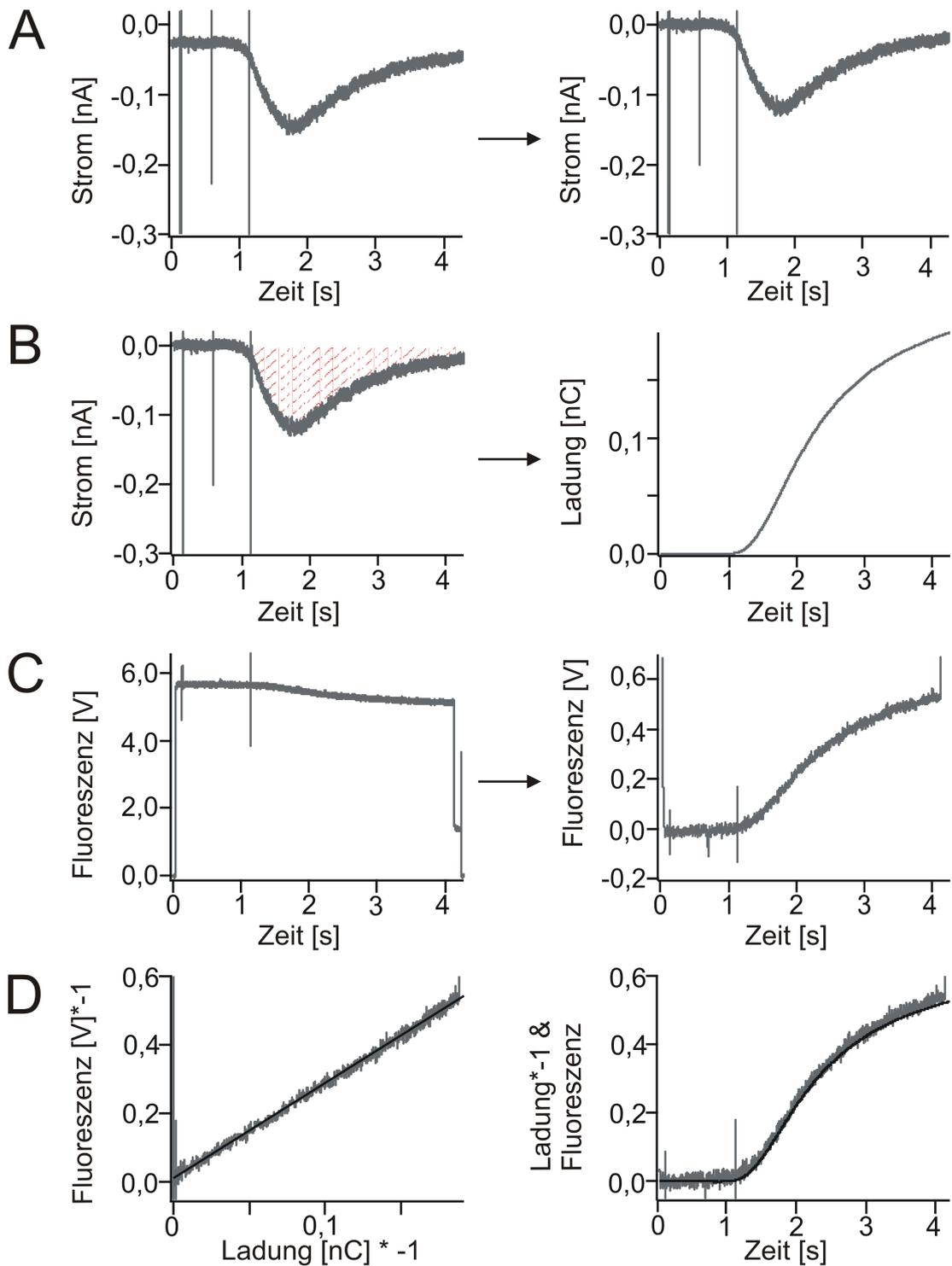


Abb. 6.1: **Auswertung der fraktionellen Calciumstrom-Experimente** (A) Baselinekorrektur der Stromkurve. (B) Integration und Inversion der Stromkurve. (C) Baselinekorrektur und Inversion der Fluoreszenzkurve. (D) Auftragung der invertierten Fluoreszenzkurve gegen die integrierte und invertierte Stromkurve sowie Überlagerung der invertierten Fluoreszenzkurve und der mit k_{Ca} bzw. k_{mix} multiplizierten, integrierten und invertierten Stromkurve als Kontrolle.

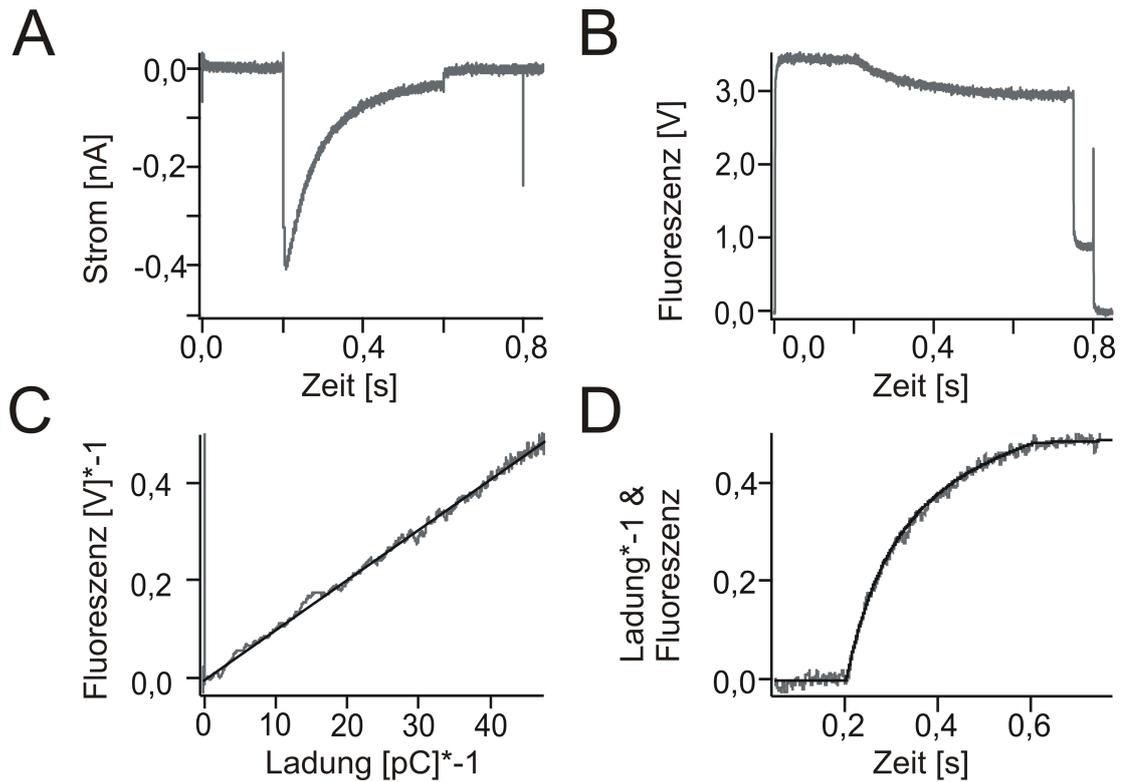


Abb. 6.2: Bestimmung von k_{Ca} mit Hilfe der heterolog in HEK293-Zellen überexprimierten $\alpha 1c$ - und $\beta 2.3$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals (A) Aktivierung des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals durch Erhöhung des Haltepotentials von -80 auf -5 mV für 400 ms. (B) Abnahme der FURA2 Fluoreszenzintensität während der Erhöhung des Haltepotentials. (C) Lineare Korrelation, die nach Auftragung der invertierten Fluoreszenzkurve gegen die integrierte und invertierte Stromkurve erhalten und durch die eine Gerade mit der Steigung k_{Ca} gefittet wurde. (D) Überlagerung der invertierten Fluoreszenzkurve und der mit k_{Ca} multiplizierten, integrierten und invertierten Stromkurve als Kontrolle.

Die zusammen mit EGFP heterolog in HEK293-Zellen überexprimierte $\alpha 1c$ - und $\beta 2.3$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals sowie endogen in INS1-Zellen exprimierte, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle wurden zur Bestimmung von k_{Ca} eingesetzt. Zur Überexpression der $\alpha 1c$ - und $\beta 2.3$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals wurden jeweils $1,1 \mu g$ der entsprechenden cDNAs zusammen mit $0,8 \mu g$ EGFP in HEK293-Zellen kotransfiziert. Die kotransfizierten HEK293-Zellen wurden 48-72 Stunden nach Transfektion für die fraktionellen Calciumstrom-Messungen genutzt. Die dreiminütige Beladung der Zellen mit FURA2 erfolgte sowohl bei den kotransfizierten HEK293-Zellen als auch bei den INS1-Zellen bei einem Haltepotential von -80 mV (schon „Liquid junction potential“ korrigiert). Nach Beladung wurde zur Aktivierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle das Haltepotential für 400 ms auf -5 mV (schon „Liquid junction potential“ korrigiert) erhöht.

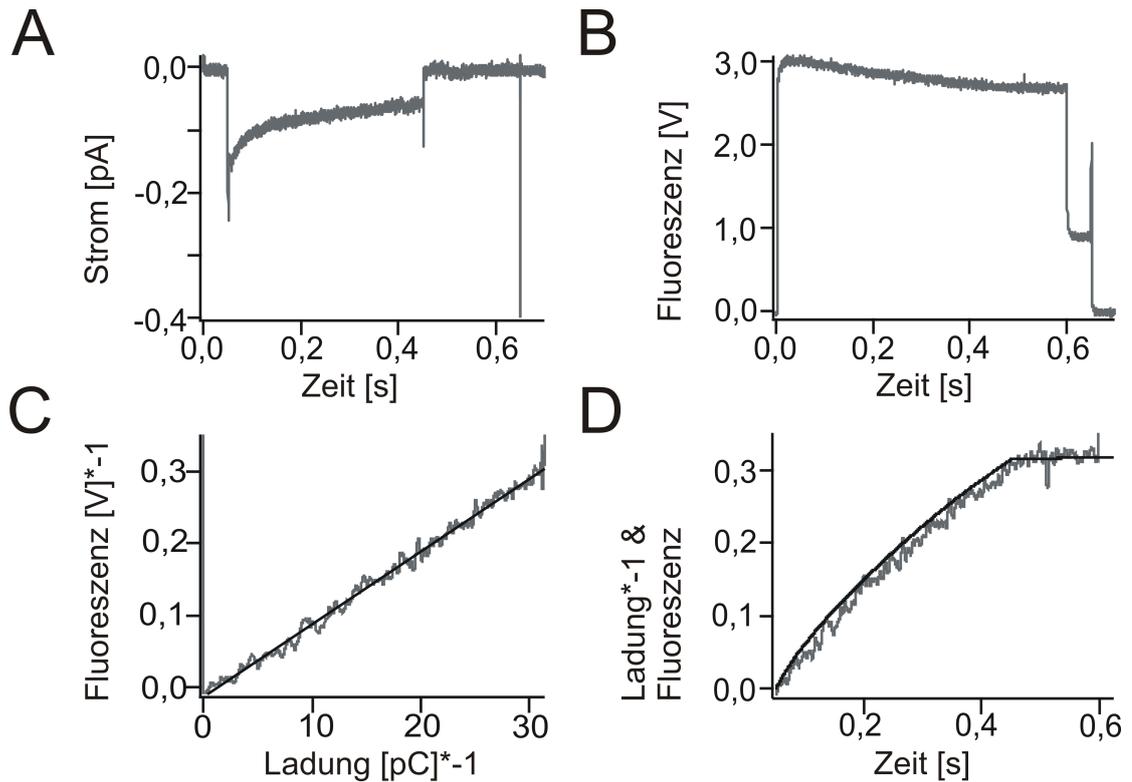


Abb. 6.3: **Bestimmung von k_{Ca} mit Hilfe des endogen in INS1-Zellen exprimierten, spannungsbhängigen Ca^{2+} -Kanals** (A) Aktivierung des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals durch Erhöhung des Haltepotentials von -80 auf -5 mV für 400 ms. (B) Abnahme der FURA2 Fluoreszenzintensität während der Erhöhung des Haltepotentials. (C) Lineare Korrelation, die nach Auftragung der invertierten Fluoreszenzkurve gegen die integrierte und invertierte Stromkurve erhalten und durch die eine Gerade mit der Steigung k_{Ca} gefittet wurde. (D) Überlagerung der invertierten Fluoreszenzkurve und der mit k_{Ca} multiplizierten, integrierten und invertierten Stromkurve als Kontrolle.

tion potential“ korrigiert) erhöht. Die Erhöhung des Haltepotentials führte sowohl in den transfizierten HEK293-Zellen als auch den INS1-Zellen zu einem messbaren Ca^{2+} -Einwärtsstrom. Gleichzeitig mit der Entwicklung des Einwärtsstromes war auch eine Abnahme in der FURA2 Fluoreszenzintensität beobachtbar. Nach Auftragung der Fluoreszenzintensitätsänderung gegen das Integral des Ca^{2+} -Stromes wurde aufgrund der direkten Proportionalität beider Parameter eine lineare Korrelation erhalten. Die lineare Korrelation lieferte einen k_{Ca} -Wert von $9,44 \pm 0,28$ V/nC ($n = 36$) für die heterolog in HEK293-Zellen überexprimierte $\alpha 1c$ - und $\beta 2.3$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals und einen k_{Ca} -Wert von $9,97 \pm 0,74$ V/nC ($n = 16$) für die endogen in INS1-Zellen exprimierten spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle. Beim Vergleich beider k_{Ca} -Werte war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Zur Berechnung des fraktionellen Calciumstromes wurde der k_{Ca} -Wert von $9,44 \pm 0,28$ V/nC, der für die heterolog

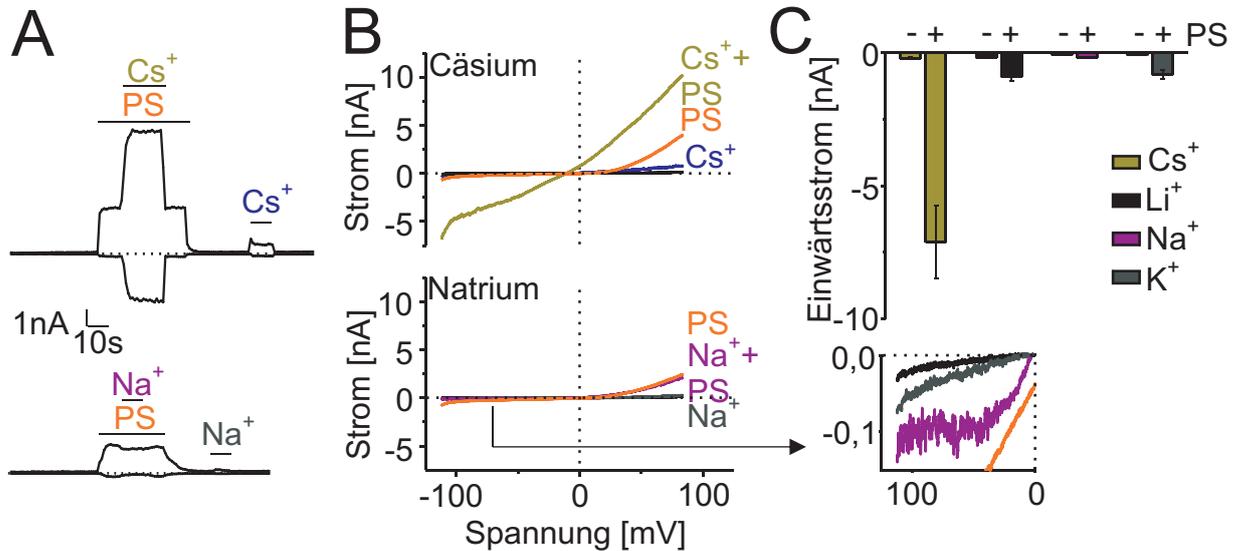


Abb. 6.4: **Permeation monovalenter, extrazellulärer Kationen durch TRPM3 α 2** (A) Ströme von TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer ausschließlich Cs⁺-haltigen bzw. ausschließlich Na⁺-haltigen, extrazellulären Lösung mit und ohne Zusatz von $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS). (B) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation der Cs⁺-haltigen bzw. Na⁺-haltigen, extrazellulären Lösung mit und ohne Zusatz von PS. (C) Statistische Auswertung der Stromantworten bei -80 mV während der Applikation der ausschließlich Cs⁺-, Na⁺-, K⁺- und Li⁺-haltigen, extrazellulären Lösungen mit und ohne Zusatz von PS ($n = 8$).

in HEK293-Zellen überexprimierte α 1c- und β 2.3-Untereinheit des spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanals bestimmt wurde, herangezogen.

6.4 Ergebnisse

Permeation monovalenter Kationen durch TRPM3 α 2

TRPM3 α 2 stellt einen nichtselektiven Kationenkanal dar, der neben divalenten Kationen auch noch für monovalente Kationen permeabel ist. Die in Kapitel 5 für TRPM3 α 2 ermittelten relativen Permeabilitäten der monovalenten Kationen lagen sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat deutlich niedriger als die der divalenten Kationen. Auch waren zwischen den relativen Permeabilitäten der monovalenten Kationen im Gegensatz zu denen der divalenten Kationen nur geringfügige Unterschiede feststellbar. Im folgenden wurden diese monovalenten Ströme durch TRPM3 α 2 genauer untersucht. Die eingesetzten extrazellulären Lösungen enthielten hierbei ausschließlich eines der nachfolgend aufgeführten, monovalenten Kationen: Cs⁺, Na⁺, K⁺, Li⁺. Sowohl die

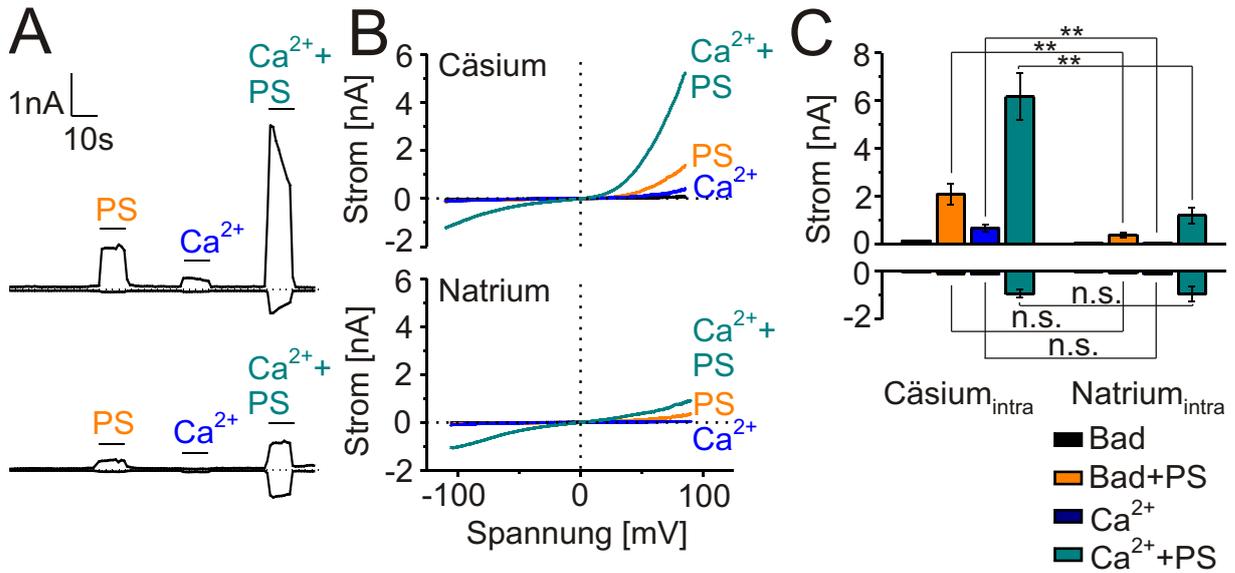


Abb. 6.5: **Permeation monovalenter, intrazellulärer Kationen durch TRPM3 α 2** (A) Ströme von TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zellen bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer ausschließlich Cs⁺-haltigen oder ausschließlich Na⁺-haltigen, intrazellulären Lösung. Als extrazelluläre Lösungen wurden eine $10,5 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat-enthaltende Standardbadlösung, eine 10 mM Ca²⁺-Lösung und eine $10,5 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat-enthaltende 10 mM Ca²⁺-Lösung eingesetzt. (B) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation der Pregnenolonsulfat-haltigen Standardbadlösung, der 10 mM Ca²⁺-Lösung und der Pregnenolonsulfat-haltigen 10 mM Ca²⁺-Lösung in Anwesenheit von intrazellulärem Cs⁺ oder Na⁺. (C) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) bei -80 und $+80$ mV ($n = 8$). Ermittlung der Signifikanzen mit Hilfe eines ungepaarten T-Tests nach Student.

Applikation der ausschließlich Cs⁺-haltigen, extrazellulären Lösung als auch die Applikation der ausschließlich Na⁺-haltigen, extrazellulären Lösung führten in Gegenwart von $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat zu einem messbaren TRPM3 α 2-Einwärtsstrom (Abbildung 6.4A und B). Der Cs⁺-getragene Einwärtsstrom war hierbei allerdings deutlich größer als der Na⁺-getragene Einwärtsstrom ($7,11 \pm 1,36 \text{ nA}$ gegenüber $0,16 \pm 0,02 \text{ nA}$). Auch in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat waren Cs⁺- und Na⁺-getragene Einwärtsströme messbar. Diese waren allerdings deutlich kleiner als die in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat. Auch hier war ein signifikanter Unterschied in der Stromgröße zwischen dem Na⁺- und Cs⁺-getragenen Einwärtsstrom feststellbar ($0,04 \pm 0,006 \text{ nA}$ gegenüber $0,29 \pm 0,04 \text{ nA}$) (Abbildung 6.4A und B). Die Stromgrößen der Einwärtsströme, die bei Applikation der ausschließlich K⁺- und Li⁺-haltigen, extrazellulären Lösungen in Ab- und Anwesenheit Pregnenolonsulfat erreicht wurden, lagen zwischen denen der Cs⁺- und Na⁺-getragenen Einwärtsströme (Abbildung 6.4C).

Aufgrund der hier festgestellten Unterschiede in der Stromgröße der Na⁺- und Cs⁺-

getragenen Einwärtsströme stellte sich die Frage, ob auch die Na^+ -getragenen Auswärtsströme deutlich geringere Stromgrößen zeigen als die Cs^+ -getragenen Auswärtsströme. Zur Klärung dieser Frage wurde die bisher verwendete Cs^+ -haltige, intrazelluläre Lösung durch eine Na^+ -haltige, intrazelluläre Lösung ersetzt. Auch unter Verwendung der Na^+ -haltigen, intrazellulären Lösung waren deutlich geringere TRPM3 α 2-Auswärtsströme messbar als bei der bisher verwendeten Cs^+ -haltigen, intrazellulären Lösung. Während bei extrazellulärer Applikation der 10 mM Ca^{2+} -Lösung kein signifikanter Na^+ -getragener Auswärtsstrom beobachtbar war, sehr wohl aber ein Cs^+ -getragener Auswärtsstrom, waren bei Applikation der 10,5 μM Pregnenolonsulfat-enthaltenden Standardbadlösung und bei Applikation der 10,5 μM Pregnenolonsulfat-enthaltenden 10 mM Ca^{2+} dagegen Na^+ -getragene Auswärtsströme messbar (Abbildung 6.5A-C).

Die Na^+ -getragenen TRPM3 α 2-Ströme waren somit sowohl in Ein- als auch in Auswärtsrichtung deutlich kleiner als die entsprechenden Cs^+ -getragenen TRPM3 α 2-Ströme. Folglich ist die geringe Stromgröße der Na^+ -getragenen TRPM3 α 2-Ströme nicht bzw. nicht ausschließlich auf einen allosterischen Angriff des Na^+ an der extrazellulären Seite des Kanals zurückzuführen. Eine in der Pore von TRPM3 α 2 gelegene Na^+ -Bindungsstelle, mit der Na^+ starke elektrostatische Wechselwirkungen eingeht und infolgedessen die Permeation anderer Kationen weitestgehend unterbindet, ist dagegen wahrscheinlicher.

Interaktion permeierender Ionen

Im folgenden wurden die Interaktionen, die zwischen den drei TRPM3 α 2 permeierenden Kationen Na^+ , Cs^+ und Ca^{2+} auftreten, untersucht. Die Beobachtung eines anomalen Molfraktionsverhalten würde hierbei auf das Vorhandensein einer entsprechenden Ionenbindungsstelle in der Pore von TRPM3 α 2 hindeuten und im Falle von Na^+ die oben aufgestellte Hypothese, dass es sich um einen permeanten TRPM3 α 2-Blocker handelt, bestätigen.

Zur Untersuchung der zwischen Ca^{2+} und Na^+ bzw. Ca^{2+} und Cs^+ auftretenden Interaktionen wurden extrazelluläre Lösungen verwendet, die neben 145 mM Na^+ bzw. 145 mM Cs^+ noch unterschiedliche Konzentrationen an Ca^{2+} enthielten. In Gegenwart von 145 mM Na^+ konnte ein kleiner, aber signifikanter Na^+ -getragener Einwärtsstrom beobachtet werden. Mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration war eine Zunahme des TRPM3 α 2-Einwärtsstromes beobachtbar (Abbildung 6.6D-F). Ein anomales Molfraktionsverhalten zeigte sich zwischen Na^+ und Ca^{2+} jedoch nicht. Die hier beobachtete Zunahme des Einwärtsstromes könnte einerseits auf einen verstärkten Einstrom von Ca^{2+} , andererseits aber auch auf einen verstärkten Einstrom von Na^+ infolge einer verstärkten, positiven Modulation durch Ca^{2+} zurückzuführen sein. In Gegenwart von 145 mM Cs^+ konnte ein im Vergleich zum Na^+ -Einwärtsstrom deutlich größerer Cs^+ -Einwärtsstrom beobachtet

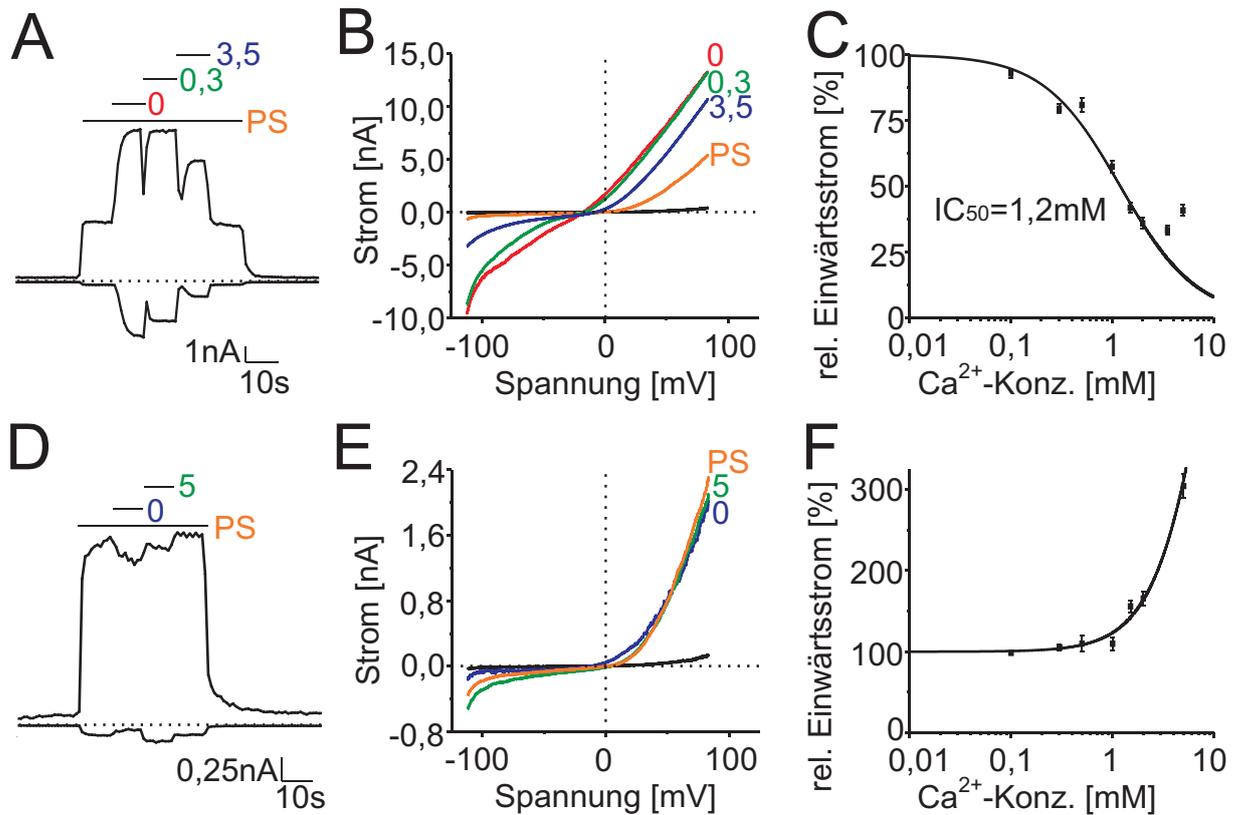


Abb. 6.6: **Interaktionen der TRPM3 α 2 permeierenden Kationen Ca²⁺, Cs⁺ und Na⁺** (A,B,C) Interaktion zwischen Cs⁺ und Ca²⁺ und (D,E,F) Interaktion zwischen Na⁺ und Ca²⁺ in Anwesenheit von 21 μ M Pregnenolonsulfat (PS). (A,D) Strom einer TRPM3 α 2 exprimierenden HEK293-Zelle bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer Cs⁺-haltigen, extrazellulären Lösung (A) bzw. einer Na⁺-haltigen, extrazellulären Lösung (D) unter Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen an Ca²⁺ (in mM). (B,E) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation der Cs⁺-haltigen (B) bzw. Na⁺-haltigen (E), extrazellulären Lösung unter Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen an Ca²⁺. (C,F) Statistische Auswertung der Stromantworten bei -80 mV aus (A) und (D) normalisiert auf die Antwort der Cs⁺-haltigen bzw. Na⁺-haltigen, extrazellulären Lösung ohne Zusatz von Ca²⁺ ($n \geq 6$). Die durch die normalisierten Antworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: $IC_{50} = 1,2$ mM, $h = 1,1$ (C); $EC_{50} = 4,6$ mM, $h = 1,8$, Maximum = 482,2 (F).

werden. Mit zunehmender Ca²⁺-Konzentration war hier jedoch zunächst eine Abnahme des TRPM3 α 2-Einwärtsstromes beobachtbar, der bei einer Ca²⁺-Konzentration von 1,2 mM sein Minimum erreichte. Bei höheren Konzentrationen an Ca²⁺ wurde schließlich eine Zunahme des TRPM3 α 2-Einwärtsstromes beobachtet (Abbildung 6.6A-C). Ein anomales Molfraktionsverhalten (englisch „anomalous mole fraction behaviour“), wie es von Ca²⁺-selektiven Kationenkanälen bekannt ist, war somit bei TRPM3 α 2 für die beiden Kationen Ca²⁺ und Cs⁺ nachweisbar. Es deutet darauf hin, dass TRPM3 α 2 in der Pore eine Ca²⁺-

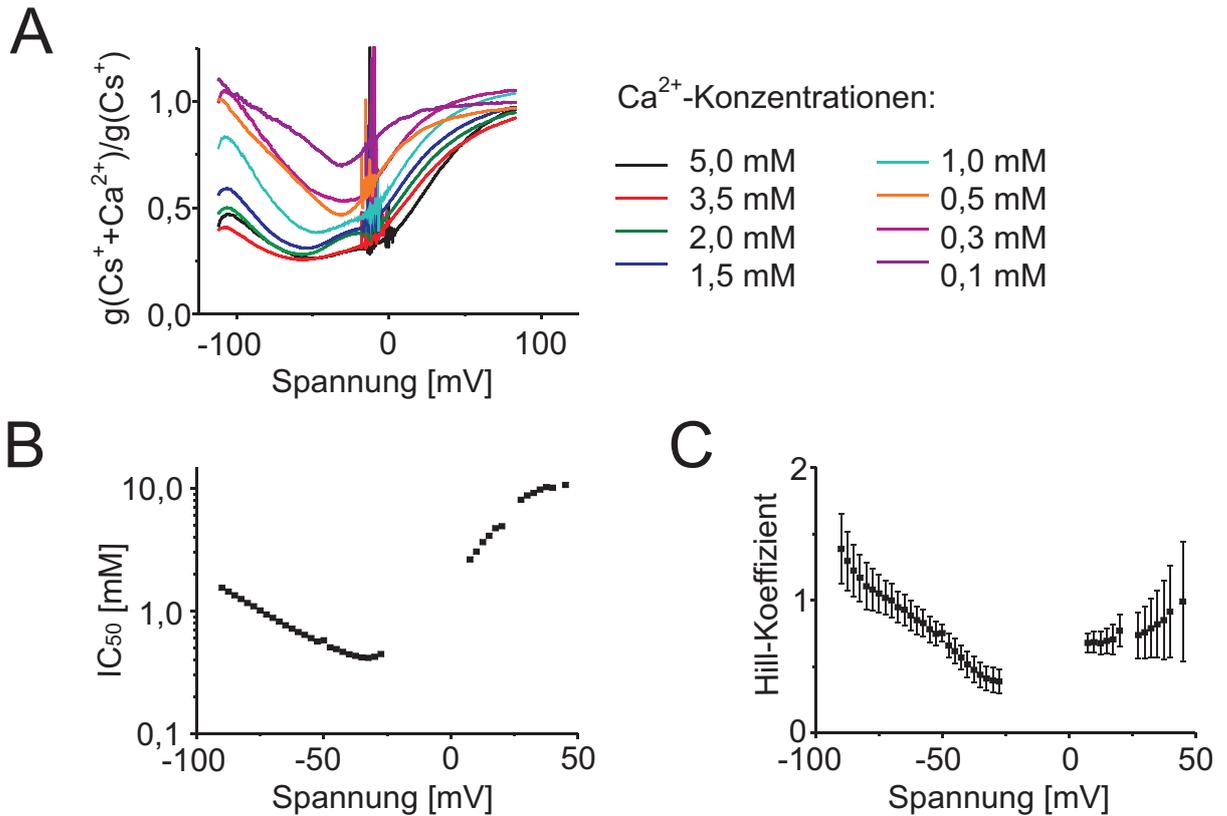


Abb. 6.7: **Spannungsabhängigkeit der Ca²⁺-Hemmung des Cs⁺-Stromes** (A) Spannungsabhängigkeit der Ca²⁺-Hemmung, erhalten nach Auftragung des Verhältnisses G/G_{\max} bei unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen gegen die Spannung. (B) Spannungsabhängigkeit der ermittelten IC₅₀-Werte. (C) Spannungsabhängigkeit der ermittelten Hillkoeffizienten.

Bindungsstelle besitzt, die aufgrund des hier ermittelten IC₅₀-Wertes von 1,2 mM (bei -80 mV) allerdings nur eine schwache Affinität für Ca²⁺ aufweist. Im folgenden stellte sich die Frage, ob ein anomales Molfraktionsverhalten wie es zwischen Ca²⁺ und Cs⁺ beobachtet wurde, auch für die beiden monovalenten Kationen Na⁺ und Cs⁺ nachzuweisen ist. Zur Untersuchung wurden hierbei extrazelluläre Lösungen verwendet, die unterschiedliche Konzentrationen an Na⁺ und Cs⁺ enthielten. Mit zunehmender Konzentration an Na⁺ und abnehmender Konzentration an Cs⁺ wurde hier eine Abnahme des TRPM3α2-Einwärtsstromes beobachtet (Abbildung 6.8A-C). Ein anomales Molfraktionsverhalten, wie es zwischen Ca²⁺ und Cs⁺ beobachtet wurde, war allerdings nicht feststellbar.

Da für CNG-Kanäle bereits gezeigt werden konnte, dass Ca²⁺ den monovalent-getragenen Einwärtsstrom durch diese in einer spannungsabhängigen Weise hemmt [50], wurde für TRPM3α2 zusätzlich noch die Spannungsabhängigkeit der Ca²⁺-Hemmung untersucht. Hierzu wurde das Verhältnis G/G_{\max} bei unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen gegen

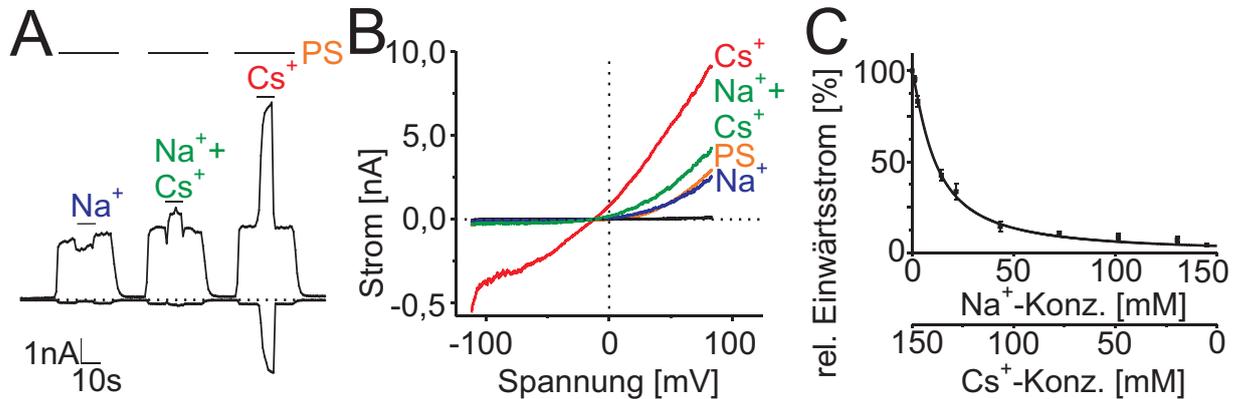


Abb. 6.8: **Interaktionen der TRPM3 α 2 permeierenden Kationen Cs⁺ und Na⁺**
 (A) Strom bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von extrazellulären Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cs⁺ und Na⁺ ($0 + 145$ mM, $72,5 + 72,5$ mM und $145 + 0$ mM). (B) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation der extrazellulären Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cs⁺ und Na⁺. (C) Statistische Auswertung der Stromantworten bei -80 mV aus (A) normalisiert auf die Antwort der Cs⁺-haltigen, extrazellulären Lösung ($n \geq 6$). Die durch die Stromantwort gefittete Kurve stellt eine Hillfunktion mit den folgenden Parametern dar: $IC_{50} = 11,4$ mM, $h = 1,2$.

die Membranspannung aufgetragen. Ausgehend von positiven Membranpotentialen wurde zunächst mit abnehmenden Membranpotential eine zunehmende Hemmung beobachtet (Abbildung 6.7A), die auf einen erleichterten Zugang von Ca²⁺ zur Ca²⁺-Bindungsstelle in der Pore zurückzuführen ist. Die Hemmung war nicht vollständig, sondern nur partiell und erreichte ihr Maximum bei ca. -33 mV. Bei Membranpotentialen kleiner -33 mV wurde eine teilweise bzw. nahezu vollständige Aufhebung der Hemmung beobachtet (Abbildung 6.7). Diese kann mit der Dissoziation des Ca²⁺ von der Ca²⁺-Bindungsstelle und mit dem Verlassen der Pore in zytosolischer Richtung erklärt werden („punch-through“-Effekt). Auch der IC_{50} -Wert der Ca²⁺-Hemmung sank mit abnehmenden Membranpotential und erreichte bei -33 mV einen minimalen Wert von $0,4$ mM. Diese Abnahme wird durch eine Ca²⁺-Affinitatzunahme der Ca²⁺-Bindungsstelle in der Pore bedingt (Abbildung 6.7B). Die Hillkoeffizienten bewegten sich im ausgewerteten Spannungsbereich (-90 bis $+45$ mV) zwischen $0,4$ und $1,4$. Als mögliche Ursache für die schwankenden Hillkoeffizienten ist die mit zunehmender Ca²⁺-Konzentration zu beobachtende, zunehmende Ca²⁺-Permeation zu nennen.

Im folgenden wurde schließlich noch der Einfluss von extrazellulärem Na⁺ auf den Ca²⁺- und Cs⁺-getragenen TRPM3 α 2 Ein- und Auswärtsstrom untersucht. Hierzu wurden extrazelluläre 140 mM Cs⁺-Lösungen und extrazelluläre 5 mM Ca²⁺-Lösungen, die unterschied-

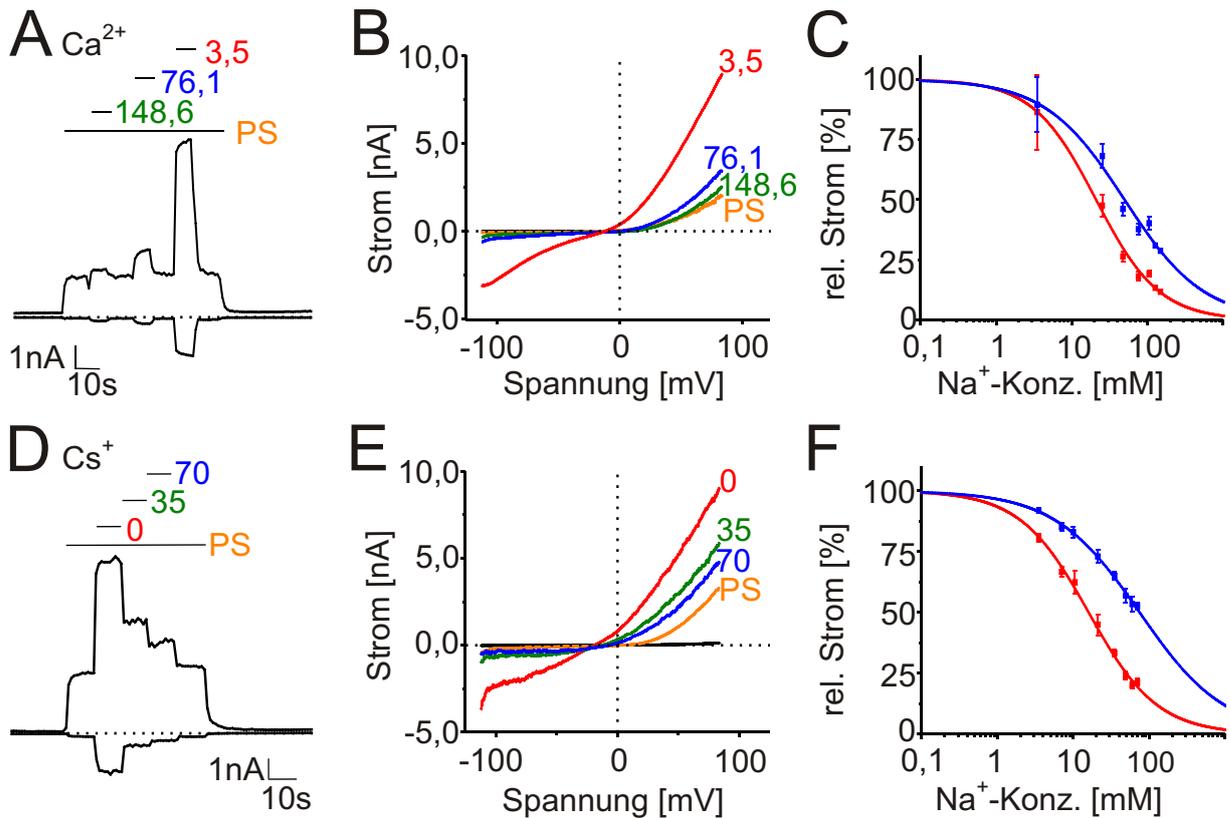


Abb. 6.9: Na^{+} -Blockade des Ca^{2+} - und Cs^{+} -getragenen TRPM3 α 2-Stromes (A,B,C) Na^{+} -Blockade des Ca^{2+} -getragenen TRPM3 α 2-Stromes in Anwesenheit von $7 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS) und (D,E,F) des Cs^{+} -getragenen TRPM3 α 2-Stromes in Anwesenheit von $21 \mu\text{M}$ PS. (A,D) Strom bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von Ca^{2+} -haltigen (A) und Cs^{+} -haltigen (D), extrazellulären Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Na^{+} (in mM). (B,E) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation der Ca^{2+} -haltigen (B) und Cs^{+} -haltigen (E), extrazellulären Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Na^{+} . (C,F) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) und (D) normalisiert auf die Antwort der Ca^{2+} -haltigen, extrazellulären Lösung unter Zusatz von $148,6$ mM Na^{+} ($n \geq 7$) bzw. der Cs^{+} -haltigen, extrazellulären Lösung unter Zusatz von 0 mM Na^{+} ($n \geq 7$). Die durch die normalisierten Antworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: -80 mV: $\text{IC}_{50} = 21$ mM, $h = 1,0$; $+80$ mV: $\text{IC}_{50} = 50$ mM, $h = 0,8$ (C); -80 mV: $\text{IC}_{50} = 16$ mM, $h = 1,0$; $+80$ mV: $\text{IC}_{50} = 75$ mM, $h = 0,8$ (F).

liche Konzentrationen an Na^{+} enthielten, verwendet. Mit zunehmender Konzentration an extrazellulärem Na^{+} konnte sowohl eine Hemmung des Cs^{+} -getragenen als auch des Ca^{2+} -getragenen Einwärtsstromes beobachtet werden (Abbildung 6.9D,E und Abbildung 6.9A, B). Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte der Na^{+} -Hemmung lagen für Cs^{+} bei 16 mM (-80 mV) und 75 mM ($+80$ mV) (Abbildung 6.9F) und für Ca^{2+} bei 21 mM (-80 mV) und 50 mM ($+80$ mV) (Abbildung 6.9C) und zeigten eine Spannungsabhängigkeit. Im Gegensatz zur Ca^{2+} -Hemmung wurde bei der Na^{+} -Hemmung mit

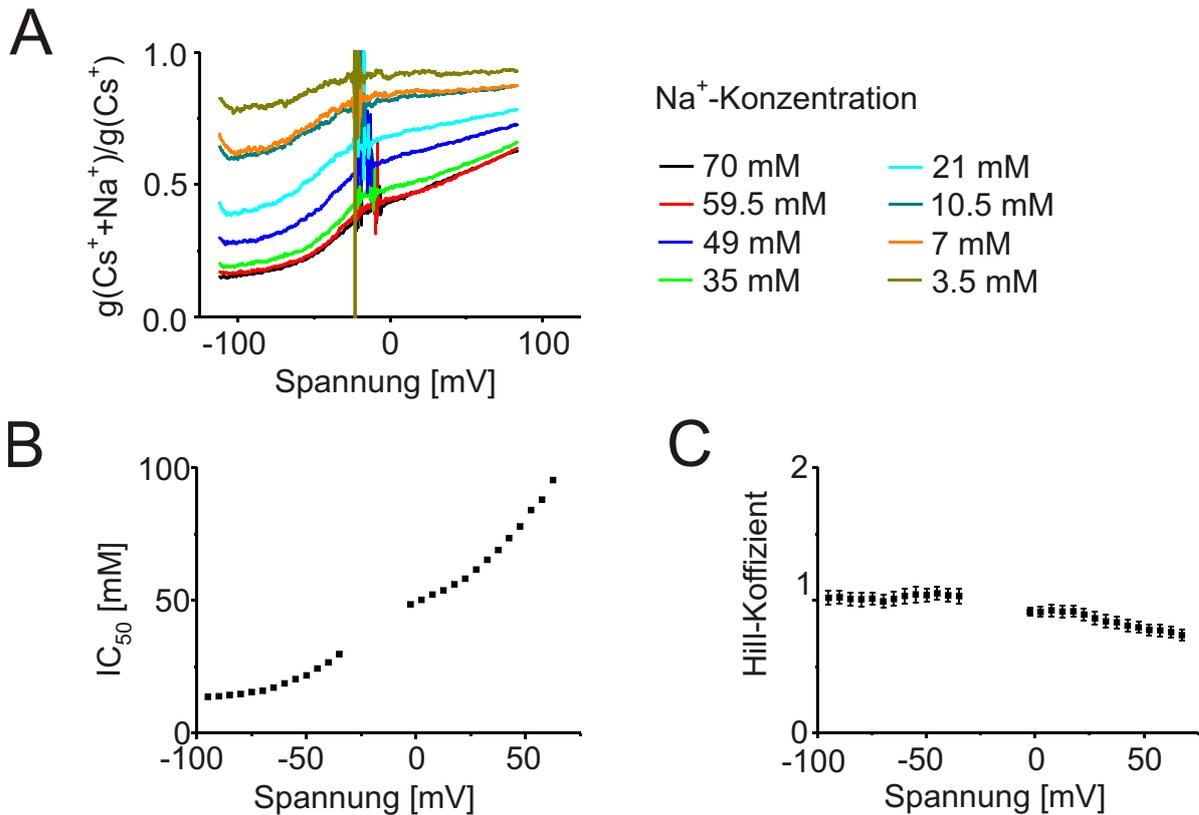


Abb. 6.10: **Spannungsabhängigkeit der Na⁺-Hemmung des Cs⁺-Stromes** (A) Spannungsabhängigkeit der Na⁺-Hemmung, erhalten nach Auftragung des Verhältnisses G/G_{\max} bei unterschiedlichen Na⁺-Konzentrationen gegen die Spannung. (B) Spannungsabhängigkeit der ermittelten IC₅₀-Werte. (C) Spannungsabhängigkeit der ermittelten Hillkoeffizienten.

abnehmenden Membranpotential lediglich eine zunehmende Hemmung des monovalenten TRPM3 α 2-Stromes beobachtet (Abbildung 6.10A). Während die zur halbmaximalen Hemmung erforderlichen Na⁺-Konzentrationen mit abnehmenden Membranpotential ebenfalls kontinuierlich sanken (Abbildung 6.10B), lagen die Hillkoeffizienten im ausgewerteten Spannungsbereich (−95 bis +65 mV) nahezu konstant bei eins ($h = 0,7-1,0$) (Abbildung 6.10C). Folglich hemmt extrazelluläres Na⁺ sowohl den Cs⁺- als auch Ca²⁺-getragenen Einwärtsstrom in einer spannungsabhängigen Weise.

Fraktioneller Calciumstrom

Mit Hilfe einer Kombination aus whole-cell Patch-clamp-Technik und Ca²⁺-Imaging-Technik wurde im folgenden der fraktionelle Calciumstrom von TRPM3 α 2 bestimmt.

Wie in Abbildung 6.11A erkennbar, führte die Applikation von 35 μ M Pregnenolonsulfat in transient mit TRPM3 α 2 transfizierten HEK293-Zellen zu einem messbaren TRPM3 α 2-Einwärtsstrom. Gleichzeitig mit der Entwicklung des Einwärtsstromes war eine Abnahme

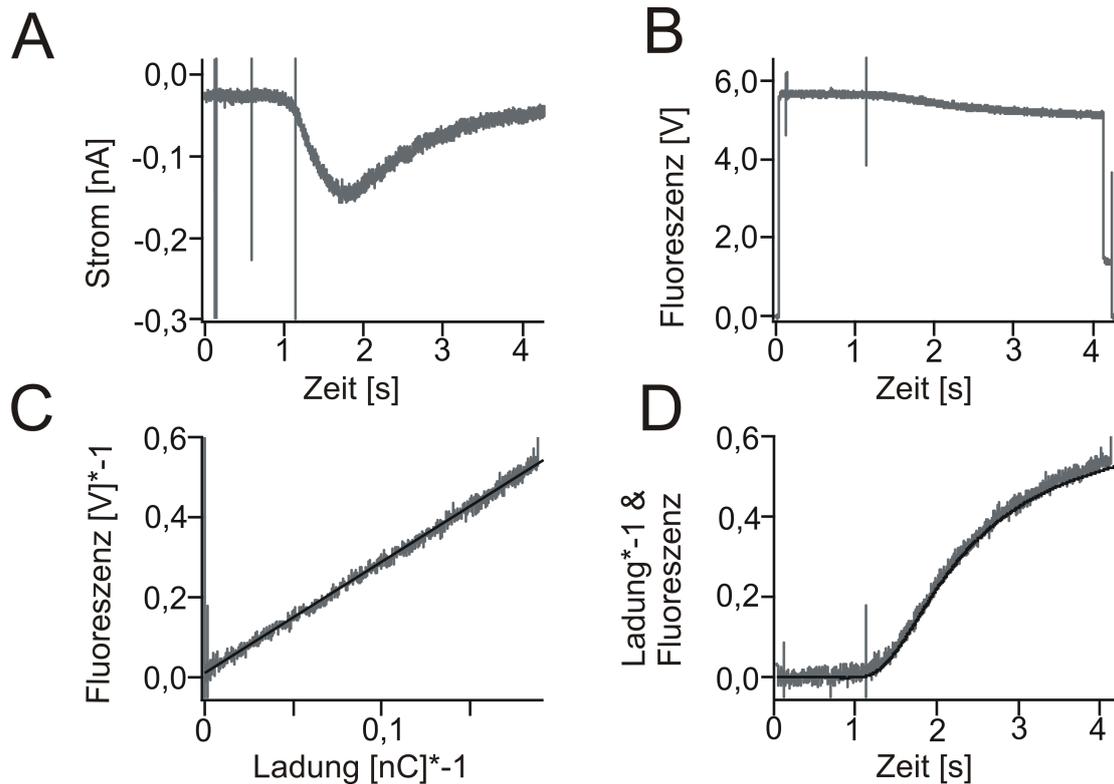


Abb. 6.11: **Bestimmung von k_{mix} für TRPM3 α 2** (A) Aktivierung der transient in HEK293-Zellen überexprimierten TRPM3 α 2-Kanäle mit 35 μ M Pregnenolonsulfat bei einem Haltepotential von -75 mV. (B) Abnahme der FURA2 Fluoreszenzintensität während der Applikation von Pregnenolonsulfat. (C) Lineare Korrelation, die nach Auftragung der invertierten Fluoreszenzkurve gegen die integrierte und invertierte Stromkurve erhalten wurde. (D) Überlagerung der invertierten Fluoreszenzkurve und der mit k_{mix} multiplizierten, integrierten und invertierten Stromkurve als Kontrolle.

in der Fluoreszenzintensität von FURA2 beobachtbar (Abbildung 6.11B). Nach Auftragung der Fluoreszenzintensitätsänderung gegen das Integral des Stromes wurde aufgrund der direkten Proportionalität beider Parameter eine lineare Korrelation erhalten (Abbildung 6.11C). Die lineare Korrelation lieferte einen k_{mix} -Wert von $2,29 \pm 0,05$ V/nC ($n = 19$), aus dem unter Zuhilfenahme des separat bestimmten k_{Ca} -Wertes von $9,44 \pm 0,28$ V/nC (Abbildung 6.2) ein fraktioneller Calciumstrom von $24,3 \pm 0,5\%$ für TRPM3 α 2 bestimmt wurde. Um einen Vergleich mit anderen Mitgliedern der TRP-Proteinfamilie ziehen zu können, wurde zusätzlich noch der fraktionelle Calciumstrom von TRPM8 und TRPV1 bestimmt. Gleichzeitig mit der Entwicklung des TRPM8-Einwärtsstromes bei Applikation von 500 μ M Menthol bzw. des TRPV1-Einwärtsstromes bei Applikation von 1 μ M N-Vanilloylnonamid wurde auch hier eine Abnahme in der Fluoreszenzintensität von FURA2 beobachtet und eine lineare Korrelation nach Auftragung der Fluoreszenzintensitätsänderung gegen das Integral des Stromes erhalten (Abbildungen 6.12A-C und 6.13A-

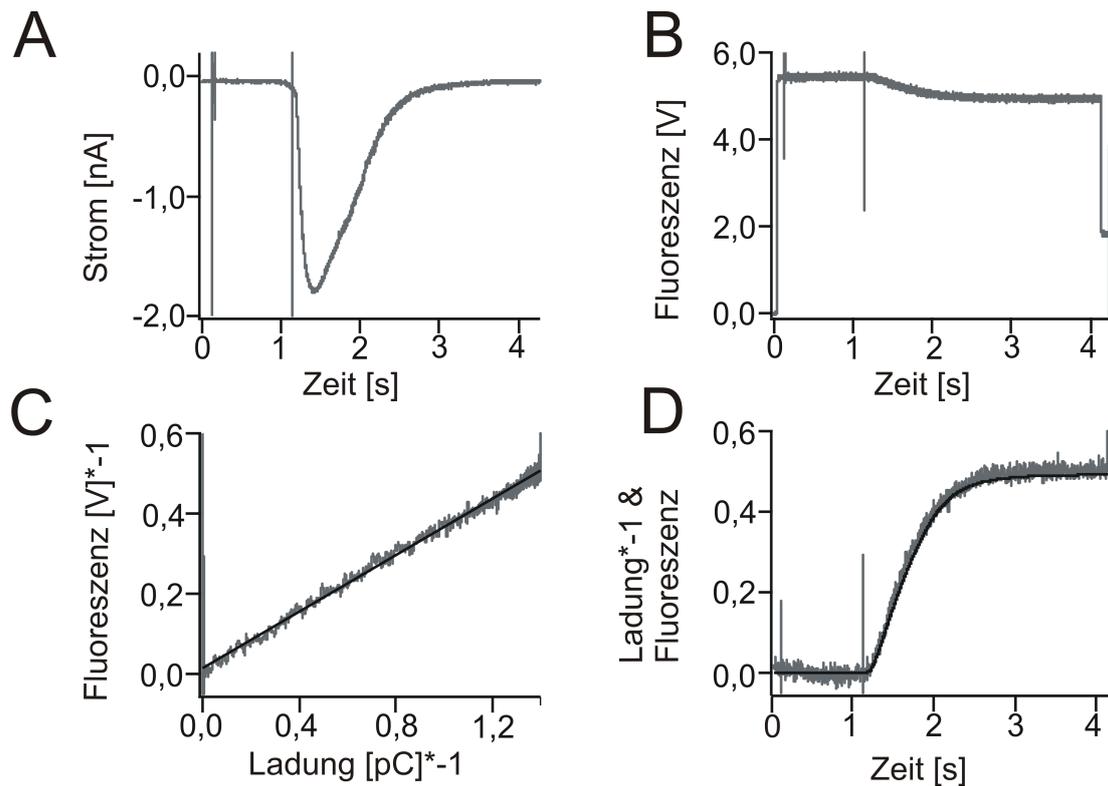


Abb. 6.12: **Bestimmung von k_{mix} für TRPM8** (A) Aktivierung der stabil in HEK293-Zellen überexprimierten TRPM8-Kanäle mit $500 \mu\text{M}$ Menthol bei einem Haltepotential von -75 mV . (B) Abnahme der FURA2 Fluoreszenzintensität während der Applikation von Menthol. (C,D) Vergleiche Abbildung 6.11C und D.

C). Die lineare Korrelation lieferte für TRPM8 einen k_{mix} -Wert von $0,34 \pm 0,01 \text{ V/nC}$ ($n = 15$) und für TRPV1 einen k_{mix} -Wert von $0,37 \pm 0,02 \text{ V/nC}$ ($n = 10$). Der hieraus bestimmte fraktionelle Calciumstrom betrug für TRPM8 $3,5 \pm 0,1\%$ und für TRPV1 $3,9 \pm 0,2\%$. Da TRPV1 neben N-Vanilloylnonamid auch noch durch Protonen aktiviert wird, wurde zusätzlich noch der fraktionelle Calciumstrom von TRPV1 unter Verwendung einer Standardbadlösung pH 5,5 bestimmt (nicht gezeigt). Dies erlaubte außerdem den direkten Vergleich mit Literaturwerten. Der aus der linearen Korrelation erhaltene k_{mix} -Wert betrug hier $0,23 \pm 0,01 \text{ V/nC}$ ($n = 13$). Die Bestimmung des fraktionellen Calciumstromes lieferte einen Wert von $2,4 \pm 0,1\%$. Abbildung 6.14A fasst die für TRPM3 α 2, TRPM8 und TRPV1 ermittelten fraktionellen Calciumströme nochmals zusammen. Wie hier ersichtlich, lag der fraktionelle Calciumstrom von TRPM3 α 2 mit 24,3% deutlich höher als die fraktionellen Calciumströme von TRPM8 (3,5%) und TRPV1 (3,9%). Die fraktionellen Calciumströme von TRPM8 und TRPV1 lagen ungefähr in der gleichen Größenordnung. Die mit $1 \mu\text{M}$ N-Vanilloylnonamid ermittelten und die mit der Standardbadlösung pH 5,5 ermittelten fraktionellen Calciumströme von TRPV1 lagen zwar ebenfalls mit 3,9% und

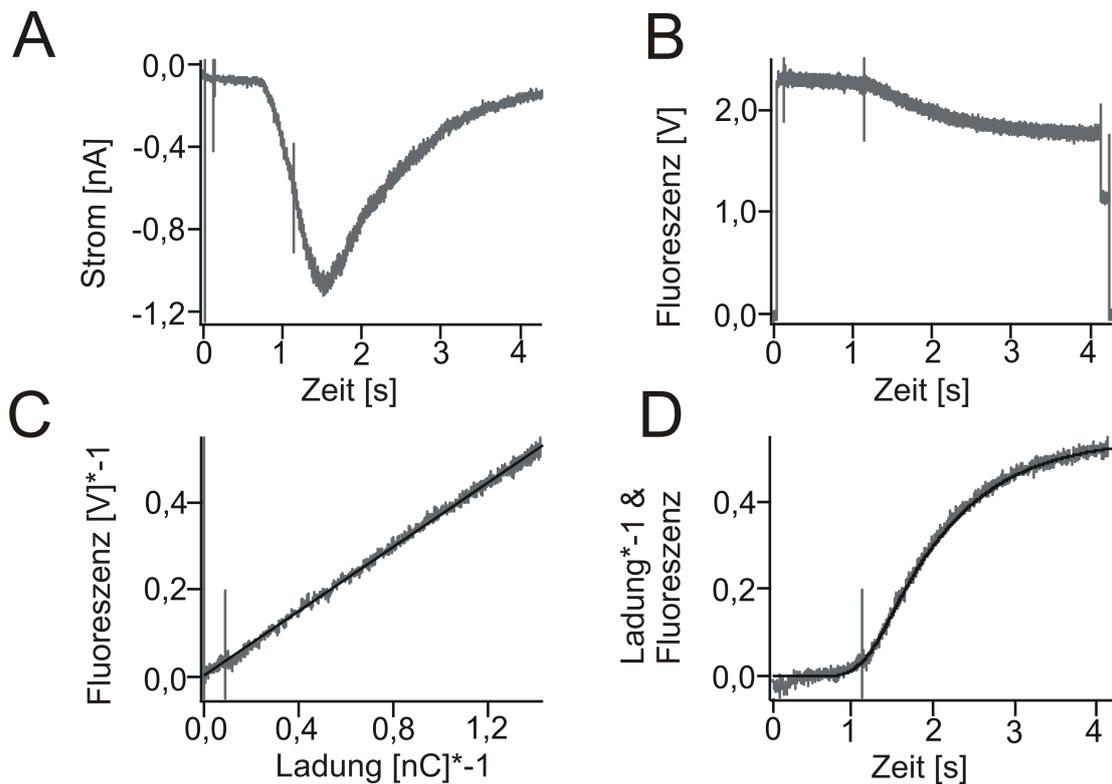


Abb. 6.13: **Bestimmung von k_{mix} für TRPV1** (A) Aktivierung der transient in HEK293-Zellen überexprimierten TRPV1-Kanäle mit $1 \mu\text{M}$ N-Vanilloylnonamid bei einem Haltepotential von -75 mV . (B) Abnahme der FURA2 Fluoreszenzintensität während der Applikation von N-Vanilloylnonamid. (C,D) Vergleiche Abbildung 6.11C und D.

2,3% dicht beieinander, signifikante Unterschiede waren aber feststellbar.

Für andere Ionenkanäle konnte bereits gezeigt werden, dass der fraktionale Calciumstrom von einer Vielzahl verschiedenster Faktoren, wie beispielweise der Spannung, der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, dem extrazellulären pH-Wert sowie der An- bzw. Anwesenheit weiterer mono- und divalenter Kationen, beeinflusst wird. Im folgenden wurde nun für TRPM3 α 2 zunächst die Abhängigkeit des fraktionellen Calciumstromes von der Spannung ermittelt, da für CNG-Kanäle bereits eine solche Abhängigkeit des fraktionellen Calciumstromes gezeigt werden konnte [37] und alle vorangegangenen Messungen ausschließlich bei einem Haltepotential von -75 mV durchgeführt wurden. Im Gegensatz zu den CNG-Kanälen zeigte der fraktionale Calciumstrom von TRPM3 α 2 allerdings nur eine geringfügige Abhängigkeit vom Haltepotential (Abbildung 6.14C). Eine leichte Zunahme von $25,1 \pm 0,6\%$ auf $27,4 \pm 0,3\%$ wurde bei Erhöhung des Haltepotentials von -95 mV auf -20 mV beobachtet.

Zusätzlich wurde auch noch die Abhängigkeit des fraktionellen Calciumstromes von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie von der An- bzw. Abwesenheit bestimmter

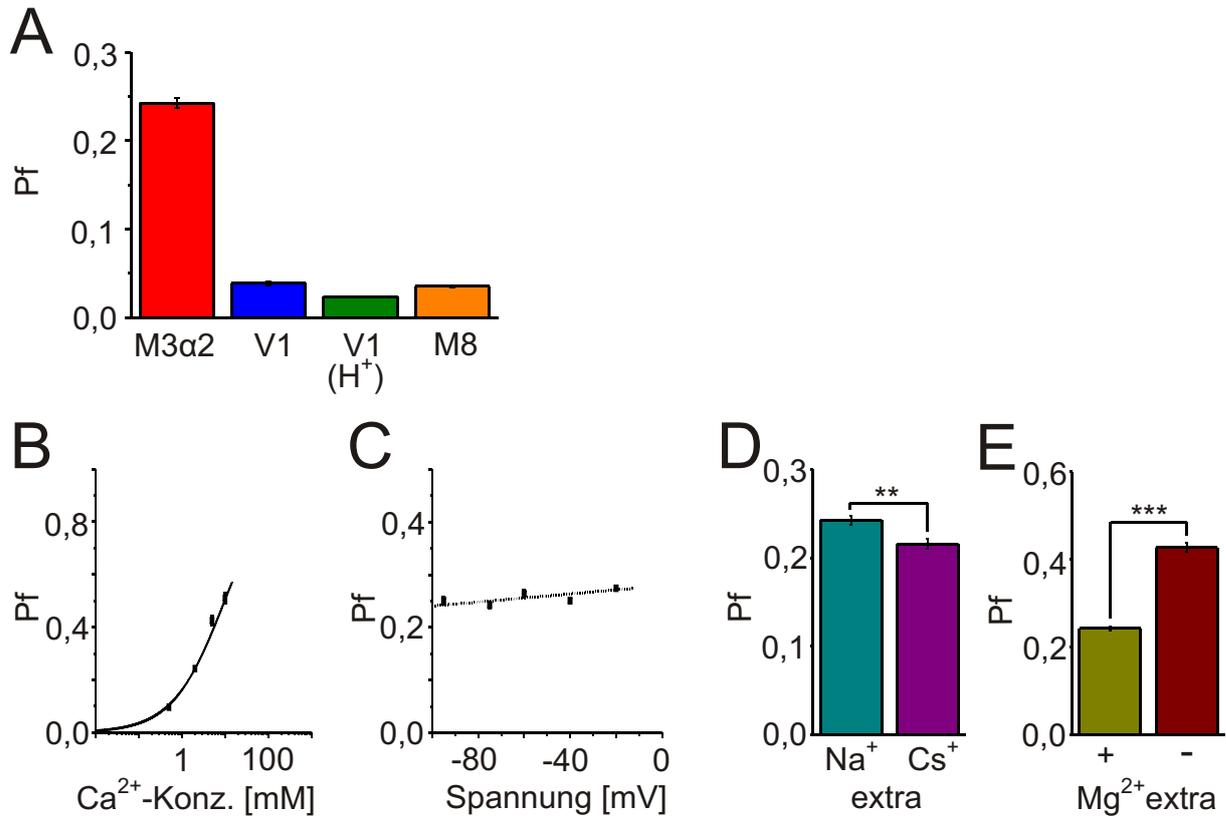


Abb. 6.14: **Zusammenfassung der ermittelten fraktionellen Calciumströme für TRPM3α2, TRPM8 und TRPV1** (A) Statistische Auswertung der fraktionellen Calciumströme von TRPM3α2 in Anwesenheit von 35 μM Pregnenolonsulfat, von TRPM8 in Anwesenheit von 500 μM Menthol und von TRPV1 in Anwesenheit von 1 μM N-Vanilloylnonamid bzw. Protonen (pH 5,5). (B,C) Abhängigkeit des fraktionellen Calciumstromes von TRPM3α2 von der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration (n ≥ 15) (B) und von der Spannung (n ≥ 14) (C). (D,E) Beeinflussung des fraktionellen Calciumstromes von TRPM3α2 durch extrazelluläres Na⁺ (n = 15) (D) und durch extrazelluläres Mg²⁺ (n = 16) (E).

mono- und divalenter Kationen ermittelt. Erwartungsgemäß konnte mit zunehmender Konzentration an extrazellulärem Ca²⁺ auch eine Zunahme des fraktionellen Calciumstromes beobachtet werden. Bei einer extrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 10 mM wurde hierbei ein fraktioneller Calciumstrom von ungefähr 50% erreicht (Abbildung 6.14B). Zur Untersuchung des Einflusses von Mg²⁺ auf den fraktionellen Calciumstrom wurde dieses aus der Standardbadlösung entfernt. Mit Entfernung des Mg²⁺ aus der Standardbadlösung konnte eine Zunahme des fraktionellen Calciumstromes beobachtet werden. Der fraktionelle Calciumstrom war mit $42,7 \pm 1,0\%$ nahezu doppelt so hoch wie der in Anwesenheit von Mg²⁺ (Abbildung 6.14E). Folglich scheinen Ca²⁺ und Mg²⁺ um die Permeation durch TRPM3α2 zu konkurrieren. Da in den vorangegangenen beiden Abschnitten gezeigt wur-

de, dass Na^+ im Vergleich zu Cs^+ nur äußerst geringe Einwärtsströme durch TRPM3 α 2 trägt und zusätzlich noch den Cs^+ - und Ca^{2+} -getragenen Einwärtsstrom hemmt, wurde zusätzlich auch noch dessen Einfluss auf den fraktionellen Calciumstrom von TRPM3 α 2 untersucht. Hierzu wurde Na^+ in der Standardbadlösung durch Cs^+ ersetzt. Nach Ersetzen des extrazellulären Na^+ gegen Cs^+ wurde eine leichte, aber signifikante Abnahme des fraktionellen Calciumstromes von $24,3 \pm 0,5\%$ auf $21,6 \pm 0,6\%$ beobachtet (Abbildung 6.14D).

6.5 Diskussion

Um den TRPM3 α 2 zugrundeliegenden Permeationsmechanismus mono- und divalenter Kationen besser verstehen zu können, wurden in diesem Kapitel die zwischen den permeierenden Kationen auftretenden Interaktionen sowie deren mögliche Interaktion mit dem Selektivitätsfilter in der Pore elektrophysiologisch untersucht.

Im ersten Teil dieses Kapitels, der sich vornehmlich mit der Permeation von Na^+ durch TRPM3 α 2 befasst, konnte zunächst gezeigt werden, dass in Abwesenheit von divalenten Kationen die Na^+ -getragenen TRPM3 α 2-Ströme sowohl in Ein- als auch in Auswärtsrichtung deutlich kleiner sind als die Cs^+ -getragenen TRPM3 α 2-Ströme, obwohl sich die in Kapitel 5 bestimmten relativen Permeabilitäten von Na^+ und Cs^+ kaum voneinander unterscheiden. Die Größen der K^+ - und Li^+ -getragenen TRPM3 α 2-Ströme lagen zwischen denen der Na^+ - und Cs^+ -getragenen TRPM3 α 2-Ströme, sodass anhand der Größe der Einwärtsströme folgende Permeationsreihenfolge für die monovalenten Kationen aufgestellt werden konnte: $\text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ (Eisenman Sequenz X [69]). Diese Permeationsreihenfolge deutet auf eine monovalente Bindungsstelle mit hoher Feldstärke (englisch „strong field strength binding site“) in der Pore von TRPM3 α 2 hin. Hierbei handelt es sich definitionsgemäß um eine Bindungsstelle geringen Durchmessers. Kleinere Kationen, wie Na^+ , die aufgrund ihrer Größe näher an diese Bindungsstelle gelangen und stärkere elektrostatische Wechselwirkungen mit dieser eingehen können, werden bevorzugt an diese gebunden [69]. Auch besitzen kleinere Kationen im Vergleich zu größeren Kationen eine höhere Ladungsdichte, sodass verstärkte elektrostatische Wechselwirkungen auch aufgrunddessen schon zu erwarten sind. Diese stärkeren elektrostatischen Wechselwirkungen könnten somit für die im Vergleich zu Cs^+ deutlich langsamere Permeation von Na^+ durch TRPM3 α 2 verantwortlich sein. Auch ist anzunehmen, dass Na^+ infolge der daraus resultierenden verlängerten Verweildauer in der Pore die Permeation weiterer mono- und divalenter Kationen durch diese behindert und folglich einen permeanten TRPM3 α 2-Blocker darstellt.

Zur Bestätigung dieser aufgestellten Hypothese wurde im folgenden das anomale Mol-

fraktionsverhalten zwischen Na^+ und Cs^+ sowie die Spannungsabhängigkeit der Na^+ -Hemmung untersucht. Ein anomales Molfraktionsverhalten und eine spannungsabhängige Na^+ -Hemmung mit „punch-through“-Effekt bei positiveren Potentialen, wie sie für einen permeanten Kanalblocker erwartet wurden, konnten hier allerdings nicht beobachtet werden. Eine Bestätigung der permeanten Blocker-Hypothese konnte somit für Na^+ nicht erbracht werden. Im Gegensatz zu Na^+ konnte in Gegenwart von Ca^{2+} jedoch sehr wohl ein anomales Molfraktionsverhalten und eine spannungsabhängige Hemmung mit „punch-through“-Effekt bei positiveren Potentialen nachgewiesen werden. Der hierbei ermittelte IC_{50} -Wert der Ca^{2+} -Hemmung von 1,2 mM bei -80 mV deutet auf das Vorhandensein einer schwachaffinen Ca^{2+} -Bindungsstelle in der Pore von TRPM3 α 2 hin. Im Vergleich dazu besitzen CNG-Kanäle, die wie TRPM3 α 2 ebenfalls zu den nichtselektiven Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen zählen ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{K}} = 1,7-8,0$ [50]) eine deutlich höher affine Ca^{2+} -Bindungsstelle in der Pore ($\text{IC}_{50} = 5-200 \mu\text{M}$).

Im zweiten Teil dieses Kapitels wurde der Anteil des Gesamtstromes, der unter physiologischen Bedingungen durch Ca^{2+} getragen wird, bestimmt. Dieser auch als fraktionelle Calciumstrom bezeichnete Anteil des Gesamtstromes kann nicht aus den bisher erhobenen Daten vorhergesagt werden. Auch die in Kapitel 5 ermittelten relativen Permeabilitäten lassen keine Rückschlüsse auf den fraktionellen Calciumstrom zu, da hier Interaktionen zwischen permeierenden Kationen aufgrund der stark reduzierten Messbedingungen (bionische Messbedingungen) nicht erfasst werden. Der für TRPM3 α 2 ermittelte fraktionelle Calciumstrom betrug 24,3%. Vergleicht man diesen mit den ebenfalls hier ermittelten fraktionellen Calciumströmen von TRPM8 und TRPV1 so ist ein deutlicher Unterschied feststellbar. Die fraktionellen Calciumströme von TRPM8 und TRPV1 lagen mit 3,5% und 3,9% bzw. 2,4% um den Faktor 6-10 niedriger als der fraktionelle Calciumstrom von TRPM3 α 2. Auch die fraktionellen Calciumströme anderer Ca^{2+} -permeabler Kationenkanäle (NMDA-, AMPA-, Kainat-, ATP-, nicotinischer Acetylcholinrezeptorkanäle) liegen mit Ausnahme der CNG-Kanäle deutlich niedriger als bei TRPM3 α 2 (Abbildung 6.15) [15]. Angaben zum fraktionellen Calciumstrom von TRPV1 sind auch in der Literatur zu finden. Für den heterolog in HEK293-Zellen exprimierten TRPV1-Kanal wurde hierbei unter Verwendung einer Standardbadlösung pH 5,5 ein fraktioneller Calciumstrom von $3,5 \pm 0,3\%$ [38] ermittelt und für den endogen in DRG-Neuronen exprimierten TRPV1-Kanal unter Verwendung einer $3 \mu\text{M}$ Capsaicin-enthaltenden Standardbadlösung bzw. einer Standardbadlösung pH 5,1 ein fraktioneller Calciumstrom von $4,3 \pm 0,2\%$ bzw. $1,65 \pm 0,11\%$ [208]. Die hier ermittelten fraktionellen Calciumströme von $2,4 \pm 0,1\%$ (unter Verwendung der Standardbadlösung pH 5,5) und $3,9 \pm 0,2\%$ (unter Verwendung der $1 \mu\text{M}$ N-Vanilloylnonamid-enthaltenden Standardbadlösung) liegen somit nahe an diesen Literaturwerten. Größere, systematische Fehler bei den hier durchgeführten Bestimmungen

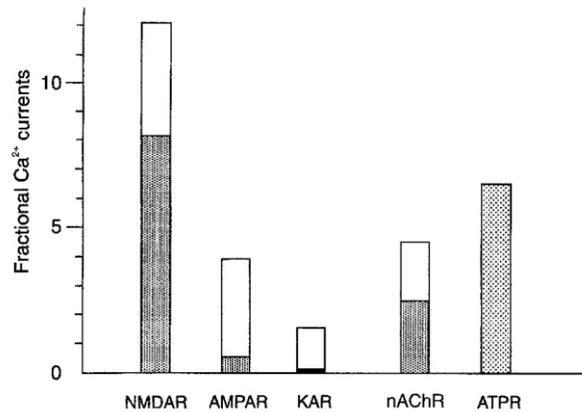


Abb. 6.15: Übersicht über die fraktionellen Calciumströme verschiedener Neurotransmitter-Rezeptoren. Abbildung übernommen aus Burnashev, 1998 [15]

der fraktionellen Calciumströme können somit ausgeschlossen werden. Beim Vergleich der beiden für TRPV1 ermittelten fraktionellen Calciumströme war ein signifikanter Unterschied feststellbar. Der unter Verwendung der Standardbadlösung pH 5,5 ermittelte fraktionelle Calciumstrom lag signifikant niedriger als der unter Verwendung der 1 μ M N-Vanilloylnonamid-enthaltenden Standardbadlösung ermittelte fraktionelle Calciumstrom. Für den endogen in DRG-Neuronen exprimierten TRPV1-Kanal wurde bereits gezeigt, dass mit abnehmenden, extrazellulären pH-Wert auch eine Abnahme des fraktionellen Calciumstromes (pH 6,1: $2,4 \pm 0,1\%$; pH 5,6: $2,1 \pm 0,1\%$; pH 5,1: $1,7 \pm 0,1\%$) zu beobachten ist [208]. Mit dieser Beobachtung lässt sich auch der hier festgestellte, signifikante Unterschied zwischen den beiden für TRPV1 ermittelten fraktionellen Calciumströmen erklären. Von anderen TRP-Kanälen liegen zur Zeit noch keine Literaturwerte zum fraktionellen Calciumstrom vor. Ein Grund liegt im Fehlen schnell wirksamer Agonisten. Auch konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass der fraktionelle Calciumstrom von TRPM3 α 2 nur eine geringfügige Abhängigkeit von der Spannung aufweist. Bei Erhöhung des Haltepotential von -95 mV auf -20 mV war lediglich eine Zunahme des fraktionellen Calciumstromes von $25,1 \pm 0,6\%$ auf $27,4 \pm 0,3\%$ beobachtbar. Bei CNG-Kanälen zeigt der fraktionelle Calciumstrom dagegen eine deutlich stärkere Abhängigkeit der Spannung. Bei Erhöhung des Haltepotentials von -90 mV auf -30 mV unter Bedingungen von reduziertem, extrazellulären Ca^{2+} war hier eine Zunahme des fraktionellen Calciumstromes von $7 \pm 1\%$ auf $24 \pm 4\%$ beobachtbar [37]. Entgegen der geringfügigen Abhängigkeit von der Spannung zeigt der fraktionelle Calciumstrom von TRPM3 α 2 jedoch eine starke Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Mit zunehmender extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration wurde, wie erwartet, eine Erhöhung des fraktionellen Calciumstromes beobachtet. Desweiteren wurde auch noch der Einfluss des in der Standardbadlösung ent-

haltenen Mg^{2+} auf den fraktionellen Calciumstrom von TRPM3 α 2 untersucht. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, besitzt TRPM3 α 2 neben einer hohen Permeabilität für Ca^{2+} auch noch eine hohe Permeabilität für Mg^{2+} . Mg^{2+} -getragene Einwärtsströme wurden dort in Abwesenheit anderer mono- und divalenter Kationen unter Verwendung einer 2 mM, 10 mM, 60 mM und 120 mM Mg^{2+} -Lösung nachgewiesen. Die hier nach Entfernung des Mg^{2+} aus der Standardbadlösung beobachtbare Zunahme des fraktionellen Calciumstromes legt nahe, dass auch unter physiologischen Bedingungen Mg^{2+} TRPM3 α 2 passiert und mit Ca^{2+} um die Bindungsstelle in der Pore konkurriert. Eine direkte Bestimmung des fraktionellen Magnesiumstromes ist bislang nicht möglich, da keine spezifischen Mg^{2+} -Indikatoren zur Verfügung stehen. Durch Austausch des extrazellulären Na^+ gegen Cs^+ in der Standardbadlösung wurde anschließend die oben aufgestellte, jedoch noch nicht bestätigte Hypothese, dass es sich bei Na^+ um einen permeanten TRPM3 α 2-Blocker handelt, überprüft. Eine signifikante Abnahme des fraktionellen Calciumstromes, wie sie bei Richtigkeit der Hypothese erwartet wurde, wurde zwar hier beobachtet, diese war aber deutlich geringer als angenommen. Erwartet wurde aufgrund des 19-fach höheren Einwärtsstromes von Cs^+ gegenüber Na^+ ein fraktioneller Calciumstrom von 2,1-2,2%, d.h. eine Abnahme um 22,1-22,2%. Eine Bestätigung der oben aufgestellten Hypothese konnte somit auch mit Hilfe der fraktionellen Calciumstrom-Messungen nicht erbracht werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die geringen Na^+ -getragenen Ein- und Auswärtsströme könnte auch eine verstärkte Inaktivierung des TRPM3 α 2-Kanals in Gegenwart von Na^+ sein. Der verstärkten Inaktivierung, d.h. der verringerten Öffnungszeit des TRPM3 α 2-Kanals könnte eine Destabilisierung des Kanals nach Bindung von Na^+ , die zu seinem vorzeitigen Schließen des Kanals führt, zugrundeliegen. Das in Gegenwart von Na^+ , nicht jedoch in Gegenwart von Cs^+ und Ca^{2+} beobachtbare starke Rauschen des TRPM3 α 2-Stromes (Abbildung 6.4B) deutet auf ein schnelles Schließen des Kanals nach Bindung von Na^+ an eine vermutlich in der Porenregion von TRPM3 α 2 gelegene Bindungsstelle hin sowie auf ein erneutes Öffnen nach dessen Dissoziation von dieser Bindungsstelle. Eine Bestätigung dieser Hypothese könnten zukünftige Einzelkanalmessungen erbringen.

7 Regulation der TRPM3 Kanalaktivität durch Kationen

7.1 Zusammenfassung

In den Zellmembranen nahezu aller Zellen befinden sich Ionenkanäle, die es Ionen erlauben, die ansonsten impermeablen Membranen zu durchqueren. Der Ionentransport durch die Ionenkanäle wird hierbei durch eine Vielzahl verschiedenster Mechanismen reguliert. Auch die Ionen selbst können in die Regulation der Ionenkanäle involviert sein. Aus diesem Grund wurde in diesem Kapitel der Einfluss verschiedenster mono-, di- und trivalenten Kationen auf die Aktivität von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2, zwei durch alternativen Spleißen gebildete und sich ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion voneinander unterscheidende TRPM3-Kanäle, mit Hilfe der Elektrophysiologie untersucht. Ziel war es, einerseits einen Einblick in die Regulationsmechanismen beider Kanäle zu bekommen und andererseits Unterschiede und Gemeinsamkeiten untereinander und zu anderen TRP-Kanälen aufzudecken.

Gezeigt werden konnte in diesem Kapitel, dass sowohl die Aktivität von TRPM3 α 2 als auch die von TRPM3 α 1 durch extrazelluläre Protonen reguliert wird. Unterschiede in der pH-Wert-Regulation beider Kanäle waren hierbei nicht feststellbar. Interessanterweise zeigte sich bei TRPM3 α 2 jedoch ein Unterschied in Anwesenheit seines Agonisten Pregnenolonsulfat, was auf eine veränderte Lage protonierbarer Aminosäuren infolge einer Konformationsänderung nach Agonistbindung hindeutet. Die in Gegenwart von extrazellulären Protonen beobachtete Hemmung haben TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 mit TRPV5, TRPV6 und TRPM5 gemeinsam. TRPM7, der TRPM3 sehr nahe steht und zahlreiche Gemeinsamkeiten mit diesem aufweist, wird dagegen durch extrazelluläre Protonen potenziert. Infolgedessen stellt die unterschiedliche Regulation durch extrazelluläre Protonen ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal von TRPM3 und TRPM7 dar. Auch Lanthanoide (Gd^{3+} , La^{3+}) und Rutheniumrot führten in mikromolaren Konzentrationen zu einer Hemmung beider Kanäle. In Gegenwart niedriger mikromolarer Konzentrationen an Gd^{3+} und La^{3+} war bei TRPM3 α 2 jedoch, ähnlich wie auch schon für TRPC4 und TRPC5 gezeigt, eine schwache Potenzierung des Einwärtsstromes beobachtbar. Beschrieben wurde für TRPM3 α 2 und TRPM3 α 1 auch schon eine Hemmung durch intrazelluläres Mg^{2+} . Eine Hemmung von TRPM3 α 2 in Gegenwart erhöhter intrazellulärer Mg^{2+} -Konzentrationen wurde auch hier sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat festgestellt. Die zur halbmaximalen Hemmung benötigten Mg^{2+} -Konzentrationen lagen im physiologischen Bereich. Auch für die TRPM3 sehr nahestehenden Ionenkanäle TRPM6 und TRPM7 konnte bereits eine solche Hemmung gezeigt werden. Neben diesen Gemein-

samkeiten weisen TRPM3 α 2 und TRPM3 α 1 jedoch auch regulatorische Unterschiede auf. So wird die Aktivität von TRPM3 α 2 durch extrazelluläre, monovalente (Na^+ , K^+) und divalente Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}), die Aktivität von TRPM3 α 1 jedoch nur durch extrazelluläre, divalente Kationen reguliert. Ausführlich untersucht wurde in diesem Kapitel die Hemmung von TRPM3 α 2 durch verschiedenste extrazelluläre, monovalente Kationen (Na^+ , K^+ , Cs^+ , Li^+ , NH_4^+ und NMDG^+). Der Schwerpunkt wurde hierbei auf die Hemmung durch extrazelluläres Na^+ gelegt, da dieses das wichtigste Kation des Extrazellulärtraumes darstellt. Außerdem zeigen nur äußerst wenige Ionenkanäle eine solche Hemmung, was insbesondere für die Identifizierung endogen exprimierter TRPM3 α 2-Kanälen von Bedeutung ist. Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse können zur Unterscheidung von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 sowie zu deren Abgrenzung von anderen TRP-Kanälen herangezogen werden. Gemeinsamkeiten zwischen beiden Kanälen sowie zu anderen TRP-Kanälen erlauben desweiteren Rückschlüsse auf gemeinsame Funktionsprinzipien.

7.2 Einleitung

Die TRP-Proteinfamilie bildet eine sehr heterogene Familie von Kationenkanälen. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihren Permeations- und Selektivitätseigenschaften, sondern auch in ihren Aktivierungs- und Regulationsmechanismen.

Bei der Aktivierung und Regulation der TRP-Kanäle spielen neben intra- und extrazellulären Botenstoffen und chemischen, mechanischen und osmotischen Reizen auch noch verschiedenste mono-, di- und trivalente Kationen eine bedeutende Rolle [25]. Monovalente Kationen wie beispielsweise Protonen regulieren die Aktivität von TRPM5, TRPM7, TRPV1, TRPV5 und TRPV6 in unterschiedlichster Art und Weise. So führen pH-Wert-Erniedrigungen einerseits zu einer Potenzierung von TRPV1 [83] und TRPM7 [82] und andererseits zu einer Hemmung von TRPV5 [204, 205], TRPV6 [204] und TRPM5 [106]. Divalente Kationen wie beispielsweise Ca^{2+} und Mg^{2+} , sind nicht nur permeable Kationen für zahlreiche TRP-Kanäle sondern auch in deren Regulation involviert. Hierbei regulieren sie deren Aktivität nicht nur von der extrazellulären sondern auch von der intrazellulären Seite her [25]. So stellt intrazelluläres Mg^{2+} beispielsweise einen wichtigen Regulator für die Aktivität von TRPM6 und TRPM7 dar [122, 190]. Trivalente Kationen wie Gd^{3+} und La^{3+} werden häufig aufgrund des Fehlens spezifischer Antagonisten als Blocker von selektiven und nichtselektiven, Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen eingesetzt. Auch zahlreiche TRP-Kanäle werden durch Gd^{3+} und La^{3+} blockiert [84]. Die zur Blockade erforderlichen Konzentrationen liegen hierbei im mikro- bis millimolaren Bereich. Eine Ausnahme bildet der *Drosophila* TRP-Kanal, der schon durch nanomolare Konzentrationen blockiert wird [67, 72]. Als Besonderheit zeigen TRPC4 und TRPC5 in Gegenwart mikromolarer

Konzentrationen eine Potenzierung. In Gegenwart millimolarer Konzentrationen werden jedoch auch sie durch Gd^{3+} und La^{3+} blockiert [84]. Neben Gd^{3+} und La^{3+} wird auch die hexavalente Verbindung Rutheniumrot häufig als unspezifischer Blocker von TRP-Kanälen eingesetzt. Rutheniumrot blockiert hierbei neben allen Mitgliedern der TRPV-Proteinfamilie (TRPV1-TRPV6) auch noch TRPM8 und TRPA1 [150]. Die zur Blockade erforderlichen Konzentrationen liegen im mikromolaren Bereich [150].

In diesem Kapitel wurde nun der Einfluss dieser verschiedenen mono-, di- und trivalenten Kationen auf die Aktivität der beiden TRPM3-Spleißvarianten TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 untersucht. TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 unterscheiden sich beide ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne voneinander. Bei TRPM3 α 2 ist hier eine 12 Aminosäuren lange Sequenz deletiert und ein Alanin zu Prolin substituiert. Infolge dieses Unterschiedes weisen beide sehr unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften auf. Unterschiede sind in der konstitutiven Aktivität, im Aktivierungsmechanismus sowie in den Permeations- und Selektivitätseigenschaften zu finden. Während TRPM3 α 1 eine hohe konstitutive Aktivität und eine geringe Permeabilität für divalente Kationen aufweist, zeichnet sich TRPM3 α 2 durch eine geringe konstitutive Aktivität und eine hohe Permeabilität für divalente Kationen aus [129] (siehe auch Kapitel 5). Im Gegensatz zu TRPM3 α 1, der durch Pregnenolonsulfat dosisabhängig gehemmt wird, wird TRPM3 α 2 durch Pregnenolonsulfat dosisabhängig aktiviert (siehe Kapitel 4). Bei der in diesem Kapitel durchgeführten Untersuchung des Einflusses mono-, di- und trivalenter Kationen auf die TRPM3 α 1- und TRPM3 α 2-Aktivität interessierte es insbesondere, ob regulatorische Unterschiede zwischen TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 auftreten. Bereits gezeigt werden konnte, dass sowohl die Aktivität von TRPM3 α 2 als auch die Aktivität von TRPM3 α 1 durch extrazelluläres Ca^{2+} und Mg^{2+} und intrazelluläres Mg^{2+} gehemmt wird. Die Aktivität von TRPM3 α 2 wird außerdem noch durch extrazelluläre monovalente Kationen (Na^+ , K^+) reguliert [129]. Auch interessierte es, ob sich die Regulation von TRPM3 α 2 durch mono- und divalente Kationen in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat verändert. Eine veränderte Regulation könnte auf eine durch Bindung von Pregnenolonsulfat bedingte, veränderte Konformation von TRPM3 α 2 hinweisen. Mit den Ergebnissen lassen sich desweiteren Vergleiche zu anderen TRP-Kanälen ziehen. Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Regulation von TRPM7, der TRPM3 sehr nahe steht und zahlreiche Gemeinsamkeiten (Hemmung durch intrazelluläres Mg^{2+} wie bei TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2, hohe Permeabilität für Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie weitere Spuren- und Schwermetalle wie bei TRPM3 α 2) mit diesem aufweist, sind hierbei von besonderer Bedeutung. Während Unterschiede zur Unterscheidung beider Kanäle herangezogen werden können, erlauben weitere Gemeinsamkeiten Rückschlüsse auf gemeinsame Funktionsprinzipien.

7.3 Materialien und Methoden

7.3.1 Materialien

Mit Ausnahme der extra- und intrazellulären Lösungen, die für die elektrophysiologischen Messungen eingesetzt wurden, sind die übrigen in diesem Kapitel verwendeten Materialien in Kapitel 3 Abschnitt 3.1 aufgeführt.

LÖSUNGEN FÜR DIE ELEKTROPHYSIOLOGIE

In allen Experimenten wurde als extrazelluläre Lösung die in Tabelle 7.1 aufgeführte Standardbadlösung (Lösung E1) und als intrazelluläre Lösung eine der in Tabelle 7.9 und 7.10 aufgeführten Cs⁺-haltigen Lösungen (Lösung I1-I7) verwendet.

Zur Untersuchung der Hemmung von TRPM3 α 2 durch intrazelluläres Mg²⁺ wurden der intrazellulären Cs⁺-Lösung I3 unterschiedliche Konzentrationen an Mg²⁺ zugesetzt (Tabelle 7.10). Gleichzeitig wurde in diesen Lösungen die CsCl-Konzentration entsprechend erniedrigt, um eine Osmolalität von 330 mosmol · kg⁻¹ nicht zu überschreiten. Die freie Mg²⁺-Konzentration, die mit Maxchelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc.S.htm>) berechnet wurde, betrug in Lösung I3 0 mM, in Lösung I4 1 mM, in Lösung I5 3 mM und in Lösung I6 10 mM.

Zur Untersuchung der Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläres NMDG⁺, Na⁺, K⁺, Cs⁺, Li⁺, NH₄⁺ und Cholin wurden 10 mM Ca²⁺-Lösungen, die 3-5 mM des entsprechenden monovalenten Kations enthielten (Lösung E7.2; 7.4; 7.6; 7.8; 7.10; 7.12; 7.14), und 10 mM Ca²⁺-Lösungen, die 139-145 mM des entsprechenden monovalenten Kations enthielten (Lösung E7.1; 7.3; 7.5; 7.7; 7.9; 7.11; 7.13), hergestellt (Tabelle 7.7) und in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander gemischt. Die finalen NMDG⁺-, Na⁺-, K⁺-, Cs⁺-, Li⁺-, NH₄⁺- und Cholinkonzentrationen wurden anschließend mit Hilfe des Mischungskreuzes berechnet. Zusätzlich wurde auch noch eine monovalentfreie Lösung hergestellt (Tabelle 7.3). Zur Untersuchung der Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläres Na⁺ und extrazelluläres NMDG⁺ in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat wurden die 5 mM Ca²⁺-Lösungen E5.1 und E5.2 und die 5 mM Ca²⁺-Lösungen E5.3 und E5.4 hergestellt (Tabelle 7.5) und in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Die finalen Na⁺- und NMDG⁺-Konzentrationen wurden auch hier mit Hilfe des Mischungskreuzes berechnet. Eine Reduktion der Ca²⁺-Konzentration von 10 mM auf 5 mM wurde vorgenommen, um der raschen Inaktivierung des TRPM3 α 2-Stromes in Gegenwart von Pregnenolonsulfat entgegenzuwirken. Eine divalentfreie, EGTA-/EDTA-haltige Na⁺-Lösung (Lösung E4), die anstelle der Standardbadlösung in diesen Experimenten eingesetzt werden sollte, wurde aus denselben Gründen hergestellt (Tabelle 7.4).

Zur Untersuchung der pH-Wert-Sensitivität von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 (in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat) wurden Standardbadlösungen mit pH-Werten zwischen 9,0 und 4,0 hergestellt (Tabelle 7.2). Bei den Lösungen E2.1-E2.3 wurde Tris (optimaler pH-Bereich zwischen pH 7,0 - 9,0), bei den Lösungen E2.4-E2.7 HEPES (optimaler pH-Bereich zwischen pH 6,8 - 8,2), bei den Lösungen E2.8-E2.11 MES (optimaler pH-Bereich zwischen pH 5,5 - 6,7), und bei den Lösungen E2.12-E2.14 Citrat (optimaler pH-Bereich zwischen pH 3,0 und 6,2) als Puffer verwendet. Da Citrat sowohl Ca²⁺ als auch Mg²⁺ komplexiert, mussten in den citrat-haltigen Lösungen (Lösung E2.12-E2.14) höhere Konzentrationen an Ca²⁺ und Mg²⁺ eingesetzt werden, um freie Konzentrationen von 2 mM zu erreichen. Die Berechnung der einzusetzenden Ca²⁺- und Mg²⁺-Konzentrationen erfolgte wiederum mit Maxchelator. Zur Untersuchung der pH-Wert-Sensitivität von TRPM3 α 2 (in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat) wurden 10 mM Ca²⁺-Lösungen mit pH-Werten zwischen 9,0 und 5,0 eingesetzt (Tabelle 7.6). Auch diese Lösungen enthielten in Abhängigkeit von einzustellenden pH-Wert entweder Tris, HEPES oder MES als Puffer. Um einen Effekt der unterschiedlichen Puffer auf TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 ausschließen zu können, wurden die pH 8,0-Lösungen sowohl mit Tris als auch mit HEPES und die pH 6,8-Lösungen sowohl mit HEPES als auch mit MES hergestellt (Tabelle 7.2 und 7.6).

Zur Untersuchung der Hydrolyseempfindlichkeit von Pregnenolonsulfat wurden drei Lösungen identischer Zusammensetzung in einer unterschiedlichen Art und Weise hergestellt (Tabelle 7.8). Die erste Lösung (Lösung E8) wurde zunächst mit NaOH auf pH 4,0 und die zweite Lösung (Lösung E9) auf pH 5,0 eingestellt. Anschließend wurde beiden Lösungen 35 μ M Pregnenolonsulfat zugesetzt und zwei Stunden inkubiert. Eine Veränderung des pH-Wertes nach Zusatz von Pregnenolonsulfat war nicht beobachtbar. Auch während der zweistündigen Inkubationszeit konnte keine Veränderung des pH-Wertes festgestellt werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der pH-Wert beider Lösungen mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Die dritte Lösung (Lösung E10) wurde direkt mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Anschließend wurde auch dieser Lösung 35 μ M Pregnenolonsulfat zugesetzt. Zur Gewährleistung eines stabilen pH-Wertes sowohl bei pH 4,0 bzw. pH 5,0 als auch bei pH 7,2 wurde allen drei Lösungen sowohl 5 mM Citrat als auch 5 mM HEPES als Puffer zugesetzt. Da das in den Lösungen enthaltene Citrat sowohl Ca²⁺ als auch Mg²⁺ komplexiert, lag in den Lösungen nur 0,13 mM Ca²⁺ und 0,14 mM Mg²⁺ frei vor. Die Berechnung der freien Ca²⁺- und Mg²⁺-Konzentrationen erfolgte auch hier mit Maxchelator.

Zur Untersuchung des Einflusses von Lanthanoiden und Rutheniumrot auf die Aktivität von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 wurde die Standardbadlösung E1 eingesetzt, der in Abhängigkeit von jeweiligen Experiment unterschiedliche Konzentrationen an Gd³⁺, La³⁺ oder Rutheniumrot zugesetzt wurden.

Extrazelluläre Lösungen

Tabelle 7.1: **Standard-Badlösung**

Nr	Na ⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	K ⁺ [mM]	Ca ²⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
E1	142-149	10	3	2	2	160-167	10	3-15

pH-Wert: 7,2-7,3

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321-333

Tabelle 7.2: **Standard-Badlösung pH 9,0 - 4,0**

Nr	pH	Na ⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	K ⁺ [mM]	Ca ²⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	Puffer [mM]	D-Glucose [mM]
E2.1	9,0	145	10	3	2	2	167	10	10
E2.2	8,5	145	10	3	2	2	169	10	3
E2.3	8,0	145	10	3	2	2	172	10	3
E2.4	8,0	153	10	3	2	2	166	10	3
E2.5	7,5	150	10	3	2	2	166	10	3-6
E2.6	7,0	147-148	10	3	2	2	166	10	3-9
E2.7	6,8	147	10	3	2	2	166	10	6
E2.8	6,8	153	10	3	2	2	166	10	6
E2.9	6,5	152	10	3	2	2	166	10	6
E2.10	6,0	149	10	3	2	2	166	10	6-12
E2.11	5,5	147	10	3	2	2	166	10	9-12
E2.12	5,0	158-159	10	3	3,5	3,3	172	5	-
E2.13	4,5	155-156	10	3	2,8	2,7	169	5	-
E2.14	4,0	152-153	10	3	2,3	2,2	167	5	5

pH-Wert: siehe Tabelle

(Puffer in E2.1-E2.3: Tris, E2.4-E2.7: HEPES, E2.8-2.11: MES, E2.12-2.14: Citrat)

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 320-330

Tabelle 7.3: **Monovalentfreie Lösung**

Nr	Ca ²⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
E3	2	2	3	8	10	280

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321

Tabelle 7.4: **Divalentfreie Lösung**

Nr	Na ⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EGTA [mM]	EDTA [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]	Mannit [mM]
E4	145	-	130	2	2	10	53	-

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 325

Tabelle 7.5: **5 mM Ca²⁺-Lösungen**

Nr	Ca ²⁺ [mM]	Na ⁺ [mM]	NMDG ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]
E5.1	5	148,6	-	155	10	30
E5.2	5	3,5	-	10	10	285
E5.3	5	-	145	143	10	55
E5.4	5	-	3,4	10	10	310

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 328-330

Tabelle 7.6: **10 mM Ca²⁺-Lösungen pH 9,0 - 5,0**

Nr	pH	Ca ²⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	Cholin [mM]	Tris [mM]	HEPES [mM]	MES [mM]	Mannit [mM]
E6.1	9,0	10	21	-	10	-	-	265
E6.2	8,5	10	23	-	10	-	-	265
E6.3	8,0	10	25	-	10	-	-	265
E6.4	8,0	10	20	9	-	10	-	260
E6.5	7,5	10	20	6	-	10	-	265
E6.6	7,0	10	20	3	-	10	-	265
E6.7	6,8	10	20	2	-	10	-	265
E6.8	6,8	10	20	8	-	-	10	265
E6.9	6,5	10	20	7	-	-	10	265
E6.10	6,0	10	20	4	-	-	10	268
E6.11	5,5	10	20	2	-	-	10	268

pH-Wert: siehe Tabelle

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321-329

Tabelle 7.7: **10 mM Ca²⁺-Lösungen**

Nr	Ion	Ca ²⁺ [mM]	Cs ⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	X [mM]	HEPES [mM]	Mannit [mM]	D-Glucose [mM]
E7.1	NMDG ⁺	10	-	164-158	140	10	-	10-22
E7.2	NMDG ⁺	10	-	20	3-4	10	265-267	-
E7.3	Na ⁺	10	-	160	144	10	-	17
E7.4	Na ⁺	10	-	20	3-4	10	270-271	-
E7.5	K ⁺	10	10	165	139	10	-	10
E7.6	K ⁺	10	10	30	4	10	250	-
E7.7	Cs ⁺	10	-	160	143	10	-	30
E7.8	Cs ⁺	10	-	20	4	10	250-265	-
E5.9	Li ⁺	10	-	160	144	10	-	20
E7.10	Li ⁺	10	-	20	3	10	265	-
E7.11	NH ₄ ⁺	10	-	160	145	10	-	23
E7.12	NH ₄ ⁺	10	-	20	5	10	265	-
E7.13	Cholin	10	-	160	143	10	-	26
E7.14	Cholin	10	-	20	4	10	265	-

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 321-330

Tabelle 7.8: **Inkubationslösungen**

Nr	Na ⁺	Cs ⁺ [mM]	K ⁺ [mM]	Ca ²⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	Cl ⁻ [mM]	HEPES [mM]	Citrat [mM]	D-Glucose [mM]
E8-10	162	10	3	1	1	162	5	5	10

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 327-329

Intrazelluläre Lösungen

Tabelle 7.9: **Intrazelluläre Lösungen mit EGTA**

Nr	Cs ⁺ [mM]	Asp ⁻ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EDTA [mM]	EGTA [mM]	ATP [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
I1	165-173	100	45-46	-	10	-	10	0-3
I2	168	90	45	5	5	4 (Na)	10	3

pH-Wert: 7,2

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 304-309

Tabelle 7.10: Intrazelluläre Lösungen mit BAPTA

Nr	Cs ⁺ [mM]	Mg ²⁺ [mM]	Asp ⁻ [mM]	Cl ⁻ [mM]	EDTA [mM]	BAPTA [mM]	ATP [mM]	HEPES [mM]	D-Glucose [mM]
I3	187-189	-	80	45	5	10	4 (Na)	10	-
I4	185	9,9	80	50	5	10	4 (Na)	10	10
I5	181	12,7	80	51	5	10	4 (Na)	10	8
I6	169	21,2	80	55	5	10	4 (Na)	10	10
I7	189-192	-	80	45	5	10	4 (Tris)	10	-

pH-Wert: 7,2-7,3

Osmolalität [mosmol · kg⁻¹]: 303-312

Stocklösungen

Pregnenolonsulfat wurde in Wasser (Stocklösung: 3,5 mM) gelöst. Die Ionenkonzentrationen in den 7 μ M-, 10,5 μ M und 35 μ M Pregnenolonsulfat-haltigen Lösungen lagen aufgrunddessen um 0,2%, 0,3% und 1% niedriger als angegeben.

7.3.2 Methoden

Die nachfolgend gezeigten tight-seal, whole-cell Patch-clamp-Messungen wurden, wie in Kapitel 3 Abschnitt 3.2 beschrieben, durchgeführt.

EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

Hemmung durch intrazelluläres Magnesium

Zur Untersuchung der Hemmung von TRPM3 α 2 durch intrazelluläres Mg²⁺ in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat wurden als intrazelluläre Lösungen abwechselnd die Lösungen I3, I4, I5 und I6, die unterschiedliche Konzentrationen an freiem Mg²⁺ enthielten, eingesetzt. Da bei verlängerter, extrazellulärer Applikation einer 35 μ M Pregnenolonsulfat-enthaltenden Standardbadlösung eine Inaktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes zu beobachten war, wurde deren Applikation auf 10 Sekunden begrenzt. Die Applikation erfolgte 135 Sekunden nach Übergang in die whole-cell-Konfiguration. Bei einem durchschnittlichen Serienwiderstand von $7,6 \pm 0,4$ M Ω sollte sich innerhalb dieses Zeitraumes die intrazelluläre Lösung zu über 63,2% mit dem Zytosol der Zelle ausgetauscht haben und eine mögliche Hemmung beobachtbar sein [148]. Für diese Abschätzung wurde der von Postma et al. angegebene Diffusionskoeffizient für Mg²⁺ herangezogen [144], aus dem die Mg²⁺-Diffusionsrate mit Hilfe der von Pusch und Neher

veröffentlichten Daten abgeschätzt wurde [148].

Hemmung durch extrazelluläre monovalente Kationen

Zur Untersuchung der Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläre, monovalente Kationen in Ab- und Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat wurde die monovalentfreie Lösung E3 mit und ohne Zusatz von 10,5 μ M Pregnenolonsulfat eingesetzt. Die Applikation erfolgte für jeweils 10 Sekunden. Als intrazelluläre Lösung wurde eine divalentfreie, Cs⁺-haltige Lösung (Lösung I7) verwendet.

Zur Untersuchung der Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläres Na⁺, NMDG⁺, Cs⁺, Li⁺, K⁺, NH₄⁺ und Cholin in Abwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat wurden die 10 mM Ca²⁺-Lösungen E7.1-E7.14 und die daraus hergestellten Lösungen eingesetzt. Die Applikation der Lösungen erfolgte für jeweils 10 Sekunden. Als intrazelluläre Lösung wurde eine divalentfreie, Cs⁺-haltige Lösung (Lösung I1) verwendet.

Zur Untersuchung der Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläres Na⁺ und NMDG⁺ in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat wurden die 5 mM Ca²⁺-Lösungen E5.1-E5.4 und die daraus hergestellten Lösungen eingesetzt. Den Lösungen wurden zusätzlich noch 7 μ M Pregnenolonsulfat zugesetzt. Anstelle einer 7 μ M Pregnenolonsulfat-enthaltenden Standardbadlösung wurde in diesem Experiment eine 7 μ M Pregnenolonsulfat-enthaltende, divalentfreie Na⁺-Lösung (Lösung E4) verwendet, um eine Inaktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes weitestgehend zu verhindern. Die Applikation der Lösungen erfolgte nach maximaler Aktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes für jeweils 7-10 Sekunden. Die Stromgrößen des TRPM3 α 2-Stromes, die bei Applikation der Lösung E7.2 und E7.4 in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat bzw. der Lösung E5.1 bzw. E5.3 in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat erzielt wurden, dienten bei der nachfolgenden Auswertung der Experimente als Bezugswerte. Durch die auf die Lösung E7.2 bzw. E7.4 in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat bzw. die Lösung E5.1 bzw. E5.3 in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat bezogenen Werte wurden anschließend mit GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA) Hill-Funktionen gefittet, wobei im ersten Fall die Minima konstant bei 0 und die Maxima konstant bei 1 und in zweiten Fall nur die Minima konstant bei 0 gehalten wurden. Zur besseren Übersicht wurden die auf die Lösung E5.1 und E5.3 bezogenen Werte noch auf die aus den Fits erhaltenen Maxima normalisiert. Als intrazelluläre Lösung wurde eine divalentfreie, Cs⁺-haltige Lösung (Lösung I2) eingesetzt.

Hemmung durch extrazelluläre Protonen

Zur Untersuchung der pH-Sensitivität von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 kamen Standardbadlösungen (Lösung E2.1-E2.11), die pH-Werte zwischen pH 9,0 und 4,0 aufwiesen, zum

Einsatz. Im Falle von TRPM3 α 2 wurden den Standardbadlösungen noch Pregnenolonsulfat in einer Konzentration von 35 μ M zugesetzt. Die Applikation der Lösungen erfolgte bei TRPM3 α 1 nach maximaler Aktivierung des TRPM3 α 1-Stromes und bei TRPM3 α 2 nach maximaler Aktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Stromes für jeweils 10 Sekunden. Die unmittelbar vor Applikation der Standardbadlösungen ermittelte Stromgröße des TRPM3 α 1-Stromes bei pH 7,2 und der Mittelwert der unmittelbar vor und nach Applikation der Standardbadlösungen ermittelten Stromgrößen des TRPM3 α 2-Stromes bei pH 7,2 dienten bei der nachfolgenden Auswertung der Experimente als Bezugswerte. Durch die so erhaltenen Werte wurden anschließend mit GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA) Hill-Funktionen gefittet, wobei die Minima konstant bei Null gehalten wurden.

Zur Untersuchung der pH-Sensitivität von TRPM3 α 2 in Abwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat wurden 10 mM Ca²⁺-Lösungen (Lösung E6.1-E6.11), die pH-Werte zwischen pH 9,0 und 5,5 aufwiesen, eingesetzt. Die Applikation der Lösungen erfolgte auch hier für jeweils 10 Sekunden. Die Stromgröße des TRPM3 α 2-Stromes bei pH 9,0 diente bei der nachfolgenden Auswertung des Experiments als Bezugswert. Durch die so erhaltenen Werte wurde anschließend auch hier mit GraphPad Prism eine Hill-Funktion gefittet, wobei das Minimum wiederum konstant bei Null gehalten wurde.

Um einen Effekt der in den Lösungen eingesetzten unterschiedlichen Puffer auf TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 ausschließen zu können, wurde eine mit Tris-eingestellte und eine mit HEPES-eingestellte Standardbadlösung pH 8,0 (Lösung E2.3, Lösung E2.4) bzw. 10 mM Ca²⁺-Lösung pH 8,0 (Lösung E8.3, Lösung E8.4) sowie eine mit HEPES-eingestellte und eine mit MES-eingestellte Standardbadlösung pH 6,8 (Lösung E2.7, Lösung E2.8) bzw. 10 mM Ca²⁺-Lösung pH 6,8 (Lösung E6.7, Lösung E6.8) an denselben Zellen vermessen. Als intrazelluläre Lösung wurden in diesen Experimenten eine divalentfreie, Cs⁺-haltige Lösung (TRPM3 α 1: Lösung I1, TRPM3 α 2: Lösung I2 in Abwesenheit und Lösung I7 in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat) eingesetzt.

Zur Untersuchung des pH-Wert-Einflusses auf Pregnenolonsulfat wurden drei Lösungen, die auf unterschiedliche Art und Weise hergestellt wurden, aber eine identische Zusammensetzung aufwiesen (Lösung E8-E10), eingesetzt. Eine genaue Beschreibung der Herstellung dieser drei Lösungen findet sich unter Abschnitt 7.3.1. Sie wurden nacheinander für jeweils 10 Sekunden appliziert. Als intrazelluläre Lösung wurde in diesem Experiment eine divalentfreie, Cs⁺-haltige Lösung (Lösung I7) eingesetzt.

Hemmung durch extrazelluläre Lanthanoide und Rutheniumrot

Zur Untersuchung der Hemmung von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 durch extrazelluläre Lanthanoide und Rutheniumrot wurden der Standardbadlösung (Lösung E1) unterschiedliche

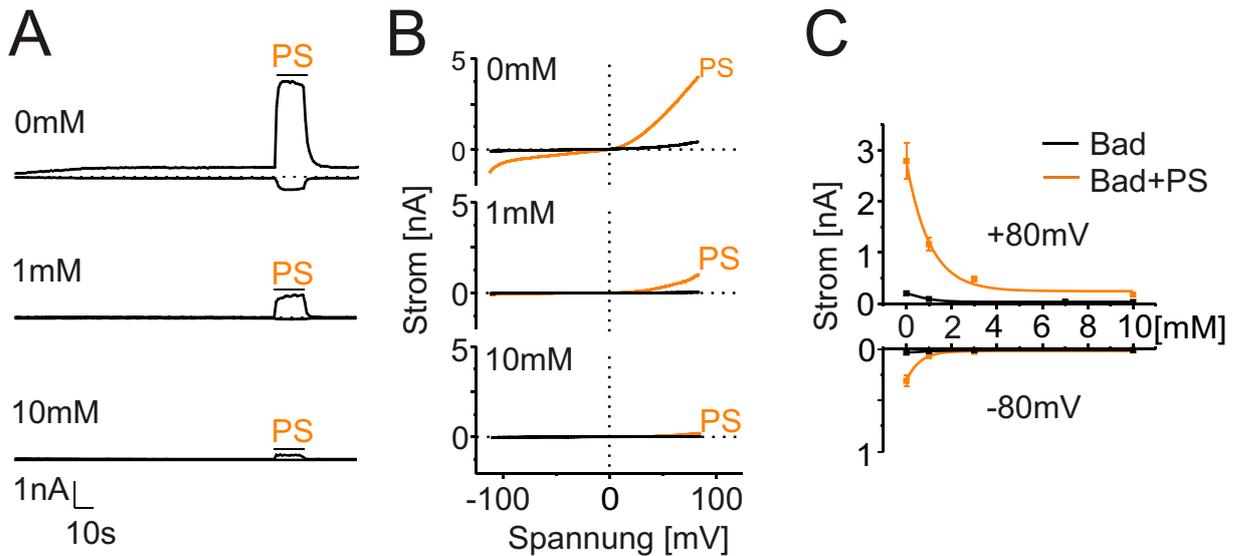


Abb. 7.1: **Hemmung von TRPM3α2 durch intrazelluläres Magnesium** (A) Ströme von jeweils einer TRPM3α2 exprimierenden HEK293-Zellen bei Membranpotentialen von -80 und +80 mV unter Verwendung von intrazellulären Lösungen mit freien Mg²⁺-Konzentrationen von 0, 1 und 10 mM. Nach 135 Sekunden wurde für 10 Sekunden 35 μM Pregnenolonsulfat (PS) extrazellulär appliziert. (B) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der extrazellulären Applikation von 35 μM PS (C). Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) (n ≥ 11). Die durch die Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: +PS: IC₅₀ = 0,34 mM, h = 1,3 bei -80 mV; IC₅₀ = 0,72 mM, h = 1,2 bei +80 mV; -PS: IC₅₀ = 0,98 mM, h = 2,2 bei -80 mV; IC₅₀ = 0,62 mM, h = 1,0 bei +80 mV.

Konzentrationen an Gd³⁺, La³⁺ und Rutheniumrot zugesetzt. Im Falle von TRPM3α2 wurde den Gd³⁺-, La³⁺- und Rutheniumrot-haltigen Standardbadlösungen zusätzlich noch 35 μM Pregnenolonsulfat zugegeben. Die Applikation der Lösungen erfolgte bei TRPM3α1 nach maximaler Aktivierung des TRPM3α1-Stromes und bei TRPM3α2 nach maximaler Aktivierung des Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3α2-Stromes für jeweils 10-20 Sekunden. Die Mittelwerte der unmittelbar vor und nach Applikation der Gd³⁺-, La³⁺- und Rutheniumrot-haltigen Standardbadlösungen ermittelten Stromgrößen des TRPM3α1- und TRPM3α2-Stromes dienten bei der nachfolgenden Auswertung der Experimente als Bezugswerte. Durch die so erhaltenen Werte wurden anschließend mit GraphPad Prism Hill-Funktionen gefittet, wobei die Minima konstant bei 0 und die Maxima konstant bei 1 gehalten wurden. Als intrazelluläre Lösung wurde eine divalentfreie, Cs⁺-haltige Lösung (TRPM3α1: Lösung I1, TRPM3α2: Lösung I3) eingesetzt.

7.4 Ergebnisse

Hemmung durch intrazelluläres Magnesium

Sowohl die TRPM3α1- als auch die TRPM3α2-Spleißvariante werden beinahe vollständig

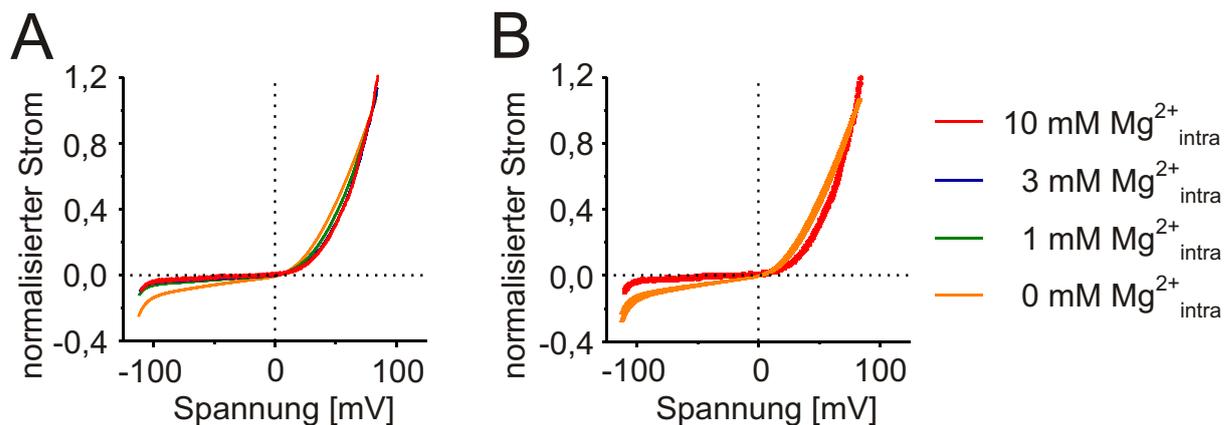


Abb. 7.2: **Spannungsabhängigkeit der intrazellulären Mg^{2+} -Hemmung** (A) Überlagerung der normalisierten und gemittelten Strom-Spannungsbeziehungen von Zellen, die mit einer 10 mM ($n = 11$), 3 mM ($n = 11$), 1 mM ($n = 12$) und 0 mM ($n = 13$) Mg^{2+} -haltigen Pipettenlösung infundiert wurden. Zur Normalisierung der Strom-Spannungsbeziehungen wurden für jede Zelle zunächst die Potentialwerte um das in Abhängigkeit von der verwendeten Pipettenlösung berechnete Liquid junction potential (10 mM: 13,6 mV; 3 mM: 14,6 mV; 1 mM: 14,9 mV und 0 mM: 15,5 mV) korrigiert und anschließend die gemessenen Stromwerte auf den Stromwert bei +80 mV normalisiert. (B) Normalisierte und gemittelte Strom-Spannungsbeziehungen (0 mM, 10 mM) inklusive Standardfehler des Mittelwertes.

durch intrazelluläres Mg^{2+} in Konzentrationen von 9 mM gehemmt [129]. Eine Bestimmung des IC_{50} -Wertes fehlte aber bisher. Ebenso war unklar, ob intrazelluläres Mg^{2+} auch den Pregnenolonsulfat-induzierten TRPM3 α 2-Strom hemmt. Im folgenden wurde mit Hilfe von intrazellulären Lösungen, die unterschiedliche Konzentrationen an Mg^{2+} enthielten, die intrazelluläre Mg^{2+} -Hemmung von TRPM3 α 2 in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat untersucht. Mit zunehmender intrazellulärer Mg^{2+} -Konzentration konnte hierbei eine zunehmende Hemmung des TRPM3 α 2-Stromes beobachtet werden (Abbildung 7.1A-C). Auch eine Abnahme der in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat beobachtbaren geringen konstitutiven Aktivität von TRPM3 α 2 war in Übereinstimmung mit der Literatur im Verlauf des Experimentes feststellbar (Abbildung 7.1A-C). Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen für den Einwärtsstrom bei 0,34 mM in Anwesenheit und 0,98 mM in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat und für den Auswärtsstrom bei 0,72 mM in Anwesenheit und 0,62 mM in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat. Obwohl die Stromgrößen bei intrazellulären Mg^{2+} -Konzentrationen von 1 mM, 3 mM und 10 mM in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat stark variierten, waren im Verlauf der Strom-Spannungsbeziehungen keine bzw. nur geringfügige Unterschiede erkennbar. Unterschiede im Verlauf der Strom-Spannungsbeziehungen zeigten sich jedoch in Abwesenheit von intrazellulärem Mg^{2+} . Da diese Unterschiede nicht auf experimentelle Unzulänglichkeiten wie beispielsweise zu hohe effektive Serienfehler zurückzuführen sind, deuten sie vielmehr auf eine Spannungsab-

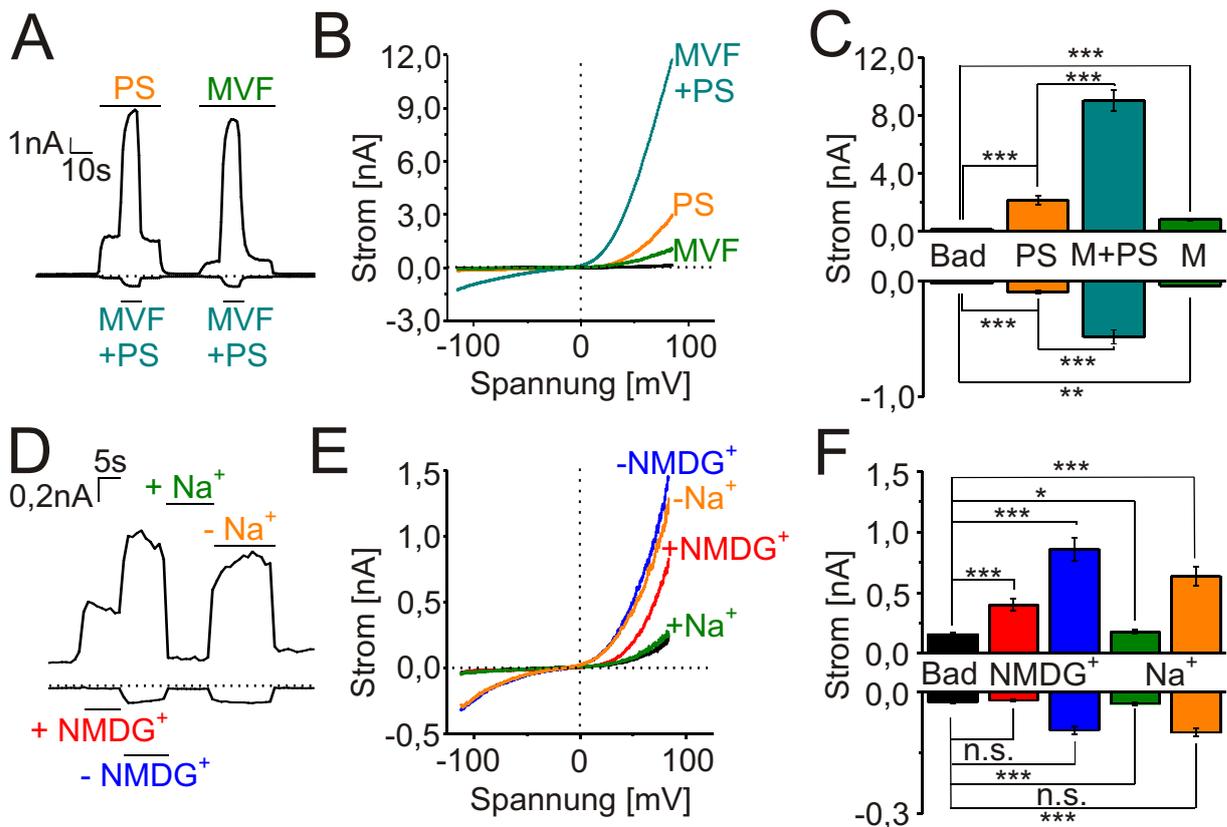


Abb. 7.3: **Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläre, monovalente Kationen** (A) Strom bei -80 und +80 mV während Applikation einer monovalentfreien, extrazellulären Lösung (MVF) mit und ohne Zusatz von 10,5 μ M Pregnenolonsulfat (PS). (B) Strom-Spannungsbeziehung vor und während der Applikation der monovalentfreien Lösung mit und ohne Zusatz von Pregnenolonsulfat. (C) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) bei -80 und +80 mV ($n = 7$). Ermittlung der Signifikanzen unter Verwendung eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests nach Student. (D) Strom bei -80 und +80 mV während Applikation einer 140 mM NMDG⁺- (+ NMDG⁺), 3,5 mM NMDG⁺- (-NMDG⁺), 140 mM Na⁺- (+ Na⁺) und 3,4 mM Na⁺- (-Na⁺) enthaltenden 10 mM Ca²⁺-Lösung. (E) Strom-Spannungsbeziehungen vor und während der Applikation der NMDG⁺- und Na⁺-haltigen 10 mM Ca²⁺-Lösungen. (F) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (D) ($n = 8$). Ermittlung der Signifikanzen unter Verwendung eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests nach Student.

hängigkeit der Mg²⁺-Hemmung hin. Diese Spannungsabhängigkeit könnte möglicherweise auf eine direkte Interaktion des Mg²⁺ mit der TRPM3 α 2-Pore hinweisen. TRPM7, der TRPM3 innerhalb der TRP-Proteinfamilie sehr nahe steht und ebenfalls durch intrazelluläres Mg²⁺ gehemmt wird, zeigt im Gegensatz zu TRPM3 keine solche Spannungsabhängigkeit [87].

Hemmung durch extrazelluläre, monovalente Kationen

Sowohl die Aktivität der TRPM3 α 1-Spleißvariante als auch die Aktivität der TRPM3 α 2-

Spleißvariante werden neben intrazellulärem Mg^{2+} auch noch durch extrazelluläre Kationen reguliert. Während die TRPM3 α 1-Spleißvariante ausschließlich eine Sensitivität gegenüber divalenten Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) zeigt, weist die TRPM3 α 2-Spleißvariante sowohl eine Sensitivität gegenüber divalenten (Ca^{2+} , Mg^{2+}) als auch monovalenten Kationen (Na^+ , K^+) auf [129]. Die Daten in Abbildung 7.3A-C zeigen, dass extrazelluläre, monovalente Kationen nicht nur in Ab-, sondern auch in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat einen hemmenden Effekt auf den durch TRPM3 α 2 fließenden Ein- und Auswärtsstrom ausüben. Nach Entfernung der monovalenten Kationen aus der extrazellulären Lösung wurde sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat eine signifikante Erhöhung des TRPM3 α 2 Ein- und Auswärtsstromes beobachtet. Auch zeigte sich in diesem Experiment nochmals, dass TRPM3 α 2 eine hohe Permeabilität für divalente Kationen besitzt, da diese nach Entfernung der monovalenten Kationen die einzigen Ladungsträger in der Lösung waren.

Im folgenden wurde nun zunächst die Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläres Na^+ näher untersucht, da dieses das wichtigste und häufigste Kation des Extrazellularraumes darstellt. Abbildung 7.3D zeigt, dass extrazelluläres Na^+ in physiologischen Konzentrationen eine stark hemmende Wirkung auf TRPM3 α 2 ausübt. In Gegenwart einer 10 mM Ca^{2+} -Lösung, die zusätzlich noch 140 mM Na^+ enthielt, wurden nur signifikante TRPM3 α 2 Auswärtsströme, nicht jedoch signifikante TRPM3 α 2 Einwärtsströme beobachtet. Erst nach Reduktion der extrazellulären Na^+ -Konzentration von 140 auf 3,4 mM, waren auch signifikante TRPM3 α 2 Einwärtsströme messbar. In Gegenwart einer 10 mM Ca^{2+} -Lösung, die anstelle von 140 mM Na^+ 140 mM NMDG $^+$ enthielt, konnten ebenfalls keine signifikanten TRPM3 α 2-Einwärtsströme beobachtet werden (Abbildung 7.3D). Sehr wohl waren hier aber auch signifikante Auswärtsströme beobachtbar. Die Reduktion der extrazellulären NMDG $^+$ -Konzentration von 140 auf 3,5 mM NMDG $^+$ führte auch hier zu signifikanten TRPM3 α 2-Einwärtsströmen. Auch extrazelluläres NMDG $^+$ übt somit eine hemmende Wirkung auf TRPM3 α 2 aus. Im Gegensatz zu extrazellulärem Na^+ hemmt extrazelluläres NMDG $^+$ allerdings den TRPM3 α 2-Auswärtsstrom in einem geringeren Maße (Abbildung 7.3F). Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der extrazellulären Na^+ - und NMDG $^+$ -Hemmung wurden Dosiswirkungskurven mit 10 mM Ca^{2+} -Lösungen, die unterschiedliche Konzentrationen an Na^+ bzw. an NMDG $^+$ enthielten, aufgenommen. Mit zunehmender Konzentration an extrazellulärem Na^+ bzw. an extrazellulärem NMDG $^+$ wurde hierbei eine zunehmende Hemmung der TRPM3 α 2 Ein- und Auswärtsströme beobachtet (Abbildung 7.4A und C). Während in Gegenwart von extrazellulärem Na^+ die TRPM3 α 2-Einwärtsströme in nahezu gleichem Maße gehemmt wurden wie die TRPM3 α 2-Auswärtsströme, wurden in Gegenwart von extrazellulärem NMDG $^+$ die TRPM3 α 2-Einwärtsströme deutlich stärker gehemmt als die TRPM3 α 2-Auswärtsströme.

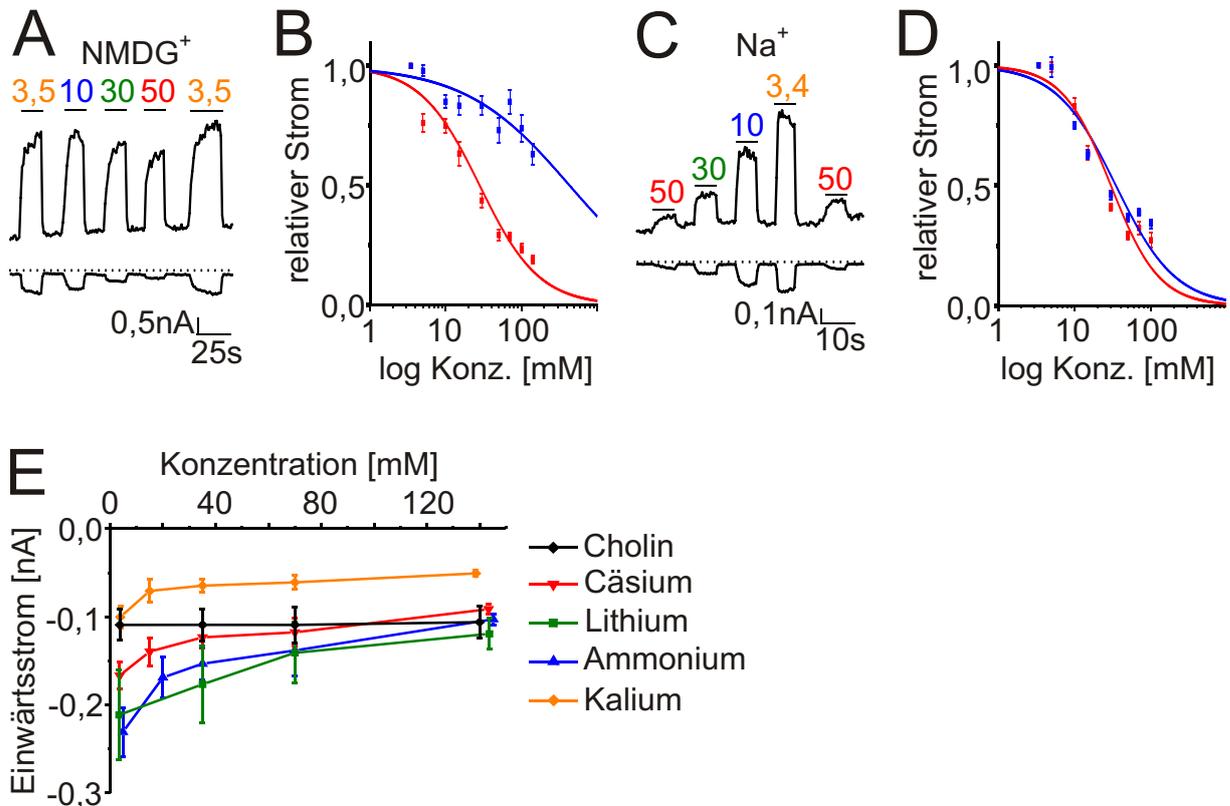


Abb. 7.4: **Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläre, monovalente Kationen in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat** (A,C) Strom bei -80 und $+80$ mV während Applikation von 10 mM Ca^{2+} -Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an NMDG $^{+}$ (A) und an Na^{+} (C); Konzentrationsangaben in mM. (B,D) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) und (C) normalisiert auf die Antwort bei Applikation der 10 mM Ca^{2+} -Lösungen mit $3,5$ mM NMDG $^{+}$ bzw. $3,4$ mM Na^{+} . Die durch die normalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: NMDG $^{+}$: $\text{IC}_{50} = 28$ mM, $h = 1,1$ bei -80 mV; $\text{IC}_{50} = 432$ mM, $h = 0,6$ bei $+80$ mV ($n \geq 7$) (B); Na^{+} : $\text{IC}_{50} = 30$ mM, $h = 1,4$ bei -80 mV; $\text{IC}_{50} = 35$ mM, $h = 1,1$ bei $+80$ mV ($n \geq 6$) (D). (E) Statistische Auswertung der Stromantworten bei -80 mV während der Applikation von 10 mM Ca^{2+} -Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cs^{+} , Li^{+} , K^{+} , NH_4^{+} und Cholin ($n \geq 5$).

Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen für Na^{+} bei 30 mM (-80 mV) und 35 mM ($+80$ mV) und für NMDG $^{+}$ bei 28 mM (-80 mV) und 432 mM ($+80$ mV) (Abbildung 7.4B und D). Die Hemmung durch Na^{+} zeigte somit eine schwache und die Hemmung durch NMDG $^{+}$ eine starke Spannungsabhängigkeit. Mit Ausnahme von Cholin führten auch andere extrazelluläre, monovalente Kationen (Cs^{+} , Li^{+} , K^{+} , NH_4^{+}) in höheren Konzentrationen zu einer Hemmung der TRPM3 α 2 Ein- und Auswärtsströme (Abbildung 7.4E).

Auch in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat war mit zunehmender Konzentration an extrazellulärem Na^{+} bzw. an extrazellulärem NMDG $^{+}$ eine Hemmung der

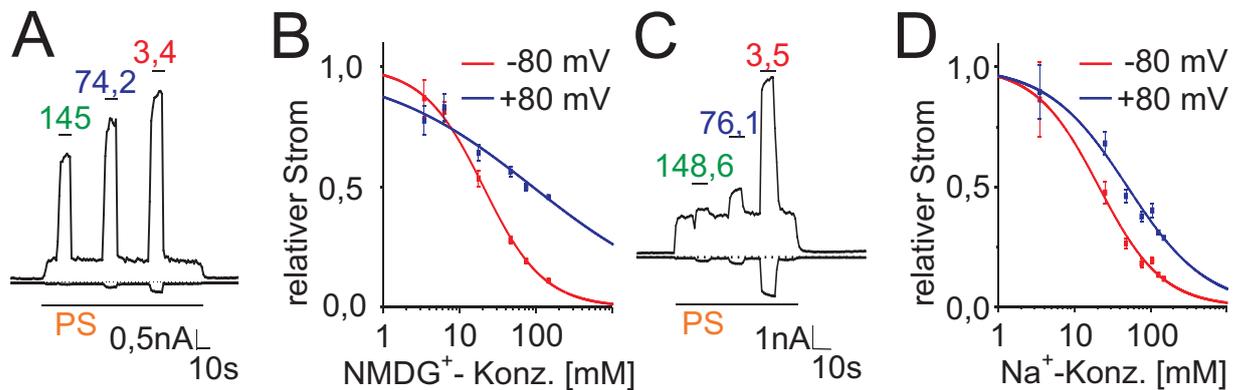


Abb. 7.5: **Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläre, monovalente Kationen in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat** (A,C) Strom bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von 5 mM Ca^{2+} -Lösungen mit unterschiedlichen millimolaren Konzentrationen an NMDG^+ (A) und Na^+ (C) in Anwesenheit von $7 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS). (B,D) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) und (C) normalisiert auf die Antwort der 5 mM Ca^{2+} -Lösung mit 145 mM NMDG^+ bzw. $148,6$ mM Na^+ . Die durch die renormalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: NMDG^+ : $\text{IC}_{50} = 20$ mM, $h = 1,1$ bei -80 mV; $\text{IC}_{50} = 91$ mM, $h = 0,4$ bei $+80$ mV ($n \geq 8$); Na^+ : $\text{IC}_{50} = 21$ mM, $h = 1,0$ bei -80 mV; $\text{IC}_{50} = 50$ mM, $h = 0,8$ bei $+80$ mV ($n \geq 7$). Abbildung C und D wurden bereits in Kapitel 6 Abbildung 6.9 gezeigt.

TRPM3 α 2 Ein- und Auswärtsströme beobachtbar (Abbildung 7.5A und C). Die schwache Spannungsabhängigkeit der Na^+ -Hemmung und die starke Spannungsabhängigkeit der NMDG^+ -Hemmung, die in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat beobachtet wurden, zeigten sich auch hier. Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen für Na^+ bei 21 mM (-80 mV) und 50 mM ($+80$ mV) und für NMDG^+ bei 20 mM (-80 mV) und 91 mM ($+80$ mV) (Abbildung 7.5B und D).

Hemmung durch extrazelluläre Protonen

Bei der Untersuchung des pH-Einflusses auf die TRPM3 α 1- und TRPM3 α 2-Spleißvariante waren zum einen mögliche Unterschiede in der pH-Wert-Sensitivität beider Spleißvarianten und zum anderen mögliche Unterschiede in der pH-Sensitivität der TRPM3 α 2-Spleißvariante in Anwesenheit und in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat von besonderem Interesse, da solche Unterschiede auf eine veränderte Lage protonierbarer Aminosäuren und damit auf eine veränderte Konformation des Ionenkanals bzw. der Ionenkanaluntereinheiten hindeuten.

Ausgehend von einem pH-Wert von $7,2$ konnte bei Applikation von Standardbadlösungen höheren pH-Werts (pH $7,5 - 9,0$) eine Zunahme und bei Applikation von Standardbadlösungen niedrigeren pH-Werts (pH $7,0 - 4,0$) eine Abnahme des TRPM3 α 1-Stromes beobachtet werden.

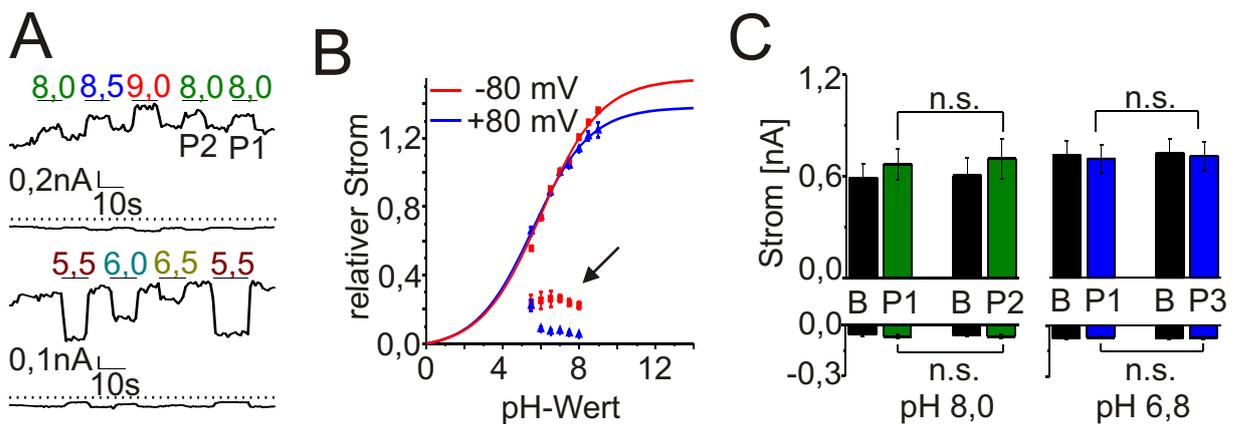


Abb. 7.6: **Hemmung von TRPM3 α 1 durch extrazelluläre Protonen** (A) Ströme bei -80 und $+80$ mV während der Applikation von Standardbadlösungen unterschiedlichen pH-Werts. (B) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) normalisiert auf die Antwort der Standardbadlösung bei pH 7,2. Die durch die normalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: -80 mV: $pH_{50} = 6,1 \pm 0,2$, $h = 0,3$, $max = 1,5$; $+80$ mV: $pH_{50} = 5,7 \pm 0,1$, $h = 0,3$, $max = 1,4$ ($n \geq 6$). Ebenfalls gezeigt sind die Stromantworten der entsprechenden Kontrollzellen (schwarzer Pfeil). (C) Vergleich der Stromantworten bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer mit HEPES (P1) und einer mit Tris (P2) eingestellten Standardbadlösung pH 8,0 sowie einer mit HEPES (P1) und einer mit MES (P3) eingestellten Standardbadlösung pH 6,8 ($n \geq 6$). Ermittlung der Signifikanzen unter Verwendung eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests nach Student.

bachtet werden (Abbildung 7.6A). Bei Applikation von Standardbadlösungen mit pH-Werten kleiner pH 5,0 kam es neben einer transienten Aktivierung endogener in HEK293-Zellen vorkommender ASIC-Ströme [61] auch noch zu einer verstärkten Aktivierung der endogenen PAORAC- und MIC-Ströme [92, 122]. Die Aktivierung dieser endogenen Ströme überlagerte zum Teil die Hemmung des TRPM3 α 1-Stromes, sodass eine Auswertung bei diesen pH-Werten nicht möglich war. Die in den Standardbadlösungen zur Einstellung des pH-Wertes eingesetzten Puffer (pH 9,0 - 8,0: Tris, pH 8,0 - 6,8: HEPES, pH 6,8 - 5,5: MES) übten keinen Einfluss auf TRPM3 α 1 aus, da keine Unterschiede in der Stromgröße von TRPM3 α 1 zwischen der mit Tris-eingestellten Standardbadlösung pH 8,0 und der mit HEPES-eingestellten Standardbadlösung pH 8,0 sowie der mit HEPES-eingestellten Standardbadlösung pH 6,8 und der mit MES-eingestellten Standardbadlösung pH 6,8 festgestellt wurden (Abbildung 7.6C). Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen bei pH $6,1 \pm 0,2$ für den Einwärtsstrom und bei pH $5,7 \pm 0,1$ für den Auswärtsstrom. Die Hillkoeffizienten waren deutlich kleiner als eins ($h = 0,3$ bei -80 und $+80$ mV) (Abbildung 7.6B).

Zur Untersuchung der pH-Wert-Sensitivität der TRPM3 α 2-Spleißvariante wurden als extrazelluläre Lösungen 10 mM Ca^{2+} -Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten ein-

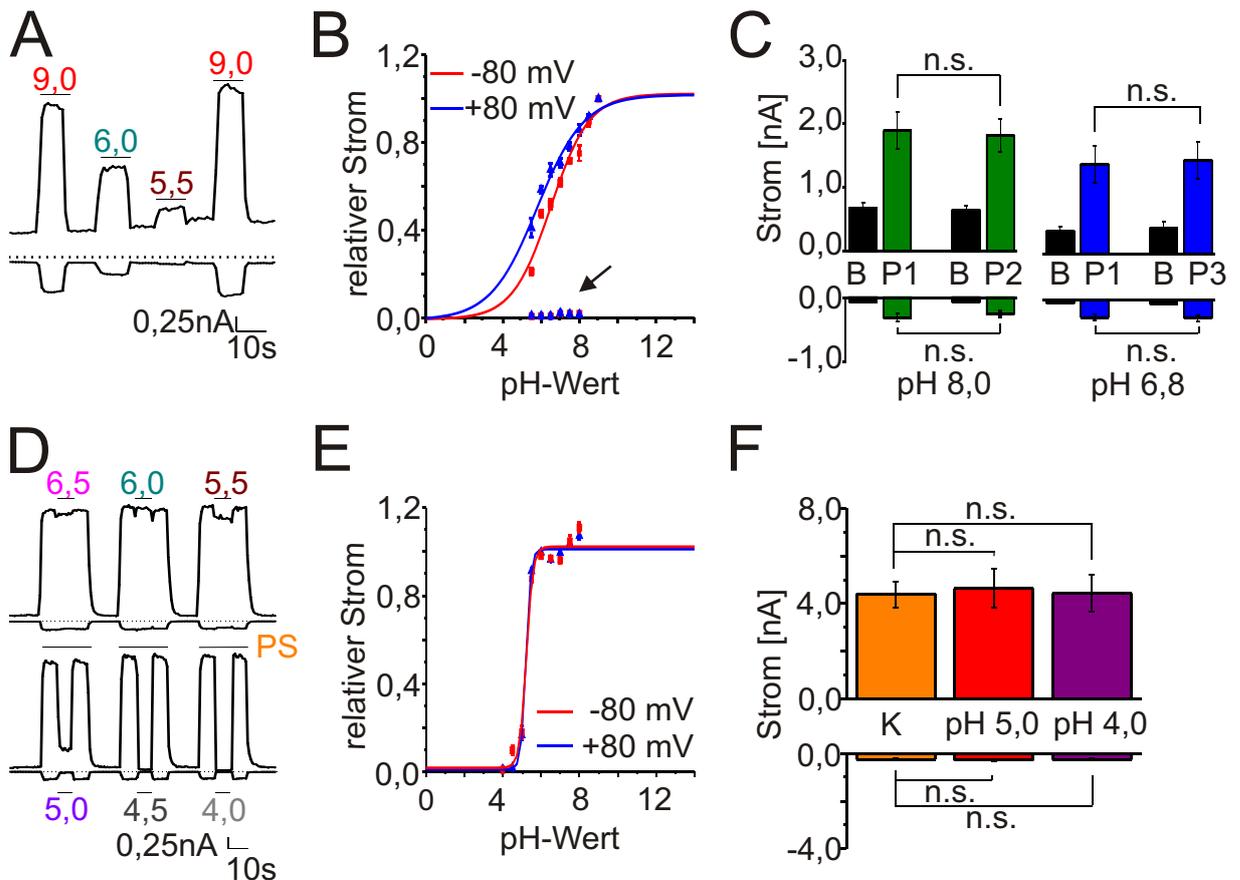


Abb. 7.7: **Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläre Protonen** (A) Strom bei -80 und $+80$ mV während Applikation von 10 mM Ca^{2+} -Lösungen unterschiedlichen pH-Werts. (B) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (A) normalisiert auf die Antwort der 10 mM Ca^{2+} -Lösung pH $9,0$. Die durch die normalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: -80 mV: $\text{pH}_{50} = 6,8 \pm 0,5$, $h = 0,4$, $\text{max} = 1,1$; $+80$ mV: $\text{pH}_{50} = 5,8 \pm 0,2$, $h = 0,4$, $\text{max} = 1,0$ ($n \geq 5$). Ebenfalls gezeigt sind die Stromantworten der entsprechenden Kontrollzellen (schwarzer Pfeil). (C) Vergleich der Stromantworten bei -80 und $+80$ mV während der Applikation einer mit HEPES (P1) und Tris (P2) eingestellten 10 mM Ca^{2+} -Lösung pH $8,0$ sowie einer mit HEPES (P1) und MES (P3) eingestellten 10 mM Ca^{2+} -Lösung pH $6,8$ ($n \geq 5$). (D) Ströme bei -80 und $+80$ mV während Applikation von Standardbadlösungen unterschiedlichen pH-Werts in Anwesenheit von $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS). (E) Statistische Auswertung der Stromantworten aus (D) normalisiert auf die Antwort der Standardbadlösung pH $7,2$ in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat. Die durch die normalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: -80 mV: $\text{pH}_{50} = 5,2 \pm 0,05$, $h = 2,8$, $\text{max} = 1,0$; $+80$ mV: $\text{pH}_{50} = 5,2 \pm 0,03$, $h = 3,3$, $\text{max} = 1,0$ ($n \geq 6$). (F) Statistische Auswertung des Inkubationsversuches ($n \geq 7$), siehe Text für Details. Ermittlung der Signifikanzen in (C) und (F) unter Verwendung eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests nach Student.

gesetzt. Auch hier konnte mit abnehmendem pH-Wert eine Abnahme des TRPM3 α 2-Stromes beobachtet werden (Abbildung 7.7A). Auf die Vermessung von 10 mM Ca^{2+} -

Lösungen mit pH-Werten kleiner pH 5,0 wurde aufgrund der oben beschriebenen Probleme verzichtet. Die in den 10 mM Ca^{2+} -Lösungen zur Einstellung des pH-Wertes eingesetzten Puffer (pH 9,0 - 8,0: Tris, pH 8,0 - 6,8: HEPES, pH 6,8 - 5,5: MES) übten wie auch schon bei TRPM3 α 1 keinen hemmenden oder aktivierenden Effekt auf TRPM3 α 2 aus (Abbildung 7.7C). Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen bei pH $6,8 \pm 0,5$ für den Einwärtsstrom und pH $5,8 \pm 0,2$ für den Auswärtsstrom. Die Hillkoeffizienten waren kleiner als eins ($h = 0,4$ bei -80 mV, $h = 0,5$ bei $+80$ mV) (Abbildung 7.7B). Beide Spleißvarianten unterscheiden sich somit in ihrer pH-Sensitivität nur unwesentlich.

Bei Untersuchung der pH-Wert-Sensitivität von TRPM3 α 2 in Anwesenheit seines Agonisten Pregnenolonsulfat ergab sich aber interessanterweise ein deutlich anderes Bild als in dessen Abwesenheit (Abbildung 7.7D). Während in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat pH-Werte von 6,0 und 5,5 schon zu einer deutlichen Hemmung des TRPM3 α 2-Stromes führten, übten sie in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat nur einen geringen Effekt auf diesen aus. Erst bei pH-Werten kleiner pH 5,0 wurde hier eine Abnahme des TRPM3 α 2-Stromes beobachtet. Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen bei pH $5,2 \pm 0,05$ für den Einwärtsstrom und pH $5,2 \pm 0,03$ für den Auswärtsstrom. Sie unterscheiden sich somit deutlich von den ermittelten IC_{50} -Werten in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat. Auch in der Steilheit der Dosiswirkungskurven wurden Unterschiede festgestellt ($h = 2,8$ bei -80 mV, $h = 3,3$ bei $+80$ mV) (Abbildung 7.7E).

Um auszuschließen, dass die in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat bei pH-Werten kleiner pH 5,0 beobachtete Abnahme des TRPM3 α 2-Stromes auf eine Hydrolyse von Pregnenolonsulfat zurückzuführen ist, wurden zwei Lösungen identischer Zusammensetzung, in denen Pregnenolonsulfat zwei Stunden lang einem pH-Wert von 4,0 bzw. 5,0 ausgesetzt war, nach Wiederherstellung eines neutralen pH-Wertes zusammen mit einer Pregnenolonsulfat-haltigen Lösung pH 7,2 vermessen. Keine Unterschiede in der Stromgröße waren zwischen den drei Lösungen feststellbar (Abbildung 7.7F). Folglich kann die hier beobachtete Abnahme des TRPM3 α 2-Stromes nicht auf eine Hydrolyse des Pregnenolonsulfats, sondern auf eine Hemmung von TRPM3 α 2 durch Protonen oder eine Protonierung des Pregnenolonsulfats zurückgeführt werden.

Hemmung durch extrazelluläre Lanthanoide und Rutheniumrot

Bei der Untersuchung des Einflusses von extrazellulärem Gd^{3+} , La^{3+} und Rutheniumrot auf TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 konnte bei beiden Spleißvarianten mit zunehmender Konzentration an Gd^{3+} , La^{3+} und Rutheniumrot eine zunehmende Hemmung des Ein- und Auswärtsstromes beobachtet werden (Abbildung 7.8A und C). Bei TRPM3 α 2 konnte zudem bei Potentialen kleiner -80 mV in Gegenwart sehr niedriger Konzentrationen an

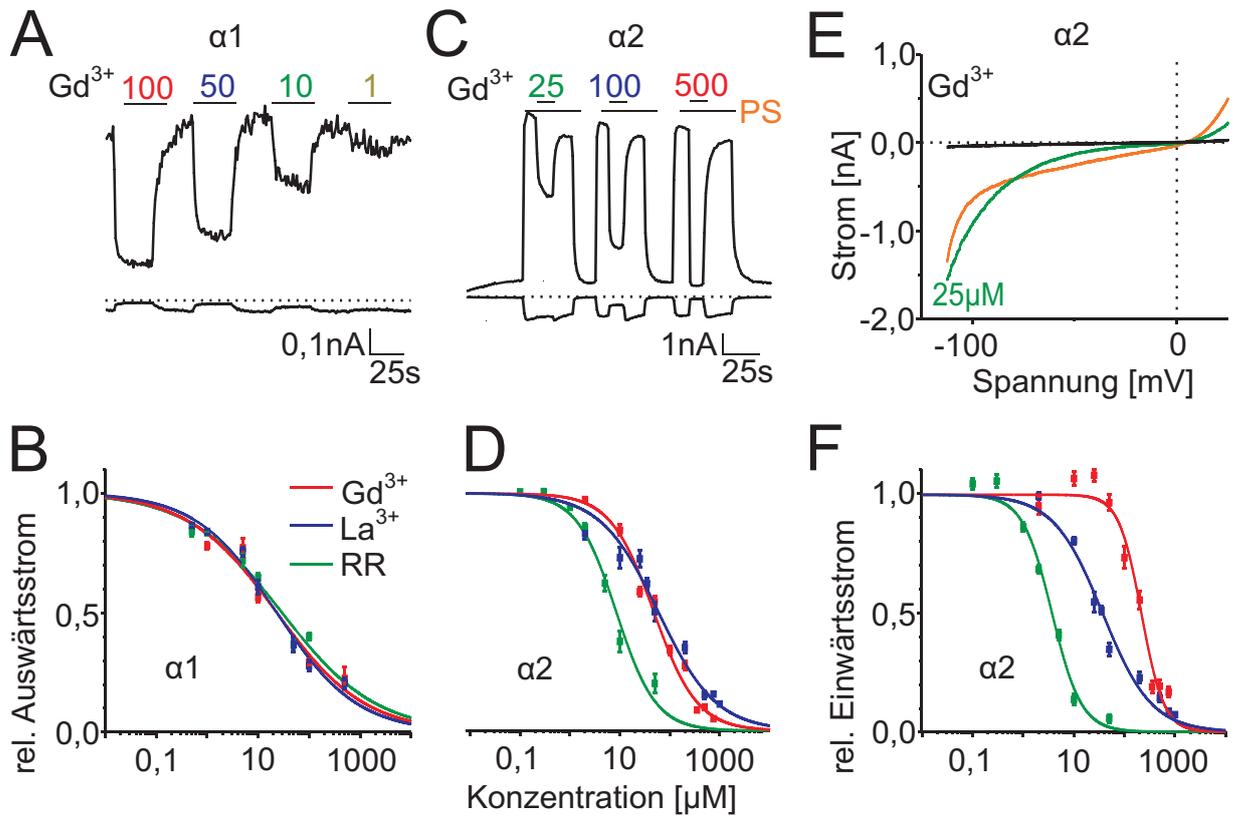


Abb. 7.8: **Hemmung von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 durch Lanthanoide und Rutheniumrot** (A) TRPM3 α 1-Strom bei -80 und $+80$ mV während Applikation von Standardbadlösungen mit unterschiedlichen Gd^{3+} -Konzentrationen (in μM). (B) Statistische Auswertung der TRPM3 α 1-Stromantworten bei $+80$ mV während der Applikation der Gd^{3+} -, La^{3+} - und RR-haltigen Standardbadlösungen. Die Stromantworten auf die unterschiedlichen Gd^{3+} -, La^{3+} - und RR-Konzentrationen wurden auf die mit der Standardbadlösung erzielte Antwort normalisiert. Die durch die normalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: Gd^{3+} : $\text{IC}_{50} = 23 \mu\text{M}$, $h = 0,5$ ($n \geq 6$); La^{3+} : $\text{IC}_{50} = 23 \mu\text{M}$, $h = 0,5$ ($n \geq 8$); RR: $\text{IC}_{50} = 28 \mu\text{M}$, $h = 0,5$ ($n \geq 5$). (C) TRPM3 α 2-Strom bei -80 und $+80$ mV während Applikation von Standardbadlösungen mit unterschiedlichen Gd^{3+} -Konzentrationen in Anwesenheit von $35 \mu\text{M}$ Pregnenolonsulfat (PS) (in μM). (D,F) Statistische Auswertung der TRPM3 α 2-Stromantworten bei $+80$ und -80 mV während der Applikation der Gd^{3+} -, La^{3+} - und RR-haltigen Standardbadlösungen in Anwesenheit von PS. Die Stromantworten auf die unterschiedlichen Gd^{3+} -, La^{3+} - und RR-Konzentrationen wurden auf die mit der PS-haltigen Standardbadlösung erzielte Antwort normalisiert. Die durch die normalisierten Stromantworten gefitteten Kurven stellen Hillfunktionen mit folgenden Parametern dar: Gd^{3+} : $+80$ mV $\text{IC}_{50} = 48 \mu\text{M}$, $h = 0,9$; -80 mV $\text{IC}_{50} = 216 \mu\text{M}$, $h = 1,9$ ($n \geq 6$); La^{3+} : $+80$ mV $\text{IC}_{50} = 65 \mu\text{M}$, $h = 0,7$, -80 mV $\text{IC}_{50} = 37 \mu\text{M}$, $h = 0,9$ ($n \geq 6$); RR: $+80$ mV $\text{IC}_{50} = 6,8 \mu\text{M}$, $h = 1,3$; -80 mV $\text{IC}_{50} = 3,7 \mu\text{M}$, $h = 1,5$ ($n \geq 6$). (E) Strom-Spannungsbeziehung von TRPM3 α 2 vor und während der Applikation einer Standardbadlösung mit 0 und $35 \mu\text{M}$ Gd^{3+} in Anwesenheit von PS.

Gd^{3+} und in geringerem Ausmaß auch in Gegenwart sehr niedriger Konzentrationen an La^{3+} eine leichte Potenzierung des Einwärtsstromes festgestellt werden (Abbildung 7.8E).

Die aus den Dosiswirkungskurven von TRPM3 α 1 ermittelten IC₅₀-Werte lagen für Gd³⁺ bei 23 μ M (+80 mV), für La³⁺ bei 23 μ M (+80 mV) und für Rutheniumrot bei 28 μ M (+80 mV) und die aus den Dosiswirkungskurven von TRPM3 α 2 ermittelten IC₅₀-Werte für Gd³⁺ bei 216 μ M (+80 mV) und 48 μ M (−80 mV), für La³⁺ bei 65 μ M (+80 mV) und 37 μ M (−80 mV) und für Rutheniumrot bei 6,8 μ M (+80 mV) und 3,7 μ M (−80 mV) und zeigten eine Spannungsabhängigkeit (Abbildung 7.8B und D).

7.5 Diskussion

In diesem Kapitel wurde der Einfluss verschiedenster mono-, di- und trivalenter Kationen auf die Aktivität von TRPM3 α 2 untersucht. Gezeigt werden konnte, dass die Aktivität von TRPM3 α 2 durch intrazelluläres Mg²⁺, extrazelluläre Protonen, extrazelluläre, monovalente Kationen sowie extrazelluläre Lanthanoide (Gd³⁺, La³⁺) und Rutheniumrot gehemmt wird. Auch die Aktivität von TRPM3 α 1 wird mit Ausnahme der extrazellulären, monovalenten Kationen durch diese Kationen negativ reguliert.

Wie bereits bei Oberwinkler et al. [129] beschrieben, führten auch hier erhöhte intrazelluläre Mg²⁺-Konzentrationen zu einer Hemmung von TRPM3 α 2. In diesem Kapitel konnte allerdings zusätzlich noch gezeigt werden, dass diese Hemmung auch in Anwesenheit des TRPM3 α 2-Agonisten Pregnenolonsulfat beobachtbar ist. Die zur halbmaximalen Hemmung erforderlichen Mg²⁺-Konzentrationen lagen für den Einwärtsstrom bei 0,34 mM in An- und 0,98 mM in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat und für den Auswärtsstrom bei 0,72 mM in An- und 0,62 mM in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat. Physiologische Mg²⁺-Konzentrationen (0,5-1 mM [152]) führen somit schon zu einer Hemmung von TRPM3 α 2. Für die intrazelluläre Mg²⁺-Hemmung war außerdem eine Spannungsabhängigkeit nachweisbar, die möglicherweise auf eine direkte Interaktion des Mg²⁺ mit der TRPM3 α 2-Pore hindeuten könnte. Auch für zahlreiche andere Ionenkanäle (einwärtsrektifizierende K⁺-Kanäle [110, 124, 184], nikotinische Acetylcholin-Rezeptorkanäle [47, 79], spannungsabhängige L-Typ Ca²⁺-Kanäle [91], spannungsabhängige Na⁺-Kanäle [149]) wurde schon eine solche spannungsabhängige, intrazelluläre Mg²⁺-Hemmung nachgewiesen.

Wie für TRPM3 α 2 wurde auch schon für TRPM3 α 1, der sich ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne von diesem unterscheidet, eine Hemmung durch intrazelluläres Mg²⁺ gezeigt [129]. Aus diesem Grunde wurden für alle in diesem als auch in den vorangegangenen Kapiteln durchgeführten Patch-clamp-Messungen Mg²⁺-freie, intrazelluläre Lösungen eingesetzt. Die Hemmung durch intrazelluläres Mg²⁺ ist jedoch nicht nur ein Merkmal von TRPM3, sondern wurde auch schon für die beiden TRPM3 sehr nahestehenden Ionenkanäle TRPM6 und TRPM7

sowie einen endogenen in praktisch allen Zellen, auch HEK293-Zellen, vorkommenden Strom beschrieben [122]. Letzterer wird aufgrunddessen auch als MIC-Strom (= „Magnesium Inhibited Current“) bzw. MagNuM-Strom (= „Magnesium Nucleotide regulated Metal current“) bezeichnet und vermutlich von TRPM7 kodiert. Eine Aktivierung des endogenen MIC- bzw. MagNuM-Stromes war aufgrund der eingesetzten Mg^{2+} -freien, intrazellulären Lösungen zu erwarten. Um den Einfluss des MIC- bzw. MagNuM-Stromes auf die TRPM3-Messungen möglichst gering zu halten, wurden deshalb folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen: (1) wurden die Patch-clamp-Messungen immer möglichst kurz gehalten, d.h. in der Regel 90-120 Sekunden nach Übergang in die whole-cell-Konfiguration beendet. Da der endogene MIC- bzw. MagNuM-Strom im Gegensatz zum TRPM3 α 2-Strom erst nach ca. 90-100 Sekunden aktiviert und die halbmaximale Aktivierung erst nach 220 Sekunden erreicht [6], sollte innerhalb dieses gewählten Zeitfensters dessen Einfluss auf die TRPM3-Messungen noch gering sein. (2) wurden z.T. parallel zu den TRPM3-exprimierenden Zellen Kontrollzellen unter identischen Messbedingungen vermessen. Im Gegensatz zu TRPM3 α 2 konnte für den endogenen MIC- bzw. MagNuM-Strom jedoch keine Spannungsabhängigkeit der intrazellulären Mg^{2+} -Hemmung nachgewiesen werden [87].

Auch wird die Aktivität von TRPM3 α 2 - wie hier gezeigt werden konnte - noch durch den extrazellulären pH-Wert reguliert. Erniedrigungen des pH-Wertes führten hierbei zu einer Hemmung, Erhöhungen des pH-Wertes zu einer Potenzierung der TRPM3 α 2-Ströme. Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen für den Einwärtsstrom bei $pH\ 6,8\pm 0,5$ und für den Auswärtsstrom bei $pH\ 5,8\pm 0,2$. In Gegenwart des Agonisten Pregnenolonsulfat lagen die IC_{50} -Werte für den Ein- und Auswärtsstrom dagegen bei deutlich niedrigeren pH-Werten (IC_{50} -Wert bei $-80\ mV$: $pH\ 5,2\pm 0,05$ und bei $+80\ mV$: $pH\ 5,2\pm 0,03$). Während in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat bei pH-Werten von 6,0 und 5,5 eine deutliche Hemmung des TRPM3 α 2-Stromes beobachtbar war, waren hier nur geringfügige Effekte erkennbar. Folglich scheint sich die pH-Wert-Regulation von TRPM3 α 2 in Gegenwart von Pregnenolonsulfat verändert zu haben. Ursache hierfür könnte eine durch Bindung von Pregnenolonsulfat bedingte veränderte Konformation von TRPM3 α 2 und damit veränderte Lokalisation protonierbarer Aminosäuren sein. Die hier im pH-Bereich zwischen 5,0 bis 4,0 auftretende Hemmung von TRPM3 α 2 ist nicht - wie ebenfalls hier gezeigt werden konnte - auf eine Hydrolyse von Pregnenolonsulfat zurückzuführen.

Auch die Aktivität von TRPM3 α 1, der sich ausschließlich in der mutmaßlichen Porenregion zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne von TRPM3 α 2 unterscheidet, wird durch Erniedrigungen des pH-Wertes gehemmt und durch Erhöhungen des pH-Wertes erhöht. Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen für den Einwärtsstrom bei $pH\ 6,1\pm 0,2$ und für den Auswärtsstrom bei $pH\ 5,7\pm 0,1$. Größere Unter-

schiede in der pH-Wert-Regulation von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 konnten somit in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat nicht festgestellt werden. Aufgrund der unmittelbar nach Applikation der unterschiedlichen pH-Lösungen beobachtbaren Hemmung der TRPM3 α 1- und TRPM3 α 2-Spleißvariante, kann eine intrazelluläre Azidifizierung als Ursache für die Hemmung ebenfalls ausgeschlossen werden.

Auch für andere Mitglieder der TRP-Proteinfamilie konnte schon eine pH-Wert-Regulation gezeigt werden. So führten pH-Erniedrigungen einerseits zu einer Potenzierung von TRPV1 (EC₅₀: pH = 5,3 [83]) und TRPM7 (EC₅₀-Wert: pH = 4,5 [82]) und andererseits zu einer Hemmung von TRPV5, TRPV6 und TRPM5 [106, 204, 205]. Die ermittelten IC₅₀-Werte für TRPV5 (IC₅₀-Wert: pH = 6,6 bei -80 mV) und TRPM5 (IC₅₀-Wert: pH = 6,4 bei -80 mV) lagen hierbei in demselben pH-Bereich wie die IC₅₀-Werte von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 (in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat). Während bei TRPV1 und TRPV5 extrazellulär gelegene Glutamatreste zwischen fünfter Transmembrandomäne und mutmaßlicher Porenregion (TRPV1: Glu⁶⁰⁰, TRPV5: Glu⁵²²) bzw. zwischen mutmaßlicher Porenregion und sechster Transmembrandomäne (TRPV1: Glu⁶⁴⁸) für die pH-Effekte verantwortlich sind [83, 204], sind bei TRPM5 ein extrazellulär gelegener Histidinrest zwischen mutmaßlicher Porenregion und sechster Transmembrandomäne (His⁹³⁴) und ein extrazellulär gelegener Glutamatrest (Glu⁸³⁰) zwischen dritter und vierter Transmembrandomäne für die pH-Effekte verantwortlich [106]. Protonierbare Aminosäuren in diesen Bereichen könnten auch bei der pH-Wert-Regulation von TRPM3 eine Rolle spielen.

Physiologisch spielt die Potenzierung von TRPV1 und TRPM7 durch Protonen vermutlich bei Entzündungen, die mit einer pH-Wert-Erniedrigung im Gewebe einhergehen, eine Rolle [82, 83]. Der Hemmung von TRPM5 durch Protonen wird dagegen eine Rolle bei der Modulation der Geschmackswahrnehmung von süß, sauer und bitter [106] und der Hemmung von TRPV5 eine Rolle bei der Regulation der renalen Ca²⁺-Aufnahme zugeschrieben [205]. Welche physiologische Rolle Protonen bei der Regulation des murinen TRPM3-Kanals spielen ist noch unbekannt. Da der humane TRPM3-Kanal im Gegensatz zum murinen ebenfalls in der Niere exprimiert wird und ihm dort eine Rolle bei der renalen Ca²⁺-Homeostase zugeschrieben wird [59], könnte die pH-Wert-Regulation des humanen TRPM3-Kanals dort eine ähnliche Funktion erfüllen wie bei TRPV5.

TRPM3 weist, wie in diesem als auch in den vorangegangenen Kapiteln bereits gezeigt werden konnte, zahlreiche Gemeinsamkeiten mit TRPM7, einem weiteren Mitglied der TRPM-Proteinfamilie, auf. Beide werden u.a. durch intrazelluläres Mg²⁺ gehemmt [122, 129] (siehe oben) und sind neben Ca²⁺ und Mg²⁺ noch für eine Vielzahl weiterer Spuren- und Schwermetalle permeabel [115] (siehe auch Kapitel 5). Die hier gezeigte, von TRPM7 abweichende pH-Wert-Regulation von TRPM3 stellt aufgrunddessen ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal für TRPM3 und TRPM7 dar. Der endogen in HEK293-

Zellen vorkommende MIC- bzw. MagNuM-Strom wird wie TRPM7 auch durch Protonen potenziert. Die in Gegenwart sehr niedriger pH-Werte auftretende Potenzierung des MIC- bzw. MagNuM-Stromes sowie die Aktivierung anderer endogener, protonenaktivierter Ströme wie ASIC- (= „Acid Sensing Ion channel“) [61] und PAORAC- (= „Proton-Activated, Outward-Rectifying Anion Current“) Ströme [92]) überlagerten zum Teil die TRPM3-Hemmung. Eine Auswertung der pH-Effekte bei pH-Werten kleiner pH 5,0 war deshalb nicht möglich. Da der MIC- bzw. MagNuM-Strom in nahezu allen Zellen zu finden ist und noch keine spezifischen Antagonisten existieren, wären die hier beschriebenen Probleme auch durch Wechsel des Überexpressionssystems nicht gelöst worden.

Neben Protonen führten auch Lanthanoide (Gd^{3+} , La^{3+}) und Rutheniumrot zu einer Hemmung von TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2. Die hierzu benötigten Konzentrationen lagen im mikromolaren Bereich. Da die Aktivität zahlreicher weiterer Ionenkanäle ebenfalls durch Lanthanoide und Rutheniumrot in diesem Konzentrationsbereich gehemmt wird, handelt es sich hierbei nur um unspezifische TRPM3-Hemmstoffe. Abweichend von den übrigen Mitgliedern der TRP-Proteinfamilie, deren Aktivität ebenfalls durch Lanthanoide in diesem Konzentrationsbereich gehemmt wird, wird die Aktivität von TRPC4 und TRPC5 durch Lanthanoide in mikromolaren Konzentrationen potenziert und erst in millimolaren Konzentrationen gehemmt [84]. Auch bei TRPM3 α 2 wurde bei Potentialen unterhalb von -80 mV in Gegenwart niedriger, mikromolarer Konzentrationen an Gd^{3+} und in geringerem Ausmaß auch in Gegenwart niedriger, mikromolarer Konzentrationen an La^{3+} eine schwache Potenzierung des Einwärtsstromes beobachtet. Höhere, mikromolare Konzentrationen an Gd^{3+} und La^{3+} führten auch hier zu einer Hemmung. Die sowohl bei Gd^{3+} , La^{3+} als auch bei Rutheniumrot beobachtbare Spannungsabhängigkeit der Hemmung deutet darauf hin, dass sich deren Bindungsstelle im elektrischen Feld von TRPM3 α 1 bzw. TRPM3 α 2 befindet bzw. sich deren Konformation in Abhängigkeit von der Spannung ändert. Bei TRPC5 konnten drei Glutamatreste (Glu^{543} , Glu^{595} , Glu^{598}) in unmittelbarer Nähe der extrazellulären Porenöffnung bereits als mögliche Bindungsstelle für Gd^{3+} und La^{3+} identifiziert werden [84].

Abweichend von der gemeinsamen Hemmung durch intrazelluläres Mg^{2+} , extrazelluläre Protonen und extrazelluläre Lanthanoide und Rutheniumrot zeigen TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 jedoch Unterschiede in der Regulation durch extrazelluläre Kationen. Während extrazelluläre, monovalente Kationen die Aktivität von TRPM3 α 1 nicht beeinflussen, führen sie bei TRPM3 α 2 zu einer Hemmung [129]. Auch in Anwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat wurde, wie hier gezeigt werden konnte, eine Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläre, monovalente Kationen beobachtet. Von physiologischer Bedeutung ist hierbei insbesondere die Hemmung durch extrazelluläres Na^+ , da dieses mit einer Konzentration von 130-150 mM das bedeutenste Kation des Extrazellularraumes darstellt.

Extrazelluläres Na^+ hemmte sowohl in An- als auch in Abwesenheit des Agonisten Pregnenolonsulfat den TRPM3 α 2 Ein- und Auswärtsstrom. Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat bei 30 mM (-80 mV) und 35 mM ($+80$ mV) und in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat bei 21 mM (-80 mV) und 50 mM ($+80$ mV). Da Na^+ mit einer Konzentration von 130-150 mM das häufigste Kation des Extrazellulärraumes darstellt und dramatische Variationen in der extrazellulären Na^+ -Konzentration in der Regel nicht auftreten, leitet TRPM3 α 2 mono- und divalente Kationen unter physiologischen Bedingungen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit seines Agonisten Pregnenolonsulfat folglich nur mit einer verringerten Effizienz. Eine Hemmung durch extrazelluläres Na^+ , wie sie hier für TRPM3 α 2 nachgewiesen wurde, wurde bislang in der Literatur nur für einen in sensorischen Neuronen vorkommenden N-Typ Ca^{2+} -Kanal [143] sowie für einwärtsrektifizierende K^+ -Kanäle und K^+ -Kanäle des HERG-Typs („human ether-a-go-go-related gene“) [128, 200] beschrieben. Da die Hemmung durch extrazelluläres Na^+ ein sehr seltenes Merkmal von Ionenkanälen darstellt, kann sie zur Identifizierung von endogen exprimierten TRPM3 α 2 genutzt werden. Auch eine Abgrenzung von TRPM3 α 1, der keine solche Hemmung zeigt, ist möglich.

Für TRPM3 α 2 konnte neben der Hemmung durch extrazelluläres Na^+ auch eine Hemmung durch extrazelluläres NMDG^+ gezeigt werden. NMDG^+ führte hierbei sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat im Vergleich zu Na^+ zu einer deutlich stärkeren Hemmung des Einwärtsstromes als des Auswärtsstromes. Die aus den Dosiswirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte lagen in Abwesenheit von Pregnenolonsulfat bei 28 mM (-80 mV) und 432 mM ($+80$ mV) und in Anwesenheit von Pregnenolonsulfat bei 20 mM (-80 mV) und 91 mM ($+80$ mV). Die Unterschiede in den IC_{50} -Werten bei $+80$ mV könnten teilweise auf Schwierigkeiten in der Kurvenanpassung zurückzuführen sein, da die ermittelten Datenpunkte aufgrund der schwachen NMDG^+ -Hemmung alle im oberen Bereich der Dosiswirkungskurve lagen. Im Gegensatz zur Na^+ -Hemmung spielt die NMDG^+ -Hemmung keine physiologische Rolle. Die Aufklärung der NMDG^+ -Hemmung leistete jedoch einen wichtigen Beitrag zur weiteren Charakterisierung von TRPM3 α 2. Hohe Konzentrationen an NMDG^+ in den extrazellulären Lösungen waren beispielsweise dafür verantwortlich, dass Ca^{2+} -getragene Einwärtsströme zuvor nur in Gegenwart sehr hoher Ca^{2+} -Konzentrationen detektiert wurden [129]. Erst nach Aufdeckung der NMDG^+ -Hemmung und nach Substitution des NMDG^+ durch Mannit waren auch bei deutlich niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen Ca^{2+} -getragene Einwärtsströme messbar.

Die in diesem Kapitel gezeigte Hemmung von TRPM3 α 2 durch extrazelluläre, monovalente Kationen, extrazelluläre Protonen und intrazelluläres Mg^{2+} kann zukünftig zu dessen Abgrenzung von anderen TRP-Kanälen genutzt sowie zu dessen Nachweis in ver-

schiedensten Geweben herangezogen werden.

8 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] Aarts, M., K. Iihara, W.-L. Wei, Z.-G. Xiong, M. Arundine, W. Cerwinski, J. MacDonald and M. Tymianski. 2003. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 115:863–877.
- [2] Ahern, G. 2003. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 278:30429–30434.
- [3] Andersson, D., H. Chase and S. Bevan. 2004. TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J Neurosci* 24:5364–5369.
- [4] Asfari, M., D. Janjic, P. Meda, G. Li, P. Halban and C. Wollheim. 1992. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167–178.
- [5] Ashcroft, F. 2006. From molecule to malady. *Nature* 440:440–447.
- [6] Bakowski, D. and A. Parekh. 2002. Permeation through store-operated CRAC channels in divalent-free solution: potential problems and implications for putative CRAC channel genes. *Cell Calcium* 32:379–391.
- [7] Bancila, V., T. Cens, D. Monnier, F. Chanson, C. Faure, Y. Dunant and A. Bloc. 2005. Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat K_{ATP} channel. *J Biol Chem* 280:8793–8799.
- [8] Baulieu, E. 1991. Neurosteroids: a new function in the brain. *Biol Cell* 71:3–10.
- [9] Belelli, D. and J. Lambert. 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nat Rev Neurosci* 6:565–575.
- [10] Berr, C., S. Lafont, B. Debuire, J. Dartigues and E. Baulieu. 1996. Relationships of dehydroepiandrosterone sulfate in the elderly with functional, psychological, and mental status, and short-term mortality: a French community-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13410–13415.
- [11] Berridge, M., P. Lipp and M. Bootman. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21.

- [12] Birder, L., Y. Nakamura, S. Kiss, M. Nealen, S. Barrick, A. Kanai, E. Wang, G. Ruiz, W. D. Groat, G. Apodaca, S. Watkins and M. Caterina. 2002. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci* 5:856–860.
- [13] Bossert, F. and W. Vater. 1971. Dihydropyridine, eine neue Gruppe stark wirksamer Coronartherapeutika. *Naturwissenschaften* 58:578.
- [14] Brauchi, S., P. Orio and R. Latorre. 2004. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15494–15499.
- [15] Burnashev, N. 1998. Calcium permeability of ligand-gated channels. *Cell Calcium* 24:325–332.
- [16] Cataldi, M., E. Perez-Reyes and R. Tsien. 2002. Differences in apparent pore sizes of low and high voltage-activated Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 277:45969–45976.
- [17] Caterina, M., A. Leffler, A. Malmberg, W. Martin, J. Trafton, K. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. Basbaum and D. Julius. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306–313.
- [18] Caterina, M., M. Schumacher, M. Tominaga, T. Rosen, J. Levine and D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824.
- [19] Caterina, M., T. Rosen, M. Tominaga, A. Brake and D. Julius. 1999. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436–441.
- [20] Caterina, M. and D. Julius. 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24:487–517.
- [21] Chen, S.-C. and F.-S. Wu. 2004. Mechanism underlying inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by pregnenolone sulfate in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1027:196–200.
- [22] Chubanov, V., S. Waldegger, M. Schnitzler, H. Vitzthum, M. Sassen, H. Seyberth, M. Konrad and T. Gudermann. 2004. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2894–2899.

- [23] Chung, M.-K., H. Lee, A. Mizuno, M. Suzuki and M. Caterina. 2004. 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* 24:5177–5182.
- [24] Clapham, D., L. Runnels and C. Strübing. 2001. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387–396.
- [25] Clapham, D. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524.
- [26] Corpéchet, C., M. Synguelakis, S. Talha, M. Axelson, J. Sjövall, R. Vihko, E. Baulieu and P. Robel. 1983. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* 270:119–125.
- [27] Corry, B. and S.-H. Chung. 2006. Mechanisms of valence selectivity in biological ion channels. *Cell Mol Life Sci* 63:301–315.
- [28] Cosens, D. and A. Manning. 1969. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285–287.
- [29] Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, C. Pérez, N. Shigemura, R. Yoshida, B. Mosinger, J. Glendinning, Y. Ninomiya and R. Margolskee. 2006. Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses* 31:253–264.
- [30] Davis, J., J. Gray, M. Gunthorpe, J. Hatcher, P. Davey, P. Overend, M. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S. Hughes, K. Rance, E. Grau, A. Harper, P. Pugh, D. Rogers, S. Bingham, A. Randall and S. Sheardown. 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183–187.
- [31] de Peretti, E. and E. Mappus. 1983. Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 57:550–556.
- [32] de Peretti, E. and M. Forest. 1978. Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J Clin Endocrinol Metab* 47:572–577.
- [33] Dietrich, A., M. Schnitzler, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaja, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova, H. Kalwa, K. Essin, O. Pinkenburg, F. Luft, T. Gudermann and L. Birnbaumer. 2005. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25:6980–6989.

- [34] Duncan, L., J. Deeds, F. Cronin, M. Donovan, A. Sober, M. Kauffman and J. McCarthy. 2001. Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* 19:568–576.
- [35] Duncan, L., J. Deeds, J. Hunter, J. Shao, L. Holmgren, E. Woolf, R. Tepper and A. Shyjan. 1998. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 58:1515–1520.
- [36] Dwyer, T., D. Adams and B. Hille. 1980. The permeability of the endplate channel to organic cations in frog muscle. *J Gen Physiol* 75:469–492.
- [37] Dzeja, C., V. Hagen, U. Kaupp and S. Frings. 1999. Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J* 18:131–144.
- [38] Egan, T. and B. Khakh. 2004. Contribution of calcium ions to P₂X channel responses. *J Neurosci* 24:3413–3420.
- [39] Eger, Troschütz and Roth. 1999. Arzneistoffanalyse. *Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart* 4.Auflage.
- [40] Emdin, S., G. Dodson, J. Cutfield and S. Cutfield. 1980. Role of zinc in insulin biosynthesis. Some possible zinc-insulin interactions in the pancreatic B-cell. *Diabetologia* 19:174–182.
- [41] Erler, I., D. Al-Ansary, U. Wissenbach, T. Wagner, V. Flockerzi and B. Niemeyer. 2006. Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J Biol Chem* 281:38396–38404.
- [42] Erler, I., D. Hirnet, U. Wissenbach, V. Flockerzi and B. Niemeyer. 2004. Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem* 279:34456–34463.
- [43] Fang, D. and V. Setaluri. 2000. Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279:53–61.
- [44] French Mullen, J., P. Danks and K. Spence. 1994. Neurosteroids modulate calcium currents in hippocampal CA1 neurons via a pertussis toxin-sensitive G-protein-coupled mechanism. *J Neurosci* 14:1963–1977.
- [45] Fonfria, E., I. Marshall, C. Benham, I. Boyfield, J. Brown, K. Hill, J. Hughes, S. Skaper and S. McNulty. 2004. TRPM2 channel opening in response to oxidative

- stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Br J Pharmacol* 143:186–192.
- [46] Fonfria, E., P. Murdock, F. Cusdin, C. Benham, R. Kelsell and S. McNulty. 2006. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* 26:159–178.
- [47] Forster, I. and D. Bertrand. 1995. Inward rectification of neuronal nicotinic acetylcholine receptors investigated by using the homomeric alpha 7 receptor. *Proc Biol Sci* 260:139–148.
- [48] Foster, T., S. Hamann, V. Richards, P. Bryant, D. Graves and R. McAllister. 1983. Nifedipine kinetics and bioavailability after single intravenous and oral doses in normal subjects. *J Clin Pharmacol* 23:161–170.
- [49] Freichel, M., S. Suh, A. Pfeifer, U. Schweig, C. Trost, P. Weissgerber, M. Biel, S. Philipp, D. Freise, G. Droogmans, F. Hofmann, V. Flockerzi and B. Nilius. 2001. Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3:121–127.
- [50] Frings, S., R. Seifert, M. Godde and U. Kaupp. 1995. Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15:169–179.
- [51] Geppetti, P. and M. Trevisani. 2004. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol* 141:1313–1320.
- [52] Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175–182.
- [53] Goascogne, C. L., P. Robel, M. Gouézou, N. Sananès, E. Baulieu and M. Waterman. 1987. Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. *Science* 237:1212–1215.
- [54] Goldmann, S. and J. Stoltefuss. 1991. 1,4-dihydropyridines: Effects of chirality and conformation on the calcium antagonist and calcium agonist activities. *Angewandte Chemie* 103:1587–1605.
- [55] Gouaux, E. and R. Mackinnon. 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310:1461–1465.

- [56] Graham, F., J. Smiley, W. Russell and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59–74.
- [57] Greka, A., B. Navarro, E. Oancea, A. Duggan and D. Clapham. 2003. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* 6:837–845.
- [58] Grimm, C., R. Kraft, G. Schultz and C. Harteneck. 2005. Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine. *Mol Pharmacol* 67:798–805.
- [59] Grimm, C., R. Kraft, S. Sauerbruch, G. Schultz and C. Harteneck. 2003. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* 278:21493–21501.
- [60] Gu, Q. and R. Moss. 1996. 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J Neurosci* 16:3620–3629.
- [61] Gunthorpe, M., G. Smith, J. Davis and A. Randall. 2001. Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch* 442:668–674.
- [62] Hackos, D. and J. Korenbrot. 1999. Divalent cation selectivity is a function of gating in native and recombinant cyclic nucleotide-gated ion channels from retinal photoreceptors. *J Gen Physiol* 113:799–818.
- [63] Hamill, O., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85–100.
- [64] Hamill, O. and B. Martinac. 2001. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* 81:685–740.
- [65] Hantzsch, A. 1882. Über die Synthese pyridinartiger Verbindungen aus Acetessigäther und Aldehydammoniak. *Justus Liebigs Ann Chem* 215:1-82.
- [66] Hara, Y., M. Wakamori, M. Ishii, E. Maeno, M. Nishida, T. Yoshida, H. Yamada, S. Shimizu, E. Mori, J. Kudoh, N. Shimizu, H. Kurose, Y. Okada, K. Imoto and Y. Mori. 2002. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 9:163–173.

- [67] Hardie, R. and B. Minke. 1992. The trp gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643–651.
- [68] Hellwig, N., T. Plant, W. Janson, M. Schäfer, G. Schultz and M. Schaefer. 2004. TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *J Biol Chem* 279:34553–34561.
- [69] Hille. 2001. Ion channels of excitable membranes. *Sinauer, Sunderland, MA* 3.Auflage
- [70] Hirasawa, M. and Q. Pittman. 2003. Nifedipine facilitates neurotransmitter release independently of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6139–6144.
- [71] Hirnet, D., J. Olausson, C. Fecher-Trost, M. Bödding, W. Nastainczyk, U. Wissenbach, V. Flockerzi and M. Freichel. 2003. The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* 33:509–518.
- [72] Hochstrate, P. 1989. Lanthanum mimicks the trp photoreceptor mutant of *Drosophila* in the blowfly *Calliphora*. *J Comp Physiol [A]* 166:179–187.
- [73] Hoenderop, J., A. Hartog, M. Stuiver, A. Doucet, P. Willems and R. Bindels. 2000. Localization of the epithelial Ca^{2+} channel in rabbit kidney and intestine. *J Am Soc Nephrol* 11:1171–1178.
- [74] Hoenderop, J., B. Nilius and R. Bindels. 2005. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:373–422.
- [75] Hoenderop, J., T. Voets, S. Hoefs, F. Weidema, J. Prenen, B. Nilius and R. Bindels. 2003. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22:776–785.
- [76] Hofmann, T., A. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann and G. Schultz. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259–263.
- [77] Hofmann, T., V. Chubanov, T. Gudermann and C. Montell. 2003. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca^{2+} -activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* 13:1153–1158.
- [78] Hu, H.-Z., Q. Gu, C. Wang, C. Colton, J. Tang, M. Kinoshita-Kawada, L.-Y. Lee, J. Wood and M. Zhu. 2004. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2 and TRPV3. *J Biol Chem* 279:35741–35748.

- [79] Ifune, C. and J. Steinbach. 1992. Inward rectification of acetylcholine-elicited currents in rat phaeochromocytoma cells. *J Physiol* 457:143–165.
- [80] Inamura, K., Y. Sano, S. Mochizuki, H. Yokoi, A. Miyake, K. Nozawa, C. Kitada, H. Matsushime and K. Furuichi. 2003. Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J Membr Biol* 191:201–207.
- [81] Inoue, R., T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito and Y. Mori. 2001. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha1-adrenoceptor-activated Ca^{2+} -permeable cation channel. *Circ Res* 88:325–332.
- [82] Jiang, J., M. Li and L. Yue. 2005. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J Gen Physiol* 126:137–150.
- [83] Jordt, S., M. Tominaga and D. Julius. 2000. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8134–8139.
- [84] Jung, S., A. Mühle, M. Schaefer, R. Strotmann, G. Schultz and T. Plant. 2003. Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem* 278:3562–3571.
- [85] Jungnickel, M., H. Marrero, L. Birnbaumer, J. Lémos and H. Florman. 2001. Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 3:499–502.
- [86] Kolisek, M., A. Beck, A. Fleig and R. Penner. 2005. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 18:61–69.
- [87] Kozak, J. A., H. H. Kerschbaum and M. D. Cahalan. 2002. Distinct properties of CRAC and MIC channels in RBL cells. *J Gen Physiol* 120:221–235.
- [88] Kozak, J. and M. Cahalan. 2003. MIC channels are inhibited by internal divalent cations but not ATP. *Biophys J* 84:922–927.
- [89] Kraft, R., C. Grimm, K. Grosse, A. Hoffmann, S. Sauerbruch, H. Kettenmann, G. Schultz and C. Harteneck. 2004. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C129–C137.

- [90] Kunert-Keil, C., F. Bisping, J. Krüger and H. Brinkmeier. 2006. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 7:159.
- [91] Kuo, C. and P. Hess. 1993. Block of the L-type calcium channel pore by external and internal magnesium in rat pheochromocytoma cells. *J Physiol* 466:683–706.
- [92] Lambert, S. and J. Oberwinkler. 2005. Characterization of a proton-activated, outwardly rectifying anion channel. *J Physiol* 567:191–213.
- [93] Langeslag, M., K. Clark, W. Moolenaar, F. van Leeuwen and K. Jalink. 2007. Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists. *J Biol Chem* 282:232–239.
- [94] Launay, P., A. Fleig, A. Perraud, A. Scharenberg, R. Penner and J. Kinet. 2002. TRPM4 is a calcium-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109:397–407.
- [95] Launay, P., H. Cheng, S. Srivatsan, R. Penner, A. Fleig and J.-P. Kinet. 2004. TRPM4 regulates Ca^{2+} oscillations after T cell activation. *Science* 306:1374–1377.
- [96] Lee, H., T. Iida, A. Mizuno, M. Suzuki and M. Caterina. 2005. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* 25:1304–1310.
- [97] Lee, N., J. Chen, L. Sun, S. Wu, K. Gray, A. Rich, M. Huang, J.-H. Lin, J. Feder, E. Janovitz, P. Levesque and M. Blonar. 2003. Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem* 278:20890–20897.
- [98] Leybold, B., C. Yu, T. Leinders-Zufall, M. Kim, F. Zufall and R. Axel. 2002. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6376–6381.
- [99] Li, J., A. Mahajan and M.-D. Tsai. 2006. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* 45:15168–15178.
- [100] Li, M., J. Jiang and L. Yue. 2006. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol* 127:525–537.

- [101] Liedtke, W., Y. Choe, M. Martí-Renom, A. Bell, C. Denis, A. Sali, A. Hudspeth, J. Friedman and S. Heller. 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103:525–535.
- [102] Liedtke, W. and J. Friedman. 2003. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13698–13703.
- [103] Liere, P., A. Pianos, B. Eychenne, A. Cambourg, S. Liu, W. Griffiths, M. Schumacher, J. Sjövall and E.-E. Baulieu. 2004. Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *J Lipid Res* 45:2287–2302.
- [104] Liman, E., D. Corey and C. Dulac. 1999. TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5791–5796.
- [105] Lis, A., U. Wissenbach and S. Philipp. 2005. Transcriptional regulation and processing increase the functional variability of TRPM channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371:315–324.
- [106] Liu, D., Z. Zhang and E. Liman. 2005. Extracellular acid block and acid-enhanced inactivation of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM5 involve residues in the S3-S4 and S5-S6 extracellular domains. *J Biol Chem* 280:20691–20699.
- [107] Liu, D. and E. Liman. 2003. Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15160–15165.
- [108] Lucas, P., K. Ukhanov, T. Leinders-Zufall and F. Zufall. 2003. A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40:551–561.
- [109] Mathur, C., V. Prasad, V. Raju, M. Welch and S. Lieberman. 1993. Steroids and their conjugates in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:85–88.
- [110] Matsuda, H., A. Saigusa and H. Irisawa. 1987. Ohmic conductance through the inwardly rectifying potassium channel and blocking by internal magnesium. *Nature* 325:156–159.
- [111] Matsushita, M., J. Kozak, Y. Shimizu, D. McLachlin, H. Yamaguchi, F.-Y. Wei, K. Tomizawa, H. Matsui, B. Chait, M. Cahalan and A. Nairn. 2005. Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *J Biol Chem* 280:20793–20803.

- [112] McKemy, D., W. Neuhausser and D. Julius. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52–58.
- [113] Minke, B., C. Wu and W. Pak. 1975. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258:84–87.
- [114] M.L.Nealen, M. Gold, P. Thut and M. Caterina. 2003. TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol* 90:515–520.
- [115] Monteilh-Zoller, M., M. Hermosura, M. Nadler, A. Scharenberg, R. Penner and A. Fleig. 2003. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 121:49–60.
- [116] Montell, C., L. Birnbaumer, V. Flockerzi, R. Bindels, E. Bruford, M. Caterina, D. Clapham, C. Harteneck, S. Heller, D. Julius, I. Kojima, Y. Mori, R. Penner, D. Prawitt, A. Scharenberg, G. Schultz, N. Shimizu and M. Zhu. 2002. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9:229–231.
- [117] Montell, C. and G. Rubin. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323.
- [118] Montell, C. 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005:re3.
- [119] Moqrich, A., S. Hwang, T. Earley, M. Petrus, A. Murray, K. Spencer, M. Andahazy, G. Story and A. Patapoutian. 2005. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307:1468–1472.
- [120] Muraki, K., Y. Iwata, Y. Katanosaka, T. Ito, S. Ohya, M. Shigekawa and Y. Imaizumi. 2003. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93:829–838.
- [121] Mutschler, Geisslinger, Kroemer and Schäfer-Korting. 2001. Arzneimittelwirkungen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* 8. Auflage.
- [122] Nadler, M., M. Hermosura, K. Inabe, A. Perraud, Q. Zhu, A. Stokes, T. Kurosaki, J. Kinet, R. Penner, A. Scharenberg and A. Fleig. 2001. LTRPC7 is a MgATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411:590–595.
- [123] Neher, E. and G. Augustine. 1992. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450:273–301.

- [124] Nichols, C., K. Ho and S. Hebert. 1994. Magnesium-dependent inward rectification of ROMK1 potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 476:399–409.
- [125] Niemeyer, B. A., C. Bergs, U. Wissenbach, V. Flockerzi and C. Trost. 2001. Competitive regulation of Ca^T-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3600–3605.
- [126] Nilius, B., J. Prenen, A. Janssens, G. Owsianik, C. Wang, M. Zhu and T. Voets. 2005. The selectivity filter of the cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 280:22899–22906.
- [127] Nilius, B., R. Vennekens, J. Prenen, J. G. Hoenderop, G. Droogmans and R. Bindels. 2001. The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 276:1020–1025.
- [128] Numaguchi, H., J. Johnson, C. Petersen and J. Balser. 2000. A sensitive mechanism for cation modulation of potassium current. *Nat Neurosci* 3:429–430.
- [129] Oberwinkler, J., A. Lis, K. Giehl, V. Flockerzi and S. Philipp. 2005. Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* 280:22540–22548.
- [130] Oberwinkler, J. and S. Philipp. 2007. TRPM3. *Handb Exp Pharmacol* :253–267.
- [131] Okada, T., S. Shimizu, M. Wakamori, A. Maeda, T. Kurosaki, N. Takada, K. Imoto and Y. Mori. 1998. Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J Biol Chem* 273:10279–10287.
- [132] Owsianik, G., K. Talavera, T. Voets and B. Nilius. 2006. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:685–717.
- [133] Peier, A., A. Moqrich, A. Hergarden, A. Reeve, D. Andersson, G. Story, T. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan and A. Patapoutian. 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705–715.
- [134] Peier, A., A. Reeve, D. Andersson, A. Moqrich, T. Earley, A. Hergarden, G. Story, S. Colley, J. Hogenesch, P. McIntyre, S. Bevan and A. Patapoutian. 2002. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296:2046–2049.

- [135] Peng, J., X. Chen, U. Berger, P. Vassilev, E. Brown and M. Hediger. 2000. A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J Biol Chem* 275:28186–28194.
- [136] Peng, J., X. Chen, U. Berger, P. Vassilev, H. Tsukaguchi, E. Brown and M. Hediger. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 274:22739–22746.
- [137] Perraud, A., A. Fleig, C. Dunn, L. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A. Stokes, Q. Zhu, M. Bessman, R. Penner, J. Kinet and A. Scharenberg. 2001. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411:595–599.
- [138] Perraud, A.-L., C. Takanishi, B. Shen, S. Kang, M. Smith, C. Schmitz, H. Knowles, D. Ferraris, W. Li, J. Zhang, B. Stoddard and A. Scharenberg. 2005. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 280:6138–6148.
- [139] Perraud, A.-L., H. Knowles and C. Schmitz. 2004. Novel aspects of signaling and ion-homeostasis regulation in immunocytes. The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response. *Mol Immunol* 41:657–673.
- [140] Petersen, O. 2002. Cation channels: homing in on the elusive CAN channels. *Curr Biol* 12:R520–R522.
- [141] Phillips, A., A. Bull and L. Kelly. 1992. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8:631–642.
- [142] Piriz, J., M. R. Siri, R. Pagani and O. Uchitel. 2003. Nifedipine-mediated mobilization of intracellular calcium stores increases spontaneous neurotransmitter release at neonatal rat motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 306:658–663.
- [143] Polo-Parada, L. and S. Korn. 1997. Block of N-type calcium channels in chick sensory neurons by external sodium. *J Gen Physiol* 109:693–702.
- [144] Postma, M., J. Oberwinkler and D. Stavenga. 1999. Does Ca^{2+} reach millimolar concentrations after single photon absorption in *Drosophila* photoreceptor microvilli? *Biophys J* 77:1811–1823.

- [145] Prawitt, D., M. Monteilh-Zoller, L. Brixel, C. Spangenberg, B. Zabel, A. Fleig and R. Penner. 2003. TRPM5 is a transient Ca^{2+} -activated cation channel responding to rapid changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15166–15171.
- [146] Prawitt, D., T. Enklaar, G. Klemm, B. Gärtner, C. Spangenberg, A. Winterpacht, M. Higgins, J. Pelletier and B. Zabel. 2000. Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet* 9:203–216.
- [147] Pérez, C., L. Huang, M. Rong, J. Kozak, A. Preuss, H. Zhang, M. Max and R. Margolskee. 2002. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5:1169–1176.
- [148] Pusch, M. and E. Neher. 1988. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch* 411:204–211.
- [149] Pusch, M. 1990. Open-channel block of sodium channels by intracellular magnesium. *Eur Biophys J* 18:317–326.
- [150] Ramsey, I., M. Delling and D. Clapham. 2006. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619–647.
- [151] Rohács, T., C. Lopes, I. Michailidis and D. Logothetis. 2005. $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8:626–634.
- [152] Romani, A. and A. Scarpa. 2000. Regulation of cellular magnesium. *Front Biosci* 5:D720–D734.
- [153] Runnels, L., L. Yue and D. Clapham. 2002. The TRPM7 channel is inactivated by PIP_2 hydrolysis. *Nat Cell Biol* 4:329–336.
- [154] Runnels, L., L. Yue and D. Clapham. 2001. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 291:1043–1047.
- [155] Rupprecht, R. and F. Holsboer. 1999. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* 22:410–416.
- [156] Sanguinetti, M. and R. Kass. 1984. Photoalteration of calcium channel blockade in the cardiac Purkinje fiber. *Biophys J* 45:873–880.

- [157] Sano, Y., K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, H. Yokoi, H. Matsushime and K. Furuichi. 2001. Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science* 293:1327–1330.
- [158] Sather, W. and E. McCleskey. 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol* 65:133–159.
- [159] Schaefer, M., T. D. Plant, A. G. Obukhov, T. Hofmann, T. Gudermann and G. Schultz. 2000. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* 275:17517–17526.
- [160] Schaefer, M. 2005. Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflügers Arch* 451:35–42.
- [161] Schlingmann, K., S. Weber, M. Peters, L. N. Nejsum, H. Vitzthum, K. Klingel, M. Kratz, E. Haddad, E. Ristoff, D. Dinour, M. Syrrou, S. Nielsen, M. Sassen, S. Waldegger, H. Seyberth and M. Konrad. 2002. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* 31:166–170.
- [162] Schmitz, C., A.-L. Perraud, C. Johnson, K. Inabe, M. Smith, R. Penner, T. Kurosaki, A. Fleig and A. Scharenberg. 2003. Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. *Cell* 114:191–200.
- [163] Schneggenburger, R., Z. Zhou, A. Konnerth and E. Neher. 1993. Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* 11:133–143.
- [164] Schneggenburger, R. 1996. Simultaneous measurement of Ca^{2+} influx and reversal potentials in recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophys J* 70:2165–2174.
- [165] Schumacher, M., Y. Akwa, R. Guennoun, F. Robert, F. Labombarda, F. Desarnaud, P. Robel, A. D. Nicola and E. Baulieu. 2000. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol* 29:307–326.
- [166] Smith, G., M. Gunthorpe, R. Kelsell, P. Hayes, P. Reilly, P. Facer, J. Wright, J. Jerman, J.-P. Walhin, L. Ooi, J. Egerton, K. Charles, D. Smart, A. Randall, P. Anand and J. Davis. 2002. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418:186–190.

- [167] Stowers, L., T. Holy, M. Meister, C. Dulac and G. Koentges. 2002. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295:1493–1500.
- [168] Straub, I. Charakterisierung von TRPM3 ähnlichen Strömen im endokrinen Pankreas. (Diplomarbeit), *Biologie, Universität des Saarlandes* 2006.
- [169] Strübing, C., G. Krapivinsky, L. Krapivinsky and D. Clapham. 2001. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29:645–655.
- [170] Strübing, C., G. Krapivinsky, L. Krapivinsky and D. Clapham. 2003. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* 278:39014–39019.
- [171] Strotmann, R., C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz and T. Plant. 2000. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2:695–702.
- [172] Sukharev, S. and A. Anishkin. 2004. Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems? *Trends Neurosci* 27:345–351.
- [173] Sukharev, S. and D. Corey. 2004. Mechanosensitive channels: multiplicity of families and gating paradigms. *Sci STKE* 2004:re4.
- [174] Suzuki, M., A. Mizuno, K. Kodaira and M. Imai. 2003. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278:22664–22668.
- [175] Tabuchi, K., M. Suzuki, A. Mizuno and A. Hara. 2005. Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci Lett* 382:304–308.
- [176] Takezawa, R., C. Schmitz, P. Demeuse, A. Scharenberg, R. Penner and A. Fleig. 2004. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6009–6014.
- [177] Tiruppathi, C., M. Freichel, S. Vogel, B. Paria, D. Mehta, V. Flockerzi and A. Malik. 2002. Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ Res* 91:70–76.
- [178] Tominaga, M., M. Caterina, A. Malmberg, T. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. Raumann, A. Basbaum and D. Julius. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543.

- [179] Topala, C., W. Groenestege, S. Thébault, D. van den Berg, B. Nilius, J. Hoenderop and R. Bindels. 2006. Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPM6. *Cell Calcium* .:
- [180] Tsavaler, L., M. Shapero, S. Morkowski and R. Laus. 2001. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61:3760–3769.
- [181] Tsuruda, P., D. Julius and D. Minor. 2006. Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* 51:201–212.
- [182] Ullrich, N., T. Voets, J. Prenen, R. Vennekens, K. Talavera, G. Droogmans and B. Nilius. 2005. Comparison of functional properties of the Ca²⁺-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice. *Cell Calcium* 37:267–278.
- [183] van Abel, M., J. Hoenderop and R. Bindels. 2005. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371:295–306.
- [184] Vandenberg, C. 1987. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci USA Vandenberg1987* 84:2560–2564.
- [185] Vannier, B., M. Peyton, G. Boulay, D. Brown, N. Qin, M. Jiang, X. Zhu and L. Birnbaumer. 1999. Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2060–2064.
- [186] Vennekens, R., J. G. Hoenderop, J. Prenen, M. Stuiver, P. Willems, G. Droogmans, B. Nilius and R. Bindels. 2000. Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 275:3963–3969.
- [187] Vernino, S., M. Rogers, K. Radcliffe and J. Dani. 1994. Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 14:5514–5524.
- [188] Voets, T., A. Janssens, G. Droogmans and B. Nilius. 2004. Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. *J Biol Chem* 279:15223–15230.

- [189] Voets, T., A. Janssens, J. Prenen, G. Droogmans and B. Nilius. 2003. Mg²⁺-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6. *J Gen Physiol* 121:245–260.
- [190] Voets, T., B. Nilius, S. Hoefs, A. van der Kemp, G. Droogmans, R. Bindels and J. Hoenderop. 2004. TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem* 279:19–25.
- [191] Voets, T., G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi and B. Nilius. 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430:748–754.
- [192] Vriens, J., H. Watanabe, A. Janssens, G. Droogmans, T. Voets and B. Nilius. 2004. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:396–401.
- [193] Wagner, T. Pharmakologische Charakterisierung von TRPM3 kodierenden Ionenkanälen. (Diplomarbeit), *Biologie, Universität des Saarlandes* 2005.
- [194] Walder, R., D. Landau, P. Meyer, H. Shalev, M. Tsolia, Z. Borochowitz, M. Boettger, G. Beck, R. Englehardt, R. Carmi and V. Sheffield. 2002. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 31:171–174.
- [195] Watanabe, H., J. Davis, D. Smart, J. Jerman, G. Smith, P. Hayes, J. Vriens, W. Cairns, U. Wissenbach, J. Prenen, V. Flockerzi, G. Droogmans, C. Benham and B. Nilius. 2002. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* 277:13569–13577.
- [196] Watanabe, H., J. Vriens, J. Prenen, G. Droogmans, T. Voets and B. Nilius. 2003. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424:434–438.
- [197] Watanabe, H., J. Vriens, S. Suh, C. Benham, G. Droogmans and B. Nilius. 2002. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277:47044–47051.
- [198] Wehage, E., J. Eisfeld, I. Heiner, E. Jüngling, C. Zitt and A. Lückhoff. 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.

- [199] Wes, P., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten and C. Montell. 1995. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9652–9656.
- [200] Wischmeyer, E., K. Lentens and A. Karschin. 1995. Physiological and molecular characterization of an IRK-type inward rectifier K⁺ channel in a tumour mast cell line. *Pflugers Arch* 429:809–819.
- [201] Xu, H., I. Ramsey, S. Kotecha, M. Moran, J. Chong, D. Lawson, P. Ge, J. Lilly, I. Silos-Santiago, Y. Xie, P. DiStefano, R. Curtis and D. Clapham. 2002. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418:181–186.
- [202] Xu, S.-Z., F. Zeng, G. Boulay, C. Grimm, C. Harteneck and D. Beech. 2005. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol* 145:405–414.
- [203] Xu, X., F. Moebius, D. Gill and C. Montell. 2001. Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10692–10697.
- [204] Yeh, B.-I., T.-J. Sun, J. Lee, H.-H. Chen and C.-L. Huang. 2003. Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. *J Biol Chem* 278:51044–51052.
- [205] Yeh, B.-I., Y. Kim, W. Jabbar and C.-L. Huang. 2005. Conformational changes of pore helix coupled to gating of TRPV5 by protons. *EMBO J* 24:3224–3234.
- [206] Yue, L., J. Peng, M. Hediger and D. Clapham. 2001. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* 410:705–709.
- [207] Zalewski, P., S. Millard, I. Forbes, O. Kapaniris, A. Slavotinek, W. Betts, A. Ward, S. Lincoln and I. Mahadevan. 1994. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J Histochem Cytochem* 42:877–884.
- [208] Zeilhofer, H., M. Kress and D. Swandulla. 1997. Fractional Ca²⁺ currents through capsaicin- and proton-activated ion channels in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 503 (Pt 1):67–78.
- [209] Zhang, Y., M. Hoon, J. Chandrashekar, K. Mueller, B. Cook, D. Wu, C. Zuker and N. Ryba. 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293–301.

- [210] Zheng, J., C. Dai, P. Steyger, Y. Kim, Z. Vass, T. Ren and A. Nuttall. 2003. Vanilloid receptors in hearing: altered cochlear sensitivity by vanilloids and expression of TRPV1 in the organ of corti. *J Neurophysiol* 90:444–455.
- [211] Zhou, Z. and E. Neher. 1993. Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch* 425:511–517.
- [212] Zitt, C., A. Zobel, A. Obukhov, C. Harteneck, F. Kalkbrenner, A. Lückhoff and G. Schultz. 1996. Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16:1189–1196.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. V. Flockerzi bedanken, der es mir ermöglicht hat meine Promotionsarbeit hier in Homburg am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie anzufertigen sowie bei Herrn Dr. J. Oberwinkler, der die praktische Arbeit während der drei Jahre betreut hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor R. W. Hartmann für die Übernahme des Koreferates sowie Herrn Professor Dr. J. Rettig für den Vorsitz in der Prüfungskommission.

Desweiteren danke ich allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. S. Lambert. Vielen, vielen Dank Sachar für alles.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. B. Niemeyer, deren Patch-clamp-Messtand ich für meine Patch-clamp-Messungen mitbenutzen durfte; bei Herrn Dr. S. Philipp, der mir die cDNAs von TRPM3 zur Verfügung gestellt hat; bei Frau Heidi Löhr, die mir zu Beginn der Promotionsarbeit ihr Wissen über die Zellkultur vermittelt und mich später in der Zellkultur unterstützt hat, und bei Herrn Martin Simon-Thomas, der die zahlreichen defekten Geräte repariert hat und mir in Computerfragen immer weitergeholfen hat. Auch danke ich den übrigen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie für das gute Arbeitsklima und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bei auftretenden Fragen.

Zum Schluß gilt mein Dank noch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, sowie allen meinen Freunden, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt und aufgebaut haben. Danke!