

Aus der Fachrichtung 2.4, Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Elektrophysiologische Charakterisierung der
murinen Ionenkanäle TRPM1 und TRPM3 und
des TRPM Kanals von
Drosophila melanogaster

Dissertation zur Erlangung des Grades der Doktorin der Naturwissenschaften der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Homburg 2010

vorgelegt von: Anna-Dorothee Drews
geboren am: 23.08.1980 in Düsseldorf

Zusammenfassung

Bei TRPM3 (Transient Receptor Potential Melastatin) Kanälen handelt es sich um nicht selektive Kationen-Kanäle, welche zur großen Familie der TRP-Kanäle gehören. Ziel der hier beschriebenen Doktorarbeit ist die elektrophysiologische Charakterisierung von TRPM3-Kanälen, sowie der Nachweis, dass es sich beim murinen TRPM1-Protein sowie dem einzigen in *Drosophila melanogaster* vorkommenden TRPM-Protein ebenfalls um Ionenkanalbildende Proteine handelt. Beide Proteine sind hoch homolog zum TRPM3-Kanal.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass TRPM3-Kanäle durch das Steroid Pregnenolonsulfat (PregS) schnell (< 1 s), reversibel und dosisabhängig aktiviert werden. In den hier präsentierten Versuchen ließ sich durch Patch Clamp whole cell Messungen nachweisen, dass PregS TRPM3-Kanäle durch Bindung an eine für diese Substanz spezifische Bindungsstelle aktiviert. Diese befindet sich entweder im extrazellulären Bereich des TRPM3-Proteins selbst oder an einem Protein in unmittelbarer Nähe des untersuchten Kanals. TRPM3-Kanäle sind für eine Vielzahl divalenter Kationen, besonders Ca^{2+} -Ionen, leitfähig. Durch extrazelluläres Na^+ hingegen werden die Kanäle inhibiert. Ich konnte mittels Untersuchungen mehrerer Punktmutationen der geladenen Aminosäuren in der Porenregion des TRPM3-Kanals zeigen, dass die Position E1057 entscheidend für den vom Kanal gezeigten Na^+ -Block und die Permeabilität von Ca^{2+} ist.

Aus Versuchen mit Chimären und Cotransfektionen aus TRPM3- und TRPM1-Proteinen ging hervor, dass es sich beim TRPM1-Protein um ein Ionenkanalbildendes Protein handelt. Wie sich im Verlauf der Untersuchungen zeigte, können TRPM1-Kanäle ebenfalls dosisabhängig durch PregS aktiviert werden, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als TRPM3-Kanäle. Weiterhin konnte ich anhand von Cotransfektionen mit TRPM1- und TRPM3-Proteinen belegen, dass die beiden homologen Kanäle TRPM1 und TRPM3 miteinander interagieren und so ebenfalls funktionelle Ionenkanäle bilden. Während jedoch TRPM3-Kanäle permeabel für Zn^{2+} -Ionen sind, werden TRPM1-Kanäle, sowie alle von mir gemessenen Konstrukte, welche eine TRPM1-Pore enthalten, von Zn^{2+} -Ionen schon bei Konzentrationen im niedrigen μM -Bereich inhibiert. Messungen mit Zn^{2+} an Zellen, die sowohl TRPM1- als auch TRPM3-Proteine co-exprimierten, zeigten, dass die Zellen eine deutlich niedrigere Leitfähigkeit für Zn^{2+} -Ionen zeigten als jene, die nur mit TRPM3 transfiziert

wurden. Es ist somit anzunehmen, dass das TRPM1-Protein einen dominant negativen Effekt auf TRPM3-Kanäle hat. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass TRPM1 einen regulatorischen Einfluss auf TRPM3 in Zn^{2+} abhängigen Prozessen hat, in Zellen, in denen beide Proteine exprimiert werden.

In einem weiteren Teilprojekt, wurde das bis dahin weitestgehend unbekannte, einzige in *Drosophila* vorkommende dTRPM-Protein untersucht. Auch hier konnte ich nachweisen, dass es sich um ein Ionenkanalbildendes Protein handelt. Dieser Kanal, wie sich anhand von Messungen des dTRPM WT und der Punktmutation E1007Q in der Porenregion herausstellte, ist permeabel für die meisten divalenten Kationen. Es wurde eine hohe Permeabilität für Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} und Ca^{2+} , sowie eine besonders hohe für Zn^{2+} belegt.

Summary

TRPM3 (Transient Receptor Potential Melastatin) channels are non-selective cation channels and belong to the large TRP channel family. The ambition of this work was the detailed electrophysiological characterization of TRPM3 channels and furthermore the verification that the murine TRPM1 protein as well as the only TRPM protein in *Drosophila melanogaster* (dTRPM) are also ion channels. Both proteins, TRPM1 and dTRPM, are highly homologous to TRPM3 proteins.

The steroid Pregnenolone sulfate (PregS) was previously shown to be a well working agonist for TRPM3 channels. TRPM3 is fast (< 1 s) and reversibly activated by PregS in a dose-dependent manner. In whole cell patch-clamp measurements I could show that PregS activates the channel by binding to a binding site specific for this steroid. This site is either located at the TRPM3 protein itself or at a protein close to it. TRPM3 channels are permeable for a plethora of divalent cations, especially Ca^{2+} , whereas extracellular Na^+ inhibits this channel. By investigating point mutations of charged amino acids in the TRPM3 pore region, I could show that the position E1057 is crucial for both, Ca^{2+} permeability and Na^+ block, of TRPM3 channels. Moreover, measurements from chimaeras and cotransfections demonstrated that the TRPM1 protein is also an ion channel. These channels are like TRPM3 channels quickly, reversibly and dose-dependently activated by PregS, but to a smaller extent. Further experiments with the cotransfection from the TRPM1 and TRPM3 proteins showed that these homologous channels interact with each other and form functional heteromeric ion channels. Whereas TRPM3 channels are permeable for Zn^{2+} , TRPM1 channels and all other measured chimaeric and mutated constructs containing the TRPM1 pore are inhibited by Zn^{2+} . This inhibition occurs at Zn^{2+} concentrations in the low μM range. Cells coexpressing TRPM1 and TRPM3 proteins show a lower conductance for Zn^{2+} compared to cells expressing only TRPM3 channels. Hence it is to assume that TRPM1 has a dominant negative effect on TRPM3 channels. This result leads to the supposition that TRPM1 has a regulatory influence on TRPM3 in Zn^{2+} dependent physiological processes in cells coexpressing both proteins.

In an additionally project, I investigated the thitherto mostly unknown protein dTRPM. It is the only TRPM protein in *Drosophila melanogaster*. Measurements were made with dTRPM WT and a point mutation in the pore region dTRPM_{E1007Q}. It could be

shown that dTRPM forms indeed a functional ion channel, which is permeable for Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} and especially for Zn^{2+} .

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-propionsäure
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
bzw.	beziehungsweise
d.h.	das heißt
DM	Doppelmutante
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	effektive Konzentration, die zu einer 50%igen Aktivierung des Ionenkanals führt
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ent-PregS	synthetisches Enantiomer des Pregnenolonsulfats
E _{rev}	Umkehrpotential
°C	Grad Celsius
GABA	γ -Aminobuttersäure
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
IC ₅₀	effektive Konzentration, die zu einer 50%igen Inhibierung des Ionenkanals führt
Ins1	Ratten-Insulinoma-Zelllinie (Asfari et al., 1992)
max	Maximum
mOsm	Milliosmol
mV	Millivolt
n	Anzahl
nA	Nanoampere
nat-PregS	natürliches Enantiomer des Pregnenolonsulfats
Nif	Nifedipin
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDG ⁺	N-Methyl-D-Glucamin-Ion
PAORAC	Proton Activated Outwardly Rectifying Anion Current, Protonenaktivierter auswärtsrektifizierender Anionenstrom

pBS	plasmid Bluescript (Vektor)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Konzentration
PregS	Pregnenolonsulfat
RT	Raumtemperatur
SEM	Fehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean)
T	Temperatur in Kelvin
TRP	Transient Receptor Potential
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
u.a.	unter anderem
V	Volt
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Summary	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Ionenkanäle	1
1.2. TRP-Kanäle	2
1.2.1. TRPM-Kanäle	4
1.3. Neurosteroide	8
1.3.1. Pregnenolonsulfat.....	9
1.4. 1,4-Dihydropyridine	11
2. Fragestellung.....	13
3. Material und Methoden.....	14
3.1. Material	14
3.1.1. Lösungen.....	14
3.2. Methoden	15
3.2.1. Zellkultur und Transfektionen	15
3.2.2. Molekularbiologie.....	16
3.2.3. Patch Clamp Technik	18
3.2.4. Der Messstand	18
3.2.5. Analyse und Statistik	19
4. Wirkung von Nifedipin und der zwei Enantiomere von PregS auf TRPM3-Kanäle	21
4.1. Zusammenfassung.....	21
4.2. Einleitung	21
4.3. Material und Methoden	23
4.3.1. Elektrophysiologie	24
4.3.2. Kapazitätsmessungen	24
4.3.3. Verwendete Zelllinien	24

4.3.4. Lösungen.....	24
4.4. Ergebnisse: PregS und Nif im Vergleich	25
4.5. Ergebnisse: nat- und ent-PregS im Vergleich	26
4.6. Diskussion.....	28
5. Punktmutationen in der Porenregion des TRPM3 und ihre Auswirkungen auf die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals.	30
5.1. Zusammenfassung.....	30
5.2. Einleitung	31
5.3. Material und Methoden	32
5.3.1. Elektrophysiologie	32
5.3.2. Molekularbiologie.....	32
5.3.3. Zellkultur.....	33
5.3.4. Lösungen.....	34
5.4. Ergebnisse	35
5.5. Diskussion.....	41
6. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den funktionellen Eigenschaften von TRPM1 und TRPM3	43
6.1. Zusammenfassung.....	43
6.2. Einleitung	44
6.3. Material und Methoden	46
6.3.1. Elektrophysiologie	46
6.3.2. Molekularbiologie.....	46
6.3.3. Zellkultur.....	49
6.3.4. Lösungen.....	49
6.4. Ergebnisse	50
6.5. Diskussion.....	63
7. Der TRPM-Kanal von <i>Drosophila melanogaster</i>	66
7.1. Zusammenfassung.....	66
7.2. Einleitung	66
7.3. Material und Methoden	69
7.3.1. Elektrophysiologie	69
7.3.2. Molekularbiologie.....	69

7.3.3. Zellkultur	70
7.3.4. Lösungen.....	70
7.4. Ergebnisse	71
7.5. Diskussion.....	76
8. Ausblick	79
9. Literaturverzeichnis	80
10. Danksagung	90
11. Veröffentlichungen	93
12. Lebenslauf.....	92

1. Einleitung

1.1. Ionenkanäle

Ionenkanäle in biologischen Membranen können von Proteinen bzw. Proteinkomplexen gebildet werden. Sie bilden ionendurchlässige Poren, welche das Einströmen von Ionen in die Zelle und deren Ausströmen aus der Zelle in signifikantem Ausmaß ermöglichen. So wird der Ionenaustausch zwischen Zellinnerem und Zelläußerem gewährleistet, da die Zellmembran selbst für Ionen weitestgehend undurchlässig ist. Ionenkanäle sind an unterschiedlichsten Prozessen im Organismus beteiligt, z.B. an der Kommunikation zwischen den Zellen, an der Vermittlung und Regulierung der elektrischen Erregbarkeit, an der Zellvolumenregulation, an der Zellproliferation, am Zelltod sowie bei der Neurotransmitter- und Hormonsekretion, um nur einige Beispiele zu nennen (Hille, 2001).

Man unterscheidet Ionenkanäle anhand ihrer Aktivierungsmechanismen in spannungsgesteuerte („voltage-operated channels“) und ligandengesteuerte („ligand-operated“) Ionenkanäle (Hille, 2001). Die erstgenannten Kanäle verfügen über einen Spannungssensor, welcher eine Veränderung der elektrischen Membranspannung detektiert und hierauf mit einer Konformationsänderung reagiert. Dies wiederum führt zur Öffnung des Kanals. Bis heute sind spannungsgesteuerte Na^+ -, K^+ -, Cl^- - und Ca^{2+} -Kanäle, sowie spannungsgesteuerte unselektive Ionenkanäle beschrieben. Ligandengesteuerte Ionenkanäle hingegen besitzen eine spezifische Liganden-Bindungsstelle, welche intra- wie auch extrazellulär positioniert sein kann. Als Liganden kommen unterschiedlichste endogene und exogene Substanzen (u.a. Neurotransmitter, Lipide, Nukleotide und deren Metaboliten, sowie natürliche und synthetische organische Produkte) vor. Diese führen, nach Bindung an die spezifische Bindungsstelle, zu einer Konformationsänderung des Kanals und dessen Öffnung. Neben diesen beiden Typen sind noch Ionenkanäle bekannt, die sich durch bloße mechanische Reize öffnen (mechanosensitive Ionenkanäle) (Hamill & Martinac, 2001; Sukharev & Anishkin, 2004; Sukharev & Covey, 2004b). Es sind ebenfalls Ionenkanäle bekannt, die sowohl spannungsabhängig wie auch ligandengesteuert sind. Bekannt ist dies beispielsweise für einige Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM)-Kanäle wie TRPM4 (Nilius et al., 2003), TRPM5 (Hofmann et al., 2003) und auch für TRPM8 (Voets et al., 2004a). Ebenso zeigte sich, dass TRPV5- und

TRPV6-Kanäle spannungsabhängig durch extrazelluläres Mg^{2+} inhibiert werden (Voets et al., 2003) und TRPM4- und TRPM5-Kanäle bei Hyperpolarisation inaktivieren (Nagata et al., 2005).

Doch nicht nur durch ihre Aktivierungsmechanismen sondern auch über ihr unterschiedliches Selektivitätsverhalten lassen sich Ionenkanäle in Gruppen unterteilen, in selektive und nicht selektive Ionenkanäle (Corry et al., 2006). Selektiv bedeutet, dass der Ionenkanal weitestgehend für nur eine bestimmte Ionensorte permeabel ist, während nicht selektive Ionenkanäle mehrere Ionensorten passieren lassen.

Eine recht heterogene Familie von Ionenkanälen, deren Mitglieder in Hefen und Tieren zu finden sind und die sich sowohl in ihren Aktivierungsmechanismen als auch in ihren Permeations- und Selektivitätseigenschaften deutlich unterscheiden, ist die TRP-Familie.

1.2. TRP-Kanäle

Ein TRP-Protein wurde erstmals in einer *Drosophila*-Mutante entdeckt (Minke, 1977; Cosens & Manning, 1969), die auf einen anhaltenden Lichtreiz, im Gegensatz zum Wildtyp (WT) in ihren Photorezeptorzellen, nur ein transientes Rezeptorpotential aufbaut (Cosens & Manning, 1969). Dieser Mutante fehlt ein Gen, welches aufgrund dieses Phänotyps „transient receptor potential“ (*trp*) Gen genannt wird (Minke, 1977; Montell & Rubin, 1998). Nach der Entdeckung dieses TRP-Proteins begannen eine Reihe von Wissenschaftler mit der intensiven Suche nach homologen Proteinen in anderen Spezies. Fündig wurden sie in Hefen (u.a. *Saccharomyces cerevisiae*) (Palmer et al., 2001), Würmern (u.a. *Caenorhabditis elegans*) (Harteneck et al., 2000), Fliegen (Montell, 2005), Fischen (Elizondo et al., 2007) und Säugetieren. In Pflanzen sind bislang noch keine TRP-Kanäle bekannt. Auch TRPM-Kanäle wurden in mehreren Stämmen, reichend von Protisten (Protista, eukaryotische Ein- bis Wenzeller) bis hin zum Menschen gefunden (Mederos y Schnitzler et al., 2008).

Die Familie der TRP-Kanäle von Säugetieren zählt 28 Mitglieder, welche in sechs Klassen unterteilt wurden (Abb. 1) (Nilius et al., 2007). TRPA-(ankyrin), TRPC-(canonische), TRPM-(melastatin), TRPML-(mucolipin), TRPP-(polycystin) und TRPV-

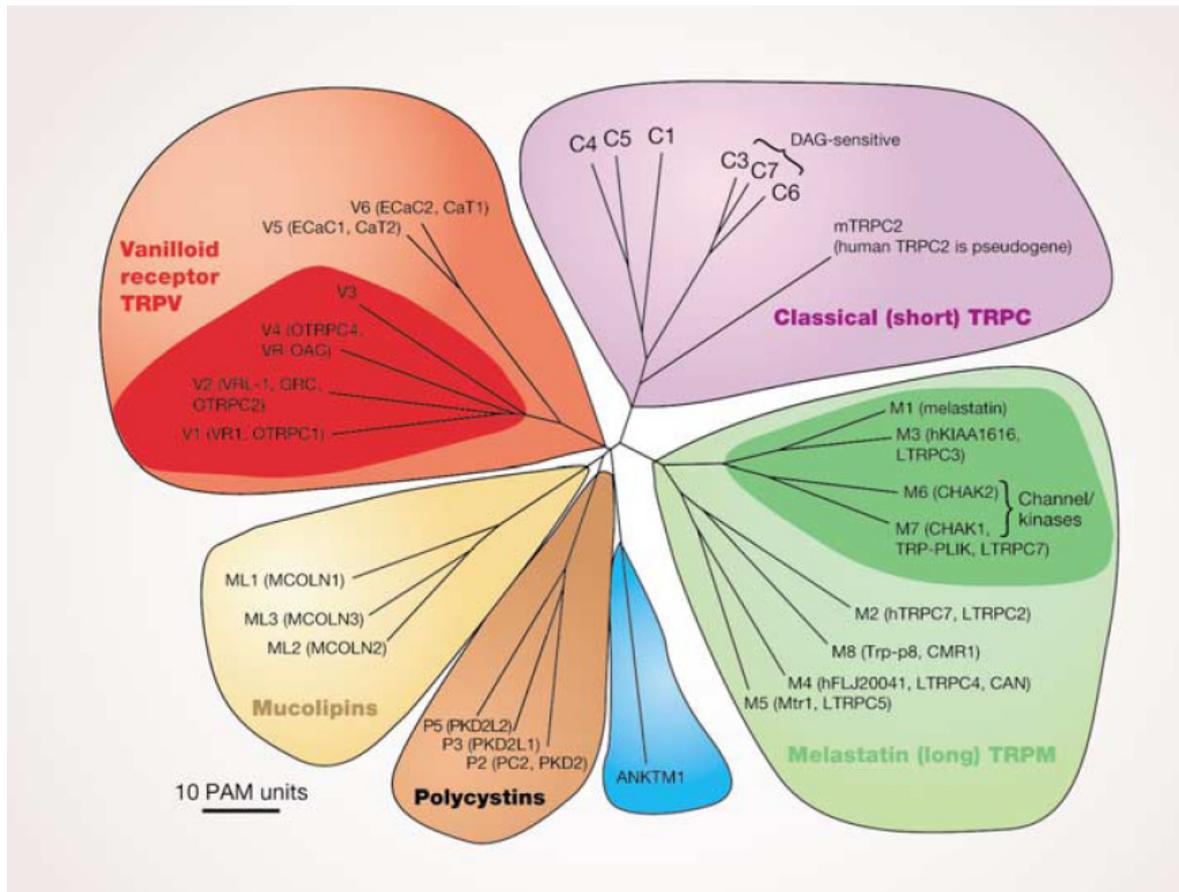


Abb. 1: Stammbaum der TRP Ionenkanal-Familie (Clapham, 2003).

(vanniloid) Kanäle. Die Mitglieder der einzelnen Klassen weisen deutliche Sequenzhomologien untereinander auf. Zwischen den Klassen ist diese Homologie deutlich geringer. Bei allen TRP-Kanälen geht man aber davon aus, dass sie sechs Transmembrandomänen mit einer Porenregion zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne besitzen. Es wird weiterhin angenommen und ist bereits auch für einige Kanäle gezeigt (Erlor et al., 2004; Hoenderop et al., 2003), dass sie Tetramere bilden (Abb. 2). Sie ähneln somit in ihrer Topologie den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen. Die Bildung von Tetrameren kann zwischen identischen (Homomultimere), aber auch unterschiedlichen (Heteromultimere) TRP-Protein-Untereinheiten zustande kommen (Garcia-Sanz et al., 2004; Hellwig et al., 2005; Schaefer, 2005).

Alle Mitglieder der TRP-Familie bilden Kationen-Kanäle aus. Mit Ausnahme von TRPM4 und TRPM5 (Launay et al., 2002; Hofmann et al., 2003; Nilius et al., 2005), die ausschließlich für monovalente Kationen permeabel sind, handelt es sich um



Abb. 2:
Angenommene Tetramerstruktur von TRP-Kanälen (Wollenberg aus Eler et al., 2004).

Kationen-Kanäle mit meist hoher Permeabilität für divalente Kationen. Besonders für Ca^{2+} , welches bei vielen physiologischen Abläufen, u.a. als sekundärer Botenstoff oder bei Zellwachstum, Zelltod, Kommunikation zwischen Zellen, Exozytose, Erregbarkeit von Zellen und Stoffwechselfvorgängen von großer Bedeutung ist.

TRP-Kanäle werden durch eine große Anzahl verschiedener chemischer Substanzen aktiviert. Die meisten der bisher gefundenen Agonisten stammen aus Pflanzen (Vriens et al., 2008). So aktiviert z.B. Menthol den TRPM8-Kanal (Mckemy et al., 2002; Peier et al., 2002) und Capsaicin (u.a. in Chilischoten vorkommend) aktiviert TRPV1-Kanäle (Caterina et al., 1997). Körpereigene Substanzen, die die Aktivität von TRP-Kanälen beeinflussen, sind hingegen bisher weniger bekannt. Diese endogen gebildeten Substanzen sind jedoch die, bei denen eine physiologische Relevanz wahrscheinlich ist. Jedoch ist für einige TRP-Kanäle noch nicht bekannt, ob sie im physiologischen Kontext überhaupt durch körpereigene chemische Stimuli beeinflusst und wie sie physiologisch reguliert werden.

1.2.1. TRPM-Kanäle

Die Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM)-Unterfamilie der Säugetiere besteht aus insgesamt acht Mitgliedern TRPM1-8 (Abb. 1) (Clapham et al., 2001). Diese Unterfamilie der TRP-Kanäle bekam ihren Namen durch das zuerst entdeckte Mitglied TRPM1, welches in Melanomazellen identifiziert wurde und daher den Namen Melastatin erhielt (Duncan et al., 1998; Hunter et al., 1998). Ihre phylogenetische Analyse lässt sie in vier weitere Untergruppen unterteilen: TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5, TRPM6/TRPM7 und TRPM2/TRPM8 (Harteneck, 2005).

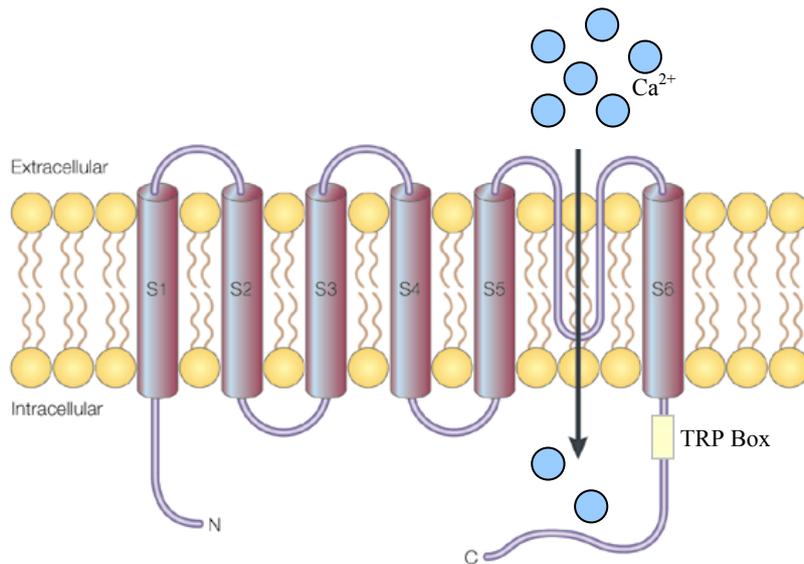


Abb. 3:
Angenommene Struktur
von TRPM3 (Clapham et
al. 2001, modifiziert).

Ebenso wie alle übrigen TRP-Kanäle besitzen auch TRPM-Kanäle jeweils sechs Transmembrandomänen und eine Porenregion zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne. Des Weiteren weisen sie einen intrazellulären C- und N-Terminus, sowie eine TRP-Box in ihrem C-Terminus auf (Clapham, 2003).

Trotz dieser Gemeinsamkeiten weist diese Unterfamilie Heterogenität bezüglich ihrer Expressionsmuster, Permeabilitäten, Aktivierungsmechanismen und physiologischen Funktionen auf. U.a. sind sie an Prozessen wie der Kältewahrnehmung (TRPM8) (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002), Wahrnehmung von Geschmack (TRPM5) (Zhang et al., 2003), Mg^{2+} -Homeostasis (TRPM6 und TRPM7) (Schlingmann et al., 2007) und weitere beteiligt. Diese Heterogenität wird noch durch die Bildung von Heteromultimeren, z.B. zwischen TRPM6 und TRPM7 (Chubanov et al., 2005; Li et al., 2006), sowie das Auftreten von Spleißvarianten (Oberwinkler et al., 2005) weiter verstärkt.

1.2.1.1. TRPM1

Das TRPM1-Gen wurde ursprünglich in Melanomazellen identifiziert und Melastatin genannt (Duncan et al., 1998; Hunter et al., 1998). TRPM1 ist recht hoch exprimiert in nicht metastasierenden Melanozyten und deutlich herunterreguliert in jenen, die Metastasen bilden (Duncan et al., 1998). Daher ist das Expressionslevel des TRPM1-Proteins ein nützlicher Marker für die klinische Einordnung von Melanomen (Duncan et al., 2001; Carlson et al., 2005; Erickson et al., 2009).

Im Laufe der letzten Jahre hat sich immer mehr herausgestellt, dass viele Vertreter der TRP-Familie bei unterschiedlichsten physiologischen Vorgängen eine entscheidende Rolle spielen (Clapham et al., 2003). So lassen sich TRPM1-Proteine u.a. in Bipolarzellen und, wie oben schon erwähnt, in Melanozyten nachweisen. Im Fall der Bipolarzellen ist anzunehmen, dass dieses Protein essentiell an der post-synaptischen Signaltransduktionskaskade der Zellen beteiligt ist (Shen et al. 2009; Morgans et al., 2009, Koike et al., 2010). Auf dieses Thema wird ausführlicher im Kapitel 6.2 eingegangen. In neonatalen menschlichen Melanozyten korreliert die Expression des TRPM1-Proteins mit dem Melaningehalt der Zellen. Es wird vermutet, dass die Funktion dieses Proteins entscheidend für die normale Melanozyten-Pigmentierung ist (Oancea et al., 2009). Obwohl TRPM1 das erste klonierte Mitglied der TRPM-Unterfamilie darstellt, sind seine biophysikalischen Eigenschaften noch weitgehend unklar. Eine genauere Beschreibung, so wie die elektrophysiologischen Untersuchungen zum TRPM1-Protein, befinden sich in Kapitel 6.

1.2.1.2. TRPM3

TRPM3-Kanäle sind, wie viele TRP-Kanäle, nichtselektive Kationen-Kanäle. Es konnte nachgewiesen werden, dass TRPM3-Kanäle durch das Steroid Pregnenolonsulfat (PregS) dosisabhängig, schnell (< 1 s) und reversibel aktiviert werden (Wagner et al. 2008). Die Aktivierung erfolgt ausschließlich von der extrazellulären Seite. Die intrazelluläre Applikation von PregS auf den Kanal zeigte in inside out und whole cell Patch Clamp Messungen keine Zunahme der Ströme. In früheren Studien wurden weitere Aktivierungsmechanismen des TRPM3 beschrieben. So soll die Entleerung von intrazellulären Speichern die Aktivität des TRPM3-Kanals verstärken (Lee et al., 2003), was jedoch von Grimm et al. (2003) und Grimm et al. (2005) nicht bestätigt

wurde. Ein Anschwellen der Zellen durch Applikation einer hypoosmotischen Lösung führt laut Grimm et al. (2003) und Harteneck & Reiter (2007) ebenfalls zu einem TRPM3-vermittelten Ca^{2+} -Signal. Des Weiteren ist bekannt, dass Sphingolipid D-erythro-Sphingosin den Kanal aktiviert (Grimm et al., 2005), jedoch deutlich schwächer als PregS (Wagner et al., 2008), und dass Lanthanoid Gadolinium (Gd^{3+}) den TRPM3-Kanal inhibiert (Grimm et al., 2003; Grimm et al., 2005). Xu et al. berichteten (2005), dass sie einen blockierenden Effekt von 1,2-Aminoethoxydiphenyl-Borate (2-APB) auf in HEK293-Zellen überexprimierte TRPM3-Kanäle beobachten konnten.

TRPM3-Kanäle sind, wie TRPM1, ebenfalls in mehreren unterschiedlichen Geweben vorzufinden. U.a. werden sie im Gehirn (speziell im Plexus) (Oberwinkler et al., 2005), in der Hypophyse (Fonfria et al., 2006), im Auge, in der Niere (Lee et al., 2003; Grimm et al., 2003) und in den pankreatischen β -Zellen exprimiert (Wagner et al., 2008). Diese Zellen sind für die Insulinproduktion des Körpers verantwortlich. Es konnte klar gezeigt werden, dass PregS in insulinproduzierenden β -Zellen endogen exprimierte TRPM3-Kanäle aktiviert, was zu einem schnellen Ca^{2+} -Strom führt, welcher wiederum die Insulinsekretion erhöht (Wagner et al. 2008).

Die Erforschung der TRPM3-Kanäle ist jedoch nicht ganz einfach. Aufgrund alternativen Spleißens liegt eine Vielzahl von Varianten vor (Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005), welche sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden (Oberwinkler et al., 2005). Die Spleißvarianten TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 unterscheiden sich nur durch das Fehlen von 12 Aminosäuren und einem Aminosäureaustausch in TRPM3 α 2, doch schon diese geringe Anzahl fehlender Aminosäuren bewirkt deutliche Abweichungen in den Poreneigenschaften.

Die in dieser Arbeit vornehmlich untersuchte Spleißvariante des TRPM3, TRPM3 α 2 ist schwach konstitutiv aktiv und zeigt auswärtsrektifizierende Ströme, die durch intrazelluläres Mg^{2+} inhibiert werden (Oberwinkler et al., 2005). TRPM3 α 2 leitet divalente Kationen, besonders Ca^{2+} (Oberwinkler et al., 2005; Oberwinkler & Philipp, 2007) und wird durch extrazelluläres Na^+ inhibiert (Oberwinkler et al., 2005). TRPM3 α 1 hingegen ist nicht leitfähig für divalente Kationen und weist auch keine Inhibition durch extrazelluläres Na^+ auf. Allerdings zeigt die Spleißvariante TRPM3 α 1 einen deutlich höheren konstitutiven Strom als TRPM3 α 2.

Dank dieser Vorkenntnisse, insbesondere durch das Vorhandensein des sehr wirkungsvollen Agonisten PregS, ist es möglich den TRPM3-Kanal näher zu untersuchen und weiter zu charakterisieren.

Im späteren Verlauf dieser Arbeit wird auch das einzige in *Drosophila melanogaster* vorkommende TRPM-Protein (dTRPM) untersucht. Eine nähere Beschreibung dieses Proteins befindet sich in der Einleitung von Kapitel 7.

1.3. Neurosteroid

Bei Neurosteroiden handelt es sich um im Nervensystem von Nervenzellen und Gliazellen aus Cholesterol hergestellte Steroide. Hierzu gehören u.a. Pregnenolon, Pregnenolonsulfat, Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteronsulfat, Allopregnanolon, Progesteron und deren reduzierte Metaboliten (Abb. 4) (Schumacher et al., 2000).

Da sie im Nervensystem synthetisiert werden, wirken Neurosteroid im Gegensatz zu den klassischen Steroidhormonen der Gonaden und der Nebennieren, welche ihre Ziele über die Blutbahn erreichen, direkt am Bildungsort. Man spricht in diesem Fall von einer autokrinen bzw. parakrinen Wirkungsweise. Aufgrund dieser Tatsache können im Nervensystem lokal deutlich höhere Konzentrationen vorkommen als im Blutplasma (Schumacher et al., 2000).

Da Neurosteroid mit ionotropen und metabotropen Neurotransmitter-Rezeptoren (u.a. NMDA-, AMPA-, GABA_A- und nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor) und vielen anderen Rezeptoren und Ionenkanälen interagieren, beeinflussen sie die Aktivität und Plastizität von Neuronen, sowie die Neurotransmitter- und Neuropeptidfreisetzung.

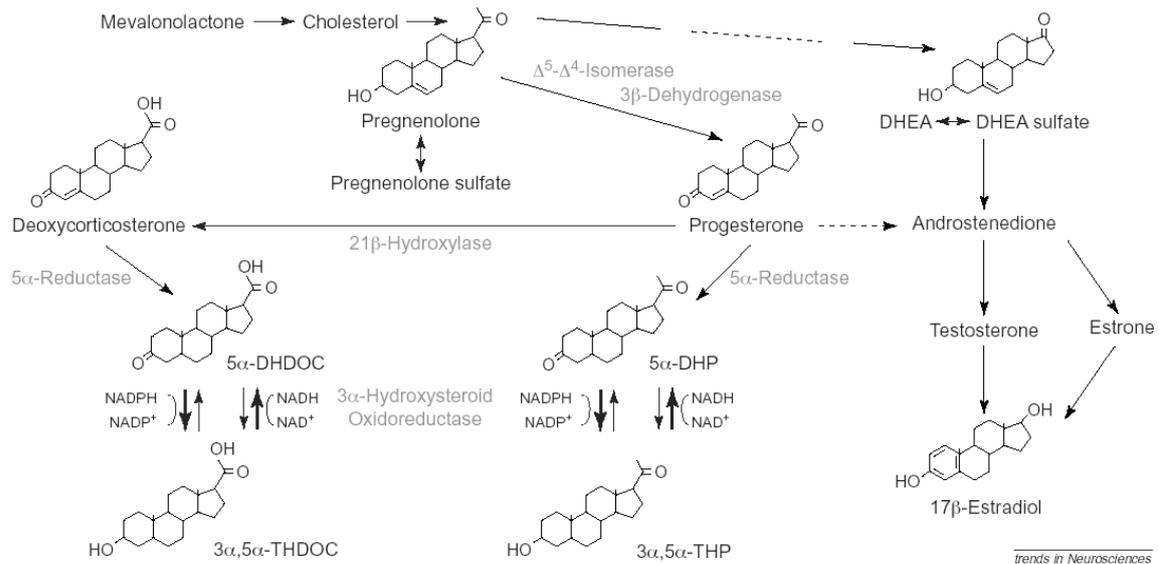


Abb. 4: Biosynthese der Neurosteroiden im Überblick (Rupprecht und Holsboer, 1999).

1.3.1. Pregnenolonsulfat

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, gehört PregS (Abb. 5) zur Gruppe der Steroide. Es handelt sich um Pregnenolon in sulfatierter Form, welches endogen im Körper vorkommt.

Während in einigen älteren Publikationen noch davon ausgegangen wird, dass PregS die höchste Konzentration im Gehirn aufweist (Corpechot et al., 1983), zeigen neuere, dass es dort eher wenig vorkommt (Schumacher et al. 2007). Beide Neurosteroiden, Pregnenolon sowie auch PregS, werden als Mittel zur Verbesserung des Erinnerungsvermögens angepriesen. In Nagetieren konnte ein Zusammenhang zwischen PregS und dem Gedächtnis bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden (Mayo et al., 1993; Flood et al., 1995; Meziane et al., 1996; Vallée et al., 2001). Zusätzlich zeigte PregS bei Nagetieren den Effekt eines Antidepressivums (Reddy und Kulkarni, 1997; Reddy et al., 1998; Urani et al., 2002).

Im Menschen konnten Änderungen der PregS-Konzentration im Blutplasma sowie im Liquor mit Gemütsschwankungen in Zusammenhang gebracht werden (van Broekhoven und Verkes, 2003; Dubrovsky 2005). Doch nicht nur im Gehirn zeigt PregS einen Effekt. Im Verlauf der letzten Jahre stellte sich heraus, dass PregS ein Agonist des hier untersuchten TRPM3-Kanals ist (Wagner et al., 2008).

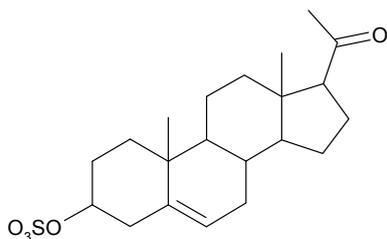


Abb.5 : Strukturformel des Neurosteroids PregS.

Es erwies sich als außerordentlich nützliches Werkzeug, um den Kanal auf seine Eigenschaften hin zu untersuchen.

Neben der Tatsache, dass PregS TRPM3-Kanäle aktiviert, belegen weitere Studien, dass PregS regulatorische Wirkung auf unterschiedliche Kanäle ausübt. Es ist bekannt, dass es in Interaktion mit dem γ -Aminobuttersäure (GABA)_A-Rezeptor tritt. Hier verändert es die Konformation des Rezeptorproteins in einer Art und Weise, die die Wirkung des Neurotransmitters GABA verringert (Majewska et al., 1988; Baulieu, 1998). PregS moduliert den GABA_A-Rezeptor und senkt die durch GABA vermittelten Chloridströme (Roberts, 1995). Doch auch auf den NMDA-Rezeptor wirkt PregS ein. In diesem Fall kommt es zu einer Potentierung der Glutamatströme (Wu et al., 1991). Eine andere Gruppe berichtet, dass PregS eine NMDA-Rezeptorabhängige Dopaminausschüttung aus synaptischen Endigungen im Corpus striatum (Teil der Basalganglien, der zum Großhirn gehört) induziert (Whittaker et al., 2008). Auch über spannungsabhängige Ca²⁺- (VGCCs) und K⁺-Kanäle ist eine Wirkung des PregS bekannt. Spence et al. berichteten im Jahr 1991, dass PregS in isolierten Hippokampalneuronen aus der CA1-Region den Ca²⁺-Einstrom durch VGCCs blockiert. Neuere Studien widerlegen diese Annahme jedoch (Hige et al., 2006). Ebenso wurde eine PregS-bedingte Stromzunahme mittels hKv1.1 und hKv2.1, durch eine Änderung der Kinetik der Kanäle, von Wang et al. (1998) belegt. Kobayashi et al. zeigten 2009, dass dieses Steroid den einwärtsrektifizierenden Strom durch den K⁺-Kanal Kir2.3 potenziert. Diese Beispiele zeigen, dass TRPM3-Kanäle keine Einzelfälle in der Regulierung durch PregS sind. Es ist jedoch unklar, ob PregS der physiologische Aktivator des TRPM3 ist. PregS aktiviert TRPM3-Kanäle mit einem EC₅₀-Wert von 23 μ M (für den Einwärtsstrom, -80 mV) (Wagner et al., 2008). Um TRPM3-Kanäle in heterologen Expressionssystemen zu aktivieren sind 0,35 μ M PregS oder mehr nötig und 5 μ M PregS, um TRPM3-Aktivität in pankreatischen β -Zellen nachzuweisen (Wagner et al., 2008). Im erwachsenen Menschen hat das Blutplasma für gewöhnlich eine PregS-Konzentration von 0,2 bis 0,4 μ M (de Peretti & Mappus, 1983). Obwohl diese

Werte unter den in Wagner et al. (2008) verwendeten Konzentrationen liegen, gibt es physiologische Vorgänge bei denen die Konzentration des PregS soweit erhöht wird, dass es denkbar ist, dass TRPM3-Kanäle aktiviert werden. Beispielsweise liegt der gemessene Wert bei Neugeborenen und im mütterlichen Plasma bei der Geburt bei etwa 5 μM PregS. Eine physiologische Rolle von PregS in der Aktivierung von TRPM3-Kanälen wäre also durchaus denkbar.

Über PregS ist bekannt, dass es stark in die Plasmamembran inseriert (Mennerik et al., 2008). Hier bewirkt dieses Einrücken des PregS eine Änderung der biophysikalischen Membraneigenschaften, welche sich in der Zunahme der Kapazität äußern. Ob es zur Aktivierung der TRPM3-Kanäle durch diese Änderung der Membraneigenschaften oder durch Bindung des PregS an ein Protein kommt, wird in Kapitel 4 untersucht.

1.4. 1,4-Dihydropyridine

Zum ersten Mal wurde die Synthese der Dihydropyridine im Jahr 1882 beschrieben (Hantzsch, 1882). Dass 1,4-Dihydropyridine jedoch auch großes pharmakologisches Potential besitzen und bei der Therapie von koronaren Herzerkrankungen zur Blutdrucksenkung genutzt werden können, zeigte sich erst rund 90 Jahre später (Bossert & Vater, 1971).

Sie hemmen den Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle u.a. in den Gefäßmuskelzellen.

Das einfachste der 1,4-Dihydropyridine ist Nifedipin (Nif) (Abb.6). Nif konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits vor längerem als Agonist des TRPM3 identifiziert werden. Die Stromzunahme durch die Aktivierung ist im Vergleich zu der Zunahme bei PregS deutlich geringer. Auch wird es nicht wie PregS vom Körper selbst produziert, was Nif als physiologisch weniger relevant darstellt als PregS. Nif ist das einzige bisher bekannte 1,4-Dihydropyridin, welches eine solche Wirkung auf den TRPM3-Kanal zeigt (Wagner et al., 2008).

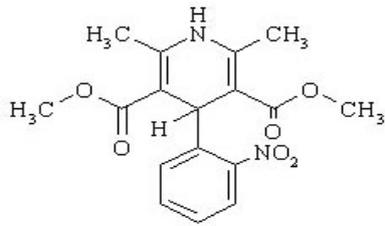


Abb. 6: Strukturformel des 1,4-Dehydropyridins Nif.

Über einen weiteren L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker, Nimodipin, ist bekannt, dass er die PregS-induzierten Ströme durch TRPM3-Kanäle hemmt (Loch, 2007). 2008 wiesen Fajardo et al. nach, dass auch TRPA1-Kanäle durch einige 1,4-Dihydropyridine, genauer gesagt durch Nif, Nimodipin, Nicardipin und Nitrendipin aktiviert werden können.

Im Kapitel 4 wird näher auf die Wirkung von Nif auf TRPM3-Kanäle eingegangen.

2. Fragestellung

Am Anfang dieser Doktorarbeit stand die nähere Charakterisierung des TRPM3-Ionenkanals, insbesondere seiner Poreneigenschaften. Da schon zu Beginn dieser Arbeit bekannt war, dass TRPM3-Kanäle durch das Steroid PregS und das Dihydropyridin Nif aktiviert werden, war es das Ziel, zu ermitteln, ob diese beiden Substanzen die gleiche Bindungsstelle haben oder ob sie von unterschiedlichen Stellen her auf den Kanal einwirken. Auch galt es zu klären, ob PregS, der stärkere der beiden Agonisten, an eine speziell für dieses Steroid geeignete Bindungsstelle bindet oder durch die Insertion in die Membran und die dadurch hervorgerufene Änderung der biophysikalischen Membraneigenschaften den Kanal aktiviert. In einem nachfolgenden Schritt war es das Ziel, anhand von Punktmutationen in der Porenregion des TRPM3-Kanals, eine oder mehrere Positionen zu finden, die entscheidend für einige der bereits bekannten Poreneigenschaften, wie Ca^{2+} -Permeabilität und den Block durch monovalente Kationen sind. Da TRPM3 eine hohe Homologie zum TRPM1-Protein aufweist, über das jedoch nur wenig bekannt ist, war das zweite große Ziel dieser Arbeit, nachzuweisen, dass es sich auch beim TRPM1-Protein um ein Protein handelt, das Ionenkanäle bildet, welche Eigenschaften diese aufweisen und worin die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen TRPM1 und TRPM3 liegen.

Dieser Fragestellung wurde mit Hilfe von Chimären aus TRPM3- und TRPM1-Proteinen, Cotransfektionen und weiteren Konstrukten, in denen die Porenregion des TRPM1 verändert wurde, nachgegangen.

Im dritten Teilprojekt dieser Arbeit wurde das einzige in Drosophila vorkommende TRPM-Protein untersucht, über das zu Beginn dieser Arbeit nur seine Existenz bekannt war. Ebenso wie beim TRPM1-Protein musste zunächst einmal bestätigt werden, dass es sich in der Tat um einen Ionenkanal handelt. Dann konnten seine Eigenschaften ermittelt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Lösungen

Zur Aufbewahrung der Zellen im Kulturschälchen während der Messungen und zum Abspülen der verwendeten Agonisten oder anderer Substanzen, wurde im gesamten Verlauf dieser Doktorarbeit durchweg die hier beschriebene Standardbadlösung verwendet. Für die meisten Versuche wurde die unten stehende Standardintrazellulärlösung verwendet.

Standardbadlösung enthält (in mM): 145 NaCl, 10 CsCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 D-Glucose und 10 HEPES. Zur Einstellung des pH-Werts auf 7,2 wurde NaOH verwendet (2-5 mM). Die Osmolalität lag stets im Bereich von 320 und 330 mOsm.

Standardintrazellulärlösung enthält (in mM): 90 CsAsp, 45 CsCl, 10 BAPTA, 5 EDTA, 4 Na₂ATP und 10 HEPES. Der pH-Wert wurde mit CsOH (ca. 60 mM Cs⁺) auf 7,2 eingestellt.

PregS-Stocklösung: 50 mM PregS in DMSO wurden in 1 ml Aliquots bei ca. 5°C im Kühlschrank aufbewahrt.

PregS-Lösung: Die gewünschte Konzentration des Agonisten wurde der Standardbadlösung zugefügt. Die DMSO-Konzentration erreichte nie mehr als 2 %.

Die Osmolalität aller verwendeten Lösungen wurde mit einem Gefrierpunkt-Osmometer (Gonotec) gemessen.

Alle weiteren verwendeten Lösungen werden in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt und ihre Zusammensetzung dargelegt.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur und Transfektionen

Für diese Promotionsarbeit wurden die untersuchten Zelllinien in 75 cm² großen Gewebekulturflaschen in einer 5% CO₂ enthaltenen Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Hierzu wurden folgende Kulturmedien verwendet:

HEK293-Zelllinie:

MEM Minimal Essential Medium	Gibco #31095-029
10% FKS	Gibco #10270-106

Ins1-Zelllinie:

RPMI Medium	Gibco
10% FKS	Gibco #10270-106
50 µM β-Mercaptoethanol	
1 mM Natriumpyruvat	
10 mM HEPES	

Nach jedem Vereinzeln wurde dem Medium frisch Pen/Strep (10 µl / 1 ml) hinzugegeben.

Stabile TRPM3α2-Zelllinie (α2F2):

MEM Minimal Essential Medium	Gibco #31095-029
10% FKS	Gibco #10270-106
1% Active Genitacin	Gibco #10131-019

Um ein übermäßiges Wachstum und das daraus resultierende Absterben der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche mit Hilfe von Trypsin vereinzelt und gesplittet.

Um die stabil transfizierten Zellen für Patch Clamp Experimente nutzen zu können, wurden sie in Kulturschälchen mit einem Durchmesser von 35 mm ausplattiert. Sie konnten so direkt in einen Halter auf dem Mikroskopisch eingesetzt werden. Transiente Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz Polyfect (Quiagen, Hilden, Deutschland) bei einer Zelldichte von etwa 80% angesetzt. Für die Transfektion wurde in ein 1 ml Eppendorf-Gefäß 100 µl OptiMEM (Invitrogen, San Diego, USA), 3 µg der entsprechenden cDNA und 9 µl Polyfect gegeben. Nach kurzem, aber kräf-

tigem Mischen wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen, welche zur Transfektion in den 35 mm Schälchen bereitstanden, mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1,5 ml frischem Kulturmedium versehen. Nach Ablauf der 10 min Inkubationszeit wurde der Ansatz aus cDNA und Polyfect mit 0,6 ml Kulturmedium gemischt und vorsichtig über die Zellen geträufelt. Nach ca. 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen dann erneut vereinzelt und nach weiteren 12-36 Stunden (je nach Konstrukt) wurden die Zellen gemessen. Vor Beginn der Messungen wurden die Schälchen 2-3 mal mit der Standardbadlösung gewaschen. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur nur an einzeln liegenden Zellen durchgeführt.

3.2.2. Molekularbiologie

Die gesamten molekularbiologischen Arbeiten in unserem Labor wurden von Dr. Sachar Lambert, Sandra Plant und Melanie Portz durchgeführt.

Die Konstrukte, sowie die einzelnen Klonierungsstrategien werden in den entsprechenden Kapiteln im Detail vorgestellt.

Abb. 7 stellt die von uns als Standard-Expressionsvektoren verwendeten Vektoren dar, mit denen alle gemessenen Konstrukte nach ihrer Fertigstellung ligiert wurden, um so eine Transfektion von HEK293-Zellen und die Expression der Konstrukte in diesen Zellen zu ermöglichen.

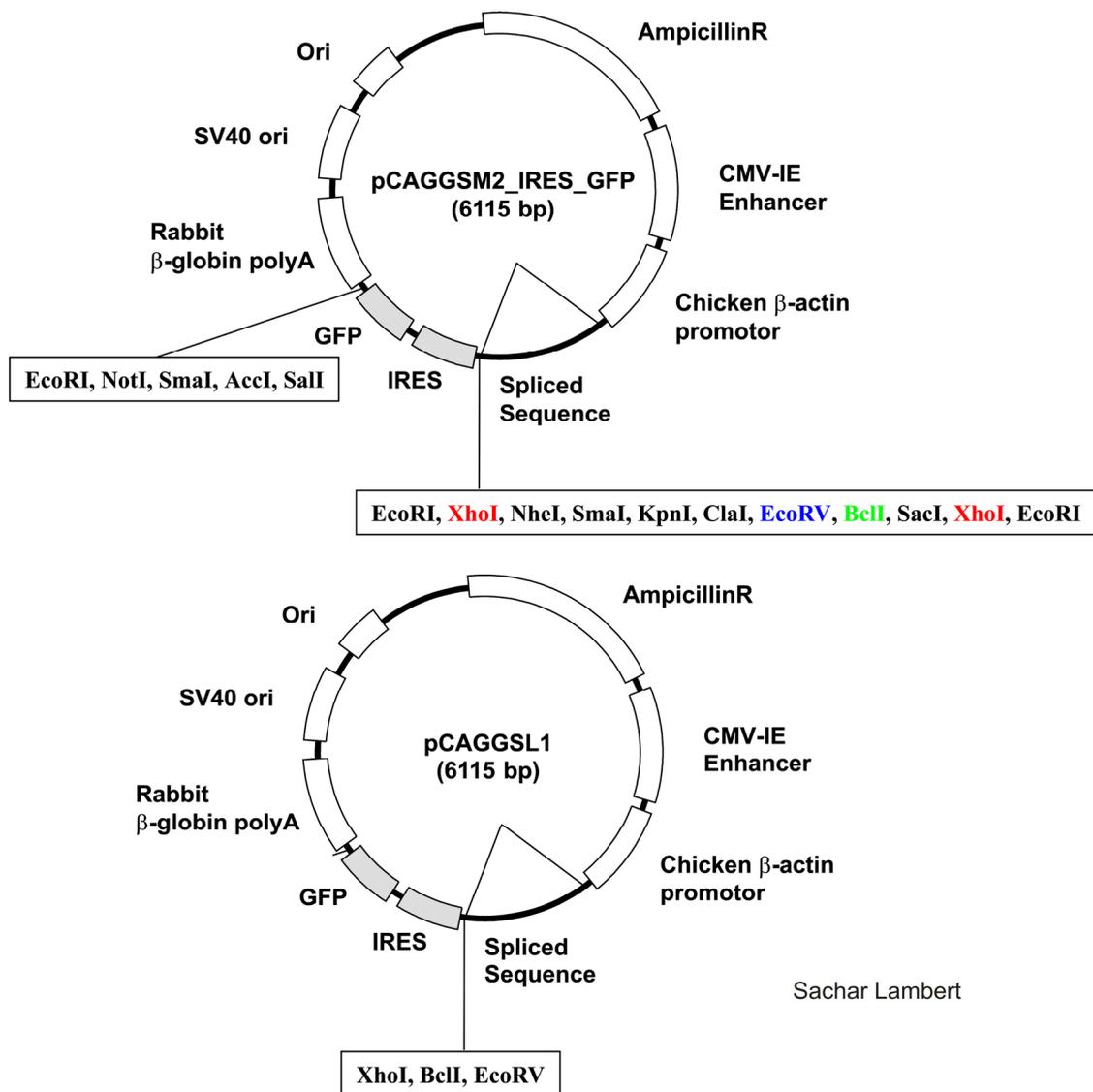


Abb. 7: Expressionsvektoren pcAGGsm2 und pcAGGsl1 im Vergleich (Die Vektoren wurden von Dr. Sachar Lambert von dem Vektor pCAGGS (Warnat et al., 1999) abgeleitet.).

3.2.3. Patch Clamp Technik

Im Jahr 1976 beschrieben Erwin Neher und Bert Sakmann zum Erstenmal die so genannte Patch Clamp Technik (Neher & Sakmann, 1976), für die sie 1991 den Nobelpreis in Physiologie und Medizin erhielten. Heute gehört die von ihnen entwickelte Technik zu den Standardmessverfahren in der Elektrophysiologie. Die Patch Clamp Technik ermöglicht es, Ionenströme durch die Kanäle in Plasmamembranen von Zellen zu messen und so die untersuchten Ionenkanäle zu charakterisieren. Die hier präsentierten Patch Clamp Messungen wurden ausschließlich in der in Hamill et al. (1981) beschriebenen whole cell Konfiguration durchgeführt. Um diese zu erreichen, wird zunächst die Patch Clamp Pipette (eine vorn spitz zulaufende Glaspipette mit einer nur wenige μm großen Öffnung) auf die Zellmembran gesetzt. Durch vorsichtiges Saugen an einem Schlauch am anderen Ende der Pipette entsteht ein Unterdruck. Dies führt dazu, dass die Zellmembran etwas in die Pipette hineingezogen wird und es so zu einem sehr engen Kontakt zwischen Plasmamembran und Glas kommt. Der so entstehende Widerstand kann eine Größenordnung von bis zu mehreren Gigaohm erreichen, daher der Name Gigaseal. Somit entsteht die cell-attached bzw. on-cell Konfiguration. Durch erneutes Anlegen eines etwas stärkeren Unterdrucks wird die Zellmembran im Bereich der Pipettenöffnung aufgerissen, während der Gigaseal intakt bleibt. Durch diesen Schritt erreicht man die gewünschte whole cell Konfiguration. Es kann so die gesamte Membran abgeleitet werden, d.h. die Ströme durch die gesamte verbleibende Plasmamembran der abgeleiteten Zelle werden gemessen. Durch die entsprechende Wahl der ionalen Zusammensetzung der intrazellulären, wie extrazellulären Lösungen, kann das Ionenmilieu der Zelle in dieser Konfiguration, sowohl von innen wie auch von außen, manipuliert werden.

3.2.4. Der Messstand

Alle in dieser Doktorarbeit beschriebenen Versuche wurden stets am selben Messstand durchgeführt. Es handelte sich dabei um ein inverses Mikroskop (Nikon Eclipse TE 2000U, Nikon, Düsseldorf, Deutschland), welches auf einem durch Styroporplatten gedämpften Tisch stand, um so die Schwingungen aus der Umgebung abzufangen und so ein störungsfreies Messen zu ermöglichen. Zusätzlich war es noch mit einem Faradayschen Käfig von elektrischen Störsignalen abgeschirmt. Im Objekt-

tisch des Mikroskops befand sich eine Halterung, in die Kulturschälchen mit den jeweils zu messende Zellen gestellt wurden. Am in xyz-Richtung steuerbaren elektrischen Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) war der Patch Clamp-Vorverstärker befestigt, welcher wiederum mit dem Elektrodenhalter mit chloridiertem Silberdraht versehen war. Die Referenzelektrode war ebenfalls ein chloridierter Silberdraht, welcher in ein kleines Nebengefäß (Eppendorfgefäßdeckel) mit Standardbadlösung getaucht wurde. Referenz- und Messelektrode wurden über eine Agarbrücke, die in das kleine Nebengefäß und das ebenfalls mit Standardbadlösung gefüllte Kulturschälchen gestellt wurde, verbunden. Die Agarbrücke ist ein kleiner (ca. 2 cm) PAE-Schlauch (neoLab-PAE-Mikroschlauch, 0,86 x 1,52 mm, neoLab, Heidelberg, Deutschland), welcher mit Agar gefüllt ist und in einem Winkel von etwa 60° gehalten wird. So können die jeweiligen Enden problemlos in die entsprechenden Gefäße gestellt werden. Für die Herstellung wurde 1%ige Agarose in Standardbadlösung aufgekocht und im noch flüssigen Zustand in den PAE-Schlauch gefüllt, wo sie erkaltet und fest wird. Aufbewahrt wurden die Agarbrücken in der Standardbadlösung im Kühlschrank. Der Vorverstärker war mit dem Hauptverstärker (EPC10, HEKA, Lambrecht, Deutschland) verbunden, welcher über den Computer unter Verwendung der Patchmaster Software (HEKA, Lambrecht, Deutschland) angesteuert wurde. Die Lösungen wurden mittels eines selbst hergestellten, gravitationsbetriebenen Perfusionssystems appliziert. Hierbei fließen die Lösungen aus den unterschiedlichen Schläuchen in einer schmalen Spitze zusammen. So ist es möglich die Öffnung in einem Abstand von etwa 200 µm vor der Zelle zu platzieren und einen Applikationswechsel der einzelnen Lösungen in einem Zeitraum von nur 0,5 - 1 s in unmittelbarer Nähe der zu messenden Zelle zu gewährleisten.

3.2.5. Analyse und Statistik

Die während der Messungen aufgezeichneten Daten wurden anschließend um die Potentialdifferenz zwischen der Standardbadlösung und der intrazellulären Lösung (dem sog. „Liquid junction potential“ / LJP) korrigiert. Die Kalkulation des LJPs erfolgte mit Clampex 8.1 (Axon instruments, Union City, Kanada). Im Folgenden werden alle Spannungswerte für das LJP korrigiert angegeben.



Abb. 8: Schematische Darstellung des gemessenen Rampenprotokolls.

Es wurden Spannungsrampen von -115 mV bis +85 mV appliziert, um so Aufschluss über die Strom-Spannungs-Charakteristika zu erlangen. Bei einem Haltepotential von -15 mV wurden die Spannungsrampen von -115 mV um je 1 mV/ms bis auf +85 mV gemessen (Abb. 8). Vor jeder Rampe wurde das Potential für 50 ms auf -115 mV gehalten (Abb. 8). Dieses Vorgehen wurde jede Sekunde wiederholt. Zusätzlich zu Einwärts- und Auswärtsströmen wurden vom Programm automatisch auch Zellkapazität und Serienwiderstand vor jeder Spannungsrampe kompensiert und aufgezeichnet. In allen durchgeführten Messungen erfolgte eine 80%ige Kompensation des Serienwiderstandes.

Die Ströme wurden im Anschluss bei -80 mV für den Einwärtsstrom und +80 mV für den Auswärtsstrom ausgewertet. Zur weitergehenden Analyse wurden die Daten in das Programm IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) mittels Patcher's Power Tools importiert. Die statistische Auswertung hingegen wurde mit Microsoft Excel oder Graphpad prism Version 3.0 vorgenommen. Die hier präsentierten Graphen wurden mit den Programmen Microcal Origin (OriginLab Corporation, Northampton, USA) und Adobe Corel Draw 12 erstellt. Es wurden Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ermittelt. Die Fehlerbalken, die in dieser Arbeit gezeigten Statistiken, repräsentieren stets den SEM. Die Signifikanz der Daten wurde mittels eines zweiseitigen, gepaarten oder ungepaarten und heteroskedatischen T-Test nach Student oder ANOVA mit dem Newmann-Keuls Post-Test ermittelt. Ein Wert $P < 0,05$ wurde mit *, $P < 0,01$ mit ** und $P < 0,001$ mit *** symbolisiert.

4. Wirkung von Nifedipin und der zwei Enantiomere von PregS auf TRPM3-Kanäle

4.1. Zusammenfassung

Neben PregS werden TRPM3-Kanäle auch durch das Dihydropyridin Nifedipin (Nif) aktiviert. Auch hier erfolgt die Antwort schnell (< 1 s) und ist reversibel. Die Stromzunahme ist jedoch im Vergleich zur Aktivierung durch PregS deutlich geringer.

Die in diesem Kapitel präsentierten Daten dienen der Klärung der Frage, ob PregS und Nif sich dieselbe Bindungsstelle am TRPM3-Kanal teilen. Erfolgt eine Coapplikation von Nif und PregS resultiert dies in eine höhere Antwort, als wenn man die Antworten der Einzelapplikationen addiert. Daraus ergibt sich, dass Nif und PregS unterschiedliche Bindungsstellen haben, an denen sie TRPM3-Kanäle aktivieren.

Eine weitere sich darauf stellende Frage ist, ob TRPM3-Kanäle eine spezifische Bindungsstelle für PregS besitzen oder ob die Kanäle durch das Neurosteroid auf un-spezifische Art und Weise aktiviert werden. Eine gute Möglichkeit zur Beantwortung dieser Frage, ist die Verwendung des künstlich hergestellten Enantiomers des PregS, welches sich durch dieselben chemischen und physikalischen Eigenschaften auszeichnet. Messungen mit dem natürlichen (nat-) PregS und dem synthetischen Enantiomer (ent-) PregS zeigten, dass ent-PregS die Kanäle deutlich schwächer aktiviert als nat-PregS. Dies kann als klarer Beleg dafür gesehen werden, dass PregS an eine chirale Bindungsstelle bindet, um TRPM3-Kanäle zu aktivieren. Da chirale Bindungsstellen nur an Proteinen vorkommen, muss die PregS-Bindungsstelle von Proteinen gebildet werden.

4.2. Einleitung

TRPM3-Kanäle werden schnell (< 100 ms) durch das natürlich vorkommende Steroid PregS aktiviert. Doch nicht nur PregS, sondern auch das Dihydropyridin Nif aktiviert TRPM3-Kanäle, wenn auch deutlich schwächer (Wagner et al., 2008).

Neben TRPM3-Kanälen ist eine Aktivierung durch Nif ebenfalls für TRPA1-Kanäle bekannt (Fajardo et al., 2008). Diese sind für Kationen permeabel und werden durch reizende, sowie weitere natürlich vorkommende Substanzen aktiviert und fungieren

als zentrale chemische Nozizeptoren (Schmerzrezeptoren) (Macpherson et al., 2005; Nagata et al., 2005; Kwan et al., 2006). Während jedoch Nagata et al. (2005) noch behaupten, TRPA1 sei auch entscheidend für die Generierung des durch mechanische Reizung ausgelösten Rezeptorpotentials in Haarzellen, widerlegten Kwan et al. dies im Jahr 2006. Sie bestätigen jedoch die Rolle der TRPA1-Kanäle am Schmerzempfinden. Auch intrazelluläres Ca^{2+} aktiviert diesen Kanal (Zurborg et al., 2007). 2008 wiesen dann Fajardo et al. nach, dass TRPA1 zusätzlich auch durch einige 1,4-Dihydropyridine, genauer gesagt durch Nifedipin, Nimodipin, Nicardipin und Nitrendipin aktiviert wird. Die Aktivierung des TRPM3-Kanals stellt somit also keinen Einzelfall in der Familie der TRP-Kanäle dar. Bei TRPM3-Kanälen ist Nif jedoch das einzige 1,4-Dihydroperidin, welches eine Zunahme der Stromantwort bewirkt (Wagner et al., 2008).

Über PregS ist bekannt, dass es stark in die Plasmamembran inseriert. In der Plasmamembran bewirkt dieses Einrücken des PregS eine Änderung der biophysikalischen Membraneigenschaften, welche sich in der Zunahme der Kapazität äußert (Mennerik et al., 2008). Neben PregS gibt es noch eine große Anzahl weiterer Substanzen, die in die Plasmamembran inserieren und dort zu deren Deformationen führen können, wodurch es wiederum zur Aktivierung mechanosensitiver Kanäle kommen kann. Trinitrophenol bewirkt z.B. durch Insertion in die Membran eine leichte Wölbung nach außen. In diesem Fall spricht man im Englischen von einem Crenator. Bei Cupformern wie dem Neuroleptikum Chlorpromazin kommt es hingegen zu einer Deformation der Membran, welche sich nach innen wölbt und es so ebenfalls zu einem mechanischen Stimulus kommt. Appliziert man 500 μM Chlorpromazin auf TRPM3-Kanäle kommt es zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Signals in FURA-Messungen, jedoch ist dieser Effekt auch in nicht transfizierten HEK293-Zellen zu messen. Die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit 50 μM Trinitrophenol hingegen führt zu keiner Änderung des Ca^{2+} -Einstroms (Wagner, 2009). Eine Aktivierung von TRPM3-Kanälen durch den hier genannten Cupformer bzw. Crenator kann somit ausgeschlossen werden.

Jedoch wirft die Tatsache, dass PregS in die Plasmamembran inseriert, die Frage auf, ob PregS den TRPM3-Kanal durch Änderung der biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran oder durch die Bindung an eine spezifische Bindungsstelle beeinflusst. Um diese Frage zu klären, nutzte ich das synthetische Enantiomer

des PregS (ent-PregS) (Nilsson et al., 1998). Dies ist ein genaues Spiegelbild des nat-PregS und weist daher dieselben physikalischen und chemischen Eigenschaften auf. Für den Fall, dass der Kanal ausschließlich über eine Änderung der biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran aktiviert wird, muss man annehmen, dass die Applikation des ent-PregS in einer ebenso hohen Stromantwort resultiert, wie die Applikation des nat-PregS. Für eine solche Aktivierung ist kein „spezifischer Schlüssel“, also eine Substanz die exakt an eine spezifische Bindungsstelle bindet, nötig. Schon in früheren Untersuchungen wurde das Enantiomer des PregS verwendet, um nachzuweisen, dass PregS durch Binden an eine spezifische Bindungsstelle eine Wirkung auf die Zielstrukturen ausübt (Meyer et al., 2002).

Da TRPM3-Kanäle neben PregS auch von Nif aktiviert werden, stellte sich zudem die Frage, ob PregS und Nif die gleiche Bindungsstelle haben oder ob sie von unterschiedlichen Stellen auf den Kanal einwirken. Möglicherweise kann es sich auch um einen allosterischen Effekt handeln. Allosterische Modulatoren binden an eine andere Bindungsstelle als der eigentliche Agonist. Sie führen dort zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins. Der allosterische Modulator induziert somit entweder eine Verstärkung (positive Allosterie) oder eine Abschwächung der Effekte (negative Allosterie) eines Agonisten. Um die Wirkung der beiden Substanzen zu untersuchen, habe ich die Stromantworten des Kanals bei Applikation von PregS, Nif und PregS+Nif in Ganzzelleableitungen gemessen und miteinander verglichen.

4.3. Material und Methoden

Das ent-PregS wurde uns freundlicherweise von Prof. D. Covey (Washington University Saint Louis, Missouri, USA) zur Verfügung gestellt (Nilsson et al., 1998).

Abb. 9 zeigt anhand der Strukturformeln die Unterschiede zwischen ent-PregS und nat-PregS. Enantiomere weisen jedoch dieselben physikalischen und chemischen Eigenschaften auf, da sie genaue Spiegelbilder voneinander sind.

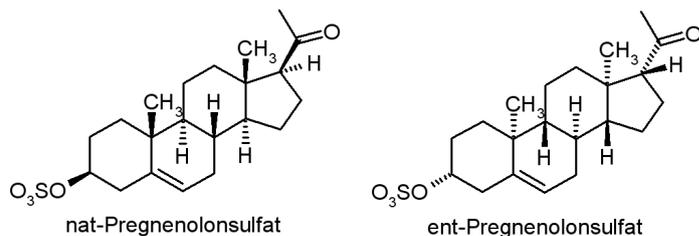


Abb. 9: Struktur von nat- und ent-PregS.

4.3.1. Elektrophysiologie

Alle Messungen wurden mit Hilfe der zu Beginn dieser Arbeit beschriebenen whole cell Patch Clamp Methode (Kapitel 3.2.3) durchgeführt.

4.3.2. Kapazitätsmessungen

Die Kapazität wurde mit einer Rate von 1 Hz mit einem EPC-10 Verstärker, welcher durch die Patchmaster Software (HEKA Instr.) gesteuert ist (Kapitel 3.2.4), mit Hilfe der automatischen Kapazitäts- und Serienwiderstandskompensation gemessen.

4.3.3. Verwendete Zelllinien

Verwendet wurden mit TRPM3 stabil transfizierte Zelllinien ($\alpha 2F2$ und $\alpha 2B7$), die uns von Dr. S. Philipp (Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden.

4.3.4. Lösungen

Der Standardbadlösung (siehe Kapitel 3.1.2) wurden PregS-Konzentrationen im Bereich von $0,35 \mu\text{M}$ bis $150 \mu\text{M}$ zugegeben. Für die Lösung mit PregS und Nif kamen dann noch $20 \mu\text{M}$ Nif hinzu. Die Nif-Lösungen enthielten die Standardbadlösung und $20 \mu\text{M}$ Nif. Die Stocklösungen für PregS und Nif hatten jeweils eine Konzentration von 50 mM und wurden in DMSO gelöst. Die Nif-Stocklösung wurde aufgrund der Lichtsensitivität der Substanz an jedem Messtag frisch angesetzt und die Gefäße in

denen sich die Lösung befand wurden zur Abschirmung des Lichts mit Aluminiumfolie umwickelt.

4.4. Ergebnisse: PregS und Nif im Vergleich

Um zu ermitteln, ob PregS und Nif von selber Stelle her oder doch von unterschiedlichen Stellen aus den TRPM3-Kanal aktivieren, wurden verschiedene Konzentrationen von PregS (0,35 – 100 μM) mit und ohne 20 μM Nif, bzw. nur 20 μM Nif appliziert (Abb. 10).

Die in Abb. 10a gezeigte Beispielmessung verdeutlicht bereits, dass die Aktivierung des PregS dosisabhängig ist und dass eine Coapplikation von PregS und Nif zu einer deutlichen Potenzierung der Stromantwort führt.

Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des PregS durchgeführt, um so zu belegen, dass der Effekt der Potenzierung bei unterschiedlichen Konzentrationen gleichermaßen auftritt. Dieser Versuchsablauf wurde gewählt, da zu Beginn der Versuche der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve noch unbekannt war. Bei einer steil verlaufenden Kurve, also einem Hill-Koeffizient > 1 , wäre die Messung an einem Punkt, also einer PregS-Konzentration allein, nicht aussagekräftig. Es ließe sich so nicht überprüfen, ob es beispielsweise bei einer Verdopplung der PregS-Konzentration auch zu einer Verdopplung der Stromantwort kommt.

Betrachtet man die Werte der Stromantworten für PregS, Nif, die Coapplikation der beiden Agonisten und den Wert der Addition der Einzelapplikationen in den Balkendiagrammen (Abb. 10b), so zeigt sich, dass die erreichten Stromgrößen bei Coapplikation die Werte der addierten Einzelapplikationen überschreiten. Dies gilt besonders für die Einwärtsströme. Die Ströme wurden aufgrund der schwankenden Stromantworten zwischen den einzelnen gemessenen Zellen, auf die Antworten bei 35 μM PregS normalisiert. Nif verstärkt also noch die Aktivierung des TRPM3-Kanals durch PregS. Dies wäre nicht möglich, würden die beiden Agonisten um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren.

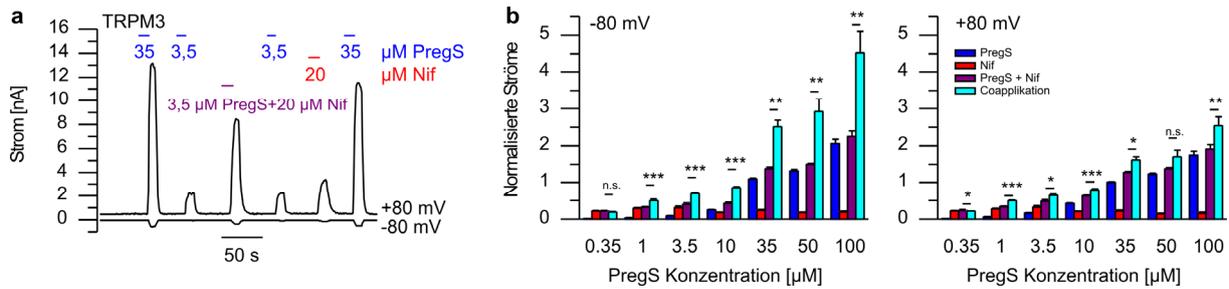


Abb. 10: PregS und Nif wirken supraadditiv.

a Repräsentative Beispielmessung. Applikation von PregS (0,35 – 100 μM) mit und ohne 20 μM Nif und nur Nif **b** Statistische Auswertung der auf die Applikation von 35 μM PregS normalisierten Ströme für PregS (dunkelblau), Nif (rot), die addierten Ströme (lila) und für die Coapplikation von PregS und 20 μM Nif (hellblau). Links für die Einwärtsströme (-80 mV), rechts für die Auswärtsströme (+80 mV). Die Signifikanz der Unterschiede wurde über einen Students T-Test ermittelt (n = 7-19).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PregS und Nif sich nicht dieselbe Bindungsstelle am TRPM3-Protein oder einem anderen Protein teilen und somit die Stromantwort durch zusätzliche Applikation von Nif signifikant im Vergleich zur alleinigen Applikation von PregS gesteigert wird.

4.5. Ergebnisse: nat- und ent-PregS im Vergleich

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Klärung der Frage, ob TRPM3-Kanäle eine spezifische Bindungsstelle für PregS besitzen, präsentiert.

Da ent- und nat-PregS dieselben chemischen und physikalischen Eigenschaften besitzen, kann erwartet werden, dass sie den Kanal gleichermaßen aktivieren, wenn die Aktivierung von der Insertion des PregS in die Membran herrührt und nicht durch Bindung an eine speziell fürs PregS geeignete Bindungsstelle. Ich applizierte unterschiedliche Konzentrationen von nat- und ent-PregS (Abb. 11), um so die Dosis-Wirkungs-Kurven für beide Substanzen erstellen und sie miteinander vergleichen zu können. Die in Abb. 11a dargestellte Beispielmessung mit den dazu gehörenden Strom-Spannungs-Kurven (Abb. 11b) zeigt, dass auch das ent-PregS den Kanal dosisabhängig aktiviert, jedoch sind die erzielten Stromgrößen bei gleicher Konzentration erheblich kleiner. Die daraus resultierende Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 11c) zeigt, dass ent-PregS den Kanal mit einem EC_{50} -Wert aktiviert, welcher um mindestens das Zehnfache höher liegt als der EC_{50} -Wert, der für nat-PregS ermittelt werden konnte.

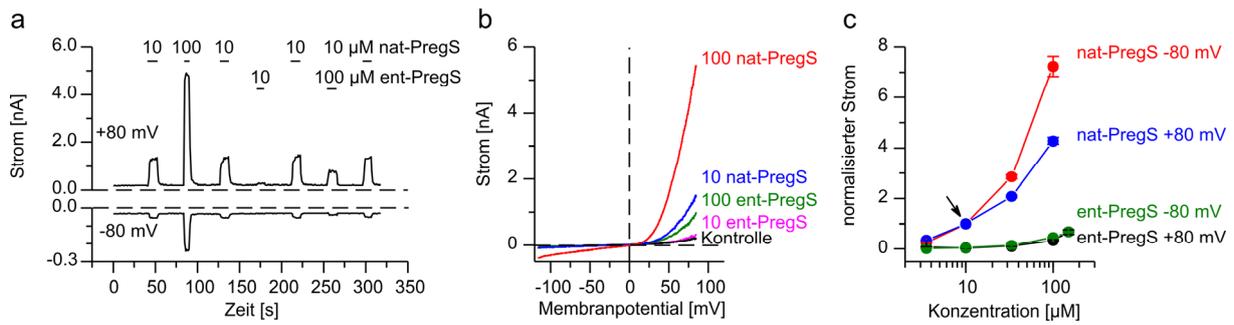


Abb. 11: Aktivierung des TRPM3 durch ent-PregS und nat-PregS im Vergleich.

a Repräsentative Messung einer mit TRPM3 stabil transfizierten HEK293-Zelle. 10 µM und 100 µM ent-PregS, sowie nat-PregS wurden wie angezeigt appliziert. Man beachte die unterschiedliche Skalierung für die Einwärts- (-80 mV) und Auswärts- (+80 mV) Ströme. **b** Strom-Spannungs-Kurven der in b dargestellten Zelle. **c** Statistische Analyse der Zellen (n = 12-38 pro Datenpunkt), aufgezeichnet wie die in a dargestellte Messung. Einwärts- und Auswärtsströme wurden separat zur Stromamplitude bei 10 µM nat-PregS (Pfeil) normalisiert.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das nat-PregS an eine speziell dafür vorgesehene Bindungsstelle am TRPM3-Protein oder einem anderen nahe am TRPM3-Protein befindlichen Protein bindet.

Aufgrund der gleichen chemischen und biophysikalischen Eigenschaften des nat- und ent-PregS sollte die durch die Insertion des PregS in die Plasmamembran hervorgerufene Kapazitätserhöhung ebenfalls gleich sein. Um dies zu überprüfen wurde parallel zu den Messungen der Stromgrößen auch die Kapazität gemessen. Anschließend wurden auch hierzu Dosis-Wirkungs-Kurven für nat- und ent-PregS erstellt.

Abb. 12a zeigt den Verlauf der Kapazität über die Zeit. Die Applikation von ent-PregS bewirkt, ebenso wie die von nat-PregS, eine Zunahme der Kapazität. Vergleicht man jedoch diese Zunahme für die einzelnen Konzentrationen zwischen nat- und ent-PregS, zeigen sich für die Konzentrationen 10 µM, 33,3 µM und 100 µM signifikante Unterschiede (Abb. 12b). Die kontinuierliche Zunahme der Kapazität im Verlauf der Messung (Abb. 12a) ist artifiziell. Sie lässt sich durch den wechselnden Stand der Lösung im Messschälchen, welcher durch die Applikation der Lösungen zustande kommt, erklären.

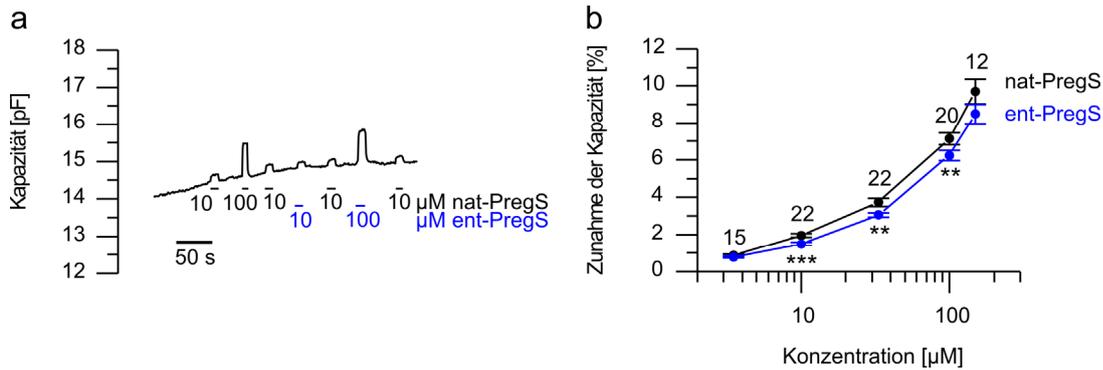


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Kurve der Kapazitätsänderungen induziert durch ent-PregS und nat-PregS. **a** Repräsentative Messung der Kapazität. Es erfolgten Applikationen von je 10 und 100 μM nat- und ent-PregS, welche in einer Erhöhung der Kapazität resultierten. **b** Dosis-Wirkungs-Kurve der Kapazitätsänderungen ($n = 12-22$). Die Differenz in der Kapazität-zunahme zwischen ent- und nat-PregS ist statistisch signifikant bei den Konzentrationen 10-100 μM , bleibt aber sehr klein ($< 20\%$).

4.6. Diskussion

Die Coapplikation von PregS und Nif auf TRPM3-Kanäle bewirkt eine höhere Stromantwort, als die Addition der einzelnen gemessenen Ströme (Abb. 10a+b). Dies gilt besonders für die Einwärtsströme (Abb. 10a+b). Eine Konkurrenz zwischen diesen beiden Agonisten des TRPM3-Kanals kann somit ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass der Effekt der Potenzierung der Ströme bei beinahe jeder gemessenen PregS-Konzentration signifikant ist (Abb. 10), belegt, dass es sich nicht um ein und dieselbe Bindungsstelle handelt. Dies könnte der Fall sein, wenn dieses Phänomen nur bei einer Konzentration zu beobachten wäre. Beide Substanzen binden an unterschiedlichen Stellen des TRPM3-Kanals, so dass sie ihre Wirkung gegenseitig verstärken können.

Die Messungen mit ent-PregS (Abb. 11+12) belegen hierzu noch, dass PregS nicht nur eine andere Bindungsstelle als Nif hat, sondern auch, dass es an eine chirale Bindungsstelle bindet. Diese befindet sich am TRPM3-Protein oder einem mit TRPM3 in Verbindung tretenden Protein. Hieran bindet das nat-PregS ideal an. Es ist denkbar, dass das synthetische Enantiomer ebenfalls hier bindet. Da dieses jedoch trotz gleicher chemischer und biophysikalischer Eigenschaften, eine deutlich geringere Aktivierung bewirkt, bindet es dort weniger gut oder es bindet an einer anderen Stelle. Schon in früheren Studien wurde das synthetische Enantiomer herangezogen, um nachzuweisen, dass es spezielle Bindungsstellen an Proteinen für PregS gibt. So wiesen Meyer et al. (2002) dies für GABA_A- und NMDA-Rezeptoren nach. Die Frage,

ob PregS direkt an das TRPM3-Protein oder aber an ein Protein in unmittelbarer Nähe bindet, ist noch ungeklärt. Hier könnten die Aufreinigung des Proteins und fortführende Experiment weiteren Aufschluss darüber verschaffen.

Würde es sich nur um eine mechanische Aktivierung durch das Inserieren in die Membran handeln, hätten ent-PregS und nat-PregS die gleiche Wirkung auf den Kanal. Sie würden aufgrund der identischen Eigenschaften die Membran gleichermaßen beeinflussen. Da dies jedoch nicht der Fall ist und nat-PregS den Kanal deutlich besser aktiviert als ent-PregS, kann es sich nur um eine spezifische Bindestelle für nat-PregS handeln in die das ent-PregS nicht passt. Während meine Ergebnisse für die Konzentrationen 10 μM , 33,3 μM und 100 μM signifikante Unterschiede in der Zunahme der Membrankapazität zeigen (Abb. 12), wird in Mennerik et al. (2008) beschrieben, dass es keine Unterschiede in der Kapazitätsänderung zu beobachten gibt. Diese Diskrepanz der Resultate lässt sich zum momentanen Zeitpunkt noch nicht klären. Da die Differenz zwischen ent- und nat-PregS maximal nur 20% beträgt, können sie in keinem Fall die signifikanten Unterschiede der Stromantworten in Abb. 11 erklären. Selbst dann nicht, wenn die auftretende Abweichung in der Kapazität von einer eventuellen Unreinheit der verwendeten Substanzen herrühren sollte. Es bleibt somit festzuhalten, dass die Stimulation mit nat-PregS in eine deutlich höheren Stromantwort resultiert, was daher kommt, dass diese Substanz eine spezielle Stelle am TRPM3-Kanal oder einem anderen Protein in unmittelbarer Nähe findet, an die es binden, und diesen aktivieren kann.

5. Punktmutationen in der Porenregion des TRPM3 und ihre Auswirkungen auf die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals

5.1. Zusammenfassung

Ziel der in diesem Kapitel präsentierten Untersuchung war es, die Poreneigenschaften und den Einfluss der geladenen Aminosäuren (AS) in der Porenregion des TRPM3-Kanals auf diese Eigenschaften zu charakterisieren. Über TRPM3-Kanäle ist bekannt, dass sie divalente Kationen leiten und durch extrazelluläres Na^+ geblockt werden. Die Charakterisierung erfolgte über Punktmutationen in der Porenregion. TRPM3-Kanäle weisen eine hohe Homologie zu TRPM6- und TRPM7-Kanälen auf, über die bekannt ist, dass die Mutation einer einzigen Aminosäure ihre Permeabilität für divalente Kationen aufhebt.

Alle sieben geladenen AS in der Porenregion des TRPM3-Kanals wurden in ungeladene mutiert und auf ihre Permeabilität sowie auf einen Block durch extrazelluläre Na^+ -Ionen untersucht. Ebenso untersuchte ich die Auswirkungen einer erhöhten extrazellulären H^+ -Konzentration (pH 4). Trotz Mutationen kam es weiterhin zur Expression von funktionellen Kanälen. Diese ließen sich weiterhin wie der TRPM3 WT durch PregS und Nif aktivieren. Die Messungen bei erhöhter H^+ -Konzentration (pH 4) zeigen, dass nur die Mutation E1057Q eine Stromzunahme aufweist, während der TRPM3 WT und alle anderen mutierten Kanäle mit einer Abnahme der Ströme auf die Applikation antworteten. Auch die Permeabilität für divalente Kationen, sowie der Na^+ -Block, was in Versuchen mit einer monovalentfreien Lösung untersucht wurde, sind bei allen Mutationen, mit Ausnahme der E1057Q, ähnlich wie bei TRPM3 WT. Messungen mit 120 mM Ca^{2+} extrazellulär zeigen, dass die Permeabilität für divalente Kationen in der E1057Q nicht völlig abhanden, jedoch drastisch reduziert ist. Die hier präsentierten Ergebnisse belegen, dass die Position E1057 in der Porenregion des TRPM3-Kanals relevant ist für die Permeabilität von divalenten Kationen und für den Block durch extrazelluläres Na^+ . E1057 könnte also somit am Selektivitätsfilter beteiligt sein, wie es auch für TRPM7-Kanäle angenommen wird. Weiterhin lassen diese Ergebnisse die Annahme zu, dass Na^+ -Ionen tief in der Pore von TRPM3-Kanälen binden, möglicherweise am oder aber in der Nähe des Selektivitätsfilter.

5.2. Einleitung

Vom TRPM3-Kanal existieren mehrere unterschiedliche Spleißvarianten (Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). Einer der Spleißbereiche ist zwischen der 5ten und 6ten Transmembrandomäne, in der Porenregion, lokalisiert. Die biophysikalische Analyse zweier dieser Spleißvarianten zeigt deutliche Unterschiede in ihren Poreneigenschaften. TRPM3 α 1 besitzt 12 zusätzliche AS im Vergleich zum TRPM3 α 2 und eine 13te ist unterschiedlich. Während TRPM3 α 2 für divalente Kationen, besonders Ca²⁺ und Mg²⁺, permeabel ist und durch extrazelluläres Na⁺ inhibiert wird, zeigen TRPM3 α 1-Kanäle eine deutlich geringere Leitfähigkeit für Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen und werden nicht durch extrazelluläres Na⁺ geblockt (Oberwinkler et al., 2005). Diese Daten bestätigen, dass Spleißvarianten die Poreneigenschaften von TRPM3-Kanälen beeinflussen und erlauben die Lokalisation des Porenbereichs. Die zu TRPM3-Kanälen homologen Kanäle TRPM6 und TRPM7 sind ebenso wie TRPM3-Kanäle für Ca²⁺ und Mg²⁺ permeabel. Die Permeabilität für divalente Kationen in diesen beiden Kanälen ist nach der Mutation eines einzigen Glutamatrests in der Porenregion nicht mehr nachzuweisen (Li et al., 2007; Mederos y Schnitzler et al. 2008). Von TRPM7-Kanälen ist außerdem bekannt, dass sie bei niedrigem pH-Wert (pH 4) eine deutliche Zunahme der Einwärts- und Auswärtsströme zeigen (Jiang et al., 2005). Da bereits bekannt ist, dass TRPM3-Kanäle im Gegensatz zu TRPM7-Kanälen inhibierte Ströme unter pH 4-Bedingungen zeigen (Loch 2007), wurde der Stromverlauf während der Applikation einer pH 4-Lösung untersucht, um die strukturellen Unterschiede zwischen TRPM3 und TRPM7 zu ermitteln, die trotz hoher Homologie für diese Diskrepanz verantwortlich sind.

Zur Feststellung, ob einzelne Mutationen in der Porenregion des TRPM3 α 2 (TRPM3) ebenfalls zu einer Änderung der Poreneigenschaften führen, wurden alle geladenen AS in der Porenregion einzeln in ungeladene mutiert. Zusätzlich zu den Einzelmutanten wurde noch eine Doppelmutante untersucht. Die Mutanten wurden auf ihre Funktionalität, auf ihr Verhalten unter pH 4-Bedingungen, ihre Permeabilität für divalente Kationen und den Na⁺-Block hin untersucht.

5.3. Material und Methoden

5.3.1. Elektrophysiologie

Alle Messungen wurden mit Hilfe der zu Beginn dieser Arbeit beschrieben whole cell Patch Clamp Methode (Kapitel 3.2.3) durchgeführt.

5.3.2. Molekularbiologie

Als Ausgangskonstrukt für alle in diesem Kapitel gemessenen Konstrukte diente die cDNA, die den Porenbereich (AS V992 – N1108) von TRPM3 α 2 kodiert. Dieses cDNA Fragment wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen (HpaI) in den pBS Vektor subkloniert. Um die HpaI Schnittstelle zu generieren, wurde TRPM3 α 2 im Vektor pBS per Mutagenese mit 2 HpaI Schnittstellen 5' (C2979T) und 3' (C3339T) der Pore versehen. Es handelte sich um stille Mutationen, um die Aminosäuresequenz nicht zu verändern. Mit einem PCR-basierten Verfahren wurde die gewünschten Mutationen (Tab. 1) erzeugt. Anschließend wurden die Konstrukte zur Überprüfung sequenziert. Der gewünschte Bereich, also die Pore inkl. der Mutation (ca. 350 bp), wurden mit HpaI herausgeschnitten und mit dem dephosphoryliertem Vektor KozTRPM3_o.Pore_pcAGGSL1 oder KozTRPM3_o.Pore_pcAGGS M2_IGFP (Abb. 7) ligiert. Die korrekte Insertion des Fragments wurde wiederum mittels Sequenzierung sichergestellt.

Im TRPM7 ist die Position E1047 (Abb. 13) von entscheidender Bedeutung für die divalente Leitfähigkeit des Kanals (Li et al., 2007; Mederos y Schnitzler et al., 2008). Die Mutation E1047Q in TRPM7 zeigt keine Permeabilität für Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen mehr (Mederos y Schnitzler et al., 2008). Auch die Zunahme der Ströme durch Protonen ist nicht mehr nachweisbar in dieser TRPM7-Mutante (Li et al., 2007). E1047 ist somit entscheidend für die Permeabilität und die pH-Sensitivität des TRPM7-Kanals. Die homologe Position zu E1047 in TRPM7 ist E1057 in TRPM3. Also ist auch hier ein Glutamat (E) positioniert. Diese Stelle wurde von uns zu Glutamin (Q) mutiert und untersucht.

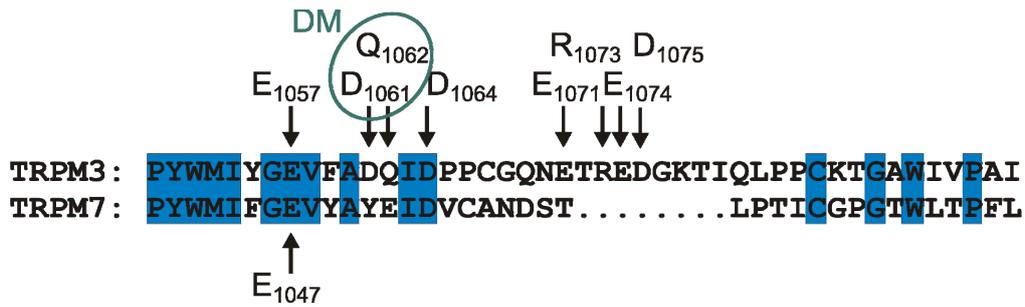


Abb. 13: Darstellung des Ausschnitts der Porenregion von TRPM3 und TRPM7 in dem die Punktmutationen vorgenommen wurden.

Tab. 1: Auflistung der untersuchten Mutationen.

Position	mutiert zu	Bezeichnung
E1075	Q	E1075Q
D1061	Y	D1061Y
D1061/Q1062	Y/E	DM
E1071	Q	E1071Q
R1073	D	R1073D
E1074	Q	E1074Q
D1075	N	D1075N

Es wurden weitere Einzelmutanten sowie eine Doppelmutante gemessen. Die geladenen AS in der TRPM3-Porenregion wurden in ungeladene mutiert. Ausnahmen stellen die zweite Position der Doppelmutante Q1062E und die R1073D dar. Hier wurde zu einer geladenen AS mutiert, da sich an den Positionen 1062 und 1073 im TRPM7 geladene Aminosäuren befinden (Abb. 13).

5.3.3. Zellkultur

Die zu messenden Konstrukte wurden in HEK293-Zellen überexprimiert. Für ausführliche Informationen zu Transfektion und Zellkultur siehe Kapitel 3.2.1.

5.3.4. Lösungen

Es wurde die Standardbadlösung und Standardintrazellulärlösung verwendet (siehe Kapitel 3.1.2.).

PregS-Lösung enthält: Der Standardbadlösung wurden 35 μM PregS (Stocklösung 50 mM in DMSO) zugegeben.

Nif-Lösung enthält: Der Standardbadlösung wurden 20 μM Nif (Stocklösung 50 mM in DMSO) zugegeben. Diese Lösung sowie auch die Stocklösung wurde auf Grund der Lichtempfindlichkeit des Nif an jedem Messtag frisch angesetzt.

pH 4 Lösung enthält (in mM): 145 NaCl, 10 CsCl, 3 KCl, 2,3 CaCl₂, 2,22 MgCl₂, 5 Zitronensäure und 5 D-Glucose. Die tatsächlich einzusetzende Ca²⁺- und Mg²⁺-Menge zum Erreichen von 2 mM freiem Ca²⁺ bzw. Mg²⁺, wurde mit Hilfe des Maxchelators (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc S.htm>) berechnet. Zur Einstellung des pH-Werts auf 4 wurde NaOH verwendet (5-8 mM). Die Osmolalität lag stets im Bereich von 320 und 330 mOsm. An dieser Stelle sei angemerkt, dass dieser pH 4-Lösung noch 100 μM 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2-disulfonic acid DIDS hinzugefügt wurden, um die Entwicklung des von Lambert & Oberwinkler (2005) beschriebenen proton-activated outwardly rectifying anionen channel (PAORAC)-Strom zu unterdrücken.

Monovalentfreie (MVF)-Lösung enthält (in mM): 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES und 280 D-Mannitol. Der pH-Wert wurde mit NMDG (1-3 mM) auf 7,2 eingestellt. Die Osmolalität betrug 320-330 mOsm.

120 mM Ca²⁺-Lösung enthält (in mM): 120 CaCl₂, 10 HEPES und 16 D-Glucose. Der pH-Wert wurde mit NMDG (2-4 mM) auf 7,2 eingestellt. Die Osmolalität betrug 320-330 mOsm.

Den Lösungen pH 4, MVF und 120 mM Ca²⁺ wurden noch 35 μM PregS aus der 50 mM Stocklösung in DMSO zugegeben, um die Lösung mit und ohne PregS miteinander vergleichen zu können.

5.4. Ergebnisse

Bevor die biophysikalischen Eigenschaften der mutierten Kanäle untersucht wurden, untersuchte ich, ob die Expression der mutierten Proteine noch zur Bildung funktioneller Kanäle führt.

Um dies zu überprüfen wurden alle mutierten Proteine in HEK293-Zellen überexprimiert und mit den beiden uns bekannten Agonisten PregS (35 μ M) und Nif (20 μ M) stimuliert und mit den WT TRPM3-Kanälen verglichen.

Die Beispielmessungen in Abb. 14a und die Strom-Spannungs-Verhältnisse in Abb. 14b, wobei D1064N stellvertretend für alle übrigen Mutanten mit Ausnahme von E1057Q steht, zeigen, dass alle gemessenen Konstrukte ebenso wie der TRPM3 WT funktionelle Kanäle formen und durch PregS und Nif aktivierbar sind (Abb. 14).

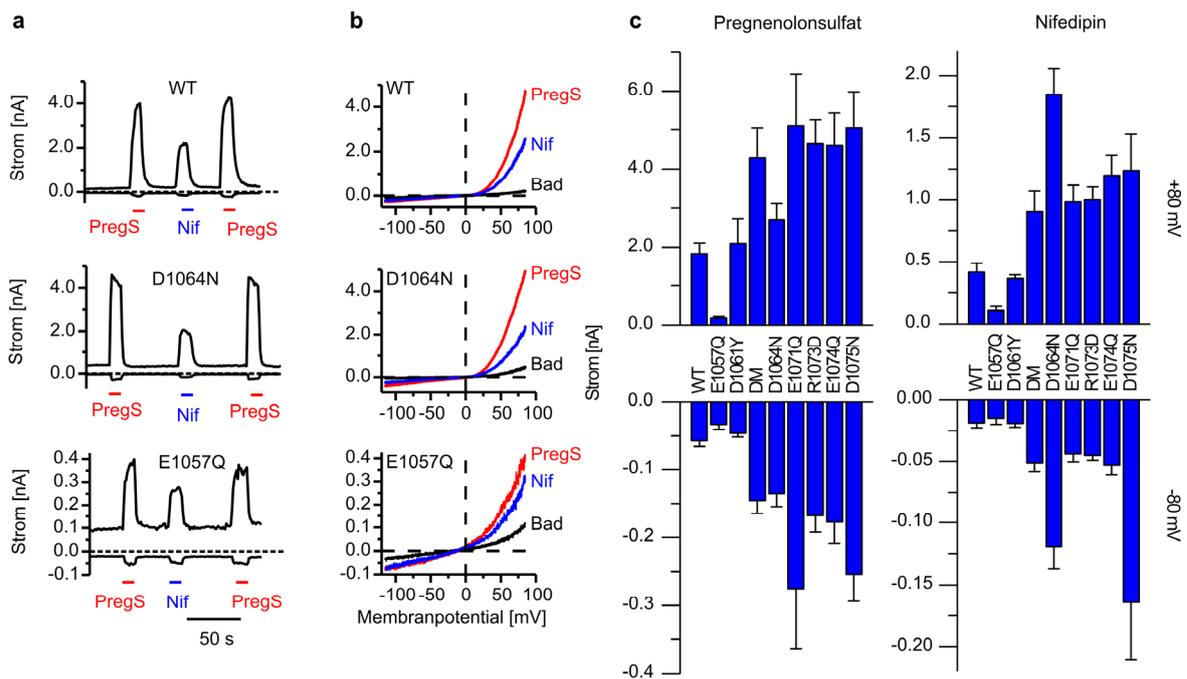


Abb. 14: Durch PregS und Nif induzierter Strom in TRPM3 WT und dessen Punktmutationen. **a** Repräsentative Beispielmessungen. Die Mutation D1064N steht für alle übrigen Mutanten, mit Ausnahme von E1057Q. Es wurden 35 μ M PregS und 20 μ M Nif appliziert. **b** Strom-Spannungs-Verhältnisse der in a dargestellten Messungen. **c** Statistische Auswertung der Amplitude der Einwärts- (-80 mV) und Auswärtsströme (+80 mV) (n=5-25).

Die Mutante E1057Q zeigte deutlich kleinere Ströme im Vergleich zu den anderen Mutanten. Das auch die Zellen mit TRPM3 WT kleinere Ströme zeigen (Abb. 14c+d), liegt unter Umständen an der für die Messungen verwendeten, stabil mit TRPM3 transfizierten, Zelllinie α 2F2. Diese zeigt im Vergleich zu transient transfizierten HEK293-Zellen stets kleinere Ströme, da der Kanal hier in geringerem Maße exprimiert zu sein scheint.

Nachdem klar gezeigt werden konnte, dass die Expression der mutierten Proteine auch weiterhin zur Bildung funktioneller Kanäle führt und für alle PregS als Agonist zur Verfügung steht, konnte mit der Untersuchung der Poreneigenschaften der Mutanten begonnen werden.

Zu Beginn wurden die Auswirkungen der Mutationen auf den inhibitorischen Effekt durch Protonen auf den TRPM3-Kanal untersucht. Hierzu wurde eine Lösung mit einem pH-Wert von 4 sowie diese Lösung plus 35 μ M PregS appliziert. So lies sich die Wirkung der Protonen auf den konstitutiven Strom des TRPM3-Kanals und auf den PregS-induzierten Strom beobachten.

Die Beispielmessungen für die Applikation von 35 μ M PregS und der pH 4-Lösung (Abb. 15a) und die dazugehörigen Strom-Spannungs-Kurven (Abb. 15b) zeigen für E1057Q eine Zunahme der Ströme unter pH 4-Bedingungen, wie es aus der Literatur für TRPM7 bekannt ist (Jiang et al., 2005). PregS reduziert pH 4-induzierte Ströme in E1057Q (Abb. 15a+b). Alle anderen Mutanten verhalten sich wie TRPM3 WT-Kanäle und zeigen die vollständige Abwesenheit der konstitutiven, sowie der PregS-induzierten Ströme. Die Statistik in Abb. 15c verdeutlicht, dass sich nur E1057Q qualitativ von TRPM3 WT-Kanälen unterscheidet.

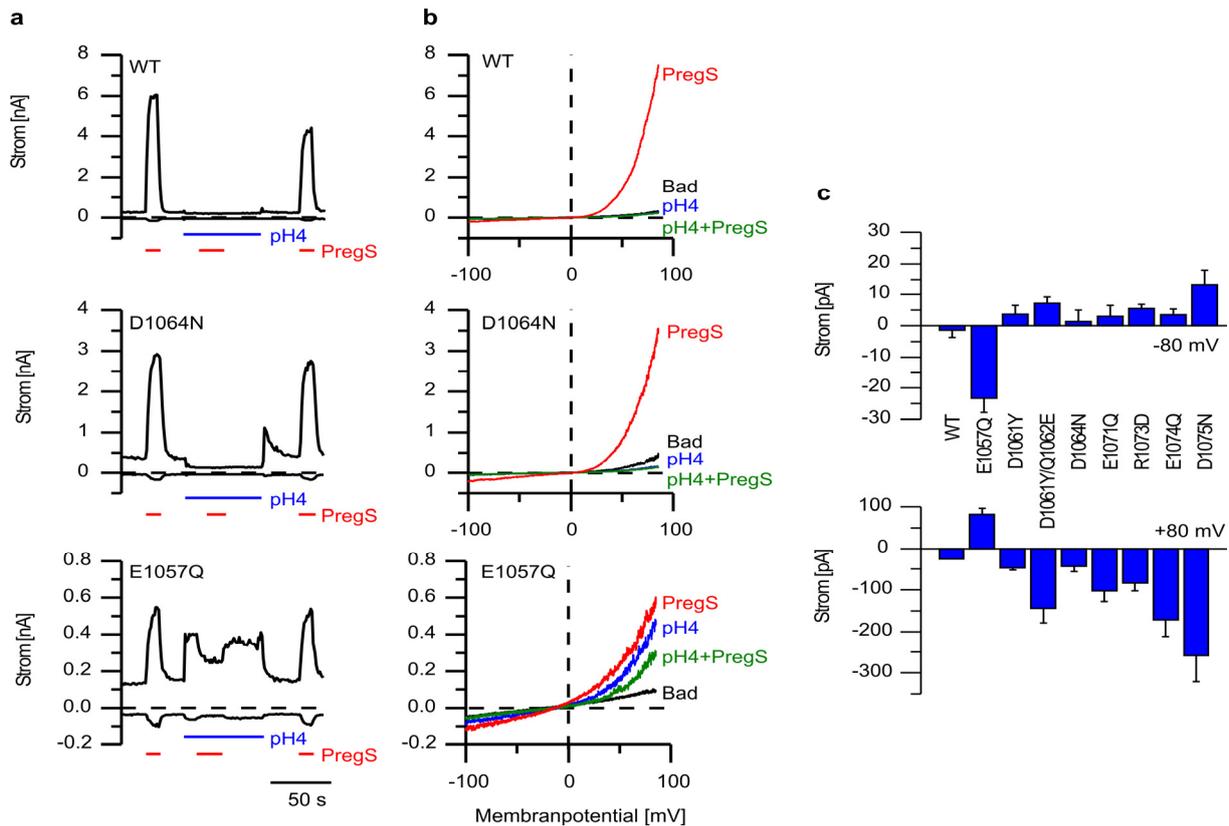


Abb. 15: Aktivierung der mutierten TRPM3-Kanäle bei niedrigen pH-Werten (pH 4). **a** Repräsentative Beispielmessungen. TRPM3 WT, D1064N als Repräsentant der sich wie TRPM3 WT verhaltenden Mutanten und E1057Q. Applikation von 35 μ M PREGS und pH 4. **b** Die zu den in a präsentierten Messungen gehörenden Strom-Spannungs-Kurven. **c** Statistische Analyse der Ein- und Auswärtsströme bei pH 4, ermittelt über die Subtraktion der Ströme unter Standardbadlösung-Bedingungen von denen bei Applikation der pH 4-Lösung. (n=5-13)

Neben der Inhibition durch Protonen ist über TRPM3-Kanäle bekannt, dass sie eine hohe Permeabilität für divalente Kationen aufweisen. Appliziert man nun auf die Kanäle eine Lösung, der die monovalenten Kationen fehlen, die nur divalente Kationen enthält, lässt sich ein signifikanter Einwärtsstrom beobachten. Im Folgenden wurde untersucht, ob dies auch auf die Punktmutanten zutrifft. Alle gemessenen Mutanten, mit Ausnahme der E1057Q, zeigen wie TRPM3 WT-Kanäle einen signifikanten PREGS-induzierten Einwärtsstrom, während der Applikation von MVF Lösung (Abb. 16). Es kommt hier also zu einem Einwärtsstrom von divalenten Kationen, da extrazellulär keine monovalenten Kationen mehr vorhanden sind. Die Statistik in Abb. 16c zeigt PREGS-induzierte Einwärtsströme unter monovalentfreien Bedingungen [$I_{(MVF+PREGS)} - I_{(MVF)}$]. Alle Mutanten mit Ausnahme der E1057Q zeigen einen signifikanten Strom. Die Abwesenheit dieser Zunahme des Einwärtsstroms bei E1057Q lässt vermuten, dass diese Mutation zu einer starken Reduktion der divalenten Permeabilität führt.

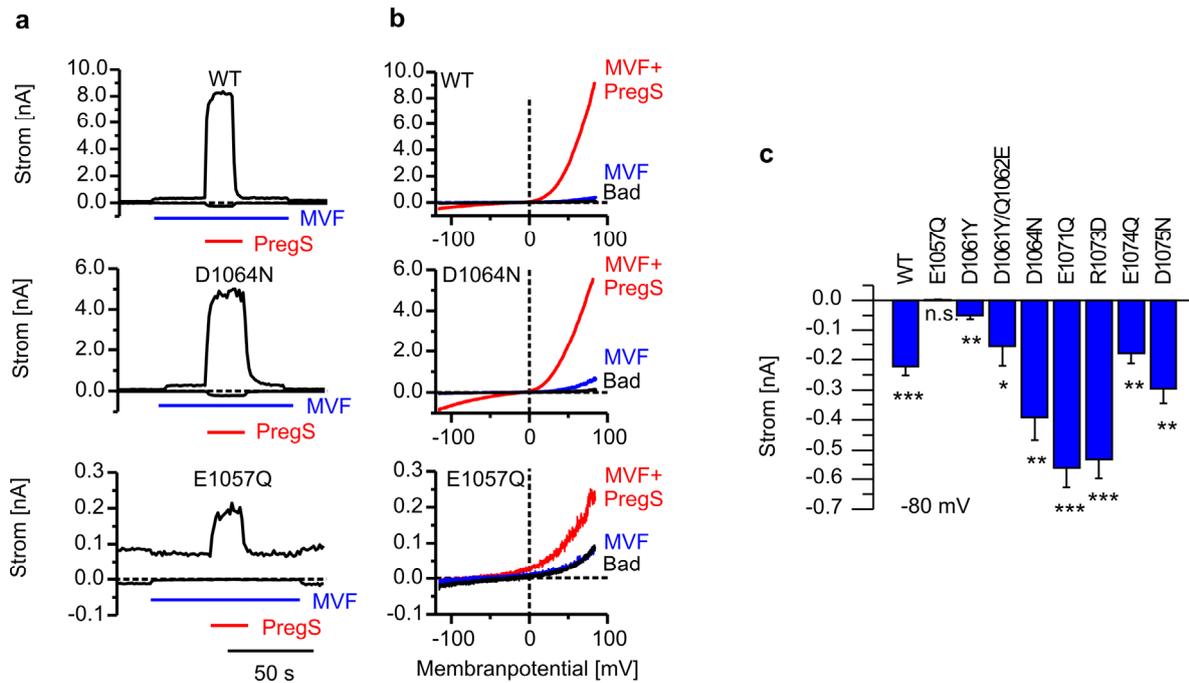


Abb. 16: Permeabilität für divalente Kationen in TRPM3 WT-Kanälen und den mutierten TRPM3-Kanälen.

a Repräsentative Beispielmessungen. Es wurden MVF Lösung und 35 μ M PregS plus MVF Lösung appliziert. **b** Strom-Spannungs-Kurven der in **a** dargestellten Messungen. **c** Statistische Analyse der PregS-induzierten Ströme unter monovalentfreien Bedingungen. Aufgetragen wurde $[I_{(MVF+PregS)} - I_{(MVF)}]$. Getestet wurde der signifikante Unterschied zu 0, d.h. ob es durch PregS-Applikation eine Stromzunahme gab oder nicht. (n = 5-15).

Wie schon zuvor beschrieben, werden TRPM3-Kanäle nicht nur durch extrazelluläre Protonen sondern auch durch extrazelluläre Na^+ -Ionen blockiert. Um zu testen, ob die mutierten TRPM3-Kanäle eine veränderte Na^+ -Inhibition zeigen, wurden die PregS-induzierten Ströme unter Kontrollbedingungen (Standardbadlösung ca. 150 mM Na^+) und unter monovalentfreien Bedingungen (0 mM Na^+) miteinander verglichen (Abb. 17).

Entfernt man die Na^+ -Ionen aus der extrazellulären Lösung, wird der Na^+ -Block aufgehoben und die Ströme nehmen im Vergleich zu den rein PregS-induzierten Strömen zu (Abb. 17). Die Mutation D1061Y sowie die DM zeigen nur eine geringe Zunahme der Einwärtsströme während der Applikation von MVF+PregS im Vergleich zu den PregS-induzierten Strömen unter Standardbedingungen (Abb. 17c). Auch bei diesen Versuchen ist es die Mutante E1057Q, die mit ihrer Antwort am deutlichsten herausfällt. Hier ist keine Zunahme des Auswärtsstroms ersichtlich (Abb. 17a) und auch die Statistik zeigt ein Verhältnis von 1 für die PregS-induzierten Ströme unter MVF-Bedingungen zu denen unter Standardbedingungen (Abb. 17c).

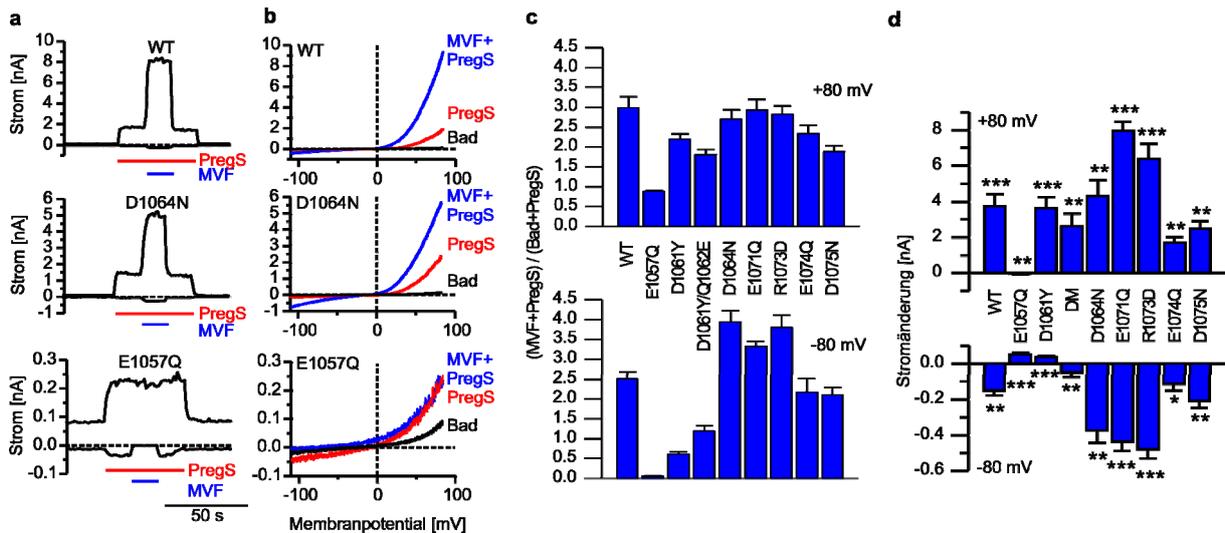


Abb. 17: Einfluss der Punktmutationen auf den Na⁺-Block des Kanals.

a Repräsentative Beispielmessungen. Es wurde 35 μ M PregS und MVF Lösung plus PregS appliziert. **b** Strom-Spannungs-Verhältnisse der in **a** gezeigten Messungen. **c** Statistische Analyse der Verhältnisse des PregS-induzierten Strom bei 0 mM Na⁺ zu PregS-induziertem Strom bei 150 mM Na⁺. **d** Statistische Analyse der Stromänderung [$I_{(MVF+PregS)} - I_{(PregS)}$] ($n = 5-12$). Es wurde auf Signifikanz gegen Null getestet, also ob eine signifikante Stromänderung vorliegt.

Die Einwärtsströme nehmen, wie schon aufgrund der Daten in Abb. 16 zu erwarten, drastisch ab (Abb. 17). Für D1061Y und DM ist ein verminderter Na⁺-Block festzustellen. Abb. 17d zeigt, dass alle gemessenen Mutanten eine signifikante Stromänderung zwischen Stimulation mit MVF und MVF+PregS zeigen. Jedoch nehmen die Einwärtsströme bei E1057Q und D1061Y, sowie die Auswärtsströme von E1057Q nicht zu sondern ab. Diese Ergebnisse belegen, dass die Mutante E1057Q nicht durch extrazelluläres Na⁺ inhibiert wird.

Auf Grund der Tatsache, dass die Mutante E1057Q im Vergleich zu den übrigen Mutanten kleine Ströme zeigt, lässt sich nicht ausschließen, dass die gemessenen Ströme zur Bestimmung der Permeabilität (Abb. 16) nicht auch einfach nur zu klein waren, um detektiert zu werden. Um den Faktor der zu kleinen Ströme auszuschließen, wurden alle Mutanten mit einer 120 mM Ca²⁺ enthaltenden Lösung gemessen (Abb. 18).

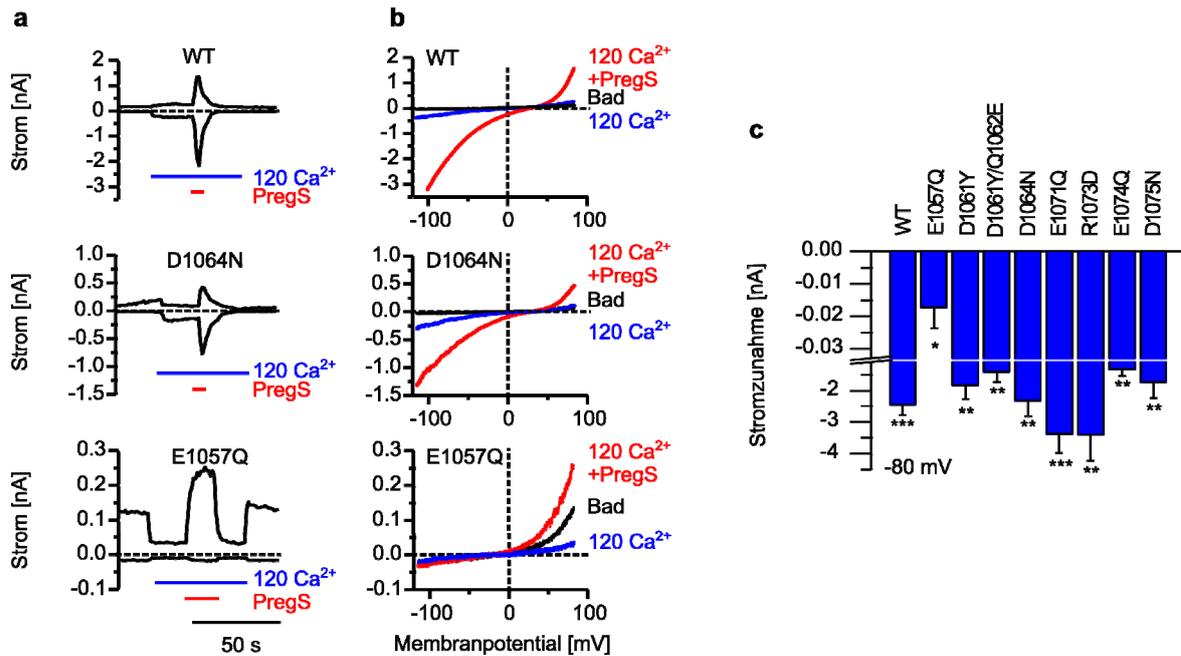


Abb. 18: Divalente Permeabilität der TRPM3 Mutanten bei Applikation von 120 mM Ca²⁺. **a** Repräsentative Beispielmessungen. Appliziert wurden 120 mM Ca²⁺ und 120 mM Ca²⁺ plus 35 μM PregS. **b** Strom-Spannungs-Beziehungen der in a gezeigten Messungen. **c** Statistische Analyse der durch PregS induzierten Einwärtsströme unter 120 mM Ca²⁺ Bedingungen. (n=6-15). Es wurde auf Signifikanz gegen Null getestet, also ob eine signifikante Stromzunahme vorliegt.

Zunächst wurden nur 120 mM Ca²⁺ appliziert. Schon hier zeigten sich erste Unterschiede zwischen den TRPM3 WT-Kanälen und den übrigen Mutanten zu E1057Q. Während bei allen anderen eine Zunahme des Einwärtsstroms kommt, zeigt E1057Q eine Abnahme (Abb. 18a+b). TRPM3 WT und die Mutanten, außer E1057Q, zeigen große PregS-induzierte Einwärtsströme (Abb. 18). Unter 120 mM Ca²⁺-Bedingungen zeigt aber auch E1057Q einen kleinen aber signifikanten Einwärtsstrom, wenn die Kanäle mit PregS aktiviert werden. Da die Mutante D1075N bei fünf von zwölf Messungen bereits während der Applikation von 120 mM Ca²⁺ große und schnell (< 3 s) inaktivierende Ströme zeigte, kam es vor, dass die darauf folgende Applikation von 120 mM Ca²⁺ plus 35 μM PregS nur noch eine kleinere Stromzunahme als bei 120 mM Ca²⁺ bewirkte. Bei diesen Zellen wurde der Wert für 120 mM Ca²⁺ nicht, wie bei den übrigen Zellen für die Statistik in Abb. 18c, beim Maximalwert bei 120 mM Ca²⁺ abgelesen, sondern direkt eine Sekunde vor dem Wechsel auf die Lösung plus PregS. So wird deutlich, dass auch hier PregS eine Stromzunahme bewirkt. Die aus der vollständigen Analyse resultierende Statistik (Abb. 18c) zeigt, dass neben dem TRPM3 WT auch alle gemessenen Mutanten eine signifikante Stromzunahme ermittelt durch $[(I_{(120 \text{ mM Ca}^{2+})} - I_{(120 \text{ mM Ca}^{2+} + 35 \text{ μM PregS})})]$ zeigen. Die Ca²⁺-Ströme durch die

Pore der Mutante E1057Q sind jedoch deutlich kleiner als jene die für den TRPM3 WT und die übrigen Mutanten gemessen wurden. Diese Ergebnisse belegen, dass E1057Q eine sehr stark reduzierte aber immer noch vorhandene Leitfähigkeit für divalente Kationen besitzt.

5.5. Diskussion

Alle analysierten mutantierten Kanäle formen funktionelle Kanäle nach Überexpression in HEK293-Zellen und können durch PregS und Nif aktiviert werden (Abb. 14). Frühere Arbeiten demonstrieren, dass TRPM3-Kanäle unter Bedingungen mit einem niedrigen pH-Wert (pH 4), mit einer starken Inhibition der konstitutiven, sowie PregS-induzierten Strömen antworteten (Loch, 2007). Eine Mutation der Position E1057 führt zu einer zuvor nicht zu beobachteten Aktivierbarkeit des TRPM3-Kanal durch Protonen (Abb. 15), wie auch TRPM7-Kanäle durch Protonen aktivierbar sind (Jiang et al., 2005). Des Weiteren zeigen Kanäle mit der Punktmutation E1057Q eine starke Reduktion der Leitfähigkeit für divalente Kationen (Abb. 16+18), während alle übrigen Mutationen divalente Leitfähigkeiten wie der TRPM3 WT aufweisen (Abb. 16). In den homologen Mutationen in TRPM6 und TRPM7 wurde schon gezeigt, dass die Permeabilität für divalente Kationen nicht mehr nachweisbar ist (Li et al., 2007; Mederos y Schnitzler et al., 2008), während in dem hier gezeigten Fall von TRPM3 die Permeabilität für Ca^{2+} nur stark reduziert wird (Abb. 18). Dieser geringe Unterschied lässt sich vermutlich über die verwendeten Methoden erklären. Da in der vorgelegten Arbeit TRPM3-Kanäle mit einem Agonisten stimuliert werden konnten, war es mir möglich, auch die kleinen noch vorhandenen Ströme nachzuweisen. Es könnte sich aber auch über die Unterschiede der Poren der einzelnen Kanäle erklären lassen. Interessanterweise weist dieselbe Mutante E1057Q auch keinen Na^+ -Block auf (Abb. 17). Schon frühere Untersuchungen der natürlich auftretenden Spleißvarianten des TRPM3 zeigten, dass der Austausch oder aber das Fehlen weniger AS in der Porenregion des Kanals zu einer Änderung der Poreneigenschaften führen kann (Oberwinkler et al., 2005).

Die hier präsentierten Ergebnisse belegen, dass die Position E1057 durchaus am Selektivitätsfilter beteiligt sein könnte, wie es auch für TRPM7-Kanäle angenommen wird (Li et al., 2007; Mederos y Schnitzler et al., 2008). In TRPM3-Kanälen ist die

Position E1057 relevante Stelle für beides, Permeabilität divalenter Kationen (Abb. 16+18) und Na⁺-Inhibition (Abb. 17), was ein Modell stützt, in dem Na⁺-Ionen den Kanal inhibieren, indem sie tief in der Pore binden, vermutlich sogar am oder zumindest in der Nähe des Selektivitätsfilters.

In diesem Fall reicht somit schon die Mutation einer einzigen AS, um die Vielzahl von Poreneigenschaften des TRPM3-Kanals grundlegend zu ändern.

6. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den funktionellen Eigenschaften von TRPM1 und TRPM3

6.1. Zusammenfassung

TRPM1 ist das zu TRPM3 am stärksten homologe Protein. Dennoch ist über das TRPM1-Protein bisher wenig bekannt. Daher wurde mit den hier präsentierten Daten der Beleg angestrebt, dass es sich beim TRPM1-Protein um ein Ionenkanalbildendes Protein handelt und es möglich ist TRPM1-Kanäle von TRPM3-Kanälen zu unterscheiden.

Die Proteine TRPM1 und TRPM3 wurden in HEK293-Zellen überexprimiert und mit der whole cell Patch Clamp Technik gemessen. HEK293-Zellen, mit TRPM1-Proteinen zeigten Ströme, die durch PregS-Applikation dosisabhängigen aktiviert werden könnten, wie dies auch bei TRPM3-Kanälen der Fall ist. Jedoch zeigten Zellen, welche das TRPM1-Protein überexprimieren, wesentlich kleinere Ströme, welche so klein sind, dass eine aussagekräftige biophysikalische Analyse schwierig oder gar unmöglich war.

Um dieses Problem zu lösen wurden zwei Porenchimären aus dem TRPM1-Protein und dem TRPM3-Protein konstruiert, TRPM1 mit der TRPM3-Pore und umgekehrt, welche beide im Überexpressionssystem große Stromantworten auf PregS zeigten. Die Ergebnisse aus Untersuchungen des TRPM1 WT- und TRPM3 WT-Proteins, den Chimären und einer Cotransfektion mit dem TRPM1- und TRPM3-Protein, sowie einem Konstrukt, in dem aus TRPM1 das im N-Terminus gelegene Exon 11 herausgeschnitten wurde, ergaben zunächst, dass das Verhältnis von Auswärts- zu Einwärtsstrom sinkt, je stärker die TRPM1-Pore im Konstrukt vertreten ist. TRPM1-Kanäle sind also weniger stark auswärtsrektifizierend als TRPM3-Kanäle. Messungen mit 120 mM Ca^{2+} zeigten, dass alle untersuchten Konstrukte für Ca^{2+} -Ionen permeabel sind, diejenigen mit der TRPM1-Pore jedoch weniger als jene mit der TRPM3-Pore.

Ein entscheidender Unterschied zwischen TRPM1- und TRPM3-Proteinen ist, dass die TRPM1-Pore nicht wie die TRPM3-Pore für Zn^{2+} -Ionen permeabel ist. Sie wird sogar durch Zn^{2+} -Ionen dosisabhängig mit einem IC_{50} von ungefähr 1 μM inhibiert. Auch in einigen Messungen an Ins1-Zellen zeigte sich diese Inhibition durch Zn^{2+} -Ionen. Messungen an Porenmutanten des TRPM1-Proteins und eines Konstrukts,

dem die Aminosäuresequenz LYAMEIN, welche in der Porenregion des TRPM1-Proteins, jedoch nicht in der des TRPM3-Proteins vorkommt, entfernt wurde, belegen, dass insbesondere diese Sequenz für die Inhibition des TRPM1 durch Zn^{2+} -Ionen von entscheidender Rolle ist.

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass TRPM1-Proteine Ionenkanäle bilden, welche trotz hoher Homologie zu TRPM3-Kanälen Unterschiede in den Poreneigenschaften zu eben diesen aufweisen. Zn^{2+} stellt ein brauchbares pharmakologisches Werkzeug dar, welches bei der zukünftigen Charakterisierung von TRPM1-Kanälen *in vivo* dazu dienen kann, diese eindeutig von TRPM3-Kanälen zu unterscheiden.

6.2. Einleitung

Über das TRPM1-Protein, insbesondere über seine elektrophysiologischen Eigenschaften ist bis heute relativ wenig bekannt. Dies liegt u.a. daran, dass es sich bis heute als schwierig erwies, dieses Protein in heterologen Überexpressionssystemen zu exprimieren (Xu et al., 2001, Oancea et al., 2009). Koike et al. beschrieben jedoch 2010, dass es ihnen gelungen sei. Im Verlauf des letzten Jahres erschienen einige Publikationen über das erstmals 1998 entdeckte TRPM1-Proteine veröffentlicht (Duncan et al., 1998). Neben der Expression von TRPM1-Proteinen in Melanozyten (siehe Kapitel 1.2.1.) wurde das TRPM1-Protein in mehreren Studien mit der angeborenen stationären Nachtblindheit in Zusammenhang gestellt. Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass die TRPM1 mRNA Menge in Appaloosa Pferden mit Nachtblindheit deutlich herunter geregelt ist (Bellone et al., 2008). TRPM1 mRNA ist in einer Subpopulation von Bipolarzellen nachweisbar (Kim et al., 2008a; Kim et al., 2008b; Nakajima et al., 2009), bei einigen handelt es sich um ON-Bipolarzellen. In diesen bewirkt die Glutamatfreisetzung durch Stäbchenzellen die Aktivierung von metabotropen Glutamat Rezeptoren (Nakajima et al., 1993; Masu et al., 1995). Diese wiederum aktivieren einen bislang nur wenig verstandenen Signalweg (Snellman et al., 2008). Dieser jedoch führt zur Inaktivierung einer konstitutiv aktiven, nicht selektiven Kationenleitfähigkeit (Nawy & Jahr 1990; Nawy & Jahr 1991). Im Verlauf des letzten Jahres konnte auch gezeigt werden, dass Mäuse, denen das TRPM1-Gen inaktiviert wurde, Beeinträchtigungen der visuellen Wahrnehmung aufweisen (Morgans et al., 2009; Shen et al., 2009; Koike et al., 2010). TRPM1 mRNA konnte mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung in Zellen der Retina nachgewiesen werden (Morgans

et al., 2009). Mittels Immunfluoreszenz Konfokalmikroskopie konnte diese Arbeitsgruppe weiterhin belegen, dass das TRPM1-Protein in den Dendriten von ON-Bipolarzellen in Mäusen und Makaken vorkommt. Das Elektroretinogramm (ERG) von Retinaschnitten von TRPM1-defizienten Mäusen weist normale a-Wellen, jedoch keine b-Wellen auf (Morgans et al., 2009 Shen et al., 2009), was die Vermutung zulässt, dass ein Verlust der Bipolarzellenantwort vorliegt. Morgans et al. (2009) zeigten zusätzlich noch durch whole cell Patch Clamp Messungen an ON-Bipolarzellen in Retinaschnitten aus Mäusen, dass die genetische Deletion des TRPM1-Proteins die chemisch stimulierte Antwort der Stäbchen-Bipolarzellen auslöscht und drastisch die Antwort der Zapfen-ON-Bipolarzellen verändert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in vielen Fällen von Nachtblindheit bei Menschen eine Mutation des TRPM1-Proteins vorliegt (Audo et al., 2009; van Genderen et al., 2009; Li et al., 2009; Nakamura et al., 2010). Dies und die Tatsache, dass die Mehrheit der TRP-Proteine nicht selektive Ionenkanäle formen, lässt die Annahme zu, dass das TRPM1-Protein die Pore des Transduktionskanals in ON-Bipolarzellen der Stäbchen bildet. Es bleibt jedoch ein eindeutiger Beleg für diese Hypothese zu erbringen. Doch zunächst stellt sich die Frage, ob es sich beim TRPM1-Protein überhaupt um ein porenbildendes Protein handelt und falls ja, welche biophysikalischen Eigenschaften es aufweist. Der Klärung dieser Fragen, ebenso wie dem Vergleich zum stark homologen TRPM3-Kanal, soll in diesem Kapitel nachgegangen werden.

TRPM3-Kanäle werden durch PregS aktiviert (Wagner et al., 2008) und zeigen auswärtsrektifizierende Ströme, die durch intrazelluläres Mg^{2+} inhibiert werden (Oberwinkler et al., 2005). Dieser Kanal leitet divalente Kationen, besonders Ca^{2+} (Oberwinkler et al., 2005; Oberwinkler & Philipp, 2007) und Zn^{2+} (Wagner et al., 2010), und wird durch extrazelluläres Na^+ inhibiert (Oberwinkler et al., 2005). Nähere Angaben zu TRPM3-Kanälen finden sich unter Kapitel 1.1.1.2..

Uns ist es gelungen, nicht nur TRPM3-Kanäle, sondern auch das TRPM1-Protein in HEK293-Zellen zu überexprimieren, was uns eine elektrophysiologische Untersuchung mit Hilfe der whole cell Patch Clamp Technik ermöglichte. Doch wie auch in Koike et al. (2009) war es uns nur möglich ausgesprochen kleine Ströme in den mit dem TRPM1-Protein transfizierten Zellen zu messen. Wie auch in mit dem TRPM3-Protein transfizierte Zellen, konnte ich eine Zunahme der Ströme bei Stimulation mit PregS beobachten.

Aus früheren FRET-Versuchen und proteinbiochemischen Untersuchungen ist bekannt, dass TRPM1- und TRPM3-Proteine ebenso wie andere TRPM-Proteine miteinander interagieren (Lis, 2005). Nachgewiesen ist dies z.B. für Kanäle TRPM6 und TRPM7 (Chubanov et al., 2004; Li et al., 2006). Beide Kanäle sind hoch homolog zu TRPM1 und TRPM3. Somit wurden in diesem Kapitel neben den Wildtypen der beiden TRP-Proteine und von uns konstruierten Chimären, in denen jeweils die die Pore des Proteins gegen die des anderen ausgetauscht worden war, auch eine Cotransfektion der beiden Proteine untersucht. Hinzu kamen noch Versuche mit einem TRPM1 Konstrukt aus dem das im N-Terminus befindliche Exon 11 herausgeschnitten wurde. Diese Konstrukte, sowie deren Überexpression in HEK293-Zellen ermöglichten eine nähere Untersuchung der Eigenschaften des TRPM1-Proteins und den Vergleich zum TRPM3-Kanal. Getestet wurden die Aktivierbarkeit durch PregS, Rektifizierung, sowie die Permeabilität für divalente Kationen.

6.3. Material und Methoden

6.3.1. Elektrophysiologie

Alle Messungen wurden mit Hilfe der zu Beginn dieser Arbeit beschriebenen whole cell Patch Clamp Methode (Kapitel 3.2.3) durchgeführt.

6.3.2. Molekularbiologie

Untersucht wurden die Eigenschaften von TRPM1 und TRPM3, einer Cotransfektion aus TRPM1- und TRPM3-Proteinen im Verhältnis 3:1, den Chimären TRPM1 mit TRPM3-Pore (M1-M3-M1) und TRPM3 mit der TRPM1-Pore (M3-M1-M3). Hinzu kamen noch Messungen an punktmutierten TRPM1 Konstrukten. Die TRPM1-Pore wurde mutiert und in den TRPM3 Kanal eingefügt. Zusätzlich wurden noch Konstrukte kloniert, denen längere Aminosäuresequenzen, wie das Exon 11 im N-Terminus und LYAMEIN in der Porenregion, des TRPM1 fehlen. Beide Sequenzen sind nur im TRPM1-Protein nicht aber in den homologen TRPM-Kanälen, wie TRPM3, TRPM6 und TRPM7 vorhanden.

Konstruktion der beiden Porechimären

Zunächst wurden für die M1M3M1 Chimäre im MycTRPM1_PoM1 (TRPM1 WT) in Vektor pBS per Mutagenese 2 HpaI Schnittstellen 5' (C2979T) und 3' (C3339T) der Pore gesetzt, um so MycTRPM1_PoM1_5'3'HpaI_pBS zu erhalten. Es handelt sich hierbei um stille Mutationen, um einen Aminosäureaustausch zu unterbinden. MycTRPM1_PoM1_5'3'HpaI wurde im Anschluss aus dem Vektor pBS herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pcAGGSL1 ligiert. MycTRPM1_PoM1_5'3'HpaI wurde mit einem HpaI Verdau die Pore entfernt und die ebenfalls mit HpaI geschnittene TRPM3-Pore in den TRPM1-Backbone gesetzt. Für die M3M1M3 Chimäre wurde die gleiche Vorgehensweise gewählt, allerdings umgekehrt (Abb. 19b).

Deletion des LYAMEIN- Motivs in der M1 Pore

Im Vektor PoM1_pBS_HpaI, das ist der Vektor pBluescript mit der TRPM1-Pore, wurden zunächst die Schnittstellen PmeI 1059 AS und SmaI 1069 AS durch Mutagenese generiert. Im zweiten Schritt erfolgte der Restriktionsverdau mit PmeI und SmaI, um das Stück zwischen den Schnittstellen zu entfernen. Es fehlen nun die Aminosäuren 1066 bis 1078 in der TRPM1-Pore (Abb. 19a). Anschließend wurde die Ligation mit einem synthetischen Oligonukleotid (26bp), das der TRPM1-Pore ohne das LYAMEIN-Motiv entspricht, durchgeführt. Die TRPM1-Pore wurde aus dem Vektor PoM1_pBS_HpaI mit HpaI herausgeschnitten und mit dem Backbone (=Protein ohne Porenregion) TRPM1 bzw. TRPM3 im pcAGGSL1 (geschnitten mit HpaI und anschließend phosphoryliert) ligiert.

Deletion Exon 11 im TRPM1

Im Vektor TRPM1new_shPo_PBS_HpaI (hier wurden 7 im ursprünglichen TRPM1 WT vorkommende Punktmutationen entfernt) (Vektor pBluescript mit der TRPM1-Pore), wurden die Schnittstellen PmeI 1318 bp und PmeI 1508 bp per Mutagenese generiert. Das komplette Konstrukt wurde dann per Restriktionsverdau in den Expressionsvektor pcAGGSL1 (Abb. 7) zurück gesetzt. Es folgte ein Restriktionsverdau mit PmeI, um das Stück zwischen den Schnittstellen zu entfernen.

Im Anschluss daran erfolgte die Ligation mit einem synthetischen Oligonukleotid (19bp). Es fehlen nun die AS 446 bis 502, die genau dem Exon 11 entsprechen (Abb. 19c).

Konstruktion der Punktmutationen

Ausgangskonstrukt für die in diesem Kapitel gemessenen Punktmutanten diente PoM1shPo_pBS_Hpal (Pore von TRPM1 im Vektor pBS). Nach erfolgter Mutagenese mit den entsprechenden Mutageneseprimern wurden die Konstrukte zur Überprüfung mit dem hauseigenen Gerät (Abi Prism) sequenziert. Der gewünschte Bereich, die Pore inkl. der Mutation bzw. Mutationen (ca. 350 bp), wurde mit Hpal herausgeschnitten (Abb. 19a).

Im Anschluss erfolgte die Ligation mit einem Hpal geschnittenen und dephosphoriertem Expressionsvektor KozTRPM3_o.Pore_pcAGGSL1 (also das TRPM3-Protein ohne Pore im Expressionsvektor pcAGGSL1) (Abb. 7).

6.3.3. Zellkultur

Die zu messenden Konstrukte wurden in HEK293-Zellen überexprimiert. Transfektion und Zellkultur sind in Kapitel 3.2.1. beschrieben.

6.3.4. Lösungen

Es wurde unsere Standardbadlösung und Standardintrazellulärlösung verwendet (siehe Kapitel 3.1.2).

PregS-Lösung enthält: Der Standardbadlösung wurden die gewünschte PregS Konzentration (Stocklösung 50 mM PregS in DMSO) zugegeben.

Nif-Lösung enthält: Der Standardbadlösung wurden 20 μ M Nif (Stocklösung 50 mM Nif in DMSO) zugegeben. Diese Lösung wurde, aufgrund der Lichtsensibilität des Nif, an jedem Messtag frisch angesetzt.

120 mM Ca²⁺-Lösung enthält (in mM): 120 CaCl₂, 10 HEPES und 16 D-Glucose. Der pH-Wert wurde mit NMDG (3-4 mM) auf 7,2 eingestellt. Die Osmolalität betrug 320-330 mOsm.

10 mM Zn²⁺-Lösungen enthält (in mM): 10 Zn²⁺, 10 HEPES und 274-287 D-Glucose. NMDG (1,3-1,7 mM) wurde zur Einstellung des pH-Werts auf 7,1 verwendet. Die Osmolalität lag im Bereich von 320-330 mOsm. Der pH-Wert wurde nur auf 7,1 anstatt 7,2 wie bei allen anderen Lösungen eingestellt, da Zn(OH)₂ bei einem zu hohen pH-Wert ausfällt.

0.001 mM bis 1 mM Zn²⁺-Lösungen enthalten: Der Standardbadlösung wurde die gewünschte Zn²⁺-Konzentration (Stocklösung 100 mM Zn²⁺ in H₂O) zugegeben.

Den Lösungen der unterschiedlichen Zn²⁺-Konzentrationen wurden noch 100 µM PregS zugegeben, um so die Inhibition des PregS-induzierten Stroms durch Zn²⁺-Ionen ermitteln zu können.

Den Lösung 120 mM Ca²⁺ und 10 mM Zn²⁺ wurden noch 35 µM PregS zugegeben, um die Lösung mit und ohne PregS miteinander vergleichen zu können.

6.4. Ergebnisse

Um zu testen, ob TRPM1-Proteine funktionelle Ionenkanäle bilden, wurde das Protein in HEK293-Zellen überexprimiert und mit Hilfe der whole cell Patch Clamp Technik die Membranströme gemessen. Unter Standardbedingungen, also während der Applikation unserer Standardbadlösung, konnte kein konstitutiv aktiver Strom beobachtet werden. Da TRPM1- und TRPM3-Proteine hoch homolog zu einander sind und TRPM3 durch das Steroid PregS aktiviert wird, wurde getestet, ob diese Aktivierung auch für TRPM1 möglich ist. Um nachzuweisen, dass die Überexpression des TRPM1-Proteins in HEK293-Zellen zu zuvor nicht messbaren PregS-induzierten Strömen führt, wurden mit TRPM1 transient transfizierte und zur Kontrolle nicht transfizierte HEK293-Zellen mit 35 µM PregS stimuliert (Abb. 20). Die Stromantworten wurden anschließend statistisch miteinander verglichen (Abb. 20b).

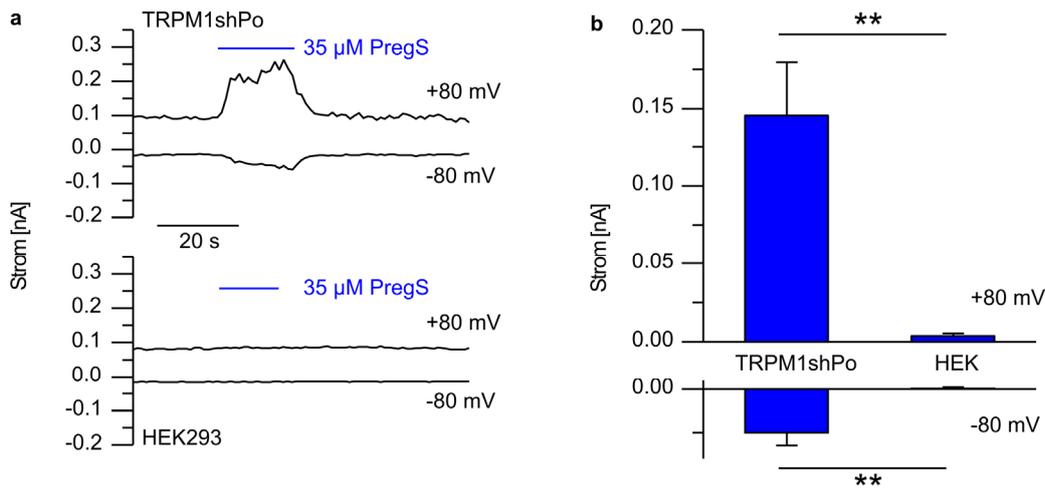


Abb. 20: TRPM1 ist durch PregS aktivierbar.

a Repräsentative Beispielmessungen. Oben TRPM1 überexprimierende HEK Zelle, unten zur Kontrolle eine nicht transfizierte HEK Zelle. Transfizierte und nicht transfizierte Zellen wurden mit 35 µM PregS stimuliert. **b** Statistische Analyse der PregS-induzierten Ströme in transfizierten und nicht transfizierten Zellen (n=9).

Die Applikation führte in den transfizierten Zellen zu einer signifikanten Stromzunahme im Vergleich zu den nicht transfizierten Kontrollzellen. Abb. 20 zeigt eindeutig, dass die Überexpression von TRPM1-Proteinen in HEK293-Zellen zu einem PregS-induzierten Strom führt. Wie auch im Fall der TRPM3-Kanäle erfolgt die Antwort schnell und ist reversibel. Da gezeigt werden konnte, dass Kanäle in mit TRPM1 transfizierten Zellen durch PregS aktiviert werden (Abb. 20), stellte sich nun die Frage ob auch hier eine Abhängigkeit zur Konzentration besteht. Um dieser Frage nachzugehen, wurden HEK293-Zellen, welche mit dem TRPM1-Protein transfiziert wurden, mit 10 µM, 35 µM und 100 µM PregS stimuliert und eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt (Abb. 21). Abb. 21 zeigt trotz kleiner Ströme, dass die PregS-Antwort in den transfizierten Zellen, dosisabhängig ist.

Die EC_{50} -Werte für TRPM1 für PregS liegen bei 9 µM für die Auswärtsströme und 12 µM für die Einwärtsströme. Die in unserem Labor ermittelten EC_{50} -Werte für TRPM3-Kanäle hingegen liegen beim Auswärtsstrom bei 12 µM für den Einwärtsstrom bei 23 µM PregS (Wagner et al., 2008).

Die Stromgrößen liegen für mit dem TRPM1-Protein transfizierten Zellen (+ 80 mV, 100 µM PregS) bei nur durchschnittlich 150 pA in whole cell Ableitungen, während diese beim TRPM3 bei gleichen Bedingungen im nA-Bereich liegen. Diese Stromantworten sind trotz ihrer Signifikanz so gering, dass eine aussagekräftige biophysikalische Analyse schwierig ist.

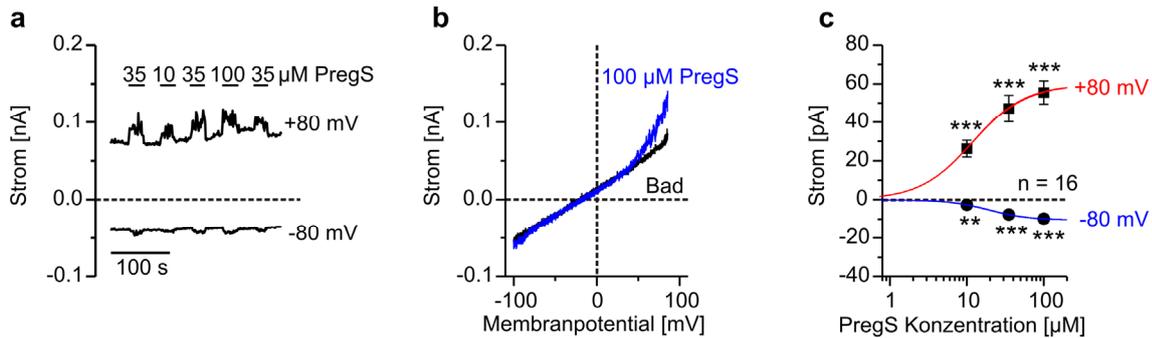


Abb. 21: TRPM1 wird durch PregS dosisabhängig aktiviert.

a Repräsentative Beispielmessung einer mit TRPM1 transfizierten Zelle. Stimulation mit 10 μM, 35 μM und 100 μM PregS. **b** Strom-Spannungs-Kurven der in a gezeigten Zelle. **c** Dosis-Wirkungs-Kurven für PregS auf mit TRPM1 transfizierte Zellen. Einwärtsstrom in blau, Auswärtsstrom in rot (n=16).

Zusätzlich wirft die geringe Größe der Stromantworten Zweifel auf, ob es sich bei den gemessenen Strömen tatsächlich um Ströme handelt, welche durch eine von TRPM1-Proteinen geformte Pore fließen. Alternativ könnte es sein, dass die Überexpression des TRPM1-Proteins in HEK293-Zellen zu einer geänderten Expression eines anderen Kanals führt. Zur Lösung des Problems entwickelten wir drei unabhängige Strategien, um nachzuweisen, dass es sich bei den gemessenen Strömen um Ströme durch die TRPM1-Pore handelt und es sich somit bei diesem Protein um einen Ionenkanal handelt. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen dem TRPM1- und TRPM3-Protein in der Porenregion zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne (Abb. 19a), setzten wir die Porenregion von TRPM1 in das TRPM3-Protein und umgekehrt (Abb. 19b). Durch diese Porentransplantation entstanden die beiden Chimären M1-M3-M1 und M3-M1-M3 (Abb. 19b). Beide Chimären zeigen nach Überexpression in HEK293-Zellen deutliche Stromantworten auf die Stimulation durch PregS (Abb. 22b+e). Diese Tatsache ermöglichte nun auch die Eigenschaften der TRPM1-Pore quantitativ zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit unsere Untersuchungen voran zu treiben, bot uns die Entfernung des Exons 11 im TRPM1-Protein. Dieser Bereich im N-Terminus konnte im TRPM1-Protein aber nicht im TRPM3-Protein identifiziert werden (Abb. 19c). Die Vermutung war, dass dieser Bereich für die Reduktion der Stromamplitude verantwortlich sein könnte. Daher entwarfen wir ein Konstrukt ohne diese Region (TRPM1ΔExon11) (Abb. 19c). Die Überexpression dieses Konstrukts in HEK293-Zellen führte, wie schon zuvor die Überexpression der Chimären, zu einer deutlichen Erhöhung der Stromantwort, im Durchschnitt 6,9 mal so hoch im Vergleich zum TRPM1 WT, die aber nicht so groß wie bei den Chimären ist.

Die dritte Strategie beruht auf dem Wissen, dass TRPM-Proteine heteromultimere Kanäle formen. Nachgewiesen ist dies z.B. für TRPM6- und TRPM7-Kanäle (Chubakov et al., 2004; Li et al., 2006), beide Kanäle sind hoch homolog zu TRPM1 und TRPM3. Überprüft wurde die Hypothese der Formung von funktionellen heteromultimeren Kanälen aus TRPM1 und TRPM3 mittels einer Cotransfektion (TRPM3/M1 CoT) der beiden Proteine in HEK293-Zellen. Hierbei wurden die cDNAs in einem Verhältnis von TRPM1 3:1 TRPM3 transfiziert, um die Wahrscheinlichkeit der Bildung von homomultimeren TRPM3-Kanälen zu reduzieren.

Die Konstrukte aus TRPM1 und TRPM3 sowie ihre jeweiligen Wildtypen wurden in den im Folgenden präsentierten Versuchen auf ihre biophysikalischen Eigenschaften und somit auf die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen TRPM1- und TRPM3-Pore hin untersucht.

Zellen, die mit TRPM3 WT bzw. den unterschiedlichen TRPM1- und TRPM3-Konstrukten transfiziert waren, wurden mit 35 μ M PregS stimuliert (Abb. 22). Alle sechs Proteine zeigen Strömen, die durch PregS aktiviert werden. Die TRPM1-Pore zeigt jedoch im Vergleich zur TRPM3-Pore ein verändertes Verhältnis zwischen Auswärts- und Einwärtsstromgröße. Die Rektifizierung ist somit anders. Der Einwärtsstrom in Konstrukten mit der TRPM1-Pore ist im Vergleich zum Auswärtsstrom größer als es bei der TRPM3-Pore der Fall ist. Anders ausgedrückt, ermittelt man den Rektifizierungsindex (Abb. 22h), indem man den Auswärts- durch den Einwärtsstrom teilt (bei +80 bzw. -80 mV gemessen), so sinkt dieser je stärker die TRPM1-Pore vertreten ist. Alle Konstrukte, gleich welche Pore enthalten war, zeigten jedoch auch weiterhin einen auswärtsrektifizierenden Verlauf der Strom-Spannungskurven (Abb. 22g). Die systematisch auftretende Variation der Rektifizierungseigenschaften lässt stark vermuten, dass die beiden hier untersuchten Kanäle unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Da der gemessene Rektifizierungsindex für die Cotransfektion sich signifikant vom TRPM3 WT und ebenfalls signifikant vom TRPM1 WT unterscheiden (Abb. 22c) und sich hervorragend in die Reihe der statistisch ausgewerteten Rektifizierungsindizes einreicht (Abb. 22h), kann man vermuten, dass TRPM1- und TRPM3-Proteine nicht nur miteinander interagieren, sondern auch

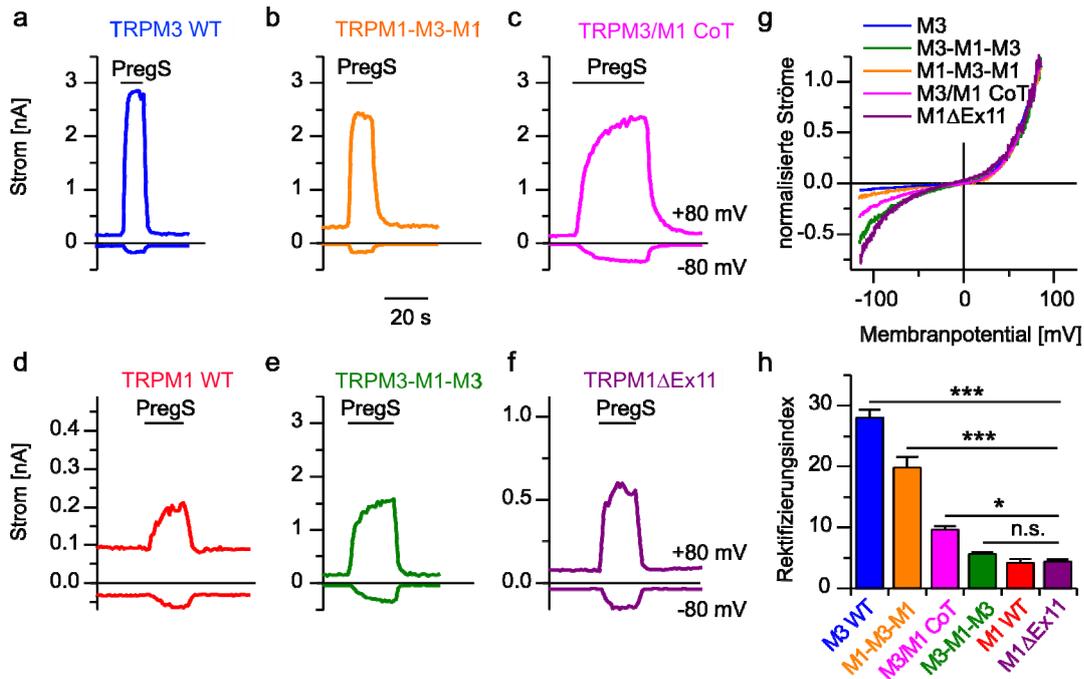


Abb. 22: Rektifizierung bei TRPM1 und TRPM3 Chimären und heteromultimeren Kanälen. **a-f** Repräsentative Beispielmessungen der einzelnen Konstrukte. **g** Normalisierte (auf +80 mV) Strom-Spannungs-Verhältnisse der einzelnen Konstrukte auf 35 μM PregS (Farben entsprechen denen in a-d). **f** Rektifizierungsindex (RI = $I_{+80} / I_{-80} \cdot -1$) (n=11-44).

funktionelle heteromultimere Kanäle bilden. Da jedoch auch die Möglichkeit besteht, dass die Änderung des Rektifizierungsindex durch eine Addition der Ströme durch homomultimere TRPM1- und TRPM3-Kanäle in der gemessenen Zelle zustande kommt, wurde zusätzlich noch die Stromdichte analysiert. Hier ergaben sich bei TRPM3 WT die Werte $-9,02 \pm 1,46$ pA/pF für den Einwärtsstrom und 222 ± 26 pA/pF für den Auswärtsstrom. Für TRPM1 WT konnte eine Stromdichte von $-2,26 \pm 0,805$ pA/pF für den Einwärtsstrom und $8,26 \pm 2,9$ pA/pF für den Auswärtsstrom ermittelt werden und für die Cotransfektion $-34,6 \pm 4,72$ pA/pF für den Einwärtsstrom und $283 \pm 33,4$ pA/pF für den Auswärtsstrom. Teilt man nun den gemessenen Auswärtsstrom der Cotransfektion durch den für TRPM3 WT ermittelten Rektifizierungsindex von $24,61 \pm 4,7$, so erhält man die zu erwartenden Stromdichte des Einwärtsstroms für der Annahme, es würden nur homomultimere TRPM3-Kanäle gemessen. Dieser weicht mit $-11,5 \pm 2,7$ pA/pF deutlich vom tatsächlich ermittelten Wert für die Cotransfektion ab. Eine Addition dieses angenommenen Wertes und der Stromdichte bei reinen TRPM1-Strömen liegt nur bei $-13,8 \pm 4,8$ pA/pF und somit ebenfalls unter den tatsächlich gemessenen $-34,6 \pm 4,72$ pA/pF der Cotransfektion. Somit kann eine Addition von Strömen durch homomultimere TRPM1- und TRPM3-Kanäle ausgeschlossen und die Bildung von funktionellen heteromultimeren Kanälen aus TRPM1

und TRPM3 angenommen werden. Man beachte, dass der Wert $24,61 \pm 4,7$ für den TRPM3 WT Rektifizierungsindex von dem in Abb 22h dargestellten geringfügig abweicht. Dies liegt daran, dass hier durch den gemittelten Wert der Stromdichte geteilt wird, während in Abb. 22h der Quotient für jede Zelle berechnet und dann erst gemittelt wurde.

Die folgenden Untersuchungen galten dem Ziel die Poreneigenschaften, speziell die Permeabilität des TRPM1 zu ermitteln. TRPM3-Kanäle sind hochgradig permeabel für Ca^{2+} -Ionen (Wagner et al, 2008). Somit wurde zunächst unter bi-ionischen Bedingungen mit 120 mM Ca^{2+} auf der extrazellulären Seite die Permeabilität von TRPM1 für Ca^{2+} -Ionen getestet (Abb. 23).

Die Stromdichte, ermittelt für die PregS-induzierten Einwärtsströme unter 120 mM Ca^{2+} -Bedingungen, zeigen signifikante Unterschiede, insbesondere zwischen den Konstrukten mit der TRPM3-Pore und denen mit der TRPM1-Pore (Abb. 23g+h). Die Ca^{2+} -Ströme, welche durch die TRPM1-Pore fließen sind also deutlich kleiner, als jene die durch die TRPM3-Pore fließen. Sowohl TRPM1 Δ Exon11 wie auch TRPM1 WT zeigen signifikante Unterschiede zu den als Kontrolle gemessenen nicht transfizierten HEK293-Zelle. Die Transfektion mit diesen Konstrukten führt also ganz klar zu einer neuen Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen. Alle gemessenen Konstrukte zeigen deutliche Ca^{2+} -Einwärtsströme bei Coapplikation von 120 mM Ca^{2+} und 35 μM PregS bzw. 100 μM PregS (Abb. 23). Somit ist nachgewiesen, dass neben der TRPM3-Pore auch die TRPM1-Pore für Ca^{2+} -Ionen permeabel ist.

Betrachtet man nun noch die Umkehrpotentiale für die einzelnen Konstrukte (Abb. 23i), ist festzustellen, dass auch das Umkehrpotential signifikant unterschiedlich zwischen der TRPM1- und TRPM3-Pore ist. Aus diesen Versuchen unter bi-ionischen Bedingungen, außen nur Ca^{2+} -Ionen und innen Cs^+ -Ionen, zeigt sich, dass alle gemessenen Konstrukte permeabel für Ca^{2+} -Ionen sind, jedoch besitzt die Pore von TRPM3 eine höhere relative Permeabilität von Ca^{2+} zu Cs^+ als die Pore von TRPM1.

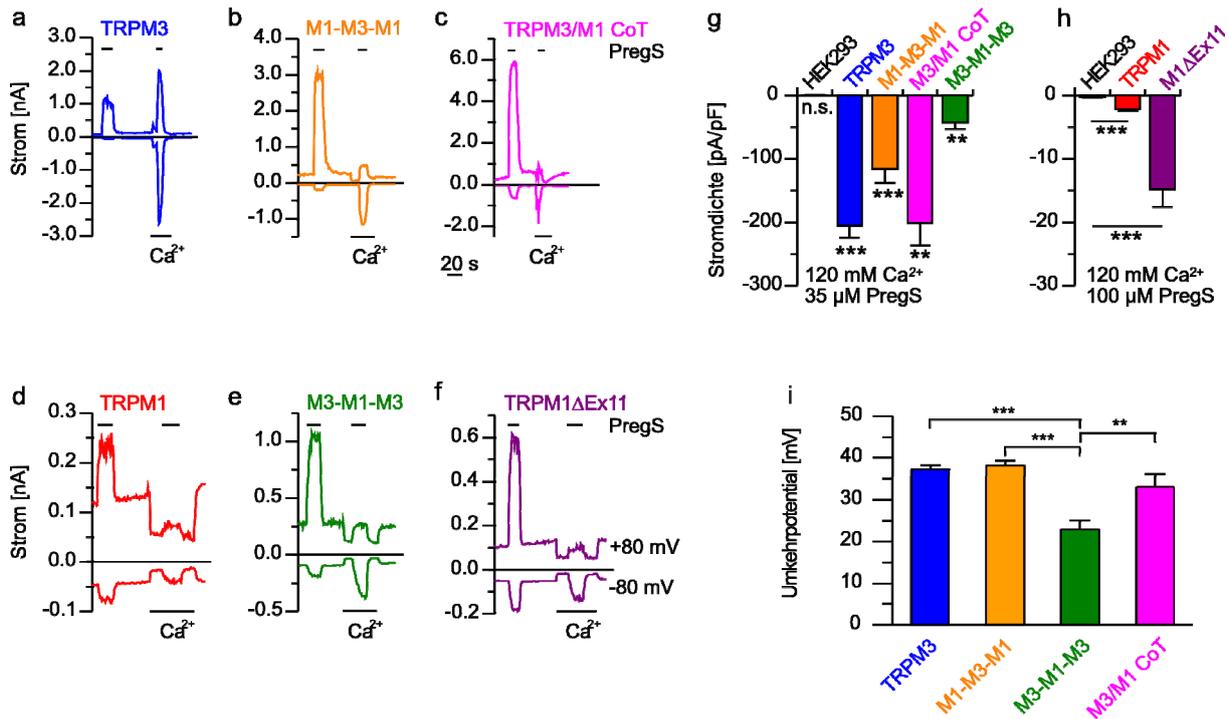


Abb. 23: Die TRPM1-Pore ist permeabel für Ca²⁺-Ionen.

a-f Repräsentative Beispielmessungen der angegebenen TRPM1 und TRPM3 Konstrukte bzw. des TRPM3 WT. Applikation von 35 μM oder 100 μM PrgS (für HEK293, TRPM1 und TRPM1ΔExon11), 120 mM Ca²⁺ und einer Lösung, die beides enthielt. **g** Statistische Auswertung der Stromdichte [pA/pF] bei Coapplikation von 120 mM Ca²⁺ und 35 μM PrgS. **h** Die statistische Auswertung der Stromdichte [pA/pF] bei Coapplikation von 120 mM Ca²⁺ und 100 μM PrgS. (Daten stammen von Dr. Sachar Lambert und wurden zu Vergleichszwecken mit eingefügt). **i** Statistische Analyse des Umkehrpotentials während der Applikation von 120 mM Ca²⁺ plus 35 μM PrgS (n=8-10). Die Signifikanz der Unterschiede für die Umkehrpotentiale wurde mit Hilfe eines ANOVA Newmann-Keuls Post-Test ermittelt.

Die TRPM3-Pore hat ein Verhältnis $P_{Ca^{2+}}/P_{Cs^+}$ von $9,44 \pm 0,59$, M1-M3-M1 $10,15 \pm 0,81$, M3-M1-M3 $3,80 \pm 0,54$ und für die Cotransfektion wurde ein Wert von $7,66 \pm 1,01$ berechnet. Das Verhältnis wurde über die Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung (Hille, 2001; Formel 14.11a) berechnet.

Neben Ca²⁺- fließen auch Zn²⁺-Ionen durch TRPM3-Kanäle (Loch, 2007; Wagner et al., 2010). Da nun klar gezeigt werden konnte, dass die TRPM1-Pore eine Permeabilität für Ca²⁺-Ionen besitzt, war der nächste naheliegende Schritt, gleiches für Zn²⁺ zu untersuchen.

Hierzu wurden die zu messenden Konstrukte mit einer 10 mM Zn²⁺-Lösung und 35 μM PrgS stimuliert (Abb. 24).

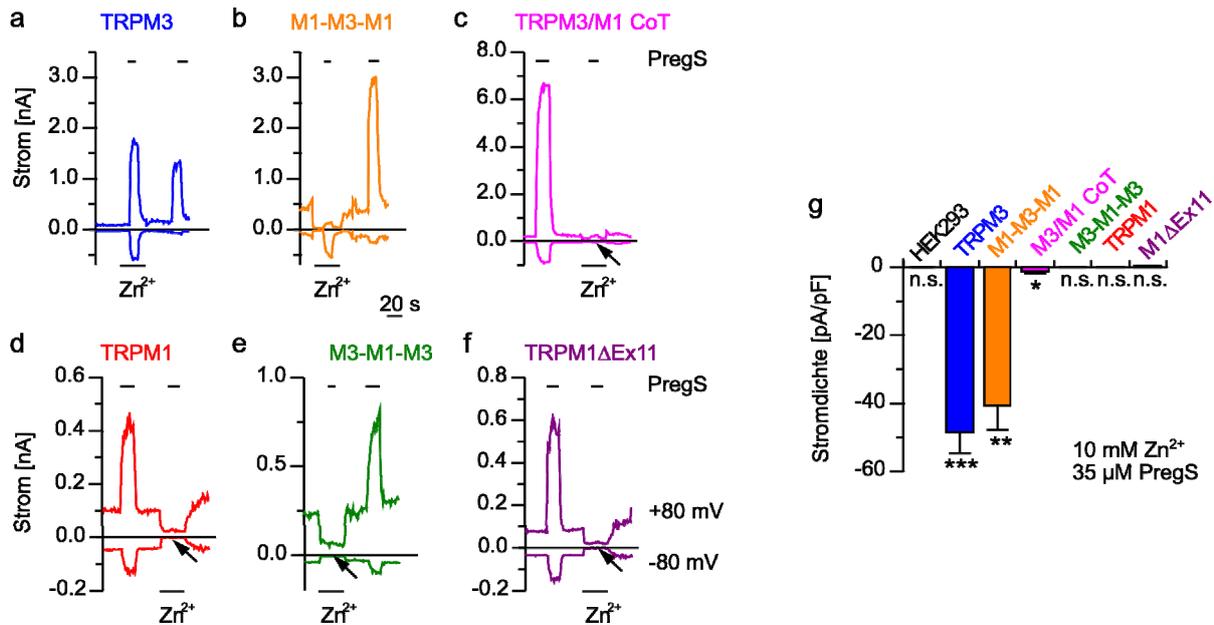


Abb. 24: Die TRPM1-Pore leitet keine Zn²⁺-Ionen, anders als die TRPM3-Pore. **a-f** Repräsentative Beispielmessungen. Applikation von 35 μ M PregS und 10 mM Zn²⁺. **d+f** Daten stammen von Dr. Sachar Lambert und wurden zu Vergleichszwecken mit eingefügt. **g** Statistische Analyse der Stromdichte der Einwärtsströme (n=5-11).

Während diese Coapplikation von PregS und Zn²⁺ bei TRPM3-Kanälen zu einer Zunahme des Einwärtsstroms im Vergleich zur alleinigen Zn²⁺-Antwort führt, ist dies bei Konstrukten mit der TRPM1-Pore nicht der Fall (Abb. 24c-f). Die Statistik zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Strömen bei Stimulation mit Zn²⁺ im Vergleich zur Stimulation mit Zn²⁺ + 35 μ M PregS für TRPM3 WT und die Porenchimäre M1-M3-M1 (Abb. 24g).

Betrachtet man die Stromdichte, so ist eindeutig zu erkennen, dass bei allen drei Konstrukten, welche ausschließlich die TRPM1-Pore beinhalten, unter Zn²⁺-Bedingungen auch bei Stimulation mit PregS keine Stromzunahme zeigen. Die Statistik zeigt keine Signifikanz beim Test der Stromzunahme gegen 0 für diese drei Konstrukte. Anders als die TRPM3-Pore leitet die TRPM1-Pore also keine Zn²⁺-Ionen.

Ganz im Gegenteil dazu, die Ströme durch die TRPM1-Pore werden sogar durch Zn²⁺-Ionen inhibiert, was mit den im Folgenden dargestellten Graphen verdeutlicht wird (Abb. 25).

Für die nachfolgenden Versuche wurde der Standardbadlösung 1 mM Zn²⁺ hinzugefügt.

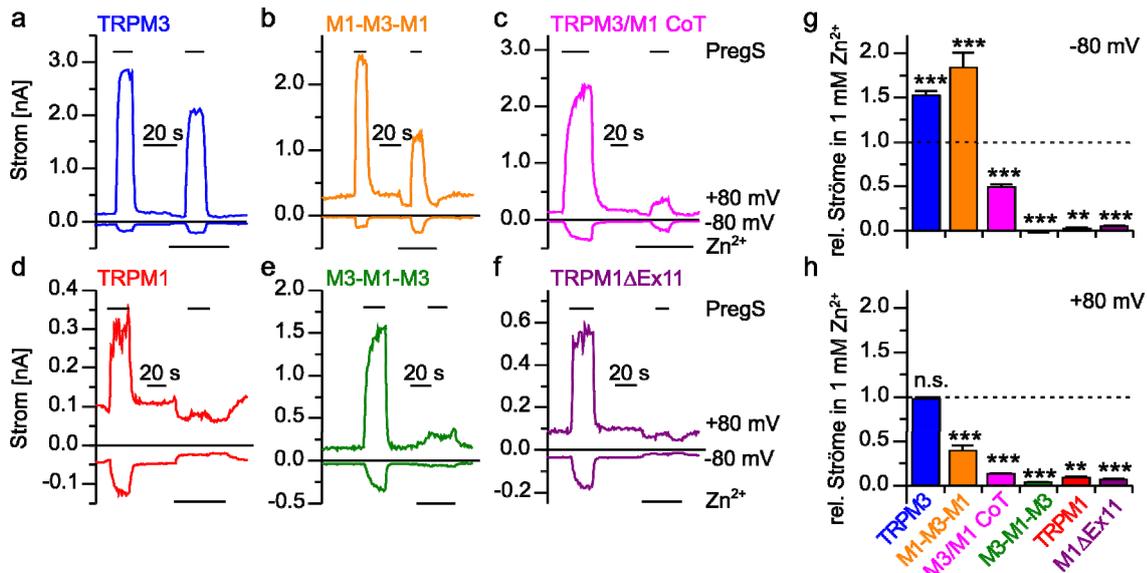


Abb. 25: Die TRPM1-Pore wird durch Zn²⁺-Ionen inhibiert.

a-f Repräsentative Beispielmessungen von TRPM1 und TRPM3 Konstrukten. Appliziert wurden 35 μM PregS und 1 mM Zn²⁺. **g+h** Statistische Analyse der rel. PregS-induzierten Ströme in 1 mM Zn²⁺ für den Einwärts- (g) und den Auswärtsstrom (h) [$I_{(\text{PregS}+\text{Zn}^{2+})} / I_{(\text{PregS})}$] (n=8-18).

Die PregS-induzierten Einwärtsströme bei allen Konstrukten, mit Ausnahme des TRPM3 WT, werden durch die in der Lösung enthaltenen Zn²⁺-Ionen inhibiert (Abb. 25). Die statistische Auswertung des Verhältnisses der PregS-induzierten Ströme in Standardbadlösung zu denen mit zusätzlich 1 mM Zn²⁺, verdeutlicht die drastische Reduktion der Ströme durch die Pore von TRPM1 (Abb. 25g+h). Somit wird klar gezeigt, dass die Ströme durch die TRPM1-Pore durch Zn²⁺-Ionen inhibiert werden (Abb. 25).

Da die TRPM1-Pore ganz im Gegensatz zur TRPM3-Pore durch Zn²⁺-Ionen inhibiert wird, stellte sich als nächstes die Frage, worin die Unterschiede der Kanäle liegen, die für eine solch extreme Divergenz in der Permeabilität verantwortlich sind.

Trotz der hohen Homologie der beiden hier untersuchten Poren weisen sie einige Unterschiede auf. Neben 15 Punktmutationen im Vergleich zu TRPM3 besitzt TRPM1 noch eine Aminosäuresequenz in der Porenregion, die in TRPM3 nicht zu finden ist, LYAMEIN (Abb. 19a). Das Ziel der nächsten präsentierten Versuche (Abb. 26) war es herauszufinden, ob eine oder mehrere der Punktmutationen oder die zusätzliche Aminosäuresequenz für die Inhibition des TRPM1 durch Zn²⁺-Ionen verantwortlich ist. Da sich in früheren Studien an anderen Ionenkanälen, zum Beispiel T-Typ Calciumkanäle, bezüglich der Zn²⁺-Bindung ein Histidin (H) als relevant herausstellte (Nelson et al., 2007), wurde auch im TRPM1-Protein zunächst die Position

H1034 in der Porenregion mutiert. Diese Histidin-Stelle ist im TRPM3-Protein nicht vorhanden. Hier befindet sich an dieser Position ein Phenylalanin (F) (Abb. 19a). Aus diesem Grund wurde H1034 zu F mutiert. Auch die zwei darauf folgenden Aminosäuren, welche sich vom TRPM3 unterscheiden wurden in einer dreifach Mutante (H1034F, E1036N, K1036E) untersucht. Auch in diesem Fall wurde zu der Aminosäure hin mutiert, die sich an homologer Stelle im TRPM3 befindet. Als weiteres Konstrukt kam noch eines mit der TRPM1-Pore hinzu, aus dem die Aminosäuresequenz LYAMEIN herausgeschnitten wurde. Alle drei veränderten TRPM1-Poren wurden im TRPM3 Backbone untersucht, um erstens größere Stromamplituden zu erreichen und zweitens, um sie besser mit der Chimäre M3M1M3 und TRPM3 WT-Kanälen vergleichen zu können. Erneut wurde der PregS-induzierte Strom mit und ohne die Addition von Zn^{2+} -Ionen untersucht (Abb. 26). In den Messungen mit den beiden Mutanten (H1034F) und (H1034F, E1036N, K1036E) lies sich bereits eine schwächere Inhibition im Vergleich zur TRPM1 WT-Pore beobachten (Abb. 26f). In Messungen mit TRPM1 Δ LYAMEIN aber kommt es zu keiner Inhibition. Dieses Konstrukt verhält sich wie TRPM3 WT-Kanäle (Abb. 26). Betrachtet man die aus den Messungen resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibition (Abb. 26f), lassen sich die gemessenen Konstrukte in drei Gruppen einteilen. Die stärkste Inhibition zeigt sich bei denen mit der nicht mutierten TRPM1-Pore. Die Mutante H1034F und die dreifach Mutante werden bereits geringer inhibiert. Und die dritte Gruppe bilden der TRPM3 WT und TRPM1 Δ LYAMEIN. Hier ist die Inhibition des Auswärtsstroms nur noch geringfügig und einwärts ist sogar eine Zunahme der Ströme, also eine Leitfähigkeit für Zn^{2+} , zu messen. Des Weiteren zeigt Abb. 26g, dass die Inhibition des TRPM1 durch Zn^{2+} -Ionen dosisabhängig ist. Für TRPM1 konnte ein IC_{50} -Wert von ca. 1 μ M Zn^{2+} ermittelt werden. Somit erfolgt die Inhibition bereits bei geringer Konzentration, was eine physiologische Relevanz möglich erscheinen lässt.

Für TRPM3 WT-Kanäle und Δ LYAMEIN sind beim Einwärtsstrom keine Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibition durch Zn^{2+} dargestellt (Abb. 26f), da es aufgrund der Permeabilität der beiden Konstrukte für Zn^{2+} nicht zu einer Abnahme sondern zu einer Zunahme der Ströme kommt.

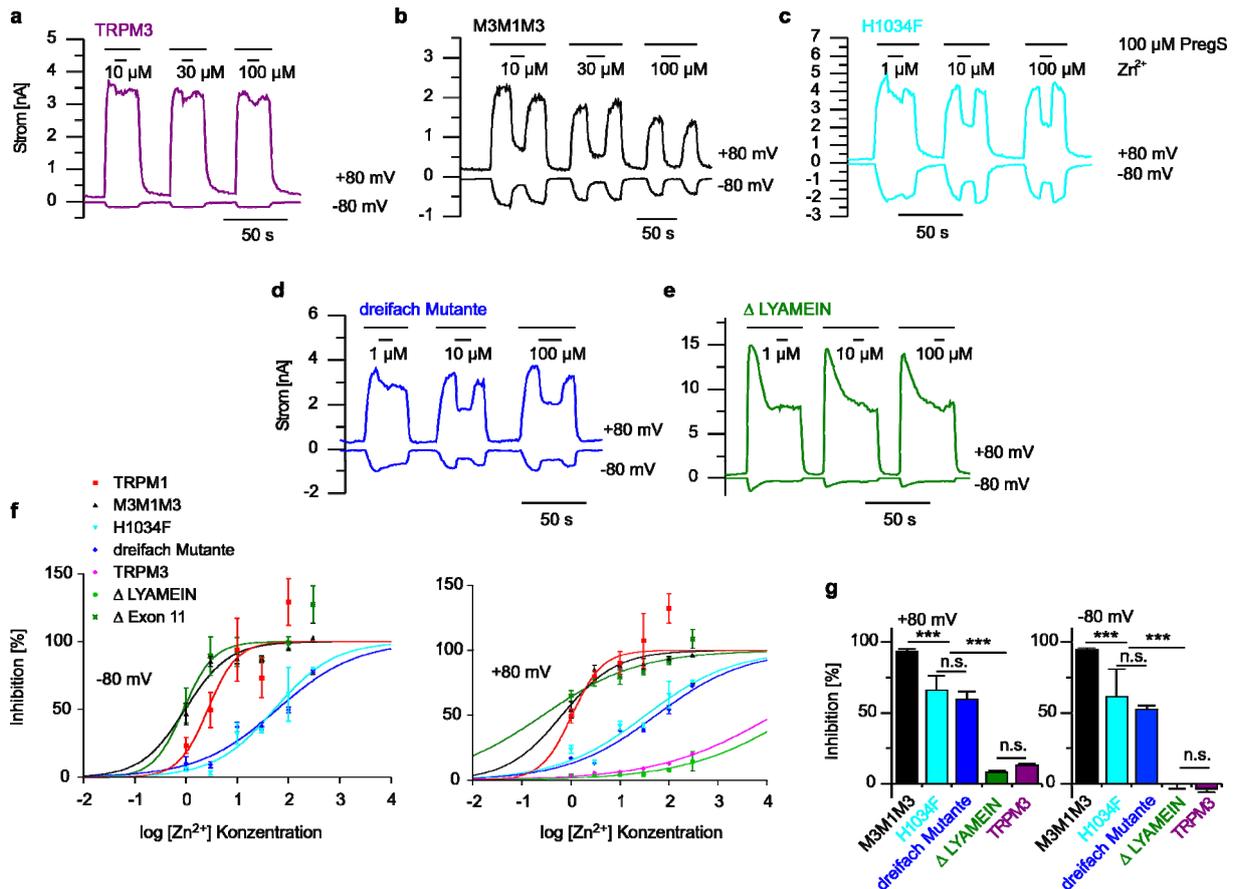


Abb. 26: Die Aminosäuresequenz LYAMEIN in der Porenregion des TRPM1-Proteins ist entscheidend für die Inhibition durch Zn²⁺-Ionen.

a-e Repräsentative Beispielmessungen des TRPM1- oder TRPM3-Wildtyps, der Mutante H1034F, der dreifach Mutante sowie des Konstrukts ΔLYAMEIN. Appliziert wurden 100 μM PregS ohne und mit unterschiedlichen Zn²⁺-Konzentrationen. **f** Ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurven für die durch Zn²⁺-Ionen hervorgerufene Inhibition der PregS-induzierten Ströme. **g** Statistische Auswertung der prozentualen Inhibition bei 100 μM Zn²⁺ (n=4-18).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der Histidin (H) Rest an der Position 1034 im TRPM1 durchaus eine geringe Rolle für die Inhibition des Kanals durch Zn²⁺-Ionen spielt, da man eine Abnahme dieser beobachten kann (Abb. 26). Entfernt man jedoch die Aminosäuresequenz LYAMEIN aus dem Porenbereich des TRPM1-Kanals kommt es zum völligen Verlust der Inhibition und zu einer vergleichbaren Leitfähigkeit für Zn²⁺-Ionen wie durch die TRPM3-Kanäle (Abb. 26). Der entscheidende Bereich ist somit eindeutig diese sieben Aminosäuren lange Sequenz in der Porenregion des TRPM1-Proteins, über die das TRPM3-Protein nicht verfügt. TRPM1 und TRPM3 unterscheiden sich somit insbesondere durch ihre Permeabilität für Zn²⁺-Ionen. Dabei hat TRPM1, wie die Messungen mit der Cotransfektion zeigen (Abb. 22-24), einen dominant negativen Effekt auf TRPM3. Da diese Ergebnisse aus Messungen mit transient transfizierten Zellen stammen, galt es als nächstes zu untersuchen,

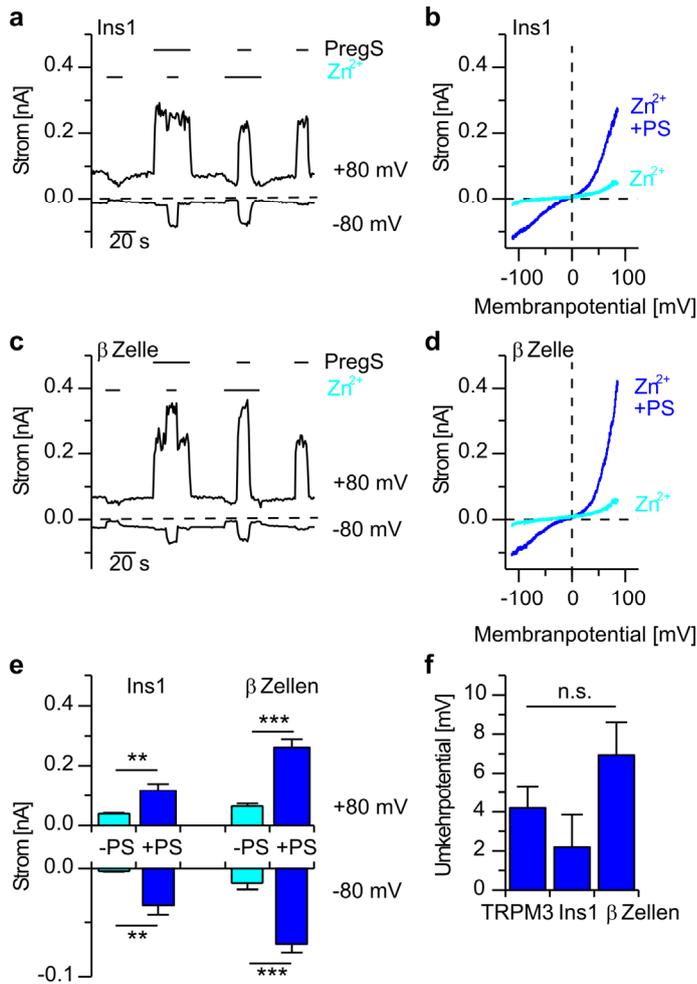


Abb. 27: Endogen exprimierte, PregS-sensitive Kanäle in Ins1 und β-Zellen sind hoch permeabel für Zn²⁺.

a Repräsentative Beispielmessung einer Ins1 Zelle. Applikation von 35 μM PregS, 10 mM Zn²⁺ und einer Lösung die aus beidem. **b** Strom-Spannungs-Verhältnis der in **a** dargestellten Zelle.

c Repräsentative Beispielmessung einer β-Zelle. **d** Strom-Spannungs-Verhältnis der in **c** dargestellten Zelle. **e** Statistische Analyse der Ströme in Ins1 (n=21) und β-Zellen (n=22) in 10 mM Zn²⁺ mit und ohne Aktivierung durch PregS. **f** Umkehrpotentiale bei 10 mM Zn²⁺.

ob TRPM1 auch in primären Zellen, bzw. natürlich TRPM1 und TRPM3 exprimierenden Zellen, mit TRPM3 interagiert und dessen Funktionen beeinflusst.

TRPM3 wird in pankreatischen β-Zellen von Mäusen und in der Ratten Insulinoma Zelllinie Ins1 exprimiert. Es wird vermutet, dass Zn²⁺ bei der Synthese von Insulin eine Rolle spielt, da beides gemeinsam ausgeschüttet wird (Dunn, 2005).

In Messungen mit 10 mM Zn²⁺ und 35 μM PregS konnte ich zunächst nachweisen, dass die endogen exprimierten, PregS-sensitiven Kanäle sowohl in Ins1 als auch in pankreatischen β-Zellen permeabel für Zn²⁺-Ionen sind (Abb. 27).

Abb. 27 zeigt die Beispielmessungen von Ins1 und β-Zellen mit Applikation der Lösungen mit 10 mM Zn²⁺, 35 μM PregS und beidem zusammen. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Ströme bei Coapplikation von PregS und Zn²⁺ im Vergleich zu nur Zn²⁺ in den Beispielmessungen und den dazugehörigen Strom-Spannungskurven (Abb. 27a-d). Die PregS-sensitiven Kanäle in allen drei Zelltypen, Ins1-Zellen, β-Zellen und mit TRPM3 WT transfizierte HEK293-Zellen, sind somit permeabel für Zn²⁺. Die Umkehrpotentiale sind nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 27f).

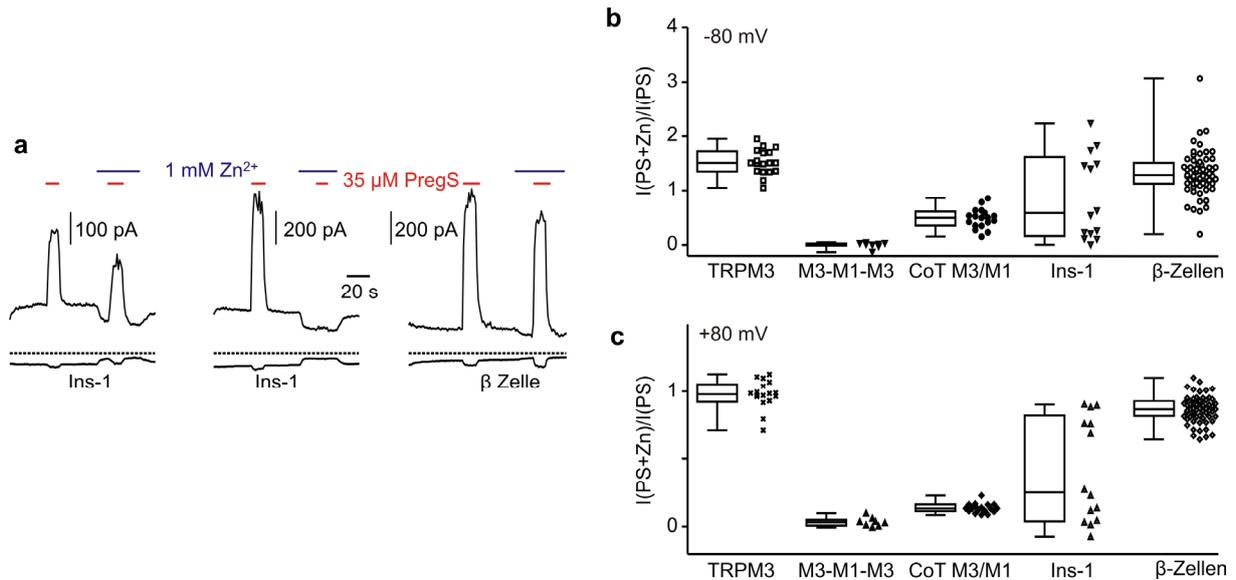


Abb. 28: Steroid-induzierte, Zn^{2+} -sensitive Kanäle in pankreatischen β -Zellen.

a Repräsentative Beispielmessungen zweier Ins1 und einer β -Zelle. Appliziert wurden 35 μ M PregS und 1 mM Zn^{2+} , sowie eine Lösung, die beides enthielt. Deutlich zu sehen ist, dass die Ins1-Zellen auf zwei sehr unterschiedliche Art und Weisen auf die Applikation von Zn^{2+} reagieren. In der ersten Beispielmessung ist eine deutliche Zunahme in der zweiten ein Ausbleiben dieser Ströme zu sehen. **b, c** Statistische Analyse der Stromverhältnisse bei PregS mit Zn^{2+} zu PregS ohne Zn^{2+} für den Einwärtsstrom (**b**) und den Auswärtsstrom (**c**). Die Boxen zeigen die 25te und 75te Percentile und Median an. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum an. Die Datenwolken der Ins1-Zellen zerfallen für den Einwärts- wie den Auswärtsstrom in zwei klar voneinander getrennte Bereiche.

Neben TRPM3-Kanälen konnte auch mRNA des TRPM1-Proteins in Ins1 anhand von Northernblots, nachgewiesen werden (Marcel Meissner & Stephan Philipp, Daten unveröffentlicht). Um nun zu testen, ob das TRPM1-Protein auch in diesen Zellen an der Formation der PregS-aktivierten Kanäle beteiligt ist und somit auf den TRPM3-Kanal regulatorisch einwirkt, wurden hier die Versuche mit 1 mM Zn^{2+} in der Standardbadlösung wiederholt (Abb. 28). Erneut war es das Ziel so zu überprüfen, ob es zur Reduktion der PregS-induzierten Ströme durch Zn^{2+} kommt. Während es in einigen Ins1-Zellen zu Inhibition der Einwärts- und Auswärtsströme kommt, lässt sich dies in β -Zellen nicht nachweisen (Abb. 28). Diese Ergebnisse lassen zumindest die Vermutung zu, dass es möglich ist, dass es in manchen Ins1-Zellen zu einer Interaktion zwischen dem TRPM3- und TRPM1-Protein kommt. Die hohe Variabilität, sprich die Unterschiede der einzelnen Messungen in der Antwort auf Zn^{2+} der Ins1-Zellen (Abb. 28b+c) zeigt aber auch, dass die Interaktion nicht zwangsläufig abzulaufen scheint, da genügend Zellen sich so verhalten, als ob sie nur TRPM3 WT-Kanäle enthielten. Doch selbst wenn das TRPM1-Protein tatsächlich in Ins1-Zellen exprimiert wird, so besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die Inaktivierung durch Zn^{2+} durch ein bisher noch nicht bestimmtes Protein zustande kommt. Anders ist es da bei den β -

Zellen. Hier zeigen die Daten, dass das TRPM1-Protein nicht an der Formation der PregS-aktivierten Kanäle beteiligt ist und somit auch keine direkte regulatorische Wirkung auf die Funktion des TRPM3-Kanals hat, da die Ergebnisse nicht signifikant von denen der TRPM3 WT-Kanäle abweichen.

6.5. Diskussion

Dieses Kapitel liefert überzeugende Belege dafür, dass es sich beim TRPM1-Protein um ein Ionenkanalbildendes Protein handelt. Die Überexpression des Proteins führt in HEK293-Zellen zu einer vorher nicht vorhandenen Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen (Abb. 23). Weiterhin konnte ich nachweisen, dass HEK293-Zellen, welche mit dem TRPM1-Protein transfiziert worden waren, signifikant höhere Antworten auf PregS zeigen als nicht transfizierte Zellen (Abb. 20+21). Diese Stromzunahme ist, wie auch bei TRPM3-Kanälen, dosisabhängig (Abb. 21). Jedoch kann von diesen ersten Ergebnissen ausgehend nicht ausgeschlossen werden, dass die neue Leitfähigkeit nicht evtl. durch eine Hochregulierung eines anderen Proteins in HEK293-Zellen entsteht, die durch die Überexpression des TRPM1-Proteins hervorgerufen wird. Die weiteren Versuche, insbesondere mit der Cotransfektion, zeigten dann jedoch, dass das TRPM1-Protein an der Bildung von funktionellen Kanälen ggf. auch an der Porenbildung eines Kanals beteiligt ist. Der gemessene Rektifizierungsindex, also das Verhältnis von Auswärts- zu Einwärtsstrom, für die Cotransfektion unterscheidet sich signifikant vom TRPM3 WT und ebenfalls signifikant vom TRPM1 WT (Abb. 22c). Die Werte ordnen sich hervorragend in die Reihe der statistisch ausgewerteten Rektifizierungsindizes ein (Abb. 22h). Diese Tatsache plus die, dass die Stromdichte der Einwärtsströme der Cotransfektion deutlich größer sind als die der Heteromultimeren oder die Addition dieser, stellt einen klaren Beleg dafür, dass es zur Interaktion zwischen TRPM1- und TRPM3-Proteinen kommt und sie funktionelle Kanäle bilden. In Folge dessen, kann auch die Vermutung geäußert werden, dass es durchaus auch möglich ist, dass das TRPM1-Protein an der Bildung der Pore von Ionenkanälen beteiligt ist.

Trotz der hohen Homologie zu TRPM3-Kanälen weist der gemessene Kanal in TRPM1-überexprimierenden HEK293-Zellen unterschiedliche Poreneigenschaften auf. So ist die IV-Kurve für den TRPM1 eine andere als für den TRPM3. Der Rektifizierungsindex, sinkt signifikant, wenn die TRPM1-Pore in einem Konstrukt enthalten

ist (Abb. 22). Auch nimmt die relative Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen ab, vergleicht man das Umkehrpotential sowie das unterschiedliche Verhältnis $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Cs}^+}$ von $9,44 \pm 0,59$ für die TRPM3-Pore mit denen der TRPM1-Poren-Konstrukte M3-M1-M3 $3,80 \pm 0,54$. Einer der wohl entscheidendsten Unterschiede dieser beiden Poren ist, dass TRPM3-Kanäle für Zn^{2+} -Ionen permeabel sind, TRPM1-Kanäle hingegen durch diese inhibiert werden (Abb. 24+25). Diese Unterschiede zwischen solch hoch homologen Proteinen sind nicht unüblich. In mehreren unterschiedlichen bereits vorausgegangenen Studien konnte bereits belegt werden, dass homologe Kanäle unterschiedlich durch Zn^{2+} reguliert werden. U.a. gilt dies für NMDA-Rezeptoren (Paoletti et al., 1997; Mony et al., 2009) und spannungsabhängige T-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Jeong et al., 2003), bei denen sehr ähnliche Isoformen oder sogar Spleißvarianten unterschiedlich sensitiv für Zn^{2+} sind. Somit stellt Zn^{2+} ein pharmakologisches Werkzeug zur Unterscheidung von TRPM1- und TRPM3-Kanälen dar.

Diese Unterschiede machen klar, dass es trotz der hohen Homologie entscheidende Unterschiede in der Aminosäuresequenz geben muss, die zu diesen Abweichungen in den Poreneigenschaften führen. Im Verlauf der hier präsentierten Untersuchungen erwies sich die Aminosäuresequenz LYAMEIN, welche in der TRPM1-Pore, jedoch nicht in der von TRPM3 zu finden ist, als entscheidend für die dosisabhängige Inhibition durch Zn^{2+} -Ionen (Abb. 26). Durch die Tatsache, dass auch die Punktmutationen H1034F und die dreifach Mutante in der TRPM1-Pore eine Reduktion der Zn^{2+} -Inhibition bewirken, d.h. eine Änderung der Poreneigenschaften vorliegt. Laut Voets und Nilius (2003), kann man, wenn eine Mutation in der vermeintlichen Porenregion zu einer Änderung der Poreneigenschaften des zu untersuchenden Proteins führt, von einem Ionenkanal sprechen.

TRPM1-Kanäle werden bereits bei niedrigen μM Konzentrationen ($\approx 1 \mu\text{M}$) von Zn^{2+} -Ionen in der Lösung inhibiert (Abb. 26g). Dieser Wert ist zwar um einiges höher als der der angenommenen freien Konzentration des Zinks im Gehirn von 19 nM (Frederickson et al., 2006), lässt aber dennoch die Vermutung zu, dass die Inhibition des TRPM1 durch Zn^{2+} -Ionen durchaus von physiologischer Relevanz sein könnte. Beispielsweise wird Zn^{2+} häufig gemeinsam mit Glutamat ausgeschüttet, so dass die Zn^{2+} Konzentration im synaptischen Spalt deutlich höher ist (Li et al., 2001). Auch in der Retina wird Zn^{2+} von den Zapfen ausgeschüttet (Redenti & Chappell, 2005; Redenti et al., 2007). Dies könnte entscheidend für die dort ablaufenden Prozesse sein, besonders da gezeigt wurde, dass TRPM1 in der postsynaptischen Membran von

Bipolar-Dendriten in der Synapse zwischen Photorezeptor und Bipolarzelle lokalisiert ist (Morgans et al., 2009; Koike et al., 2010). TRPM1 ist ein entscheidender Teil des mGluR6 gekoppelten Ionenkanals, welcher für die Generierung der depolarisierenden Lichtantwort in den On-Bipolarzellen verantwortlich ist (Morgans et al., 2009; Shen et al., 2009; Koike et al., 2010). Bei Dunkelheit kommt es zur Ausschüttung von Zn^{2+} in die Synapse zwischen Photorezeptor und Bipolarzelle. Hierbei kommt TRPM1 mit den Zn^{2+} -Ionen in Kontakt. TRPM1-Proteine könnten unter Umständen, wie in den eben genannten Veröffentlichungen vermutet, den Transduktionskanal in ON-Bipolarzellen bilden. Die schnelle Abgabe von Zn^{2+} -Ionen in den synaptischen Spalt inhibiert den TRPM1-Kanal, evtl. schneller als die Transduktionskaskade, die durch die Bindung von Glutamat an mGluR6 initiiert wird. Ein solcher Mechanismus könnte daher unter Umständen die temporelle Auflösung der Informationen durch Bipolarzellen deutlich verbessern. In dieser Arbeit wurde stets die kurze Porenvariante des TRPM1-Proteins gemessen. Es unterscheidet sich nur in sechs fehlenden Aminosäuren in der Porenregion vor dem LYAMEIN Motiv von der langen Porenvariante (Lis et al., 2005). Diese konnte jedoch bisher heterolog überexprimiert noch nicht aktiviert werden. Wie unter Kapitel 1.2.1.2. bereits ausführlich dargelegt führt schon eine geringe Abweichung in der Porenregion zu deutlichen Unterschieden in den Poreneigenschaften, was die Spleißvarianten TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 zeigen (Oberwinkler et al., 2005). Hier führen bereits zwölf zusätzliche und eine geänderte AS im TRPM3 α 1 zu geänderten Poreneigenschaften im Vergleich zum TRPM3 α 2. Es ist also denkbar, dass die sechs zusätzlichen Aminosäuren in der langen Pore des TRPM1-Proteins eine Expression in heterologen Expressionssystemen unterbinden und somit eine Untersuchung der Eigenschaften dieser Porenvariante bisher nicht erlaubte.

Die hier präsentierten Daten zeigen, dass es sich beim TRPM1-Protein um einen Ionenkanal handelt. Insbesondere die Tatsache, dass TRPM1-Kanäle deutlich andere Poreneigenschaften, besonders bezüglich der Permeabilität für Zn^{2+} -Ionen, als TRPM3-Kanäle besitzen ermöglicht es sie elektrophysiologisch voneinander zu unterscheiden. Die hier präsentierten Ergebnisse bieten die Vorkenntnisse für Untersuchungen, z.B. in Strukturen wie den ON-Bipolarzellen. Doch auch in anderen Zelltypen, in denen es zu einer Coexpression der beiden TRPM-Proteine kommt, kann die physiologische Relevanz sowie die Interaktion von TRPM1- und TRPM3-Proteinen ermittelt werden.

7. Der TRPM-Kanal von *Drosophila melanogaster*

7.1. Zusammenfassung

Im Genom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gibt es nur ein einziges Gen, das für einen Vertreter der TRPM-Unterfamilie kodiert. Über dieses Protein dTRPM ist bisher nur bekannt, dass es existiert. Da alle anderen TRP-Proteine Ionenkanäle sind, besteht die Vermutung, dass dies auch für das dTRPM-Protein der Fall ist. Somit musste zunächst geklärt werden, ob es sich tatsächlich um einen Ionenkanal handelt und welche Eigenschaften dieser besitzt. Es wurde die Leitfähigkeit des dTRPM und anschließend die der Mutante dTRPM_{E1007Q} für divalente Kationen untersucht.

Eine Überexpression des dTRPM-Proteins in HEK293-Zellen führt zu einer vorher nicht messbaren Leitfähigkeit für Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} und besonders für Zn^{2+} . Eine Punktmutation in der Porenregion an der Position E1007, bei der es sich um die homologe Position zu E1057 im TRPM3-Protein handelt, führt weiterhin zur Expression eines funktionellen Kanals, aber zu einer Änderung der Poreneigenschaften. Somit konnte nachgewiesen werden, dass es sich beim dTRPM-Protein in der Tat um einen Ionenkanal handelt, der divalente Kationen, besonders Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen, leitet. Diese Untersuchungen bilden ein solides Fundament, um die Funktion und die Bedeutung dieses Proteins zu verstehen.

7.2. Einleitung

Drosophila melanogaster ist in der Wissenschaft ein häufig verwendetes Forschungsobjekt. Sie gehört zur Familie der Drosophilidae und wird häufig auch "Fruchtfliege" genannt. *Drosophila* ist weltweit verbreitet. Ihre Zucht und Haltung ist kostengünstig und verhältnismäßig einfach. Sie besitzen einen sehr kurzen Reproduktionszyklus, was einer der Gründe dafür ist, weshalb sie sich hervorragend als genetisches Werkzeug eignen. Wie im Verlauf dieser Arbeit bereits dargestellt, erfüllen TRP-Kanäle unterschiedlichste physiologische Funktionen. Dies gilt auch für die TRP-Kanäle in *Drosophila melanogaster*. Bis zum Jahr 2005 waren bereits 13 TRP-Kanäle in dieser Fliege bekannt (Abb. 28) (Montell, 2005).

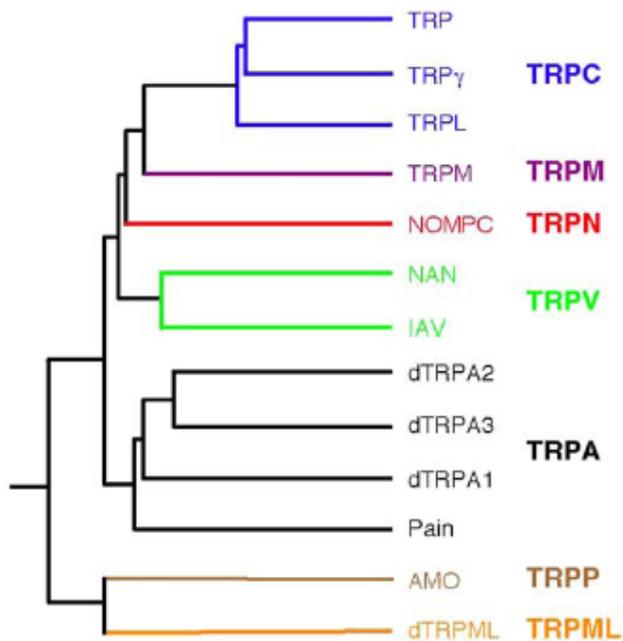


Abb. 29:
Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Kanäle in *Drosophila melanogaster* (Montell, 2005).

Diese werden, wie die jeweiligen homologen Proteine von Säugetieren auch, in fünf Gruppen unterteilt (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN und TRPA) und zwei entfernt verwandte Gruppen (TRPP und TRPML) (Montell, 2005). 2007 kam noch ein weiterer hinzu. CG31284 oder auch Water witch genannt (Liu et al., 2007). Dieser Kanal ist für die Wahrnehmung von feuchter Luft verantwortlich, während ein weiterer TRP-Kanal, genannt Nanchung, trockene Luft wahrnimmt (Liu et al., 2007). Doch auch einige der anderen TRP-Kanäle in *Drosophila* sind bereits intensiver untersucht worden.

Das *Drosophila* Genom kodiert drei TRPC-Kanäle (TRP, TRPL und TRPY) und es gibt klare Belege dafür, dass zwei davon, TRP und TRPL, in der Phototransduktion, also die Umwandlung von Lichtreizen in chemische und anschließend in elektrische Impulse, welche ins Gehirn geleitet werden, involviert sind (Hardie & Minke, 1992; Niemeyer et al., 1996). Mehrere Mitglieder der TRP-Unterfamilie werden vermutlich durch mechanische Stimuli aktiviert (Montell, 2005). Dazu gehören TRP-Kanäle, die beteiligt sind am Hören, dem Gleichgewichtssinn und der Fähigkeit zwischen harmlosen und schädlichen Leveln von mechanischen Stimuli zu unterscheiden (Montell, 2005). Im Gegensatz zu diesen teils schon recht gut untersuchten TRP-Kanälen in *Drosophila* ist über das dTRPM-Protein noch nicht viel bekannt, auch wenn seine Existenz bereits in früheren Publikationen erwähnt wurde (Padinjat & Andrews, 2004). Im Vergleich zu Säugetieren, die acht Vertreter der TRPM-Kanäle exprimie-

ren, besitzt *Drosophila* nur einen TRPM-Kanal (dTRPM). Im Folgenden wird dieser Kanal näher untersucht und beschrieben. Große Ähnlichkeiten weist der dTRPM, u.a. aufgrund der Sequenzhomologie, mit den in Mäusen exprimierten TRPM1, TRPM3, TRPM6 und TRPM7 auf. So zeigt die Porenregion hohe Übereinstimmungen mit der des TRPM3, welcher in den vorherigen Kapiteln ausführlich beschrieben wurde. Ein entscheidender Unterschied von dTRPM zu TRPM6 und TRPM7 ist jedoch, dass die beiden in Mäusen exprimierten Kanäle, als einzige der TRP Familie, eine Kinase-Domäne besitzen (Nadler et al., 2001; Runnels et al., 2001; Ryazanov et al., 2004), dTRPM hingegen nicht.

TRPM7 ist ein divalentspezifischer Ionenkanal, welcher für nahezu alle divalenten Kationen permeabel ist (Monteilh-Zoller et al., 2003). Gleiches gilt auch für TRPM6. Auch dieser Kanal ist u.a. permeabel für Mg^{2+} und Ca^{2+} (Voets et al., 2004). Doch beide Kanäle, TRPM7 (Nadler et al., 2001) und TRPM6 (Voets et al., 2004) werden ebenso wie TRPM3-Kanäle (Oberwinkler et al., 2005) durch intrazelluläres Mg^{2+} inhibiert. Im Verlauf dieses Kapitels werden Versuche präsentiert, mit denen dies auch für das dTRPM Protein und die Mutante dTRPM_{E1007Q} überprüft wurde.

Ziel und Zweck der hier präsentierten Studie war die Klärung der Frage, ob es sich beim dTRPM tatsächlich um einen Ionenkanal handelt, welche Eigenschaften er aufweist und welche physiologische Rolle er in *Drosophila melanogaster* spielen könnte.

Zunächst untersuchte ich die Leitfähigkeit des dTRPM-Proteins und anschließend die der Mutante dTRPM_{E1007Q}. Die Mutation wurde an diese Stelle gesetzt, da der dTRPM, wie erwähnt, eine recht hohe Homologie zum TRPM1- und TRPM3-Kanal aufweist. E1007 ist die homologe Position zu E1057 im TRPM3-Kanal. Und eine Mutation an dieser Stelle führt, wie in Kapitel 5 gezeigt, zu einer stark reduzierten Leitfähigkeit für divalente Kationen.

7.3. Material und Methoden

7.3.1. Elektrophysiologie

Alle Messungen wurden mit Hilfe der zu Beginn dieser Arbeit beschriebenen whole cell Patch Clamp Methode durchgeführt.

7.3.2. Molekularbiologie

dTRPM und Subklonierung der dTRPM-Mutante dTRPM_{E1007Q}

Der Klon dTRPM long pCAN HA1 #17 wurde uns von Dr. Padinjat Raghu und seiner Arbeitsgruppe im Babraham Institut in Cambridge, UK zur Verfügung gestellt.

Da der Ursprungsklon in einem Vektor ohne IRES-GFP vorlag, wurde das Konstrukt in den von uns standardmäßig verwendeten Expressionsvektor pcAGGSL1 (Abb. 7) subkloniert. Dieser enthält zusätzlich noch eine IRES-GFP Sequenz, welche es ermöglicht, die transfizierten Zellen über ihre Fluoreszenz zu detektieren. Dafür wurde eine PCR auf dem Ursprungsklon durchgeführt, um das Konstrukt zu amplifizieren. Der Primer hierfür wurde so konstruiert, dass der N-terminale HA-tag vom rekombinanten Protein entfernt wurde und eine Kozak-Sequenz (GCCACC; Kozak, 1987) inseriert wurde, um die Expression zu steigern. Das Amplifikationsprodukt wurde ligiert mit dem Vektor pcAGGSL1, der zuvor mit PmeI geschnitten und mit Phosphatase (CIP) behandelt wurde. Zur Überprüfung der Basensequenz und der richtigen Orientierung wurde das Endkonstrukt dTRPMlg_pcAGGSL1 doppelsträngig sequenziert (ABI Prism).

Zur Herstellung der Mutante E1007Q wurde dTRPM in einen modifizierten pBluescript KS(-) mit einer veränderten multiple custom cloning site unter Verwendung einer PCR-basierten Strategie subkloniert. Die Punktmutation E1007Q wurde ebenfalls mit Hilfe einer PCR-basierten Mutagenese Strategie inseriert.

Die Mutante dTRPM_{E1007Q} wurde mit Hilfe eines Restriktionsenzym (PmeI) in einen modifizierten pcAGGS Vektor transferiert. Das endgültige Konstrukt wurde durch eine direkte Sequenzierung überprüft. An dieser Stelle sei noch vermerkt, dass in

unserer Arbeitsgruppe keine Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften zwischen HA-getaggten und nicht getaggten dTRPM-Proteinen festgestellt werden konnten (Oberwinkler, unpubliziert).

7.3.3. Zellkultur

Die zu messenden Konstrukte wurden auch hier wieder in HEK293-Zellen überexprimiert. Transfektion und Zellkultur wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

7.3.4. Lösungen

Auch für die hier beschriebenen Experimente wurde unsere Standardbadlösung verwendet. Für die Messungen in Abb. 29 und 30 wurde ebenfalls auch die Standardintrazellulärlösung (siehe Kapitel 3.1.2) verwendet.

Mg²⁺-Intrazellulärlösung enthält (in mM): 90 CsAsp, 21,2 MgCl₂, 13,5 CsCl, 10 BAPTA, 5 EDTA, 4 Na₂ATP und 10 HEPES, die Endkonzentration des freien Mg²⁺ (berechnet mit Maxchelator: <http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) betrug 10 mM. Der pH-Wert wurde mit CsOH (Endkonzentration ist oben angegeben) auf 7,2 eingestellt. Die Osmolalität betrug 313 mOsm.

Alle 10 mM divalente Kationen Lösungen enthielten (in mM): 10 des entsprechenden divalenten Kations als Chloridsalz, 10 HEPES und 274-287 D-Glucose. NMDG (1,3-1,7 mM) wurde zur Einstellung des pH-Werts auf 7.2 (einzige Ausnahme: Zn²⁺-Lösung mit 7,1) verwendet. Die Osmolalität lag im Bereich von 320-330 mOsm. Für die 10 mM Zn²⁺-Lösung wurde ein niedrigerer pH-Wert eingestellt, da es ansonsten zu einem Ausfällen von Zinksalzen kommt.

NMDG-Lösung enthielt (in mM): 145 NMDG, 10 HEPES und 51 D-Glucose. Ein pH-Wert von 7.2 wurde durch die Zugabe von 49,5 mM HCl erreicht. Die gemessenen Osmolalitäten lagen zwischen 321-334 mOsm.

7.4. Ergebnisse

Zu Beginn dieses Projekts wurde versucht die Kanaleigenschaften von dTRPM-Proteinen zu untersuchen. Da dTRPM eine recht hohe Homologie zu den zuvor untersuchten TRPM1- und TRPM3-Proteinen aufweist, welche für divalente Kationen leitfähig sind, wurde auch hier durch Applikation von Lösungen mit 10 mM Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} oder Zn^{2+} die Leitfähigkeit für divalente Kationen überprüft. Es erfolgte jede zweite Applikation mit Mg^{2+} , um anschließend für die Analyse der Ströme diese auf die Ströme des Mg^{2+} normalisieren zu können.

Mit dem dTRPM-Protein transfizierte Zellen zeigen deutliche Einwärtsströme für Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , noch größere Einwärtsströme zeigten sich während der Applikation von Mn^{2+} , Co^{2+} und ganz besonders für Zn^{2+} (Abb. 30a). In den zur Kontrolle gemessenen, nicht transfizierten HEK293-Zellen ist diese Stromzunahme nicht zu beobachten (Abb. 30a+c). Die Überexpression des dTRPM-Proteins in HEK293-Zellen führt demnach zu einer vorher nicht messbaren Leitfähigkeit. Die Strom-Spannungs-Verhältnisse zeigen anhand der Beispiele von Mg^{2+} und Zn^{2+} , dass es sich unter diesen ionalen Bedingungen, um einwärtsrektifizierende Ströme handelt (Abb. 30b). Vergleicht man die Einwärtsströme für die einzelnen divalenten Kationen zu nicht transfizierten HEK293-Zellen, erhält man signifikante Unterschiede für Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} (Abb. 30c). In der Abb. 29d sind die relativen, auf Mg^{2+} normalisierten, Einwärtsströme dargestellt. Im Vergleich zu Mg^{2+} zeigt der Kanal eine größere Leitfähigkeit für Mn^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} .

Es ergibt sich für den dTRPM-Ionenkanal eine Rangfolge der Leitfähigkeit von $\text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} \approx \text{Mn}^{2+} \approx \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+} > > > \text{Sr}^{2+} \approx \text{Ba}^{2+} \approx 0$ (Abb. 30d). Eine Leitfähigkeit für Sr^{2+} und Ba^{2+} konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 30c).

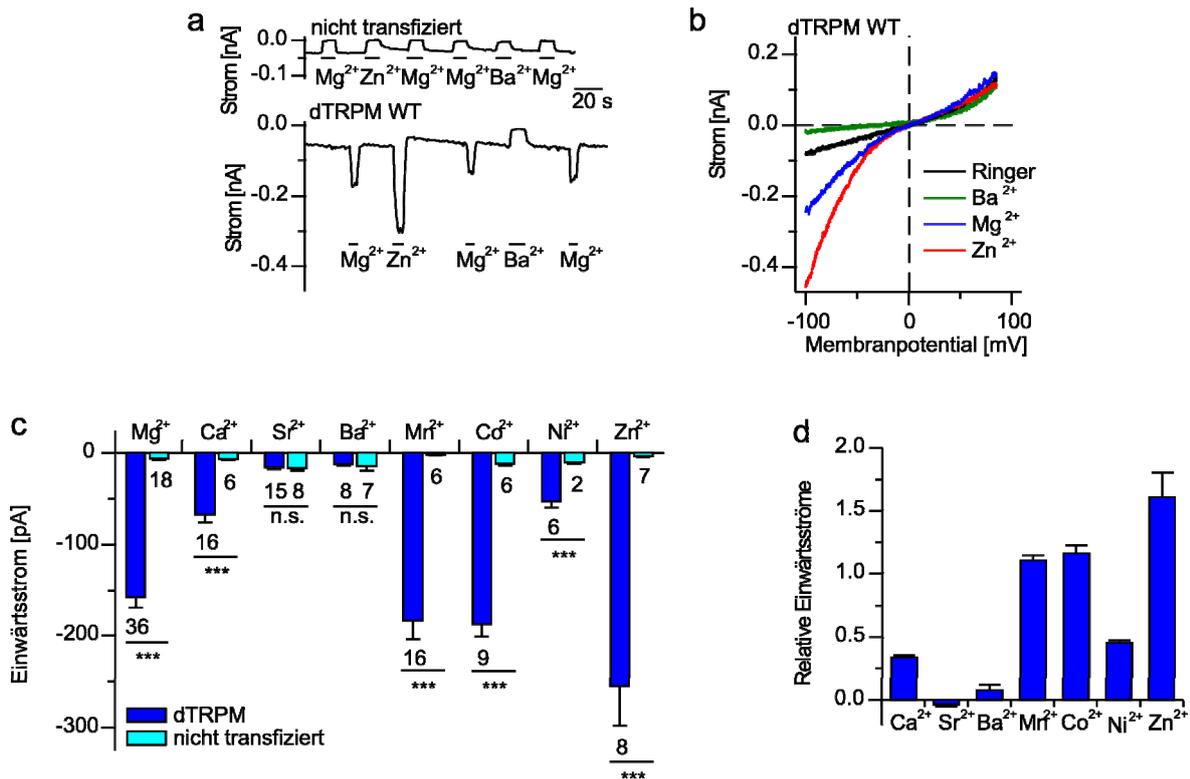


Abb. 30: Einstrom divalenter Kationen in dTRPM-transfizierte Zellen.

a Repräsentative Beispielmessung bei einem Haltepotential von -80 mV, nicht transfizierte Kontrollzellen (HEK293) im Vergleich zu dTRPM überexprimierenden HEK293-Zellen. Es wurden abwechselnd die Lösungen appliziert, welche nur je eine Sorte divalenter Kationen (10 mM) enthielten. Mg²⁺ wurde stets im Wechsel zu allen andern divalenten Kationen appliziert, um später alle Ströme auf Mg²⁺ zu normalisieren. **b** Strom-Spannungs-Verhältnisse der in **a** gezeigten Zelle. **c** Einwärtsströme divalenter Kationen in mit dTRPM transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten HEK293-Zellen. **d** Statistische Auswertung der zu Mg²⁺ normalisierten Einwärtsströme (n=6-16).

In den in Abb. 30 gezeigten Versuchen wurde nachgewiesen, dass die Expression von dTRPM-Proteinen in HEK293-Zellen zu einer zuvor nicht messbaren Leitfähigkeit für divalente Kationen führt. Daraus ergab sich die Frage, ob diese neue Leitfähigkeit durch die Pore des dTRPM zustande kommt oder ob es durch die Transfektion der Zellen mit dem dTRPM-Protein evtl. zur Hochregulierung eines anderen Proteins führt, was dann für die neue Leitfähigkeit sorgt. Zur Klärung dieser Frage und zum Nachweis, dass es sich beim dTRPM-Protein tatsächlich um ein Ionenkanalbildendes Protein handelt, wurde in der Porenregion eine Punktmutation vorgenommen. Die Position E1007 im dTRPM-Protein ist homolog zur Position E1057 im TRPM3-Kanal. Da diese entscheidend für gleich mehrere Poreneigenschaften ist (Kapitel 5), wurde die Position E1007 zu Glutamin (Q) (dTRPM_{E1007Q}) mutiert. Führt eine Mutation in der Porenregion des vermeintlichen Ionenkanals zu einer Änderung der Poreneigenschaften, so kann dieser als Ionenkanal bezeichnet werden.

Während der vorangegangenen Messungen ließ sich beobachten, dass die Einwärtsströme, besonders aber die Auswärtsströme während der ersten 5 Minuten nach Erreichen der whole cell Konfiguration in den mit dTRPM WT transfizierten Zellen zunehmen.

Nun wurde der Verlauf der sich langsam entwickelnden Ströme für eine Dauer von 200 s, nach Beginn der Messung, nach Erreichen der whole cell Konfiguration, beobachtet (Abb. 31). Nach dieser Zeit erfolgte die Applikation der 10 mM Mg^{2+} -Lösung (Abb. 31a+c), um zumindest für den WT nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um eine transfizierte Zelle handelt. Die Zunahme der Ströme, nach Erreichen der whole cell Konfiguration, ließ sich auch in der Mutante beobachten (Abb. 31c). Diese, sich im Verlauf der Messungen entwickelnden Ströme, warfen die Frage auf, ob es sich um Ströme durch den Kanal oder um Leckströme handelt. Um eine Antwort hierfür zu finden, wurde die Intrazellulärlösung mit 10 mM freiem Mg^{2+} versehen. Über TRPM3-, TRPM6- und TRPM7-Kanäle ist bekannt, dass die Ströme durch intrazelluläres Mg^{2+} inhibiert werden. Auch im Fall des dTRPM sowie der Mutante dTRPM_{E1007Q} konnte ich dieses Verhalten messen (Abb. 31b+d). Vergleicht man die Stromentwicklung von dTRPM und der Mutante mit und ohne intrazellulärem Mg^{2+} , so zeigen sich signifikante Unterschiede. In beiden wird der sich langsam entwickelnde Strom vollständig durch das intrazelluläre Mg^{2+} blockiert (Abb. 31e). Doch auch die Ströme des extrazellulären Mg^{2+} durch den dTRPM WT werden blockiert. Eine solche Inhibition wäre nicht zu beobachten, wenn es sich bei den beobachteten Strömen um Leckströme handeln würde. In Abb. 31g ist ein weiteres Kontrollexperiment dargestellt, mit dem gezeigt wird, dass diese sich entwickelnden Ströme ein spezifisches Phänomen der mit dTRPM oder dTRPM_{E1007Q} transfizierten Zellen ist, welches in den nicht transfizierten HEK293-Kontrollzellen deutlich weniger zu beobachten ist. Der in untransfizierten HEK293-Zellen bei +80 mV zu beobachtende Reststrom ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein durch TRPM7-Kanäle, welche in diesen Zellen exprimiert werden (Nadler et al., 2001), fließender MIC-Strom.

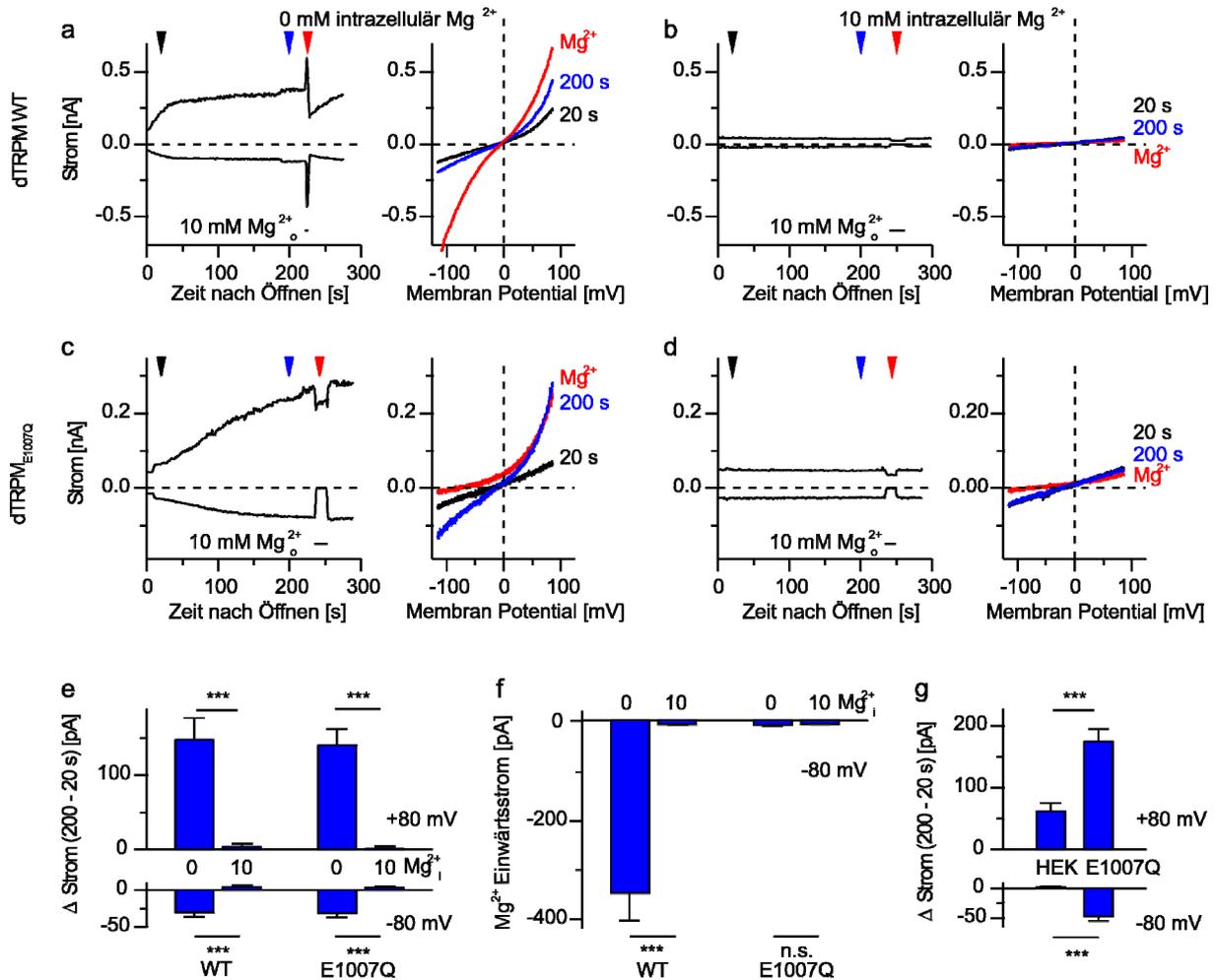


Abb. 31: dTRPM Kanäle mit der Punktmutation E1007Q formen funktionelle Kanäle und werden ebenso wie dTRPM WT-Kanäle durch Mg²⁺ inhibiert.

a-d Repräsentative Beispielmessungen des dTRPM WT (**a,b**) und der Punktmutation E1007Q (**c,d**). Darstellung der Einwärts- (-80 mV) und Auswärtsströme (+80 mV) sowie die jeweils zugehörigen Strom-Spannungs-Verhältnisse. Die Zellen wurden während der Perfusion mit Standardbadlösung mit und ohne 10 mM intrazellulärem Mg²⁺ gemessen. Gegen Ende der Messung wurde noch einmal extrazellulär eine 10 mM Mg²⁺-Lösung appliziert. **e,f** Statistische Analyse der Stromentwicklung zwischen der 20ten und 200ten Sekunde nach Erreichen der whole cell Konfiguration (**e**). Einwärtsströme während der Applikation von extrazellulärem Mg²⁺ mit und ohne intrazellulärem Mg²⁺ (**f**). **g** Kontrollexperiment der Stromentwicklung ohne intrazelluläres Mg²⁺ von dTRPM^{E1007Q} transfizierten und nicht transfizierten HEK293-Zellen.

Die vorangegangenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich nicht um unspezifische Leckströme handelt, die z.B. durch einen schlechter werdenden Seal zustande kommen, sondern eindeutig um Ströme, die aufgrund der Expression von dTRPM oder dTRPM^{E1007Q} auftreten.

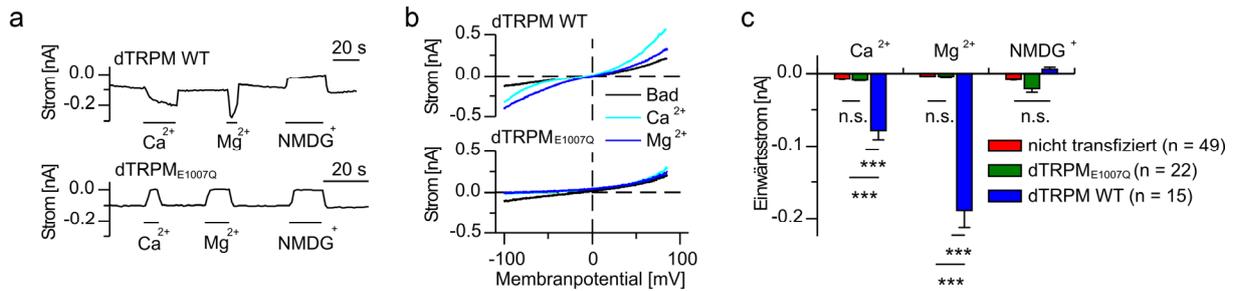


Abb. 32: Strom divalenter Kationen durch dTRPM_{E1007Q}.

a Repräsentative Beispielmessungen. dTRPM WT im Vergleich zur Punktmutante dTRPM_{E1007Q}. Dargestellt sind die Einwärtsströme bei einem Haltepotential von -80 mV. **b** Strom-Spannungs-Verhältnisse der in a gezeigten Zellen. **c** Statistische Analyse der Einwärtsströme (-80 mV). Nicht transfizierte Kontrollzellen (HEK293), dTRPM WT und die Mutante im Vergleich (n=15-49).

Die in Abb. 32 gezeigten Versuche zeigen die Applikation von 10 mM Mg²⁺ und 10 mM Ca²⁺ nun auch mit dem mutierten Kanal, um eventuelle Unterschiede in den Poreneigenschaften nachzuweisen. Tatsächlich ist eine Zunahme der Ströme für divalente Kationen, wie durch dTRPM, in der Mutante dTRPM_{E1007Q} nicht mehr zu beobachten (Abb. 32). Anhand der Beispiele von Ca²⁺ und Mg²⁺ (Abb. 32a), sowie der dazugehörigen Strom-Spannungs-Beziehungen (Abb. 32b) ist zu sehen, dass die Mutation E1007Q dazu führt, dass der Kanal bei Applikation von Lösungen, die nur divalente Kationen enthalten, keine Zunahme der Ströme mehr zeigt. Divalente Kationen werden nicht mehr geleitet. Die analysierten Einwärtsströme für dTRPM WT, Mutante und nicht transfizierte HEK293-Zellen bei Ca²⁺ und Mg²⁺ zeigen signifikante Unterschiede zwischen dTRPM WT und dTRPM_{E1007Q} sowie HEK293-Zellen (Abb. 32c). Ein Unterschied zwischen Mutante und Kontrollzellen ist nicht zu erkennen. Diese Resultate zeigen, dass eine Änderung der Poreneigenschaften im Vergleich dTRPM WT zu dTRPM_{E1007Q} vorliegt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich beim dTRPM-Protein in der Tat um ein Ionenkanalbildendes Protein handelt, dessen Position E1007 entscheidend für die Leitfähigkeit von divalenten Kationen ist.

Zusätzlich zu den Lösungen mit 10 mM des entsprechenden divalenten Kations wurde noch eine 145 mM N-Methyl-D-Glucamin-Ion (NMDG⁺) Lösung appliziert. NMDG⁺-Ionen können die meisten Ionenkanäle aufgrund ihrer Größe nicht passieren. Da sich in der verwendeten Lösung neben diesen nur noch Cl⁻-Ionen (durch Einstellen des pH-Wertes mit HCl) befinden, wäre die Zunahme des Einwärtsstroms ein Beleg dafür, dass es sich um Cl⁻-Ströme handelt. Dies wiederum würde bedeuten, dass ein zu

beobachtender Einwärtsstrom unter den Bedingungen mit divalenten Kationen, nicht zwangsläufig auch der Strom der divalenten Kationen ist.

Während der Applikation der NMDG-Lösung zeigten sowohl dTRPM WT als auch die Mutante eine Abnahme der Einwärtsströme (Abb. 32). Ein Cl⁻-Strom durch die beiden Kanäle konnte also nicht ermittelt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich beim dTRPM um einen Kationen-Kanal handelt.

Die vorangegangenen Versuche zeigen, es handelt sich beim dTRPM-Protein und ebenso bei der Mutante dTRPM_{E1007Q} um funktionelle Kanäle mit unterschiedlichen Poreneigenschaften.

7.5. Diskussion

Die Expression von dTRPM in HEK293-Zellen führt zu einer neuen Leitfähigkeit für divalente Kationen in HEK293-Zellen (Abb. 30). Besonders große Ströme zeigten sich für Zn²⁺-Ionen. Diese in HEK293-Zellen zuvor nicht da gewesene Leitfähigkeit warf die Frage auf, ob die gemessenen Ströme nun tatsächlich durch die Pore des dTRPM fließen oder ob sie evtl. durch die Hochregulierung eines anderen Proteins in den Zellen zustande kommt. Zur Klärung dieser Frage und zum Nachweis, dass es sich beim dTRPM-Protein tatsächlich um ein Ionenkanalbildendes Protein handelt, wurde eine Punktmutation an der Position E1007 in der vermeintlichen Porenregion gesetzt. Eine Leitfähigkeit für divalente Kationen konnte nun nicht mehr nachgewiesen werden. Dies wiederum führte zu der Frage, ob die Mutation zu einem nicht funktionellen Kanal führte oder ob sie die Poreneigenschaften verändert. Da aber weiterhin eine Stromzunahme im Verlauf der Messungen, wie auch für den dTRPM WT, beobachtet werden konnte, welcher durch intrazelluläres Mg²⁺ inhibiert wird (Abb. 31), kann man davon ausgehen, dass weiterhin funktionelle Kanäle gebildet werden. Diese weisen nur andere Poreneigenschaften auf. Die Tatsache, dass die sich entwickelnden Ströme durch intrazelluläres Mg²⁺ inhibiert werden, zeigt, es handelt sich um Ströme durch den Kanal und nicht um zunehmende Leckströme, die durch einen schlechter werdenden Seal hervorgerufen werden können. Die hier präsentierten Daten belegen, dass es sich beim dTRPM-Protein um ein Ionenkanalbildendes Protein handelt, welches eine Leitfähigkeit für eine Vielzahl divalenter Kationen besitzt und die Mutation E1007Q zu geänderten Poreneigenschaften führt. dTRPM Kanäle zeigen nur eine geringe Leitfähigkeit für Sr²⁺ und Ba²⁺. Es ist auffällig, dass alle

gemessenen divalenten Kationen, die durch den Kanal fließen, in der dritten (Mg^{2+}) bzw. der vierten (alle übrigen) Periode des Periodensystems eingeordnet sind, während Sr^{2+} und Ba^{2+} sich in der fünften bzw. sechsten befinden. Das bedeutet, dass sie jeweils noch ein weiteres Elektron auf der äußersten Elektronenhülle besitzen, was zu deutlich geänderten chemischen Eigenschaften führt. Ionisierungsenergie und Elektronenaffinität sind bei Sr^{2+} und Ba^{2+} geringer als bei den übrigen gemessenen divalenten Kationen. Entscheidend ist hier aber vermutlich die Tatsache, dass beide größer sind. Atomradius sowie Atommasse nehmen innerhalb einer Gruppe im Periodensystem von oben nach unten zu. Es ist somit denkbar, dass Sr^{2+} und Ba^{2+} aufgrund ihrer Größe den Kanal nicht passieren können. Allerdings ist, für TRPM3- (Loch, 2007; Wagner et al., 2010), TRPM6- (Li et al., 2006) und TRPM7-Kanäle (Monteilh-Zoller et al., 2003; Li et al., 2006) bekannt, dass diese dem dTRPM-Kanal verwandten Kanäle, sowohl Sr^{2+} als auch Ba^{2+} leiten. Durch Messungen mit weiteren Vertretern dieser Perioden, lässt sich evtl. diese Theorie näher belegen. Die hohe Leitfähigkeit des Kanals für Zn^{2+} lässt bereits die Vermutung zu, dass dieser Kanal durchaus eine relevante Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen spielen könnte. Zn^{2+} ist u.a. beteiligt am Zucker-, Fett- und Eiweißstoffwechsel sowie am Aufbau der Erbsubstanz und beim Zellwachstum. Es konnte bereits infolge der hier präsentierten Daten die besondere Relevanz von Zink im Zusammenhang mit diesem Kanal und dem Larvenwachstum von *Drosophila* festgestellt werden. Tiere ohne dTRPM zeigen zwar Zellteilung, die Zellen sind aber deutlich kleiner als die im WT. Die Larven weisen einen Zn^{2+} -Mangel auf, sind deutlich kleiner und sterben vor dem Erreichen des Puppenstadiums (Georgiev et al., 2010). Dieser Phänotyp kann partiell durch Zn^{2+} -Resupplementierung revidiert werden. Es wird angenommen, dass der dTRPM-Kanal in allen Geweben in *Drosophila* exprimiert wird. Dies wäre neben den Sequenzhomologien, die er zu TRPM7 zeigt, eine weitere Gemeinsamkeit mit diesem, in Säugetieren vorkommenden, Ionenkanal. TRPM7-Kanäle sind u.a. für die Regulierung des Mg^{2+} -Haushalts, der Zellen in denen sie exprimiert werden, zuständig. Erst kürzlich veröffentlichten Hofmann et al. (2010) eine Arbeit die besagt, dass dTRPM entscheidend für den extrazellulären Mg^{2+} -Level in *Drosophila* sei. Meine Daten zeigen jedoch eine deutlich höhere Leitfähigkeit des dTRPM-Kanals für Zn^{2+} -Ionen (Abb. 30), welche bis zu 1,6 mal höher ist als die für Mg^{2+} . Dies plus die Tatsache, dass Zn^{2+} entscheidend fürs Larvenwachstum von *Drosophila* ist, lassen die Vermutung zu, dass dTRPM-Kanäle eher oder

zumindest auch für die Zn^{2+} -Regulation im Organismus dieser Fliege verantwortlich sind. Bis heute ist die physiologische Rolle des einzigen in *Drosophila* exprimierten TRPM-Kanals jedoch noch nicht gut verstanden.

Es bedarf daher weiterer Forschung, um die Funktion des Kanals aufzuklären.

8. Ausblick

Diese Arbeit präsentiert gleich mehrere interessante und sicherlich auch für die Zukunft der Forschung, sei es im biologischen oder medizinischen Bereich, hilfreiche neue Erkenntnisse im großen Feld der TRPM-Kanäle.

Ich konnte in dieser Arbeit die Poreneigenschaften des TRPM3-Kanals näher charakterisieren und zeigen, dass er nicht nur für Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen permeabel ist und durch extrazelluläres Na^+ und Protonen inhibiert wird, sondern auch dass die Position E1057 in der Porenregion entscheidend für eine Vielzahl dieser Eigenschaften ist. Weiterhin konnte ich nachweisen, dass es sich bei den Proteinen TRPM1 und dTRPM ebenso wie beim TRPM3-Protein um Ionenkanäle handelt und elektrophysiologisch ihre Eigenschaften darlegen, welche sich trotz hoher Homologie zu TRPM3-Kanälen teils deutlich unterscheiden. Die Tatsache, dass TRPM1-Kanäle keine Leitfähigkeit für Zn^{2+} -Ionen besitzen, durch sie sogar inhibiert werden, ermöglicht es, sie in kommenden Untersuchungen eindeutig von TRPM3-Kanälen zu differenzieren. In der nahe liegenden Zukunft sollten zunächst einmal Untersuchungen stattfinden, die die genaue physiologische Rolle von TRPM1-Kanälen in der Retina und in Melanozyten aufzeigen. Auch sollte anhand weiterer elektrophysiologischer Versuche die Interaktion von TRPM1- und TRPM3-Kanälen in weiteren Zelltypen untersucht werden. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen Zn^{2+} nicht nur als geeignetes Werkzeug zur Unterscheidung dieser beiden Kanäle, sondern auch zur Untersuchung ihrer Interaktion aus. Es sollte so, nach erbrachtem Nachweis einer Coexpression, in unterschiedlichsten Zelltypen möglich sein, die Bildung von funktionellen heteromultimeren Ionenkanälen aus TRPM1 und TRPM3 zu belegen.

Auch die durch diese Arbeit nachgewiesenen Eigenschaften des einzigen in *Drosophila* vorkommenden TRPM-Kanals zeigen schon jetzt ihren Nutzen in der Forschung und ermöglichen das Voranschreiten der Untersuchungen an der Larvalentwicklung von *Drosophila*. Die Tatsache über das Wissen, dass dieser Kanal eine besonders hohe Leitfähigkeit für Zn^{2+} besitzt, begründet nun nähere Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen dTRPM-Kanälen und dem Zn^{2+} -Haushalt der Zellen, in denen diese exprimiert werden.

Die hier errungenen neuen Erkenntnisse dieser drei Kanäle werden es in Zukunft erleichtern, sie weiter zu erforschen und sie in das physiologische Gesamtkonzept einzuordnen.

9. Literaturverzeichnis

- Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB, (1992), Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130(1):167-78.
- Audo I, Kohl S, Leroy BP, Munier FL, Guillonneau X, Mohand-Saïd S, Bujakowska K, Nandrot EF, Lorenz B, Preising M, Kellner U, Renner AB, Bernd A, Antonio A, Moskova-Doumanova V, Lancelot ME, Poloschek CM, Drumare I, Defoort-Dhellemmes S, Wissinger B, Léveillard T, Hamel CP, Schorderet DF, De Baere E, Berger W, Jacobson SG, Zrenner E, Sahel JA, Bhattacharya SS, Zeitz C, (2009), TRPM1 is mutated in patients with autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *Am J Hum Genet* 85(5):720-9.
- Baulieu, (1998), Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23(8):963-87.
- Bellone RR, Brooks SA, Sandmeyer L, Murphy BA, Forsyth G, Archer S, Bailey E, Grahn B, (2008), Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*). *Genetics* 179(4):1861-70.
- Bossert F, Vater W, (1971), Dihydropyridines, a new group of strongly effective coronary therapeutic agents. *Naturwissenschaften* 58(11):578.
- Broekhoven F van, Verkes RJ, (2003), Neurosteroids in depression: a review. *Psychopharmacology* 165(2):97-110.
- Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, Mihm M Jr, (2005), Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol* 52(5):743-75.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D, (1997), The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653):816-24.
- Chubanov V, Mederos y Schnitzler M, Wäring J, Plank A, Gudermann T, (2005), Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371(4):334-41.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C, (2001), The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2(6):387-96.
- Clapham, (2003), TRP channels as cellular sensors. *Nat* 426, 517-524.
- Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS, (2004), TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nat* 432(7018):723-30.
- Corpéchet C, Synguelakis M, Talha S, Axelson M, Sjövall J, Vihko R, Baulieu EE, Robel P, (1983), Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res* 270(1):119-25.

- Corry B, Chung SH, (2006), Mechanisms of valence selectivity in biological ion channels. *Cell Mol Life Sci* 63(3):301-15.
- Cosens DJ, Manning A, (1969), Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224(5216):285-7.
- Dubrovsky BO, (2005), Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(2):169-92.
- Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW, (1998), Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 58(7):1515-20.
- Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, Donovan M, Sober AJ, Kauffman M, McCarthy JJ, (2001) Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* 19(2):568-76.
- Dunn MF, (2005), Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals* 18(4):295-303.
- Elizondo MR, Arduini BL, Paulsen J, MacDonald EL, Sabel JL, Henion PD, Cornell RA, Parichy DM, (2005), Defective skeletogenesis with kidney stone formation in dwarf zebrafish mutant for *trpm7*. *Curr Biol* 15(7):667-71.
- Erickson LA, Letts GA, Shah SM, Shackelton JB, Duncan LM, (2009), TRPM1 (Melastatin-1/MLSN1) mRNA expression in Spitz nevi and nodular melanomas. *Mod Pathol* 22(7):969-76.
- Erler I, Hirnet D, Wissenbach U, Flockerzi V, Niemeyer BA, (2004), Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem* 279(33):34456-63.
- Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F, (2008), TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin)* 2(6):429-38.
- Flood JF, Morley JE, Roberts E, (1995), Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23):10806-10.
- Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S, (2006), Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* 26(3):159-78.
- Frederickson CJ, Giblin LJ, Krezel A, McAdoo DJ, Mueller RN, Zeng Y, Balaji RV, Masalha R, Thompson RB, Fierke CA, Sarvey JM, de Valdenebro M, Prough DS, Zornow MH, (2006), Concentrations of extracellular free zinc (pZn) in the central nervous system during simple anesthetization, ischemia and reperfusion. *Exp Neurol* 198(2):285-93.
- García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sánchez E, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A, (2004), Identifica-

- tion of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 24(23):5307-14.
- Georgiev P, Okkenhaug H, Drews A, Wright D, Lambert S, Flick M, Carta V, Martel C, Oberwinkler J and Raghupathi P, 2010, TRPM channels mediate zinc homeostasis and cellular growth during *Drosophila* development. *Cell Metab* in press.
- Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C, (2003), Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* 278(24):21493-501.
- Grimm C, Kraft R, Schultz G, Harteneck C, (2005), Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine. *Mol Pharmacol* 67(3):798-805.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ, (1981), Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391(2):85-100.
- Hamill OP, Martinac B, (2001), Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* 81(2):685-740.
- Hantzsch AR, (1882), Über die Synthese pyridinartiger Verbindungen aus Acetessigäther und Aldehydammoniak. *Justus Liebig Ann Chem* 215:1-82.
- Hardie RC, Minke B, (1992), The *trp* gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8(4):643-51.
- Harteneck C, Plant TD, Schultz G, (2000), From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 23(4):159-66.
- Harteneck C, (2005), Function and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371(4):307-14.
- Harteneck C, Reiter B, (2007), TRP channels activated by extracellular hypo-osmoticity in epithelia. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 1):91-5.
- Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M, (2005), Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* 118:917-928.
- Hige T, Fujiyoshi Y, Takahashi T, (2006), Neurosteroid pregnenolone sulfate enhances glutamatergic synaptic transmission by facilitating presynaptic calcium currents at the calyx of Held of immature rats. *Eur J Neurosci* 24(7):1955-66.
- Hille B, (2001), Ion channels of excitable membranes. Sinauer, Sunderland, MA 3. Auflage.
- Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ, (2003), Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22(4):776-85.

- Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C, (2003), TRPM5 is a voltage-modulated and Ca²⁺-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* 13(13):1153-8.
- Hofmann T, Chubanov V, Chen X, Dietz AS, Gudermann T, Montell C, (2010), *Drosophila* TRPM channel is essential for the control of extracellular magnesium levels. *PLoS One* 5(5):e10519.
- Hunter JJ, Shao J, Smutko JS, Dussault BJ, Nagle DL, Woolf EA, Holmgren LM, Moore KJ, Shyjan AW, (1998), Chromosomal localization and genomic characterization of the mouse melastatin gene (*Mln1*). *Genomics* 54(1):116-23.
- Jeong SW, Park BG, Park JY, Lee JW, Lee JH, (2003), Divalent metals differentially block cloned T-type calcium channels. *Neuroreport* 14(11):1537-40.
- Jiang J, Li M, Yue L, (2005), Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J Gen Physiol* 126(2):137-50.
- Kim DS, Matsuda T, Cepko CL, 2008a, A core paired-type and POU homeodomain-containing transcription factor program drives retinal bipolar cell gene expression. *J Neurosci* 28(31):7748-64.
- Kim DS, Ross SE, Trimarchi JM, Aach J, Greenberg ME, Cepko CL, 2008b, Identification of molecular markers of bipolar cells in the murine retina. *J Comp Neurol* 507(5):1795-810.
- Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K, (2009), Pregnenolone sulfate potentiates the inwardly rectifying K channel Kir2.3. *PLoS One* 4(7):e6311.
- Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, Koyasu T, Ueno S, Funabiki K, Tani A, Ueda H, Kondo M, Mori Y, Tachibana M, Furukawa T, (2010), TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1):332-7.
- Kozak M, (1987), An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15(20):8125-48.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP, (2006) TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50(2):277-89.
- Lambert S, Oberwinkler J, (2005), Characterization of a proton-activated, outwardly rectifying anion channel. *J Physiol* 567(Pt 1):191-213.
- Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP, (2002), TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109(3):397-407.
- Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, Huang M, Lin JH, Feder JN, Janovitz EB, Levesque PC, Blannar MA, (2003), Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem* 278 (23): 20890-29897.

- Li Y, Hough CJ, Suh SW, Sarvey JM, Frederickson CJ, (2001), Rapid translocation of Zn^{2+} from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *J Neurophysiol* 86(5):2597-604.
- Li M, Jiang J, Yue L, (2006), Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol* 127(5):525-37.
- Li M, Du J, Jiang J, Ratzan W, Su LT, Runnels LW, Yue L, (2007), Molecular determinants of Mg^{2+} and Ca^{2+} permeability and pH sensitivity in TRPM6 and TRPM7. *J Biol Chem* 282(35):25817-30.
- Li Z, Sergouniotis PI, Michaelides M, Mackay DS, Wright GA, Devery S, Moore AT, Holder GE, Robson AG, Webster AR, 2009, Recessive mutations of the gene TRPM1 abrogate ON bipolar cell function and cause complete congenital stationary night blindness in humans. *Am J Hum Genet* 85(5):711-9.
- Lis A, (2005), Identifizierung von TRPM3- und TRPM1-Ionenkanälen: Funktionelle Diversität durch alternatives Spleißen der Transkripte und durch heterooligomere Assemblierung der Kanaluntereinheiten. Dissertation an der Uni des Saarlandes.
- Lis A, Wissenbach U, Philipp SE, 2005, Transcriptional regulation and processing increase the functional variability of TRPM channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371(4):315-24.
- Liu L, Li Y, Wang R, Yin C, Dong Q, Hing H, Kim C, Welsh MJ, (2007), Drosophila hygrosensation requires the TRP channels water witch and nanchung. *Nature* 450(7167):294-8.
- Loch S, (2007), Elektrophysiologische Charakterisierung von TRPM3 Ionenkanälen. Dissertation an der Uni des Saarlandes. <http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2008/1415/>
- Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A, (2005), The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol* 15(10):929-34.
- Majewska MD, Mienville JM, Vicini S, (1988), Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neurosci Lett* 90(3):279-84.
- Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, Sasaki H, Hiroi K, Nakamura Y, Shigemoto R, Takada M, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi S, 1995, Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80(5):757-65.
- Mayo W, Dellu F, Robel P, Cherkaoui J, Le Moal M, Baulieu EE, Simon H, (1993), Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Res* 607(1-2):324-8.
- McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D, (2002), Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nat* 416(6876):52-8.

- Mederos y Schnitzler M, Währing J, Gudermann T, Chubanov V, (2008), Evolutionary determinants of divergent calcium selectivity of TRPM channels. *FASEB J* 22(5):1540-51.
- Mennerick S, Lamberta M, Shu HJ, Hogins J, Wang C, Covey DF, Eisenman LN, Zorumski CF, (2008), Effects on Membrane Capacitance of Steroids with Antagonist Properties at GABA_A Receptors. *Biophys J* 95 (1): 176–185.
- Meyer DA, Carta M, Partridge LD, Covey DF, Valenzuela CF, (2002), Neurosteroids enhance spontaneous glutamate release in hippocampal neurons. Possible role of metabotropic sigma1-like receptors. *J Biol Chem* 277(32):28725-32.
- Meziane H, Mathis C, Paul SM, Ungerer A, (1996), The neurosteroid pregnenolone sulfate reduces learning deficits induced by scopolamine and has promnestic effects in mice performing an appetitive learning task. *Psychopharmacology (Berl)* 126(4):323-30.
- Minke B, (1977), *Drosophila* mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* 3(1):59-64.
- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A, (2003), TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 121(1):49-60.
- Montell C, Rubin GM, (1989), Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2(4):1313-23.
- Montell C, (2005), *Drosophila* TRP channels. *Pflugers Arch* 451(1):19-28.
- Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P, (2009), Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential: *Br J Pharmacol* 157(8):1301-17.
- Morgans CW, Zhang J, Jeffrey BG, Nelson SM, Burke NS, Duvoisin RM, Brown RL, (2009), TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(45):19174-8.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A, (2001), LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability: *Nature* 411(6837):590-5.
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J, (2005), Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing: *J Neurosci* 25(16):4052-61.
- Nakajima Y, Moriyama M, Hattori M, Minato N, Nakanishi S, 2009, Isolation of ON bipolar cell genes via hrGFP-coupled cell enrichment using the mGluR6 promoter. *J Biochem* 145(6):811-8.

- Nakamura M, Sanuki R, Yasuma TR, Onishi A, Nishiguchi KM, Koike C, Kadowaki M, Kondo M, Miyake Y, Furukawa T, 2010, TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. *Mol Vis* 16:425-37.
- Nawy S, Jahr CE, 1990, Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature* 346(6281):269-71.
- Nawy S, Jahr CE, 1991, cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter. *Neuron* 7(4):677-83.
- Neher E, Sakmann B, 1976, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 1976 Apr 29;260(5554):799-802.
- Nelson MT, Woo J, Kang HW, Vitko I, Barrett PQ, Perez-Reyes E, Lee JH, Shin HS, Todorovic SM, (2007), Reducing agents sensitize C-type nociceptors by relieving high-affinity zinc inhibition of T-type calcium channels. *J Neurosci* 27(31):8250-60.
- Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V, (2003), Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278(33):30813-20.
- Nilius B, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Wang C, Zhu MX, Voets T, (2005), The selectivity filter of the cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 280(24):22899-906.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA, (2007), Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87(1):165-217.
- Nilsson KR, Zorumski CF, Covey DF, (1998), Neurosteroid analogues. 6. The synthesis and GABAA receptor pharmacology of enantiomers of dehydroepiandrosterone sulfate, pregnenolone sulfate, and (3alpha,5beta)-3-hydroxypregnan-20-one sulfate. *J Med Chem* 41(14):2604-13.
- Niemeyer BA, Suzuki E, Scott K, Jalink K, Zuker CS, (1996), The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* 85(5):651-9.
- Oancea E, Vriens J, Brauchi S, Jun J, Splawski I, Clapham DE, (2009), TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Sci Signal* 12; 2(70):ra21.
- Oberwinkler J, Lis A, Giehl KM, Flockerzi V, Philipp SE, (2005), Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* 280 (23): 22540-22548.
- Oberwinkler J, Philipp SE, (2007), TRPM3. *Handb Exp Pharmacol* 179, 253-267.
- Padinjat R, Andrews S, (2004), TRP channels at a glance. *J Cell Sci* 117(Pt 24):5707-9.
- Palmer CP, Zhou XL, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y, (2001), A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca(2+)-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):7801-5.

- Paoletti P, Ascher P, Neyton J, (1997), High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* 17(15):5711-25.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A, (2002), A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108(5):705-15.
- Reddy DS, Kulkarni SK, (1997), Differential anxiolytic effects of neurosteroids in the mirrored chamber behavior test in mice. *Brain Res* 752(1-2):61-71.
- Reddy DS, Kaur G, Kulkarni SK, (1998), Sigma (sigma1) receptor mediated antidepressant-like effects of neurosteroids in the Porsolt forced swim test. *Neuroreport* 9(13):3069-73.
- Redenti S, Chappell RL, (2005), Neuroimaging of zinc released by depolarization of rat retinal cells. *Vision Res* 45(28):3520-5.
- Redenti S, Ripps H, Chappell RL, (2007), Zinc release at the synaptic terminals of rod photoreceptors. *Exp Eye Res* 85(4):580-4.
- Peretti E de, Mappus E, (1983), Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 57(3):550-6.
- Roberts E, (1995), Pregnenolone--from Selye to Alzheimer and a model of the pregnenolone sulfate binding site on the GABAA receptor. *Biochem Pharmacol* 49(1):1-16.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE, (2001), TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 291(5506):1043-7.
- Rupprecht R, Holsboer F, (1999), Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* 22(9):410-6.
- Ryazanova LV, Dorovkov MV, Ansari A, Ryazanov AG, (2004), Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. *J Biol Chem* 279(5):3708-16.
- Schaefer M., (2005), Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch* 451(1):35-42.
- Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T, 2007, TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1772(8):813-21.
- Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurosaki T, Fleig A, Scharenberg AM, (2003), Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell* 114(2):191-200.
- Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Labombarda F, Desarnaud F, Robel P, De Nicola AF, Baulieu EE, (2000), Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J Neurocytol* 29(5-6):307-26.

- Schumacher M, Liere P, Akwa Y, Rajkowski K, Griffiths W, Bodin K, Sjövall J, Baulieu EE, (2007), Pregnenolone sulfate in the brain: a controversial neurosteroid. *Neurochem Int* 52(4-5):522-40.
- Shen Y, Heimel JA, Kamermans M, Peachey NS, Gregg RG, Nawy S, (2009), A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci* 29(19):6088-93.
- Snellman J, Kaur T, Shen Y, Nawy S, 2008, Regulation of ON bipolar cell activity. *Prog Retin Eye Res* 27(4):450-63.
- Spence KT, Plata-Salaman CR, French-Mullen JM, (1991), The neurosteroids pregnenolone and pregnenolone-sulfate but not progesterone, block Ca^{2+} currents in acutely isolated hippocampal CA1 neurons. *Life Sci* 49(26): 235-9.
- Sukharev S, Corey DP, (2004), Mechanosensitive channels: multiplicity of families and gating paradigms. *Sci STKE* 2004(219):re4.
- Sukharev S, Anishkin A, (2004), Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems? *Trends Neurosci* 27(6):345-51.
- Urani A, Romieu P, Portales-Casamar E, Roman FJ, Maurice T, (2002), The antidepressant-like effect induced by the sigma(1) receptor agonist igmesine involves modulation of intracellular calcium mobilization. *Psychopharmacology* 163(1):26-35
- Vallée M, Mayo W, Le Moal M, (2001), Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3):301-12.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B, (2004), The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nat* 430(7001):748-54.
- Voets T, Janssens A, Prenen J, Droogmans G, Nilius B, (2003), Mg^{2+} -dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6. *J Gen Physiol* 121(3):245-60.
- Voets T, Nilius B, (2003), The pore of TRP channels: trivial or neglected? *Cell Calcium* 33(5-6):299-302.
- Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG, (2004), TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J Biol Chem* 279(1):19-25.
- Vriens J, Nilius B, Vennekens R, (2008), Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr Neuropharmacol* 6(1):79-96.
- Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, Düfer M, Lis A, Flockerzi V, Philipp SE, Oberwinkler J, (2008), Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic β cells. *Nat Cell Biol* 10, 1421-30

- Wagner TF, (2009), TRPM3-Kanäle sind ionotrope Steroidrezeptoren endokriner Zellen. Dissertation an der Uni des Saarlandes. <http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2009/2462/>.
- Wagner TF, Drews A, Loch S, Mohr F, Philipp SE, Lambert S, Oberwinkler J, (2010), TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch* [Epub ahead of print].
- Wang Q, Wang L, Wardwell-Swanson J, (1998), Modulation of cloned human neuronal voltage-gated potassium channels (hKv1.1 and hKv2.1) by neurosteroids. *Pflugers Arch* 437(1):49-55.
- Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalié A, 1999, Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca^{2+} . *J Physiol* 518 (3):631-8.
- Whittaker MT, Gibbs TT, Farb DH, (2008), Pregnenolone sulfate induces NMDA receptor dependent release of dopamine from synaptic terminals in the striatum. *J Neurochem* 107(2):510-21.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH, (1991), Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40(3):333-6.
- Xu XZ, Moebius F, Gill DL, Montell C, (2001), Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):10692-7.
- Xu SZ, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ, (2005), Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol* 145(4):405-14.
- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ, (2003), Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112(3):293-301.
- Zhu G, Zhang Y, Xu H, Jiang C, (1998), Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *J Neurosci Methods* 81(1-2):73-83.
- Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA, (2007), Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca^{2+} , *Nat Neurosci* 10(3):277-9.

10. Danksagung

Zu Beginn möchte ich meiner Familie, speziell meinen Eltern danken. Sie haben mich stets in meinem Bestreben unterstützt, mich der Wissenschaft zu widmen und ohne sie wäre ich nun nicht hier, wo ich heute bin. Ganz ganz lieben Dank.

Prof. Veit Flockerzi gilt mein Dank, da ich die Möglichkeit erhielt in seinem Institut meine Doktorarbeit zu schreiben.

Dr. Johannes Oberwinkler möchte ich dafür danken, dass er vor gut dreieinhalb Jahren das kleine Risiko einging eine doch fachfremde Biologin als Doktorandin einzustellen und mir seitdem mit Rat und Tat als Betreuer zur Seite stand und mich nach Ablauf meines Stipendiums sieben Monate weiter finanzierte.

Dem Graduierten Kolleg 1326 „Calcium-Signaling and Cellular Nanodomains“ möchte ich für die finanzielle Förderung sowie der stetigen Weiterbildung danken.

Aus unserem Labor gilt mein besonderer Dank Sandra Plant. Sie hat mich nicht nur mit Zellen und Lösungen versorgt und meine Arbeit Korrektur gelesen, sie hat versucht, mir die Molekularbiologie näher zubringen und mir in mehreren Semestern die Badmintonbälle um die Ohren gefetzt. Auch gilt mein Dank Melanie Flick, Melanie Portz, Rebekka Tascher, Florian Mohr und Sachar Lambert, die mir meine Zeit hier im Labor so angenehm und erfolgreich wie möglich gemacht haben. Allen Mitgliedern der AG Oberwinkler, inkl. den ehem. Mitgliedern, und den Mitarbeitern der Pharmakologie möchte ich Danke sagen für jede Form der Unterstützung und den ein oder anderen netten Plausch zwischendurch.

Nun möchte ich meinen Freunden danken. Allen Göttingern und Homburgern (inkl. Umkreis) meinen aller besten Dank für nette Spieleabende, gutes Essen und unterhaltsame bis hilfreiche Gespräche. Meine Freundin Jasmin Mertens hat es immer gut verstanden mich aufzuheitern, selbst wenn es leider viel zu oft nur telefonisch war. Danke Mini. Allen Göttingern ein riesengroßes Dankeschön für die tollste Studienzeit, die man sich denken kann. Von den Homburgern geht noch ein Extradanke an Dalia Al-Ansary, sowie Carolin und Dominik Bick. Super Abende, nette Shoppingtouren, unglaublich viel Spaß und Unterstützung, wie beispielsweise Korrektur lesen.

Zu guter Letzt möchte ich dem mir wohl wichtigsten Menschen der vergangenen sieben Jahre und hoffentlich auch der Zukunft danken. Meinem Freund Mathias Pasche. Er stand immer zu mir, hat mich unterstützt, hat mich zum Lachen gebracht und scheute es auch nicht noch spät nach Feierabend mit mir über die Themen unserer Doktorarbeiten zu diskutieren. Danke fürs Dasein, Du bist der Beste.

11. Veröffentlichungen

- Thomas F.J. Wagner, **Anna Drews**, Sabine Loch, Florian Mohr, Stephan Philipp, Sachar Lambert, Johannes Oberwinkler (2010), TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic β cells. *Pflugers Arch.* (in press)
- Plamen Georgiev, Hanneke Okkenhaug, **Anna Drews**, David Wright, Melanie Flick, Sachar Lambert, Valentina Carte, Cecile Martel, Johannes Oberwinkler and Padinjat Raghu, TRPM channels mediate zinc homeostasis and cellular growth triggered by Class I PI3K signalling during *Drosophila* larval development. *Cell Metab.* (in press)
- Sachar Lambert*, **Anna Drews***, Thomas F.J. Wagner, Annette Lis, Stefanie Mannebach, Sandra Plant, Melanie Portz, Marcel Meissner, Stephan E. Philipp and Johannes Oberwinkler, TRPM1 is an ion-conducting membrane channel inhibited by zinc ions.
* **These authors contributed equally to this work.** (submitted)
- **Anna Drews**, Florian Mohr, Oleksandr Rizun, Sabine Loch, Thomas F.J. Wagner, Douglas F. Covey, Johannes Oberwinkler, Initial characterisation of the Pregnenolone sulfaten and Nifedipine binding sites of TRPM3 channels. (in preparation)
- Julia Frühwald, Julia Meiser, Stefanie Mannebach, **Anna Drews**, Johannes Oberwinkler, Anette Lis, Veit Flockerzi and Stephan Philipp, Alternative splicing of a protein region essential for TRPM3 channel function. (in preparation)

12. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anna-Dorothee Drews
Geburtstag: 23.08.1980 in Düsseldorf
Nationalität: deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang:

- 10/2000 – 01/2006 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität, Göttingen, Hauptfach: Zoologie, Nebenfach: Physik
Titel der Diplomarbeit: „Schwebfliegen (Diptera: Syrphidae) aus Farbschalenfängen in Wiesenhabitaten des Oberharzes: Faunistik und ökologische Analysen“
Abschluss: Diplom
- 09/2006 – 04/2010 Doktorarbeit im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum des Saarlandes
Titel der Doktorarbeit: „Elektrophysiologische Charakterisierung der murinen Ionenkanäle TRPM1 und TRPM3 und des TRPM Kanals von *Drosophila melanogaster*“
- Seit 05/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Physiologie, Abteilung Prof. Bruns, Universitätsklinikum des Saarlandes
- Seit 09/2006 Mitglied des Graduierten Kollegs 1326, Calcium-Signaling and Cellular Nanodomains, Homburg

