

TRPM7 en TRPM2 – kandidaat ontvankelijkheidsgenen voor Westerse Pacifische ALS en PD?

Meredith C. Hermosura^{a*} en Ralph M. Garruto^b

^aBekesy Laboratory of Neurobiology, Pacific Biosciences Research Center, University of Hawaii at Manoa, 1993 East-West Road, Honolulu, Hawaii 96822

^bLaboratory of Biomedical Anthropology and Neurosciences, State University of New York at Binghamton, Binghamton, New York 13902-6000

*congruente auteur Meredith C. Hermosura Ph.D., Bekesy Laboratory of Neurobiology, Pacific Biosciences Research Center, University of Hawaii at Manoa, 1993 East-West Rd., Honolulu, Phone: +1-808-956-5212, Fax: +1-808-956-6984, email: meredith@pbrc.hawaii.edu

►De finale geëditeerde versie van de uitgever van dit artikel is beschikbaar via [Biochim Biophys Acta](#).

[Publisher's Disclaimer](#)

Uittreksel

Recente resultaten die TRPM7 en TRPM2 impliceren in oxidatieve stress-geïnduceerde neuronale dood, zet deze kanalen in het daglicht als mogelijke therapeutische doelen voor neurodegeneratieve ziektes. In dit verslag, beschrijven we hoe de functionele eigenschappen van TRPM7 en TRPM2 intergeconnecteerd zijn met calcium (Ca^{2+}) en magnesium (Mg^{2+}) homeostasis, oxidatieve stress, mitochondrische dysfunctie, en immuun mechanismes, allemaal cruciale verdachten in de neurodegeneratie. Wij focussen onze discussie op Westerse Pacifische Amyotrofe Lateraal Sclerose (ALS) en Parkinsonism Dementia (PD) omdat extensieve studies die over de jaren heen gevoerd zijn, sterk suggereren dat deze ziektes ideale kandidaten zijn voor een gen-omgevings model van etiologie. De unieke minerale omgeving geïdentificeerd in connectie met Westerse Pacifische ALS en PD – lage Mg^{2+} en Ca^{2+} , hoewel hoog in transitie metalen, creëert een conditie die de goede werking van deze 2 kanalen zou kunnen aantasten.

Kernwoorden: TRPM7, TRPM2, Westerse Pacifische ALS, Parkinsonism Dementia, oxidatieve stress, neurodegeneratie, Ca^{2+} en Mg^{2+} homeostasis, mitochondrische dysfunctie, microgliale activatie

Westerse Pacifische ALS en PD

Amyotrofe lateraal sclerose (ALS), een fatale ziekte gekarakteriseerd door de progressieve degeneratie van motor neuronen, bevindt zich onder de meest gangbare van de volwassen onset neurodegeneratieve ziektes [1]. De onderliggende pathogenische processen zijn niet gekend, maar men gelooft dat ze te wijten zijn aan een heleboel contributieve factoren waaronder genetische predispositie, omgevings toxines, aberrante cellulaire calcium en metaal ion homeostatis, oxidatieve stress, mitochondrische dysfunctie, en inflammatoire reacties [2,3]. Meer dan 50 jaar geleden, werd een ongewoon hoog voorkomen van ALS gerapporteerd in 3 geografisch aparte streken in de Westerse Stille Zuidzee: de eilanden Guam en Rota, de Kii Peninsula van Japan, en zuid-west New Guinea [4-6]. Op Guam, was de voorkomingsgraad van ALS in 1954 geschat van 50-100 keer hoger te zijn dan het wereldwijde voorkomen [7]. Een gerelateerde, maar uitsluitend neurodegeneratieve aandoening, parkinsonism dementia (PD), gekarakteriseerd door de klinische manifestatie van zowel parkinsonism en dementie in dezelfde patient, was ook overheersend in dezelfde 3 Westers Pacifische ALS ziektehaarden [5-9]. Deze twee ziektes kunnen overlappende klinische symptomen hebben, die regelmatig samen voorkomen in dezelfde families en zelfs in hetzelfde individu, ze kunnen neurofibrilaire verwarde neuronen in de hersenen en het ruggenmerg hebben, en kunnen beiden progressief en uiteindelijk fataal zijn [10-12]. Terwijl er 2 tegengestelde kanten bestaan over het feit of ALS en PD aparte ziektes zijn of klinische varianten van dezelfde ziekte, is er een algemene overeenkomst dat de basis-pathogene mechanismes achter deze ziekte gelijkaardig zijn. Aangezien het onderwerp van dit verslag mechanisch is van nature, zullen Westerse Pacifische ALS en PD beschouwd worden als één (ALS/PD), behalve daar waar het absoluut nodig is om hen apart te beschouwen.

De hyperendemische ALS/PD ziektehaarden in de Westerse Stille Zuidzee trokken aanzienlijke interesse aan onder de medische onderzoekers en wetenschappers om een waaier van redenen waaronder het feit dat deze ziektehaarden van ALS/PD ideaal zijn voor het bestuderen van de relatieve contributie van genen en omgeving in ziekte etiologie omdat elke ziektefocus voorkomt in een bepaalde, beperkte omgeving onder de 3 genetisch verschillende homogene groepen van mensen. ALS/PD is een tragische ziekte en een serieus publiek gezondheidsprobleem en

verdient alleen om die redenen al om onderzocht te worden. Daarenboven, zijn ALS/PD ziektehaarden in deze regio's extreem informatieve ziekteclusters die waardevolle leidraden zouden kunnen leveren voor de pathologische mechanismes achter de meer voorkomende, sporadische vormen van ALS, Parkinson (PD) en Alzheimer (AD) wereldwijd.

In 1956, heeft het National Institute of Neurological Diseases and Blindness (NINDB) zoals het toen genoemd, van het National Institutes of Health (NIH), een onderzoekscentrum opgericht op Guam om de klinische, epidemiologische, neuropathologische en genetische aspecten van ALS/PD te onderzoeken. Het intensieve onderzoek dat volgde bood geen duidelijk begrip van de ziekte etiologie, maar toch suggereerde het dat een complex samenspel tussen genetische ontvankelijkheid en blootstelling aan specifieke omgevingsfactoren betrokken waren. Extensieve epidemiologische studies identificeerden vervolgens twee kandidaat omgevings triggers: (1) gewijzigde minerale inhoud van de bodem en het drinkwater gekoppeld aan abnormaal mineraal metabolismes [13,14]; en (2) toxines van de cycad plant, een traditionele voedselbron in Guam [15,16].

De omgevingsfactoren

Gewijzigde minerale inhoud in de omgeving

Alle drie de hoge voorkomensziektehaarden in de Westerse Zuidzee werden gerapporteerd als zijnde lage niveaus van calcium (Ca^{2+}) en magnesium (Mg^{2+}) te hebben, gekoppeld met hoge niveaus van biobeschikbare transitie metalen zoals manganese (Mn^{2+}), aluminium (Al^{3+}), en ijzer (Fe^{3+}). De bodem en rivieren in streken van hoge voorkomens in de Kii Peninsula bleken hoge niveaus van Mn^{2+} te bevatten maar zeer lage niveau's van Ca^{2+} en Mg^{2+} [13]. Op Guam, kwam het hoogste voorkomen van ALS/PD voor in het zuidelijke deel van het eiland, dezelfde regio waar Ca^{2+} niveau's in de bodem en het traditionele bronddrinkwater werden gevonden van een 10- tot 100 keer lager in vergelijking met andere regio's van het eiland. Mg^{2+} in watervoorraad is vergelijkbaar laag, ongeveer een tienvoud lager in het zuiden dan elders in Guam. [14]. De Ca^{2+} en Mg^{2+} niveaus in de bodem en het drinkwater in de hoge voorkomens-steden in West New Guinea waren zelfs lager dan deze gezien in zuidelijk Guam. [5]. De ongewone gelijkheid van de minerale samenstelling in deze 3 ALS/PD ziektehaarden leidde tot het voorstel dat *verlengde* blootstelling tot een dergelijke omgeving, betrokken zou kunnen zijn in de pathogenese van ALS/PD [13]. Deze hypothese wordt ondersteund door resultaten

van gewijzigde Ca^{2+} en Vitamine D metabolismes [17]; hypocalcemia en reductie van kritische [18]; en de accumulatie van Ca^{2+} , en transitie-metalen zoals Al^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} en Zn^{2+} in de hersenen en het ruggenmerg van patiënten geïmpacteerd door ALS/PD in Guam en Kii peninsula [19-23]. Dierlijke modellen kregen gewijzigde mineralen toegediend om zo de geobserveerde omgevingsniveau's van Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} en Al^{3+} te simuleren, en toonden zo de evidentie aan van gewijzigde Ca^{2+} homeostasis en depositie van Ca^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} in de hersenen en het ruggenmergweefsel [24-26]. Deze modellen toonden ook tekens van neuronale schade waaronder neurofibrillaire pathologie en mitochondriale degeneratie. In een recente studie, werden ratten blootgesteld aan lage Ca^{2+} en/of Mg^{2+} inname over 2 generaties om zo de menselijke condities in Guam meer nauwgezet te kunnen simuleren [27]. Van de verschillende combinaties van Ca^{2+} en Mg^{2+} inhoud getest, was blootstelling aan lage Mg^{2+} (één-vrijfde van de normale niveau's) meer deletair, en veroorzaakte zo een significant verlies van dopaminerge neuronen in de substantia nigra. We zullen een mogelijk mechanische uitleg over deze observaties aanbieden, verderop in dit verslag.

L-beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is een vermoedelijk neurotoxine van de cycad plant

Traditioneel gebruikt als voedselbron in Guam en voor medicinale toepassing in Kii Peninsula en West New Guinea, is cycad en zijn toxine, L-BMAA, de tweede omgevingsfactor die voorgesteld werd als betrokkene in de pathogenese van ALS/PD [15,16]. Het is ook één van de meest controversiële topics in ALS/PD onderzoek. L-BMAA is een niet-proteïne amino zuur aanwezig in cycad zaadjes waarvan ook aangetoond is dat ze neurotoxische eigenschappen bevatten in celcultuur modellen [28,29]. Van belang, is dat makaak (*Cynomolgus*) apen die grote dosissen van BMAA aten, klinische en neuropathologische ALS-gelijkende symptomen vertoonden [15]. De gigantische dosis, echter, werd beschouwd als onrealistisch bij woorden van menselijke consumptie omdat er slechts zeer lage hoeveelheden van L-BMAA overblijven in gewassen cycad bloem, aanschouwd als de primaire bron van menselijke blootstelling [30,31]. Zwakke neurotoxische eigenschappen die gedetecteerd werden in celcultuur studies, motiveerden dit aanzicht nog meer dat L-BMAA niet significant zou toedragen aan de ALS/PD pathogenese. Hoge (millimolaire) concentraties van L-BMAA waren nodig om cytotoxische effecten op te wekken in gecultiveerde neuronale cellen [28]. NMDA receptor (NMDAR) antagonisten blokkeerden

grotendeels deze effecten die suggereren dat L-BMAA reageert via NMDARs [32,33]. Verder werd aangetoond dat de toevoeging van bicarbonaat ionen het vermogen van L-BMAA aanzienlijk verhoogde door de formatie van β -carbamate, een structureel meer potente agonist van NMDARs [32]. Terwijl nucleaire magnetische spectroscopie (NMR) inderdaad kon demonstreren dat carbamate onderdelen zich vormen wanneer BMAA en bicarbonaat gemixed worden, moet het benadrukt worden dat, zover gekend, geen enkele studie ooit gerapporteerd heeft over de isolatie van carbamaten uit de hersenen of ruggenmergweefsel van ALS/PD patiënten.

Verdere studies duiden aan dat NMDAR activatie niet het dominante pad zou zijn langs waar L-BMAA zijn neurotoxische effecten uitwerkt. L-BMAA werd gerapporteerd als zijnde preferentieel te interageren met metabotropische receptoren [34-36], en non-NMDA receptoren in de aanwezigheid van bicarbonaat [37,38]. Preferentiële schade aan NADPH-diaphorase neuronen opgewekt door lagere BMAA blootstellingen werd gevonden als zijnde predominant gemedieerd door AMPA/kainate receptoren [28,32]. Blootstelling aan L-BMAA (en bicarbonaat) verhoogde de intracellulaire niveau's Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$, en suggereerde zo Ca^{2+} betrokkenheid [39]. Aangezien AMPA/kainate receptoren Ca^{2+} - ondoordringbaar zijn, was de betrokkenheid van deze receptoren niet makkelijk om te integreren in de overheersende hypothese van L-BMAA toxiciteit. Anderzijds, werd al snel ontdekt dat een speciale klasse van AMPA/kainate receptoren, Ca-A/K, die Ca^{2+} -doorlaatbaar zijn, bestaan [40,41]. Van een bijzondere relevantie voor ALS, werden motor neuronen (MNs) aangetoond die grote hoeveelheden CA-A/K kanalen bevatten [42].

Gestimuleerd door een rapport dat proteïne-gebonden vormen van L-BMAA potentieel zouden kunnen dienen als endogene neurotoxisch reservoir van deze toxine [43], werd de kwestie van L-BMAA neurotoxiciteit recent herbekeken door Rao, et al [44]. Spinale neuronen geplateerd om een astrocytische monolaag werden blootgesteld aan gecontroleerde dosissen van L-BMAA, cycad toxine extracten, en de antagonisten NBQX (specifiek voor AMPA/kainate receptoren) en Mk801 (een NMDAR antagonist). Cel dood, $[Ca^{2+}]_i$ veranderingen, en reactieve zuurstof soorten (ROS) productie werd gemonitord. Resultaten toonden aan dat L-BMAA potentieel meer toxisch was voor MNs dan voor alle andere spinale neuronen. De toevoeging van NBQX, maar niet Mk801, stond substantiele bescherming toe, suggererend dat L-BMAA toxiciteit predominant gemedieerd wordt door Ca-A/K kanalen.

Toch, was NBQX niet compleet beschermend. In motor neuronen blootgesteld aan 100 μM L-BMAA, NBQX of een combinatie van NBQX en Mk801 verminderde L-BMAA-veroorzaakte celdood met twee derde, zo de betrokkenheid van andere paden suggererend. Interessant is een vroegere studie die gecultiveerde hippocampale neuronen gebruikt, die aantoonde dat blootstelling aan L-BMAA een ongeïdentificeerde lineaire stroom activeerde [38]. Het is mogelijk dat deze stroom gedragen wordt door TRPM2, één van de kanalen die behandeld worden in dit rapport, omdat verhoogde $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ROS de TRPM2 activatie promoten.

De Rao, et al. studie rapporteerde drie belangrijke resultaten: (1) motor neuronen zijn selectief kwetsbaarder aan L-BMAA toxiciteit; (2) deze toxische effecten zijn gemedieerd door $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhogingen via Ca-A/K kanalen en andere paden, en subsequeante ROS generatie; en (3) L-BMAA, in concentraties gevonden in cycad extracten, oefenen invloed uit door neurotoxische effecten. De demonstratie dat relatief lage (in de zin van micromolaire) niveau's van L-BMAA motor neuronen zouden kunnen beschadigen, stelt L-BMAA als een stevige, geldige kandidaat in de etiologie van ALS/PD. Toch moet het benadrukt worden dat L-BMAA niet gevonden was in *alle* ALS/PD autopsie soorten, en dat een andere studie uitgevoerd door aan aparte research groep, getest heeft op vrije L-BMAA in Alzheimer patiënten van de US Pacific Northwest, maar niet gedetecteerd heeft, noch in PD patiënten in Guam of Chamorro onderzoeksvoorwerpen [45]. Voor dit rapport, is het belangrijke punt dat L-BMAA $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhogingen veroorzaakt en ROS generatie in motor neuronen, zo gunstige omstandigheden creëerend voor de activatie van TRPM2, een ion kanaal dat gelinkt wordt aan oxidatieve stress-gemedieerde neuronale dood [46,47].

De vraag van genetische predispositie

Epidemiologische studies hebben genetische factoren geïmpliceerd in de ontwikkeling van ALS/PD omdat cases clusteren in families – afstammelingen en ouders van geïmpacteerde patiënten vertoonden een verhoogd risico om deze ziektes te ontwikkelen [48]. Een intensieve inspanning werd gelanceerd om de genetische oorzaak van ALS/PD te identificeren, waaronder stamboom analyses en berekeningen van inteelt coëfficiënten in hoge voorkomenssteden, identificatie van geseleceerde genmarkers zoals HLA antigenen, bloedgroepsystemen, rode cel enzymen, immunoglobulin allotypes, en serum proteïnen [49]. Geen enkele leverde bevredigende

resultaten.

Een prospectief case-control register werd opgestart in 1958 (gecompleteerd in 1963) om vast te stellen of eerste-gradsverwanten en echtgenote(n)(s) van ALS/PD patiënten een hoger risico hebben op de ontwikkeling van de ziekte dan verwanten van niet getroffen objecten (aangepast voor leeftijd, geslacht en dorp). Een follow-up studie van 25 jaar onthulde een significant verhoogd risico op de ontwikkeling van ALS en PD onder zonen en dochters, en op een lager niveau, onder echtgenoten van patiënten [50]. Kleinkinderen, daarentegen, vertoonden geen verhoogd risico in de opvolgingsstudie van 25 jaar, waarschijnlijk omdat de meesten onder de risicoleeftijd van de ziekte vielen. Broers en zussen van proefobjecten hadden geen verhoogd risico en hebben, in feite, een lager risico dan de algemene Chamorro bevolking. Een recentere opvolging van 40 jaar toonde gelijkaardige resultaten: eerstegraadsverwanten van ALS of PD patiënten hebben een significant hoger risico op de ontwikkeling van eender welke ziekte dan de Guamanian bevolking, terwijl verwanten van proefobjecten significant lagere risico's hebben. [51]. Desalniettemin, is er een aanzienlijk verschil want deze keer, vertoonden de nakomelingen van PD patiënten een verhoogd risico voor de ontwikkeling van zowel ALS of PD. Terwijl deze data een genetische contributie suggereren aan etiologie, gelden de simpele Mendelian regels niet. Ten eerste, zowel de opvolgingsstudie van 25, als die van 40 jaar, toonden een verhoogd risico aan voor echtgenoten van patiënten. Daarenboven, vond de 40jarige studie een verhoging in leeftijd van de start de ziekte en een dramatische achteruitgang in het voorkomen voor beide ziektes sinds de jaren 1950 toen de eerste systematische epidemiologische studies begonnen. De achteruitgang viel samen met een verhoogde modernisatie van Guam die de levensstijl veranderde, de veranderde toegang tot lokaal geoogst voedsel en veranderde of verbeterde lokale drinkwatervoorraden. Deze resultaten, vooral de snelle achteruitgang over 3 eeuwen in zuidelijk Guam, waar de hoogste voorkomens van de ziekte gevonden werden, suggeren sterk dat omgevingsfactoren bijdragen aan de etiologie [52,53]. Ter ondersteuning van deze conclusie, werd segregatie analyse verricht op de geregistreerde data die werd gebruikt in de 25jarige opvolgingsstudie, waar alle patiënten onder vallen van 1950-1983, verwierp een pure omgevingshypothese en een Mendelian dominant of een Mendelian recessieve hypothese, maar kon een twee-allel additieve grote locus hypothese niet verwerpen [54]. Deze segregatie studie stelt daarom voor dat een belangrijk gen in

combinatie met omgevingsfactoren betrokken zou kunnen zijn in de ontwikkeling van ALS/PD.

Een zoektocht naar kandidaat genen

In een poging om de genen te identificeren die betrokken zijn in de etiologie van ALS/PD, werden die genen die voordien gelinked waren aan familiale ALS, PD of AD gecatalogiseerd. Geen ziekte-geassocieerde variant of mutatie werd gevonden na sequentie analyses van Cu-Zn superoxyde dismutase, *SOD1* (familiale ALS), de microtubule-geassocieerde proteïne, *TAU* (PD), apolipoproteïne E, *ApoE* $\Sigma 4$ (vroeg start AD) en *CYP2D6*, die een ontgiftingsenzyme (PD) codeert [55-58].

Het is waarschijnlijk dat we zouden moeten zoeken naar vatbare genen die niet onmiddellijk de ziekte veroorzaken maar bijdragen aan de predispositie wanneer ze functioneren in een gunstige omgeving. Belangrijk is, dat de genetische oorzaak van complexe ziektes zoals ALS/PD, waarschijnlijk polygenisch van nature is, dat is, kleine functionele varianten van verschillende genen zouden samen kunnen bijdragen aan de pathologie. Om functionele kandidaat vatbaarheidsgenen te identificeren voor ALS/PD, hebben we beslist dat een effectieve aanpak zou moeten gebruikt worden om de omgevingsrisicofactoren gevonden in alle 3 de hyperendemische Western Pacific ziektehaarden als een screening tool. *Welke gen productfunctie zal hoogst waarschijnlijk aangetast worden door lage Mg^{2+} , lage Ca^{2+} , en hoge transitie metalen?* Prominent onder verschillende functionele kandidaten zijn ion kanaal genen. Om het veld verder toe te spitsen, hebben we twee bijkomende beperkingen opgelegd: de kandidaat kanalen moeten uitgedrukt worden in het centrale zenuwstelsel (CNS) en moeten aangetast zijn door oxydatieve stress. Oxydatieve stress in de prijs die een eukaryotische cel betaald voor het kunnen gebruiken van moleculaire zuurstof (O_2) als een energiebron. Oxydatieve phosphorylatie, het proces van het converteren van energie van O_2 naar een vorm die gebruikt kan worden door de cel, produceert hoge-energie-door-producten, ROS, die normaal beheerd worden door het cellulaire antioxydante beschermingssysteem. Oxydatieve stress resulteert wanneer het evenwicht zwaar overbuigt in het voordeel van ROS productie zoals dat voorkomt in omstandigheden van hoge metabolische koersen, verzwakte cellulaire verdediging en aanwezigheid van omgevingstoxines zoals transitie metalen. Zo een onevenwichtigheid leidt tot moleculaire schade, uitvallen van cellulaire functies, en uiteindelijk celdood. Verhoogde oxydatieve stress doet zich voor ten gevolge van veroudering, de universele

risico factor voor alle neurodegeneratieve ziektes. In de hyperendemische ALS/PD ziektehaarden in de Westerse Zuidzee, creëert de unieke minerale samenstelling van de omgeving een omstandigheid van verhoogde oxidatieve stress omdat lage Mg^{2+} niveau's lipide peroxidatie kunnen veroorzaken [59] terwijl transitie-metalen ageren als redox catalyten die verhoogde ROS productie veroorzaken [60].

We vonden 2 kandidaatgenen die aan onze criteria voldoen – ion kanalen die voorkomen in de hersenen en aangetast worden door oxidatieve stress: *TRPM7* en *TRPM2*. Beiden behoren ze tot de transiente receptor potentiele melastatin (TRPM) familie van kanalen. *TRPM7* bevindt zich in chromosoom 15q21, in een locus die gelinked is aan een vorm van autosomale recessieve familiale ALS [61]. *TRPM2* bevindt zich in het ziekte-rijke kromosoom 21 (21q22.3), nabij de SOD1 locus (21q22.1-22.2) die geassocieerd is met familiale ALS [62].

TRPM7

TRPM7 is een alomtegenwoordig plasma membraan proteïne dat virtueel alle divalente ionen leidt – van de fysiologische extensieve Ca^{2+} en Mg^{2+} , tot essentiële trace metalen zoals Mn^{2+} en Zn^{2+} en niet-essentiële, zelfs toxische transitie-metalen zoals Cd^{2+} [63, 64]. Het werd voorgesteld dat TRPM7 een centrale rol speelt in het regelen van de cellulaire homeostatische niveau's van Ca^{2+} , Mg^{2+} en trace metalen [63-65]. TRPM7 is vereist voor cellevensvatbaarheid zoals aangetoond door de resulterende dodelijke phenotype wanneer het kanaal uitgeschakeld is in DT40 B lymphocytes [63]. Studies hebben TRPM7 betrokkenheid geïmpliceerd in verschillende celfuncties waaronder celgroei, proliferatie, embryonische ontwikkeling, anoxische neuronale dood, pathologische respons op vaatwandschade, actomyosin contractility, en neurotransmitter release in gewillige neuronen [65-72]. Misschien van een bepaalde relevantie op dit onderwerp van dit verslag, is het recente rapport dat TRPM7 impliceert in familiale Alzheimer [73].

TRPM7 is een dual functie proteïne, een van de slechts 3 gekende kanalen die zowel een kanaal bevat als een enzyme domein, de andere 2 zijde TRPM6 en TRPM2. TRPM7 en TRPM6 tonen ongeveer 50% sequentie homologie en bevatten allebei een C-terminal serine/threonine alpha (α)-kinase [74]. α -kinases worden gekarakteriseerd door hun unieke capaciteit om fosforilate substraten in α -helices, tegenover conventionele proteïne kinases

die hun substraten fosforoliseren in loops, β -turns en onregelmatige structuren [75, 76]. Biochemische studies hebben kinase activiteit aangetoond in zowel TRPM6 en TRPM7 [65, 77, 78]. De relatie tussen een kanaal en een kinase bestanddeel dat samenbestaat in dezelfde molecule, is rechtmatig het onderwerp geweest van aanzienlijke interesse. Initieel dacht men dat TRPM7 kinase activiteit de kanaalfunctie reguleert [77] maar verdere studies hebben aangetoond dat fosfotransferase activiteit niet vereist is voor kanaalactiviteit [78, 79]. TRPM7 was recent betrokken in de regulatie van celadhesie en podosome formatie door het moduleren van actomyosin contractiliteit door phosphorylatie van de myosin IIA zware ketting [72]. Annexin 1, een Ca^{2+} -gereguleerd fosfolipide binding proteïne, werd ook geïdentificeerd als een substraat voor TRPM7 kinase [80]. Fosforylatie van annexin 1 en de myosin IIA zware ketting door TRPM7 kinase vereist Ca^{2+} influx door het kanaal domein, en wijst op een intricate associatie tussen kanaal en kinase functies [72, 80]. Er wordt dus gesuggereerd dat ionen permeaten de zwakke regulate kinase functie en de subsequente aanwerving of activatie van downstream signaling components [72]. Dit is een aantrekkelijke hypothese die zéker verder onderzoek verdient.

TRPM7 regulatie

TRPM7 kanalen zijn constitutief open, maar worden intracellulair geramd door vrije Mg^{2+} [63, 81], een feit dat gereflecteerd wordt in één van de namen volgens endogene TRPM7 stromen, *MIC* voor ***Mg²⁺-geremde stroom*** [82]. De andere terminologie, MagNuM (*Magnesium Nucleotides Metal*) neem het blok in rekening door Mg^{2+} en Mg^{2+} -nucleotides (hoofdzakelijk MgATP) en metaal permeatie [81]. TRPM7 reageert ook op veranderingen in pH [83, 84], een feature die relevant zou kunnen zijn gedurende bepaalde pathologische condities zoals wanneer acidosis opduikt gedurende ischemie. Behalve intracellulaire vrije Mg^{2+} , MgATP en pH, werden andere modulators van kanaalactiviteit gesuggereerd in verschillende experimentele systemen: phospholipase C-coupled receptoren agerend door phosphatidylinositol 4,5- bisfosfaat (PIP_2), cyclische adenosine 3,5-monofosfaat (cAMP), polyvalente cations, en fosforylatie door TRPM6 [78, 85-89].

Mg^{2+} en Ca^{2+} zijn permeante blockers

Behalve ontbinding TRPM7 van de cytoplasmische kant, Mg^{2+} speelt het ook een cruciale rol in het reguleren van externe ion permeatie door deze kanalen. Dit effect van Mg^{2+} is van een doorslaggevende fysiologische relevantie omdat externe Mg^{2+} de

permeatie van andere ionen aantast. Dit kanaal is kation non-selectief, en desalniettemin, is de TRPM7 I/V curve onder fysiologische ionische condities gekarakteriseerd door uitgesproken uitwaartse rectificatie, met zeer kleine inwaartse stromen aan negatieve potentiëlen, en alsmaar grotere uitwaartse stromen aan positieve voltages. De reden hiervoor is dat externe divalente blokken – divalent aanwezig in het extracellulaire medium (fysiologische Mg^{2+} en Ca^{2+}) een voltage-afhankelijk blok produceren dat progressief verwijderd is door depolarisatie. Divalente blokken zijn ook gered aan zeer lage negatieve voltages. Kerschbaum et al. [89] voerden een gedetailleerde studie uit over de externe divalente (en polyvalente) blokken en presenteerden een model voor ion permeatie door MIC/TRPM7 kanalen. Het model voorspelde succesvol experimenteel geobserveerde effecten van Mg^{2+} op de permeatie van monovalente kations. Het stelde de aanwezigheid voor van twee lage-affiniteit binding sites en een enkele hoog-affiniteit site binnen de dirigerende regio's van het kanaal. Volgens dit model, wanneer aanwezig in lage μM concentraties, misplaatsen Mg^{2+} en Ca^{2+} Na^+ van de hoog-affiniteit binding site, daardoor de monovalente stroom blokkerend. Mg^{2+} bindt sterker aan deze site dan Ca^{2+} ($K_{1/2}$ aan -40 mV is $1 \mu M$ voor Mg^{2+} vs. $4 \mu M$ voor Ca^{2+}) wat aangeeft dat het een sterkere blocker is. Permeatie van Mg^{2+} en Ca^{2+} doet zich voor wanneer het aanwezig is in voldoende hoge concentraties, mogelijk door een 'knock off' mechanisme waarin de hoog-affiniteit binding site betrokken is, en 'punch-through' van het blocking ion aan de binnenkant.

Of er nu één binding site is, of meer, het is belangrijk om in gedachten te houden dat Mg^{2+} , Ca^{2+} , en Na^+ mogelijk interageren in de zwakke, competitie voor bindende sites, elk mekaar beïnvloedend. Terwijl Mg^{2+} en Ca^{2+} sterke blockage afdwingen van Na^+ permeatie, is het blok niet totaal omdat enige graad van Na^+ permeatie geobserveerd is [67, 82]. De experimenteel bepaalde binding affiniteiten tonen aan dat Mg^{2+} de sterkere blocker is, wat suggereert dat het moeilijker zal zijn voor een Ca^{2+} ion om een gebonden Mg^{2+} ion te verplaatsen dan vice versa. Het kan dus bekeken worden als dat de extracellulaire Mg^{2+} concentratie verminderd is, de mogelijkheid van Ca^{2+} (en Na^+) om het kanaal binnen te komen zal corresponderend verhogen. Boven, zal het verwijderen van Mg^{2+} van de externe oplossing altesamen (zoals gedaan in sommige experimenten, voornamelijk excitotoxiciteit testen), de verhoogde influx van Ca^{2+} door TRPM7 de voorkeur krijgen. We observeerden inderdaad verhoogde Ca^{2+} influx door

overexpressed murine TRPM7 aangezien externe Mg^{2+} concentratie verminderd is (M. Hermosura, et al., ongepubliceerde data). Deze lijn van redenering volgend, zal verwijdering van zowel Mg^{2+} als Ca^{2+} van de externe oplossing, divalente blokken verwijderen, en zo monovalente (Na^+) influx toelatend. Dit is experimenteel gedemonstreerd [67, 81, 89].

TRPM7 en neuronale dood

TRPM7 werd recent betrokken in anoxische neuronale dood door het mediëren van I_{OGD} , een kation stroom geactiveerd gedurende verlengde zuurstof-glucose deprivatie, OGD [68]. In dit model van hypoxie door het gebruik van corticale neuronen van muizen, werd het voorgesteld dat ROS geproduceerd gedurende oxidatieve stress, de TRPM7 kanalen activeerde, zo de ongeregelde influx van Ca^{2+} toelatend en een vicieuze cirkel triggerend doordat de hoge intracellulaire Ca^{2+} de productie van nog meer ROS veroorzaakte, en zo de I_{OGD} /TRPM7 activatie verhoogde. Downregulating TRPM7 expressie door kleine interfererende RNA (siRNA) specifiek voor TRPM7 beschermden de cellen van zuurstof en glucose deprivatie-opgewekte stress. Alhoewel, datzelfde TRPM7-specifieke siRNA downregulated ook de TRPM2 kanalen. Dit resultaat werd uitgelegd als zijnde suggestief aan interdependente proteïne expressie tussen deze twee kanalen en/of dat ze heteromeren vormen in corticale neuronen en dat de geobserveerde anoxia-opgewekte stroom gedragen is door TRPM2/TRPM7 heteromeren. Het bestaan van dit laatste moet nog altijd vastgelegd worden en naar onze wetenschap, is de interactie tussen TRPM2 en TRPM7 op een proteïne niveau nog niet aangetoond.

Het feit dat oxidatieve en nitratieve stressors TRPM2 activeren is duidelijk vastgesteld [90, 91] en zal later in detail besproken worden. Jammer genoeg, hebben we geen H_2O_2 - gemedieerde activatie van menselijke TRPM7 gevonden in HEK-293 cellen in onze volledige-cel patch clamp experimenten, in de aanwezigheid van fysiologische concentraties van Ca^{2+} en Mg^{2+} . We leveren een alternatieve uitleg voor de resultaten geobserveerd in deze OGD studie. Zo ver als we kunnen vaststellen, werden deze experimenten uitgevoerd in de afwezigheid van externe Mg^{2+} . Zoals we besproken hebben in de vorige sectie, geeft deze conditie de voorkeur aan Ca^{2+} entry door de constitutieve open TRPM7 kanalen. De mate van Ca^{2+} influx zal bepaald worden door het aantal TRPM7 kanalen beschikbaar voor permeatie dat op zijn beurt afhankelijk is van bestaande niveau's van intracellulaire Mg^{2+} en MgATP. De experimentele inductie van OGD veroorzaakte

significante vermindering van cellulaire MgATP [92] daardoor het intracellulaire TRPM7 blok verminderend. Aangezien meer TRMP7 kanalen beschikbaar komen voor permeatie, zullen intracellulaire Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, stijgen. Een van de gevonden van deze $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stijging zal de verhoogde ROS productie zijn in de mitochondria. De gecombineerde $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stijging en verhoogde oxidatieve stress, is gunstig voor TRPM2 activatie. In dit scenario, veroorzaakt de activatie van TRMP2 de massieve influx van Ca^{2+} en Na^{2+} waarna celdood volgt. Deze uitleg is niet in conflict met het beschermende effect geobserveerd na de siRNA inhibitie van TRMP7 omdat de vroege $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stijging nodig voor het triggeren van ROS/RNS productie niet zal voorkomen wanneer het aantal beschikbare TRMP7 kanalen ernstig uitgedund is. Dus, zoals de auteurs besluiten, is TRMP7 een kritieke en belangrijke speler in OGD-gemedieerde neuronale dood. Het zal van belang zijn de weten of de I_{OGD} paden neuronale dood medieren in de aanwezigheid van fysiologische en/of pathologische (lage) niveau's van Mg^{2+} . Dit zijn vroege dagen in de functionele karakterisatie van TRPM kanalen, vooral in de context van complexe cellen zoals neuronen. Onze beste experimentele pogingen en interpretaties zijn gelimiteerd door wat we weten, en in het geval van TRPM7 en TRPM2 is er veel te leren. We moeten weten of deze twee kanalen heteromeren vormen, welke splits varianten voorkomen in neuronale cellen en onder welke omstandigheden deze voorkomen, de electrofysiologische handtekening van de heteromeren, en de spelers betrokken in de modulatie en activatie van homomerische en heteromerische kanalen. I_{OGD} zou gemedieerd kunnen worden door zowel TRPM7 en TRPM2. Enkel de tijd en verdere studies zullen ons meer vertellen.

Toch, gezien dat dit een review is op een kandidaat ontvankelijkheidsgen voor een vorm van neurodegeneratieve motor neuron ziekte, is het resultaat dat TRPM7 betrokken is in neuronale dood, relevant. Belangrijk is dat de recent gepubliceerde studie de lokalisatie beschrijft van TRMP7 in synaptische terminales van motor neuronen en zo de TRMP7 betrokkenheid aantonend gedurende neurotransmitter release in neuromusculaire synapsen [71] voegt verdere verklaring toe voor het overwegen van *TRPM7* als een goede kandidaat voor een ontvankelijkheidsgen voor Westerse Zuidzee ALS/PD.

TRPM7 in Guam ALS/PD

De T1482I TRPM7 variant in Guamanische ALS/PD

In een poging om een genetische variant te identificeren die de ontvankelijkheid voor ALS/PD aangeeft, hebben we genomische

DNA samengevoegd van ALS/PD stalen en leeftijd-gebonden objecten [93]. We vonden een heterozygote variante van *TRMP7* in een subset van Guamanische ALS/PD gevallen die een kanaal proteïne coderen met een verkeerde mutatie, Thr¹⁴⁸² is vervangen door Ile¹⁴⁸². Uitlijning van TRPM7 sequenties van verschillende soorten toonde aan dat Thr¹⁴⁸² evolutionair geconserveerd is van zebrevissen tot mensen, behalve in muizen die serine (Ser) in deze positie hebben. Thr en Ser zijn niet dissimilaar aangezien ze allebei gefosforyleerd kunnen worden. De evolutionaire conservatie van Thr/Ser in deze positie suggereert dat fosforylatie van dit residu belangrijk is en de potentiële significantie van de Thr-naar-Ile substitutie ondergraaft omdat isoleucine niet kan gefosforyleerd worden. TRPM7 is een Ser/Thr α -kinase, het fosforyleert Ser en Thr residues in α -helices. We vergeleken fosfothreonine niveaus tussen wild-type (WT) en T1482I TRPM7 en vonden dat Thr¹⁴⁸² inderdaad autofosforylated is. de Thr-naar-Ile vervanging had geen impact op TRMP7 kinase activiteit maar verhoogde de gevoeligheid van het kanaal aan intracellulaire Mg²⁺ blokken. Aangezien één van de primaire functies van TRPM7 de cellulaire import van Mg²⁺ en Ca²⁺ is, zullen cellen met T1482I mogelijks defecter geraken in deze ionen. Dit defect zal meer uitgesproken worden in een omgeving die sterk uitgeput is aan Mg²⁺ en Ca²⁺ om te beginnen, zoals gevonden in de hyperendemische ALS/PD ziektehaarden in de Westerse Zuidzee. Het is daarom onze hypothese, dat de *T1482I* variant een genetische predispositie aangeeft aan ALS/PD. In een omgeving met normale niveaus van Ca²⁺ en Mg²⁺, komt geen sterk tekort voor, maar verlengde blootstelling aan een gunstige omgeving (in dit geval, één met zeer lage Mg²⁺ en Ca²⁺ niveaus) ontmaskert de verwijderende effecten van de mutatie. De resulterende onevenwichtigheid in Mg²⁺ en Ca²⁺ homeostase zou veer cellulaire processen kunnen aantasten, waaronder die die reageren op verhoogde oxidatieve stress en die die activatie van proinflammatoire paden activeren. Jammer genoeg is het testen van deze hypothese niet zo simpel. *TRPM7* knock-out bij muizen is embryonische dodelijk (A. Ryazanov, personal communication). Over het algemeen, is er de bijkomende complicatie dat Thr¹⁴⁸² vervangen is door Ser in de muis. We bekijken ook andere mogelijkheden zoals het gebruik van een DT20 kip lymfocyte cellijn met de endogene TRMP7 knocked-out en vervangen met induceerbare T1482I TRPM7 (in samenwerking met Drs. C. Schmitz en A. Perraud, National Jewish Medical en Research Center), alhoewel we volledig erkennen dat dit een over-expressie model is. Gezien de nieuw beschreven rol van TRPM7 in neurotransmitter release in de neuromusculaire verbinding, zal het

ook van belang zijn om te onderzoeken of synaptische transmissie aangetast is in de aanwezigheid van T1482I, vooral gezien de verstoring en het verlies aan neuromusculaire synaps, dat gerapporteerd is als één van de vroegste pathologische gebeurtenissen in ALS en zich voordat lang vóór het verschijnen van symptomen [94, 95].

Mg² tekort verhoogt oxidatieve stress

De demonstratie dat lage Mg² omstandigheden een significant verlies veroorzaakt van nigrale dopaminergieke neuronen van ratten, steunt de notie dat neuropathologische veranderingen zouden kunnen volgen simpelweg als een resultaat van verlengde blootstelling aan lage Mg² [27]. Wat is het mogelijke mechanisme hierachter? Lage Mg²⁺ veroorzaakt lipide peroxidatie en activatie van NF-κB in canine primaire cerebrale vasculaire gladde spiercellen [59]. Lipide peroxidatie verstoort de membraan integriteit door het beschadigen van fosfolipiden en zo verder, verhoogt de oxidatieve stress door de productie van reactieve bijproducten zoals lipide hydroperoxides en reactieve aldehyde [60]. De peroxidatie van mitochondriale membraan lipiden kan het ionische evenwicht in de mitochondria wijzigen, wat mitochondriale zwellingen veroorzaakt en verhoogde productie van ROS [96]. NF-κB activatie opgewekt door lage Mg²⁺ omstandigheden kan proinflammatoire reacties initiëren zoals inductie van COX2 en iNOS in microglia, hen zo houdend in een persistent geactiveerde staat die schadelijk is voor omliggende neuronen. Nog een andere manier waarop lage extracellulaire Mg²⁺ niveaus de cel negatief kunnen impacteren is door verhoogde Ca²⁺, Na⁺, en metaal influx door TRPM7, als een resultaat van het feit dat er minder Mg²⁺ is om externe blokken op te dringen. We hebben inderdaad verhoogde Mn²⁺ influx gezien door recombinante TRPM7 wanneer de extracellulaire Mg²⁺ verlaagd is (M. Hermosura en S. Thompson, ongepubliceerde data). Metalen zijn redox catalyten, en zullen daarom bijdragen aan de stijging in cellulaire oxidatieve stress. Dat Mg²⁺ gebrek veroorzaakt mogelijke alteraties in ion fluxes en verhoogde oxidatieve stress was ook voorgesteld door genexpressiestudies in gespeende ratten blootgesteld aan Mg²⁺-gebrek diëten [97].

Aldus, het algemene effect van lage Mg²⁺ is om omstandigheden te creëren van hoge oxidatieve stress die gunstig is voor de activatie van TRPM2, non selectieve kation kanalen die gelinkt zijn aan de activatie van celdood paden [46, 47, 90, 98, 99].

Oxidatieve stress in Western Pacific ALS/PD

Factoren emanerend van de unieke minerale compositie van de omgeving in de ALS/PD ziektehaarden in de Westerse Zuidzee lopen samen met de productie van een staat van hoge oxidatieve stress. Oxidatieve stress is meer en meer herkend als een sleutelspeler in de initiatie en amplificatie van het ziekteproces in vele ziektes waaronder neurodegeneratieve ziektes [100] en onderlegt de groeiende interesse in ons kandidaatgen, *TRPM2*.

TRPM2 is een ion kanaal dat geactiveerd wordt door oxidatieve en nitratieve stress

TRPM2 kanalen zijn kation nonselectieve kanalen die in grote mate voorkomen in de hersenen en in immuuncellen, vooral die van monocytische afkomst [101, 102]. In een recept rapport, werd RTPCR gebruikt om een wijdverspreide distributie te demonstreren van TRMP2 mRNA in de CNS [103]. In situ hybridisatie studies toonden TRPM2 expressie aan als zijnde het hoogste in de hippocampus, cerebrale cortex, thalamus en middenbrein [104]. Op een cellulair niveau, werd TRPM2 gevonden in neuronale cellen en microgliale cellen [46, 104, 105]. Zoals eerder vermeld, is TRPM2 een van de enige 3 gekende *chanzymes*, kanalen die intrinsiek gekoppeld zijn aan een enzym domein. In TRPM2, is het enzym in de C-terminal regio en is NUDT9_H toegewijd om zijn homologie te reflecteren aan NUDT9 ADP-ribose hydrolyse [106]. Hoewel lage niveaus van NUDT9_H enzymatische activiteiten gedemonstreerd werden, wijzen experimentele data op het feit dat enzyme activiteit geen vereiste is voor kanaaldosering [107]. In de plaats daarvan, wijzen studies erop dat NUDT9-H een binding site levert voor adenine 5'-diphosphoribose (ADPR), de fysiologische activator van TRPM2 [108]. Behalve ADPR, werden millimolaire concentraties van β -NAD gezien om deze kanalen te activeren [90, 101]. Omwille van de hoge, non-fysiologische nodige dosissen, werd de suggestie of β -NAD TRPM2 direct kan doseren in vraag gesteld. In de plaats daarvan werd voorgesteld dat TRPM2 activatie door β -NAD voorkomt als een resultaat van β -NAD breakdown in ADPR [109].

ADPR activatie van TRPM2 is gemoduleerd door intracellulaire Ca^{2+} [110, 111]. Ca^{2+} , op zichzelf, kan TRPM2 niet doseren [111]. Echter, Ca^{2+} is vereist voor basale niveau's van ADPR om het kanaal te doseren. In granulocytes, was basale ADPR vastgesteld als zijnde $\sim 5 \mu\text{M}$, en het bleef rond dit niveau zelfs na agoniste stimulatie. Ca^{2+} enhanced TRPM2 activatie door ADPR. Aan een gegeven ADPR concentratie, hogere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ niveau's lokken

grotere TRPM2 stromen, met een gerapporteerde EC_{50} van 340 nM [110]. Het was dus voorgesteld dat ADPR en Ca^{2+} ageren in concert, als een tweede messenger systeem, om de effecten van agonist binding te verzachten. Het versterkende effect van Ca^{2+} op TRPM2 activatie zou relevant kunnen zijn in relatie met oxidatieve stress-gemedieerde neuronale dood zoals hieronder besproken.

TRPM2 in oxidatieve stress-gemedieerde celdood

Accumulerend bewijs suggereert dat TRPM2 een centrale rol speelt in oxidatieve stress-gemedieerde celdood [46, 98, 99, 112]. H_2O_2 -gemedieerde dood van cerebrale corticale neuronen was significant verminderd ingevolge de siRNA inhibitie van TRPM2 [46]. Gelijkaardig was de H_2O_2 -opgewekte toxiciteit in striatale neuronen verzwakt door transfectie met een dominante negatieve korte vorm van TRPM2 (TRPM2-S) alsook door een TRPM2-specifieke siRNA inhibitie [113, 114]. In beide gevallen, volgde de dood door een verhoging van intracellulaire Ca^{2+} als een resultaat van massieve Ca^{2+} influx door TRPM2 kanalen. Hoe oxidatieve en nitratieve stressor dit kanaal activeren, blijft controversieel aangezien verschillende studies verschillende kandidaatpaden ondersteunen. Toch, kunnen bestaande mogelijkheden breed geclassificeerd worden als direct en indirect. In de vorige, doseert H_2O_2 het kanaal direct [91, 104]. In het indirecte pad, is de TRPM2 activatie ADPR-gedoseerd, met oxidatieve stress die simpelweg de productie van dit metaboliet verhoogt. Experimentele bewijzen ondersteunen ten minste 2 verschillende mechanismes waardoor intracellulaire ADPR geproduceerd is bij oxidatieve stress: één gemedieerd door poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) en de andere door productie van ADPR in de mitochondria door een β -NAD breakdown [115, 116]. Uiteindelijk is het ook mogelijk dat verhoging van $[Ca^{2+}]_i$ opgewekt door oxidatieve stress simpelweg de ADPR-gemedieerde activatie van TRPM2 verbetert zonder enige toegevoegde productie van ADPR [111]. Zoals het dikwijls het geval is, bestaat in situ omstandigheden, waaronder celtype-specifieke metabolische factoren dicteren welk pad of welke paden gerekruteerd zijn, en het is hoogst waarschijnlijk dat méér dan één operationeel is in een gegeven situatie. Bijvoorbeeld, PARP enzymatische activiteit en β -NAD breakdown zou simultaan kunnen gebeuren, waardoor de cytoplasmische ADPR niveaus verhogen. Tezelfdertijd, verbetert de stijging van $[Ca^{2+}]_i$ opgewekt door oxidatieve stress, de ADPR gemedieerde activatie van TRPM2 kanalen. Als deze paden zouden kunnen bijdragen aan het

creëren van een situatie waar een langdurige Ca^{2+} influx voorkomt.

TRPM2 is doorlaatbaar voor Na^+ en andere kationen

We moeten echter onthouden, dat TRPM2 kation non-selectief is, en dat andere ionen (aangedreven door hun eigen elektrochemische drijfkraft) het kanaal langs Ca^{2+} doorlaten. Aanvoerend is Na^+ . De impact van massieve Na^+ influx door TRPM2 is niet voorzichtig geschat, maar men kan vooruitzien dat het navolgen van membraan depolarisatie een significant effect zal uitoefenen vooral in cellen zoals neuronen en pancreatische β -cellen. Plotse grote veranderingen in cytoplasmische Ca^{2+} en Na^+ niveaus na TRPM2 activatie zouden ernstig schadelijk kunnen zijn voor een goede mitochondriale functie. Een van deze functies – buffering van pathofysiologische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stijgingen, zoals die geëvokeerd door oxidatieve stress, zou bepaald vatbaar kunnen zijn omdat het gedeeltelijk afhankelijk is van een $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in de mitochondriale binnenste membranen [117]. Verstoring in de exchanger functie zou ionische homeostase kunnen aantasten in de mitochondria, zo mitochondriale zwelling veroorzakend en andere tegengestelde effecten, waaronder het verminderen van het half)leven van mitochondriaal geëncodeerde RNA [96, 118]. Mitochondriale zwelling is een vroeg preklinische eigenschap in neurodegeneratieve ziektes, waaronder ALS [119]. Wat deze thesis sterk ondersteunt, is de recente demonstratie die hersen- en ruggenmerg mitochondria in twee familiale ALS (SOD1) muis modellen vertoonde met verminderde Ca^{2+} buffering capaciteit. Belangrijk is, dat deze vermindering zich zeer vroeg in het verloop van de ziekte voordeed vóór het begin van de symptomen [120].

TRPM2 kanalen zijn kation nonselectief en zouden daarom transitie metalen kunnen geleiden, boven Na^+ en Ca^{2+} . Inderdaad, Mn^{2+} permeatie werd gedemonstreerd gedurende fura-2 quench experimenten [90]. We hebben recentelijk studies afgewerkt waar we de zink-specifieke kleurstof, FluoZin-3 gebruikten, om Zn^{2+} influx te demonstreren door TRPM2 (R. Go, C. Shetler, S. Thompson en M. Hermosura, ongepubliceerde data). Het resultaat dat TRPM2 permeatie zou kunnen toelaten van Mn^{2+} en Zn^{2+} is vooral significant wanneer het bekeken wordt in de context van de mogelijke rol van TRPM2 in neurodegeneratie omdat de abnormale accumulatie van deze metalen geassocieerd wordt met neuropathology [121]. Een seminaal verslag over ALS/Pd rapporteerde dat de Mn^{2+} inhoud in het ruggenmerg 10 tot 20 keer hoger was bij ALS patiënten dan in proefobjecten. [13]. De abnormale cellulaire accumulatie van Zn^{2+} is gelinkt aan acute

neuronale schade door ischemie en epilepsie, alsook met pathologische veranderingen in neurodegeneratieve ziektes [122]. Een recente herwaardering van metaal accumulatie in ALS/PD rapporteerde significant verhoogde Zn^{2+} niveaus in de PD hersenstalen [123]. Gewijzigde metaal homeostase is ook beschreven in sporadische alsook familiere ALS [124, 125]. De juiste regeling van metaal homeostase vertrouwt op een delicaat evenwicht tussen influx, sekwestratie door cellulaire buffer systemen, en transport buiten de cel. Transitie metalen zijn redox-actief, bekwaam om vrije radicale formatie te stimuleren en aldus de cellulaire oxidatieve stress te verhogen. Daarom creëren transitie metalen die door TRPM2 binnenkomen (en andere influx paden), omstandigheden gunstig voor meer TRPM2 activatie, verder het evenwicht kantelend ten voordele van ion influx dat gedomineerd wordt door de fysiologische abundante Ca^{2+} en Na^{+} ionen. De verhoging in gevolgschade in cytoplasmische Ca^{2+} en Na^{+} niveaus zou mitochondria kunnen leiden tot het genereren van meer ROS, aldus een vicieuze cirkel creëren die de protectieve machinerie van de cellen zouden kunnen overweldigen.

Mitochondriale Dysfunctie in ALS

We hebben gezien dat ten gevolge van zijn activatie, dat TRPM2 de goede werking van het mitochondria kan aantasten. Mitochondriale dysfunctie werd gerapporteerd als een potentiële bijdragende factor in sporadische en familiere ALS [118-120, 126-129]. Jammer genoeg, werd dit onderwerp niet vroeger onderzocht in connectie met Westerse Zuidzee ALS/PD, behalve voor één vermelding van een mogelijk complex I tekort [130] en rapporten van de degenererende mitochondria in ultrastructuur studies op hersensecties van autopsie stalen en dierlijke modellen die een laag Ca^{2+} en Mg^{2+} dieet gevoed kregen [22-27]. Het lijkt erop dat de mitochondria van hersenen en van het ruggenmerg bijzonder vatbaar zijn voor het ziekteproces in ALS. In SOD1 modellen van ALS, was enkel verminderde Ca^{2+} buffering capaciteit gedetecteerd in de hersenen en het ruggenmerg, niet in lever mitochondria [120]. Mogelijke redenen voor de ongewone gevoeligheid van mitochondria van het ruggenmerg, zijn hun significant lagere drempels voor Ca^{2+} -opgewekte verandering in mitochondriale permeabiliteit transitie (MPT), verhoogde vatbaarheid aan lipide peroxidatie, verminderde mitochondriale mRNA niveaus en significant hogere niveaus van geoxideerde mitochondriale DNA [131].

Somatische mutaties zouden significant kunnen bijdragen aan

mitochondriale dysfunctie. Mitochondriale DNA (mtDNA) is een 16.5-kb circulair genoom dat 13 proteïnen van de ademhalingsketting encodeert en 22 tRNAs. Het ontbreekt aan beschermende histons en is daarom vatbaarder voor oxidatieve schade dan nucleaire DNA. De hoge oxidatieve status in dit organel wordt verwacht om zwaar meerdere mutaties te favoriseren. Verhoogde frequenties van mtDNA mutaties werd gerapporteerd in sporadische ALS en andere neurodegeneratieve ziektes [118, 127, 132]. Het werd voorgesteld dat deze mutaties de complexe IV activiteit van het elektron transport ketting (ETC) verminderen. MtDNA van ALS subjecten doorgezet naar mtDNA-verbruikte menselijke neuroblastoma cellen, veroorzaakte abnormale ETC functie, verstoorde Ca^{2+} homeostase, en wijzigingen in de mitochondriale structuur [133]. We hebben recent mtDNA samengetrokken van ALS/OD en vonden somatische mutaties in het lichte strand promotor (LSP) regio in mitochondriale DNA of hersenweefsel van zowel PD [134] als ALS patiënten [R. Garruto et al., ongepubliceerde data]. De LSP oefent invloed uit op de regulatoire controle over mitochondriale transcriptie en replicatie. Zijn cruciale rol in het onderhoud van de stabiliteit van de mitochondriale genomen impliceert dat de mutaties in de LSP schadelijk zouden kunnen zijn voor goede mitochondriale functies.

Het wordt voorgesteld dat mitochondria zouden kunnen ageren als zowel doel en trigger in sporadische en familiale ALS [135]. De schijnbaar functionele connectie tussen TRPM2 en mitochondria, ondersteunt deze suggestie. Plotse verhoging in cytoplasmische Ca^{2+} en Na^{+} gemedieerd door TRPM2 die routinematig zou kunnen behandeld worden door normaal functionerende mitochondria zou schadelijk kunnen zijn voor mitochondria waar somatische mutaties dysfunctionele ETC activiteiten veroorzaakt hebben, of waar lipide peroxidatie het membraan integriteit heeft aangetast, daardoor het organel veel minder bekwaam maken in het behandelen van ion onevenwichtigheid. Het is mogelijk dat hogere niveaus van ROS geproduceerd worden in deze situaties, zo persistente TRPM2 activatie veroorzakend, en langdurige massieve Ca^{2+} en Na^{+} influx, die het cellulaire buffering systeem zou kunnen overweldigen. De zelf-onderhoudende cyclus van oxidatieve stress, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhogingen, verhoogde ROS, en verhoogde TRPM2 activatie, zou verantwoordelijk kunnen zijn voor het genereren van langdurige Ca^{2+} influx. In de aanwezigheid van dysfunctionele mitochondria met verminderde Ca^{2+} buffering capaciteiten, abnormaal hoge Ca^{2+} zal accumuleren. Deze serie van

gebeurtenissen kan de abnormale accumulatie van Ca^{2+} geobserveerd in het cytoplasma en mitochondria in de hersenen en ruggenmergweefsels in ALS/PD beïnvloeden, en de andere klinikale varianten van ALS [19, 23, 136]. Motor neuronen zijn uiterst gevoelig aan Ca^{2+} overload door een lage cytosolische Ca^{2+} buffering capaciteit [119, 137]. Het is daarom raadzaam om aan te nemen dat oxidatieve stress en persistente activatie van TRPM2 kanalen in motor neuronen, uiterst schadelijk zal zijn. De recente demonstratie dat L-BMAA-opgewekte cytotoxische effecten, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhogingen, en ROS productie waren substantieel groter in motor dan in andere spinale neuronen, ondersteunt sterk deze hypothese [44]. Belangrijk is het resultaat dat L-BMAA een substantiële $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhoging veroorzaakte en ROS productie in motor neuronen, gunstige condities voor TRPM2 activatie, suggereert een mogelijke rol voor TRPM2 in L- BMAA gemedieerde neurotoxiciteit. TRPM2 functie in motor neuronen, vooral in de aanwezigheid van L-BMAA en andere oxidatieve stressors, is een uiterst belangrijk onderwerp voor toekomstig onderzoek..

Immuun betrokkenheid in ALS: TRPM2 in Microglia

Er is een stijgend bewijs dat de degeneratie en dood van motor neuronen in sporadische en familiale ALS niet gelimiteerd is tot pathogene processen in de neuronen zelf, maar dat er een immuun component betrokken is, bijgedragen door buurcellen, vooral microglia, de residente immunocompetente cellen in de CNS [138-144]. Microglia levert vroege respons naar hersenschade door het vrijlaten van proinflammatoire cytokines en toxische factoren zoals nitric oxide (NO), H_2O_2 , en ROS. Geactiveerde microglia zijn fagocytair, bezitten uitgebreide migratoire vermogens en zijn geobserveerd in het ventrale hoorn van het ruggenmerg van ALS patiënten [145]. Microgliale activiteit was niet onderzocht in connectie met ALS/PD uit de Westerse Zuidzee, hoewel schade in humorale en cellulaire immuniteit gerapporteerd waren [146, 147]. TRPM2 is in hoge mate aanwezig in microglia en nog belangrijker, wordt het voorgesteld dat TRPM2 betrokken is in microgliale activatie gedurende oxidatieve stress [104]. In afwezigheid van informatie over microgliale activatie in ALS/PD, zullen we bespreken wat er gekend is over dit onderwerp in familiale en sporadische ALS.

Studies in sporadische ALS en in muismodellen van familiale ALS

Suggereren dat immuunevents voorkomen in een zeer vroeg stadium in het ziekteproces. Microgiale proliferatie en activatie bleek voort te gaan en bij te dragen aan neuronale dood [141]. Proinflammatoire factoren, vermoedelijk afgescheiden door microglia, werden opgemerkt in een vroeg stadium, wanneer geen ander motor neuron verlies al gebeurd was. Cerebrospinale vloeistof (CSF) in sporadische en familiale ALS bevat cytotoxische factoren [142], waaronder 4-hydroxynonenal (4-HNE), een reactieve aldehyde bijproduct van lipide peroxidatie [143]. Het wordt hoe langer hoe meer duidelijk dat interacties tussen motor neuron en omliggende gliale cellen integraal zijn voor ALS pathogenese [138-140, 148-150]. Bijvoorbeeld, een studie die het G93A SOD1 model van familiale ALS rapporteert dat de ziekte alleen gevolgschade geeft wanneer de mutatie voorkomt in zowel menselijke glioblastoma en neuroblastoma cellen, niet wanneer het voorkomen beperkt was tot eender welk celtype [148]. Een andere studie gebruikte een celcultuur systeem om motor neuron toxiciteit aan te tonen opgewekt door lipopolysaccharide (LPS)-geactiveerde microglia [149]. Toxiciteit leek veroorzaakt door microglaal-opgewekte oxidatieve/nitratieve stress die een Ca^{2+} influx pad activeert, omdat het verhinderd was door een microgiale opwekbare nitriet oxide synthase (iNOS) inhibitor, de verwijdering van extracellulaire Ca^{2+} , of door de toevoeging van catalase of glutathione. Uiteindelijk werd definitieve betrokkenheid van microglia in het ziekteproces van familiale ALS aangetoond door het gebruik van transgenische muizen met verwijderbare mutante SOD1 [139]. 'Het naar beneden brengen van' mutante SOD1 expressie in motor neuron vertraagde het startpunt van de ziekte en een vroege progressie aanzienlijk. Het gebruik van dezelfde manipulatie voor microglia taster het startpunt van de ziekte niet aan, maar vertraagde later aanzienlijk de progressie van de ziekte, en verlengde de algemene overlevingstijd, was suggereerde dat microglia met mutante SOD1 het ziekteproces accelereert.

Microgiale activatie is gemedieerd door verhogingen in cytoplasmische Ca^{2+} afkomstig van intracellulaire bronnen en van de extracellulaire omgeving [104, 151]. TRPM2 kanalen toonden dat ze significant bijdragen aan het laatste. Belangrijks is dat TRPM2 in geactiveerde microglia de verhoogde gevoeligheid aan H_2O_2 [104] vertoonden. Geactiveerde microglia, daarentegen, proceduren zelf H_2O_2 (een proces dat ademhalingsvlaag noemt). Daarom zal de verhoogde gevoeligheid van TRPM2 aan H_2O_2 in geactiveerde microglia waarschijnlijk dienen als een positief feedback signaal, zo de TRPM2 activatie nog meer promotend, en

langdurige Ca^{2+} en Na^+ influx – condities die microglia in een verlengde geactiveerde staat kunnen houden. Zo een voorkomen zal oxidatieve stress genereren in buurneuronen en glia. Het gecombineerde effect van oxidatieve stress, en vervolgens TRPM2 activatie, en drastische verhoging van cellulaire Ca^{2+} en Na^+ niveaus zal voornamelijk schadelijk zijn voor motor neuronen door hun onvermogen om enorme cytoplasmische Ca^{2+} veranderingen te bufferen. Abnormale Ca^{2+} accumulatie in motor zenuw terminals in ALS verleent steun aan dit mogelijke scenario [152] en aan de hypothese dat verhoogde intracellulaire Ca^{2+} getriggered door immuun mechanismes betrokken is in motor neuron celdood in ALS [153]. Dichte populaties van microglia zijn gerapporteerd aanwezig in de hippocampus, olfactorius telencephalon, basale ganglia en substantia nigra [154]. De redenering volgen die hierboven gepresenteerd werd, kunnen we veronderstellen dat deze hersenregio's vatbaarder zijn voor schade door het verlengde microgliale activatie. Het selectieve verlies van nigrale cellen na verlengde blootstelling aan lage Mg^{2+} ondersteunt deze mogelijkheid [27]. Verhoogde oxidatieve stress en NF- κ B activatie aangebracht door lage Mg^{2+} zou persistente microgliale activatie en nigrale celdood kunnen veroorzaken.

Het is zeker waarschijnlijk dat andere Ca^{2+} influx paden zoals AMPA/Kainate en glutamate receptoren ook betrokken zijn. Hoewel, de directe relatie evident in de 'microglia-oxidatieve stress – motor neuron TRPM2 - Ca^{2+} influx pathway' een waarschijnlijke hypothese lijkt te zijn voor het uitleggen van de relatie tussen microglia en motor neuronen en immuun betrokkenheid in de pathogenese van ALS [155, 156].

Andere intrigerende aanwijzingen naar TRPM2 betrokkenheid in ALS/PD

β -amyloide peptides

Deze peptiden zijn gelinkt aan de etiologie van AD en werden ook gevonden in ALS/PD. Een recente studie rapporteerde dat β -amyloide activiteit gemedieerd is door TRPM2 kanalen [111].

Diabetische perifere neuropathie in ALS/PD en de rol van PARP activatie

In 1997, werd een mogelijke relatie tussen diabetes mellitus en ALS/PD in Guam opgemerkt [130]. Een studie gepubliceerd in 1999 rapporteerde dat perifere neuropathie een manifestatie zou kunnen zijn van ALS/PD uit Guama [157]. De activatie van poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) werd recent geïdentificeerd als een belangrijk mechanisme dat achter perifere diabetische neuropathie zit [158]. PARP actie werd ook geïdentificeerd als één

van de belangrijke paden waarbij oxidatieve stress TRPM2 kanalen activeert [115] zo suggererend dat Ca^{2+} influx via TRPM2 betrokken zou kunnen zijn in perifere diabetische neuropathie. Belangrijk is, dat deze resultaten sterk de suggestie ondersteunen dat ALS/PD uit Guam een multisysteem ziekte is met een subklinische betrokkenheid van het perifere zenuwstelsel en dat ongeregelde TRPM2 activatie, misschien door hoge oxidatieve stress, een sleutel etiologische factor zou kunnen zijn.

TRPM2 mutanten in ALS/PD

Sequentie analyse van TRPM2 ontsluitte de aanwezigheid van 3 varianten geassocieerd met ALS/PD. De resultaten worden geschreven voor publicatie en zullen niet in dit verslag behandeld worden.

Samenvatting

Grote inspanning en gigantische resources zijn toegewijd aan de studie van Westerse Zuidzee ALS/PD. De substantiële hoeveelheid aan neuropathologische, klinische en epidemiologische data gegenereerd over de jaren heen, vertegenwoordigt een schatkist aan nuttige informatie en aanwijzingen die geanalyseerd en geïnterpreteerd zouden kunnen worden samenlopend met meer recente studies over sporadische en familiale ALS. Het wordt algemeen aangenomen dat de verschillende klinische varianten van ALS, waarschijnlijk gelijkaardige moleculaire pathogenische mechanismes delen, en dat van deze, de superioriteit van bewijs de betrokkenheid bewijst van oxidatieve stress, mitochondriale dysfunctie, afwijkende Ca^{2+} homeostase, en immuun mechanismes, vooral gemedieerd door geactiveerde microglia.

Krachtens hun activatie en permeatie eigenschappen en het feit dat ze voorkomen in motor neuronen en microgliale cellen, stellen we *TRPM7* en *TRPM2* voor als kandidaat ontvankelijkheid genen in ALS/PD, en misschien ook voor sporadische ALS. *TRPM7* en *TRPM2* kanaal activiteiten zijn intergeconnecteerd met de belangrijke factoren verdacht van betrokkenheid in deze ziektes – afwijkende Ca^{2+} en Mg^{2+} homeostase, mitochondriale dysfunctie, oxidatieve stress, en inflammatoire antwoorden. Het kan daarom gehypothekeerd worden dat genetische varianten van deze kanalen sommige of alle van de verdachte mechanismes kan aantasten, en aldus bijdragen aan het ziekteproces. Terwijl er zekere conjecturen en veronderstellingen zijn gebaseerd op middellijk bewijs, hopen we toch dat we twee veelbelovende doelen geïdentificeerd hebben

voor verder onderzoek.

Dankwoorden

We bedanken Cory M. Shetler en R. C. V. Go (University of Hawaii) voor de assistentie in het voorbereiden van dit manuscript. M.H. is gesteund door S11 NS043462.

Referenties

1. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:1046–57. [[PubMed](#)]
2. Rowland LP. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 2001;344:1688–700. [[PubMed](#)]
3. Mitchel JD. Amyotrophic lateral sclerosis: toxins and environment. *ALS and other motor neuron disorders*. 2000;1:235–250. [[PubMed](#)]
4. Elizan TS, Hirano A, Abrams BM, Need RL, Van Nuis C, Kurland LT. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam. Neurological reevaluation. *Arch Neurol*. 1966;14:356–68. [[PubMed](#)]
5. Gajdusek DC, Salazar AM. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology*. 1982;32:107–26. [[PubMed](#)]
6. Kimura K, Yase Y, Higashi Y, Une S, Yamamoto K, Iwasaki M, Tsumoto I, Sugiura M, Yoshimura S, Namikawa K, Kumura J, Iwamoto S, Yamamoto I, Handa Y, Yata M, Yata Y. Epidemiological and geomedical studies on amyotrophic lateral sclerosis. *Dis Nerv Syst*. 1963;14:155–159.
7. Kurland LT, Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 1. Preliminary report on geographic distributions, with special referesce to the Marianas Islands, including clinical and ptholofical observations. *Neurology*. 1954;4:355–378. 438–448. [[PubMed](#)]
8. Hirano A, Kurland LT, Krooth RS, Lessell S. Parkinsonism-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. I. Clinical features. *Brain*. 1961;84:642–61. [[PubMed](#)]
9. Hirano A, Malamud N, Kurland LT. Parkinsonism-dementia complex, an endemic

disease on the island of Guam. II. Pathological features. *Brain*. 1961;84:662–79.

[[PubMed](#)]

10.

Rodgers-Johnson P, Garruto RM, Yanagihara R, Chen K-M, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam: a 30 year evaluation of clinical and neuropathological trends. *Neurology*. 1986;36:7–13.

[[PubMed](#)]

11.

Matsumoto S, Hirano A, Goto S. Spinal cord neurofibrillary tangles of Guamanian amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex: an immunohistochemical study. *Neurology*. 1990;40:975–9. [[PubMed](#)]

12.

Garruto RM. A commentary on neuronal degeneration and cell death in Guam ALS and PD: an evolutionary process of understanding. *Curr Alzheimer Res*. 2006;3:397–401. [[PubMed](#)]

13.

Yase Y. The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 1972;2:292–6.

[[PubMed](#)]

14.

Garruto RM, Y R, Gajdusek DC, Arion DM. Concentrations of Heavy Metals and Essential Minerals in Garden Soil and Drinking Water in the Western Pacific. *Amyotrophic Lateral Sclerosis in Asia and Oceania*. 1984:265–330.

15.

Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science*. 1987;237:517–22. [[PubMed](#)]

16.

Whiting MG. Food practices in ALS foci in Japan, the Marianas and New Guinea. *Fed Proc*. 1964;23:1343–1345. [[PubMed](#)]

17.

Yanagihara R, Garruto RM, Gajdusek DC, Tomita A, Uchikawa T, Konagaya Y, Chen KM, Sobue I, Plato CC, Gibbs CJ Jr. Calcium and vitamin D metabolism in Guamanian Chamorros with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia. *Ann Neurol*. 1984;15:42–8. [[PubMed](#)]

18.

Garruto RM, Plato CC, Yanagihara R, Fox K, Dutt J, Gajdusek DC, Tobin J. Bone mass in Guamanian patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia. *Am J Phys Anthropol*. 1989;80:107–13. [[PubMed](#)]

19.

Garruto RM, Fukatsu R, Yanagihara R, Gajdusek DC, Hook G, Fiori CE. Imaging of calcium and aluminum in neurofibrillary tangle-bearing neurons in parkinsonism-

- dementia of Guam. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:1875–1879. [[PubMed](#)]
20. Garruto RM, Swyt C, Yanagihara R, Fiori CE, Gadjusek DC. Intraneuronal co-localization of silicon with calcium and aluminum in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism with dementia of Guam. *N Engl J Med*. 1986;315:711–2. [[PubMed](#)]
21. Perl DP, Gadjusek DC, Garruto RM, Yanagihara RT, Gibbs CJ Jr. Intraneuronal aluminum accumulation in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Science*. 1982;1:1028.
22. Yasui M, Ota K, Garruto RM. Concentration of zinc and iron in the brains of Guamanian patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia. *Neurotoxicology*. 1993;14:445–450. [[PubMed](#)]
23. Yasui M, Yase Y, Kihira T, Adachi K, Suzuki Y. Magnesium and calcium contents in CNS tissues of amyotrophic lateral sclerosis patients from the Kii peninsula, Japan. *Eur Neurol*. 1992;32:95–8. [[PubMed](#)]
24. Garruto RM, Shankar SK, Yanagihara R, Salazar AM, Amyx HL, Gadjusek DC. Low-calcium, high-aluminum diet-induced motor neuron pathology in cynomolgus monkeys. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1989;78:210–9. [[PubMed](#)]
25. Yasui M, Yano I, Yase Y, Ota K. Distribution of magnesium in central nervous system tissue, trabecular and cortical bone in rats fed with unbalanced diets of minerals. *J Neurol Sci*. 1990;99:177–83. [[PubMed](#)]
26. Yasui M, Ota K, Yoshida M. Effects of low calcium and magnesium dietary intake on the central nervous system tissues of rats and calcium-magnesium related disorders in the amyotrophic lateral sclerosis focus in the Kii Peninsula of Japan. *Magnes Res*. 1997;10:39–50. [[PubMed](#)]
27. Oyanagi K, Kawakami E, Kikuchi-Horie K, Ohara K, Ogata K, Takahama S, Wada M, Kihira T, Yasui M. Magnesium deficiency over generations in rats with special references to the pathogenesis of the Parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *Neuropathology*. 2006;26:115–28. [[PubMed](#)]
28. Weiss JH, Koh JY, Choi DW. Neurotoxicity of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and beta-N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res*. 1989;497:64–71. [[PubMed](#)]
- 29.

- Staton PC, Bristow DR. The dietary excitotoxins beta-N-methylamino-L-alanine and beta-N-oxalylamino-L-alanine induce necrotic- and apoptotic-like death of rat cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 1997;69:1508–18. [[PubMed](#)]
- 30.
- Duncan MW, Kopin IJ, Garruto RM, Lavine L, Markey SP. 2-amino-3 (methlyamino)-propionic acid in cycad-derived foods is an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism. *Lancet.* 1988;2:631–632. [[PubMed](#)]
- 31.
- Garruto RM, Yanagihara R, Gajdusek DC. Cycads and amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia. *Lancet.* 1988;2:1079. [[PubMed](#)]
- 32.
- Weiss JH, Christine CW, Choi DW. Bicarbonate dependence of glutamate receptor activation by beta-N-methylamino-L-alanine: channel recording and study with related compounds. *Neuron.* 1989;3:321–6. [[PubMed](#)]
- 33.
- Ross SM, Seelig M, Spencer PS. Specific antagonism of excitotoxic action of ‘uncommon’ amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res.* 1987;425:120–7. [[PubMed](#)]
- 34.
- Copani A, Canonico PL, Nicoletti F. Beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a potent agonist of ‘metabotropic’ glutamate receptors. *Eur J Pharmacol.* 1990;181:327–8. [[PubMed](#)]
- 35.
- Copani AP, Canonico L, Catania MV, Aronica E, Bruno V, Ratti E, van Amsterdam FT, Gaviraghi G, Nicoletti F. Interaction between beta-N-methylamino-L-alanine and excitatory amino acid receptors in brain slices and neuronal cultures. *Brain Res.* 1991;558:79–86. [[PubMed](#)]
- 36.
- Manzoni OJ, Prezeau L, Bockaert J. beta-N-methylamino-L-alanine is a low-affinity agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport.* 1991;29:609–11. [[PubMed](#)]
- 37.
- Weiss JH, Choi DW. Slow non-NMDA receptor mediated neurotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol.* 1991;56:311–8. [[PubMed](#)]
- 38.
- Allen CN, Spencer PS, Carpenter DO. Beta-N-methylamino-L-alanine in the presence of bicarbonate is an agonist at non-N-methyl-D-aspartate-type receptors. *Neuroscience.* 1993;54:567–74. [[PubMed](#)]
- 39.
- Brownson DM, Mabry TJ, Leslie SW. The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated

- rat brain cells. *J Ethnopharmacol.* 2002;82:159–67. [[PubMed](#)]
- 40.
- Bochet P, Audinat E, Lambolez B, Crepel F, Rossier J, Iino M, Tsuzuki K, Ozawa S. Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron.* 1994;12:383–8. [[PubMed](#)]
- 41.
- Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H. Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron.* 1994;12:1281–9. [[PubMed](#)]
- 42.
- Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci.* 1996;16:4069–79. [[PubMed](#)]
- 43.
- Murch SJ, J S, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:12228–31. [[PubMed](#)]
- 44.
- Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol.* 2006;201:244–52. [[PubMed](#)]
- 45.
- Montine TJ, Li K, Perl DP, Galasko D. Lack of beta-methylamino-l-alanine in brain from controls, AD, or Chamorro with PDC. *Neurology.* 2005;65:768–9. [[PubMed](#)]
- 46.
- Kaneko S, Kawakami S, Hara Y, Wakamori M, Itoh E, Minami T, Takada Y, Kume T, Katsuki H, Mori Y, Akaike A. A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci.* 2006;101:66–76. [[PubMed](#)]
- 47.
- Smith MA, Herson PS, Lee K, Pinnock RD, Ashford ML. Hydrogen-peroxide-induced toxicity of rat striatal neurones involves activation of a non-selective cation channel. *J Physiol.* 2003;547:417–25. [[PubMed](#)]
- 48.
- Plato CC, Reed DM, Elizan TS, Kurland LT. Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. IV. Familial and genetic investigations. *Am J Hum Gene.* 1967;19:617–632.
- 49.
- Garruto RM. Pacific paradigms of environmentally-induced neurological disorders: clinical, epidemiological and molecular perspectives. *Neurotoxicology.* 1991;12:347–77. [[PubMed](#)]
- 50.

- Plato CC, Garruto RM, Fox KM, Gajdusek DC. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam: a 25-year prospective case-control study. *Am J Epidemiol.* 1986;124:643–56. [[PubMed](#)]
- 51.
- Plato CC, Galasko D, Garruto RM, Plato M, Gamst A, Craig UK, Torres JM, Wiederholt W. ALS and PDC of Guam: forty-year follow-up. *Neurology.* 2002;58:765–73. [[PubMed](#)]
- 52.
- Garruto RM, Yanagihara R, Gajdusek DC. Disappearance of high-incidence amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam. *Neurology.* 1985;35:193–198. [[PubMed](#)]
- 53.
- Plato CC, Garruto RM, Galasko D, Craig UK, Plato M, Gamst A, Torres JM, Wiederholt W. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years. *Am J Epidemiol.* 2003;157:149–57. [[PubMed](#)]
- 54.
- Bailey-Wilson JE, Plato CC, Elston RC, Garruto RM. Potential role of an additive genetic component in the cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the western Pacific. *Am J Med Genet.* 1993;45:68–76. [[PubMed](#)]
- 55.
- Figlewicz DA, Garruto RM, Krizus A, Yanagihara R, Rouleau GA. The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. *Neuroreport.* 1994;5:557–60. [[PubMed](#)]
- 56.
- Perez-Tur J, Buee L, Morris HR, Waring SC, Onstead L, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, Buee-Scherrer V, Hof PR, Petersen RC, McGeer PL, Delacourte A, Hutton M, Siddique T, Ahlskog JE, Hardy J, Steele JC. Neurodegenerative diseases of Guam: analysis of TAU. *Neurology.* 1999;53:411–3. [[PubMed](#)]
- 57.
- Poorkaj P, Tsuang D, Wijsman E, Steinbart E, Garruto RM, Craig UK, Chapman NH, Anderson L, Bird TD, Plato CC, Perl DP, Wiederholt W, Galasko D, Schellenberg GD. TAU as a susceptibility gene for amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex of Guam. *Arch Neurol.* 2001;58:1871–8. [[PubMed](#)]
- 58.
- Chen X, Xia Y, Gresham LS, Molgaard CA, Thomas RG, Galasko D, Wiederholt WC, Saitoh T. ApoE and CYP2D6 polymorphism with and without parkinsonism-dementia complex in the people of Chamorro, guam. *Neurology.* 1996;47:779–84. [[PubMed](#)]
- 59.
- Altura BM, Gebrewold A, Zhang A, Altura BT. Low intracellular magnesium ions

- induce lipid peroxidation and activation of nuclear factor-kappa B in canine cerebral vascular smooth muscle: possible relation to traumatic brain injury and strokes. *Neurosci Lett.* 2003;341:189–192. [[PubMed](#)]
- 60.
- Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem.* 2001;8:721–38. [[PubMed](#)]
- 61.
- Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, Nijhawan D, Ahmad A, Yang Y, Rimmler J, Hung W, Schlotter B, Ahmed A, Ben Hamida M, Hentati F, Siddique T. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics.* 1998;2:55–60. [[PubMed](#)]
- 62.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362:59–62. [[PubMed](#)]
- 63.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A. LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature.* 2001;411:590–5. [[PubMed](#)]
- 64.
- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol.* 2003;121:49–60. [[PubMed](#)]
- 65.
- Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurosaki T, Fleig A, Scharenberg AM. Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell.* 2003;114:191–200. [[PubMed](#)]
- 66.
- He Y, Yao G, Savoia C, Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. *Circ Res.* 2005;96:207–15. [[PubMed](#)]
- 67.
- Hanano T, Hara Y, Shi J, Morita H, Umebayashi C, Mori E, Sumimoto H, Ito Y, Mori Y, Inoue R. Involvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously activated Ca²⁺ entry pathway in human retinoblastoma cells. *J Pharmacol Sci.* 2004;95:403–19. [[PubMed](#)]
- 68.
- Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF, Tymianski M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell.*

- 2003;115:863–77. [[PubMed](#)]
69.
Elizondo MR, Arduini BL, Paulsen J, MacDonald EL, Sabel JL, Henion PD, Cornell RA, Parichy DM. Defective skeletogenesis with kidney stone formation in dwarf zebrafish mutant for *trpm7*. *Curr Biol*. 2005;15:667–71. [[PubMed](#)]
70.
Oancea E, Wolfe JT, Clapham DE. Functional TRPM7 Channels Accumulate at the Plasma Membrane in Response to Fluid Flow. *Circ Res*. 2005;98:245–253. [[PubMed](#)]
71.
Krapivinsky G, Mochida S, Krapivinsky L, Cibulsky SM, Clapham DE. The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release. *Neuron*. 2006;52:485–96. [[PubMed](#)]
72.
Clark K, Langeslag M, van Leeuwen B, Ran L, Ryazanov AG, Figdor CG, Moolenaar WH, Jalink K, van Leeuwen FN. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *Embo J*. 2006;25:290–301. [[PubMed](#)]
73.
Landman N, Jeong SY, Shin SY, Voronov SV, Serban G, Kang MS, Park MK, Di Paolo G, Chung S, Kim T-W. Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's Disease cause an imbalance in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:19524–9. [[PubMed](#)]
74.
Montell C. Mg²⁺ homeostasis: the Mg²⁺-sensitive TRPM channels. *Curr Biol*. 2003;13:R799–801. [[PubMed](#)]
75.
Ryazanov AG, Pavur KS, Dorovkov MV. Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr Biol*. 1999;9:R43–45. [[PubMed](#)]
76.
Pinna LA, Ruzzene M. How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim Biophys Acta*. 1996;1314:191–225. [[PubMed](#)]
77.
Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*. 2001;291:1043–1047. [[PubMed](#)]
78.
Schmitz C, Dorovkov MV, Zhao X, Davenport BJ, Ryazanov AG, Perraud AL. The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. *J Biol Chem*. 2005;280:37763–71. [[PubMed](#)]
79.
Matsushita M, Kozak JA, Shimizu Y, McLachlin DT, Yamaguchi H, Wei FY, Tomizawa K, Matsui H, Chait BT, Cahalan MD, Nairn AC. Channel function is

- dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *J Biol Chem.* 2005;280:20793–803. [[PubMed](#)]
- 80.
- Dorovkov MV, Ryazanov AG. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J Biol Chem.* 2004;279:50643–6. [[PubMed](#)]
- 81.
- Hermosura MC, Monteilh-Zoller MK, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. Dissociation of the store-operated calcium current I(CRAC) and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current MagNuM. *J Physiol.* 2002;539:445–58. [[PubMed](#)]
- 82.
- Prakriya M, Lewis RS. Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg²⁺-inhibited cation (MIC) channels. *J Gen Physiol.* 2002;119:487–507. [[PubMed](#)]
- 83.
- Kozak JA, Matsushita M, Nairn AC, Cahalan MD. Charge screening by internal pH and polyvalent cations as a mechanism for activation, inhibition, and rundown of TRPM7/MIC channels. *J Gen Physiol.* 2005;126:499–514. [[PubMed](#)]
- 84.
- Jiang J, Li M, Yue L. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J Gen Physiol.* 2005;126:137–50. [[PubMed](#)]
- 85.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol.* 2002;4:329–36. [[PubMed](#)]
- 86.
- Takezawa R, Schmitz C, Demeuse P, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:6009–14. [[PubMed](#)]
- 87.
- Kozak JA, Cahalan MD. MIC channels are inhibited by internal divalent cations but not ATP. *Biophys J.* 2003;84:922–7. [[PubMed](#)]
- 88.
- Langeslag M, Clark K, Moolenaar WH, van Leeuwen FN, Jalink K. Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists. *J Biol Chem.* 2007;282:232–9. [[PubMed](#)]
- 89.
- Kerschbaum HH, Kozak JA, Cahalan MD. Polyvalent cations as permeant probes of MIC and TRPM7 pores. *Biophys J.* 2003;84:2293–305. [[PubMed](#)]
- 90.
- Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers

- susceptibility to cell death. *Mol Cell*. 2002;9:163–73. [[PubMed](#)]
- 91.
- Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem*. 2002;277:23150–6. [[PubMed](#)]
- 92.
- Martinez-Sanchez M, Striggow F, Schroder UH, Kahlert S, Reymann KG, Reiser G. Na⁺ and Ca²⁺ homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience*. 2004;128:729–40. [[PubMed](#)]
- 93.
- Hermosura MC, Nayakanti H, Dorovkov MV, Calderon FR, Ryazanov AG, Haymer DS, Garruto RM. A TRPM7 variant shows altered sensitivity to magnesium that may contribute to the pathogenesis of two Guamanian neurodegenerative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11510–5. [[PubMed](#)]
- 94.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci*. 2000;20:2534–42. [[PubMed](#)]
- 95.
- Pinter MJ, Waldeck RF, Wallace N, Cork LC. Motor unit behavior in canine motor neuron disease. *J Neurosci*. 1995;15:3447–57. [[PubMed](#)]
- 96.
- Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *Febs J*. 2006;273:433–50. [[PubMed](#)]
- 97.
- Petrault I, Zimowska W, Mathieu J, Bayle D, Rock E, Favier A, Rayssiguier Y, Mazur A. Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency. *Biochim et Biophys Acta*. 2002;1586:92–98.
- 98.
- Aarts MM, Tymianski M. TRPMs and neuronal cell death. *Pflugers Arch*. 2005;451:243–9. [[PubMed](#)]
- 99.
- McNulty S, Fonfria E. The role of TRPM channels in cell death. *Pflugers Arch*. 2005;451:235–42. [[PubMed](#)]
- 100.
- Simpson EP, Yen AA, Appel SH. Oxidative Stress: a common denominator in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15:730–6.

[\[PubMed\]](#)

101.

Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Matsushime H, Furuichi K. Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science*. 2001;293:1327–30.

[\[PubMed\]](#)

102.

Perraud AL, Schmitz C, Scharenberg AM. TRPM2 Ca^{2+} permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium*. 2003;33:519–31. [\[PubMed\]](#)

103.

Fonfria E, Mattei C, Hill K, Brown JT, Randall A, Benham CD, Skaper SD, Campbell CA, Crook B, Murdock PR, Wilson JM, Maurio FP, Owen DE, Tilling PL, McNulty S. TRPM2 is elevated in the tMCAO stroke model, transcriptionally regulated, and functionally expressed in C13 microglia. *J Recept Signal Transduct Res*. 2006;26:179–98. [\[PubMed\]](#)

104.

Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286:C129–37. [\[PubMed\]](#)

105.

Lipski J, Park TI, Li D, Lee SC, Trevarton AJ, Chung KK, Freestone PS, Bai JZ. Involvement of TRP-like channels in the acute ischemic response of hippocampal CA1 neurons in brain slices. *Brain Res*. 2006;1077:187–99. [\[PubMed\]](#)

106.

Shen BW, Perraud AL, Scharenberg A, Stoddard BL. The crystal structure and mutational analysis of human NUDT9. *J Mol Biol*. 2003;332:385–98. [\[PubMed\]](#)

107.

Kuhn FJ, Luckhoff A. Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *J Biol Chem*. 2004;279:46431–7. [\[PubMed\]](#)

108.

Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*. 2001;411:595–9. [\[PubMed\]](#)

109.

Perraud AL, Knowles HM, Schmitz C. Novel aspects of signaling and ion-homeostasis regulation in immunocytes. The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response. *Mol Immunol*. 2004;41:657–73. [\[PubMed\]](#)

110.

McHugh D, Flemming R, Xu SZ, Perraud AL, Beech DJ. Critical intracellular Ca^{2+} dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel

- activation. *J Biol Chem.* 2003;278:11002–6. [[PubMed](#)]
111.
Heiner I, Eisfeld J, Warnstedt M, Radukina N, Jungling E, Luckhoff A. Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochem J.* 2006;398:225–32. [[PubMed](#)]
112.
Miller BA. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol.* 2006;209:31–41. [[PubMed](#)]
113.
Fonfria E, Marshall IC, Boyfield I, Skaper SD, Hughes JP, Owen DE, Zhang W, Miller BA, Benham CD, McNulty S. Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J Neurochem.* 2005;95:715–23. [[PubMed](#)]
114.
Zhang W, Chu X, Tong Q, Cheung JY, Conrad K, Masker K, Miller BA. A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem.* 2003;278:16222–9. [[PubMed](#)]
115.
Fonfria E, Marshall IC, Benham CD, Boyfield I, Brown JD, Hill K, Hughes JP, Skaper SD, McNulty S. TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Br J Pharmacol.* 2004;143:186–92. [[PubMed](#)]
116.
Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, Knowles HM, Ferraris D, Li W, Zhang J, Stoddard BL, Scharenberg AM. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem.* 2005;280:6138–48. [[PubMed](#)]
117.
Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 1999;79:1127–55. [[PubMed](#)]
118.
Cassarino DS, Bennett JP Jr. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;29:1–25. [[PubMed](#)]
119.
von Lewinski F, Keller BU. Ca^{2+} , mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci.* 2005;28:494–500. [[PubMed](#)]
120.
Damiano M, Starkov AA, Petri S, Kipiani K, Kiaei M, Mattiazzi M, Flint Beal M, Manfredi G. Neural mitochondrial Ca^{2+} capacity impairment precedes the onset of

- motorsymptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem*. 2006;96:1349–61. [[PubMed](#)]
- 121.
- Mattson MP. Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1012:37–50. [[PubMed](#)]
- 122.
- Capasso M, Jeng JM, Malavolta M, Mocchegiani E, Sensi SL. Zinc dyshomeostasis: a key modulator of neuronal injury. *J Alzheimers Dis*. 2005;8:93–108. [[PubMed](#)]
- 123.
- Gellein K, Garruto RM, Syversen T, Sjobakk TE, Flaten TP. Concentrations of Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Rb, V, and Zn in formalin-fixed brain tissue in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia complex of Guam determined by High-resolution ICP-MS. *Biol Trace Elem Res*. 2003;96:39–60. [[PubMed](#)]
- 124.
- Carri MT, Ferri A, Cozzolino M, Calabrese L, Rotilio G. Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Res Bull*. 2003;61:365–74. [[PubMed](#)]
- 125.
- Kapaki E, Zournas C, Kanias G, Zambelis T, Kakami A, Papageorgiou C. Essential trace element alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1997;147:171–5. [[PubMed](#)]
- 126.
- Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ, Turnbull DM. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol*. 1999;46:787–90. [[PubMed](#)]
- 127.
- Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz WS. Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2000;123:1339–48. [[PubMed](#)]
- 128.
- Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, Kunz D, Buchner M, Feistner H, Elger CE, Ludolph AC, Riepe MW, Kunz WS. Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1999;169:133–9. [[PubMed](#)]
- 129.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. 1995;14:1105–16. [[PubMed](#)]

130.
Ahlskog JE, Petersen RC, Waring SC, Esteban-Santillan C, Craig UK, Maraganore DM, Lennon VA, Kurland LT. Guamanian neurodegenerative disease: are diabetes mellitus and altered humoral immunity clues to pathogenesis? *Neurology*. 1997;48:1356–62. [[PubMed](#)]
131.
Sullivan PG, Rabchevsky AG, Keller JN, Lovell M, Sodhi A, Hart RP, Scheff SW. Intrinsic differences in brain and spinal cord mitochondria: Implication for therapeutic interventions. *J Comp Neurol*. 2004;474:524–34. [[PubMed](#)]
132.
Coskun PE, Beal MF, Wallace DC. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10726–31. [[PubMed](#)]
133.
Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS, Trimmer PA, Miller SW, Maguire DJ, Sheehan JP, Maguire RS, Pattee G, Juel VC, Phillips LH, Tuttle JB, Bennett JP Jr, Davis RE, Parker WD Jr. Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 1998;153:135–42. [[PubMed](#)]
134.
Wanglund C, Lynch D, Spathis R, Lum JK, Garruto RM. Evidence for mitochondrial dysfunction and its role in neurodegeneration in Guam ALS and PD. *American Journal of Human Biology*. 2006;18:280.
135.
Bacman SR, Bradley WG, Moraes CT. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis: trigger or target? *Mol Neurobiol*. 2006;33:113–31. [[PubMed](#)]
136.
Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1996;39:203–16. [[PubMed](#)]
137.
Rao SD, Weiss JH. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci*. 2004;27:17–23. [[PubMed](#)]
138.
Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006;52:39–59. [[PubMed](#)]
139.
Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006;312:1389–92. [[PubMed](#)]
140.
Borchelt DR. Amyotrophic lateral sclerosis--are microglia killing motor neurons? *N*

- Engl J Med.* 2006;355:1611–3. [[PubMed](#)]
- 141.
- Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology.* 2001;57:1282–9. [[PubMed](#)]
- 142.
- Tikka TM, Vartiainen NE, Goldsteins G, Oja SS, Andersen PM, Marklund SL, Koistinaho J. Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Brain.* 2002;125:722–31. [[PubMed](#)]
- 143.
- Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1998;44:696–9. [[PubMed](#)]
- 144.
- Graves MC, Fiala M, Dinglasan LA, Liu NQ, Sayre J, Chiappelli F, van Kooten C, Vinters HV. Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages, mast cells and T cells. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2004;5:213–9. [[PubMed](#)]
- 145.
- Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH. Lymphocytic infiltrates in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 1993;50:30–6. [[PubMed](#)]
- 146.
- Hoffman PM, Robbins DS, Oldstone MB, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Humoral immunity in Guamanians with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia. *Ann Neurol.* 1981;10:193–6. [[PubMed](#)]
- 147.
- Hoffman PM, Robbins DS, Nolte MT, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Cellular immunity in Guamanians with amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia. *N Engl J Med.* 1978;299:680–5. [[PubMed](#)]
- 148.
- Ferri A, Nencini M, Casciati A, Cozzolino M, Angelini DF, Longone P, Spalloni A, Rotilio G, Carri MT. Cell death in amyotrophic lateral sclerosis: interplay between neuronal and glial cells. *Faseb J.* 2004;18:1261–3. [[PubMed](#)]
- 149.
- Zhao W, Xie W, Le W, Beers DR, He Y, Henkel JS, Simpson EP, Yen AA, Xiao Q, Appel SH. Activated microglia initiate motor neuron injury by a nitric oxide and glutamate-mediated mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:964–77. [[PubMed](#)]
- 150.
- Almer G, Vukosavic S, Romero N, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J*

- Neurochem.* 1999;72:2415–25. [[PubMed](#)]
151.
Hoffmann A, Kann O, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kettenmann H. Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *J Neurosci.* 2003;23:4410–9. [[PubMed](#)]
152.
Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1996;39:203–16. [[PubMed](#)]
153.
Appel SH, Smith RG, Alexianu M, Siklos L, Engelhardt J, Colom LV, Stefani E. Increased intracellular calcium triggered by immune mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci.* 1995;3:368–74. [[PubMed](#)]
154.
Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 1990;39:151–70. [[PubMed](#)]
155.
Appel SH, Simpson EP. Activated microglia: the silent executioner in neurodegenerative disease? *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2001;1:303–5. [[PubMed](#)]
156.
Mattson MP. Free radicals, calcium, and the synaptic plasticity-cell death continuum: emerging roles of the transcription factor NF kappa B. *Int Rev Neurobiol.* 1998;42:103–68. [[PubMed](#)]
157.
Ahlskog JE, Litchy WJ, Peterson RC, Waring SC, Esteban-Santillan C, Chen KM, Harper CM, Craig UK, Kurland LT. Guamanian neurodegenerative disease: electrophysiologic findings. *J Neurol Sci.* 1999;166:28–35. [[PubMed](#)]
158.
Obrosova IG, Li F, Abatan OI, Forsell MA, Komjati K, Pacher P, Szabo C, Stevens MJ. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2004;53:711–20. [[PubMed](#)]
-