

ANGEWANDTE CHEMIE

97. Jahrgang 1985

Heft 5

Seite 363-438

Der Glycinrezeptor aus Rattenrückenmark: Untersuchungen zum Wirkort des Pflanzenalkaloids Strychnin

Von Heinrich Betz*

Die Aminosäure Glycin dient im Nervensystem der Wirbeltiere als Überträgersubstanz (Neurotransmitter) bei der Kontrolle motorischer und sensorischer Nervenbahnen. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren in der neuronalen Zellmembran bewirkt Glycin eine Erhöhung der Chloridionenleitfähigkeit und damit eine Hyperpolarisation, d. h. Hemmung glycinsensitiver Nervenzellen. Diese Rezeptorwirkung von Glycin wird von dem Pflanzenalkaloid Strychnin in reversibler Weise blockiert. Wir haben Strychnin zur biochemischen Charakterisierung und zur Isolierung des Glycinrezeptors aus Rattenrückenmark eingesetzt. Unsere Ergebnisse zeigen, daß der Glycinrezeptor ein großes Membranprotein ist, das drei verschiedene Untereinheiten enthält. Anhand der vorliegenden Daten wird ein Strukturmodell des Glycinrezeptors vorgeschlagen und seine Verwandtschaft mit anderen an der Erregungsübertragung beteiligten Proteinen der Nervenzellmembran diskutiert.

1. Einleitung

Zahlreiche Untersuchungen der letzten zwanzig Jahre lassen vermuten, daß die Aminosäuren im Nervensystem außer ihrer allgemeinen metabolischen auch eine wichtige Funktion bei der Erregungsübertragung zwischen Nervenzellen (Neuronen) haben. Seit langem weiß man, daß z. B. die aromatischen Aminosäuren Vorstufen bei der Synthese catecholaminerger Überträgerstoffe (Neurotransmitter) sind. Die Erkenntnis, daß Aminosäuren auch unmodifiziert als Neurotransmitter dienen, ist dagegen relativ neu^[1]. Heute ist allgemein akzeptiert, daß einige saure und neutrale Aminosäuren (siehe Tabelle 1) an vielen zentralnervösen Schaltstellen, den sogenannten Synapsen, als Signalsubstanzen fungieren. Dazu werden sie in speziellen Speicherorganellen vorgeschalteter (präsynaptischer) Neurone akkumuliert und bei Reizung auf die Zellmembran

nachgeschalteter (postsynaptischer) Nervenzellen ausgeschüttet. Dort können sie an hochspezifische Rezeptoren binden und recht unterschiedliche Antworten auslösen: Saure Aminosäuren wie Glutaminsäure und Asparaginsäure wirken erregend („excitatorisch“), die neutralen Aminosäuren γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin hemmend („inhibitorisch“). Eine Übersicht über die derzeit als Neurotransmitter oder -modulatoren geltenden Aminosäuren ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Alle heute bekannten Aminosäure-Neurotransmitter bewirken über ihre Rezeptoren selektive Änderungen in der Ionenleitfähigkeit der neuronalen Zellmembran. So erhöhen z. B. Glutaminsäure und Asparaginsäure die Leitfähigkeit

Tabelle 1. Aminosäure-Neurotransmitter.

Erregend (Erhöhung der Natriumionenleitfähigkeit):

L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Homocysteinsäure [a]

Hemmend (Erhöhung der Chloridionenleitfähigkeit):

Glycin, GABA, Taurin [a], β -Alanin [a]

[a] Neurotransmitterfunktion umstritten.

[*] Prof. Dr. H. Betz

Institut für Neurobiologie, Zentrum für Molekulare Biologie
Im Neuenheimer Feld 364, D-6900 Heidelberg

keit für Na^+ , d.h. den Einstrom von extrazellulärem Na^+ in das negativ geladene Cytosol. Die daraus resultierende Depolarisation des an der Zellmembran anliegenden Ruhepotentials führt zur Erregung der Nervenzelle. GABA und Glycin dagegen erhöhen die Chloridionenleitfähigkeit; der Einstrom von Cl^- , das im Extrazellulärraum im Überschuß vorhanden ist, bewirkt eine Hyperpolarisation der Plasmamembran; die Zelle wird gehemmt.

Die Molekülstruktur der für diese Leitfähigkeitsänderungen verantwortlichen Plasmamembranproteine ist nur wenig erforscht. In Analogie zu anderen Rezeptorsystemen wird angenommen, daß die Aminosäurerezeptoren Ionenkanäle enthalten, die in verschiedenen Proteinkonformationen vorliegen können (Abb. 1). Nach dieser Vorstellung begünstigt die Bindung der Aminosäure (oder allgemein eines Aktivators oder „Agonisten“) an den Rezeptor den Übergang in die offene, leitende Konformation des Ionenkanals. Kompetitive Rezeptorblocker („Antagonisten“) verhindern diese Konformationsänderung, indem sie die Agonistenbindungsstelle besetzen, ohne den Rezeptor zu aktivieren, d.h. eine entsprechende Konformationsänderung auszulösen. Aus diesen Ausführungen folgt, daß Aminosäurerezeptoren als bifunktionelle regulatorische Proteine betrachtet werden können, die nicht nur Neurotransmitterbindung, sondern auch Ionentransport vermitteln. Betont sei außerdem, daß die in Abbildung 1 gezeigte Rezeptoraktivierung eine enorme Verstärkung des molekularen Signals beinhaltet: Pro gebundenem Agonistmolekül fließen je nach Rezeptortyp und Membranpotential zwischen ca. 10^2 und 10^6 Ionen innerhalb von 1–5 ms durch den Ionenkanal des aktivierte Rezeptors.

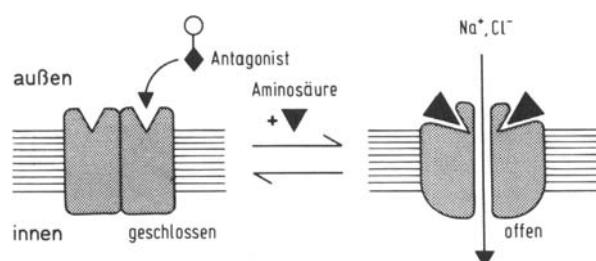


Abb. 1. Schematische Darstellung der geschlossenen und offenen Konformationen eines Aminosäurerezeptors.

Die biochemische Analyse zentralnervöser Aminosäurezeptoren war bisher vor allem an ihrer geringen Konzentration im Gehirn gescheitert: Zur Reindarstellung sind Reinigungsfaktoren von etwa 10^4 – 10^6 erforderlich. Mit der Entwicklung hochempfindlicher Proteinanalysetechniken hat sich die Situation in den letzten drei Jahren jedoch entscheidend verändert. Heute sind Fortschritte bei der Strukturaufklärung und Funktionsanalyse dieser Membranproteine möglich.

Im vorliegenden Aufsatz wird über die Bemühungen unserer Arbeitsgruppe berichtet, die Molekülstruktur eines inhibitorischen Aminosäurerezeptors, des Glycinrezeptors aus dem Rückenmark der Ratte, aufzuklären. Unsere Ergebnisse zeigen, daß dieser chemisch kontrollierte Chloridionenkanal eine komplexe Struktur aufweist, die der anderer neuronaler Ionenkanäle ähnelt.

2. Strychnin – ein Werkzeug zur Analyse des Glycinrezeptors

Das Alkaloid Strychnin aus der asiatischen Brechnuß hat eine lange Geschichte in der Naturstoffchemie. Die Aufklärung seiner Struktur (Abb. 2h) wurde 1962 mit seiner Totalsynthese in *Woodwards* Arbeitsgruppe gekrönt. In der Medizin wurde Strychnin lange als Tonicum verwendet. In höheren Dosen bewirkt dieses Alkaloid vielfältige Vergiftungssymptome, die über schwere Schmerz- und Krampfanfälle zum Tode führen können. Heute wird Strychnin gelegentlich noch als Rattengift eingesetzt.

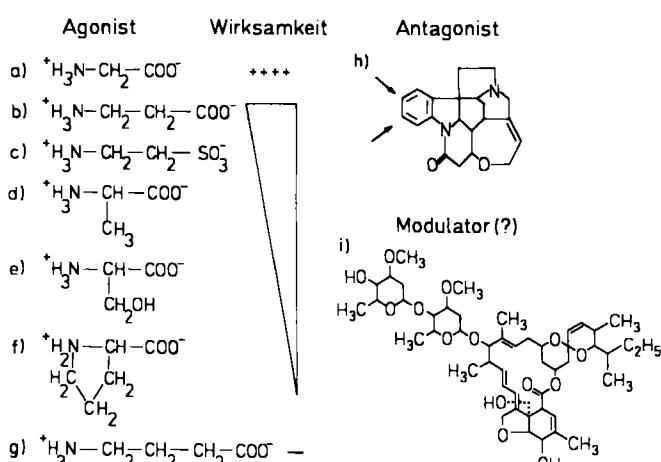


Abb. 2. Struktur von Glycinrezeptoragonisten und -antagonisten. a) Glycin; b) β -Alanin; c) Taurin; d) Alanin; e) Serin; f) Prolin; g) GABA; h) Strychnin (die Pfeile bezeichnen die substituierbaren Positionen 2 und 3); i) Avermectin B1a.

Bereits zu Beginn der fünfziger Jahre wurde gezeigt, daß Strychnin die neuronale Erregungsübertragung im Rückenmark enthemmt. Inzwischen steht fest, daß die Toxizität von Strychnin auf einer selektiven Hemmung des Glycinrezeptors beruht^[2]. Strychnin bindet mit hoher Affinität an diesen Rezeptor (Gleichgewichtsdissoziationskonstante ca. 10^{-8} M; vgl. Tabelle 2). Es ist also ein typischer Rezeptorantagonist. *Young* und *Snyder*^[3,4] konnten in Membranfraktionen aus Rattenrückenmark hochaffine Bindungsstellen für tritiertes Strychnin nachweisen, welche durch Glycin und andere am Glycinrezeptor aktive Aminosäuren im Überschuß^[5] blockiert werden. Offensichtlich sind diese Strychninbindungsstellen auf dem Glycinrezeptor lokalisiert. Die Bestimmung der Zahl dieser pharmakologisch „spezifischen“ Strychninbindungsstellen bietet einen einfachen und raschen Bindungstest zur Lokalisation und Quantifizierung des Glycinrezeptors^[3–5].

Tabelle 2. Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D natürlicher Glycinrezeptorliganden.

Ligand	K_D [M] [a]
Strychnin	$9 \cdot 10^{-9}$
Glycin	$6 \cdot 10^{-6}$
β -Alanin	$5 \cdot 10^{-6}$
Taurin	$1 \cdot 10^{-5}$
GABA	$> 10^{-3}$

[a] Die Werte sind [12] entnommen und wurden an affinitätschromatographisch gereinigtem Glycinrezeptor ermittelt.

3. Molekulare Pharmakologie des Glycinrezeptors

Nicht nur Glycin, sondern auch viele andere Aminosäuren hemmen die Erregung von Nervenzellen. Mit elektrophysiologischen Methoden konnte gezeigt werden, daß β -Alanin und Taurin gute Agonisten des Glycinrezeptors sind, während L-Alanin, Serin und Prolin nur sehr schwache Wirkung zeigen^[2-5]. Die Bindungssaffinitäten der Aminosäureagonisten sind etwa 1000mal niedriger als die von Strychnin (Tabelle 2). GABA, der neben Glycin wichtigste inhibitorische Aminosäure-Neurotransmitter im Zentralnervensystem, bindet nicht an den Glycinrezeptor, sondern wirkt über ein eigenes, ebenfalls mit einem Chloridkanal gekoppeltes Rezeptorsystem^[6].

Aus den Strukturformeln in Abbildung 2 läßt sich entnehmen, daß die ionischen Gruppen glycinerger Agonisten offensichtlich nicht durch mehr als zwei C-Atome getrennt werden dürfen, ohne ihre Aktivität zu verlieren. Ebenso wirken Seitenketten störend (Tabelle 3). Die Stereoselektivität asymmetrischer Glycinrezeptoragonisten ist gering.

Tabelle 3. Hemmung der [³H]Strychninbindung an den Glycinrezeptor durch Aminosäuren. Die [³H]Strychninbindung an membrangebundenen Glycinrezeptor wurde in Anwesenheit von 20 mM Aminosäure bestimmt (nach [9] und F. Pfeiffer, unveröffentlicht).

Aminosäure	Hemmung [%]
Glycin	86.3
β -Alanin	79.5
L-Alanin	52.9
D-Alanin	63.0
L-Prolin	49.0
D-Prolin	47.4
L- α -Aminobuttersäure	<5
D- α -Aminobuttersäure	16.8
L-Valin	22.5
D-Valin	<5

Strychnin zeigt nur wenig strukturelle Ähnlichkeit mit den Aminosäureagonisten. Bis heute ist nicht sicher geklärt, ob Strychnin an den Glycin- oder einen anderen mit ihm in allosterischer Wechselwirkung stehenden Bindungsort des Rezeptors^[4] bindet. Das Strychninmolekül läßt sich nur geringfügig modifizieren, ohne seine biologische Wirksamkeit einzubüßen. Insbesondere Substitutionen am aromatischen Ring führen jedoch zu nicht-inaktivierte, zum Teil natürlich vorkommenden Derivaten wie Brucin. Ebenso kann der sauerstoffhaltige Siebenring ohne große Aktivitätsverluste geöffnet werden. Die Öffnung des die Ketofunktion enthaltenden heterocyclischen Sechsringes zu Strychninsäure und sperrige Gruppen außerhalb des aromatischen Rings wirken dagegen inaktivierend (Tabelle 4). Die biologische Wirkung verschiedener Strychninanaloga korreliert nicht mit deren Lipophilie. Dies läßt vermuten, daß Strychnin in protonierter Form an den Rezeptor bindet^[7].

Abbildung 2i zeigt eine Verbindung, die aufgrund ihrer Wirkung im GABA-System entdeckt wurde: Avermectin B1a. Dieses makrocyclische Lacton, welches als Wurmmittel (Anthelminticum) eingesetzt wird, potenziert die inhibitorische Erregungsübertragung an GABA-Synapsen und bewirkt dadurch eine Muskellähmung von Anneliden^[8]. Am isolierten Glycinrezeptor ist es ein hochwirksamer Antagonist der Strychninbindung^[9]; sein in-vivo-Effekt ist

Tabelle 4. Biologische Wirksamkeit und Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D der Rezeptorbindung von Strychnin und Strychninderivaten.

Verbindungen	Biologische Wirksamkeit [a]	K_D [M] [b]	LD_{50} [$\mu\text{mol/kg}$]
Strychnin	0.4	$\approx 10^{-8}$	
2-Aminostrychnin, 2-Nitrostrychnin, 3-Aminostrychnin, Brucin (2-Dimethylaminostrychnin), 2,3-Dihydroxystrychnin, 2,3-Diacetamidostrychnin etc. (Substitution im aromatischen Ring)	0.4-10	$\approx 10^{-8}$ - $2.5 \cdot 10^{-7}$	
21,22-Dihydroxystychnin, Isostrychnin, Bromdesoxyisotrychnin etc. (Substitution oder Öffnung des sauerstoffhaltigen Siebenrings)	5-40	$\approx 10^{-7}$ - 10^{-6}	
Strychninsäure (9,10-Secobrucin-10-at) etc. (Öffnung des heterocyclischen Rings mit Ketofunktion)	> 50	> 10^6	

[a] LD₅₀ wurde an Mäusen ermittelt [7]. [b] K_D wurde in Kompetitionsexperimenten mit [³H]Strychnin bestimmt: [7] und D. Graham, unveröffentlicht.

bisher nicht untersucht. In jedem Falle repräsentiert dieses Lacton eine neue Klasse Glycinrezeptor-aktiver Substanzen. Die Aufklärung seines Bindungsmechanismus ist daher von großem Interesse.

4. Solubilisierung und Photoaffinitätsmarkierung des Glycinrezeptors

Für biochemische Untersuchungen müssen membrangebundene Proteine durch Detergentien aus der Lipidschicht der Membran herausgelöst und in eine micelläre Form überführt, d. h. „solubilisiert“ werden. Versuche zur Solubilisierung des Glycinrezeptors standen somit am Beginn unserer biochemischen Arbeiten. Der Glycinrezeptor kann mit ionischen und nichtionischen Detergentien wie Triton X-100 oder Cholat aus Membranpräparationen von Rattenrückenmark solubilisiert werden^[10]. Die native, d. h. Strychnin- und Aminosäure-bindende Konformation des Rezeptors bleibt allerdings nur dann erhalten, wenn genügend Phospholipid im Detergenspuffer vorhanden ist. Mit solchem „löslichen“ Glycinrezeptor konnte eine erste biochemische Charakterisierung dieses Membranproteins durchgeführt werden. Durch klassische Methoden der Biochemie wurde z. B. ermittelt, daß der Glycinrezeptor ein großes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 250 000 Da ist.

Der erste Nachweis einer Untereinheit des Glycinrezeptors gelang durch Photoaffinitätsmarkierung mit ³H-markiertem Strychnin^[11]. Ende der siebziger Jahre war von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt worden, daß photolabile, niedermolekulare Verbindungen durch ultraviolettes (UV) Licht irreversibel in hochaffine Bindungsstellen verschiedener Proteine eingebaut werden können. Strychnin ist lichtempfindlich; wir vermuteten daher, daß dieses Alkaloid als natürlicher Photoaffinitätsligand dienen könnte. In ersten Experimenten wurden Membranen aus Rattenrückenmark in Gegenwart von [³H]Strychnin mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Membranproteine durch Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht getrennt

und eingebautes ^3H durch Fluorographie nachgewiesen. Mit diesen Methoden ließ sich ein durch die UV-Belichtung kovalent mit Strychnin markiertes Polypeptid nachweisen, für welches durch Vergleich mit Proteinen bekannter Größe ein Molekulargewicht von 48 000 Da ermittelt wurde^[11]. Die Markierung dieses Polypeptids ist pharmakologisch spezifisch und findet an oder in der Nähe der hochaffinen Strychninbindungsstelle des Glycinrezeptors statt^[12]. Der genaue Mechanismus dieses durch UV-Licht induzierten Einbaus von Strychnin in den Rezeptor ist noch ungeklärt; die Reaktionskinetik lässt eine Photoaktivierung nicht nur von Strychnin, sondern auch von aromatischen Aminosäuren (Tyrosin) in der Bindungsregion des 48 000 Da-Polypeptids vermuten^[12].

Die Photoaffinitätsmarkierung mit $[^3\text{H}]$ Strychnin wurde auch für Untersuchungen zur Topologie des 48 000 Da-Polypeptids in der neuronalen Plasmamembran eingesetzt. Inkubiert man photoaffinitätsmarkierte Membranvesikel aus Rattenrückenmark mit der Protease Trypsin, so wird das radioaktive 48 000 Da-Polypeptid über Zwischenstufen zu einem Hauptprodukt mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 37 000 Da abgebaut. Dies Ergebnis zeigt, daß die Strychnin-bindende Untereinheit des Glycinrezeptors eine proteasezugängliche extrazelluläre Region von mindestens 11 000 Da aufweisen muß^[12]. Erstaunlicherweise kann aber selbst extensive proteolytische Behandlung die Radiomarkierung nicht von den Membranfraktionen entfernen. Wir glauben daher, daß sich die Strychninbindungsstelle des Glycinrezeptors an einer Polypeptiddomäne befindet, welche durch die hydrophobe Umgebung der Lipidmembran vor proteolytischer Spaltung geschützt ist (Abb. 3).

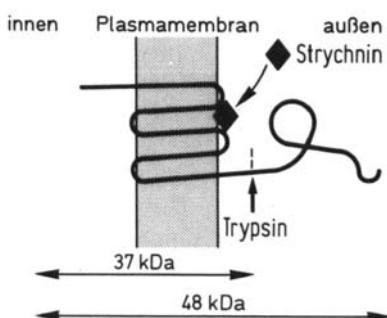


Abb. 3. Topologie des 48 000 Da-Polypeptids in der Plasmamembran. Die genaue Zahl der Transmembrandomänen ist bisher unbekannt; hier sind fünf angenommen.

5. Affinitätschromatographie und biochemische Charakterisierung des Glycinrezeptors

Der mit Detergens solubilisierte Glycinrezeptor wurde affinitätschromatographisch gereinigt. Dazu wurde ein biologisch aktives Derivat von Strychnin, 2-Aminostrychnin (vgl. Tabelle 4), über ein langes, hydrophiles Zwischenstück an Trägermaterial, Agarose, gekoppelt. Diese Aminostrychnin-Agarose bindet bei Inkubation mit Detergensextrakten aus Rückenmarkmembranen über 90% des löslichen Glycinrezeptors. Nach ausgiebigem Waschen mit Puffern hoher Ionenstärke lassen sich etwa 20% der gebundenen Rezeptormoleküle durch Elution mit dem kompetitiven Agonisten Glycin wiedergewinnen (Abb. 4)^[13].

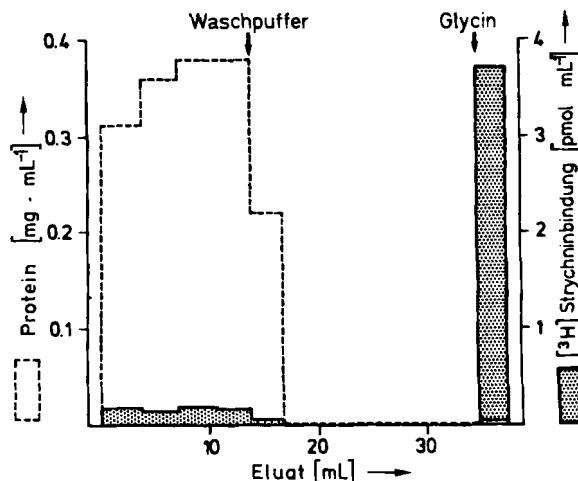


Abb. 4. Affinitätschromatographie des Glycinrezeptors. Ein Detergensextrakt aus Rückenmarkmembranen wird durch eine Aminostrychnin-Agarose-Säule gepumpt und die Säule anschließend mit Detergentspuffer gewaschen. Dabei werden 80–90% der Strychninbindungsstellen, jedoch <1% des Proteins auf der Säule adsorbiert. Anschließend lassen sich Strychninbindungsstellen, d.h. Glycinrezeptor, mit Glycin eluieren. Man beachte den geringen Proteingehalt des Glycineluats, der einer etwa 1500fachen Rezeptorreinigung entspricht.

Durch dieses einfache Verfahren kann der Glycinrezeptor in einem Schritt etwa 2000fach angereichert werden. Derzeit können in einer Aufarbeitung etwa 25–50 µg des Glycinrezeptors in praktisch reiner Form erhalten werden. Durch Polyacrylamidgelektrophorese in Anwesenheit des denaturierenden Detergents Natriumdodecylsulfat läßt sich der gereinigte Glycinrezeptor in drei Polypeptide mit Molekulargewichten von 48 000, 58 000 und 93 000 Da trennen^[13]. Der native Rezeptor hat ein Molekulargewicht von etwa 250 000 Da (Abschnitt 4). Durch Photoaffinitätsmarkierung wurde gezeigt, daß das 48 000 Da-Polypeptid im gereinigten Rezeptor mit der in Membranfraktionen nachgewiesenen Strychnin-bindenden Untereinheit des Glycinrezeptors identisch ist^[13]. Die Funktion der beiden anderen Rezeptorpolypeptide ist bisher ungeklärt. Wir nehmen an, daß diese Polypeptide zusammen mit der 48 000 Da-Untereinheit ein Heteropolymer bilden, welches als Chloridionenkanal fungiert^[14]. Diese Vorstellung wird durch Untersuchungen am Glycinrezeptor aus Schweinerückenmark^[15] und Rekonstitutionsversuche mit affinitätschromatographisch gereinigtem Glycinrezeptor erhärtet: Unter Verwendung eines für andere Rezeptoren erarbeiteten Protokolls^[16] konnte der gereinigte Glycinrezeptor durch Entfernung des Detergents in Phospholipidvesikel eingebaut und anschließend in planare Lipiddoppelschichten umgelagert werden. Die Zugabe von Glycin zu solchen Membranen bewirkte eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit, welche verschiedene Charakteristika der typischen Glycinantwort, unter anderem Hemmbarkeit durch Strychnin, aufwies^[17]. Diese Versuche zeigten, daß der von uns isolierte Glycinrezeptor tatsächlich alle zur Ionentranslokation notwendigen Komponenten enthält.

In Abbildung 5 sind die derzeit vorliegenden Daten in Form eines Arbeitsmodells zusammengefaßt. Danach enthält der Glycinrezeptor je zwei Kopien der 48 000 Da- und je eine Kopie der 58 000 und 93 000 Da-Untereinheiten. Die Bindung zweier Glycinnmoleküle an spezifische Bindungsstellen auf den 48 000 Da-Polypeptiden führt zur

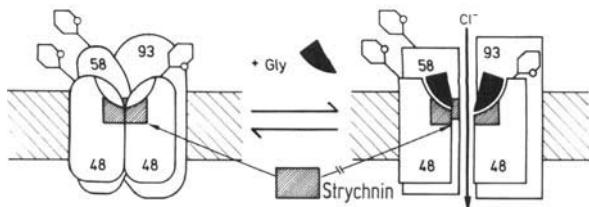


Abb. 5. Modellskizze des Glycinrezeptors. Hier wird angenommen, daß die Bindung von Glycin an den Rezeptor durch allosterische Interaktionen die Konformation aller Rezeptorpolypeptide ändert und dadurch den Chloridionenkanal öffnet. Die Zahlen geben das Molekulargewicht [kDa] der Polypeptide an. Die auf den 48- und 58 kDa-Polypeptiden nachgewiesene Kohlehydratseitenketten sind symbolisch eingezeichnet.

Konformationsänderung des Rezeptors und damit zur Öffnung eines von allen Untereinheiten (oder vom 93 000 Da-Polypeptid) gebildeten Chloridionenkanals. Dieses Modell steht in Einklang mit den elektrophysiologischen und biochemischen Befunden. Es sei aber betont, daß verschiedene Einzelheiten, insbesondere die exakte Stöchiometrie der Untereinheiten, noch eingehender experimenteller Erhärtung bedürfen.

Um neue Liganden zur weiteren Charakterisierung der Glycinrezeptorpolypeptide zu gewinnen, haben wir kürzlich mit der von Köhler und Milstein^[18] entwickelten Hybriddomänteknologie monoklonale, d. h. Determinanten-spezifische Antikörper gegen den Glycinrezeptor hergestellt^[19]. Derzeit verfügen wir über neun monoklonale Antikörper, von denen einige an die 48 000 Da- und andere an die 93 000 Da-Untereinheit des Rezeptors binden. Überraschenderweise erkennen zwei der Antikörper nicht nur ein, sondern je zwei Polypeptide des Glycinrezeptors^[19]. Dies läßt vermuten, daß die Untereinheiten dieses Rezeptors gemeinsame antigene Determinanten, d. h. homologe Peptidstrukturen, enthalten. Mit proteolytischen Enzymen erstellte Peptidmuster sprechen ebenfalls für proteinchemische Ähnlichkeiten in allen, insbesondere aber den kleinen Glycinrezeptorpolypeptiden^[19]. Möglicherweise stammen alle Untereinheiten dieses Rezeptors von einem gemeinsamen „Urrezeptorpolypeptid“ ab. Eine divergente Evolution einzelner Rezeptorpolypeptide aus einem als Homopolymer vorliegenden Membranprotein gilt beim derzeit am besten untersuchten Neurotransmitterrezeptor, dem Acetylcholinrezeptor aus dem elektrischen Fisch, als gut gesichert^[20].

6. Schlußbemerkung und Ausblick

Unsere Untersuchungen am Glycinrezeptor zeigen, daß an der Erregungsübertragung beteiligte Proteine der Nervenzellmembran der biochemischen Analyse zugänglich sind, sofern man über hochaffine Liganden wie Strychnin verfügt. Mit geeigneten Techniken wie der Affinitätschromatographie ist auch die Reindarstellung dieser seltenen (< 0.1–0.01% des Zellproteins) Membranproteine möglich. Aufgrund unserer Ergebnisse gehört der Glycinrezeptor heute zu den biochemisch mit am besten charakterisierten Neurotransmitterrezeptoren aus dem Zentralnervensystem: Es handelt sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 250 000 Da, welches drei verschiedene Polypeptidketten enthält. Durch Photoaffinitätsmarkierung und Rekonstitution konnten wir zeigen, daß das gereinigte Rezeptoroligomer nicht nur die Ligandenbindungsstelle, sondern auch den Chloridionenkanal dieses allosterischen Membranproteins enthält. Von einem Verständnis seines Aufbaus und seiner Funktion als chemo-elektrischer Signalwandler sind wir aber noch weit entfernt. Hier können nur detaillierte pharmakologische Untersuchungen und Strukturanalysen weiterhelfen. Für den Organiker dürfte die eingehende Untersuchung der Struktur-Funktions-Beziehung glycinerger Agonisten und Antagonisten und deren Abgrenzung von GABA-Rezeptorliganden besonders reizvoll sein. Die bisher vorliegenden Daten sind leider höchst unvollständig. Derzeit können nur beschränkte Aussagen über den Aufbau der Glycinrezeptoragonisten-Bindungsstelle gemacht werden: In jedem Fall sind eng benachbarte kationische und anionische Gruppen notwendig. Zusätzlich liegen Einschränkungen für Seitengruppensubstitutionen am Agonisten vor.

Auf der Proteinseite sollten die Identifizierung der an der Strychninbindungsstelle beteiligten Aminosäuren z. B. durch Affinitätsliganden oder spezifische Antikörper und die Primärstrukturermittlung der 48 000 Da-Untereinheit weiterhelfen. Diese erscheint wegen der beschränkten Mengen hochgereinigten Rezeptorproteins nur über genetotechnologische Methoden möglich. Ein Teil unserer derzeitigen Bemühungen konzentriert sich daher darauf, die Botenribonucleinsäure (mRNA) für dieses Polypeptid (und die anderen Glycinrezeptoruntereinheiten) als komplementäre Desoxyribonucleinsäure (cDNA) in Bakterien zu klonieren und ihren Informationsgehalt, und so die Aminosäuresequenz, durch Basensequenzierung zu ermitteln. Bei Erfolg kann dann daran gedacht werden, von der klonierten DNA codierte Rezeptorpolypeptide und vielleicht sogar den heteropolymeren Rezeptor in Bakterien oder eukaryonten Zellen zur Expression zu bringen und die Funktion einzelner Rezeptorregionen durch gezielte chemische Mutagenese der DNA zu ermitteln. Damit wäre der Weg zur präzisen Dissektion funktionell wichtiger Rezeptordomänen, wie der Ligandenbindungsregion und des Ionenkanals, offen. Eine Weiterführung dieser Techniken sollte überdies entscheidend zur Entwicklung der strukturellen Pharmakologie des Glycinrezeptors beitragen. Sicher birgt der Glycinrezeptor noch ein erhebliches Potential zur Entwicklung neuer Pharmaka. Inzwischen wissen wir, daß dieses Rezeptorprotein nicht nur die motorischen, sondern auch viele sensorische Nervenbahnen kontrolliert. Hochwirksame Glycinrezeptoragonisten oder „modulatoren“ sind somit bei therapeutischer Verträglichkeit als potentielle Anticonvulsiva (Krampfmittel) und Analgetica (Schmerzmittel) vielversprechend. Auch andere Aspekte des Glycinrezeptors sind für die Medizin von Bedeutung: Möglicherweise löst dieses Protein Autoimmunreaktionen bei degenerativen Rückenmarkserkrankungen aus. Genauere Struktur- und Stoffwechseluntersuchungen sollten die Pathogenese dieser Krankheitsbilder beleuchten.

Es sei hier erwähnt, daß die bisher bekannten Daten zur Molekülstruktur des Glycinrezeptors denen anderer Kanalproteine in der elektrisch erregbaren Plasmamembran ähneln. In Tabelle 5 findet sich eine Übersicht über die Molekulargewichte und, soweit bekannt, Untereinheitenstrukturen der bisher untersuchten chemisch- und span-

Tabelle 5. Molekulare Eigenschaften neuronaler Ionenkanäle.

	Molekulargewicht des nativen Proteins [kDa]	Molekulargewichte der Untereinheiten [kDa]	Zusammensetzung des Rezeptors aus Untereinheiten
Nicotinischer Acetylcholinrezeptor			
Skelettmuskel, Elektroplax [22, 23]	≈ 270	40, 50, 60, 65	$\alpha_2 \beta \gamma \delta$
Zentralnervensystem [24]			
Glycinrezeptor [13]	≈ 300	57	?
GABA-Rezeptor [25]	≈ 250 220–350	48, 58, 93 50–53, 57	$\alpha_2 \beta \gamma$?
Spannungsabhängiger Natriumkanal			
Elektroplax [26]	270–300	≈ 260	α ?
Skelettmuskel, Zentralnervensystem [27, 28]	≈ 310	270, 37–47	$\alpha \beta \beta'$

nungskontrollierten Ionenkanäle: All diese Membranproteine sind große Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 250 000–300 000 Da. Der spannungsabhängige Natriumkanal, der die Nervenimpulse weiterleitet, besteht im wesentlichen aus einem großen Glykopeptid; beim nicotinischen Acetylcholinrezeptor und beim Glycinrezeptor sind mehrere Untereinheiten mit mittleren Molekulargewichten um etwa 50 000 Da vorhanden. Auch einige bisher weniger gut untersuchte Neurorezeptoren wie der GABA-Rezeptor und der nicotinische Acetylcholinrezeptor aus dem Zentralnervensystem passen in dieses Schema: Diese Proteine bestehen ebenfalls aus mehreren Polypeptiden von 50 000–60 000 Da und haben apparente Molekulargewichte von etwa 250 000–300 000 Da (Tabelle 5). Aufgrund dieser Daten haben wir vermutet, daß die Evolution dieser Kanalproteine nach einem gemeinsamen Grundmuster abgelaufen ist^[21]. Jüngst aufgezeigte Strukturhomologien zwischen den einzelnen Untereinheiten des nicotinischen Acetylcholinrezeptors^[22] und wahrscheinlich auch des Glycinrezeptors^[19] stützen diese Auffassung. Ob die verschiedenen Rezeptorproteine und Ionenkanäle der Nervenzellmembran auch alle untereinander verwandt, d.h. Mitglieder einer großen Genfamilie, sind, ist bisher

unbekannt. Die in den nächsten Jahren zu erwartenden Primärstrukturdaten sollten hier ein klares Bild schaffen.

Diese Arbeit wurde von der Stiftung Volkswagenwerk, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Forschung und Technologie sowie dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Ich danke Dr. F. Pfeiffer, Dr. D. Graham, Dr. B. Schmitt, R. Simler, G. Grenningloh und A. Rienitz für Mitarbeit und Diskussionen, C. Weyrauch, U. Müller, C. Schröder und H. Krischke für technische Hilfe sowie R. Franklin für Unterstützung bei der Vorbereitung des Manuskriptes.

Eingegangen am 12. Juni,
ergänzt am 11. Dezember 1984 [A 534]

- [1] P. N. R. Usherwood, *Arch. Comparat. Physiol.* 7 (1978) 227.
- [2] D. R. Curtis, L. Hösl, G. A. R. Johnston, *Exp. Brain Res.* 6 (1968) 1.
- [3] A. B. Young, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2832.
- [4] A. B. Young, S. H. Snyder, *Mol. Pharmacol.* 10 (1974) 790.
- [5] A. B. Young, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4002.
- [6] F. V. DeFeudis, *Annu. Rev. Pharmacol.* 15 (1975) 105.
- [7] C. R. Mackerer, R. L. Kochman, T. F. Shen, F. M. Hershenson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 201 (1977) 326.
- [8] L. C. Fritz, C. C. Wang, A. Gorio, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 2062.
- [9] D. Graham, F. Pfeiffer, H. Betz, *Neurosci. Lett.* 29 (1982) 173.
- [10] F. Pfeiffer, H. Betz, *Brain Res.* 226 (1981) 273.
- [11] D. Graham, F. Pfeiffer, H. Betz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102 (1981) 1330.
- [12] D. Graham, F. Pfeiffer, H. Betz, *Eur. J. Biochem.* 131 (1983) 519.
- [13] F. Pfeiffer, D. Graham, H. Betz, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 9389.
- [14] H. Betz, D. Graham, F. Pfeiffer, H. Rehm in F. Hucho: *Toxins as Tools in Neurobiology*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 245.
- [15] D. Graham, F. Pfeiffer, R. Simler, H. Betz, *Biochemistry* (1985), im Druck.
- [16] H. Schindler, U. Quast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3052.
- [17] D. Graham, H. G. Schindler, unveröffentlicht.
- [18] G. Köhler, C. Milstein, *Nature* 256 (1975) 495.
- [19] F. Pfeiffer, R. Simler, G. Grenningloh, H. Betz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 7224.
- [20] B. M. Conti-Tronconi, M. A. Raftery, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 491.
- [21] H. Betz, *Naturwissenschaften* 71 (1984) 363.
- [22] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, S. Kikyonami, Y. Furutani, T. Hirose, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, S. Numa, *Nature* 302 (1983) 528.
- [23] J. P. Changeux, *Harvey Lect.* 75 (1981) 85.
- [24] H. Betz, D. Graham, H. Rehm, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 11390.
- [25] E. Siegel, C. Mamalaki, E. A. Barnard, *J. Biol. Chem.* 258 (1982) 6965.
- [26] J. A. Miller, W. S. Agnew, S. R. Levinson, *Biochemistry* 22 (1983) 462.
- [27] R. P. Hartshorne, W. A. Catterall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4620.
- [28] R. L. Barchi, *J. Neurochem.* 40 (1983) 1377.