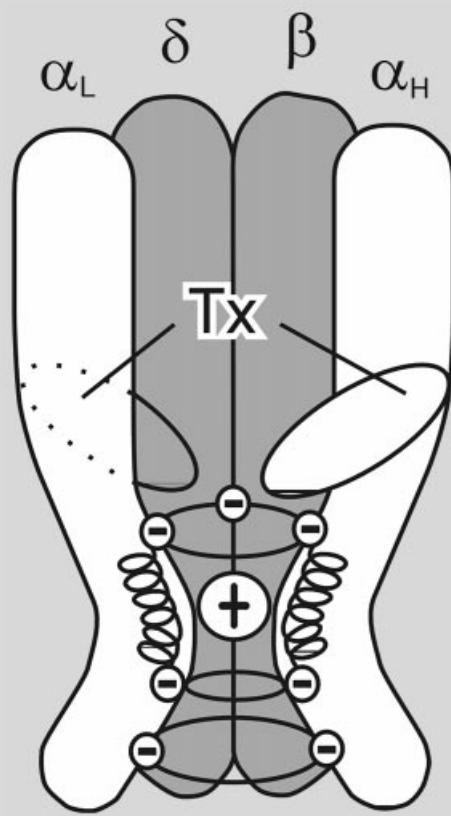
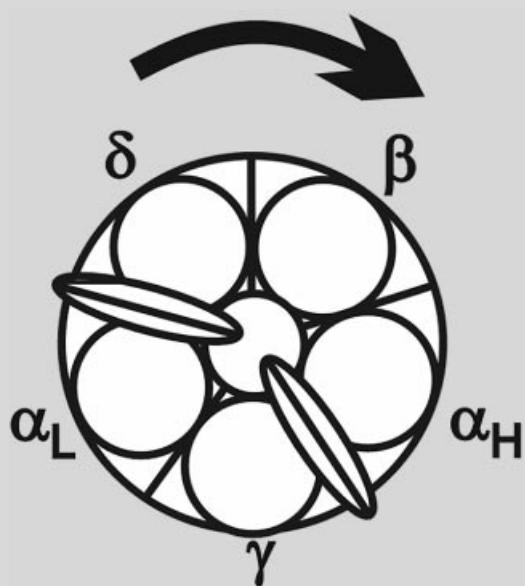


Ionenkanäle ...



... sind Schlüsselproteine für
die Informationsverarbeitung

Ligandengesteuerte Ionenkanäle

Ferdinand Hucho* und Christoph Weise

Ionenkanäle spielen eine zentrale Rolle bei zahlreichen biologischen Prozessen wie der Nervenaktivität oder der Muskelkontraktion. Wie kommt es zu ihrer beeindruckenden Ionenselektivität, wie zur Steuerung der Kanalöffnung durch spezifische Signale? In den letzten Jahren haben Röntgenkristallographie, hochauflösende Elektronenmikroskopie und der Einsatz wei-

terer Methoden wie der Photoaffinitäts-Markierung und der orts-spezifischen Mutagenese in Verbindung mit Patch-Clamp-Elektrophysiologie ein detailreiches Bild von einigen Kanalproteinen gezeichnet. Die neuen Erkenntnisse über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Kanalproteine, die durch die Fortschritte der Forschung im letzten Jahr-

zehnt gewonnen werden konnten, wollen wir hier zu einer umfassenden Beschreibung der Klasse der ligandengesteuerten Ionenkanäle zusammenfassen.

Stichwörter: Ionenkanäle • Neurotransmitter • Proteine • Rezeptoren • Strukturaufklärung

1. Was sind Ionenkanäle und wozu sind sie gut?

Wahrscheinlich alle lebenden Zellen bilden an ihrer Plasmamembran ein Membranpotential aus, ein Diffusionspotential, das auf der Ungleichverteilung von Ionen außerhalb und innerhalb der Zelle sowie auf der Semipermeabilität dieser Membran beruht. Die Größe des Potentials wird durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (1) beschrieben, eine erweiterte Fassung der Nernstischen Gleichung. Dabei ist R die Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin, F die Faraday-Konstante, und P_x , $[X]_o$ und $[X]_i$ stehen für die relativen Permeabilitäten sowie die äußere und innere Konzentration der jeweiligen Ionenart.

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_o + P_{\text{K}}[\text{K}^+]_o + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_o}{P_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_i + P_{\text{K}}[\text{K}^+]_i + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_i} \quad (1)$$

Nervenzellen (Neuronen) nutzen ihr Membranpotential für die Kommunikation innerhalb der Zelle und zwischen Zellen: Lokale Potentialänderungen, die so genannten elektrotonischen Potentiale, sind die Grundlage für Signalprozesse und die Auslösung einer intrazellulären Antwort. Wenn sie bestimmte Schwellenwerte überschreiten, lösen sie außerdem Aktionspotentiale aus. Darunter versteht man vorübergehende starke Depolarisationen und Repolarisationen erregbarer Membranen, die über weite Strecken entlang der neuronalen Membran wandern, bis sie ihr Ende erreichen. Die Nerven-

endigungen bilden zusammen mit der Membran der Nachbarzelle eine Synapse. An der Nervenendigung werden durch die Depolarisation spezifische Substanzen, die Neurotransmitter, freigesetzt, welche ihrerseits eine Depolarisation der Membran der postsynaptischen Zelle bewirken. Dort können dann wiederum lokale Potentiale oder Aktionspotentiale auftreten.

Veränderungen des Membranpotentials, auf denen sowohl lokale als auch Aktionspotentiale beruhen, werden durch Ionenströme durch die Membran verursacht. Die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran stellt eine immens hohe Energiebarriere für geladene Teilchen dar; der Ionenstrom über die Membran wird durch spezielle Transmembranproteine ermöglicht. Diese Proteine, die Ionenkanäle, sind das Thema dieses Aufsatzes.

Ionenkanäle haben einige ungewöhnliche Eigenschaften, die sie zum Gegenstand intensiver biochemischer, biophysikalischer und physiologischer Forschung machen: Zunächst einmal sind sie hochselektiv. So vermögen sie nicht nur zwischen Anionen und Kationen zu unterscheiden, sondern sogar zwischen verschiedenen ein- und zweiwertigen Ionen, z.B. Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . Ein weiteres wichtiges Merkmal ist ihre Antwort auf spezifische Signale: Im Ruhezustand sind sie geschlossen und undurchlässig, durch Änderungen des Membranpotentials oder durch bestimmte Liganden wie Neurotransmitter können sie aber geöffnet („gated“) werden. Im Einklang mit dieser Beschreibung bestehen alle Ionenkanäle aus zwei funktionellen Komponenten (Abbildung 1),

- einem **Selektivitätsfilter (S)**, der bestimmt, welche Ionenart die Membran passieren kann; und
- einer **Schleuse („gate“) (G)**, die festlegt, unter welchen Bedingungen der Kanal geöffnet wird.

[*] Prof. Dr. F. Hucho, Dr. C. Weise

Institut für Chemie – Biochemie
Freie Universität Berlin
Thielallee 63, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-8385-3753
E-mail: hucho@chemie.fu-berlin.de

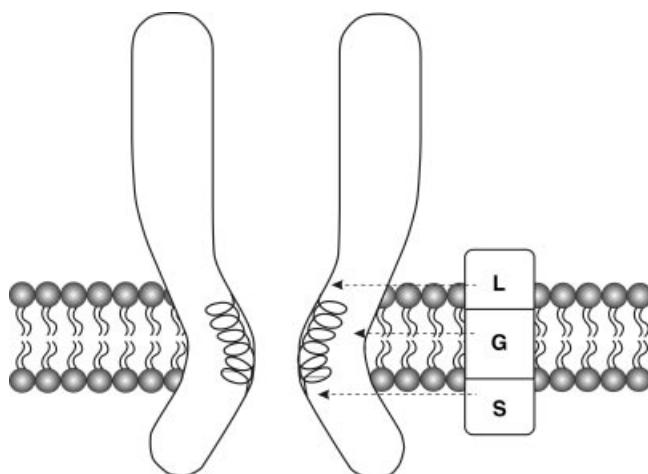


Abbildung 1. Schematische Darstellung eines ligandengesteuerten Ionenkanals – Längsschnitt durch die membran durchspannenden Proteine, der den weiten extrazellulären Eingang (oben) und die Struktur innerhalb der Membran zeigt; der Kanal wird von Transmembran-Helices gebildet und enthält die Schleuse (G) und den Selektivitätsfilter (S). Oberhalb von G und S liegt die Ligandenbindungsstelle (L), welche durch einen allostatischen Mechanismus die Kanalöffnung („gating“) bewirkt.

Nach ihrem Öffnungssignal (L) werden die Ionenkanäle in zwei Hauptklassen unterteilt, die spannungsgesteuerten Kanäle (voltage-gated ion channels, VGCs) und die ligandengesteuerten Kanäle (ligand-gated ion channels, LGCs).

2. Einteilung der ligandengesteuerten Ionenkanäle

Beide Klassen von Kanälen, die spannungsabhängigen wie die ligandengesteuerten, sind vielfältig und umfassen zahlrei-

che Mitglieder. Es ist an dieser Stelle weder beabsichtigt noch möglich, einen umfassenden Überblick zu geben, der sie alle berücksichtigen würde. Wir wollen uns lieber auf einige allgemeine Prinzipien der Struktur und Funktion von Ionenkanälen konzentrieren, die sich aus kristallographischen und molekularbiologischen Arbeiten ableiten lassen. Dabei werden wir zunächst einige andere Kanäle streifen, um uns dann den Neurotransmitter-Rezeptoren zuzuwenden, der pharmakologisch bedeutsamsten und am besten beschriebenen Klasse ligandengesteuerter Ionenkanäle. Definitionsgemäß wird sich unsere Abhandlung darum auf LGCs aus dem Tierreich beschränken, wobei wir nicht unerwähnt lassen wollen, dass sowohl VGCs als auch LGCs auch in Mikroorganismen, in eukaryontischen Einzellen und sogar in Pflanzen vorkommen. Beispielsweise wurden unlängst in *Arabidopsis* mehrere Gene entdeckt, die für ionotrope Glutamat-Rezeptoren kodieren;^[1] diese waren also möglicherweise schon vorhanden, noch bevor sich Pflanzen und Tiere auseinander entwickelten.^[2]

Der Begriff „ionotrop“ besagt, dass der Rezeptor ein Ionenkanal ist, und verweist darauf, dass es einen weiteren Typ von Rezeptoren gibt, die „metabotropen“ Rezeptoren. Diese sind „Sieben-Transmembran(7TM)-Sequenz-Rezeptoren“. Für die meisten Neurotransmitter, mit der Ausnahme von Glycin, gibt es ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Die 7TM-Rezeptoren, die über Kopplung an G-Proteine und nachgeschaltete Enzyme wirken, sind funktionell und mechanistisch völlig anders als die ionotropen Rezeptoren und sollen uns hier nicht weiter beschäftigen.

Ein einfaches Einteilungsschema ergab sich aus der Klonierung und Sequenzierung zahlreicher LGCs. Es stellte sich nämlich heraus, dass einige LGCs ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen, obwohl sie unterschiedliche Funktio-

Ferdinand Hucho studierte in Freiburg Chemie; dort promovierte er 1968 bei Kurt Wallenfels mit einer Arbeit über Enzymkinetik. Als Postdoktorand arbeitete er bei Lester Reed an der University of Texas at Austin über die Regulation von Multienzym-Komplexen. 1973 habilitierte er sich an der Universität Konstanz und wechselte dann das Arbeitsgebiet – weg von der Stoffwechselregulation und hin zur Neurochemie. Am Institut Pasteur in Paris begann Hucho bei Jean-Pierre Changeux mit seinen Arbeiten über Rezeptorproteine und Signaltransduktion. 1979 wurde er Professor für Biochemie in Konstanz; im selben Jahr wechselte er an die Freie Universität Berlin. 1988/89 erhielt er Rufe nach Gießen, Köln und Bochum. Nach der Maueröffnung entschied er sich, in Berlin zu bleiben. 1996 wurde er Mitglied der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften.

Christoph Weise, geboren 1956 in Hof, erhielt sein Biochemie-Diplom (1985) an der Freien Universität Berlin, wo er dann auch in der Neurochemie-Abteilung unter der Betreuung von Ferdinand Hucho über die Acetylcholinesterase promovierte. Seither ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Chemie – Biochemie der Freien Universität Berlin, wo er die proteinchemische Analytik und Fortgeschrittenenpraktika über Proteinchemie im Biochemie-Studiengang betreut. Er forscht über den Acetylcholin-Rezeptor und führte seine Arbeiten über die Acetylcholinesterase bei Forschungsaufenthalten am Institut Pasteur in Paris und am INRA in Montpellier weiter.



F. Hucho



C. Weise

nen haben. Dem Kriterium der Sequenz zufolge lassen sich die LGCs in drei Superfamilien einteilen (Abbildung 2):

1. Die Superfamilie der nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor-artigen Rezeptoren, die folgende Familien umfasst: die Familie der nicotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR), die Glycin-Rezeptoren (GlyR), die GABA_A-Rezeptoren (GABA_AR) und einige Serotonin-Rezeptoren (5-HT₃R)
2. Die Superfamilie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren (GluR)
3. Die ATP-gesteuerten Purin-Rezeptoren (P2X)

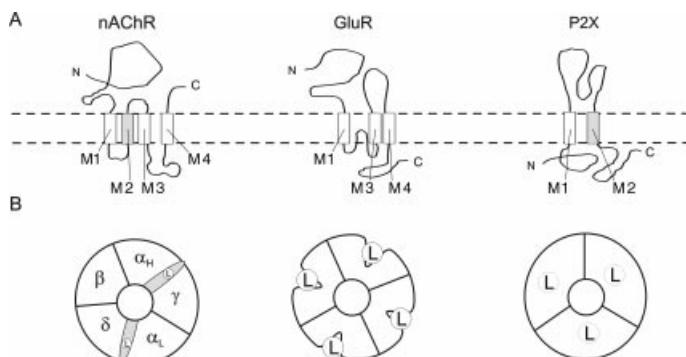


Abbildung 2. Transmembranfaltung (A) und Quartärstruktur (B) der drei Superfamilien der ligandengesteuerten Ionenkanäle – M1 bis M4 bezeichnet die Transmembransequenzen, N und C den Amino- und Carboxy-Terminus des Proteins, L die Bindungstaschen für die jeweiligen Rezeptorliganden. Für den nAChR sind diese so dargestellt, dass sie den Rezeptorkomplex von außen zum Kanallumen hin durchspannen. Bei der gezeigten Stöchiometrie der P2X-Rezeptoren handelt es sich um einen vorläufigen Befund, da sie mit einem heterolog exprimierten Kanalprotein bestimmt wurde.^[5]

Dabei ist eine „Familie“ definiert als Rezeptoren, die durch verschiedene, doch ähnliche Gene kodiert werden und über den grundsätzlich gleichen Mechanismus auf denselben Neurotransmitter ansprechen. Eine „Superfamilie“ umfasst mehrere Rezeptorfamilien mit unterschiedlicher Funktion und Wirkweise, die zumeist auf verschiedene Neurotransmitter ansprechen, aber evolutionär von einem gemeinsamen Vorfahren herzustammen scheinen und neben ihrer Sequenzähnlichkeit auch einige strukturelle Übereinstimmungen bewahrt haben.

Die Mitglieder der Rezeptor-Superfamilie 1 (Abbildung 3) haben alle ähnliche, durch Disulfidbrücken gebildete Peptidschleifen, ähnliche Glycosylierungsmuster und eine übereinstimmende Verteilung von Prolin- und (in einem bestimmten Bereich, der die Kanalwandung bildet) Serin/Threonin-Resten. Am augenfälligsten ist, dass alle Rezeptoren dieser Superfamilie vier hydrophobe Aminosäuresequenzen haben, die lang genug sind, um die Plasmamembran zu durchspannen. Demgemäß werden sie mitunter auch als „Vier-Transmembran(4TM)-Sequenz-Rezeptoren“ bezeichnet.

Die Mitglieder der Glutamat-Rezeptor-Superfamilie haben vermutlich drei Transmembransequenzen. Eine vierte hydrophobe Sequenz tritt von der cytoplasmatischen Seite her in die Plasmamembran ein und verlässt sie auf derselben Seite wieder; man geht davon aus, dass diese in die Membran eintauchende Schleife („re-entrant loop“) die Kanalwand bildet (siehe Abschnitt 4.1.2). Die ATP-bindenden P2X-

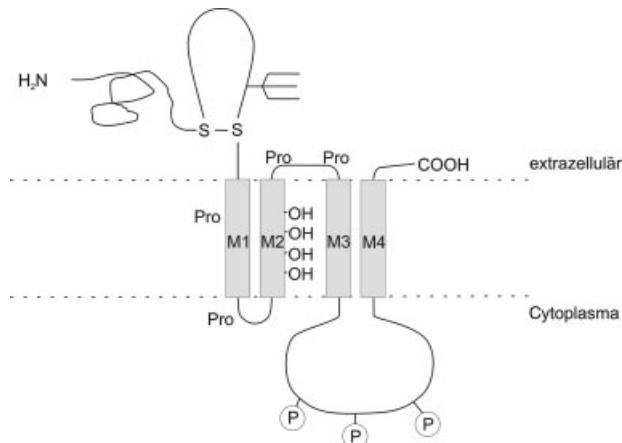


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Transmembranfaltung der Untereinheiten von nAChR-artigen Rezeptoren; gezeigt ist die Lage einer charakteristischen Disulfidbrücke und von Prolin- (Pro) und hydroxygruppenhaltigen Seitenketten entlang der kanalbildenden Transmembran-Helix M2. Der Dreizack markiert die Position von Oligosaccharid-Strukturen. M3 und M4 sind durch eine große cytoplasmatische Schleife verbunden, die Ziel verschiedener Proteinkinasen ist, welche dort Phosphatreste (P) einfügen.

Rezeptoren enthalten dem heutigen Wissensstand nach nur zwei Transmembransequenzen (2TM).

Rezeptoren, die zu derselben Superfamilie gehören, haben vermutlich auch ähnliche Tertiär- und Quartärstrukturen. Wie in Abbildung 2B gezeigt ist, sind die nAChR-artigen Rezeptoren Pentamere,^[3] wohingegen Glutamat-Rezeptoren wahrscheinlich Tetramere sind.^[4] Bei den P2X-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass heterolog exprimierte Rezeptoren zur Bildung stabiler Homotrimere neigen.^[5]

Der Vollständigkeit halber sollte in dieser einführenden Übersicht Erwähnung finden, dass es noch weitere LGCs gibt, z.B. die durch cyclische Nucleotide gesteuerten Kanäle (sie kommen z.B. im Auge in der Retina sowie im olfaktorischen System vor) oder die „Calcium Release Channels“ (Calcium-Freisetzungskanäle), die durch Inositoltriphosphat (IP₃) oder durch Ryanodin gesteuert werden und die Calcium-Durchlässigkeit im endoplasmatischen Retikulum bzw. der T-Tubulus-Membran des Skelettmuskels regulieren. Auch gibt es Wechselbeziehungen zwischen verschiedenen Arten von Ionenkanälen: Unlängst wurde gezeigt, dass TRP-Kanäle, eine spezielle Familie von Calciumkanälen, die den Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle vermitteln (auch „store-operated Ca²⁺-channels“ genannt), durch einen anderen LGC gesteuert werden, nämlich den IP₃-Rezeptor.^[6, 7] Eine weitere Familie von LGCs sind die bei der Schmerzschwahrnehmung wichtigen „Vanilloid-Rezeptoren“ (VR), die durch Protonen (pH < 6.0) und Hitze (>42 °C) gesteuert werden.^[8] Doch auch diese weisen wenig strukturelle und mechanistische Gemeinsamkeiten mit den hier besprochenen neurotransmittergesteuerten Rezeptoren auf.

3. Einige Merkmale von LGCs

Bevor wir auf zwei besonders gut beschriebene LGCs genauer eingehen, möchten wir zunächst einige Prinzipien der Funktion von Neurotransmitter-Rezeptoren vorstellen.

3.1. Grundlagen der Vielfalt

Die funktionelle Vielfalt, die wir im zentralen Nervensystem beobachten, beruht nicht auf der Verwendung vieler verschiedener Transmitter; ihre Zahl ist auf ungefähr ein Dutzend beschränkt. Vielmehr kommt es dazu durch die Vielzahl an Rezeptoren. Bei vielen LGCs wird die Quartärstruktur aus mehreren verschiedenen, doch homologen Untereinheiten gebildet.^[9] Bei der Klonierung der neuronalen nikotinischen Rezeptoren zeigte sich, dass es hier zahlreiche Untereinheiten gibt und dadurch eine hohe Komplexität entsteht. Bei jedem Rezeptor gibt es eine umfangreiche Familie verwandter Gene für Rezeptor-Untereinheiten, die auf kombinatorische Weise zu Rezeptoren unterschiedlicher Funktion zusammengebaut werden können. So wurden 11 verschiedene Untereinheiten für die neuronalen nAChRs gefunden, 5 für periphere nAChRs, 16 für GluRs und mindestens 17 für GABA_ARs.^[10] Letztere Familie kann in sechs Klassen von Untereinheiten (α , β , γ , δ , ε , ρ) unterteilt werden, die etwa 20 bis 30 % Sequenzidentität zwischen und 70 % innerhalb dieser Klassen aufweisen. Im Gehirn von Vertebraten wurde ein Zusammenbau der meisten dieser Untereinheiten beschrieben. Für die GluRs können noch weitere Varianten durch alternatives Spleißen hinzukommen sowie im Falle einiger bestimmter Rezeptor-Subtypen (siehe Abschnitt 4.1.2) durch RNA-Editierung.^[11, 12] Die funktionelle Bedeutung dieses Phänomens wird in dem Abschnitt über Glutamat-Rezeptoren dargelegt werden.

Die riesige Zahl möglicher Kombinationen bildet das Potential für eine ungeheure funktionelle, räumliche und zeitliche Vielfalt. Inwieweit diese Heterogenität *in vivo* tatsächlich zum Tragen kommt, ist eine noch unbeantwortete Frage.

3.2. Regulation

LGCs werden nicht nur direkt durch ihren Transmitter reguliert, sondern weiterhin durch die Bindung verschiedener zusätzlicher Liganden, über allosterische Mechanismen und posttranskriptionale Modifizierungen (z.B. Phosphorylierung) sowie während ihrer Biosynthese, die von präsynaptischer und elektrischer Aktivität abhängt.

Verschiedene Rezeptorliganden

Der Auslöser für die Kanalöffnung der LGCs ist die Bindung eines spezifischen Neurotransmitters, sie können jedoch auch durch eine ganze Anzahl anderer Substanzen außer ihrem physiologischen Liganden beeinflusst werden. Einige dieser Verbindungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Je nach ihrer Funktion werden sie in verschiedene Gruppen eingeteilt: Agonisten lösen dieselbe Antwort aus wie der physiologische Ligand – z.B. ist Nicotin ein Agonist des nAChR. Antagonisten blockieren die Wirkung von Agonisten, normalerweise dadurch, dass sie mit vergleichbarer Affinität dieselben Bindungsstellen wie diese besetzen. Der Grund, warum Agonisten und Antagonisten so unterschiedliche Wirkungen haben, ist meist nicht bekannt. Viele in der

Natur vorkommende pflanzliche oder tierische Toxine sind Antagonisten von LGCs: Beispielsweise bindet Strychnin an den GlyR und (+)-Tubocurarin und α -Toxine aus dem Venom von Giftschlangen an den nAChR. In vielen Fällen sind solche Toxine wertvolle Werkzeuge für die biochemische Rezeptorforschung (Übersicht in Lit. [13]).

Eine dritte Gruppe von Rezeptorliganden bilden die nicht-kompetitiven Inhibitoren (non-competitive inhibitors, NCIs), eine in struktureller Hinsicht heterogene Gruppe von Verbindungen, welche an Bindungsstellen auf der Rezeptoroberfläche binden, die von der Agonisten-Bindungsstelle verschieden sind. Sie wirken entweder allosterisch oder häufig auch dadurch, dass sie an hochaffine Bindungsstellen im Ionenkanal selbst andocken, wodurch sie den Ionenfluss sterisch blockieren („Kanalblocker“). Diese Substanzen finden zur Untersuchung der Struktur von Ionenkanälen Verwendung. Zu den NCIs zählen Pharmaka wie Lokalanästhetika und Neuroleptika sowie in der Natur vorkommende Alkaloide, z.B. Froschtoxine.

Noch komplizierter wird das Bild durch die pharmakologisch sehr interessante Substanzgruppe der inversen Agonisten. Diese Stoffe wirken an derselben Bindungsstelle wie Agonisten, sie rufen jedoch eine entgegengesetzte Wirkung hervor. Derartige Substanzen sind für die Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA_AR beschrieben. Benzodiazepine sind weit verbreitete Beruhigungsmittel und wirken angstlösend. Die Ester von β -Carbolinen wirken als inverse Agonisten in Bezug auf Benzodiazepine; sie rufen eine entgegengesetzte Wirkung hervor, d.h. sie bewirken Angstzustände, Schlaflosigkeit und Krämpfe.

Allosterische Regulation

In vielen Systemen übernimmt ein separates Protein die Rolle eines Überträgers zwischen dem Rezeptor und dem Effektor – bei den 7TM-Rezeptoren die G-Proteine. Bei den LGCs gibt es jedoch kein solches Kopplungsprotein; hier kommunizieren die Rezeptor-Domäne (Ligandenbindungsstelle) und der Effektor (Ionenkanal) durch Konformationsänderungen innerhalb des Rezeptorproteins. Die für diesen Vorgang nötige Energie stammt aus der Ligandenbindungsenergie.

Die LGCs sind allosterisch regulierte Proteine, d.h., sie regulieren ihre Aktivität durch die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen verschiedenen funktionellen Zuständen, die verschiedenen Konformationszuständen entsprechen. Der nAChR z.B. zeigt ganz klassisches allosterisches Verhalten: Sowohl die Ligandenbindung als auch die Kanalöffnung sind kooperative Vorgänge, wie aus dem sigmoidalen Verlauf von Dosis-Antwort-Kurve und Bindungskurve hervorgeht (Übersicht in Lit. [14]).

Phosphorylierung

Posttranskriptionale Modifizierungen bilden eine weitere Regulationsebene. Die LGCs enthalten in ihren cytosolischen Bereichen mehrere Phosphorylierungsstellen, die durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden können.^[15] Das am

Tabelle 1. Auswahl spezifischer Liganden der drei Superfamilien ligandengesteuerter Ionenkanäle.

Superfamilie	Agonist	Kompetitiver Antagonist	Nichtkompetitiver Antagonist
Ⓐ nAChR	 Acetylcholin	 (+)-Tubocurarin	 TPMP ⁺
		 α -Neurotoxin	 Tetracain
Ⓑ Glu	 Glutamat Kainat AMPA NMDA	 D-AP5	 Phencyclidin
Ⓒ P2X	 ATP α, β -Methylen-ATP	-	-

besten charakterisierte System ist der nAChR der neuromuskulären Synapse: Agrin stimuliert hier die Phosphorylierung von Tyrosinresten (Übersicht in Lit. [16]), während Phosphorylierung an Serinresten durch das Neuropeptid CGRP (über Proteinkinase A) und durch Acetylcholin (über Ca^{2+} -abhängige Kinasen) stimuliert wird. Obwohl unter artifiziellen Bedingungen eine Regulation der Kanalaktivität durch Phosphorylierung zu beobachten war – so wird z. B. die Geschwindigkeit der Desensitivierung des Muskel-nAChR verändert –, steht ein überzeugender Beweis für eine In-vivo-Regulation noch aus. Gewiss haben diese Modifizierungen das Potential, die synaptische Übertragung zu modulieren, doch ihre tatsächliche Bedeutung ist noch weitgehend unverstanden.

Protein-Protein-Wechselwirkung

LGCs interagieren mit Proteinen im Inneren der Zelle. Der GlyR ist über das periphere Membranprotein Gephyrin mit Cytoskelett-Komponenten verbunden.^[17] Beim nAChR scheint das Protein Rapsyn diese Aufgabe wahrzunehmen, beim GABA_AR das Protein GABARAP.^[18] Verschiedene Subtypen des GluR binden an spezifische Gerüstproteine der postsynaptischen Dichte wie PSD-95 oder GRIP.^[19, 20] Auf diese Weise kommt es zur Bildung umfangreicher Proteinkomplexe dicht unter der neuronalen Membran (Übersicht in Lit. [21]). Diese Wechselwirkungen scheinen die Grundlage für eine lokale Anreicherung (clustering) und eine gezielte

subzelluläre Lokalisierung (targeting) der LGCs zu sein und regulieren dadurch ihre Aktivität und posttranskriptionale Modifizierung; es ergibt sich aber auch die Möglichkeit einer direkten Signalfortleitung (signalling) in die Zelle. Der NMDA-Rezeptor ist Bestandteil eines kürzlich aus der Ratte isolierten Signalkomplexes, der aus mindestens 77 Proteinen besteht.^[22]

Regulation der Biosynthese

Die Biosynthese der LGCs unterliegt einer strikten Regulation. Am besten versteht man diesen Vorgang für den nAChR bei der Bildung der neuromuskulären Synapsen (Übersicht: Lit. [23]). Die hohe lokale Rezeptordichte in subsynaptischen Bereichen wird sowohl durch präsynaptische Faktoren (hereinwachsende Motoneuronen) als auch durch postsynaptische Faktoren (elektrische Aktivität) bewirkt. Zunächst werden ursprünglich diffus über die gesamte Zelloberfläche verteilte Rezeptoren in die subsynaptische Zone dirigiert. In der Folge wird die Transkription der nAChR-Gene ausschließlich in den Kernen verstärkt, die sich in der Nähe der sich entwickelnden Synapse befinden; dabei spielen präsynaptisch freigesetzte Proteine wie Agrin und Neuregulin eine Rolle. Im Gegensatz dazu wird die Transkription in extrasynaptischen Kernen als Antwort auf eine Depolarisation (Rezeptor-Aktivierung) herunterreguliert.

3.3. LGCs und Krankheiten

Wegen ihrer Fähigkeit, Veränderungen an der Synapse hervorzurufen, ist zu erwarten, dass LGCs bei verschiedenen mentalen Störungen wie Schizophrenie, Epilepsie oder Depressionen eine wichtige Rolle spielen und dass Medikamente, die LGCs zum Angriffspunkt haben, zu deren Behandlung eingesetzt werden können. Hauptsächlich durch „positional cloning“ (Klonierung aufgrund der Lage) hat man herausgefunden, dass einige Erbkrankheiten des Menschen auf Mutationen von LGC-Genen beruhen (aufgelistet in Lit. [24]): Mutationen des nAChR der neuromuskulären Endplatte, die die normale Übertragung beeinträchtigen, sind Grundlage des angeborenen myasthenischen Syndroms,^[25] während Mutationen im Gen der neuronalen nAChR-Untereinheit $\alpha 4$ verschiedene Krankheiten wie benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe^[26] oder eine partielle Form der Epilepsie namens autosomale dominante nächtliche Frontlappen-Epilepsie bedingen können.^[27] Hyperekplexie (Startle-Syndrom) ist die Folge eines Defektes im GlyR-Gen GLRA1.^[28] Weiterhin verursachen Antikörper gegen den nAChR die Autoimmunerkrankung *Myasthenia gravis* (schwere Muskelschwäche).^[29]

4. Ausgewählte Vertreter der LGC-Familien

Für eine eingehendere Beschreibung wählen wir zwei LGCs aus: den Glutamat-Rezeptor (GluR) und den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR). Keiner von beiden

wurde bisher kristallisiert, aber wir kennen genügend molekulare Details, um die folgenden grundsätzlichen Fragen zu besprechen:

- Was ist die molekulare Basis der beeindruckenden Ionenselektivität (des „Selektivitätsfilters“)?
- Was ist das strukturelle Korrelat für den „Gating-Mechanismus“?

Im Falle der LGCs beinhaltet dies die Frage nach den molekularen Voraussetzungen für die Selektivität bezüglich des auslösenden Signals, d.h. der Struktur der Neurotransmitter-Bindungstasche, und für die Kopplung von Bindung und Kanalöffnung („gating“).

4.1. Glutamat-Rezeptoren

4.1.1. Die „Familie“, Funktion und Struktur

Glutamat ist der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Es entfaltet seine Wirkung sowohl durch metabotrope als auch durch kationenselektive ionotrope Rezeptoren. Die letzteren bilden eine große Familie von ligandengesteuerten Ionenkanälen, die AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren umfasst (AMPA steht für α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat; Kainat ist ein Naturstoff, ein von Algen produziertes erregungstoxisches Glutamat-Analogon; NMDA ist *N*-methyl-D-Aspartat; siehe Tabelle 1). Alle drei Subtypen sprechen auf Glutamat an, doch man kann sie anhand ihrer Reaktion auf künstliche Agonisten unterscheiden. Sie unterscheiden sich stark in ihrer Verteilung im Gehirn, ihrer physiologischen Funktion, ihrem Mechanismus und der Kinetik der Aktivierung und Regulation. Wir beabsichtigen nicht, an dieser Stelle die zahlreichen umfassenden Übersichtsartikel zum Thema GluR zu wiederholen,^[30-32] wir wollen nur einige Informationen zur Struktur zusammentragen, die für eine vertiefte Diskussion der beiden oben genannten grundsätzlichen Fragen nötig sind.

Die Primärstrukturen von vielen, wenn nicht gar allen GluRs, inklusive einiger Spleißvarianten, sind durch Klonierung und Sequenzierung ihrer cDNA bekannt. Zu ihrer Nomenklatur und ihren evolutionären Beziehungen gibt Abbildung 4 Auskunft. Wie die nAChR-artigen Rezeptoren enthalten die GluR-Untereinheiten je vier auffallend hydrophobe Sequenzen, aber es wird derzeit angenommen, dass sie im Gegensatz zu den 4TM-Rezeptoren die Membran nur drei Mal durchspannen (Abbildung 5). Die zweite hydrophobe Sequenz taucht nur kurz in die Membran ein: Sie tritt auf der cytoplasmatischen Seite in die Plasmamembran ein und kommt dort auch wieder heraus, wobei sie zwei die Kanalwand formende antiparallele β -Stränge bildet. Mehrere, wahrscheinlich vier, dieser Polypeptidketten bilden homo- oder heterooligomere Quartärstrukturen.

4.1.2. Der Selektivitätsfilter: Schützenhilfe von einem bakteriellen Kanal

Bevor wir die Kanalstruktur des GluR besprechen, müssen wir uns den spannungsgesteuerten Ionenkanälen zuwenden, denn einer von ihnen, der Kaliumkanal KcsA aus dem

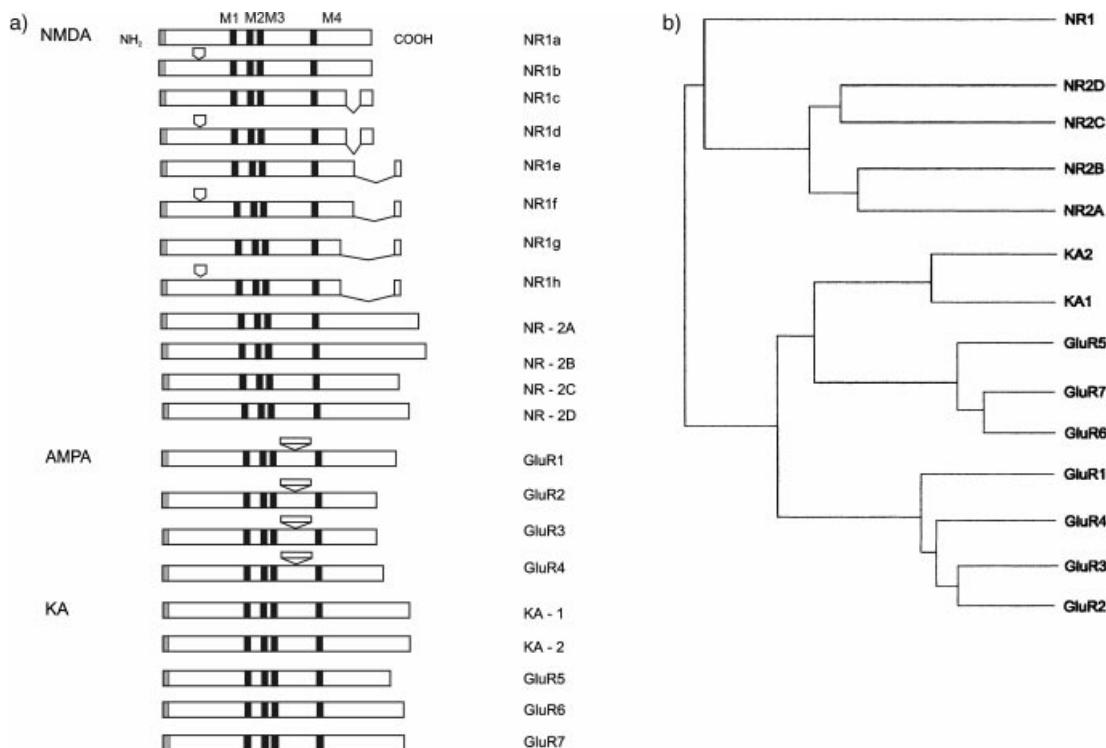
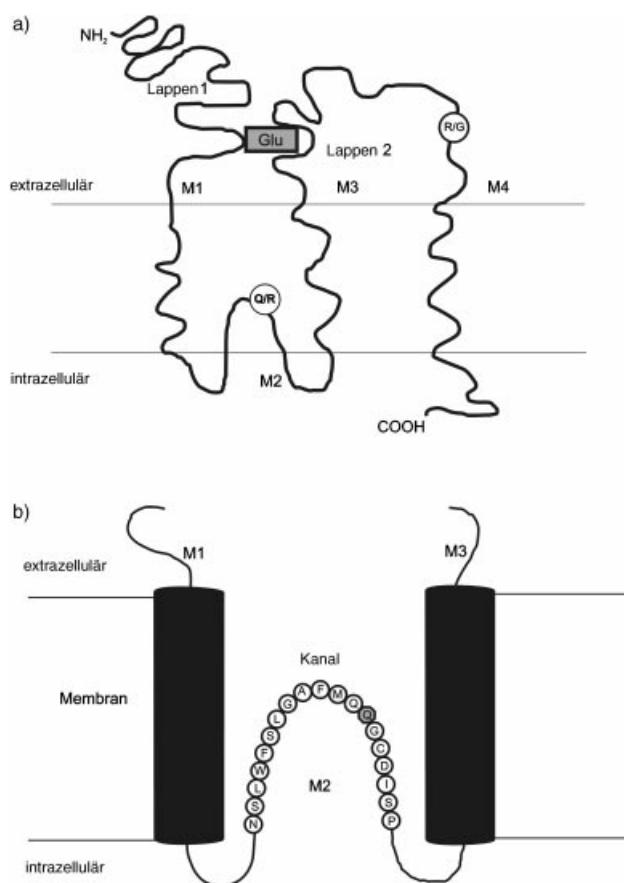


Abbildung 4. Heterogenität der Glutamat-Rezeptoren. a) Lineare Darstellung der Struktur von ionotropen Glutamat-Rezeptoren; NR steht hier für den NMDA-Subtyp, GluR für die AMPA- und Kainat-Subtypen und KA für Kainat-Bindungsproteine. Die schwarzen Kästen stellen die hydrophoben Sequenzen M1 – M4 dar, der graue Kasten am NH₂-Terminus das Signalpeptid. Varianten entstehen durch Spleißen; die Pfeile über dem Diagramm weisen auf solche Spleiß-Inserts hin. Die V-förmigen Linien stehen für Insertions/Deletionen, die für ein optimales Alignment eingefügt werden müssen. (Abbildung modifiziert nach Lit. [30]) b) Evolutionärer Stammbaum der Glutamat-Rezeptoren: Ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahrer (links) hat sich ihre heutige Vielfalt (rechts) mit unterschiedlichen pharmakologischen Profilen und funktionellen Eigenschaften herausgebildet.



Bakterium *Streptomyces lividans*, wurde kürzlich kristallisiert und liefert uns zum ersten Mal das Bild einer Ionenkanalstruktur mit 3.2 Å Auflösung (Abbildung 6).^[33] Einige seiner Merkmale erlauben es uns, die Ionenselektivität von spannungsgesteuerten und eventuell auch von ligandengesteuerten Ionenkanälen und den kanalvermittelten Ionenfluss durch die Membran-Lipidphase zu verstehen.

Wir haben gute Gründe, diesen prokaryontischen Kanal als Modell für den eukaryontischen GluR zu verwenden: Eine bisher fehlende evolutionäre Verbindung wurde kürzlich entdeckt, der Glutamat-Rezeptor GluR0 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis*.^[34] Dieses Protein hat Sequenzähnlichkeit sowohl mit eukaryontischen GluRs als auch mit Kaliumkanälen. Es ist ein kaliumselektiver LGC und trägt sogar die für Kaliumkanäle charakteristische Erkennungssequenz TVGYGD. Der KcsA-Kanal ist aus vier identischen Polypeptidketten aufgebaut, von denen jede zwei membran durchspannende Sequenzen (2TM) und einen „re-entrant loop“ (eine in die Membran eintauchende Schleife) namens P-Schleife enthält. Wie bei den GluR-Kanälen kleidet diese

Abbildung 5. Funktionelle Domänen von Glutamat-Rezeptoren. a) Die Agonistenbindungsstelle liegt zwischen den beiden Hälften der gefalteten Polypeptidkette; M2 stellt die in die Membran eintauchende Schleife („re-entrant loop“) dar, die den Ionenkanal bildet; Q/R ist Ort einer durch RNA-Editierung eingefügten Modifikation, die die Ionenleitfähigkeit reguliert. b) Vergrößerte Darstellung von M2; der dunkel unterlegte Glutaminrest (Q) wird durch RNA-Editierung durch Arginin (R) ersetzt. (Abbildung modifiziert nach Lit. [30])



Abbildung 6. Stereobild der Struktur des Kaliumkanals KcsA im Kristall.^[33] Oben: Die Faltung des KcsA-Tetramers vom extrazellulären Raum her gesehen. Unten: Seitliche Ansicht des Kanals. (Abbildung freundlicherweise von Roderick MacKinnon zur Verfügung gestellt; reproduziert mit freundlicher Genehmigung der Autoren und von Science.)

Schleife die Pore aus und enthält die Determinanten für die Ionenselektivität und die Leitfähigkeit.

Kaliumkanäle sind schwach durchlässig für die größeren Rb⁺- und so gut wie undurchlässig für die kleineren Na⁺- und Li⁺-Ionen. Dies zeigt, dass Kanäle nicht einfach Löcher sind, die Ionen mit einem bestimmten Radius herausfiltrieren. Alle können sie kleine Ionen leiten, wenn diese ihrer Hydrathülle beraubt sind; die Selektivität der Kanäle entsteht durch ihre Fähigkeit, die Wasserdipole zu entfernen, die die geladenen Teilchen umgeben (Abbildung 7). Der K⁺-Selektivitätsfilter wird von Carbonyl-Sauerstoffatomen gebildet: „To compensate for the energetic cost of dehydration, the carbonyl oxygen atoms must take the place of the water oxygen atoms, come in very close contact with the ion, and act like surrogate water. ... a K⁺ ion fits in the filter precisely so that the energetic costs and gains are well balanced“.^[33] Für das kleinere Na⁺ sind die Carbonyl-Sauerstoffatome zu weit entfernt, als dass sie einen energetischen Gewinn beisteuern könnten, um die Kosten der Dehydratisierung auszugleichen.

Dieser geniale Mechanismus wirft jedoch ein Problem auf: Wie kann ein großer Kationenfluss gewährleistet werden, wenn die Kationen so fest im Selektivitätsfilter gebunden werden? Dieses Problem wird durch einen nicht weniger genialen Mechanismus gelöst: Es befinden sich immer zwei Kationen gleichzeitig im Selektivitätsfilter (Abbildung 7 b). Ihre große Nähe und Abstoßung überwindet die ansonsten starke Wechselwirkung zwischen Ion und Protein. Dadurch wird schnelle Leitung bei gleichzeitiger hoher Selektivität ermöglicht.^[33]

Wir werden dem Thema der Protein-Sauerstoffatome im Selektivitätsfilter bei den in Abschnitt 4.2.2 besprochenen LGCs wieder begegnen. Die Struktur des mikrobiellen K⁺-Kanals im Kristall bestätigte die Existenz des für die LGCs postulierten weiten wassergefüllten Eingangs zum Kanal. Im Falle des K⁺-Kanals liegt vor dem Selektivitätsfilter (der nur 12 Å der Dicke der Membran einnimmt) eine tiefe, größtenteils hydrophobe Höhlung. Diese Höhlung ist weit genug, dass sie mit Wasser gefüllt sein und das Kation in seiner hydratisierten Form aufnehmen kann. So kann das Kation den Großteil der Membran bis zum Selektivitätsfilter ganz einfach durchqueren; die elektrostatische Barriere, die die Membran bildet, wird somit herabgesetzt. Der experimentelle Beweis hierfür ist einfach: Tetraethylammonium (TEA) ist ein selektiver Kaliumkanalblocker. Es passt in die Höhlung hinein und verstopft diese

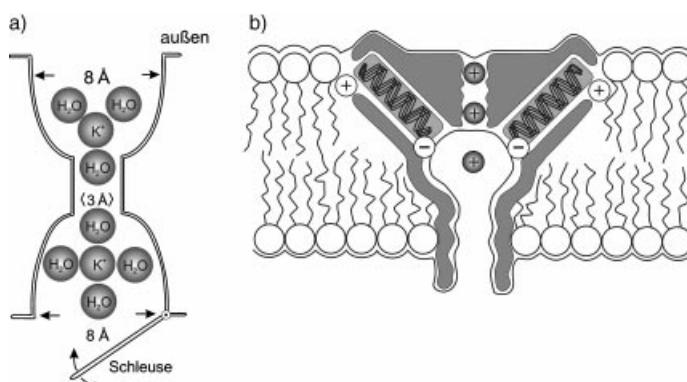


Abbildung 7. Der Ionenpfad durch spannungsabhängige Ionenkanäle, die ähnliche strukturelle Merkmale wie ligandengesteuerte Ionenkanäle aufweisen. a) Historische Darstellung von Kaliumkanälen, die den Durchmesser der intra- und extrazellulären Eingänge (Vestibül) und des Selektivitätsfilters angibt, der den Durchtritt nur für partiell dehydratisierte Kationen freigibt; b) die heutige Sichtweise, die auf den Ergebnissen von röntgenkristallographischen Untersuchungen beruht (Näheres siehe Text). (Abbildung modifiziert nach Lit. [33]).

dann, da es seine „Liganden“ nicht abstreifen kann wie das Kalium seine Hydrathülle.

Für die Kanäle der GluRs, für die eine röntgenkristallographische Karte noch fehlt, müssen wir stattdessen auf indirektere Methoden zurückgreifen, z.B. auf eine Kombination aus ortsgerechter Mutagenese und elektrophysiologischen Patch-Clamp-Untersuchungen. Solche Experimente haben gezeigt, dass eine Schleife ähnlich der P-Schleife der Kaliumkanäle die Kanalwand und den Selektivitätsfilter bildet (Abbildung 5).^[35] Interessanterweise bestimmt ein einziger Aminosäurerest in dieser Schleife, ob der Kanal für Calciumionen durchlässig ist oder nicht. Ein spezifischer Asparaginrest (N) in der P-Schleife des NMDA-Rezeptors ist für seine Calciumdurchlässigkeit ausschlaggebend. Die Natur nutzt diese Schlüsselposition: Im AMPA-Rezeptor ist die entsprechende Stelle von Glutamin (Q) besetzt; wandelt man diesen Rest in Arginin (R) um, wird der Kanal (besonders GluR2) so gut wie undurchlässig für Calciumionen. Diese Q/R-Umwandlung erfolgt durch einen seltenen Mechanismus, die so genannte RNA-Editierung (Übersicht in Lit. [36]): Auf der Ebene der prä-mRNA wird das Codon CAG für Glutamin enzymatisch zu CIG desaminiert (Adenosin zu Inosin, katalysiert von einer Adenosin-Desaminase). Es wäre sehr aufschlussreich, die Auswirkungen dieses Q/R-Austausches in einer Proteinkarte von atomarer Auflösung zu sehen, aber leider ist hier noch keine Kristallstruktur verfügbar.

Um den Gating-Mechanismus zu verstehen, mussten wir zu dem KcsA-Kanal als Modell für LGCs Zuflucht nehmen. Was die Ligandenbindungsstelle des GluR betrifft, die sowohl die Spezifität des Signals als auch den Auslösemechanismus für die Öffnung des Kanals bestimmt, ist es für uns einfacher, da die 3D-Struktur dieser Domäne des Transmitter-Rezeptors selbst vorliegt: Die Ligandenbindungsdomäne des GluR wurde im Komplex mit dem toxischen Agonisten Kainat kristallisiert, und ihre Struktur wurde mit hoher Auflösung aufgeklärt.^[37] Zuvor hatten Mutagenese-Experimente schon gezeigt, dass die Ligandenbindungsdomäne von GluRs aus zwei nichtkontinuierlichen Sequenzen, S1 und S2, aufgebaut ist.^[38, 39] S1 umfasst etwa 150 N-terminale Aminosäuren und endet mit TM1, S2 verbindet TM3 mit TM4. Fusioniert man nun mithilfe rekombinanter DNA-Techniken S1 mit S2 über ein kurzes Peptid, so erhält man ein wasserlösliches Protein, das in großer Menge in Bakterien exprimiert werden kann.^[40, 41] Diese künstliche Bindungsdomäne hat Ligandenbindungs- und pharmakologische Eigenschaften, die denen des natürlichen Gesamtrezeptors sehr ähnlich sind. Röntgenkristallographie dieses Expressionsproduktes ergab eine Gesamtstruktur, die einer Venus-Fliegenfalle ähnelt (siehe Ab-

bildungen 6 oben und 9): Die beiden Hälften kommen nahe zusammen und halten den Liganden (Kainat) gefangen. Interessanterweise ähnelt dieses Venus-Fliegenfalle-Modell der Situation im bakteriellen Glutamin-Bindungs-Protein QBP, das nur geringe Sequenzähnlichkeiten mit GluRs zeigt.^[42]

Aminosäurereste beider Hälften sind an der Ligandenbindung beteiligt. Kainat bindet tief unten in einer Spalte, die von diesen beiden Hälften gebildet wird. Jede Hälfte streckt zwei Helices mit ihrem jeweiligen Aminoterminus (dem positiven Ende ihrer Dipoles) in Richtung der negativ geladenen Carboxygruppe des Agonisten. Wenn der Ligand bindet, werden die beiden Hälften zusammengezogen, und die Falle schnappt zu. Zusammen mit vorangegangenen Mutationsexperimenten können nun die Bereiche ausgemacht werden, die Bindungsaffinität und -spezifität bestimmen (Abbildung 8).^[43–45] Zum Beispiel bindet die 2-Carboxygruppe von Kainat an einen Argininrest (R485 in GluR2) und an die NH-Gruppe eines Threoninrestes (T480) im Polypeptid-Rückgrat.

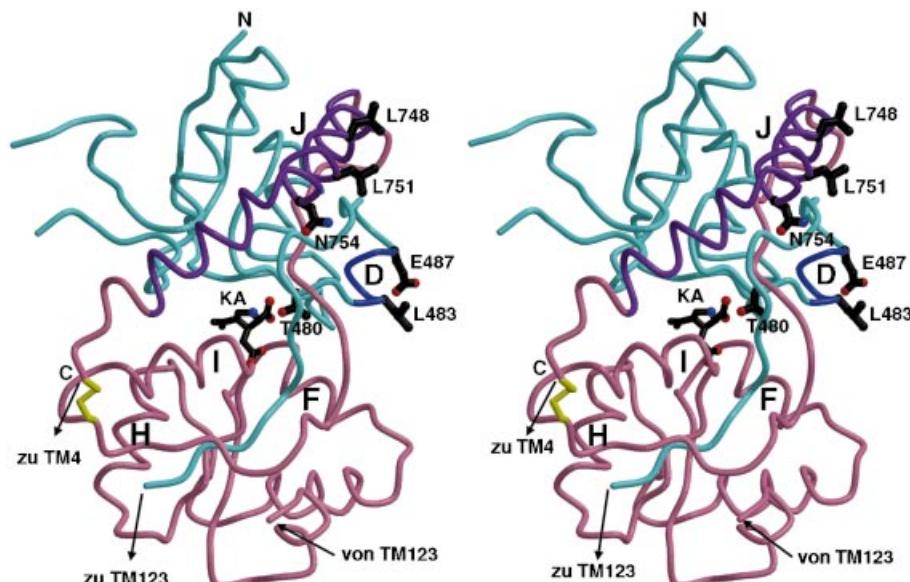


Abbildung 8. Stereobild der hochauflösten Struktur der Ligandenbindungsstelle des AMPA-Subtyps des Glutamat-Rezeptors, cokristallisiert mit dem Liganden Kainat (KA). Die obere Hälfte (in Türkis und Violett dargestellt) und die untere (in Rosa) bilden zusammen eine Struktur ähnlich einer Venus-Fliegenfalle. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von Eric Gouaux.)

Neuere Experimente, bei denen ein ähnliches GluR-Konstrukt mit verschiedenen Liganden cokristallisiert wurde, zeigten zum ersten Mal den Mechanismus, der Aktivierung und Antagonismus zugrunde liegt: Das Ausmaß der ligandeninduzierten Aktivierung hängt davon ab, wie weit die Falle geschlossen wird. In welchem Ausmaß die beiden Domänen in dem Fliegenfallen-Modell zusammengezogen werden, hängt wiederum von der Natur des Liganden ab.^[46] Agonisten bewirken das Schließen der Falle, was schließlich zur Aktivierung des Kanals führt. Die Bindung von partiellen Agonisten resultiert in entsprechend kleineren Konformationsänderungen, wohingegen Antagonisten das Ligandenbindungszentrum in seiner offenen Konformation einfrieren.

4.1.3. Der Gating-Mechanismus

Um zu verstehen, wie die Kanalöffnung vonstatten gehen könnte, greifen wir erneut auf den mikrobiellen KcsA-Kanal zurück, obwohl die physiologische Relevanz dieses Mechanismus hier nicht ganz klar ist und wir im Auge behalten sollten, dass der Öffnungsmechanismus bei den LGCs ganz anders aussehen könnte. Der KcsA-Kaliumkanal von *Streptomyces lividans* kann bei niedrigem extrazellulärem pH-Wert in seinem offenen Zustand stabilisiert werden. Protonen scheinen die „Liganden“ zu sein, die die Kanalöffnung auslösen. Die Transmembran-Helices TM1 und TM2 der vier Kanaluntereinheiten bilden die Pore. Am oberen (extrazellulären) Ende ist der Selektivitätsfilter lokalisiert, der aus vier P-Schleifen besteht, aber wo finden wir die Schleuse? Aufgrund der Ergebnisse von Ionenfluss-Experimenten und CD-, FTIR- und EPR-spektroskopischen Untersuchungen an Wildtyp- und mutierten Kanälen inklusive einwärts gleichrichtenden Kanälen („inward-rectifier channels“) von Eukaryonten (in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefasst^[47]) wurde folgendes Modell vorgeschlagen: Während der Kanalöffnung kommt es zu Konformationsänderungen entlang von TM2. Diese gehen mit keinen starken Veränderungen der Sekundärstruktur einher und sind auch nicht auf den intrazellulär gelegenen Carboxyterminus der Helices beschränkt (wo sich die Schleuse von spannungsgesteuerten K⁺-Kanälen befindet). TM1 und TM2 zusammen verdrehen sich als Ganzes leicht und rotieren entgegen dem Uhrzeigersinn. Diese „Festkörperbewegung“ bewirkt die Weitung des Kanals, wie schematisch in Abbildung 9 dargestellt ist.^[48] Die

tet wird (besprochen in Lit. [49]), wo z. B. ein kanalverschließender Ppropfen nach Aktivierung entfernt wird („Kugel- und -Kette-Mechanismus“).

Es sollte darauf hingewiesen werden, dass unsere Vorstellungen von den Vorgängen bei der Kanalöffnung, wie sie in diesem Abschnitt skizziert wurden, oft nur auf indirekten biophysikalischen Befunden und auf statischen röntgenkristallographischen Bildern beruhen. Deshalb sollten sie als spekulativ bewertet werden, und es sollte Klarheit darüber bestehen, dass weitere Experimente zu ihrer Bestätigung erforderlich sind.

4.1.4. Die Kristallographie zeigt die Verlässlichkeit biochemischer und indirekter Methoden zur Strukturaufklärung

Die erste Röntgenstrukturanalyse einer wichtigen Domäne eines ligandengesteuerten Kanals zeigt vor allem einen für die gesamte Forschung auf diesem Gebiet wichtigen Aspekt auf: Kristallographie und Molekularbiologie sind nicht nur komplementäre Methoden; schon die enorme Menge an Befunden, die durch biochemische und biophysikalische Forschung inklusive rekombinanter DNA-Methoden zusammenkommt, liefert offensichtlich verlässliche Informationen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Die Erfahrungen, die wir in den fünfziger und sechziger Jahren mit vielen Enzymen machten, deren Struktur später aufgeklärt wurde, lehren, dass die Röntgenkristallographie uns nicht zur Korrektur der 3D-Modelle zwingt, die aufgrund der „klassischen“ Ansätze entstanden. Vielmehr bestätigt sie diese und fügt viele wichtige Details hinzu.

Die Untersuchungen an LGCs bestätigen außerdem die Aussagekraft einer weiteren Methode, der Homologiemodellierung. Die agonistenbindende Domäne des GluR hat in geringem Umfang Sequenzidentität mit verschiedenen löslichen bakteriellen periplasmatischen Substratbindungs-Proteinen, für die hochauflöste Strukturen vorliegen.^[50] Diese wurden als Vorlage zur Berechnung der Struktur der GluR-Bindungsdomäne und zur Ausarbeitung eines Modells für die Agonistenbindungsstelle verwendet. Jetzt, da die erste hochauflöste Struktur einer GluR-Bindungsdomäne vorliegt,^[51] sehen wir, dass dieser Ansatz trotz der eher geringen Sequenzähnlichkeit sehr vernünftige Ergebnisse erbracht hat,^[51] und können deshalb zuversichtlich sein, dass die Vorhersagen für andere Proteine im Wesentlichen ebenfalls zutreffen werden.

Was ist nun der Nutzen eines solch detaillierten Wissens? Über 50 % aller Synapsen in unserem Gehirn nutzen Glutamat als Transmitter. GluRs sind an der Entwicklung des Gehirns beteiligt und spielen bei vielen Neuropathien eine Rolle, von Epilepsie über Schlaganfall bis zu Morbus Alzheimer, Huntington und Parkinson. Die Kenntnis der genauen sterischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften der Ligandenbindungsstelle des GluR hilft bei der Entwicklung neuer Medikamente, die auf den GluR gerichtet sind und die zur Behandlung dieser Krankheiten eingesetzt werden können.

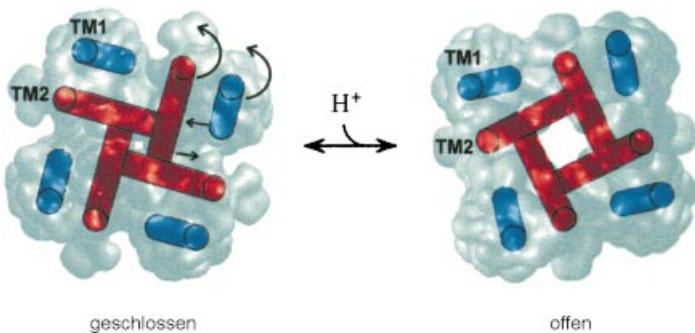


Abbildung 9. Modell eines molekularen Aktivierungsmechanismus für die Öffnung spannungsabhängiger Kaliumkanäle durch eine Festkörper-Bewegung; Blick auf den KcsA-Kanal (siehe Text) von der extrazellulären Seite her. Nach Aktivierung bewegt sich die Transmembran-Helix TM2 entgegen dem Uhrzeigersinn aus dem Ionenpfad heraus; dadurch wird der Kanal geöffnet. Zu Illustrationszwecken sind die Bewegungen vereinfacht und größer als in Wirklichkeit dargestellt. (Nachdruck aus Lit. [48] mit freundlicher Genehmigung der Autoren und von Science.)

Helices verhalten sich dabei wie Stäbe, welche die Pore öffnen und schließen. Die „Erkennungssequenzen“ (der Selektivitätsfilter) erfahren dabei keine größere Bewegung. Wie wir in Abschnitt 4.2.2 besprechen werden, beruht die Kanalöffnung bei LGCs wohl auf ähnlich geringfügigen Bewegungen. Dieser Mechanismus unterscheidet sich stark von dem, der bei anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen beobach-

4.2. Der nicotinische Acetylcholin-Rezeptor (nAChR)

4.2.1. Die Familie und ihre allgemeinen Merkmale

Der zweite LGC, der hier besprochen werden soll, ist der nAChR, der am Besten charakterisierte LGC überhaupt; er stellt einen Prototyp für die Klasse der 4TM-Rezeptoren dar. Wegen ihrer Homologie weisen die weiteren Mitglieder dieser Superfamilie wahrscheinlich ähnliche strukturelle Grundmerkmale auf, insbesondere dieselbe Transmembran-Topologie. Eine umfangreiche Sammlung von Sequenzen und Literaturangaben zu dieser Superfamilie findet sich im Internet unter <http://www.pasteur.fr/LGIC/LGIC.html> (Tabelle 2).^[52]

nAChRs kommen hauptsächlich in postsynaptischen Membranen des zentralen Nervensystems und an der neuromuskulären Endplatte vor. Das physiologische Signal, auf welches der nAChR antwortet, ist der Neurotransmitter Acetylcholin, doch wird er auch von Nicotin aktiviert, einer der am Weitesten verbreiteten Drogen.

Der Ionenkanal des nAChR ist kationenselektiv (andere Mitglieder dieser Superfamilie wie der GlyR haben hingegen anionenselektive Kanäle). Im Falle der peripheren Rezeptoren lässt er bevorzugt Na^+ und K^+ , in geringerem Ausmaß aber auch Ca^{2+} durch, während einige der neuronalen nAChR-Ionenkanäle hauptsächlich Calciumkanäle sind. Rezeptor-Aktivierung führt zur Depolarisation der Plasmamembran; in neuronalen Zellen werden durch den Ca^{2+} -Einstrom Ca^{2+} -vermittelte Signalprozesse ausgelöst.

Für keinen einzigen Rezeptor dieser Superfamilie ist bisher die Struktur mit atomarer Auflösung bekannt. Für den nAChR zeichnet sich aus der Summe der Ergebnisse von Elektronenmikroskopie, chemischer Markierung, Mutagenese und Patch-Clamp-Untersuchungen ein dreidimensionales Bild ab (eine detaillierte Übersicht findet sich in Lit. [53]). Diese Strukturinformationen wurden vor allem für die peripheren Rezeptoren gewonnen, da uns die Natur in Form

des elektrischen Organs der Zitterrochen und Zitterale mit einer reichhaltigen Quelle bedacht hat, aus der sie leicht in großer Menge isoliert werden können. Der nAChR aus dem Zitterrochen *Torpedo*, welcher als Modell für den Muskeltyp-Rezeptor der höheren Vertebraten dient, hat eine Molekulmasse von ungefähr 290 kDa, wovon etwa 20 kDa auf Zuckerreste entfallen. Es handelt sich um einen heteropentameren Komplex, der aus vier verschiedenen Polypeptidketten mit der Zusammensetzung $\alpha_2\beta\gamma\delta$ aufgebaut ist. Die fünf Untereinheiten sind radial um einen zentralen Ionenkanal herum angeordnet, und zwar von der synaptischen Spalte her gesehen im Uhrzeigersinn in der Reihenfolge $\alpha_H\text{-}\gamma\text{-}\alpha_L\text{-}\delta\text{-}\beta$ (Abbildung 10); H und L bezeichnen die hoch- und niederaffinen Bindungsstellen der beiden α -Untereinheiten (wegen ihrer unterschiedlichen Nachbarn unterscheiden sich die beiden α -Untereinheiten in ihren Bindungseigenschaften).^[54]

Die anderen Rezeptoren der Superfamilie liegen wohl ebenfalls als Pentamere vor; dies wurde für den GABA_AR und den 5-HT₃R direkt durch Elektronenmikroskopie^[55, 56] und für den GlyR indirekt durch biochemische Methoden gezeigt.^[57, 58] Eine heteromere Struktur aus verschiedenen Untereinheiten ist zwar die Regel und, wie oben ausgeführt, die Grundlage der Rezeptorvielfalt, doch homomere Strukturen sind ebenfalls beschrieben worden, z.B. für den 5-HT₃R und für bestimmte Untereinheiten des neuronalen nAChR und des GABA_AR.^[59, 60]

Die vier Untereinheiten des nAChR haben homologe Sequenzen mit 30 bis 40 % Sequenzidentität. Hydropathie-Auftragungen der Primärstruktur zeigen, dass jede Untereinheit vier hydrophobe Bereiche enthält, die für membran-durchspannende Segmente (M1 – M4) gehalten werden. Alle Mitglieder der Familie zeigen dieses Muster. Alle haben sie extrazelluläre N- und C-Termini, eine große extrazelluläre glycosyierte N-terminale Domäne (etwa 200 Reste lang) und eine lange cytosolische Schleife (100 bis 150 Reste), die die Membrandurchgänge M3 und M4 verbindet und mehrere Phosphorylierungsstellen enthält.

Tabelle 2. Auswahl von Quellen im Internet zum Thema ligandengesteuerte Ionenkanäle.^[a]

Stichwort	Kurzbeschreibung	Internet-Adresse
allgemeine Informationen zu Ionenkanälen	ein guter Einstieg, der zu weiteren Websites mit relevanter Information zu Ionenkanälen leitet	http://phy025.lubb.ttuhs.edu/Neely/ion-chann.htm
allgemeine Informationen zu Ionenkanälen	Quellsammlung mit vielen interessanten Links zu weiteren Internet-Seiten über Ionenkanäle	http://members.ncbi.com/IonChannel/ion.htm
LGC-Sequenzdatenbank (Le Novère und Changeux, 1999)	eine regelmäßig aktualisierte Datenbank mit dem kompletten Satz aller bekannten Nucleinsäure- und Proteinsequenzen (derzeit mehr als 300) von extrazellulär aktivierten transmittergesteuerten Ionenkanälen; Sequenz-Alignments und -Stammbäume	http://www.pasteur.fr/LGIC/LGIC.html
GABA-Rezeptor-Datenbank	GABAagent: eine Zusammenstellung von Daten über GABA-Rezeptoren	http://gaba.ust.hk/Agent.html
Kanalstruktur	eine Übersicht über die Struktur des KcsA-Kaliumkanals mit vielen Abbildungen der Pore	http://members.ncbi.com/IonChannel/KcsA.htm
Leitfähigkeits-Modelle	verschiedene Modelle zu Ionenselektivität und Ionenleitung	http://www.ugrad.cs.jhu.edu/~imran/kcsa/
Interview mit Roderick MacKinnon, der die erste Kanalstruktur löste (Doyle et al., 1988)	Kurzvorlesung über die faszinierende Raffinesse der Ionenkanalstrukturen und die mühevolle Arbeit, die zur Aufklärung solch einer Struktur nötig ist	http://www.sciam.com/explorations/2000/050100MacKinnon/index.html
Ionenkanäle und Krankheiten	behandelt die molekularen Grundlagen von Krankheiten, bei denen Ionenkanäle eine Rolle spielen	http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/chan.html

[a] In Lit. [109] findet sich eine umfassendere Liste, die auch allgemeinere Informationen über Proteine enthält.

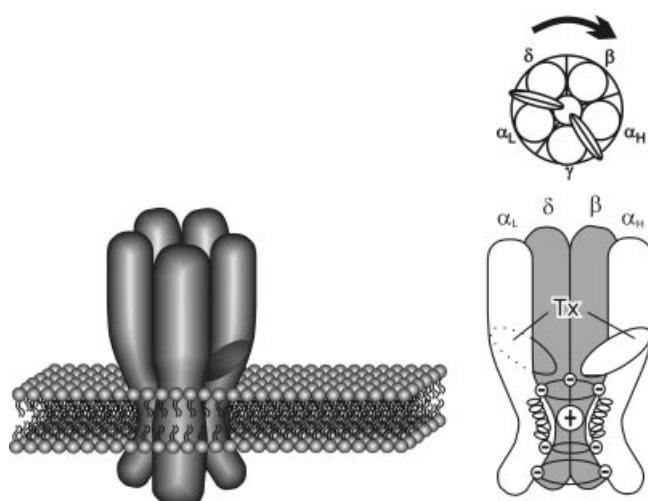


Abbildung 10. Das „interface gorge model“ für den nAChR; in dieser Abbildung ist unser derzeitiges Wissen über die Struktur des nAChR zusammengefasst. Links: Gesamtdarstellung des Rezeptors in seiner Membranumgebung. Oben rechts: Anordnung der Rezeptoruntereinheiten um einen zentral gelegenen Kanal herum (Blickrichtung von der synaptischen Spalte her). Unten rechts: Längsschnitt durch den Rezeptor. Der Ionenkanal wird von Transmembran-Helices gebildet; die Kanalschleuse ist eine Verengung zur cytoplasmatischen Seite der Membran hin. Tx bezeichnet α -Neurotoxine (Peptidtoxine aus Giftschlangen), die für die Untersuchung der Struktur der Ligandenbindungsstelle verwendet werden.^[67] Die Ellipse stellt die Toxinbindungsstelle dar; da die α -Neurotoxine kompetitive Antagonisten sind, geht man davon aus, dass sie zumindest teilweise auch die Agonistenbindungsstelle abdecken. Die Bindungsstelle durchspannt die Rezeptorwand.

Ein weiteres charakteristisches Motiv für diese Rezeptor-Superfamilie ist eine Schleife, die durch zwei Cysteinreste im Abstand von 15 Resten in der N-terminalen Domäne gebildet wird (Abbildung 3). Diese beiden Cysteinreste sind durch eine Disulfidbrücke verknüpft,^[61] die dazwischen liegenden Reste sind hochkonserviert. Diese Cys-Schleife (Cys-Loop), für die eine amphipathische β -Faltblatt-Struktur vorhergesagt wird,^[62] liegt unabhängig von der Ionenselektivität und den Ligandenbindungs-Eigenschaften des jeweiligen Rezeptors in einem festen Abstand zum ersten Membrandurchgang und könnte eine wichtige Rolle als Kern bei der Proteinfaltung spielen. Da diese Cys-Schleife eine typische Signatur für diese Superfamilie darstellt, wurde auch der Name „Cys-Loop-Rezeptoren“ vorgeschlagen.^[63]

Die Gesamtgröße des pentameren nAChR-Komplexes, abgeleitet aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Kryo-Elektronenmikroskopie an tubulären Kristallen, die aus den Membranen des elektrischen Organs von *Torpedo* gezüchtet wurden), beträgt etwa $12.5 \times 8 \text{ nm}$.^[64] Aus den Bildern lässt sich abschätzen, dass etwa 35 % des Proteins in die Membranphase eingebettet sind und etwa 50 % auf der extrazellulären Seite aus der Membran herausragen.

4.2.2. Der Ionenkanal – Selektivitätsfilter und Schleusenmechanismus

Auf den im letzten Abschnitt erwähnten elektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich auch leicht ein zentrales Loch in dem Rezeptor-, „Kringel“ („doughnut“) erkennen, das

ungefähr 20 bis 25 Å weit ist.^[65] Diese Struktur wird gemeinhin als der Eingang zum Ionenkanal interpretiert. So scheint der nAChR-Kanal, genau wie der oben besprochene Kaliumkanal, einen weiten wassergefüllten Eingangsbereich (Vestibül) zu haben, auf den eine trichterförmige Struktur innerhalb der Membran folgt (siehe Abbildung 10). Deren Durchmesser beträgt im mittleren Teil 11.5 Å (bestimmt anhand der Größe von Kanalblockern, die zur Markierung spezifischer Reste der Kanalwand genutzt wurden^[66]) und im geöffneten Zustand an der engsten Stelle zum cytosolischen Ende hin etwa 7 Å (Vorhersage aufgrund einer Computer-Modellierung^[67]). Dieser Wert stimmt gut mit dem Durchmesser des größten gerade noch permeierenden Kations (6.4 Å) überein.^[68] Am cytoplasmatischen Ende weitet sich die Pore wieder bis auf etwa 15 Å. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die cytoplasmatische Schleife zwischen M3 und M4 unterhalb der Pore eine korbbartige Struktur bildet, die etwa 40 Å aus der Membran herausragt. Die Funktion dieser Struktur besteht vielleicht darin, zu verhindern, dass die Ionen direkt ins Cytoplasma austreten, stattdessen müssten sie den Weg durch zwei enge seitliche Öffnungen nehmen.^[69]

Die Kanalwand wird durch das zweite Transmembran-Segment (M2) jeder Rezeptoruntereinheit gebildet.^[66] Dies ergibt sich hauptsächlich aus der Affinitätsmarkierung mit Kanalblockern, also Substanzen, die den Kanal direkt verstopfen;^[66, 70] Mutationsanalysen bestätigen dies.^[71, 72] Aus dem Muster der markierten Aminosäurereste wissen wir, dass dieser Bereich zumindest teilweise in einer α -helicalen Konformation vorliegt, eine Folgerung, die durch Untersuchungen der chemischen Zugänglichkeit bekräftigt wird.^[73] Teile des ersten Transmembran-Segments M1 tragen zumindest zeitweise ebenfalls zur Kanalwand in dem aufgeweiteten oberen (extrazellulären) Bereich bei.^[74]

Die fünf homologen Untereinheiten steuern jeweils das entsprechende Segment zum Aufbau des Ionenkanals bei. Aus diesem Bauprinzip ergibt sich eine interessante Schichtung der Kanalwand (Abbildung 11): Es entstehen Ringe von

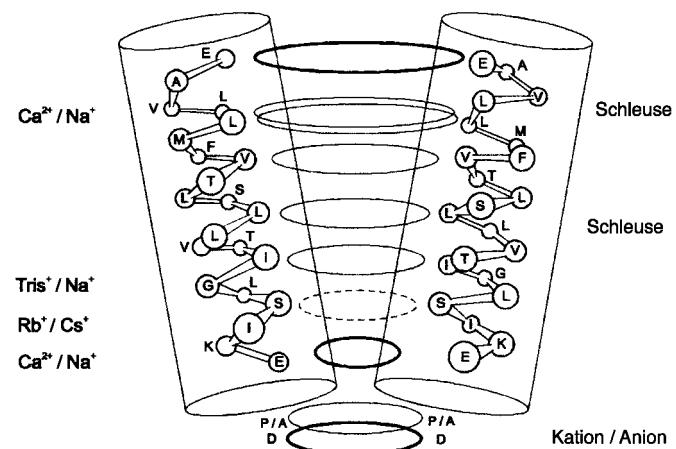


Abbildung 11. Schichtmodell des nAChR-Ionenkanals; homologe Seitenketten der fünf Rezeptor-Untereinheiten bilden Ringe, die die Kanaleigenschaften (Ionenselektivität und Schleusenmechanismus) bestimmen, wie durch Mutagenese-Experimente herausgefunden wurde (vereinfacht nach Lit. [75]). Gezeigt sind die M2-Sequenzen der neuronalen α 7-Untereinheit. (Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan.)

Aminosäure-Seitenketten mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften, die die charakteristischen Merkmale des Kanals festlegen – dabei springen vor allem drei negativ geladene Ringe (Asp/Glu), drei hydrophobe Ringe (Leu/Val) und zwei Ringe aus polaren Resten (Ser/Thr) ins Auge.^[75] Die Ioneneleitfähigkeits-Eigenschaften beispielsweise erklären sich aus den drei Ringen negativ geladener Aminosäure-Seitenketten.^[76] Diese Ringe befinden sich am cytoplasmatischen N-terminalen und am extrazellulären C-terminalen Ende des Kanals sowie auf halber Strecke dazwischen. Der mittlere Ring, in dem Glutamat-Seitenketten ins Kanallumen ragen, bildet die Konstriktion, die bestimmt, welche Ionen passieren können. „Gating“ – das Öffnen und Schließen des Pfades, auf dem die Ionen wandern – könnte durch die Drehung dieser Seitenketten aus dem Kanallumen heraus zu Stande kommen,^[67] vielleicht durch eine ähnliche „Festkörperbewegung“ der Helices, wie sie für die Öffnung der spannungsabhängigen Kaliumkanäle postuliert wurde.^[48] Andere Experimente zeigten, dass einer der hydrophoben Ringe, der durch einen konservierten Leucinrest ungefähr in der Mitte von M2 (Leu 9') gebildet wird, zur Regulation der Kanalöffnung beiträgt. Diese Leucinreste aus den verschiedenen Untereinheiten sollen an einem symmetrischen Übergang zwischen offenem und geschlossenem Zustand teilnehmen.^[77]

Die Rolle des Selektivitätsfilters, an dem große Ionen nach ihrer Größe im dehydratisierten Zustand selektiert werden, wurde noch genauer dem Aminosäurerest α T244 zugewiesen, der genau eine Helixwindung oberhalb dieses mittleren Rings liegt.^[78] Das Segment α 238–242 gleich darunter leistet einen direkten Beitrag zum Ladungs-Filter.^[79] Es befindet sich am cytoplasmatischen Ende von M2 und soll eine Knäuelkonformation annehmen, die an die oben beschriebene P-Schleife erinnert.^[80]

Durch Untersuchungen zur Zugänglichkeit von substituierten Cysteinresten^[81] – die Reste werden dabei einer nach dem anderen zu Cystein mutiert, dessen Zugänglichkeit dann mit kleinen sulphydryl-spezifischen Reagentien getestet wird – wurde die Schleuse in derselben Region (zwischen α G240 und α T244) in der Nähe des mittleren Ringes lokalisiert.^[82] So scheinen die Schleuse und der Selektivitätsfilter eng miteinander verwoben zu sein.

Das Konstruktionsprinzip, das in diesem „Helix-M2-Modell“^[66] (Abbildung 10) für den kationenselektiven Kanal des nAChR beschrieben wird, hat wohl auch für die anderen Mitglieder dieser Protein-Superfamilie Gültigkeit, z.B. für den anionenselektiven Kanal des GlyR. Ein Vergleich zwischen Aminosäureresten an den entscheidenden Stellen dieser beiden Kanäle zeigt, dass die Umwandlung des kationenselektiven nAChR-Kanals in einen anionenselektiven Kanal durch die Einführung von Mutationen an nur drei Stellen möglich ist.^[83] Durch die umgekehrten Mutationen kann der anionenselektive Kanal des GlyR in einen kationenselektiven Kanal umgewandelt werden.^[84] Relevant für die Unterscheidung von Anionen und Kationen ist in erster Linie, dass der mittlere Ring von negativen Ladungen durch einen neutralen Ring ersetzt wird.^[79] Solche Experimente legen dar, dass wir in wesentlichen Punkten verstanden haben, wie die Ionenselektivität des nAChR-Kanals reguliert wird.

4.2.3. Die Ligandenbindungsstelle: eine „Schlucht“ zwischen den Untereinheiten

Werfen wir nun einen genaueren Blick auf die Ligandenbindungsstelle des nAChR („L“ in Abbildung 1). Im Gegensatz zu den in Abschnitt 4.1.2 behandelten GluRs konnte die extrazelluläre ligandenbindende Domäne des nAChR bisher noch nicht kristallisiert werden, und es gibt kein hochauflößtes „Röntgenbild“. Über die Bindungsstelle selbst sind jedoch aus biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen zahlreiche Einzelheiten bekannt, aufgrund derer man ein räumliches Modell davon entwickelt hat. Affinitätsmarkierung mit verschiedenen Agonisten und Antagonisten ergab, dass der Bereich der Aminosäuren 190–200 der beiden identischen α -Untereinheiten zur Bindungsstelle beiträgt und mehrere funktionell wichtige aromatische Reste enthält. Doch das ist noch nicht das Ende der Geschichte: Einige Aminosäurereste auf der α -Untereinheit außerhalb dieses Bereiches werden auch markiert, und sogar Teile der benachbarten Untereinheiten (das sind die γ - und die δ -Untereinheit) in der Nähe der Grenzflächen tragen zur Bindungsstelle bei.^[85] Aufgrund dieser Befunde wurde ein Modell für die Bindungsstelle der α -Untereinheit vorgeschlagen (Abbildung 12), demzufolge die Bindungsstelle nicht auf einen

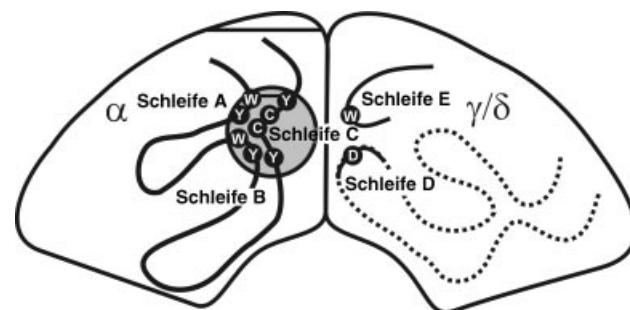


Abbildung 12. Modell der Agonistenbindungsstelle des nAChR; drei Schleifen der α -Untereinheit sowie weitere Bereiche aus den benachbarten Untereinheiten tragen zu dieser Bindungsstelle bei, die an der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten liegt.

zusammenhängenden Sequenzbereich beschränkt ist, sondern von drei separaten Schleifen der besagten α -Untereinheit gebildet wird.^[86] Dazu treten dann noch weitere Bereiche aus den Nachbar-Untereinheiten hinzu. Dies liefert auch eine einleuchtende Erklärung dafür, dass sich die beiden Bindungsstellen im Hinblick auf manche Liganden wie (+)-Tubocurarin nicht äquivalent verhalten; hierfür besteht eine hochaffine Bindungsstelle an der α/γ -Grenzfläche und eine niederaffine an der α/δ -Grenzfläche.

Untersuchungen mit α -Neurotoxinen aus Schlangengift führten zu der Hypothese, dass das Toxin in relativer Nähe zur Membran (1.5 nm oder näher) dicht beim Eingang der vom M2-Bereich gebildeten trichterförmigen Struktur bindet.^[87] Es konnte experimentell gezeigt werden, dass das Toxin diese Stelle durch eine „Schlucht“ in der Wand des ringförmigen Rezeptors erreichen muss, die die aromatischen Reste der Ligandenbindungsstelle enthält („aromatic interface gorge“; Abbildung 10).^[53, 88] Im Gegensatz dazu ergaben elektronenmikroskopische Studien vor kurzem ungefähr 10 bis 15 Å lange, von β -Strängen eingefasste Tunnel im extra-

zellulären Teil der α -Untereinheiten, die sich nur zum Vestibül hin öffnen.^[69] Sie verbinden Höhlungen, die als die Acetylcholin-Bindungsstellen interpretiert wurden, mit dem wassergefüllten Vestibül des Kanals. Man glaubt, dass diese den Hauptzugangsweg der Agonisten zu ihrer Bindungsstelle darstellen.

Der oben beschriebene Zugang durch eine enge „Schlucht“ würde genau der Situation in dem Acetylcholin-abbauenden Enzym Acetylcholinesterase (AChE) entsprechen, in dem die Acetylcholin-Bindungsstelle am Grunde einer 20 Å tiefen aromatischen Schlucht liegt.^[89] Vielleicht kann man die Analogie mit AChE sogar noch auf den Bindungsmechanismus ausdehnen: In beiden Fällen wird die Bindung der Cholinium-Gruppe durch eine Kation- π -Wechselwirkung bewerkstelligt, wobei die Oberfläche eines aromatischen Ringes eine Zone mit negativem elektrostatischem Potential bildet, die Kationen mit beträchtlicher Stärke binden kann.^[90] Für die AChE wurde durch Affinitätsmarkierung gezeigt, dass die bindende Seitenkette vom Tryptophanrest Trp84 stammt.^[91] Für den nAChR wurde in Experimenten, in denen theoretische Chemie mit Molekularbiologie kombiniert wurde, α Trp149 als die primäre Kation- π -Bindungsstelle ermittelt.^[92]

Die Bindungsstelle des nAChR scheint demnach eine Spalte zwischen den Untereinheiten nahe an der Membranoberfläche, aber auch nahe am Kanaleingang zu sein, die aus mindestens drei verschiedenen Bereichen der α -Untereinheiten mit zahlreichen aromatischen Resten und zusätzlich negativ geladenen Teilen der benachbarten γ - und δ -Untereinheiten besteht.

Operationell können Rezeptoren als ein Drei-Komponenten-System aufgefasst werden, das aus 1. einer Signalerkennungskomponente (Rezeptor, „R“), 2. einer Effektorfunktion (Effektor, „E“) und 3. einer R mit E koppelnden Übertragungskomponente (Transduktionskomponente, „T“) besteht. Im nAChR sind die Agonistenbindungsstelle („R“), der Signaltransfer zum Ionenkanal durch einen Konformationsübergang („T“) und der Ionenkanal („E“) in einer recht begrenzten Zone von nur etwa 2 nm konzentriert, die eine Art „aktives Zentrum“ bildet.^[53] Der Transduktionsmechanismus ist in diesem Fall ein allosterischer Übergang, der nach der Bindung des Transmitters erfolgt.

Trotz dieser räumlichen Verzahnung scheinen sich die extrazelluläre Domäne und der Kanal unabhängig voneinander zu falten; zumindest gelang es, ein chimäres Moleköl aus zwei verschiedenen Rezeptortypen (neuronaler $\alpha 7$ -nAChR und 5-HT₃R) zu konstruieren, das die Bindungseigenschaften des einen und die Kanaleigenschaften des anderen Partners aufweist.^[93]

Interessanterweise zeigt die hochauflöste Struktur (3.5 Å) des mechanosensitiven Ionenkanals aus *Mycobacterium tuberculosis* einige Merkmale, die dem nAChR sehr ähnlich sind (Abbildung 13).^[94] Wie beim nAChR handelt es sich um eine pentamer Struktur, und wie beim nAChR führt von der extrazellulären Seite her ein weites wassergefülltes Vestibül mit einem Durchmesser von ungefähr 18 Å zur Pore, die sich zur cytosolischen Seite hin verengt. In beiden Kanälen werden die Wände von Helices gebildet, die mit polaren Resten wie Threonin oder Serin gesäumt sind. Beide Male treten an der engsten Stelle hydrophobe Reste auf, die

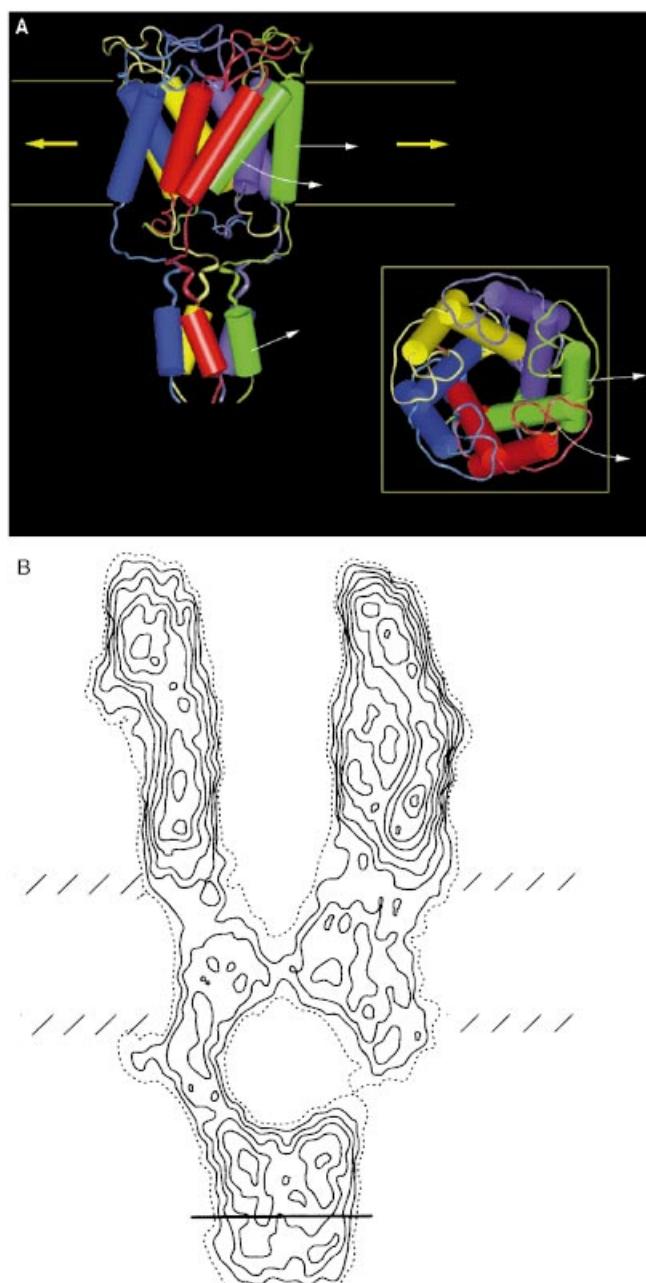


Abbildung 13. Ähnlichkeiten in der Gesamtstruktur eines mechanosensitiven Kanals (A) und des nAChR (B). A) Struktur eines mechanosensitiven Ionenkanals aus *Mycobacterium tuberculosis* im Kristall.^[94] B) Eine elektronenmikroskopische Aufnahme (4.6 Å Auflösung) des nAChR aus *Torpedo californica*.^[69] Die beiden pentameren Strukturen haben ein weites wassergefülltes Vestibül, das in die Kanalpore hineinführt, und eine intrazelluläre korbatige Struktur unterhalb des Kanalausgangs. Wiedergegeben mit freundlicher Genehmigung von Douglas Rees und von *Science* (A) sowie von Nigel Unwin (B).

als Schleuse fungieren könnten. Die Struktur, die intrazellulär in diesem mechanosensitiven Kanal zu erkennen ist, erinnert an den „Korb“, der auf den elektronenmikroskopischen Bildern des nAChR zu sehen ist.^[69]

Trotz all unseres detaillierten Wissens über den nAChR bleiben einige entscheidende Fragen offen; sie werden wohl erst mit der ersten hochauflösten Struktur eine Antwort finden. So steht die Beschreibung des genauen Kopplungsmechanismus aus, wie die Detektion eines chemischen Signals

(Agonistenbindung) in die Öffnung eines Ionenpfades (Kanalöffnung) übersetzt wird. Weiterhin liegt der pharmakologisch grundlegende funktionelle Unterschied zwischen Agonisten und Antagonisten, die doch an dieselbe Stelle binden, noch immer im Dunkeln.

4.3. Die Purin-Rezeptor-Familie P2X

Bei der letzten Klasse von ligandengesteuerten Kanälen, die wir hier besprechen wollen, handelt es sich um die P2X-Rezeptoren, die durch extrazelluläres ATP gesteuert werden (dies im Gegensatz zu den P2Y-Rezeptoren, die zu den in der Einleitung erwähnten G-Protein-gekoppelten „metabotropen“ Rezeptoren zählen). Die P2X-Rezeptoren sind kationenselektive Kanäle, die auf Bindung von extrazellulärem ATP hin im Millisekunden-Bereich öffnen. Bisher wurden sieben P2X-Isoformen kloniert, die als P2X₁ bis P2X₇ bezeichnet werden (Übersicht in Lit. [95]). Die entsprechenden Proteine zeigen untereinander Sequenzähnlichkeit (38 bis 48 % Aminosäure-Identität bei paarweisem Vergleich), doch keine Homologie zu den anderen LGCs.^[96] Auch wenn keine hochaufgelöste Struktur verfügbar ist, ist es doch klar, dass sie in einigen strukturellen Merkmalen grundsätzlich verschieden von den beiden oben besprochenen Klassen von LGCs sind. Der bedeutendste Unterschied liegt darin, dass die vorhergesagte Transmembran-Anordnung deutlich anders ist: Jede Untereinheit – etwa 400 Aminosäurereste lang und beide Termini im Zellinneren – enthält nur zwei membran-durchspannende Segmente (M1 und M2), die eine 270 Reste lange glycosyierte extrazelluläre Schleife miteinander verbindet. In dieser extrazellulären Domäne finden sich zehn Cysteinreste, die fünf Disulfidbindungen innerhalb einer Kette eingehen können.^[97] Da diese bei allen Mitgliedern der Familie streng konserviert sind, nimmt man an, dass sie wichtig für die Bildung der Gesamtstruktur sind.^[96] Die genaue Struktur der Agonistenbindungsstelle ist noch nicht aufgeklärt. Mutationsstudien ergaben, dass die nahe am Kanaleingang gelegene ATP-Bindungstasche einige positiv geladene Reste enthält.^[98, 99]

P2X-Rezeptoren sind auf nichtselektive Weise durchlässig für Kationen, inklusive Ca²⁺; der effektive Poredurchmesser ist etwas größer als der des nAChR.^[100] Untersuchungen über die Zugänglichkeit von künstlich eingefügten Cysteinresten belegen, dass das M2-Segment zum Ionenpfad beiträgt.^[101] Diesen Ergebnissen zufolge muss die Pore zumindest teilweise in einer gestreckten und nicht in α -helicaler Konformation vorliegen, doch wie sie im Detail aussieht, ist weiterhin unklar. Ein konservierter Glycinrest (Gly342 bei P2X₂) könnte Teil der Schleuse sein.^[102]

Ein hochinteressanter Aspekt ist der dynamische Selektivitätsfilter mancher Kanäle (Besprechung in Lit. [103]): Bei einigen P2X-Subtypen lässt sich bei länger anhaltender Aktivierung durch ATP eine zunehmende Erweiterung der Pore beobachten, sodass größere Moleküle permeieren können.^[104] Wie dieses dynamische Verhalten zu Stande kommt und ob und wie ionotrope Rezeptoren diesen Mechanismus tatsächlich nutzen, um die Funktion der Neuronen zu modulieren, bleibt zu beweisen. Ein weiterer interessanter

Gesichtspunkt ist, dass einige P2X-Kanäle funktionell mit den strukturell nicht verwandten nAChRs interagieren und so eine Wechselbeziehung zwischen ganz unterschiedlich gesteuerten Kanälen herstellen können.^[105]

Auch in ihrem oligomeren Aufbau scheinen die P2X-Rezeptoren von der Architektur, die man bei GluR und nAChR beobachtet, abzuweichen. Die genaue Quartärstruktur der funktionell aktiven P2X-Rezeptoren ist noch nicht geklärt. Obgleich sie ihre Transmembran-Topologie mit einer Reihe anderer Ionenkanäle wie den epithelialen Na⁺-Kanälen oder den einwärts gleichrichtenden K⁺-Kanälen teilen, lässt sich nicht ohne Weiteres eine gemeinsame oligomere Struktur ableiten.^[106] Es sieht so aus, als seien Trimere der gemeinsame Nenner im Aufbau einiger P2X-Rezeptoren. Elektrophorese- und Vernetzungsexperimente zeigen, dass sie als Homotrimere vorkommen, oder zumindest, dass trimere Komplexe aus identischen Untereinheiten eine wichtige Komponente darstellen.^[5] Wie bei den anderen LGC-Klassen ist auch hier ein Zusammenbau von verschiedenen Untereinheiten möglich und könnte die Grundlage der funktionellen Vielfalt bilden.^[107]

5. Schlussbemerkungen und Ausblick

Aus hochauflösten Kristallstrukturen von spannungsabhängigen Ionenkanälen und Rezeptor-Domänen haben wir vieles über die strukturellen Grundlagen der Selektivität und über den Mechanismus der Kanalöffnung lernen können. Viele Fragen bleiben indessen noch unbeantwortet, und wir müssen uns wohl bis zur Lösung der Struktur eines liganden-gesteuerten Ionenkanals mit Ångström-Auflösung gedulden. Vor kurzem wurde erstmals die Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, des Rhodopsins, veröffentlicht.^[108] Das zeigt, dass die Methoden zur Kristallisierung von Membranproteinen inzwischen so weit fortgeschritten sind, dass auch die Kristallisierung von LGCs in baldiger Zukunft machbar werden dürfte.

Addendum

Nach Einreichen des Manuskriptes erschienen zwei für die hier beschriebene Thematik wichtige Artikel.^[110] In diesen wird ein Acetylcholin-Bindungsprotein aus der Molluske *Lymnaea stagnalis* beschrieben, welches strukturhomolog zur extrazellulären Ligandenbindungs-Domäne des neuronalen α 7-nAChR ist. Da es sich bei AChBP um ein wasserlösliches Protein handelt, konnte es kristallisiert werden. Das hochauflöste (2.7 Å) Röntgenbild kann als ein Modell für die Bindungsdomäne von LGCs vom nAChR-Typ aufgefasst werden (Abbildung 14).

Wir danken Henning Otto und Gabi Bixel für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts und ihre Kommentare. Die in diesem Aufsatz besprochenen Arbeiten aus dem Labor der Autoren wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 449) und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Eingegangen am 27. November 2000 [A 438]

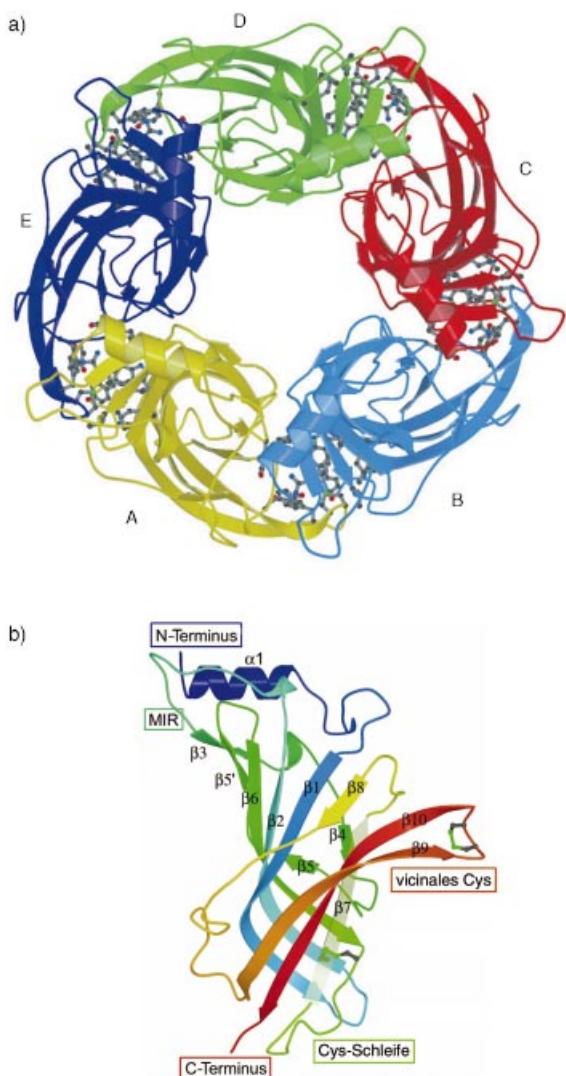


Abbildung 14. Die pentamere Struktur des AChBP. a) In dieser Darstellung ist jedes Protomer in einer anderen Farbe abgebildet; die Untereinheiten sind entgegen dem Uhrzeigersinn benannt. Die Ligandenbindungsstellen an den Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten sind in Kugel-Stab-Darstellung gezeigt. b) Übersicht über die Struktur des AChBP-Protomers, Sicht von außerhalb des pentameren Rings. Regenbogen-Darstellung mit einem Farbgradienten von Blau (N-Terminus) nach Rot (C-Terminus); Disulfidbrücken sind grün in Kugel-Stab-Darstellung abgebildet. MIR kennzeichnet die wichtigste immunogene Region (main immunogenic region). Für Näheres zur Cys-Schleife und zum vicinalen Cys siehe Text. In einem vollständigen LGC würde der N-Terminus zum synaptischen Spalt weisen, und der C-Terminus unten würde in die Membran eintauchen und zum ersten Transmembran-Bereich beitragen. Wiedergabe aus Lit. [110] mit freundlicher Genehmigung der Autoren.

- [1] H. M. Lam, J. Chiu, M. H. Hsieh, L. Meisel, I. C. Oliveira, M. Shin, G. Coruzzi, *Nature* **1998**, *396*, 125–126.
- [2] J. Chiu, R. DeSalle, H. M. Lam, L. Meisel, G. Coruzzi, *Mol. Biol. Evol.* **1999**, *16*, 826–838.
- [3] F. Hucho, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* **1973**, *38*, 11–15.
- [4] B. Laube, J. Kuhse, H. Betz, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 2954–2961.
- [5] A. Nicke, H. G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler, G. Schmalzing, *EMBO J.* **1998**, *17*, 3016–3028.
- [6] K. Kiselyov, G. A. Mignery, M. X. Zhu, S. Muallem, *Mol. Cell* **1999**, *4*, 423–429.
- [7] G. Boulay, D. M. Brown, N. Qin, M. Jiang, A. Dietrich, M. X. Zhu, Z. Chen, M. Birnbaumer, K. Mikoshiba, L. Birnbaumer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14955–14960.

- [8] M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, D. Julius, *Nature* **1997**, *389*, 816–824.
- [9] M. A. Raftery, M. W. Hunkapiller, C. D. Strader, L. E. Hood, *Science* **1980**, *208*, 1454–1456.
- [10] W. Hevers, H. Lüddens, *Mol. Neurobiol.* **1998**, *18*, 35–86.
- [11] B. Sommer, M. Kohler, R. Sprengel, P. H. Seeburg, *Cell* **1991**, *67*, 11–19.
- [12] P. H. Seeburg, *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1–5.
- [13] F. Hucho, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 23–36; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 39–50.
- [14] S. J. Edelstein, J.-P. Changeux, *Adv. Protein Chem.* **1998**, *51*, 121–184.
- [15] A. L. Mammen, S. Kamboj, R. L. Huganir, *Methods Enzymol.* **1999**, *294*, 353–370.
- [16] S. L. Swope, Z. Qu, R. L. Huganir, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *757*, 197–214.
- [17] J. Kirsch, D. Langosch, P. Prior, U. Z. Littauer, B. Schmitt, H. Betz, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22242–22245.
- [18] H. Wang, F. K. Bedford, N. J. Brandon, S. J. Moss, R. W. Olsen, *Nature* **1999**, *397*, 69–72.
- [19] H.-C. Kornau, L. T. Schenker, M. B. Kennedy, P. H. Seeburg, *Science* **1995**, *269*, 1737–1740.
- [20] H. Dong, R. J. O'Brien, E. T. Fung, A. A. Lanahan, P. F. Worley, R. L. Huganir, *Nature* **1997**, *386*, 279–284.
- [21] M. Sheng, D. T. Pak, *Annu. Rev. Physiol.* **2000**, *62*, 755–78.
- [22] H. Husi, M. A. Ward, J. S. Choudhary, W. P. Blackstock, S. G. Grant, *Nat. Neurosci.* **2000**, *3*, 661–669.
- [23] W. Hoch, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 1–10.
- [24] T. Green, S. F. Heinemann, J. F. Gusella, *Neuron* **1999**, *20*, 427–444.
- [25] A. Vincent, C. Newland, R. Croxen, D. Beeson, *Trends Neurosci.* **1997**, *20*, 15–22.
- [26] C. Beck, B. Moulard, O. Steinlein, M. Guipponi, L. Vallee, P. Montpiet, M. Blady-Moulnier, A. Malafosse, *Neurobiol. Dis.* **1994**, *1*, 95–99.
- [27] O. K. Steinlein, J. C. Mulley, P. Propping, R. H. Wallace, H. A. Phillips, G. R. Sutherland, I. E. Scheffer, S. F. Berkovic, *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 201–203.
- [28] S. G. Ryan, S. L. Sherman, J. C. Terry, R. S. Sparkes, M. C. Torres, R. W. Mackey, *Ann. Neurol.* **1992**, *31*, 663–668.
- [29] A. Vincent, D. Beeson, B. Lang, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6717–6728.
- [30] E. K. Michaelis, *Prog. Neurobiol.* **1997**, *54*, 369–415.
- [31] C. F. Bigge, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 441–447.
- [32] R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, S. F. Traynelis, *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 7–61.
- [33] D. A. Doyle, J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69–77; die Atomkoordinaten sind als Eintrag 1BL8 bei der Protein Data Bank hinterlegt (<http://www.rcsb.org/pdb/as>).
- [34] G. Q. Chen, C. Cui, M. L. Mayer, E. Gouaux, *Nature* **1999**, *402*, 817–821.
- [35] R. I. Hume, R. Dingledine, S. F. Heinemann, *Science* **1991**, *253*, 1028–1031.
- [36] L. Simpson, R. B. Emeson, *Annu. Rev. Neurosci.* **1996**, *19*, 27–52.
- [37] N. Armstrong, Y. Sun, G. Q. Chen, E. Gouaux, *Nature* **1998**, *395*, 913–917; die Atomkoordinaten sind als Eintrag 1GR2 bei der Protein Data Bank hinterlegt (<http://www.rcsb.org/pdb/as>).
- [38] Y. Stern-Bach, B. Bettler, M. Hartley, P. O. Sheppard, P. J. O'Hara, S. F. Heinemann, *Neuron* **1994**, *13*, 1345–1357.
- [39] A. Kuusinen, M. Arvola, K. Keinänen, *EMBO J.* **1995**, *14*, 6327–6332.
- [40] G. Q. Chen, E. Gouaux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13431–13436.
- [41] G. Q. Chen, Y. Sun, R. Jin, E. Gouaux, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2623–2630.
- [42] Y. J. Sun, J. Rose, B. C. Wang, C. D. Hsiao, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 219–229.
- [43] Y. Paas, M. Eisenstein, F. Medeville, V. I. Teichberg, A. Devillers-Thierry, *Neuron* **1996**, *17*, 979–990; das 3D-Modell kann von der LGIC-Datenbank heruntergeladen werden, siehe Tabelle 1.
- [44] K. Keinänen, M. Arvola, A. Kuusinen, M. Johnson, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 835–838.

- [45] B. Laube, H. Hirai, M. Sturgess, H. Betz, J. Kuhse, *Neuron* **1997**, *18*, 493–503.
- [46] N. Armstrong, E. Gouaux, *Neuron* **2000**, *28*, 165–181.
- [47] a) T. Baukrowitz, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5823–5848; b) D. Oliver, T. Baukrowitz, B. Fakler, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5824–5829; c) M. D. Mark, S. Herlitze, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5830–5836; d) U. Schulte, B. Fakler, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5837–5841; e) T. Baukrowitz, B. Fakler, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5842–5848.
- [48] E. Perozo, D. M. Cortes, L. G. Cuello, *Science* **1999**, *285*, 73–78.
- [49] B. A. Yi, L. Y. Jan, *Neuron* **2000**, *27*, 423–425.
- [50] P. J. O'Hara, P. O. Sheppard, H. Thøgersen, D. Venezia, B. A. Haldeman, V. McGrane, K. M. Houamed, C. Thomsen, T. L. Gilbert, E. R. Mulvihill, *Neuron* **1993**, *11*, 41–52.
- [51] Y. Paas, A. Devillers-Thiery, V. I. Teichberg, J.-P. Changeux, M. Eisenstein, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 87–92.
- [52] N. Le Novère, J.-P. Changeux, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 340–342.
- [53] F. Hucho, V. I. Tsetlin, J. Machold, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 539–557.
- [54] J. Machold, C. Weise, Yu. Utkin, V. Tsetlin, F. Hucho, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 427–430.
- [55] N. Nayeem, T. P. Green, I. L. Martin, E. A. Barnard, *J. Neurochem.* **1994**, *62*, 815–818.
- [56] F. G. Boess, R. Beroukhim, I. L. Martin, *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 1401–1405.
- [57] D. Langosch, L. Thomas, H. Betz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 7394–7398.
- [58] N. Griffon, C. Buttner, A. Nicke, J. Kuhse, G. Schmalzing, H. Betz, *EMBO J.* **1999**, *18*, 4711–4721.
- [59] S. Couturier, D. Bertrand, J. M. Matter, M. C. Hernandez, S. Bertrand, N. Millar, S. Valera, T. Barkas, M. Ballivet, *Neuron* **1990**, *5*, 847–856.
- [60] D. B. Pritchett, H. Sontheimer, C. M. Gorman, H. Kettenmann, P. H. Seeburg, P. R. Schofield, *Science* **1988**, *242*, 1306–1308.
- [61] P. N. Kao, A. Karlin, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8085–8088.
- [62] V. B. Cockcroft, D. J. Osguthorpe, E. A. Barnard, G. C. Lunt, *Proteins* **1990**, *8*, 386–397.
- [63] P. P. A. Humphrey, E. A. Barnard, *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 271–277.
- [64] N. Unwin, *Nature* **1995**, *373*, 37–43.
- [65] N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 1101–1124.
- [66] F. Hucho, W. Oberthür, F. Lottspeich, *FEBS Lett.* **1986**, *205*, 137–142.
- [67] F. Hucho, R. Hilgenfeld, *FEBS Lett.* **1989**, *257*, 17–23.
- [68] L. Y. Huang, W. A. Catterall, G. Ehrenstein, *J. Gen. Physiol.* **1978**, *71*, 397–410.
- [69] A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, M. Stowell, N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 765–786.
- [70] J. Giraudat, M. Dennis, T. Heidmann, J.-Y. Chang, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2719–2723.
- [71] K. Imoto, C. Methfessel, B. Sakmann, M. Mishina, Y. Mori, T. Konno, K. Fukuda, M. Kurasaki, H. Bujo, Y. Fujita, S. Numa, *Nature* **1986**, *324*, 670–674.
- [72] R. J. Leonard, C. G. Labarca, P. Charnet, N. Davidson, H. A. Lester, *Science* **1998**, *242*, 1578–1581.
- [73] M. H. Akabas, C. Kaufmann, P. Archdeacon, A. Karlin, *Neuron* **1994**, *13*, 919–927.
- [74] M. H. Akabas, A. Karlin, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12496–12500.
- [75] D. Bertrand, J.-L. Galzi, A. Devillers-Thiéry, S. Bertrand, J.-P. Changeux, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 688–693.
- [76] K. Imoto, C. Busch, B. Sakmann, M. Mishina, T. Konno, J. Nakai, H. Bujo, J. Mori, K. Fukuda, S. Numa, *Nature* **1988**, *335*, 645–648.
- [77] C. Labarca, M. W. Nowak, H. Zhang, L. Tang, P. Deshpande, H. A. Lester, *Nature* **1995**, *376*, 514–516.
- [78] A. Villarroel, B. Sakmann, *Biophys. J.* **1992**, *62*, 196–208.
- [79] P.-J. Corringer, S. Bertrand, J.-L. Galzi, A. Devillers-Thiéry, J.-P. Changeux, D. Bertrand, *Neuron* **1999**, *22*, 831–843.
- [80] N. Le Novère, P.-J. Corringer, J.-P. Changeux, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2329–2345.
- [81] A. Karlin, M. H. Akabas, *Methods Enzymol.* **1998**, *293*, 123–145.
- [82] G. G. Wilson, A. Karlin, *Neuron* **1998**, *20*, 1269–1281.
- [83] J.-L. Galzi, A. Devillers-Thiéry, N. Hussy, S. Bertrand, J.-P. Changeux, *Nature* **1992**, *359*, 500–505.
- [84] A. Keramidas, A. J. Moorhouse, C. R. French, P. R. Schofield, P. H. Barry, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 247–259.
- [85] a) D. C. Chiara, J. B. Cohen, *Biophys. J.* **1992**, *61*, A106; b) S. M. Sine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9436–9440; c) C. Czajkowski, A. Karlin, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3160–3164; d) R. J. Prince, S. M. Sine, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25770–25777.
- [86] J.-L. Galzi, J.-P. Changeux, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 554–565.
- [87] J. Machold, Yu. Utkin, D. Kirsch, R. Kaufmann, V. Tsetlin, F. Hucho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7282–7286.
- [88] P. Saez-Briones, M. Krauss, M. Dreger, A. Herrmann, V. I. Tsetlin, F. Hucho, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 902–910.
- [89] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolov, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253*, 872–879.
- [90] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303–1324.
- [91] C. Weise, H.-J. Kreikenkamp, R. Raba, A. Pedak, A. Aaviksaar, F. Hucho, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3885–3888.
- [92] W. Zhong, J. P. Gullivan, Y. Zhang, L. Li, H. A. Lester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12088–12093.
- [93] J.-L. Eisélé, S. Bertrand, J.-L. Galzi, A. Devillers-Thiéry, J.-P. Changeux, D. Bertrand, *Nature* **1993**, *366*, 479–483.
- [94] G. Chang, R. H. Spencer, A. T. Lee, M. T. Barclay, D. C. Rees, *Science* **1998**, *282*, 2220–2226.
- [95] R. A. North, E. A. Barnard, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1997**, *7*, 346–357.
- [96] R. A. North, *Ciba Found. Symp.* **1996**, *198*, 91–105.
- [97] M. A. Hansen, J. A. Barden, V. J. Balcar, K. A. Keay, M. R. Bennett, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 670–675.
- [98] S. Ennion, S. Hagan, R. J. Evans, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29361–29367.
- [99] L. H. Jiang, F. Rassendren, A. Surprenant, R. A. North, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34190–34196.
- [100] R. J. Evans, C. Lewis, C. Virginio, K. Lundstrom, G. Buell, A. Surprenant, R. A. North, *J. Physiol.* **1996**, *497*, 413–422.
- [101] F. Rassendren, G. Buell, A. Newbolt, R. A. North, A. Surprenant, *EMBO J.* **1997**, *16*, 3446–3454.
- [102] T. M. Egan, W. R. Haines, M. M. Voigt, *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 2350–2359.
- [103] S. Khakh, H. A. Lester, *Neuron* **1999**, *23*, 653–658.
- [104] a) A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, G. Buell, *Science* **1996**, *272*, 735–738; b) C. Virginio, A. MacKenzie, F. A. Rassendren, R. A. North, A. Surprenant, *Nat. Neurosci.* **1999**, *2*, 315–321; c) B. S. Khakh, X. R. Bao, C. Labarca, H. A. Lester, *Nat. Neurosci.* **1999**, *2*, 322–330.
- [105] B. S. Khakh, X. Zhou, J. Sydes, J. J. Galligan, H. A. Lester, *Nature* **2000**, *406*, 405–410.
- [106] R. A. North, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 474–483.
- [107] G. E. Torres, T. M. Egan, M. M. Voigt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 6653–6659.
- [108] K. Palczewski, T. Kumakura, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, *289*, 739–745.
- [109] J. Packer, E. Conley, N. Castle, D. Wray, C. January, L. Patmore, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 327–329.
- [110] a) A. B. Smit, N. I. Syed, D. Schaap, J. van Minnen, J. Klumpermann, K. S. Kits, H. Lodder, R. C. van der Schors, R. van Elk, B. Sorgedrager, K. Brejc, T. K. Sixma, W. P. Geraerts, *Nature* **2001**, *411*, 261–268; b) K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van der Oost, A. B. Smit, T. K. Sixma, *Nature* **2001**, *411*, 269–276.