

Thomas Kuner
Dr. med.

Isoform-spezifische Wirkungen von Ethanol, Argiotoxin₆₃₆ und Magnesium (II) Ionen auf N-Methyl-D-Aspartat Rezeptorkanäle: Funktionelle Charakterisierung und Bestimmung struktureller Determinanten

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1988 bis WS 1997/98
Physikum am 29.03.90 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 06.05.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Physiologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. B. Sakmann

N-Methyl-D-Aspartat Rezeptorkanäle (NMDAR) bilden eine Untergruppe der Familie ionotroper Glutamatrezeptoren. Aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften spielen sie eine besondere Rolle bei der Ausprägung neuronaler Schaltkreise während der Gehirnentwicklung, bei der synaptischen Lernfähigkeit und bei der durch Glutamat verursachten Neurotoxizität. Funktionelle Vielfalt dieser Rezeptoren entsteht durch das räumlich-zeitlich definierte Expressionsmuster der vier NR2 Isoformen, welche dem Ionenkanal unterschiedliche Eigenschaften verleihen.

In dieser Arbeit wurden die Isoform-spezifischen Wechselwirkungen von Ethanol, Argiotoxin₆₃₆ und Mg²⁺ mit rekombinanten NMDAR untersucht sowie deren strukturelle Determinanten bestimmt. Der Auswahl dieser Substanzen liegt die Überlegung zugrunde, klinisch, pharmakologisch und physiologisch bedeutsame Aspekte der Isoformspezifität beispielhaft darzustellen. Die NR1-NR2A und NR1-NR2B Isoformen wiesen für alle Substanzen stärkere Effekte auf, als die NR1-NR2C und NR1-NR2D Isoformen. Dies erlaubt die Einteilung der NR2-Untereinheiten in eine "hochaffine" und eine "niederaffine" Untergruppe. Interessanterweise kann diese Einteilung auch auf der Ebene der Proteinsequenzen nachvollzogen werden: innerhalb der Untergruppen sind größere Ähnlichkeiten zu verzeichnen als zwischen den Untergruppen. Aufgrund dieser Voraussetzung gelang es auch, die Bereiche des Proteins zu identifizieren, welche die Isoformspezifität für die kanalblockierenden Substanzen Argiotoxin₆₃₆ und Mg²⁺ festlegen: die beiden Transmembransegmente M1 und M4 sowie das Membran-angelagerte L2 Segment. Dies erlaubt die Vorhersage, daß diese Bereiche, möglicherweise als Bestandteile der extrazellulären Kanalwand, prinzipiell die Isoformspezifität von kanalblockierenden Substanzen vermitteln.

Die Genußdroge **Ethanol** beeinflusst bereits bei geringen Konzentrationen Lernfähigkeit und Konzentration, erst bei höheren Konzentrationen treten Störungen von Koordination und Gleichgewichtssinn auf. Die hier gefundenen, höherempfindlichen Isoformen sind vorwiegend im Hippocampus lokalisiert, einer für Lernen wichtigen Gehirnstruktur, wogegen niederempfindliche Isoformen vorwiegend im Kleinhirn lokalisiert sind, welches Koordination und Gleichgewicht kontrolliert. Somit kann die Isoform-spezifische Hemmung durch Ethanol mit der anatomischen Region in der diese Isoformen lokalisiert sind und den neuropsychologischen Fehlfunktionen in Verbindung gebracht werden.

Das Polyaminamidtoxin **Argiotoxin₆₃₆** blockiert die Isoformen der beiden Untergruppen mit einer bis zu 100-fach unterschiedlichen Affinität. Aufgrund dieser Eigenschaften kann Argiotoxin₆₃₆ als molekulare Sonde zur Unterscheidung nativer NMDAR Isoformen eingesetzt werden. Die bekannte

Struktur des Toxins und die Kenntnis der Proteinbereiche mit denen es wechselwirkt, erlauben Rückschlüsse auf die Größe des extrazellulären Kanaleingangs. NMDAR Blocker können in pathophysiologischen Situationen den neuronalen Zelltod signifikant reduzieren. Deshalb kommt Argiotoxin₆₃₆ auch als Leitsubstanz für die Entwicklung von Neuroprotektiva in Betracht.

Der spannungsabhängige Block durch Mg^{2+} verleiht dem NMDAR die Funktion eines Rechenelements. Das Ausmaß der Spannungsabhängigkeit entscheidet über die Genauigkeit ("Schärfe"), mit der eine Entscheidung über "gleichzeitiges Zusammentreffen wichtiger Information" getroffen werden kann. Hier wurde gezeigt, daß sich die beiden Untergruppen in der Spannungsabhängigkeit des Mg^{2+} Blocks unterscheiden und dementsprechend einer Nervenzelle zu mehr oder weniger "scharfem Denken" verhelfen können. Die stärker spannungsabhängige Isoform ist vorwiegend im Hippocampus lokalisiert, was sehr gut mit seiner grundlegenden Funktion für Lernen und Gedächtnis übereinstimmt. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, die *in vivo* beschriebene, entwicklungsabhängige Änderung der Spannungsabhängigkeit des Mg^{2+} Blocks mit der Anwesenheit definierter Isoformen zu erklären. Die Bestimmung von Struktur determinanten des Isoform-spezifischen Mg^{2+} Blocks schafft die Basis für die Herstellung rekombinanter Tiere und erweitert damit die Möglichkeiten, die Bedeutung Isoform-spezifischer Eigenschaften im physiologischen Modell zu untersuchen.