

1. EINFÜHRUNG

1.1. Der nAChR ist ein Schlüsselmolekül bei der synaptischen Signaltransduktion.

Die Signalübertragung von Zelle zu Zelle erfolgt im Nervensystem an spezialisierten Kontaktzonen, den Synapsen. Die beteiligten Zellen sind an diesen Punkten meist durch den synaptischen Spalt getrennt und infolgedessen voneinander elektrisch isoliert. Es gibt elektrische und chemische Synapsen, die sich in Struktur und Funktion deutlich voneinander unterscheiden. An der chemischen Synapse verursacht die Änderung des elektrischen Potentials im präsynaptischen Neuron den Einstrom von Calcium durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Dies wiederum löst die Exocytose aus, in deren Verlauf die synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran verschmelzen und ihren Inhalt, sog. Neurotransmitter, in den synaptischen Spalt ausschütten. Der Transmitter diffundiert schnell durch den Spalt zur postsynaptischen Zelle, bindet dort an Ligand-gesteuerte Ionenkanäle und induziert auf diese Weise die Öffnung eines intrinsischen Ionenkanals. Die Selektivität des einsetzenden Ionenstroms definiert die Antwort der postsynaptischen Zelle: Erregende Transmitter wie Acetylcholin, Glutamat oder Serotonin öffnen Kationenkanäle, die eine Depolarisierung der postsynaptischen Membran verursachen, während hemmende Transmitter wie γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin Anionenkanäle öffnen, die eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran bedingen. Das Signal wird abgeschaltet, indem der Transmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt wird, entweder durch enzymatische Inaktivierung oder durch Wiederaufnahme in die Nervenendigung, die ihn ausgeschüttet hat, oder in umgebende Gliazellen. Beide Mechanismen gewährleisten sowohl die räumliche als auch die zeitliche Präzision der Signalübertragung.

Die Ligand-gesteuerten Ionenkanäle sind Schlüsselemente dieses Prozesses, denn sie erlauben die Umwandlung eines chemischen Signals in ein elektrisches. Sie sind sog. Typ-I-Rezeptoren, die sich dadurch auszeichnen, dass die Agonistbindungsstellen mit einem intrinsischen Ionenkanal gekoppelt sind, d.h. Empfänger, Transduktor und Effektor sind Bestandteile desselben Proteins und können nicht gesonderten Untereinheiten zugeordnet werden.

Ligand-gesteuerte Ionenkanäle bilden eine Proteinsuperfamilie, deren Mitglieder große Übereinstimmung bezüglich Struktur und Funktion aufweisen. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR) ist ein Prototyp für diese Superfamilie. Er kommt an der neuromuskulären Endplatte des peripheren Nervensystems und in Ganglien des zentralen Nervensystems vor. Aufgrund der starken Anreicherung des nAChR in elektrischen Geweben bestimmter Fische (z.B. aus *Electrophorus electricus* oder *Torpedo sp.*) stellt er das best untersuchte Mitglied innerhalb der Typ-I-Rezeptoren dar. Weitere Mitglieder der Superfamilie sind die Rezeptoren für 5-Hydroxytryptamin (5-HT₃), Glycin und γ -Aminobuttersäure (GABA).

1.2. Der nAChR ist ein allosterisches Protein.

1.2.1. Das Prinzip der Allosterie

Der Begriff "Allosterie" wurde eingeführt (Monod *et al.*, 1963), nachdem man entdeckt hatte, dass bestimmte Enzyme, die am bakteriellen Stoffwechsel beteiligt sind, durch das Endprodukt des jeweiligen Stoffwechselweges inhibiert werden ("*Feedback-Inhibition*"). Da das Endprodukt strukturell nur sehr eingeschränkt mit dem eigentlichen Substrat eines solchen Enzyms verwandt ist und zudem Mutationen in das Enzym eingeführt werden können, die die Regulierbarkeit des Enzyms unterdrücken, ohne direkt seine Aktivität zu beeinflussen, muss man davon ausgehen, dass die Wechselwirkungen zwischen Substrat und dem regulierenden Liganden nicht von einer Kompetition um gemeinsame Bindungsstellen herrühren; vielmehr beeinflussen sie sich gegenseitig von topographisch und stereochemisch unterschiedlichen Bindungsstellen aus (*griech. allos* = anders; *steros* = Raum). Die Bindung des regulatorischen Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, einem sog. allosterischen Übergang, der indirekt die Eigenschaften des aktiven Zentrums beeinflusst.

Später wurde der Begriff enger gefasst, indem die Kooperativität der Ligandbindung als weiteres notwendiges Merkmal allosterischer Proteine eingeschlossen wurde. Dies setzt eine oligomere Struktur des Proteins voraus, wobei mehrere identische Bindungsstellen vorhanden sein müssen, deren Affinität von der Zahl der bereits gebundenen Liganden abhängt. Mitte der sechziger Jahre wurden zwei verschiedene Modelle entwickelt, die

versuchten, die Grundzüge allosterischer Mechanismen auf molekularer Ebene zu erklären und mathematisch zu beschreiben.

Das *Symmetrie-Modell* (nach Monod, Wyman & Changeux, 1965), auch MWC-Modell genannt, geht davon aus, dass im Oligomer eine endliche Anzahl von identischen Ligandenbindungsstellen vorliegt, die homologe Positionen besetzen und symmetrisch angeordnet sind. Das Protein kann spontan in unterschiedlichen Konformationen existieren. Bei Übergängen von einer Konformation in die andere wird die Symmetrie im Oligomer jedoch grundsätzlich aufrecht erhalten, so dass die Untereinheiten innerhalb eines Oligomers stets in der gleichen Konformation vorliegen. Auch in Abwesenheit von Liganden besteht ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Zuständen; die Bindung eines Liganden führt zur Stabilisierung desjenigen Zustandes, für den der Ligand höhere Affinität hat.

Im *sequenziellen Modell* (nach Koshland, Nemethy & Filmer, 1966; KNF-Modell) können die Untereinheiten im Oligomer unabhängig voneinander unterschiedliche Konformationen einnehmen. Die Bindung eines Liganden führt zunächst zu lokalen Konformationsänderungen an der Bindungsstelle selbst, die dann von dort aus auf benachbarte Proteinbereiche übergreifen und so sequenziell über das gesamte Oligomer und über große Distanzen vermittelt werden. Je nachdem, ob die Bindung des ersten Liganden die des/der weiteren erleichtert oder erschwert, spricht man von positiver bzw. negativer Kooperativität.

Nach Aufklärung der Kristallstrukturen verschiedener allosterischer Proteine, z.B. des Hämoglobins oder der Aspartattranscarbamoylase, wurde zudem deutlich, dass regulatorische Liganden oft an den Kontaktflächen zwischen benachbarten Untereinheiten gebunden werden.

Auch der nAChR besitzt mehrere Merkmale eines allosterischen Proteins: Erstens ist er ein Oligomer, das aus einer endlichen Zahl zwar nicht identischer, jedoch homologer Untereinheiten besteht, die pseudo-symmetrisch angeordnet sind. Es gibt mehrere Bindungsstellen für Acetylcholin. Zweitens ist die Bindung des Agonisten kooperativ und erfolgt an den Kontaktflächen zwischen benachbarten Untereinheiten. Drittens ist das "aktive Zentrum" des Rezeptors, der Ionenkanal, nicht mit dem Ort der Agonistbindung identisch. Und viertens kann der nAChR in verschiedenen Konformationen existieren, die anhand ihrer Eigenschaften (z.B. der Affinitäten für einen bestimmten Liganden)

unterschieden werden können. Im folgenden sollen nun verschiedene Aspekte zu Struktur und Funktion des nAChR dargelegt werden, die zu seinen allosterischen Eigenschaften beitragen.

1.2.2. Die oligomere Struktur des nAChR

Der embryonale Muskel-nAChR besteht wie der aus *T. californica* aus vier verschiedenen Untereinheiten, die in der Stöchiometrie $\alpha_2\beta\gamma\delta$ zusammengesetzt sind und die zu einer Gesamtmasse von etwa 300 kD beitragen (Hucho *et al.*, 1978). Während der Entwicklung des Säugetiermuskels wird die γ - durch die ε -Untereinheit ausgetauscht. Für die neuronalen Rezeptoren sind wesentlich mehr Untereinheiten bekannt, die als α - bzw. non- α - (auch β -) Untereinheiten bezeichnet werden. Bisher sind acht α - und drei β -Untereinheiten neuronaler nAChRs identifiziert worden (Gotti *et al.*, 1997).

Alle Untereinheiten der Typ-I-Rezeptoren haben eine ähnliche Primärstruktur mit homologer vorhergesagter Transmembrantopologie (Abb. 1.1.): An eine große hydrophile N-terminale Region mit mehreren Consensus-Sequenzen für N-Glykosylierungen schließen sich drei hydrophobe Domänen an, die als M1, M2 und M3 bezeichnet werden und die jeweils lang genug sind, die Membran zu durchspannen. Diesen folgt eine lange, wahrscheinlich intrazellulär gelegene Schleife, die mehrere Konsensus-Sequenzen für Serin/Threonin- sowie für Tyrosin-Phosphorylierungen trägt. Den Abschluss bilden ein viertes hydrophobes Segment (M4) und ein kurzer C-Terminus.

Die α -Untereinheiten des nAChR sind von den übrigen Untereinheiten eindeutig durch eine Disulfidbrücke zwischen benachbarten Cysteinresten (Positionen 192/193 in der *Torpedo*-Sequenz) zu unterscheiden. Alle Untereinheiten des nAChR werden von unterschiedlichen Genen kodiert, sind aber homolog (Noda *et al.*, 1982; Noda *et al.*, 1983). So sind die Aminosäuren innerhalb einer Spezies zu 19% identisch und – unter Einbeziehung des konservativen Aminosäureaustausches – zu 35% ähnlich. Die neuronalen Untereinheiten wurden während der Evolution so stark konserviert, dass die Aminosäuren ein und derselben Untereinheit in verschiedenen Spezies zu 80% identisch sind (Le Novère & Changeux, 1995).

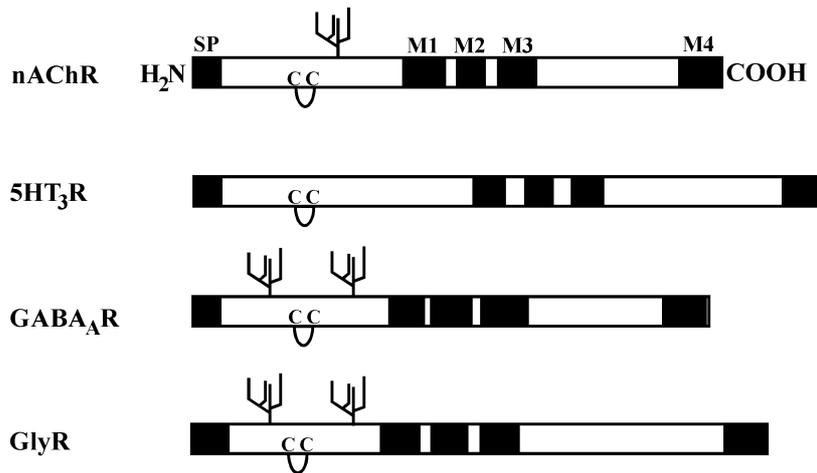


Abb. 1.1.: Die Mitglieder aus der Superfamilie Ligand-gesteuerter Ionenkanäle besitzen ähnliche Primärstrukturen (nach Hucho *et al.*, 1996). SP: Signalpeptid; M1-M4: vorhergesagte Transmembranbereiche.

Die ursprünglich beschriebenen allosterischen Proteine sind globulär; ihre Untereinheiten sind perfekt symmetrisch angeordnet, wie beispielsweise die der L-Lactatdehydrogenase, des Hämoglobins oder der Aspartattranscarbamoylase. Die Strukturen dieser Proteine besitzen mehrere Symmetrieachsen. Dagegen ist die Struktur des nAChR – bedingt durch die Membraninsertion – polar, denn die Agonistbindung erfolgt extrazellulär während der Ionenkanal innerhalb der Lipiddoppelschicht liegt. Die einzig mögliche symmetrische Anordnung der Untereinheiten ist die um eine zentrale Achse der Rotationssymmetrie. Nur in Einzelfällen ist der nAChR jedoch ein Homooligomer; so bilden z.B. neuronale $\alpha 7$ -Untereinheiten in rekonstituierten Systemen funktionstüchtige Rezeptoren. Im heteropentameren Muskel-nAChR kann man dagegen bestenfalls von einer pseudo-symmetrischen Anordnung der Untereinheiten sprechen.

Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen unterstützen dieses Modell: Durch die Streuung von Elektronen an tubulären Kristallen postsynaptischer Membranen aus *Torpedo marmorata* konnten Aufnahmen des Rezeptors in der geschlossenen Konformation zunächst mit 9 Å (Unwin, 1993), später sogar mit 4,6 Å (Miyazawa *et al.*, 1999) Auflösung gewonnen werden. Diese Aufnahmen (Abb.1.2.) zeigen den nAChR als ein insgesamt etwa 125 Å langes Transmembranprotein; 65 Å davon entfallen auf die extrazelluläre Domäne, die in den synaptischen Spalt ragt, 30 bis 40 Å erstrecken sich ins Cytoplasma. Die übrigen 33 % des Proteins sind in die Lipiddoppelschicht eingebettet. Im Querschnitt sowohl durch die extrazelluläre Domäne als auch durch den Membran benachbarten Teil der

intrazellulären Domäne erkennt man, dass die Untereinheiten pseudo-symmetrisch um eine fünfzählige Achse angeordnet sind.

Die beiden α -Untereinheiten können anhand der Verteilung der Elektronendichte eindeutig von den übrigen unterschieden werden. Die Zuordnung der restlichen Untereinheiten gelang nach Vernetzungsexperimenten mit verschiedenen photoaktivierbaren Derivaten des α -Neurotoxins II aus *Naja naja oxiana* (Machold *et al.*, 1995b). Im Rezeptor sind die Untereinheiten vom synaptischen Spalt aus betrachtet im Uhrzeigersinn in der Reihenfolge α_H - γ - α_L - δ - β angeordnet.

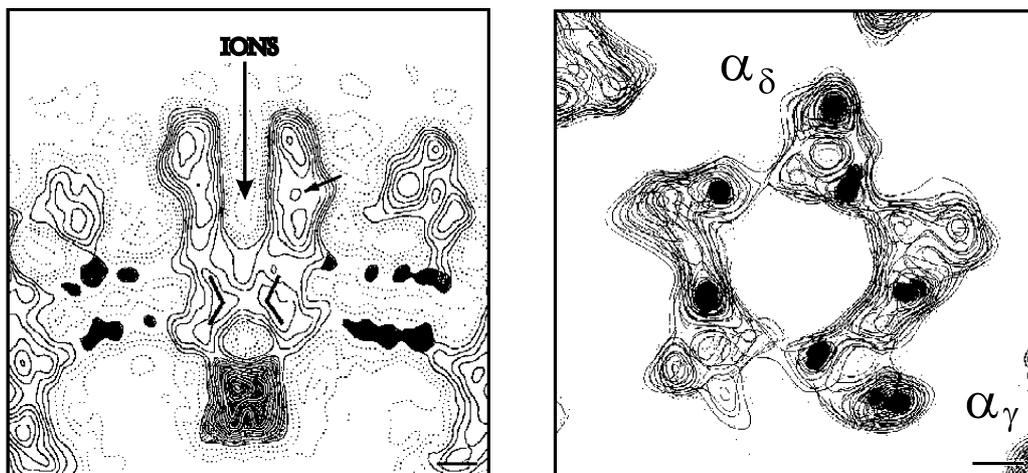


Abb. 1.2. Kryoelektronenmikroskopische Aufnahme des nAChR bei 4,6 Å Auflösung (aus Miyazawa *et al.*, 1999). Im Längsschnitt (*links*) erkennt man deutlich die wassergefüllte Pore im Zentrum des Proteins. Der Querschnitt (*rechts*) dokumentiert die pseudo-symmetrische Anordnung der Untereinheiten um den zentralen Ionenkanal. Die Balken bezeichnen eine Länge von 20 Å.

Mit Einschränkungen ist der nAChR also wie die klassischen allosterischen Proteine ein Oligomer mit annähernd symmetrischer Anordnung der Untereinheiten.

1.2.3. Die Bindungsstellen für Agonisten und kompetitive Antagonisten liegen an den Kontaktflächen zwischen benachbarten Untereinheiten

In klassischen allosterischen Proteinen liegen die Bindungsstellen für regulatorische Liganden oft an den Kontaktflächen zwischen benachbarten Untereinheiten. Der Muskel-nAChR bindet zwei Moleküle Acetylcholin pro Monomer in positiv kooperativer Weise (Weber & Changeux, 1974). Schon in der Stöchiometrie ist angedeutet, dass die beiden

α -Untereinheiten an der Bindung beteiligt sein dürften. Mittlerweile wurde aber gezeigt, dass für die Bindung von Agonisten und kompetitiven Antagonisten zusätzlich die benachbarte γ - bzw. δ -Untereinheit von Relevanz sind.

Zunächst wurde die Beteiligung der auf der α -Untereinheit gelegenen konservierten Cysteinreste 192/193 an der Agonistbindung nachgewiesen, denn sie werden durch den kompetitiven Antagonisten 4-(N-Maleimido-)benzyl-tri- ^3H -methylammonium alkyliert (Kao *et al.* 1984). Außerdem bedingen Mutationen dieser Reste eine Verminderung der Affinität für Acetylcholin (Mishina *et al.*, 1985). In Studien mit dem Photoaffinitätsreagenz p-N,N-(dimethylamino)-phenyldiazoniumfluoroborat (DDF) wurde deutlich, dass zur Bindung von Agonisten und kompetitiven Antagonisten recht große Bereiche der α -Untereinheit beitragen, denn dieses Reagenz markiert drei Peptide (α 1-105, α 145-171, α 179-205) innerhalb der N-terminalen Domäne (Dennis *et al.*, 1986). Später wurde gezeigt, dass konkret die Reste Trp86, Tyr93, Tyr149, Tyr151, Tyr190, Cys192 und Cys193 durch DDF modifiziert werden (Dennis *et al.*, 1988; Galzi *et al.*, 1990). Durch Mutageneseexperimente konnte die Bedeutung einiger Reste weiter untermauert werden (Galzi *et al.*, 1991; Tomaselli *et al.*, 1991; Fu & Sine, 1994). Diese Beobachtungen wurden in einem Modell zusammengefasst, nach dem das Polypeptid α 55-210 in drei Schleifen gefaltet ist, die die Bindung von Acetylcholin bewerkstelligen (Bertrand & Changeux, 1995). In Einklang mit dieser Vorstellung können synthetische Peptide oder proteolytische Fragmente aus der Sequenz kompetitive α -Neurotoxine binden (Gershoni *et al.*, 1983; Wilson *et al.*, 1984; Neumann *et al.*, 1986). Interessanterweise zeigte sich, dass die zwei zu einer Disulfidbrücke verknüpften Cysteinreste α -Cys128 und α -Cys142 zwar essentiell sind für die Bindung von α -Bungarotoxin, aber nicht die durch die Acetylcholin-Bindung induzierten Ionenströme beeinflussen (Blount & Merlie, 1990; Sumikawa & Gehle, 1992). Die Beteiligung von Nachbaruntereinheiten an der Bindung von Agonisten und kompetitiven Antagonisten deutete sich erstmals an, als man entdeckte, dass der kompetitive Antagonist d-Tubocurarin (dTC) hundertfach unterschiedliche Affinität für die beiden Bindungsstellen aufweist (Maelicke & Reich, 1976; Neubig & Cohen, 1979), denn diese Beobachtung ist nur schwer in Einklang zu bringen mit der Hypothese, dass dTC ausschließlich durch die (identischen) α -Untereinheiten gebunden würde. Durch die Expression unterschiedlicher Kombinationen von Untereinheiten wurde außerdem gezeigt, dass nur dann zwei verschiedene Affinitäten für dTC zu beobachten sind, wenn neben der

α - sowohl die γ - als auch die δ -Untereinheit exprimiert werden (Kurosaki *et al.*, 1987; Blount & Merlie, 1989). Schließlich wurde dTC photoinduziert in genau diese Untereinheiten inkorporiert (Pedersen & Cohen, 1990). Damit war eindeutig belegt, dass die Bindungsstellen an den Kontaktflächen α/δ und α/γ liegen. Unter den Aminosäureresten, die nach Photoaktivierung von dTC markiert werden, befinden sich neben den bereits erwähnten α -Tyr190, α -Cys192 und α -Tyr198 auch die Reste γ -Trp55 und δ -Trp57 sowie in geringerem Umfang γ -Tyr111 und γ -Tyr117 (Chiara & Cohen, 1997). Für die unterschiedliche Affinität der beiden Bindungsstellen für dTC konnten distinkte Seitenketten verantwortlich gemacht werden, nämlich γ -Tyr111 und δ -Arg113 (Chiara *et al.*, 1999); zusätzlich könnten die Reste γ -Ile116, γ -Tyr117 und γ -Ser161 sowie die komplementären Aminosäuren δ -Val118, δ -Thr119 und δ -Lys163 für die Selektivität der dTC-Bindung entscheidend sein (Sine, 1993). Es fällt auf, dass die meisten dieser Reste aromatische Gruppen enthalten. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die quartäre Ammoniumgruppe des Acetylcholins mit dem π -System eines dieser Aromaten wechselwirkt (Williamson *et al.*, 1998).

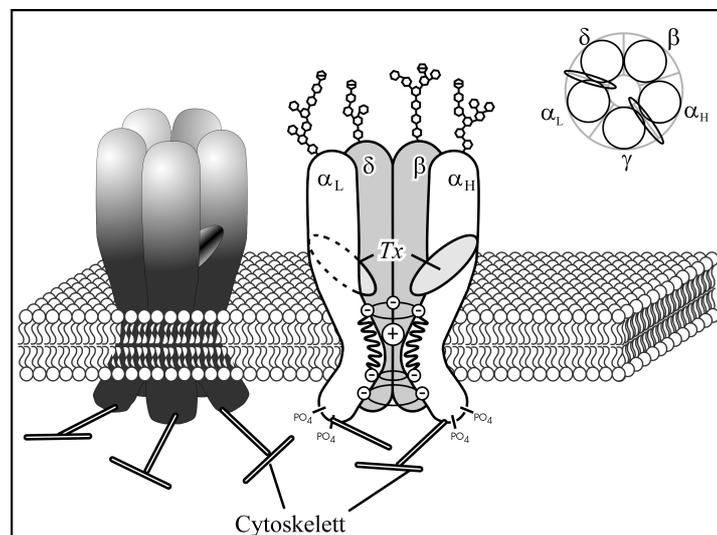


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des nAChR in der Membran (aus Hucho *et al.*, 1996). Die Bindungsstellen für Agonisten und kompetitive Antagonisten liegen an den Kontaktflächen zwischen den α/γ - und den α/δ -Untereinheiten. In diesem Modell ist außerdem veranschaulicht, dass die Orte von Agonistbindung und Ionenleitung nicht übereinstimmen.

Der Gruppe um A. Karlin gelang erstmals die Identifizierung der ersten negativ geladenen Reste im Bereich der Bindungsstellen. So vernetzte ein 9 Å langes heterobifunktionelles Reagenz die beiden vicinalen Cysteine α -Cys192/Cys193 mit den Resten Asp165,

Asp180 und Glu182 der δ -Untereinheit (Czajkowski & Karlin, 1991 und 1995). Da durch Mutation der Reste γ -Asp174 und δ -Asp180 die Affinität des nAChR für Agonisten weit stärker sinkt als für verschiedene kompetitive Antagonisten (Martin *et al.*, 1996), wurde spekuliert, dass diese Seitenketten durch Interaktion mit der (positiv geladenen) Choliniumgruppe des Agonisten einen wesentlichen Beitrag an der Ligandbindung leisten und u.U. auch am daran anschließenden Übergang zur aktiven Konformation beteiligt sind. Der Rest Asp152 auf der α -Untereinheit könnte gleichsam eine negative Ladung im Bereich der Bindungsstelle beisteuern (Sugiyama *et al.* 1996). Weitere saure Seitenketten der α -Untereinheit sollen mit basischen Resten der α -Neurotoxine wechselwirken (Ackermann *et al.*, 1998).

Kürzlich durchgeführte Mutagenesestudien legen nahe, dass die unterschiedliche Affinität von α -Neurotoxinen für die γ - bzw. die embryonale ε -Untereinheit dadurch zustande kommt, dass im einen Fall die Toxinreste Arg33 und Arg36 mit γ -Pro175 und γ -Glu176, im anderen Fall mit entsprechenden Threonin- und Alaninresten der ε -Untereinheit wechselwirken (Osaka *et al.*, 1999). Durch Konstruktion von Chimären der γ - und der δ -Untereinheit und durch Analyse von Punktmutationen wurde zudem deutlich, dass für die 10.000-fach höhere Affinität der Bindung des α -Conotoxins M1 an die α/δ -Bindungsstelle des nAChR aus Mausmuskel die Reste γ -Lys34, γ -Ser111 und γ -Phe172 bzw. die korrespondierenden Reste δ -Ser36, δ -Tyr113 und δ -Ile178 ausschlaggebend sind (Sine *et al.*, 1995); gleichzeitig wirken sich Mutationen innerhalb der α -Untereinheit unterschiedlich auf die Affinitäten der beiden Bindungsstellen aus (Sugiyama *et al.*, 1998).

Eine Fülle von Studien belegt also, dass zur Bindung von Agonisten und kompetitiven Antagonisten relativ große Bereiche sowohl der α -Untereinheit als auch der jeweils benachbarten γ - bzw. δ -Untereinheit erforderlich sind. Im Gegensatz zu klassischen allosterischen Proteinen, die eine Substratbindungsstelle pro Untereinheit besitzen, gibt es im Muskel-nAChR allerdings nur zwei Bindungsstellen pro Rezeptorpentamer. Charakteristisch für die Bindungsstellen ist eine Anhäufung aromatischer Reste, aber auch die Bildung eines anionischen Milieus; beide könnten für die Komplexierung von Acetylcholin zuträglich sein, einerseits durch Interaktion der Choliniumfunktion mit dem aromatischen π -System, oder andererseits durch elektrostatische Wechselwirkungen.

1.2.4. Der Ionenkanal des nAChR liegt auf der zentralen Pseudo-Symmetrieachse und wird durch allosterische Mechanismen geöffnet

Die spezifische Bindung des Agonisten Acetylcholin induziert eine Konformationsänderung des nAChR, in deren Verlauf der intrinsische Ionenkanal geöffnet wird; durch diesen können dann Kationen wie Na^+ , K^+ und Ca^{2+} entlang ihres elektrochemischen Gradienten diffundieren. Man nimmt an, dass der Ionenkanal sich auf der Achse der Rotationssymmetrie befindet, denn in den bereits erwähnten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von N. Unwin (1993) sieht man einen Bereich niedriger Elektronendichte im Zentrum des Oligomers, der sich vom synaptischen Spalt aus zur intrazellulären Seite des Rezeptors hin stetig verjüngt. Die engste Stelle des Kanals läge demnach im Bereich der Transmembrandomäne des nAChR.

Diese Vorstellung steht in Einklang mit der Lokalisierung der Bindungsstellen für verschiedene nicht-kompetitive Inhibitoren (NCIs). NCIs können den Agonist-induzierten Ionenstrom unterbinden, ohne die Agonistbindung selbst zu stören. Einige sind positiv geladen und werden als Kanalblocker bezeichnet, denn sie binden mit hoher Affinität im offenen Kanalzustand an den nAChR. Ein gängiges Modell geht daher davon aus, dass diese Substanzen wirken, indem sie – ähnlich einem Korken, der in einem Flaschenhals steckt – den Ionenkanal verstopfen. Da in den meisten Fällen nur in sehr geringem Maß eine strukturelle Verwandtschaft zum Agonisten besteht, liegt es auf der Hand, dass Agonistbindung und Ionenleitung an topographisch unterschiedlichen Bereichen des nAChR erfolgen, also allosterisch miteinander gekoppelt sind. FRET-Messungen zwischen dem Agonist-Analogen Dansyl- C_6 -Cholin und fluoreszenzmarkierten Fettsäuren wiesen darauf hin, dass die Agonistbindungsstellen 30 bis 40 Å von der Membranoberfläche entfernt sind (Valenzuela *et al.*, 1994). Durch genauere Photoaffinitätsmarkierungen wurde jedoch gezeigt, dass α -Neurotoxine nicht weiter als 25 Å vom Eingang des Ionenkanals entfernt an die extrazelluläre Domäne des nAChR binden..

Einige NCIs können den Rezeptor photo-induziert modifizieren; in vielen dieser Fälle konnten an der Bindung beteiligte Aminosäurereste verschiedener Untereinheiten identifiziert werden (im Überblick bei Changeux *et al.*, 1990; Hucho *et al.*, 1996; Arias, 1996). Es ist auffällig, dass diese Reste meist im Bereich von M2, also innerhalb der Membran und in signifikantem Abstand von den Agonistbindungsstellen liegen. So markiert das lipophile Reagenz Triphenylmethylphosphonium (TPMP^+) die homologen

und stark konservierten Reste δ -Ser262 (Oberthür *et al.*, 1986), α -Ser248 und β -Ser254 (Hucho *et al.*, 1986). Das Neuroleptikum Chlorpromazin (Abb. 1.4.) markiert ebenfalls δ -Ser262, β -Ser254 und α -Ser248, aber auch γ -Ser257; zusätzlich fand man eine Inkorporation in β -Leu257, γ -Thr253 und γ -Leu260 (Giraudat *et al.*, 1986; Giraudat *et al.*, 1987; Giraudat *et al.*, 1989; Revah *et al.*, 1990). Aus der Periodizität des Markierungsmusters wurde auf einen α -helikalen Charakter von M2 geschlossen. Entsprechend konnte auch für das Anästhetikum QX-222 gezeigt werden, dass es mit Resten zweier aufeinander folgender Helixwindungen interagiert (Leonard *et al.*, 1988; Charnet *et al.*, 1990). Ebenso markiert das Lokalanästhetikum Tetracain mehrere Reste im Bereich von M2 aller vier Untereinheiten (Gallagher & Cohen, 1999). Da pro Rezeptormonomer jeweils ein Molekül der NCIs TPMP⁺, Chlorpromazin oder Tetracain bindet, wurde ferner gefolgert, dass die Untereinheiten im Oligomer symmetrisch angeordnet sind; dem hohen Konservierungsgrad der Sequenz in diesem Bereich entsprechend würden von allen Untereinheiten homologe Reste zum Lumen des Ionenkanals hin exponiert.

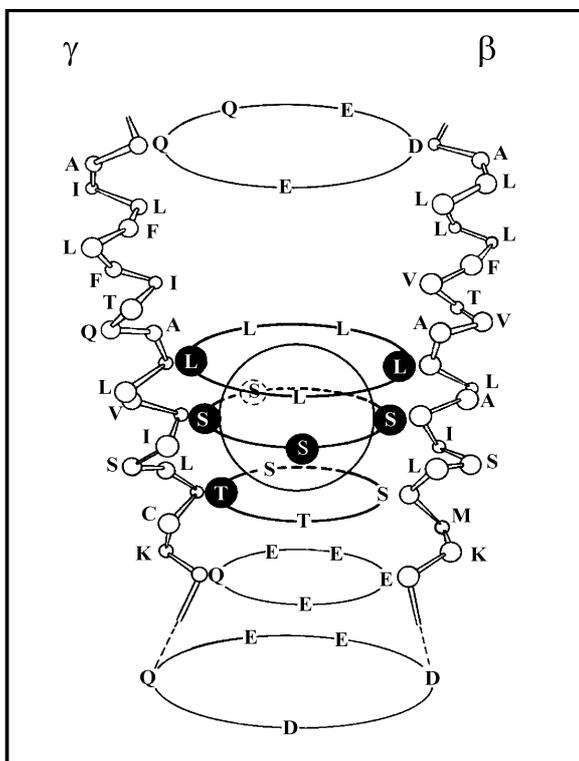


Abb. 1.4: Chlorpromazin in der Pore des nAChR (nach Revah *et al.*, 1990). Gezeigt sind die M2-Segmente der γ - und der δ -Untereinheit; ihre Anordnung wurde aus dem Markierungsmuster des NCIs abgeleitet. Drei Ringe negativ geladener Aminosäurereste nehmen Einfluss auf die Leitfähigkeit des Ionenkanals.

Dieses Bild konnte durch eine Kombination von Punktmutagenese und Einzelkanalmessungen weiter differenziert werden: So wurden drei Ringe negativ

geladener Aminosäuren identifiziert, die die Leitfähigkeit des nAChR bestimmen (Imoto *et al.*, 1988); dies sind in der α -Untereinheit (und in homologen Positionen der übrigen Untereinheiten) auf der cytosolischen Seite α -Asp238 ("*innerer Ring*"), nahe der engsten Stelle des Ionenkanals α -Glu241 ("*intermediärer Ring*") und weiter extrazellulär α -Glu262 ("*äußerer Ring*"). Daneben beeinflusst ein Ring von Ser/Thr-Resten dicht am intrazellulären Ende von M2 die Selektivität des nAChR für organische und anorganische Kationen (Imoto *et al.*, 1991; Villaroel & Sakmann, 1992; Cohen *et al.*, 1992).

Die Mutation von zwei Ringen negativ geladener Seitenketten im homomeren $\alpha 7$ -Rezeptor (äußerer und intermediärer Ring) zu neutralen Aminosäuren blieb überraschenderweise ohne Einfluss auf die Selektivität des nAChR für Kationen (Galzi *et al.*, 1992; Bertrand *et al.*, 1993). Durch Einführung eines im Wildtyp nicht vorhandenen Prolinrestes am intrazellulären Ende von M2 (Pro236'), Mutation des intermediären Glu237 nach Ala und Austausch des hydrophoben Val251 gegen ein polares Thr wurde der nAChR sogar in einen anionischen Kanal überführt. Diese Experimente zeigten, dass offenbar an der Permeation von Kationen durch die extrazelluläre Domäne keine direkten elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Wand des Ionenkanals beteiligt sind.

Durch sog. SCAM-Experimente (*substituted cysteine accessibility method*) können einzelne Aminosäurereste auf ihre Rolle bei der Ionenleitung hin untersucht werden. Hierfür werden sie zunächst zu Cystein mutiert und danach mit unterschiedlichen SH-spezifischen Reagenzien modifiziert. Anschließend überprüft man, ob die Modifikation der Reste die Ionenleitung beeinträchtigt. Die Gruppe um A. Karlin führte diese Experimente mit vielen Mutanten in den Transmembranbereichen M1 und M2 verschiedener Untereinheiten durch (Akabas *et al.*, 1992 und 1994; Akabas & Karlin, 1995; Zhang & Karlin, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Es zeichnete sich ein Bild ab, nach dem ein Großteil von M2 der α -Untereinheit α -helikale Struktur einnimmt. Zum intrazellulären Ende von M2 hin, also im Bereich der engsten Stelle des Ionenkanals, geht die Struktur jedoch in ein β -Faltblatt über. Ein ähnliches Bild ergab sich nach Analyse von β -M2, jedoch ist eine signifikante Asymmetrie im Vergleich bestimmter homologer Reste von α -M2 festzuhalten. Überraschenderweise tragen auch Reste zur Ionenleitung bei, die im N-terminalen Drittel von M1 der α - und der β -Untereinheit liegen. Dies hängt wahrscheinlich mit der Trichterform der Pore zusammen.

Das "aktive Zentrum" des nAChR, der Ionenkanal, liegt also in signifikanter Entfernung von den Agonistbindungsstellen und muss über allosterische Mechanismen geöffnet werden. Ähnlich den regulatorischen Zentren anderer allosterischer Proteine ist er auf der Achse der Pseudo-Rotationssymmetrie lokalisiert. Dort binden Liganden des nAChR, die seine Funktion regulieren können. Der Ionenkanal wird im wesentlichen von homologen Segmenten aller fünf Untereinheiten gebildet. Es treten jedoch auch feine Unterschiede im Beitrag spezifischer Aminosäurereste aus verschiedenen Untereinheiten bei der Ionenleitung auf.

1.2.5. Der nAChR kann verschiedene funktionelle Zustände einnehmen

Elektrophysiologische Messungen weisen darauf hin, dass der nAChR in mindestens drei verschiedenen Zuständen vorliegen kann: Der *Ruhezustand* zeichnet sich durch eine geringe Affinität für den Agonisten Acetylcholin aus ($K_D \approx 1 - 5 \mu\text{M}$; Watty *et al.*, 1997a); die Bindungsstellen sind nicht besetzt und der Ionenkanal ist geschlossen. Die Bindung von Acetylcholin löst – abhängig vom Membranpotential – innerhalb von Mikrosekunden einen Übergang des nAChR in den *aktiven Zustand* aus (Magleby & Stevens, 1972; Neher & Sakmann, 1976; Hamill & Sakmann, 1981). Der Ionenkanal wird daraufhin für 1 - 10 Millisekunden geöffnet, so dass einwertige und zweiwertige Kationen den Kanal passieren können. Die Leitfähigkeit liegt bei 15 bis 30 pS; dies entspricht einer Wanderung von etwa 10.000 Ionen pro Millisekunde durch das elektrische Feld (Dreyer & Peper, 1975). Bei länger anhaltender Agonistexposition geht der nAChR in den *desensibilisierten Zustand* über; hier ist der Kanal geschlossen, jedoch nicht aktivierbar (Katz & Thesleff, 1957). Die Affinität für Acetylcholin ist wesentlich höher als im Ruhezustand ($K_D \approx 10 - 40 \text{ nM}$). Abhängig von der Geschwindigkeit, mit der dieser Zustand erreicht wird, unterscheidet man eine schnelle (1-10 Millisekunden; Sakmann *et al.*, 1980) und eine langsame Desensibilisierung (Sekunden bis Minuten; Neubig *et al.*, 1982; Heidmann *et al.*, 1983a). Durch eine Vielzahl von Studien ist gezeigt worden, dass die unterschiedlichen Zustände des nAChR durch distinkte Quartärstrukturen charakterisiert sind (siehe Abschnitt 4.3.). Dennoch liegen die Mechanismen, über die das Bindungsereignis eines Agonistmoleküls zur Kanalöffnung führt, noch weitgehend im Dunkeln.

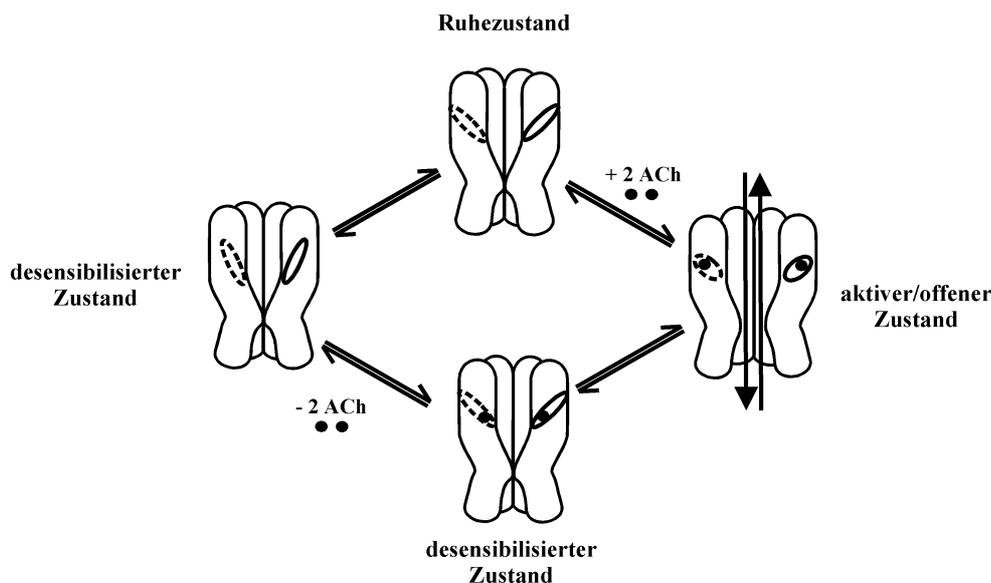


Abb. 1.5. Überblick über die verschiedenen postulierten allosterischen Zustände des nAChR. Zwischen allen Zuständen herrscht ein Gleichgewicht. Nach dem Symmetriemodell existiert diese Gleichgewicht auch in Abwesenheit von Agonisten, nach dem Sequenzmodell bedarf es der Agonistbindung, um die für die Zustandsänderung notwendigen Konformationsänderungen zu induzieren.

1.2.6. Weitere allosterische Bindungsstellen

Mehrere endogene und exogene Liganden des nAChR sind beschrieben worden, die dessen Funktion modulieren, jedoch weder mit den Agonistbindungsstellen noch mit dem Ionenkanal wechselwirken (Abb.1.6.). Dazu gehören die hoch-affinen NCIs Ethidium und Quinacrin, niedrig-affine Anästhetika wie Halothan, negativ geladene Phospholipide, freie Fettsäuren und Cholesterin.

Ethidium wurde durch elektrophysiologische Messungen (Sterz *et al.*, 1982) und durch Fluoreszenztitrationen (Herz *et al.*, 1987) eindeutig als nicht-kompetitiver Inhibitor des nAChR charakterisiert, dessen Bindung durch andere hoch-affine NCIs kompetiert werden kann, und für den eine Bindungsstelle pro Rezeptormonomer vorhanden ist. In FRET-Messungen, in denen neben Ethidium Fluoreszenz-markierte Agonistanaloga eingesetzt wurden, ergab sich eine Distanz von 21 – 40 Å zwischen beiden Fluorophoren (Herz *et al.*, 1989). Basierend auf diesen Messungen und der Erkenntnis, dass sich die Agonistbindungsstellen etwa 35 Å über der Membranoberfläche befinden (Valenzuela *et al.*, 1994), wurde spekuliert, dass Ethidium im oder nahe dem Lumen des Ionenkanals bindet. Als sich jedoch in FRET-Messungen ein Abstand von Ethidium zur Membranoberfläche von 52 Å ergab, schien dies nur mit einer Lokalisation der

Bindungsstelle deutlich außerhalb der Transmembrandomäne des nAChR vereinbar zu sein, knapp oberhalb der Agonistbindungsstellen und etwa 15-20 Å von der Pseudo-Symmetrieachse entfernt (siehe Johnson & Nuss, 1994 für eine ausführliche Diskussion). Das Malariamedikament Quinacrin ähnelt in seinen spektroskopischen und pharmakologischen Eigenschaften Ethidium sehr. Dennoch ist mehrfach diskutiert worden, dass beide Substanzen an unterschiedliche Regionen des nAChR binden. Auch für Quinacrin gibt es pro Rezeptormonomer eine hoch-affine Bindungsstelle, deren Verfügbarkeit von der Gegenwart anderer hoch-affiner NCIs abhängt (Valenzuela *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1993a,b). FRET-Messungen weisen hingegen auf einen Abstand von weniger als 10 Å zu lipophilen Akzeptor-Fluorophoren hin (Valenzuela *et al.*, 1992); wenn man bedenkt, dass die Wand des Rezeptors in Membrannähe etwa 20 Å dick ist, sollte die Quinacrin-Bindungsstelle an der Grenzschicht zwischen Membranlipiden und Rezeptor liegen. Die Beobachtung, dass verschiedene Spin-markierte Lipidanaloga (Valenzuela *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1993a,b; Johnson & Ayres, 1996) die Quinacrin-Fluoreszenz wesentlich besser quenchen können als die Ethidium-Fluoreszenz, ist konsistent mit dieser Lokalisation. Ferner wurde postuliert, dass die Bindung etwa 7 Å unterhalb der Membranoberfläche erfolgt (Arias *et al.*, 1993a). Quinacrinazid wurde photo-induziert in die N-terminale Hälfte von M1 inkorporiert (DiPaola *et al.*, 1990); die Zeitabhängigkeit der Markierung wies auf eine bevorzugte Wechselwirkung mit dem offenen Zustand des Ionenkanals hin. Es wäre daher möglich, dass dieser Bereich von M1 abhängig vom Öffnungszustand des Ionenkanals vom Lumen aus zugänglich ist (Karlin & Akabas, 1995). Aus direkten Konkurrenzexperimenten ergaben sich in Widerspruch zu all diesen Befunden auch Hinweise, dass Ethidium und Quinacrin an dieselbe Region des nAChR binden (Lurtz *et al.*, 1997).

Neben den bisher beschriebenen hoch-affinen NCIs gibt es eine weitere Klasse sog. niedrig-affiner NCIs (Heidmann *et al.*, 1983b), für die 10 bis 30 Bindungsstellen pro Rezeptormonomer vorliegen. Sie lassen sich nicht durch den hoch-affinen NCI Histronicotoxin verdrängen und binden wahrscheinlich an der Grenzschicht zwischen dem Rezeptor und seiner Lipidumgebung. So markiert das Lokalanästhetikum Halothan photo-induziert v.a. von der Membranphase aus alle vier Untereinheiten etwa gleich stark im Bereich der Transmembranbereiche (Eckenhoff, 1996). Viele hoch-affine NCIs binden, wenn sie in großem Überschuss vorliegen, ebenfalls an die Bindungsstellen im Lipidannulus des Rezeptors. Um die Bindung niedrig-affiner NCIs zu verfolgen, wurde v.a.

auf die ESR-(Elektronen-Spin-Resonanz)-Spektroskopie zurückgegriffen. So fand man, dass die Bindung von Spin-markierten lokalen Anästhetika mit einer starken Einschränkung der Beweglichkeit der Doxylgruppe einhergeht (Earnest *et al.*, 1984; 1986; Palma *et al.*, 1986; Horvath *et al.*, 1990), deren Ausmaß häufig von der Anwesenheit cholinergischer Agonisten abhängt; folglich können manche der niedrig-affinen NCIs Konformationsunterschiede des nAChR detektieren.

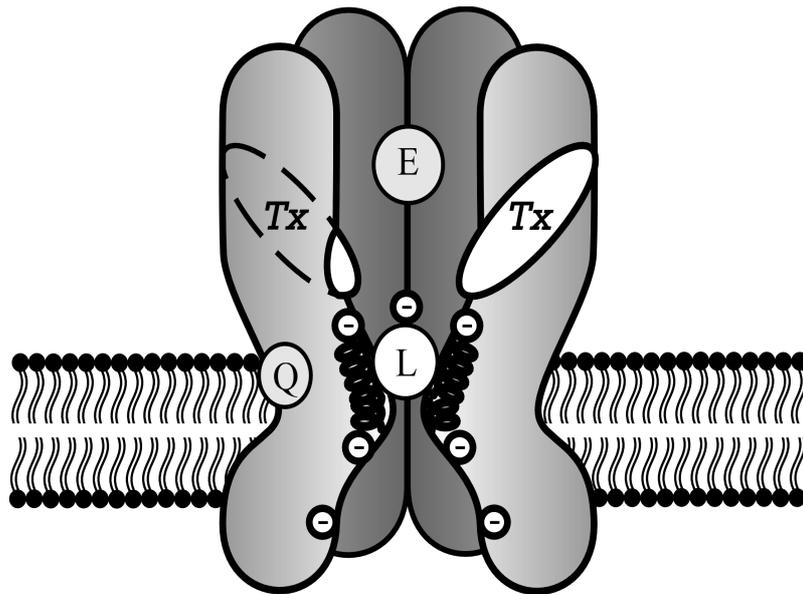


Abb. 1.6. Modell für die Bindungsstellen nicht-kompetitiver Antagonisten des nAChR. Luminale NCIs (L) binden im Bereich der M2-Helices auf der zentralen Pseudosymmetrieachse. Die NCIs Quinacrin (Q) und Ethidium (E) binden zwar auch mit hoher Affinität an den nAChR, doch liegen die Bindungsstellen an der Protein-Lipid-Grenzschicht bzw. im Vestibül des nAChR, etwas oberhalb der Agonistbindungsstellen.

Man weiß seit langem, dass die Funktionsfähigkeit des nAChR von der Anwesenheit bestimmter Lipidspezies innerhalb der Membran abhängig ist. So müssen bei Rekonstitutionsexperimenten Cholesterin und negativ geladene Phospholipide zugesetzt werden, um korrekte Ionenkanaleigenschaften zu gewährleisten (Fong & McNamee, 1986; Sunshine & McNamee, 1994). Insbesondere Cholesterin soll die Leitfähigkeit des Rezeptors als auch die Kooperativität des Agonist-induzierten Kationenflusses verstärken (Nelson *et al.*, 1980), während die Rate der Desensibilisierung durch den Cholesteringehalt der Membran nicht beeinflusst wird (Rankin *et al.*, 1997). Aus frühen ESR-Experimenten ist bekannt, dass der Rezeptor bevorzugt mit negativ geladenen Phospholipiden, freien Fettsäuren und Cholesterin assoziiert (Ellena *et al.*, 1983). Die Selektivität dieser

Wechselwirkungen ist zum Teil auf elektrostatische Interaktionen zwischen positiv geladenen Bereichen des nAChR und negativ geladenen Kopfgruppen zurückzuführen (Bhushan & McNamee, 1993; Raines & Miller, 1993). Ferner wurde behauptet, dass anionische Phospholipide und Cholesterin Sekundärstrukturen im Rezeptor stabilisierten, indem sie die Ausbildung von α -helikalen bzw. β -Faltblattstrukturen unterstützten (Fong & McNamee, 1987; Fernandez-Ballester *et al.*, 1993). Durch lipophile Affinitätsreagenzien wie 1-Azidopyren lassen sich v.a. M4 und in geringerem Maß auch M1 und M3 markieren, so dass davon auszugehen ist, dass der Transmembranbereich M4 am stärksten zur Lipidphase hin orientiert ist (Blanton & Cohen, 1992).

Es gibt folglich eine Vielzahl von Liganden des nAChR, die weder an die Agonistbindungsstellen noch an die hoch-affine NCI-Bindungsstelle im Lumen des Ionenkanals binden, und dennoch die Funktion des nAChR beeinflussen können. Viele dieser Liganden binden an der Grenzschicht zwischen dem Rezeptorprotein und der Membran. Dies unterstreicht die Komplexität der allosterischen Eigenschaften des Rezeptors.