

2. AUFGABENSTELLUNG UND EXPERIMENTELLER ANSATZ

Kürzlich wurde gezeigt, dass durch Lysin-spezifische, kovalente Vernetzung die allosterischen Wechselwirkungen im nAChR aufgehoben werden können (Watty *et al.*, 1997a). Durch die Behandlung nAChR-reicher Membranen aus *Torpedo californica* mit Glutardialdehyd in An- bzw. Abwesenheit von Agonist war es möglich, den Rezeptor in definierten Konformationen, nämlich dem desensibilisierten bzw. dem Ruhezustand, zu fixieren.

Die erste Fragestellung, die in der vorliegenden Arbeit behandelt werden sollte, widmete sich der Charakterisierung der Ligandbindungseigenschaften dieser definierten Rezeptorkonformationen. Durch Korrelation der Affinitäten verschiedener Liganden mit der Fähigkeit dieser Liganden, den Konformationszustand des nAChR zu beeinflussen, sollte die Gültigkeit grundlegender Hypothesen des Symmetriemodells evaluiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob die Bindungsstelle für den hoch-affinen NCI Ethidium tatsächlich außerhalb des Lumens des nAChR liegt, wie auf Basis von FRET-Messungen postuliert worden ist. Dazu wurde im desensibilisierten Zustand vernetzter nAChR in Fluoreszenztitrationen eingesetzt, durch die überprüft werden sollte, ob die Bindung von Ethidium durch luminale NCIs auch dann noch möglich ist, wenn allosterische Mechanismen ausgeschlossen sind. Mit demselben Test sollte die Affinität einer Serie von Polyaminamidderivate für das Lumen des nAChR bestimmt werden, um Strukturmerkmale zu definieren, die eine hoch-affine Bindung in der Pore ermöglichen.

Die dritte Problemstellung betraf das Bindungsverhalten von α -Neurotoxinen (α -NTs) an den nAChR. Da diese kompetitiven Peptidantagonisten in einer Art Tunnel binden, der die gesamte Wand der extrazellulären Domäne durchziehen (Hucho *et al.*, 1996), stellt sich die Frage, ob sich α -NTs ihrer Bindungsstelle vom Lumen des nAChR oder von der Peripherie aus nähern. Da nur im zweiten Fall ein Einfluss der Packungsdichte der Rezeptoren zu erwarten ist, sollte die Assoziation der Toxine in Abhängigkeit von der Membranfluidität bestimmt werden. Ferner sollte untersucht werden, welche Rolle Cholesterin für die allosterischen Eigenschaften des nAChR spielt.