

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Das Gleichgewicht zwischen den allosterischen Zuständen des nAChR

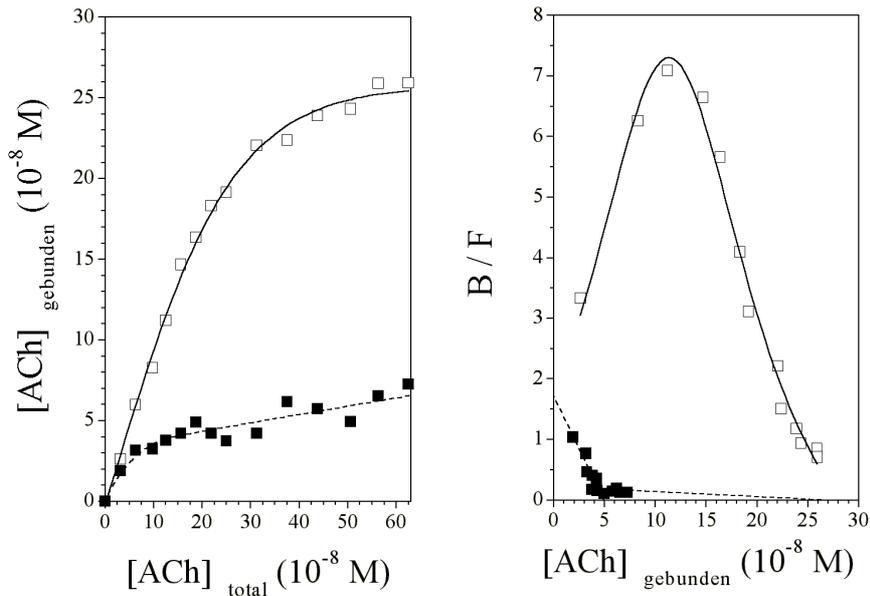
##### 3.1.1. Durch kovalente Vernetzung können die allosterischen Eigenschaften des nAChR unterbunden werden

Der nAChR aus *Torpedo californica* besitzt wie der muskel-spezifische nAChR zwei Bindungsstellen für Agonisten und kompetitive Antagonisten. Die Bindung von Acetylcholin erfolgt positiv kooperativ, d.h. die Bindung eines Liganden erleichtert die Bindung des zweiten. Dies äußert sich in einem sigmoiden Verlauf der Bindungskurve (Abb. 3.1.) bzw. einem charakteristischen glockenförmigen Scatchard-Plot. Der Hill-Koeffizient, der das Ausmaß der Kooperativität beschreibt, hat im nativen Zustand des Rezeptors den Wert 1,45; dieser Betrag liegt etwas unter dem aus elektrophysiologischen Messungen ermittelten (1,6), jedoch signifikant über eins. Nach dem Symmetriemodell erklärt sich das Bindungsverhalten dadurch, dass Acetylcholin in ein hypothetisches präformiertes Gleichgewicht zwischen den möglichen Zuständen des nAChR



eingreift, indem es mit hoher Affinität an den desensibilisierten Zustand bindet und so das Gleichgewicht zur rechten Seite hin verschiebt.

Watty *et al.* (1997) zeigten, dass der nAChR durch Vernetzung mit Lysin-spezifischen homo-bifunktionellen Reagenzien in definierten Konformationen "eingefroren" werden kann. Durch die Behandlung mit dem relativ kurzen Vernetzter Glutaraldehyd werden vermutlich ausschließlich Reste benachbarter Untereinheiten miteinander verbunden. Vernetzt man in Abwesenheit jeglicher Liganden erhält man eine Population von Bindungsstellen mit niedriger Affinität ( $K_D = 0,85 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) für Acetylcholin (Abb. 3.1.), die sehr wahrscheinlich dem Ruhezustand entspricht. Die Linearität im Scatchard-Plot und der Hillkoeffizient von eins belegen eindeutig, dass im Verlauf der Reaktion die Kooperativität der Agonistbindung verloren gegangen ist.



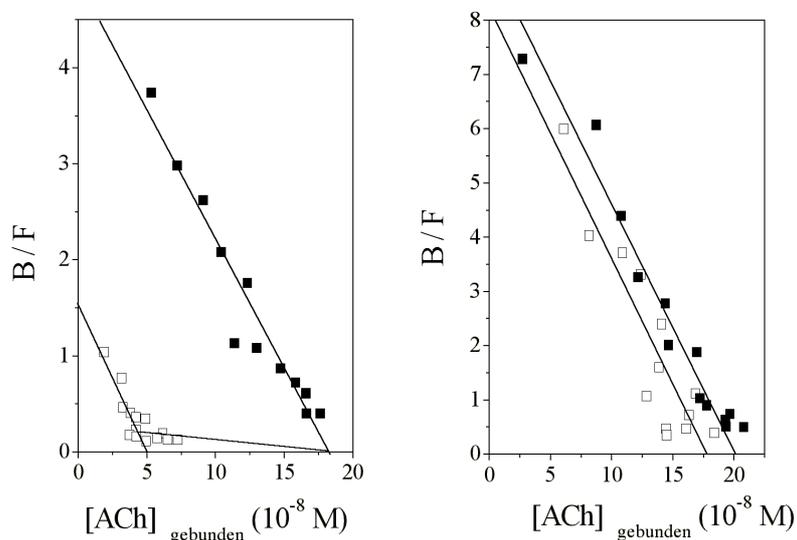
**Abb. 3.1: Bindung von  $[^3\text{H}]\text{ACh}$  an nAChR-reiche Membranen.** Gezeigt ist die Bindung vor (*durchgezogene Linie*) und nach (*gestrichelte Linie*) Vernetzung mit Glutaraldehyd. (*Links*) Bindungskurven, (*rechts*) Scatchard-Plots. Der Betrag des Kehrwerts der Steigung im Scatchard-Plot entspricht der Dissoziationskonstante. Die Proteinmenge im Bindungstest wurde so gewählt, dass v.a. der Anteil hoch-affiner Bindungsstellen erfasst wurde.

Im Ruhezustand findet man zusätzlich noch eine Population (ca. 27-35% von  $B_{\text{max}}$ ) von Rezeptoren, deren Affinität für Acetylcholin etwa der im desensibilisierten Zustand (siehe unten) entspricht. Diese Beobachtung wurde als Indiz für die Existenz eines präformierten Gleichgewichts zwischen den möglichen Zuständen des nAChR gedeutet: Auch in Abwesenheit von Liganden befände sich der Rezeptor spontan in verschiedenen Konformationen, so dass in Bindungstests die für alle Zustände charakteristischen Affinitäten detektiert werden können. Der Anteil einzelner Populationen schlägt sich in der allosterischen Konstante  $L$  nieder, die dem Quotienten aus der Zahl der Rezeptoren im Ruhezustand und der Zahl der Rezeptoren im desensibilisierten Zustand entspricht. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass der in dieser Arbeit festgestellte Wert für  $L$  abweicht von dem früherer Untersuchungen (12 % bei Watty *et al.*, 1997a; 20 % bei Heidmann & Changeux, 1979).

### 3.1.2. Ausschließlich Agonisten können den nAChR vom Ruhe- in den desensibilisierten Zustand überführen

Um die Gültigkeit des Symmetriemodells zu testen, wurde zunächst die These überprüft, ob Liganden durch Bindung an den nAChR dieses Gleichgewicht verschieben können. Hierfür wurden vor und während der Vernetzung mit nAChR-reichen Vesikeln verschiedene Agonisten und Antagonisten zugegeben; anschließend wurde der getestete Ligand durch wiederholte Zentrifugation entfernt. Schließlich wurde durch [<sup>3</sup>H]ACh-Bindungstests geklärt, ob sich der Anteil der Population von hoch-affinen Bindungsstellen durch die Anwesenheit der Liganden während der Vernetzung im Vergleich zum Ruhezustand verändert hat.

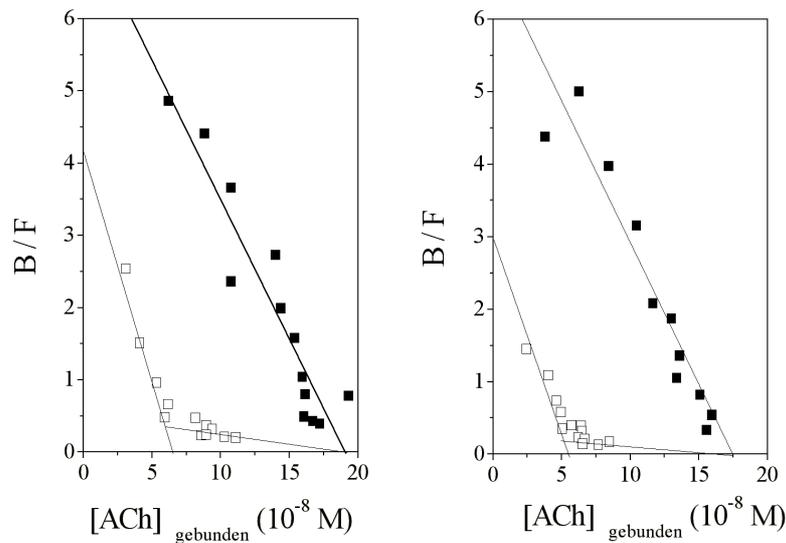
Behandelt man nAChR-reiche Membranen in Gegenwart des Agonisten Carbamoylcholin mit Glutardialdehyd, so erhält man eine homogene Population von hoch-affinen Bindungsstellen ( $K_D = 26,5 \pm 3,5$  nM), die sehr wahrscheinlich von desensibilisierten Rezeptoren herrühren. Ähnliches gilt für die Vernetzung in Gegenwart von (-)-Nicotin (Abb. 3.2.).



**Abb. 3.2: Agonisten induzieren den Übergang des nAChR in die desensibilisierte Konformation.** (Links) Vergleich des Affinitätszustandes nAChR-reicher Membranen nach Vernetzung in An- (■) oder Abwesenheit (□) von 100  $\mu$ M Carbamoylcholin, bzw. (Rechts) nach Vernetzung in Anwesenheit von 100 $\mu$ M Carbamoylcholin (■) oder 20  $\mu$ M (-)-Nicotin (□).

Diese Beobachtungen unterstreichen, dass die Bindung von Agonisten begleitet ist von einem Übergang des nAChR von der ruhenden in die desensibilisierte Konformation, der mit dem gewählten experimentellen Ansatz detektiert werden kann. Gleichzeitig wird deutlich, dass – unabhängig vom verwendeten Agonisten – sich die schließlich fixierten Konformationen bezüglich den Affinitäten für Acetylcholin nicht voneinander unterscheiden.

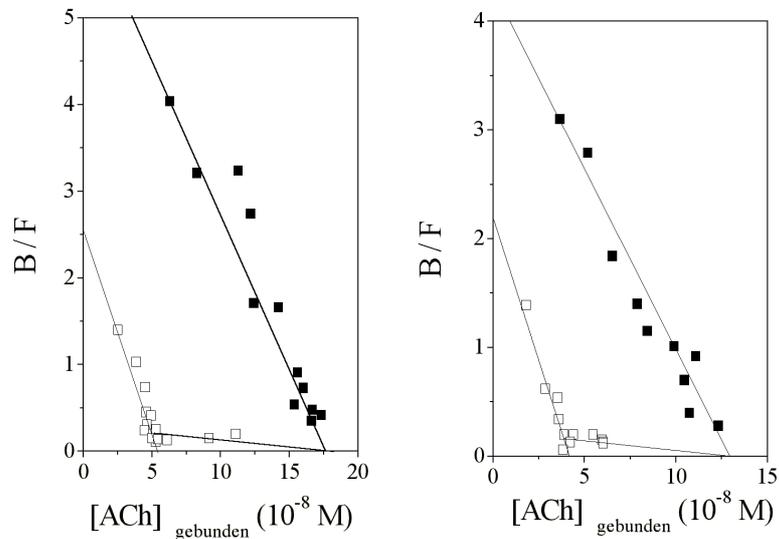
Im Gegensatz zu Agonisten vermögen die kompetitiven Antagonisten Hexamethonium, d-Tubocurare oder Flaxedil nicht, die Desensibilisierung des Rezeptors zu induzieren (Abb. 3.3.): Der nAChR verbleibt in einer Konformation mit niedriger Affinität für Acetylcholin. Wie im Ruhezustand ist eine Subpopulation von hoch-affinen Bindungsstellen vorhanden; die Größe dieser Population kann aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse ermittelt werden. Es zeigte sich, dass sie für alle Liganden weitgehend unverändert blieb. So beträgt sie nach Vernetzung in Gegenwart von Hexamethonium 31%, von d-Tubocurare 33% und von Flaxedil 34%.



**Abb. 3.3: Einfluss kompetitiver Antagonisten auf den Affinitätszustand des nAChR.** Weder durch die Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Flaxedil ( $\square$ , links) noch von 100  $\mu\text{M}$  Hexamethonium ( $\square$ , rechts) wurde die Desensibilisierung des nAChR induziert. In beiden Experimenten wurden Kontrollansätze in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Carbamoylcholin ( $\blacksquare$ ) vernetzt, die die Bestimmung von  $B_{\text{max}}$  ermöglichen.

Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn die nicht-kompetitiven Antagonisten Ethidium und TPMP<sup>+</sup> (30% bzw. 31% hoch-affine Bindungsstellen) auf ihre Fähigkeit hin überprüft

werden, die Konformation des nAChR in Abwesenheit von Agonisten zu beeinflussen (Abb. 3.4.).



**Abb. 3.4: Nicht-kompetitive Antagonisten nehmen keinen Einfluss auf den Anteil hoch-affiner Rezeptoren.** Durch die Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Ethidium ( $\square$ , links) bzw. 100  $\mu\text{M}$  TPMP<sup>+</sup> ( $\square$ , rechts) wurde der Affinitätszustand des nAChR verglichen zum Ruhezustand nicht verändert.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Affinitäten der verschiedenen Populationen von Bindungsstellen nach Vernetzung in Gegenwart der unterschiedlichen Liganden. Es fällt auf, dass die Affinität der niedrig-affinen Bindungsstelle etwa verdoppelt ist, wenn während der Vernetzung die Agonistbindungsstellen besetzt waren.

Ligand	$K_D$ der niedrig-affinen Bindungsstellen (nM)	$K_D$ der hoch-affinen Bindungsstellen (nM)	Anteil der hoch-affinen Bindungsstellen an $B_{\text{max}}$
(keiner)	890	28	27-33 %
<b>Carbamoylcholin</b>	n.b.	26	100 %
<b>(-)-Nicotin</b>	n.b.	21	100 %
<b>Flaxedil</b>	360	16	34 %
<b>Hexamethonium</b>	530	30	31 %
<b>d-Tubocurare</b>	450	35	33 %
<b>Ethidium</b>	1010	21	30 %
<b>TPMP<sup>+</sup></b>	830	21	31 %

**Tab. 3.1: Affinitäten der Populationen hoch- und niedrig-affiner Bindungsstellen nach Vernetzung des nAChR in Gegenwart unterschiedlicher Liganden.** (n.b.: nicht bestimmt)

Zusammengefasst belegen diese Experimente, dass Antagonisten wie erwartet *per se* nicht in der Lage sind, den Rezeptor in eine hoch-affine Konformation für Acetylcholin zu überführen: Der nAChR verbleibt in einer dem Ruhezustand ähnlichen Konformation.

### **3.1.3. Affinitäten verschiedener Liganden für die beiden Zustände**

#### **3.1.3.1. Vergleich der Bindungseigenschaften von Agonisten und kompetitiven Antagonisten in definierten Konformationen**

Eine weitere grundlegende Hypothese des Symmetriemodells für die Rezeptoraktivierung besagt, dass Liganden das hypothetische Gleichgewicht zu dem Zustand hin verschieben, für den sie höhere Affinität besitzen. Dadurch wird impliziert, dass Agonisten den Ionenfluss induzieren, indem sie das Gleichgewicht zum offenen Zustand hin verschieben, während Antagonisten ihre inhibitorische Wirkung entfalten, indem sie den Ruhezustand stabilisieren. Beide Vorhersagen wären mit den bisher geschilderten Ergebnissen konsistent, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die hier untersuchten Antagonisten höhere Affinität zum Ruhezustand haben.

Im folgenden sollten daher die beiden fixierbaren Zustände bezüglich ihrer Affinitäten für unterschiedliche Liganden charakterisiert werden. Da nicht alle getesteten Substanzen radioaktiv markiert zu beziehen sind, musste hierfür auf Konkurrenzexperimente mit einem radioaktiven Liganden bekannter Affinität, in diesem Fall [<sup>3</sup>H]ACh, zurückgegriffen werden. Bei diesen Experimenten wird der vorgelegte radioaktive Ligand durch aufsteigende Konzentrationen von unmarkiertem Ligand verdrängt. Diejenige Ligandkonzentration, bei der 50% des vorgelegten Acetylcholins kompetiert sind, wird als IC<sub>50</sub> bezeichnet. Aus dieser kann durch Einbeziehung der Affinität von Acetylcholin die apparente Dissoziationskonstante berechnet werden. Natürlich muss man dabei berücksichtigen, dass sich die Affinität im Ruhezustand von der im desensibilisierten Zustand unterscheidet.

Erwartungsgemäß binden alle untersuchten Agonisten mit höherer Affinität an den desensibilisierten Zustand (Tab.3.2.), wobei die höchste Affinität für Acetylcholin gefunden wurde. Carbamoylcholin bindet in beiden Zuständen schwächer als Acetylcholin (0,5 µM im desensibilisierten Zustand, 35 µM im Ruhezustand), genauso wie (-)-Nikotin

(1,4  $\mu\text{M}$  bzw. 120  $\mu\text{M}$ ). Der Antagonist Flaxedil bindet sehr viel stärker an den desensibilisierten Zustand als an den Ruhezustand (1,9  $\mu\text{M}$  bzw. 1 mM). Hexamethonium dagegen hat ähnlich niedrige Affinitäten in beiden Zuständen (350 – 550  $\mu\text{M}$ ).

	<b>desensibilisierter Zustand (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Ruhezustand (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>Acetylcholin</b>	0,026 $\pm$ 0,004	0,7 $\pm$ 0,2
<b>Carbamoylcholin</b>	0,522 $\pm$ 0,070	35 $\pm$ 10
<b>(-)-Nicotin</b>	1,36 $\pm$ 0,18	120 $\pm$ 25
<b>Flaxedil</b>	1.86 $\pm$ 0,25	1040 $\pm$ 220
<b>Hexamethonium</b>	336 $\pm$ 45	550 $\pm$ 120
<b>Ethidium*</b>	0,25 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,2
<b>NTII**</b>	0,016 $\pm$ 0,005	0,016 $\pm$ 0,002

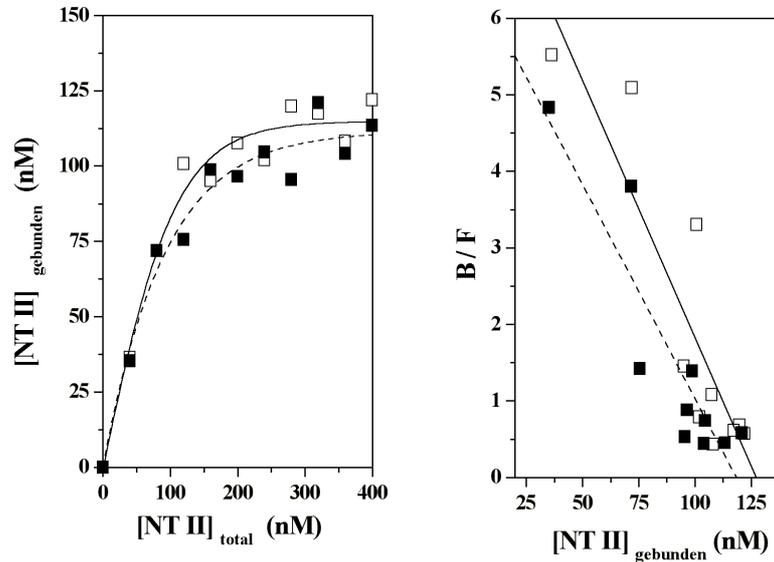
**Tabelle 3.2: Übersicht über die Affinitäten verschiedener Liganden des nAChR nach Vernetzung im Ruhe- bzw. im desensibilisierten Zustand.** Apparente Dissoziationskonstanten ( $K_{\text{app}}$ ) wurden aus Konkurrenzexperimenten mit 2  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]ACh ermittelt. Die  $K_{\text{app}}$ -Werte sind in  $\mu\text{M}$  angegeben. Es ist zu beachten, dass der Berechnung unterschiedliche Affinitäten von ACh für die beiden Zustände zugrunde liegen. \* aus Fluoreszenztitrationen (siehe 3.1.3.3.). \*\* aus Bindungstests mit [ $^{125}\text{I}$ ]-NTII (siehe Abschnitt 3.1.3.2.).

Das bedeutet, dass bis auf das  $\alpha$ -Neurotoxin alle getesteten kompetitive Antagonisten genau wie die untersuchten Agonisten höhere Affinität im desensibilisierten Zustand haben, im Gegensatz zu Agonisten aber im Verlauf der Bindung keine Konversion des Rezeptors zu diesem Zustand herbeiführen können. Damit ergibt sich ein eklatanter Widerspruch zu einer zentralen Hypothese des Symmetrie-Modells.

### 3.1.3.2. Können auch Peptidantagonisten zwischen Zuständen des nAChR unterscheiden?

Um zu überprüfen, ob auch höher affine Peptidantagonisten in beiden Konformationen unterschiedlich fest am nAChR binden, wurde Neurotoxin II aus *Naja naja oxiana* mit [ $^{125}\text{I}$ ] iodiert und in Bindungstests eingesetzt. Wie aus Abb. 3.5. hervorgeht, liegt die ermittelte Dissoziationskonstante sowohl im Ruhe- als auch im desensibilisierten Zustand bei  $16 \pm 3$  nM. Die Affinität ist etwas niedriger als im nativen, unvernetzten Rezeptor

( $K_D = 5 \text{ nM}$ ), was wahrscheinlich darin begründet liegt, dass durch die Modifizierung von Lysinresten an den Kontaktflächen der Untereinheiten die Bindungstasche modifiziert wird. Möglicherweise wird durch die Vernetzung auch der Zugang der relativ großen Toxinmoleküle erschwert (siehe Abschnitt 4.6.).



**Abb. 3.5:** [ $^{125}\text{I}$ ]-markiertes NTII zeigt in der Bindung an den nAChR keine Präferenz für den desensibilisierten oder den Ruhezustand. (Links) Bindungskurven (Rechts) Scatchard-Plots. Die finale Rezeptorkonzentration betrug 70 nM.

Peptidantagonisten wie Neurotoxin II aus *Naja naja oxiana* weisen also keine Präferenz für eine der beiden Konformationen auf. Sie sind damit besser für Wettbewerbsstudien geeignet als der native Agonist Acetylcholin, da sich die für die verschiedenen Liganden ermittelten  $\text{IC}_{50}$  im desensibilisierten Zustand direkt mit denen im Ruhezustand vergleichen lassen.

Da NTII jedoch sehr viel fester an den nAChR bindet als die meisten anderen Liganden, konnte im Bindungstest kein Überschuss an NTII eingesetzt werden. Dieser wäre nötig, um die Sättigung der vorgelegten Bindungsstellen zu gewährleisten und um aus den Wettbewerbsexperimenten neben  $\text{IC}_{50}$ -Werten auch apparente Dissoziationskonstanten berechnen zu können. Die verwendeten Konzentrationen von je 100 nM für das Toxin und den Rezeptor stellen einen Kompromiss zweier praktischer Erwägungen dar: Zum einen darf die Toxinkonzentration nicht zu hoch sein, damit die Verdrängung auch durch schwach affine Liganden sichtbar wird. Andererseits muss die Rezeptorkonzentration hoch genug sein, um statistisch signifikante Werte im Bindungstest zu erhalten (bei niedrigen

Rezeptorkonzentrationen variiert die Zahl der pro Ansatz vorgelegten Bindungsstellen zu stark).

Die Ergebnisse dieses Versuches (Tabelle 3.3.) stehen jedoch in guter Korrelation mit denen der [<sup>3</sup>H]ACh-Verdrängung. Alle getesteten Substanzen zeigen in ihrem Bindungsverhalten eine Präferenz für den desensibilisierten Zustand. Die höchste Affinität war für Carbamoylcholin zu verzeichnen; hier betrug die IC<sub>50</sub> 8,6 ± 3,4 µM im desensibilisierten Zustand bzw. 225 ± 25 µM im Ruhezustand. Der Agonist (-)-Nicotin bindet in beiden Zuständen schwächer als Carbamoylcholin (25,3 ± 17,7 µM bzw. 5,8 ± 3,9 mM). Bei den Antagonisten Hexamethonium und Flaxedil sind die Unterschiede in der Affinität für die beiden Zustände etwa gleich stark ausgeprägt.

	<b>desensibilisierter Zustand</b>	<b>Ruhezustand</b>
<b>Carbamoylcholin</b>	8,6 ± 3,4 µM	225 ± 25 µM
<b>(-)-Nicotin</b>	26,3 ± 17,7 µM	5,8 ± 3,9 mM
<b>Hexamethonium</b>	17 ± 6 mM	75 ± 2 mM
<b>Flaxedil</b>	6 ± 4 mM	41 ± 12 mM

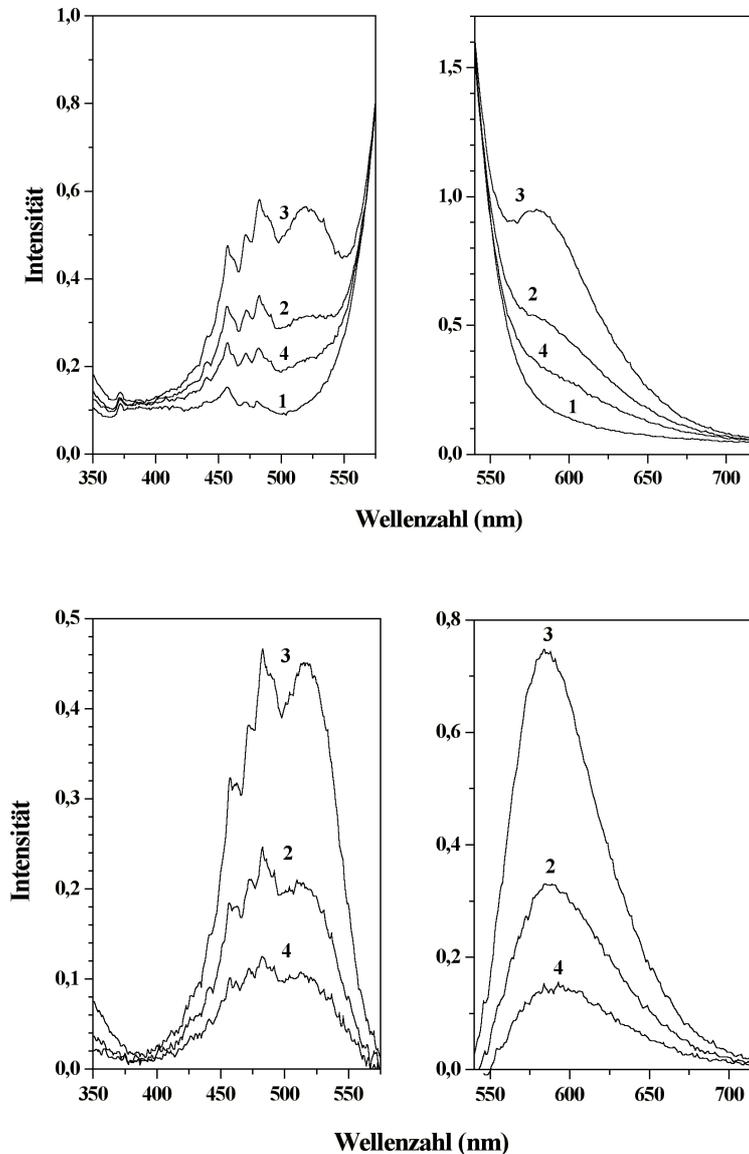
**Tab. 3.3:** IC<sub>50</sub>-Werte aus [<sup>125</sup>I]NTII-Verdrängungsexperimenten. Die Konzentrationen von NTII und nAChR betragen jeweils 100 nM.

### 3.1.3.3. Der hoch-affine NCI Ethidium bindet bevorzugt an die desensibilisierte Konformation

Ethidium ist ein hochpotenter nicht-kompetitiver Inhibitor (NCI) des nAChR (Sterz *et al.*, 1982), der als solcher den Agonist-induzierten Ionenstrom durch die Kanalpore verhindert, ohne mit der Agonistbindung selbst zu konkurrieren. Um die Affinität von Ethidium in den verschiedenen Zuständen zu bestimmen, wurde auf Fluoreszenztitrations zurückgegriffen. Im folgenden sollen daher zunächst kurz die Fluoreszenzeigenschaften dieses Liganden charakterisiert werden.

In Lösung weist Ethidium nur eine sehr schwache Fluoreszenz auf (Abb. 3.6.). Die Bindung an den Rezeptor ist jedoch von einer starken Zunahme der Fluoreszenz begleitet. Wie viele andere NCIs bindet Ethidium bevorzugt an den desensibilisierten nAChR. Das Emissionsmaximum der Fluoreszenz liegt bei 580 nm, die Anregung erfolgt

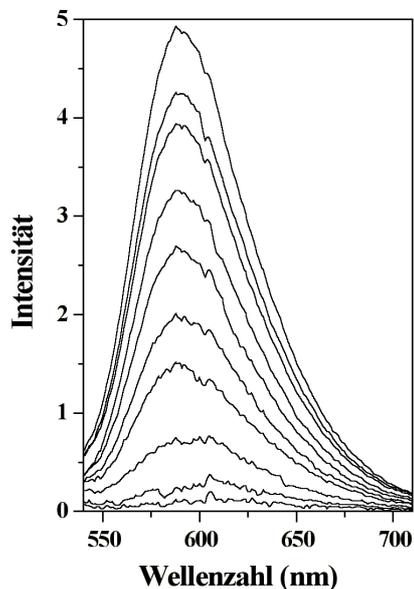
optimalerweise bei 490 nm. Charakteristisch für die Bindung ist zudem eine leichte Verschiebung des Emissionsmaximums nach kleineren Wellenzahlen im Vergleich zum Spektrum der wässrigen Lösung, die als Hinweis auf die starke Hydrophobizität der Bindungstasche für Ethidium gedeutet worden war (Herz *et al.*, 1987).



**Abb. 3.6. Fluoreszenzeigenschaften des NCI's Ethidium.** (*Rechts*) Anregungsspektren (die Emission wurde bei 620 nm verfolgt) und (*links*) Emissionsspektren (die Anregung erfolgte bei 490 nm) von 1 μM nAChR in Puffer (1) und nach Zugabe von 1,6 μM Ethidium (2). Die Gegenwart von 100 μM Carbamoylcholin verstärkt die Ethidiumfluoreszenz (3). Durch TPMP<sup>+</sup> kann Ethidium vom Rezeptor verdrängt werden (4). (*Unten*) Spektren nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz, hervorgerufen durch nAChR-reiche Vesikel in Puffer.

Dass Ethidium Eigenschaften eines nicht-kompetitiven Inhibitors hat, wird auch durch die Tatsache verdeutlicht, dass es sich durch andere, gut charakterisierte NCI's des nAChR verdrängen lässt. Durch zunehmende Konzentrationen des jeweiligen NCI's kann – wie hier

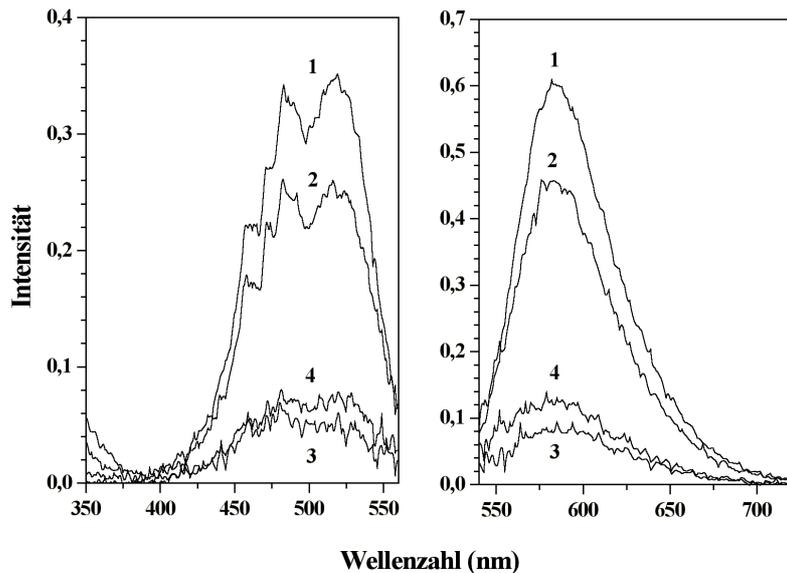
am Beispiel von TPMP<sup>+</sup> gezeigt – die Bindung von Ethidium kompetiert werden (Abb. 3.7.).



**Abb. 3.7: Verdrängung von Ethidium aus seiner hoch-affinen Bindungsstelle am nAChR durch TPMP<sup>+</sup>.** nAChR reiche Membranen (Rezeptorkonzentration: 1  $\mu$ M) wurden in Gegenwart von 100  $\mu$ M Carbamoylcholin mit 1,6  $\mu$ M Ethidium equilibriert. Dann wurden aufsteigende Konzentrationen von TPMP<sup>+</sup> zugegeben (0,1 bis 160  $\mu$ M). Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 490 nm. Die Spektren sind um den Beitrag unspezifischer Fluoreszenz (ermittelt in Anwesenheit von 300  $\mu$ M TPMP<sup>+</sup>) korrigiert.

Durch Fluoreszenztitrationen lässt sich damit spezifisch die Affinität von Ethidium für die Bindungsstelle am nativen Rezeptor ermitteln. Die Bindung kann durch die Messung der Fluoreszenzemission bei 595 nm verfolgt werden. Wie in Abb. 3.9. gezeigt, bindet pro Rezeptormonomer ein Ethidiummolekül; die Dissoziationskonstante für die Bindung an native nAChR-reiche Membranen liegt zwischen 50 und 150 nM. Dieses Resultat deckt sich recht gut mit Ergebnissen von Lurtz *et al.* (1997), die mit ähnlichen Fluoreszenz- sowie durch Radioligand-Titrationen  $K_{DS}$  von 50 nM bzw. 75 nM ermittelt haben.

Um die Affinität von Ethidium für die beiden vernetzten Zustände des nAChR bestimmen zu können, musste zunächst überprüft werden, ob sich im Zuge der Vernetzung die Fluoreszenzeigenschaften verändern. Es zeigte sich, dass sowohl die Anregungs- als auch die Emissionsmaxima in den verschiedenen Zuständen kaum voneinander zu unterscheiden sind. Allerdings treten Abweichungen bei den Fluoreszenzintensitäten auf: Wenn Ethidium mit rezeptorreichen Membranen im fixierten Ruhezustand inkubiert wurde, ist die Fluoreszenz relativ schwach. Im Gegensatz zu nativen Membranen ist die Intensität durch Zugabe von Agonisten nur sehr wenig zu steigern. Dies ist eine wichtige Kontrolle, die unterstreicht, dass nach Vernetzung die allosterische Kopplung der Bindungsstelle für NCI mit denen für Agonisten unterbrochen ist.

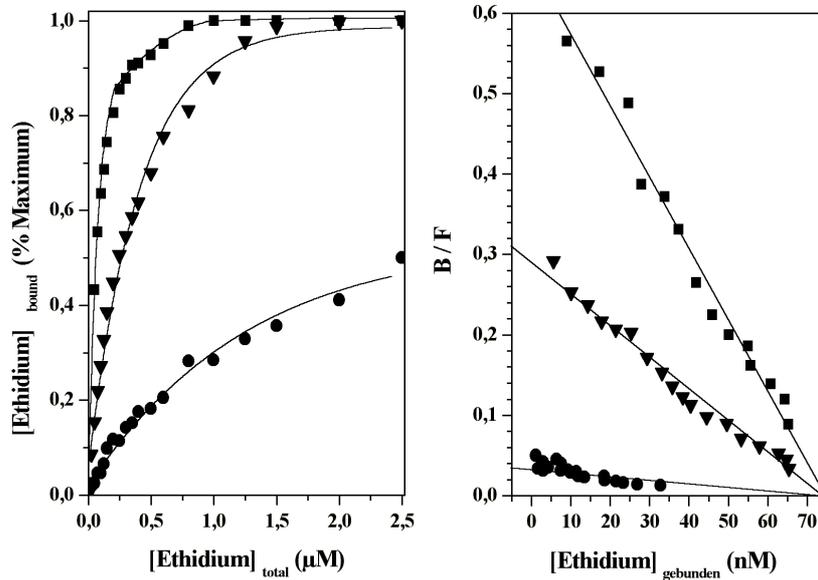


**Abb. 3.8: Fluoreszenzeigenschaften von Ethidium vor und nach Vernetzung.** (Links) Anregungsspektren und (rechts) Emissionsspektren von 1,6  $\mu\text{M}$  Ethidium an nativen nAChR-reichen Membranen (1), sowie nach Vernetzung im desensibilisierten (2) und im Ruhezustand (3). Im Ruhezustand wurde die Fluoreszenz durch die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Carbamoylcholin nicht signifikant gesteigert (4). Alle Spektren sind um den Beitrag unspezifischer Fluoreszenz bereinigt.

Im fixierten desensibilisierten nAChR ist die beobachtete Fluoreszenzintensität viel stärker als im Ruhezustand. Wieder bleibt die Zugabe von Agonist ohne Einfluss auf die Fluoreszenz. Im Vergleich zu nativen rezeptorreichen Membranen ist bei gleicher Ethidiumkonzentration ein Verlust von ca. 30 % der maximalen Fluoreszenzintensität festzustellen; offenbar nimmt also die Modifikation von Lysinresten direkt Einfluss auf die Bindung von Ethidium. Das Ausmaß des Verlustes ist abhängig von der Konzentration des Glutardialdehyds, die zuvor für die Vernetzung eingesetzt worden ist (nach Vernetzung mit 40 mM Glutardialdehyd ist überhaupt keine Bindung von Ethidium mehr detektierbar).

Die Affinitäten von Ethidium für native, ruhende und desensibilisierte Rezeptoren wurden wieder durch Fluoreszenztitrations bestimmt (Abb. 3.9.). Es stellte sich heraus, dass auch im vernetzten Zustand Ethidium noch durch andere nicht-kompetitive Inhibitoren verdrängt werden kann (siehe Abschnitt 3.2.1.). Daher wurden die Bindungsdaten um den Beitrag von unspezifisch gebundenem Ethidium korrigiert; diese unspezifische Komponente kann ermittelt werden, indem man die Fluoreszenz in Gegenwart von sättigenden Konzentrationen von Tetracain/TPMP<sup>+</sup> misst. (Tetracain wurde zugesetzt, um die Dissoziation von Ethidium vom Rezeptor im Ruhezustand zu gewährleisten.) Scatchard-Plots (Abb. 3.9.) zeigen, dass Ethidium in beiden Präparationen jeweils homogene Populationen von Bindungsstellen besetzt. Die Affinität für vernetzte desensibilisierte

Rezeptoren ( $K_D = 0,25 \pm 0,05 \mu\text{M}$ ) liegt etwas unter der für native Membranen in Gegenwart von Carbamoylcholin ( $K_D = 0,075 \mu\text{M}$ ) ist aber bei weitem höher als im Ruhezustand ( $K_D = 2 \mu\text{M}$ ).



**Abb. 3.9: Bindung von Ethidium an definierte Konformationen des nAChR.** Gezeigt sind Bindungskurven (*links*) und Scatchard-Plots (*rechts*) für die Assoziation mit dem nAChR nach Fixierung im desensibilisierten ( $\blacktriangledown$ ) und im Ruhezustand ( $\bullet$ ). Zum Vergleich ist die Bindung an native Membranen gezeigt ( $\blacksquare$ ). Die Rezeptorkonzentration betrug 110 nM, wenn kovalent vernetzter Rezeptor verwendet wurde, und 85 nM bei der Untersuchung von nativen Membranen. Unterschiedliche Proteinmengen wurden verwandt, um dem Verlust an funktionellen Rezeptoren (ca. 30 %) im Verlauf der Vernetzung Rechnung zu tragen.

Aufgrund der hier dargestellten Experimente kann also festgehalten werden, dass Ethidium mit etwa zehnfach höherer Affinität an den nAChR im desensibilisierten Zustand bindet. Da der Rezeptor durch Gegenwart von Ethidium nicht in eine hoch-affine Konformation überführt wird (vgl. Abb. 3.4.), ist dies ein weiteres gewichtiges Argument gegen die Existenz eines präformierten Gleichgewichtes in Abwesenheit von Acetylcholin.

## **3.2. Die Bindungsstellen für nicht-kompetitive Inhibitoren des nAChR**

### **3.2.1. Lokalisierung der Bindungsstelle für Ethidium im Kanallumen**

Es ist immer noch unklar, wo genau Ethidium auf dem nAChR bindet: Auf der Grundlage früherer Untersuchungen war vorgeschlagen worden, dass Ethidium – im Gegensatz zu anderen klassischen NCIs – im extrazellulären Bereich des nAChR, d.h. im Vestibül, etwas oberhalb der Agonistbindungsstellen binden würde (Johnson & Nuss, 1994). Andererseits wird auch eine Überlappung des Ethidiumlocus mit der Quinacrin-Bindungsstelle diskutiert (Arias *et al.*, 1993; Johnson & Ayres, 1996; Lurtz *et al.*, 1997), wobei letztere an der Lipid-Protein-Grenzschicht außerhalb des Lipidannulus gelegen sein soll (Arias, 1997b). Beide Lokalisierungen setzen voraus, dass der inhibitorische Effekt auf einem allosterischen Mechanismus beruht, denn die Bindung des NCIs würde den Ionenfluss durch den etwa 20 bzw. 50 Å entfernten Ionenkanal blockieren.

Um die Bindungsstelle für Ethidium zu identifizieren, sind mehrere experimentelle Ansätze denkbar. Einerseits könnte man versuchen, Seitenketten, die zur Bindung beitragen, durch Photoaffinitätsmarkierungen zu identifizieren. Dieses Verfahren ist erfolgreich in den Fällen von TPMP<sup>+</sup> (Oberthür *et al.*, 1986), Chlorpromazin (Giraudat *et al.*, 1986; Giraudat *et al.*, 1987) und Tetracain (Gallagher & Cohen, 1999) angewandt worden, die homologe Reste der M2-Helices aller Untereinheiten im Lumen des nAChR markieren. Im Fall von Ethidium schlugen ähnliche Experimente jedoch bisher fehl (Pedersen, 1995). Alternativ könnte man versuchen, durch eine Kombination von ortsspezifischer Mutagenese mit elektrophysiologischen Techniken an der Bindung beteiligte Reste aufzuspüren. Dieses Verfahren führte zur Identifizierung der Bindungsstelle von QX-222 (Leonard *et al.*, 1988; Charnet *et al.* 1990), ist aber nicht brauchbar, so lange noch völlige Unklarheit über die Lage der Bindungsstelle herrscht. Außerdem können allosterische Effekte einer Mutation grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden.

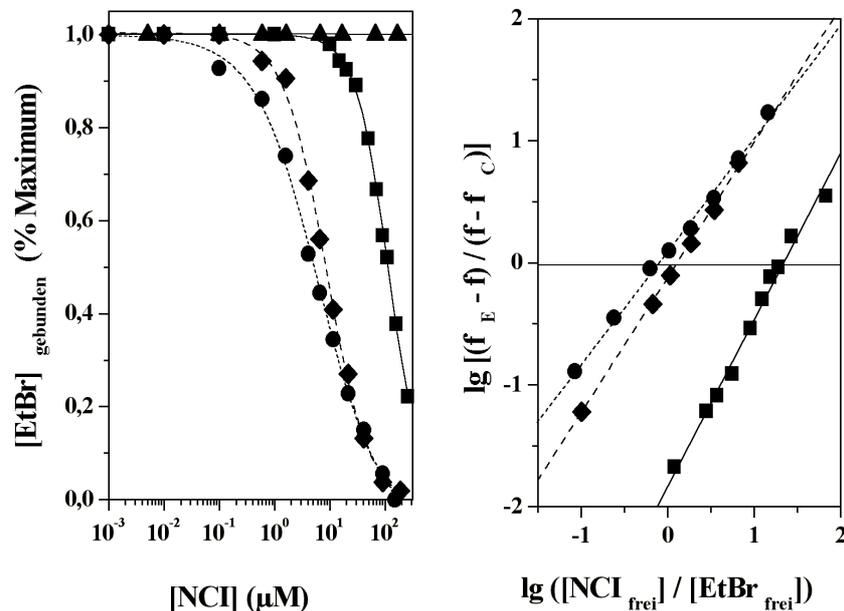
### 3.2.1.1. Luminale NCIs können Ethidium auch dann verdrängen, wenn allosterische Interaktionen im nAChR durch kovalente Vernetzung ausgeschlossen wurden.

Ein weiterer Weg zu testen, ob Ethidium im Lumen des Ionenkanals gebunden wird, eröffnet sich durch die Möglichkeit, allosterische Wechselwirkungen im nAChR durch die oben beschriebene kovalente Vernetzung zu unterbinden. Sollte auch im vernetzten Rezeptor Ethidium noch durch luminale NCIs verdrängt werden können, so wäre dies ein starkes Indiz für eine überlappende Lokalisation seiner Bindungsstelle.

Im folgenden wurden daher Fluoreszenztitrations durchgeföhrt, in denen gebundenes Ethidium durch steigende Konzentrationen von TPMP<sup>+</sup>, Chlorpromazin und Tetracain verdrängt wurde. Der Rezeptor wurde im desensibilisierten Zustand fixiert und mit einer relativ hohen Konzentration von Ethidium (6,6  $\mu\text{M}$ ) equilibriert. Auf diese Weise kann der Anteil des ungebundenen Ethidium relativ zu Gesamtkonzentration möglichst gering und entsprechend der Beitrag der unspezifischen Fluoreszenzemission annähernd konstant gehalten werden. Wie in Abb. 3.10 (*links*) gezeigt ist, föhrt die Zugabe steigender Konzentrationen aller drei luminalen NCIs zu einem kontinuierlichen Verlust der Fluoreszenzintensität von rezeptorgebundenem Ethidium. Dieser Verlust ist nicht auf Quenchmechanismen zurückzuföhren, da die Fluoreszenz von Ethidium auch in wässriger Lösung nicht durch hohe Konzentrationen von TPMP<sup>+</sup> gelöscht werden kann (nicht gezeigt). Man kann aus diesem Ergebnis also schließen, dass luminale NCIs direkt die Dissoziation von Ethidium bewirken, indem sie um eine überlappende Bindungsstelle konkurrieren.

Überträgt man die Bindungsdaten aus den Titrationskurven durch eine Umformung (nach Taylor & Lappi, 1975) in eine doppelt-logarithmische Auftragung (Abb. 3.10., *rechts*), so erhält man lineare Graphen, deren Steigungen dem Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ) entsprechen. Da in allen Fällen die Hill-Koeffizienten Werte von nahezu eins besitzen (Tab. 3.4.), ist bewiesen, dass die getesteten Substanzen im vernetzten Rezeptor um eine homogene Population von Bindungsstellen auf nicht-allosterische Weise konkurrieren. Aus den Schnittpunkten der Graphen mit der Abszisse und der bekannten Affinität von Ethidium können außerdem die apparenten Dissoziationskonstanten der nicht-fluoreszierenden Liganden ermittelt werden. Die so bestimmten Affinitäten für Tetracain, TPMP<sup>+</sup> und für Chlorpromazin stehen relativ gut mit den in der Literatur genannten Werten in Einklang (Tab. 3.4.). Tetracain hat – im Gegensatz zu den anderen NCIs – eine höhere Affinität für

den Ruhezustand als für den desensibilisierten (Blanchard *et al.*, 1979; Middleton *et al.*, 1999).



**Abb. 3.10: Konkurrenz von Ethidium vom vernetzten, desensibilisierten nAChR, durch luminalen NCIs.** Alle Ansätze enthielten 1 µM nAChR und 6,6 µM Ethidium, sowie 100 µM Carbamoylcholin, um die Agonistbindungsstellen zu blockieren. Die Verdrängung erfolgte durch Tetracain (■), Chlorpromazin (◆) bzw. TPMP<sup>+</sup> (●). (Links) Steigende Konzentrationen der luminalen NCIs verursachten einen kontinuierlichen Verlust der Ethidiumfluoreszenz. Der niedrig-affine NCI Hydrocortison (▲) beeinflusst die Ethidiumfluoreszenz hingegen nicht. (Rechts) Konversion der Daten in eine doppelt-logarithmische Auftragung; der Hill-Koeffizient kann aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse ermittelt werden.

Hydrocortison, ein niedrig-affiner nicht-kompetitiver Inhibitor, dessen Bindungsstelle sehr wahrscheinlich an der Grenzschicht zur Membran im Lipidanulus um den nAChR liegt (Bouzat & Barrantes, 1996), zeigt im verwendeten Test keine Konkurrenz.

	$K_{app}$	$n_H$
<b>Ethidium</b>	0,25 ± 0,06	1,02 ± 0,07
<b>TPMP<sup>+</sup></b>	0,32 ± 0,11	0,92 ± 0,04
<b>Chlorpromazin</b>	0,53 ± 0,13	1,21 ± 0,15
<b>Tetracain</b>	6,38 ± 0,42	1,23 ± 0,08
<b>Quinacrin</b>	0,21 ± 0,33	0,97 ± 0,21

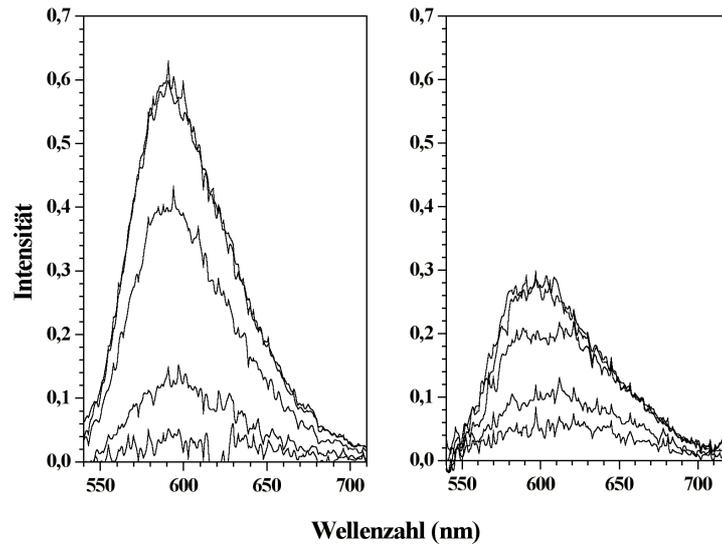
**Tab. 3.4: Übersicht über die ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten klassischer luminaler NCIs.**  $K_{app}$  in µM;  $n_H$ : Hill-Koeffizient.

Zusammengefasst beweisen diese Ergebnisse zum einen, dass die Bindungsstelle für Ethidium mit denen anderer, luminaler NCI's überlappt. Zum anderen wird deutlich, dass sich die Affinitäten auch nicht fluoreszierender Liganden zuverlässig bestimmen lassen.

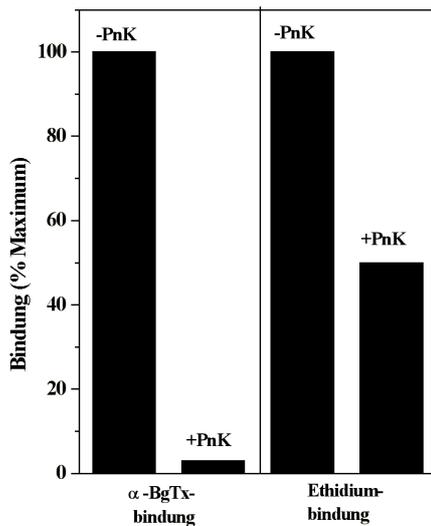
### 3.2.1.2. Ethidium interagiert mit den Transmembranbereichen des nAChR

Die Bindungsstellen für die luminalen nicht-kompetitiven Inhibitoren TPMP<sup>+</sup>, Chlorpromazin und Tetracain liegen ein bis zwei Helixwindungen über dem engsten Punkt des Ionenkanals und sehr wahrscheinlich innerhalb der Transmembrandomäne des nAChR (Hucho *et al.*, 1986). Proteinase K (PnK) ist eine relativ unspezifische, sehr schnell arbeitende Serinprotease aus dem Pilz *Tritirachium*. Durch die Behandlung mit PnK werden sämtliche Bereiche des Rezeptors abgebaut, die außerhalb der Membran liegen; die Transmembranbereiche nehmen sowohl  $\alpha$ -helikale als auch  $\beta$ -Faltblattstrukturen ein, jedoch ist unklar, ob diese Sekundärstrukturen denen im nativen Protein entsprechen (Görne-Tschelnokow *et al.*, 1994). Ferner ist gezeigt worden, dass die Wechselwirkungen des nAChR mit den umgebenden Phospholipiden zwar geschwächt, nicht aber unterbunden werden (Dreger *et al.*, 1997). Da sogar die Selektivität für bestimmte Phospholipidspezies aufrecht erhalten wird, kann spekuliert werden, dass im Verlauf des Verdauens zwar die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten an Stärke verlieren, die verbleibenden Transmembranbereiche aber nicht in der Membran auseinander driften, sondern als oligomere Einheit bestehen bleiben.

Der Verlauf der Proteolyse durch PnK lässt sich anhand der Zahl der verbliebenen (extrazellulär gelegenen) Bindungsstellen für  $\alpha$ -Bungarotoxin verfolgen. Nach Abschluss der PnK-Behandlung liegt der Anteil der Bindungsstellen für [<sup>125</sup>I] $\alpha$ -BgTx unter 3 % vom Ausgangswert. Dagegen ist nach PnK-Verdau nAChR-reicher Vesikel noch immer eine signifikante Ethidiumemission zu verzeichnen, die durch TPMP<sup>+</sup> kompetiert werden kann (Abb 3.11.). Ihre Intensität beträgt etwa 50 % der Kontrolle (unverdaute Membranen). Da zudem das Emissionsmaximum wie bei nativen Rezeptoren unter 595 nm liegt, ist davon auszugehen, dass die beobachtete Fluoreszenz von spezifisch an den nAChR gebundenen Ethidiummolekülen herrührt.



**Abb. 3.11: Ethidium bindet an die Transmembranbereiche des nAChR.** Trotz Entfernung der außerhalb der Membran gelegenen Domänen des nAChR durch PnK ist eine signifikante TPMP<sup>+</sup>-spezifische Fluoreszenzemission von Ethidium (3  $\mu$ M) zu verzeichnen. Gezeigt sind die Emissionsspektren von unverdauten Kontrollmembranen (*links*) und PnK-verdauten Membranen (*rechts*). Für die Dissoziation von gebundenem Ethidium wurden 1, 10, 50, 150 und 250  $\mu$ M TPMP<sup>+</sup> zugesetzt.



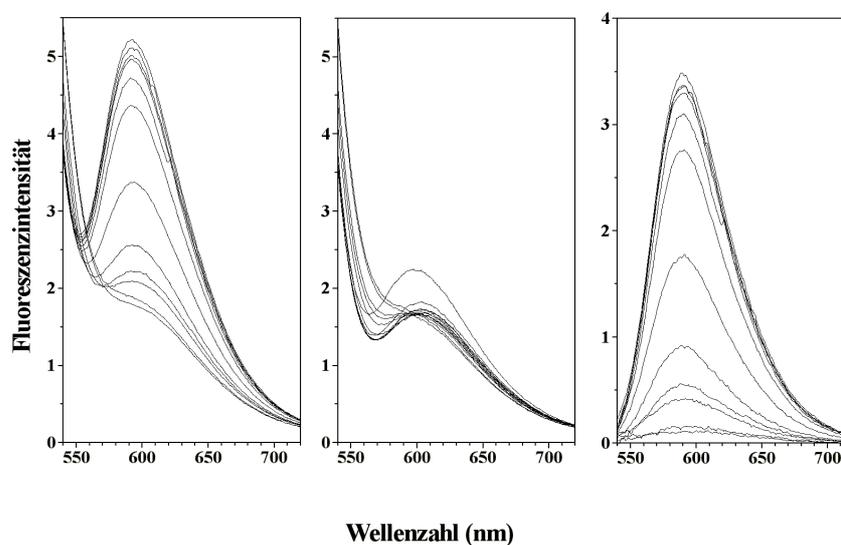
**Abb. 3.12: Verlust an Bindungsstellen für  $\alpha$ -BgTx bzw. Ethidium durch Verdau nAChR-reicher Membranen mit PnK.** Kontrolle und Probe wurden - abgesehen vom Zusatz von Protease – genau gleich behandelt. Die Intaktheit der nativen Membranen bzw. die Vollständigkeit des Verdau wurden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sichergestellt (nicht gezeigt).

### 3.2.2. Überlappung der Bindungsstellen für Quinacrin und Ethidium

Auch das Malariamedikament Quinacrin ist als ein NCI des nAChR beschrieben worden, der nicht innerhalb des Kanallumens bindet und somit auf allosterische Weise den Ionenkanal blockiert. Die Bindung soll an der Protein-Lipid-Grenzschicht erfolgen (Valenzuela *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1993a,b). Da die Fluoreszenz von Quinacrin in nAChR-reichen Membranen viel stärker durch Spin-markierte freie Fettsäuren und

Cholesterin gelöscht werden kann als durch Spin-markiertes Phosphatidylcholin, wurde diskutiert, dass Quinacrin – ähnlich Cholesterin – nicht direkt im Lipidannulus gelegene, sondern sog. "nicht-annuläre" oder "peri-annuläre" Bindungsstellen besetzt (Arias, 1997a). Andererseits wurde Quinacrinazid mit einem Teil von M1 vernetzt, der Kontakt zum Ionenkanal haben könnte (Karlin & Akabas, 1995).

Im folgenden wurde mit dem oben dargestellten Ansatz überprüft, ob Quinacrin und Ethidium überlappende Bindungsstellen besetzen. Schwierigkeiten bereitete dabei besonders bei hohen Konzentrationen die Eigenfluoreszenz von Quinacrin, dessen Emission signifikant mit der von Ethidium überlappt.



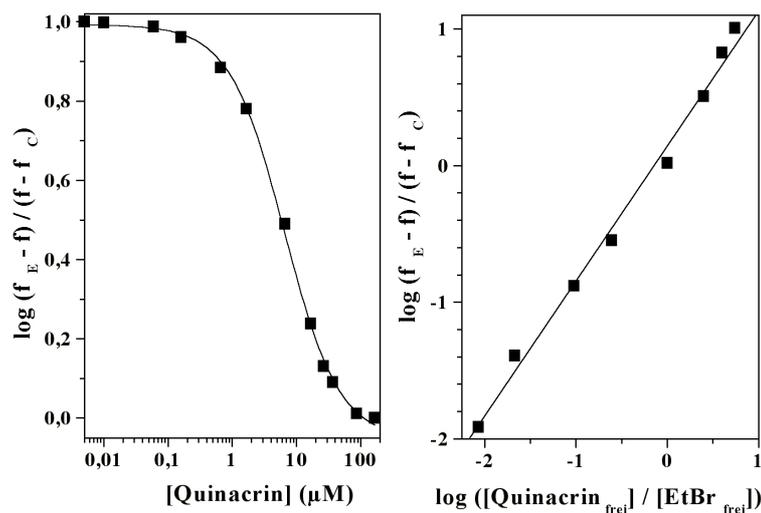
**Abb. 3.13: Konkurrenz von Ethidium durch Quinacrin.** Vernetzte desensibilisierte Rezeptoren wurden mit  $6,6 \mu\text{M}$  Ethidium equilibriert und danach mit aufsteigenden Konzentrationen an Quinacrin ( $0,05$  bis  $150 \mu\text{M}$ ) versetzt (*links*). Deutlich zu erkennen ist ein signifikanter Beitrag der Eigenfluoreszenz von Quinacrin (Anregung:  $490 \text{ nm}$ ), der besonders bei hohen Konzentrationen die Spektren verfälscht. In einem Parallelansatz wurde daher das gleiche Verdrängungsexperiment in Gegenwart von  $200 \mu\text{M}$  TPMP<sup>+</sup> durchgeführt (*Mitte*), so dass die komplexe, unspezifische Komponente quantifiziert werden konnte. Nach Subtraktion einander entsprechender Spektren (*rechts*) kann der Anteil von spezifisch gebundenem Ethidium ermittelt werden.

Suspensionen von nAChR-reichen Membranen wurden in Gegenwart von sättigenden Konzentrationen von Ethidium ( $6,6 \mu\text{M}$ ) mit aufsteigenden Mengen von Quinacrin behandelt. In einer Parallelküvette wurde der gleiche Ansatz zusätzlich mit  $200 \mu\text{M}$  TPMP<sup>+</sup> versetzt, so dass die Hintergrundfluoreszenz von gleichzeitig vorliegendem Ethidium und Quinacrin bestimmt werden konnte. Durch Quenchesperimente wurde sichergestellt, dass der Beitrag der Quinacrinfluoreszenz nicht durch die Anwesenheit von TPMP<sup>+</sup> und/oder Ethidium beeinflusst wird (nicht gezeigt). Die Konkurrenz von nAChR-gebundenem Ethidium erfolgte dennoch mit Quinacrin-Konzentrationen unter  $150 \mu\text{M}$ , um

die Hintergrundfluoreszenz möglichst niedrig zu halten und die unspezifische Assoziation mit der Membran zu verhindern.

Abb. 3.13. zeigt, dass sowohl die Emission von gebundenem als auch die von freiem Ethidium durch die Quinacrinfluoreszenz überlagert werden. Die spezifische Fluoreszenz, die von Ethidium an der luminalen hoch-affinen Bindungsstelle herrührt, kann leicht ermittelt werden, indem die Spektren, die bei gleicher Quinacrinkonzentration in An- bzw. Abwesenheit von TPMP<sup>+</sup> aufgenommen worden sind, voneinander subtrahiert werden.

Die Auswertung des Konkurrenzexperimentes liefert eine IC<sub>50</sub> von etwa 6 µM für Quinacrin (Abb. 3.14.). Die Übertragung der Daten in einen Hill-Plot resultiert in einer Geraden, so dass auch in diesem Fall davon ausgegangen werden kann, dass die Konkurrenz um homogene Bindungsstellen erfolgt, ohne dass allosterische Mechanismen eine Rolle spielen. Die ermittelte apparente Dissoziationskonstante liegt mit 71 nM etwas niedriger als die von Ethidium.



**Abb. 3.14: Ermittlung der IC<sub>50</sub>- und K<sub>app</sub>-Werte für Quinacrin aus Fluoreszenztitrationen gegen 6,6 µM Ethidium am vernetzten, desensibilisierten Rezeptor.**

Auch Quinacrin bindet demzufolge mit hoher Affinität im Kanallumen. Es sei hier allerdings angemerkt, dass auf der Grundlage des durchgeführten Verdrängungsexperimentes nicht ausgeschlossen werden kann, dass Quinacrin zusätzlich Bindungsstellen im Bereich der Protein-Lipid-Grenzschicht besetzt, die in Quenchexperimenten detektiert werden können.

Durch die eindeutige Lokalisation der Bindungsstelle für Ethidium ist es nun möglich, auch andere NCIs, die bisher nur elektrophysiologisch charakterisiert worden sind, auf ihre Affinität für das Lumen des nAChR hin zu überprüfen. Die bisher beschriebenen

Experimente haben gezeigt, dass durch Konkurrenzexperimente mit Ethidium Dissoziationskonstanten nicht-fluoreszierender Liganden zuverlässig bestimmt werden können. Der große Vorteil dieser Methode besteht sicherlich darin, dass – anders als bei alternativen Bindungstest – auf die Trennung von gebundenem und freiem Ligand verzichtet werden kann, da ungebundenes Ethidium in wässriger Lösung nur sehr schwach fluoresziert.

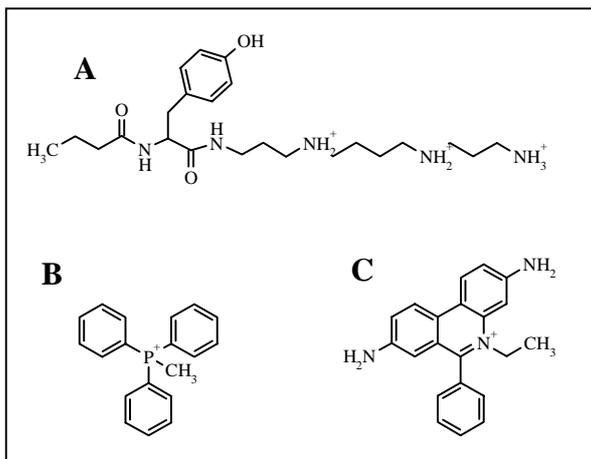
### 3.2.3. Bindungseigenschaften von Polyaminderivaten

Die biologisch aktiven Bestandteile der Venome verschiedener Wespen, so zum Beispiel dem der Grabwespe *Philanthus triangulum*, sind die sog. Philanthotoxine (PhTx; Adams *et al.*, 1987; Eldefrawi *et al.*, 1988). Diese natürlich vorkommenden Polyamine haben ein relativ geringes Molekulargewicht und sind bei physiologischem pH positiv geladen. Erwartungsgemäß binden sie an Rezeptoren, die eine entsprechende Verteilung anionischer Aminosäurereste tragen (Usherwood & Blackbrough, 1991). Entsprechend sind unter diesen Rezeptoren viele Kationen-selektive Ligand-gesteuerte Ionenkanäle wie der nAChR (Rozental *et al.*, 1989; Shao *et al.*, 1998; Jayaraman *et al.*, 1999) und der ionotrope Glutamatrezeptor (Ragsdale *et al.*, 1989; Usherwood & Blackbrough, 1991) oder spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Scott *et al.*, 1993).

Die PhTx sind durch gemeinsame Strukturelemente charakterisiert: Alle besitzen eine hydrophobe Funktion ("Kopfgruppe"), die einen Tyrosinrest enthält und über eine Peptidbindung an eine positiv geladene Polyaminkette gekoppelt ist ("Schwanz") (Abb. 3.15.). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen NCI's sind in diesem Fall also aromatisches System und positive Ladung sterisch voneinander getrennt. Zudem treten mehrere positive Ladungen auf. Ein vorläufiges Modell geht davon aus, dass die Bindung durch die Wechselwirkung der Aminogruppen mit den Ringen negativer Ladungen im Lumen der verschiedenen Ionenkanäle zustande kommt (*Passpartout-Konzept*; Choi *et al.*, 1995).

Durch Variation der Strukturelemente von PhTx kann die Affinität der Bindung an die verschiedenen Rezeptortypen verändert werden (Anis *et al.*, 1995; Nakanishi *et al.*, 1997). Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, Substanzen zu synthetisieren, die selektiv auf einzelne Ionenkanäle wirken; dieses Ziel zu erreichen ist von großem therapeutischem

Interesse. Im Rahmen der Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit den Gruppen von Prof. Peter Usherwood (University of Nottingham, UK), Prof. Carlo Melchiorre (Università di Bologna, Italien) und Prof. Povl Krogsgaard-Larsen (Royal Danish School of Pharmacy, Kopenhagen, Dänemark) stand eine Vielzahl von solchen PhTx-Derivaten zur Verfügung. Durch die Definition struktureller Charakteristika, die die Assoziation dieser Substanzen mit dem Lumen des nAChR erleichtern oder auch erschweren, sollten im Rückschluss auch Informationen über das Milieu im Ionenkanal gewonnen werden können.



**Abb. 3.15: Strukturvergleich zwischen klassischen luminalen NCI's und Polyaminamiden.** A: PhTx-343; B: TPMP<sup>+</sup>; C: Ethidium. Man beachte den Abstand der positiven Ladung von der hydrophoben Kopfgruppe.

Im folgenden wurden die Affinitäten verschiedener PhTx- und Polymethylentetramin-Derivate in Fluoreszenztitrationen gegen den luminalen NCI Ethidium (6,6  $\mu\text{M}$ ) bestimmt. Bei den Konkurrenzexperimenten wurden die Derivate in Konzentrationen zwischen 100 nM und 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht, da aus früheren Arbeiten bekannt ist, dass Polyamine im millimolaren Bereich mit negativ geladenen Kopfgruppen von Phospholipiden interagieren können (Chung *et al.*, 1985) und nicht ausgeschlossen werden kann, dass auf diese Weise indirekt die Rezeptorfunktion beeinflusst wird.

### 3.2.3.1. Philanthotoxinderivate

Das native Philanthotoxin PhTx-343 (die Zahlen geben an, wie viele Methylengruppen zwischen aufeinanderfolgenden Stickstoffatomen im Schwanz liegen) hat nur eine mäßige Affinität für die luminale hoch-affine NCI-Bindungsstelle: Die apparente Dissoziationskonstante beträgt nur 50  $\mu\text{M}$  (siehe Tab. 3.4), vgl. zu 75 nM im Fall von Ethidium. PhTx-343 scheint minimale Anforderungen zu erfüllen, die für die Assoziation

mit dem Lumen des nAChR essentiell sind, denn die Reduktion der Schwanzlänge (vgl. PhTx-43) führt zu einem vollständigen Verlust der Affinität. Auch Spermin, das dem Schwanzteil des PhTx-343 entspricht, kann Ethidium nicht vom nAChR verdrängen.

Ersetzt man die Butanoylfunktion des PhTx-343 durch eine Dekanoylfunktion (C<sub>10</sub>-PhTx-343), so steigt die Hydrophobizität der Kopfgruppe, und mit ihr die Affinität für den nAChR ( $K_{app} = 28 \mu\text{M}$ ). Durch zusätzliche terminale Derivatisierung des Schwanzes mit Arginin (C<sub>10</sub>-PhTx-343-Arg) kann die Bindung jedoch vollständig verhindert werden. Das verwandte  $\epsilon$ -Amino-C<sub>6</sub>-Phe-343-Lys zeigt hingegen noch schwache Affinität für das Kanallumen ( $K_{app} = 671 \mu\text{M}$ ). Etwa zehnmal stärker bindet HONH-PhTx-343-Lys, das eine p-(Hydroxylamino-) Benzoessäurefunktion in der Kopfgruppe trägt ( $K_{app} = 87 \mu\text{M}$ ). Die Affinität wird weiter gesteigert durch eine Konversion der Hydroxylamino- in eine Azidofunktion ( $K_{app} = 7,3 \mu\text{M}$ ). *Stellt man den Vergleich zum nativen PhTx-343 an, so wird deutlich, dass eine terminale Derivatisierung im Schwanzbereich zwar die Affinität senkt, der Effekt aber durch eine Steigerung der Hydrophobizität in der Kopfgruppe ausgeglichen werden kann.*

Dieser Trend lässt sich auch an der zweiten untersuchten Gruppe von PhTx-Derivaten, den Dihydrocarbamazepin-Derivaten, veranschaulichen. Diese Substanzen bestehen aus zwei planaren Ringsystemen, die über eine dritte aromatische Gruppe mit dem Polyaminschwanz verknüpft sind. Die resultierenden Kopfgruppen sind wesentlich hydrophober und sterisch anspruchsvoller als die des nativen Toxins. In dieser Gruppe hat DCB-343 die höchste Affinität mit einem  $K_{app}$ -Wert von 8  $\mu\text{M}$ . Die Verlängerung der Polyaminkette entweder durch die Insertion einer weiteren Alkylenaminogruppe und damit einhergehender Variation der Distanz zwischen den Aminogruppen (DCB-3343), oder durch Insertion einer Amidohexylgruppe und terminaler Derivatisierung mit Arginin (DCB-C6-343-Arg), führte zu einer leichten Reduktion der Affinität für den nAChR, was sich in den ermittelten  $K_{app}$  von 26  $\mu\text{M}$  bzw. 13  $\mu\text{M}$  widerspiegelt. *Dies zeigt, dass die Verteilung der positiven Ladungen im Schwanzbereich im Vergleich zum Einfluss der Kopfgruppe eine untergeordnete Rolle spielt.*

Bei der dritten Gruppe von Substanzen ist die Buttersäuregruppe des nativen PhTx-343 durch ein Porphyrinringsystem ersetzt worden, das noch um vier Phenylringe erweitert wurde. Diese extensive Ausdehnung der Kopfgruppe (TPP-Tyr-343) hat eine starke Erhöhung der Affinität für den nAChR zur Folge ( $K_{app} = 9,8 \mu\text{M}$ ). Durch terminale Derivatisierung des Polyaminschwanzes mit Lysin und den Austausch der Tyrosin- durch

eine Phenylgruppe (TPP-Phe-343-Lys) wurde der Effekt sogar noch leicht verstärkt ( $K_{app} = 4,9 \mu\text{M}$ ). Nach Austausch der Phenyl- gegen Pyridylfunktionen, die unter physiologischen Bedingungen ungeladen sind (TPyP-Phe-343-Lys) ist die Affinität nochmals um eine Zehnerpotenz größer als bei allen anderen Porphyrinderivaten ( $K_{app} = 0,3 \mu\text{M}$ ). Interessanterweise bricht die Affinität des Derivats vollständig zusammen, wenn im eben genannten Pyridylrest der Stickstoff durch Methylierung permanent positiv geladen wurde (TMePyP-Phe-343-Lys). *Diese Ergebnisse legen nahe, dass Kopfgruppen mit stark hydrophoben Anteilen und großer Elektronendichte die Bindung von Polyaminen sehr günstig beeinflussen, dass aber die Einführung von positiven Ladungen in die Kopfgruppe nicht mit der Bindung im Lumen des nAChR vereinbar ist.*

PhTx-12 ist durch Deletion aller internen Aminogruppen im Schwanz aus PhTx-343 hervorgegangen. Die Modifikation verstärkt die Bindung im Lumen des nAChR etwa um den Faktor zehn. *Demnach sind die positiven Ladungen im Bereich des Schwanzes bis auf die terminale nicht essentiell für die antagonistische Wirkung am nAChR.*

#### 3.2.3.2. Methoctraminderivate

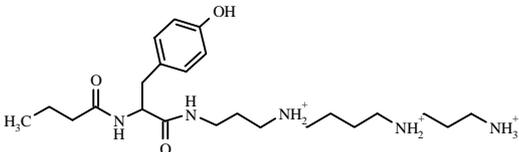
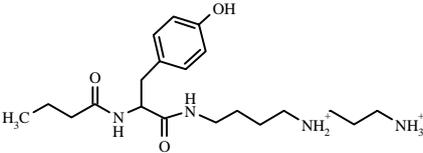
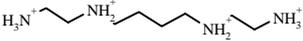
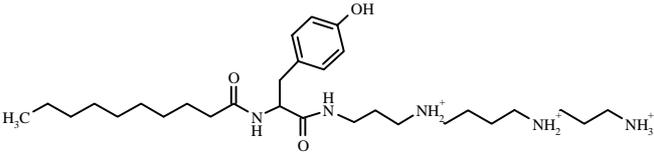
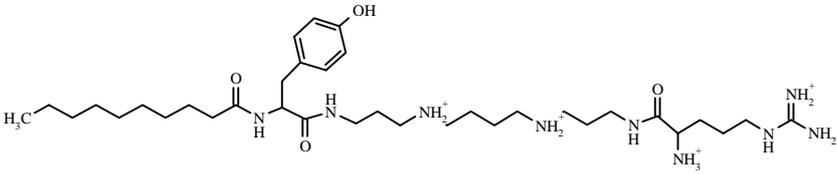
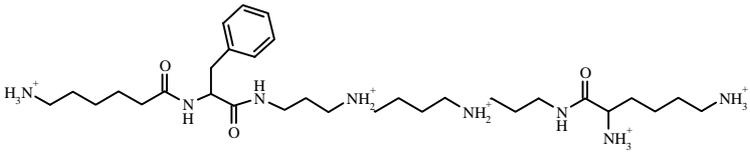
Methoctramin ist ein selektiver Antagonist des muskarinischen (metabotropen) Acetylcholinerezeptors, wirkt aber auch antagonistisch auf den nikotinischen Rezeptor. Strukturell setzt es sich aus zwei o-Methoxyphenylgruppen zusammen, die an die beiden Enden einer Tetraaminkette geknüpft sind. Im Unterschied zu den Philanthotoxinen besteht die Kopplung der aromatischen Gruppen an den Schwanzbereich nicht aus einer Amidbindung. Die Affinität für die luminale NCI-Bindungsstelle ist mit einer  $K_{app}$  von  $0,9 \mu\text{M}$  überraschend hoch. Dies ist nicht mit der Gegenwart der zweiten aromatischen Funktion zu erklären, denn die Deletionen einer Methoxyphenylfunktion (MR1996) senkt die  $K_{app}$  nur etwa um den Faktor zwei. Die Kopfgruppe des photoaktivierbaren MR44 ist im Vergleich zu der von MR1996 in großem Umfang verändert, doch scheinen sich die Einzeleffekte all dieser Veränderungen gegenseitig annähernd aufzuheben, so dass sich die Affinitäten von MR1996 und MR44 nur um den Faktor zwei unterscheiden.

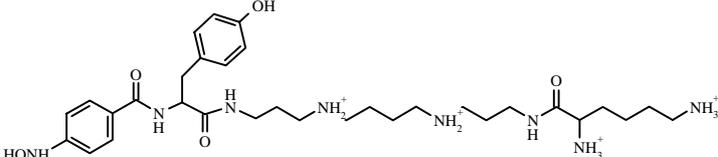
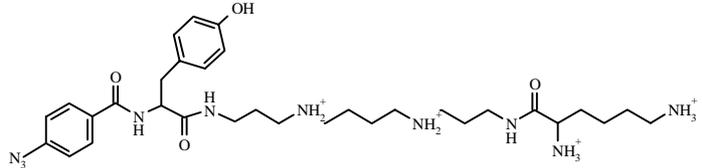
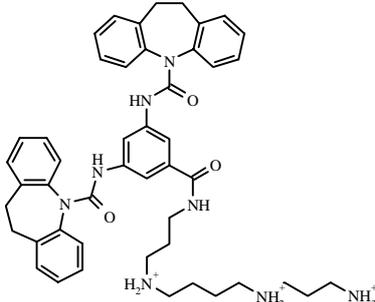
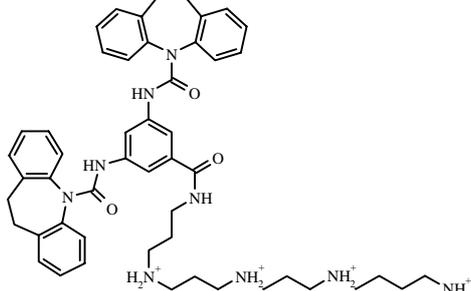
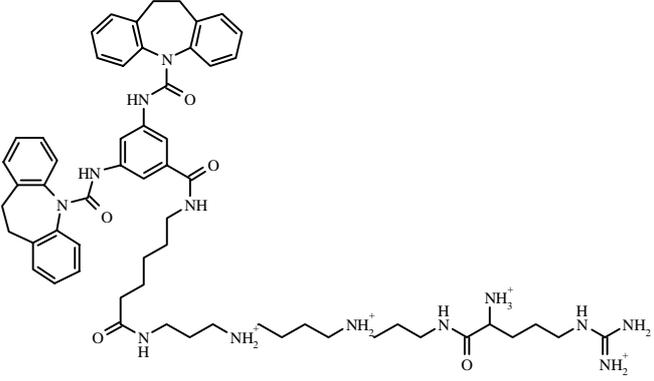
#### 3.2.3.3. Sonstige Polyaminamidderivate

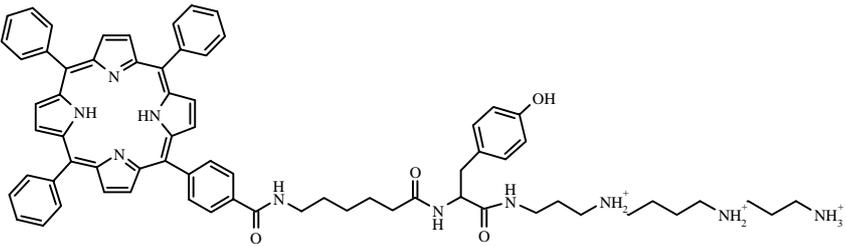
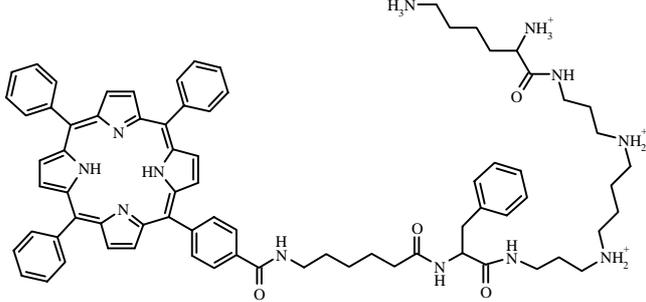
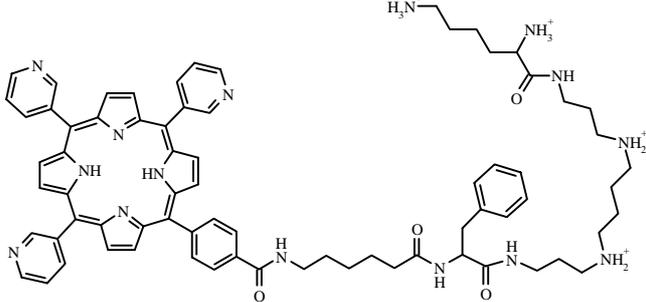
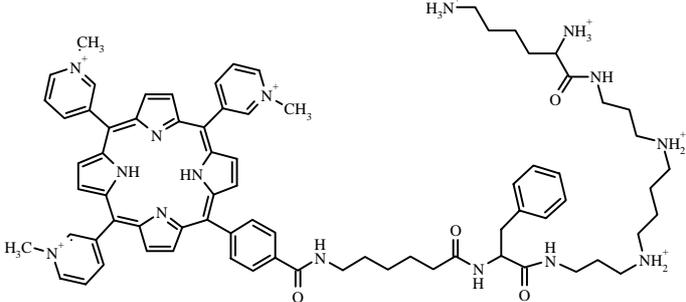
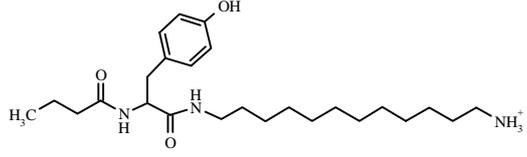
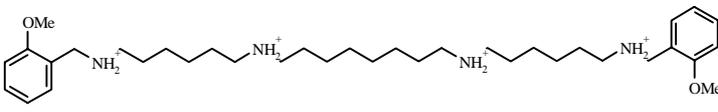
Vier weitere Verbindungen wurden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, mit dem Lumen des nAChR zu assoziieren. 50-KP entspricht dem PhTx-433, dessen Butanoylamido-Seitenkette entfernt worden ist. Die Kopfgruppe erhält so strukturelle Ähnlichkeiten mit

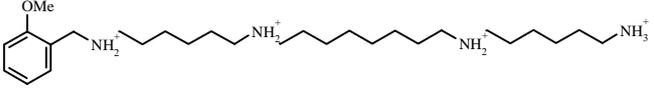
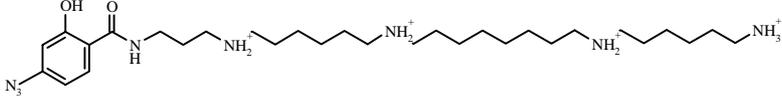
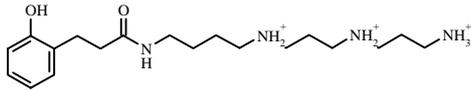
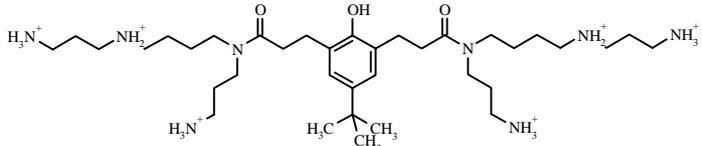
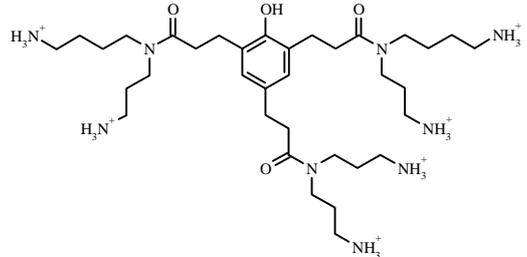
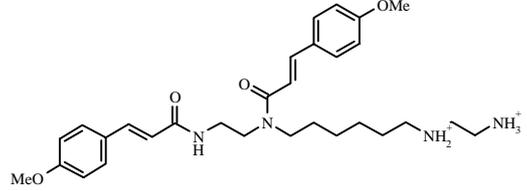
MR44, jedoch ist der Schwanz im Vergleich deutlich kürzer. Diese Verbindung zeigt keinerlei Wirksamkeit im Fluoreszenztest. Auch die stark verzweigten Substanzen 37-KP und 05-KP mit mehreren Polyaminschwänzen können Ethidium nicht vom Rezeptor verdrängen. Einzig 35-ML, dessen Schwanz die Länge eines PhTx hat, jedoch an der terminalen und der benachbarten Aminogruppe modifiziert ist, kann mit recht guter Affinität ( $K_{app} = 18 \mu\text{M}$ ) an den nAChR binden.

**Tab. 3.5: Übersicht über Strukturen und Affinitäten der in Fluoreszenztitrationen getesteten Substanzen.**  $K_{app}$  in  $\mu\text{M}$ ;  $n_H$  Hill-Koeffizient. Alle Konkurrenzexperimente erfolgten gegen  $6,6 \mu\text{M}$  Ethidium, das mit  $1 \mu\text{M}$  nAChR equilibriert worden war. Die Titration erfolgte in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  Carbamoylcholin, um die Assoziation der Derivate mit den Agonistbindungsstellen zu verhindern. k.B.: keine Bindung des Derivats.

Substanz	$K_{app}$	$n_H$
 <p><b>PhTx-343</b></p>	<b>50</b>	<b>1,55</b>
 <p><b>PhTx-43</b></p>	<b>k.B.</b>	
 <p><b>Spermin</b></p>	<b>k.B.</b>	
 <p><b>C<sub>10</sub>-PhTx-343</b></p>	<b>28</b>	<b>1,83</b>
 <p><b>C<sub>10</sub>-PhTx-343-Arg</b></p>	<b>k.B.</b>	
 <p><b><math>\epsilon</math>-Amino-C<sub>6</sub>-Phe-343-Lys</b></p>	<b>671</b>	<b>0,35</b>

Substanz	$K_{app}$	$n_H$
 <p style="text-align: center;"><b>HONH-PhTx-343-Lys</b></p>	<b>87</b>	<b>0,31</b>
 <p style="text-align: center;"><b>Azido-PhTx-343-Lys</b></p>	<b>7,3</b>	<b>1,34</b>
 <p style="text-align: center;"><b>DCB-343</b></p>	<b>8</b>	<b>0,47</b>
 <p style="text-align: center;"><b>DCB-3343</b></p>	<b>26</b>	<b>0,39</b>
 <p style="text-align: center;"><b>DCB-C<sub>6</sub>-343-Arg</b></p>	<b>13</b>	<b>0,53</b>

Substanz	$K_{app}$	$n_H$
 <p style="text-align: center;"><b>TPP-Tyr-343</b></p>	<b>9,8</b>	<b>1,02</b>
 <p style="text-align: center;"><b>TPP-Phe-343-Lys</b></p>	<b>4,9</b>	<b>1,1</b>
 <p style="text-align: center;"><b>TTPyP-Phe-343-Lys</b></p>	<b>0,3</b>	<b>1,37</b>
 <p style="text-align: center;"><b>TMePyP-Phe-343-Lys</b></p>	<b>k.B.</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>PhTx-12</b></p>	<b>4,5</b>	<b>0,87</b>
 <p style="text-align: center;"><b>Methoctramin</b></p>	<b>0,9</b>	<b>1,36</b>

Substanz	$K_{app}$	$n_H$
 <p style="text-align: center;"><b>MR1996</b></p>	<b>1,5</b>	<b>0,82</b>
 <p style="text-align: center;"><b>MR44</b></p>	<b>3,5</b>	<b>1,09</b>
 <p style="text-align: center;"><b>50-KP</b></p>	<b>k.B.</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>37-KP</b></p>	<b>k.B.</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>05-KP</b></p>	<b>k.B.</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>35-ML</b></p>	<b>18</b>	<b>1,58</b>

Die aus den Verdrängungskurven ermittelten Hill-Koeffizienten weichen zum Teil deutlich von eins ab. Keine der Substanzen verdrängte Ethidium jedoch auf allosterische Weise, denn in Bindungstests mit vernetzten desensibilisierten Rezeptoren führte die Inkubation mit allen Polyaminderivaten in Konzentrationen um ihre  $IC_{50}$ -Werte zu einem Rückgang der Fluoreszenz um etwa 50% (nicht gezeigt). Bixel *et al.* (2000a; 2000b) konnten zeigen, dass sowohl das Azidoderivat von PhTx-343 als auch MR44 mit einer Stöchiometrie von zwei zu eins an den nAChR binden, und es ist nicht auszuschließen, dass andere Derivate in noch höheren Stöchiometrien mit dem Lumen des Ionenkanals assoziieren.

Möglicherweise liegt in den abweichenden Stöchiometrien der Ethidium- bzw. Polyaminamid-Bindung eine Ursache für das kooperative Verhalten während der Competition. Negative Kooperativität könnte entstehen, indem die Bindung bereits eines Moleküls die Dissoziation von Ethidium bewirkt. Infolgedessen würde die Bindung eines zweiten Moleküls zu keiner weiteren Veränderung der Ethidiumfluoreszenz führen. Entsprechend würde im Verlauf der Titration die Competition umso schwächer, je mehr Rezeptormoleküle bereits ein Molekül Kompetitor gebunden haben.

Umgekehrt könnte das Auftreten positiver Kooperativität darauf hinweisen, dass ein Molekül der betreffenden Derivate im Lumen des Ionenkanals binden kann, ohne dass Ethidium dissoziiert; erst nach Bindung eines weiteren Moleküls würde Ethidium endgültig vom Rezeptor verdrängt. Auf diese Weise würde im Verlauf der Titration der Verlust an Ethidiumfluoreszenz umso stärker, je mehr Rezeptormoleküle bereits ein Molekül Kompetitor gebunden haben.



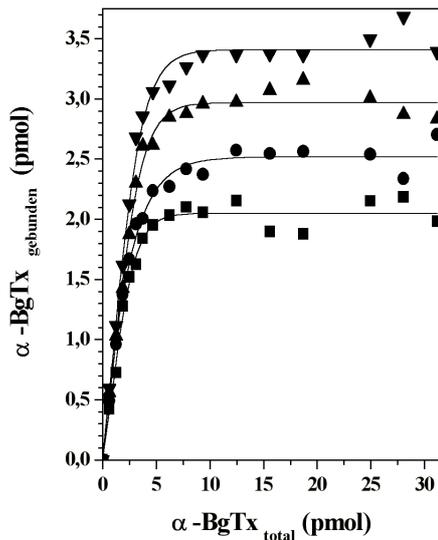
Verschiedene Beobachtungen und Überlegungen legen nahe, dass  $\alpha$ -NTs in einer Art "Tunnel" an den Kontaktflächen  $\alpha/\gamma$  und  $\alpha/\delta$  gebunden sind (im Detail diskutiert bei Hucho *et al.*, 1996), der sowohl vom Lumen des Ionenkanals als auch von der Peripherie der extrazellulären Domäne aus zugänglich sein muss. In den folgenden Experimente sollte untersucht werden, auf welchen dieser beiden denkbaren Wege sich  $\alpha$ -Neurotoxinmoleküle ihrer Bindungsstelle nähern.

### **3.3.1. Die Bindungskapazität für $\alpha$ -BgTx korreliert mit der Packungsdichte und der Fluidität nativer nAChR-reicher Membranen**

Angesichts der extremen Packungsdichte der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (siehe z.B. elektronenmikroskopische Aufnahmen bei Giersig *et al.*, 1989) kann man sich vorstellen, dass im Falle der Assoziation von der Peripherie her die Bindung der Toxinmoleküle durch benachbarte Rezeptoren beeinträchtigt wird. Diese Hypothese wurde überprüft, indem die Bindungskapazität nAChR-reicher Membranen aus *T. californica* in Abhängigkeit von der Packungsdichte bestimmt wurde: Diese sollte nur dann die Zugänglichkeit der Bindungsstellen beeinflussen, wenn die Toxine sich von der Peripherie der Rezeptoren her (*außen*) nähern; falls der Zugang durch das Lumen des Ionenkanals (*innen*) erfolgt, sollte hingegen die Zugänglichkeit unverändert bleiben.

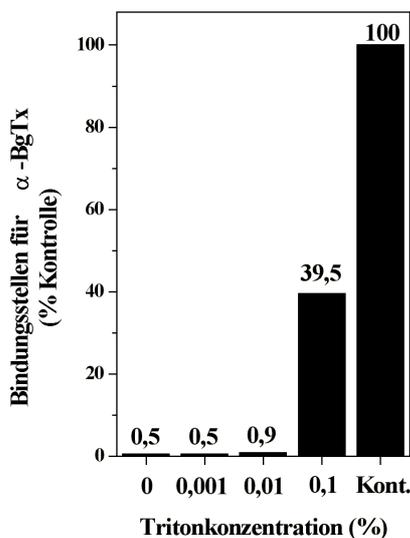
#### **3.3.1.1. Beeinflussung der Bindungskapazität durch Detergens**

Zunächst wurde die Packungsdichte der Rezeptoren in nativen nAChR-reichen Membranen durch Zugabe verschiedener Konzentrationen des nicht-denaturierenden Detergens Triton-X-100 variiert. In Bindungstests mit  $\alpha$ -BgTx wurde dann die Anzahl der zugänglichen Bindungsstellen bestimmt. Abb 3.17. zeigt, dass diese Zahl in hohem Maße von der eingesetzten Detergengkonzentration abhängt: Am offenkundigsten war der Effekt für maximal solubilisierten Membranen (0,1 % Triton), die etwa 60 % mehr  $\alpha$ -BgTx zu binden vermochten als native Membranen. Jedoch traten bereits bei 0,001 % Triton (20 % mehr Bindungsstellen) oder 0,01 % Triton (45 % mehr Bindungsstellen) Abweichungen vom Verhalten nativer Membranen auf.



**Abb. 3.17:** Die Zahl der zugänglichen Bindungsstellen für  $\alpha$ -BgTx steigt in Anwesenheit von Detergens. Die Proteinmenge betrug für jeden Messwert 2,5  $\mu$ g. Gezeigt ist die Bindung von  $\alpha$ -BgTx an native Membranen (■), sowie nach Zugabe von 0,001% (●), 0,01 % (▲) bzw. 0,1 % (▼) Triton-X-100

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt nicht durch eine schrittweise Auslösung von Rezeptormonomeren mit zunehmender Detergengkonzentration, sondern im Zuge einer Membranverdünnung zustande kommt, wurden die nAChR-reichen Vesikel mit den oben genannten Tritonkonzentrationen behandelt und anschließend durch Ultrazentrifugation pelletiert. Durch diese Prozedur können herausgelöste Rezeptormonomere von intakt gebliebenen Vesikeln getrennt werden. Wie in Abb. 3.18. dargestellt ist, wird erst ab Konzentrationen jenseits der kritischen Mizellenkonzentration die Intaktheit der Membranen so gestört, dass im Überstand Bindungsstellen für  $\alpha$ -BgTx detektierbar sind. Die Zahl der Bindungsstellen für  $\alpha$ -Bungarotoxin im Überstand liegt nach Zugabe von 0.001 % oder 0,01 % Triton-X-100 hundert mal niedriger als im Fall der Kontrolle, und selbst bei Zugabe von 0,1 % Triton-X-100 werden nur 40% der Rezeptoren solubilisiert.

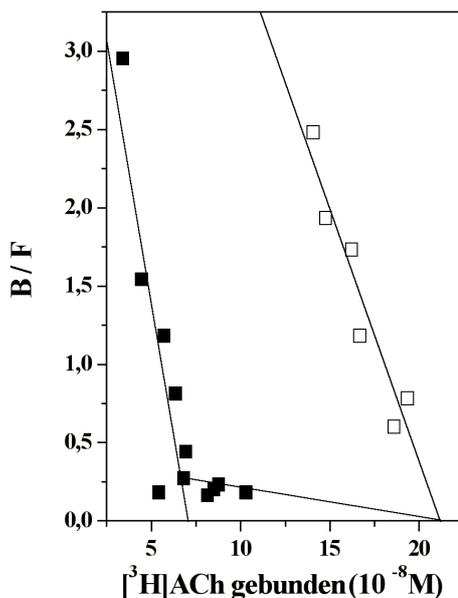


**Abb. 3.18:** Auslösung von Rezeptormolekülen aus der Membran durch Detergens. nAChR-reiche Membranen wurden mit Triton in den angegebenen Konzentrationen versetzt und pelletiert. Dann wurde die Zahl der Bindungsstellen für  $\alpha$ -BgTx im Überstand bestimmt und mit der Kontrolle (0,1 % Triton, nicht zentrifugiert) verglichen.

Dies bedeutet, dass mit steigender Tritonkonzentration zunehmende Mengen des Detergens in die Membranen inkorporiert werden und es infolge dessen zu einer schrittweisen Membranverdünnung kommt (nicht aber zur Herauslösung von Rezeptormolekülen), die bewirkt, dass eine größere Zahl von Bindungsstellen für  $\alpha$ -BgTx zugänglich wird.

In einer früheren Arbeit wurde postuliert, dass die beiden Bindungsstellen für  $\alpha$ -BgTx nicht äquivalent sind (Conti-Tronconi *et al.*, 1990); in nativen Membranen lägen eine hoch- und eine niedrig-affine Bindungsstelle vor. Dies soll dazu führen, dass im hier verwendeten Bindungstest während des Waschens die an die niedrig-affine Bindungsstelle gebundenen Toxinmoleküle abgelöst würden. Durch Solubilisierung würde der nAChR hingegen in die desensibilisierte Konformation übergehen, in der beide Bindungsstellen hohe Affinität hätten. Folglich wäre die oben beschriebene Zunahme der zugänglichen Bindungsstellen nach Tritonzusatz auf eine Konformationsänderung des nAChR zurückzuführen.

Um diesen Einwand zu entkräften, wurden native nAChR-reiche Membranen mit 0,01 % bzw. 0,001 % Triton equilibriert und danach mit Glutaraldehyd vernetzt. In  $[^3\text{H}]\text{ACh}$ -Bindungstests wurde dann der Konformationszustand der Rezeptoren überprüft (Abb. 3.19.). Der Einfluss von 0,1 % Triton-X-100 konnte nicht getestet werden, da bei dieser Konzentration ja ein signifikanter Teil der Rezeptoren aus der Membran gelöst wird und im ACh-Bindungstest nicht detektierbar ist.



**Abb. 3.19: Die Gegenwart von 0,01 % Triton-X-100 führt nicht zur Desensibilisierung des nAChR.** Native nAChR-reiche Membranen wurden in Gegenwart von Detergens mit Glutaraldehyd vernetzt. Dann wurde der Affinitätszustand der Membranen in  $[^3\text{H}]\text{ACh}$ -Bindungstests bestimmt (■). Ein Kontrollansatz wurde in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Carbamoylcholin vernetzt (□).

Tritonkonzentrationen unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration beeinflussen den Affinitätszustand nAChR-reicher Membranen also nicht; die Erhöhung der Zahl zugänglicher Bindungsstellen für  $\alpha$ -BgTx beruht demnach nicht auf der Desensibilisierung des nAChR.

### 3.3.1.2. Beeinflussung der Bindungskapazität durch Variation der Temperatur

Um auszuschließen, dass der oben beschriebene Effekte auf einer umfassenden Veränderung der Vesikelmorphologie beruht, in deren Folge zum Beispiel ursprünglich *inside-out* orientierte Vesikel umgeordnet werden, wurde versucht, die Membran auf schonendere Weise zu fluidisieren: Wenn wirklich die Beweglichkeit der Rezeptormonomere in der Membran die Fähigkeit der Assoziation von  $\alpha$ -BgTx mitbestimmt, so sollte die Erhöhung der Inkubationstemperatur einen ähnlichen Effekt erzeugen wie die Zugabe von Detergens. Im folgenden Experiment wurden daher native nAChR-reiche Membranen bei unterschiedlichen Temperaturen mit  $\alpha$ -BgTx inkubiert, um im Anschluß das Ausmaß der Bindung zu analysieren (Abb. 3.20.).

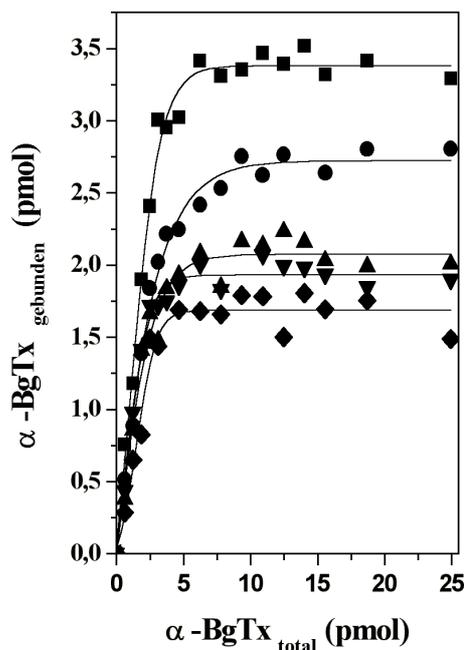
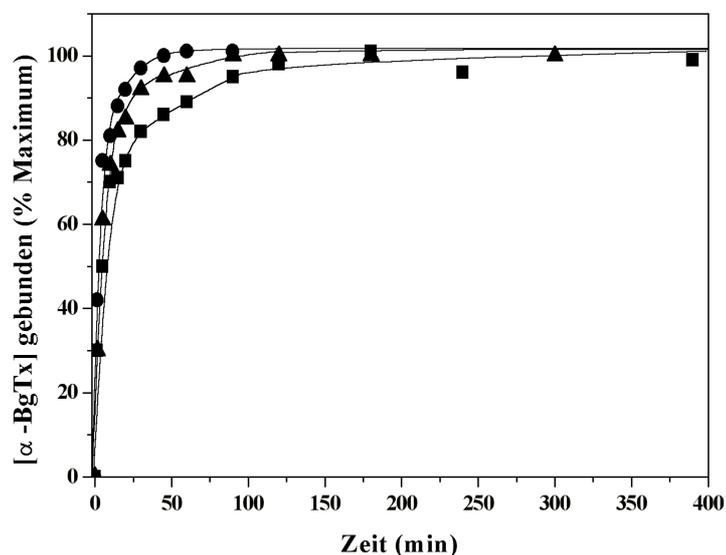


Abb. 3.20: Die Zahl der zugänglichen Bindungsstellen für  $\alpha$ -BgTx in nativen nAChR-reichen Membranen steigt mit der Temperatur. nAChR-reiche Membranen wurden bei 35 °C (●), 25 °C (▲), 15 °C (▼) und 4 °C (◆) mit [ $^{125}$ I]- $\alpha$ -BgTx inkubiert. Für jeden Messwert wurde die Bindung an 2,5  $\mu$ g Gesamtprotein bestimmt.

Die Erwärmung auf 35°C führte tatsächlich dazu, dass mehr  $\alpha$ -BgTx-Moleküle an die rezeptorreichen Membranen binden konnten. Dieser Effekt war mit dem der Zugabe von

0,001% Triton-X-100 vergleichbar. Allerdings konnte das Ausmaß der Zugänglichkeit nicht so effizient gesteigert werden wie durch Solubilisierung in 0,1 % Triton. Umgekehrt war es möglich, durch Absenken der Temperatur auf 4 °C die Zahl der zugänglichen Bindungsstellen um weitere 20 % zu reduzieren.

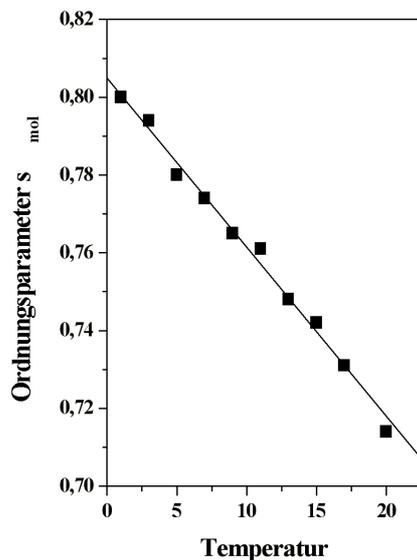
Um den Einwand zu widerlegen, dass die Veränderungen der Zugänglichkeit darauf beruhten, dass die Membranen nicht ausreichend lange mit  $\alpha$ -BgTx inkubiert worden sind, wurde die Zeitabhängigkeit der Bindung bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Wie aus Abb. 3.21. ersichtlich ist, genügten die Inkubationszeiten von 1h, 2h und 4h, um die vollständige Equilibrierung der Bindungsreaktion bei 25°C, 15°C bzw. 4°C zu gewährleisten. Eine Zunahme der Bindung konnte nach längeren Inkubationszeiten (auch über Nacht) nicht detektiert werden. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die hier gezeigte Kinetik der Toxinassoziation keine Rückschlüsse auf die Assoziationsrate der Bindungsreaktion zulässt. In Anbetracht der Schnelligkeit der Reaktion (nach 1,5 min sind bei 4°C bereits 30 % aller Bindungsstellen besetzt) müsste hierfür auf Techniken zurückgegriffen werden, durch die die Assoziation im Sekunden- bis Millisekunden-Bereich aufgelöst werden kann.



**Abb. 3.21. Zeitabhängigkeit der Bindung von  $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BgTx}$  an native nAChR-reiche Membranen bei verschiedenen Temperaturen.** Die Bindung verläuft bei 4°C (■) oder 15°C (▲) deutlich langsamer als bei 25°C (●).

Um auszuschließen, dass etwaige Phasenübergänge der Membran bei tieferen Temperaturen die Reduktion der Zahl der zugänglichen Bindungsstellen bedingen, wurde

durch ESR-Spektroskopie die Veränderung der Membranfluidität in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Hierfür wurde ein doxyl-markiertes Derivat von Stearinsäure in native nAChR-reiche Membranen inkorporiert. Aus früheren Experimenten weiss man, dass freie Fettsäuren bevorzugt mit dem nAChR interagieren und somit die Bestimmung der Fluidität der Membran in unmittelbarer Nachbarschaft des Rezeptors erlauben (Saez-Briones *et al.*, 1999). Bei der Methode macht man sich zunutze, dass durch die Assoziation eines spinmarkierten Lipids mit einem Membranprotein die Beweglichkeit der Spinsonde eingeschränkt wird und es dadurch zu einer Verbreiterung der Peaks kommt. Entsprechend kann die Hyperfeinaufspaltung mit dem Ordnungsgrad der Membran korreliert werden. Die Auftragung des Ordnungsparameters nAChR-reicher Membranen gegen die Temperatur ergibt eine lineare Abhängigkeit (Abb. 3.22.).



**Abb. 3.22: Lineare Abhängigkeit des Ordnungsparameters nAChR-reicher Membranen von der Temperatur.** Durch ESR-Spektroskopie wurde die Beweglichkeit einer doxyl-markierten Stearinsäure in nAChR-reichen Membranen in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug 5 mg/ml. Der Anteil der Spinsonde an Gesamtlipid lag unter 1,5 mol%.

Diese Experimente belegen, dass bei Erniedrigung der Temperatur die Struktur der Membran starrer, bei Erwärmung dagegen beweglicher wird. Im beobachteten Temperaturbereich kommt es nicht zu Phasenübergängen innerhalb der Membran. Im Zuge der Abkühlung wird offenbar bereits bei einer kleineren Zahl gebundener Toxinmoleküle ein Schwellenwert erreicht, ab dem keine weiteren Toxinmoleküle mehr Platz zwischen den Rezeptormonomeren finden können.

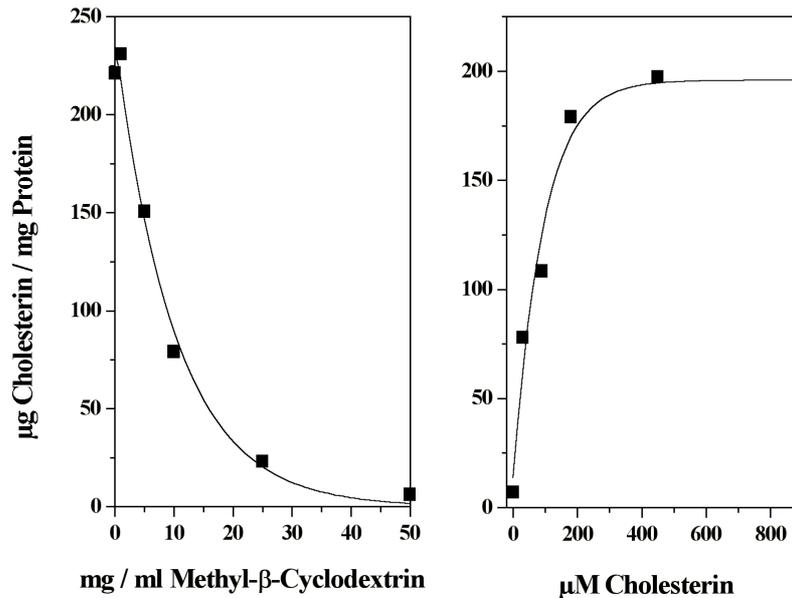
### 3.3.2. Die Rolle der Lipidumgebung für Agonist-induzierte Konformationsänderungen

#### 3.3.2.1. Der Cholesteringehalt nAChR-reicher Membranen kann durch Behandlung mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin variiert werden

Durch Rekonstitutionsexperimente wies man nach, dass die Funktion des nAChR abhängig ist von seiner Lipidumgebung (siehe Abschnitt 1.2.6.). Negativ geladene Phospholipide und Cholesterin scheinen zudem wichtig zu sein für die korrekte Faltung der Transmembrandomänen des nAChR (Fong & McNamee, 1987; Fernandez Ballester *et al.*, 1993). Bei den angesprochenen Experimenten wurde der Rezeptor zunächst durch Detergentien aus seiner nativen Lipidumgebung herausgelöst, gereinigt und danach wieder in eine Membran definierter Zusammensetzung zurückverlegt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Struktur und/oder Funktion des nAChR während der Rekonstitution beeinträchtigt werden.

Eine schonendere Methode, die Lipidzusammensetzung der Membran zu verändern, ergibt sich durch den Einsatz von Cyclodextrinen, die relativ selektiv bestimmte Lipidspezies aus der Membran zu extrahieren vermögen (Ohtani *et al.*, 1989). Insbesondere Methyl- $\beta$ -cyclodextrin ist als Reagenz beschrieben worden, das spezifisch Cholesterin komplexieren kann (z.B. Kilsdomk *et al.*, 1995). Im folgenden wurde versucht, den Cholesteringehalt nAChR-reicher Vesikel zu verringern und danach deren Ligandbindungseigenschaften zu untersuchen.

Wie aus Abb. 3.23. ersichtlich wird, kann man mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auch aus nAChR-reichen Membranen von *T. californica* Cholesterin extrahieren. Der Anteil am Gesamtlipid von ca. 40–60 mol% entspricht dem vieler anderer nativer Membranen aus verschiedenen Geweben und Organismen. Durch Behandlung mit Cholesterin-gesättigtem Me $\beta$ CD ist es umgekehrt möglich, in nAChR-reichen Vesikel, denen zuvor Cholesterin entzogen worden war, den ursprünglichen Steroidgehalt wiederherzustellen. Auffällig ist dabei, dass sich der Anteil von Cholesterin am Gesamtlipid offenbar nicht über den nativer Membranen hinaus steigern lässt.

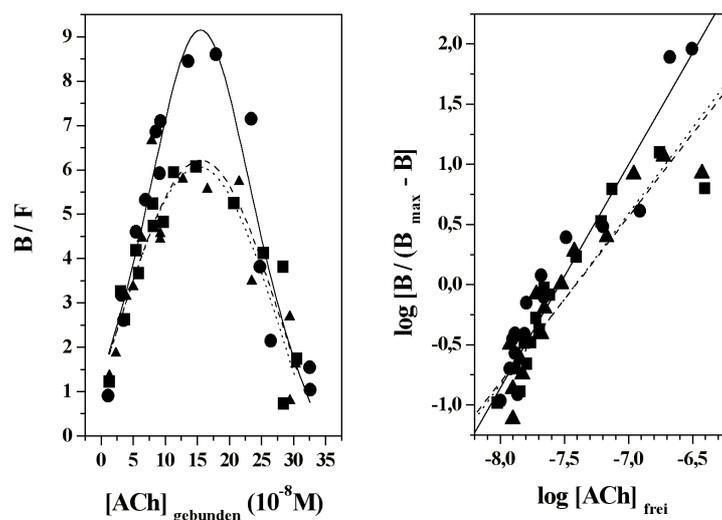


**Abb. 3.23: Manipulation des Cholesteringehalts nAChR-reicher Membranen mit Methyl-β-Cyclodextrin.** (*Links*) Die Menge an in der Membran verbleibendem Cholesterin hängt von der Konzentration an MeβCD während der Behandlung ab. (*Rechts*) In verarmten Membranen kann der Cholesteringehalt gesteigert werden, indem die Membranen mit Cholesterin-gesättigtem MeβCD inkubiert werden.

3.3.2.2. Durch Entfernung von Cholesterin aus nAChR-reichen Membranen wird die Kooperativität der Acetylcholinbindung erhöht.

Im folgenden wurden die Bindungseigenschaften nativer nAChR-reicher Membranen für Acetylcholin mit denen solcher Membranen verglichen, die durch Behandlung mit MeβCD stark an Cholesterin verarmt worden waren.

Scatchard-Plots der Bindung von [<sup>3</sup>H]ACh belegen eindeutig, dass in allen drei Membranpräparationen die Anzahl der Bindungsstellen für Acetylcholin ( $B_{max}$ ) nahezu gleich geblieben ist (Abb. 3.24.). Eine interessante Beobachtung zeigt sich bei Vergleich der Hill-Plots: Offenbar geht die Cholesterin-Depletion mit einer Erhöhung der Kooperativität der Acetylcholinbindung einher. Entsprechend steigt der Hill-Koeffizient von 1,4 auf 1,9. Der Effekt ist reversibel, denn nach Wiederherstellung des ursprünglichen Cholesteringehaltes ist eine Rückgang des Hill-Koeffizienten auf den Ausgangswert zu verzeichnen.



**Abb. 3.24: Einfluss des Cholesteringehalts auf die Kooperativität der Acetylcholinbindung.** (*Links*) Scatchard-Plots und (*rechts*) Hill-Plots der [<sup>3</sup>H]ACh-Bindung. Native nAChR-reiche Membranen (■) wurden verglichen mit solchen, denen durch Inkubation in 50 mg/ml MeßCD Cholesterin weitestgehend entzogen wurde (●). Durch Behandlung depletierter Membranen mit Cholesterin-gesättigtem MeßCD (Endkonzentration 0,5 mM in 50 mg/ml MeßCD) konnten die Ausgangsverhältnisse wiederhergestellt werden.

Cholesterin-arme Membranen wurden vernetzt, um in [<sup>3</sup>H]ACh-Bindungstests Dissoziationskonstanten für Acetylcholin im Ruhe- bzw. im desensibilisierten Zustand zu bestimmen (Bindungstests nicht gezeigt). Im Ruhezustand war die Affinität im Vergleich zu nativen Membranen mit 630 nM leicht erhöht, im desensibilisierten Zustand dagegen mit 60 nM etwas erniedrigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die allosterische Kopplung zwischen den beiden Agonistbindungsstellen durch hohe Cholesterinkonzentrationen abgeschwächt wird.