

4. DISKUSSION

4.1. Das Symmetrie-Modell vermag die Bindungseigenschaften definierter allosterischer Zustände des nAChR nicht korrekt zu beschreiben.

Das Symmetriemodell ist entwickelt worden, um die allosterischen Mechanismen oligomerer Proteine zu beschreiben. Eine wesentliche Vorhersage dieses Modells besagt, dass ein präformiertes Gleichgewicht zwischen den möglichen Konformationen des Proteins besteht, und dass die Bindung eines jeden Liganden das Gleichgewicht zu der Konformation hin verschiebt, die für diesen Liganden höhere Affinität aufweist.

Um zu klären, ob das Symmetriemodell auch Gültigkeit für den nAChR besitzt (Changeux & Edelstein, 1998), wurden daher zwei Sachverhalte überprüft: Zum einen wurden verschiedene Liganden bezüglich ihrer Fähigkeit getestet, das hypothetische Gleichgewicht zwischen dem Ruhe- und dem desensibilisierten Zustand zu verschieben. Zum anderen wurde die Affinität dieser Liganden für die beiden Zustände bestimmt. Beide Experimente nutzten die Erkenntnis, dass durch kovalente Vernetzung mit geeigneten bifunktionellen Reagenzien der nAChR in definierten Konformationen fixiert und analysiert werden kann (Watty *et al.*, 1997a).

Durch die dargestellten Experimente wurde nachgewiesen, dass ausschließlich Agonisten in der Lage sind, den nAChR in die desensibilisierte Konformation zu überführen. Entsprechend erhält man durch Vernetzung in Gegenwart von Carbamoylcholin oder (-)-Nicotin eine homogene Population von hoch-affinen Bindungsstellen. In Übereinstimmung mit Experimenten von Watty *et al.* (1997a) behielt der Rezeptor dagegen eine niedrig-affine Konformation bei, wenn die Vernetzungsreaktion in Abwesenheit von Agonisten durchgeführt wurde. Durch Zugabe von kompetitiven oder nicht-kompetitiven Antagonisten während der Behandlung mit Glutaraldehyd wurde der Affinitätszustand des nAChR im Vergleich zum Ruhezustand kaum verändert.

Dieses Ergebnis ist nur dann im Einklang mit dem Symmetriemodell, wenn die getesteten Antagonisten im Ruhezustand fester bänden als im desensibilisierten, denn in diesem Fall würde keine Veränderung des Affinitätszustands induziert. Doch eine Überprüfung der Affinitäten durch Konkurrenzexperimente mit Acetylcholin bzw. NTII zeigte, dass die meisten der untersuchten Agonisten und kompetitiven Antagonisten bevorzugt an den

desensibilisierten Zustand des nAChR binden. Dies gilt auch für den nicht-kompetitiven Antagonisten TPMP⁺, der im desensibilisierten Zustand mit wesentlich höherer Ausbeute mit den M2-Helices vernetzt werden kann als im Ruhezustand (Lauffer *et al.*, 1982; Oberthür *et al.*, 1986; Oberthür *et al.*, 1988). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde außerdem nachgewiesen, dass der NCI Ethidium etwa zehnmal stärker an den desensibilisierten Rezeptor bindet als an den ruhenden.

Seit den frühen Untersuchungen von Katz & Thesleff (1957) ist immer wieder bestätigt worden, dass der nAChR spontan aus der desensibilisierten Konformation in den Ruhezustand zurückkehrt, sobald der Agonist entfernt wird. Da während der Rückkehr keine Kanalöffnungen detektierbar sind, müssen die Zustandsänderungen beim Übergang vom desensibilisierten in den Ruhezustand auf anderen Wegen erfolgen als diejenigen, die zur Erreichung des desensibilisierten Zustandes geführt haben. Dies wird durch das zyklischen Schema in Abb 4.1. deutlich (nach Franke *et al.*, 1992, 1993).

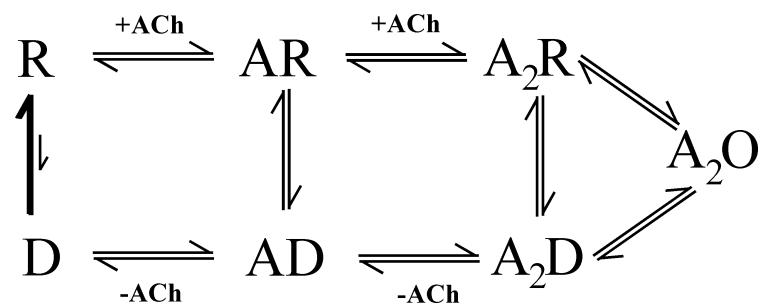


Abb. 4.1: Zyklisches Schema der Aktivierung, Desensibilisierung und Erholung des nAChR (nach Franke *et al.*, 1993).

Es gibt nachweislich Kanalöffnungen vom mono-ligierten Zustand aus ($AR \rightleftharpoons AO$), doch sind diese Öffnungen – ähnlich den spontanen Öffnungen, die ebenfalls nicht berücksichtigt sind – sehr selten (Colquhoun & Sakmann, 1985) und wurden in dem Schema vernachlässigt. Theoretisch kann der desensibilisierte Zustand also vom Ruhezustand aus direkt oder nach Agonistbindung über die offene Konformation erreicht werden. Die Ergebnisse der Bindungsstudien in der vorliegenden Arbeit belegen eindeutig, dass der direkte (d.h. Agonist-unabhängige) Übergang nicht stattfindet. Ähnlich zeigte sich indirekt in elektrophysiologischen Messungen (Franke *et al.*, 1993), dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten unligiert desensibilisierter Rezeptoren sehr gering ist;

der Quotient aus den Reaktionsraten im Gleichgewicht $D \rightleftharpoons R$ wurde auf unter 0,01 geschätzt.

Dadurch ergibt sich ein deutlicher Widerspruch zum Symmetriemodell: Ausschließlich durch die Bindung von Agonisten können offenbar spezifische Konformationsänderungen ausgelöst werden, die essentiell sind für die Signalübertragung von den Agonistbindungsstellen zum Ionenkanal, so dass der nAChR vom Ruhezustand über den sehr kurzlebigen aktivierten, d.h. offenen Zustand hinweg in die desensibilisierte Konformation konvertiert werden kann. Kompetitive und allosterische Liganden sind *per se* nicht in der Lage, Strukturveränderungen im nAChR herbeizuführen, die nachhaltig die Affinität für Agonisten beeinflussen können, auch wenn sie die Agonist-induzierten Konformationsänderungen nachweislich erleichtern können (siehe z.B. Heidmann *et al.*, 1983b).

Das Auftreten negativer Kooperativität bei der Bindung von Epibatidin an den nAChR (Prince & Sine, 1999) kann mit dem Symmetriemodell ebenfalls nicht in Einklang gebracht werden. Um diesem Bindungsverhalten Rechnung zu tragen, wurde ein ungekoppeltes Modell vorgeschlagen: Die beiden Agonistbindungsstellen könnten demnach wie im sequenziellen Modell unterschiedliche Konformationen einnehmen; der Übergang von einer Konformation in die andere würde jedoch nicht durch den Ligand induziert, sondern durch die Stabilisierung spontan existierender Konformationen durch den Agonisten vermittelt. Auch dieses ungekoppelte Modell ist nicht mit den in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen vereinbar, weil es voraussetzt, dass Agonist-unabhängige Konversionen innerhalb einzelner Untereinheiten in einem Gleichgewicht zwischen dem Ruhe- und dem desensibilisierten Zustand stattfinden, in das grundsätzlich alle Liganden eingreifen sollten.

Eher als das Symmetriemodell untermauern die hier dargelegten Beobachtungen das sequenzielle Modell (Koshland *et al.*, 1966). Dieses geht davon aus, dass durch die Agonistbindung weitreichende Konformationsänderungen ausgelöst werden, die sich von den Kontaktflächen an der Bindung beteiligter Untereinheiten zum Lumen des Ionenkanals hin ausbreiten und dort dessen Öffnung auslösen. Es wird u.a. durch die Erkenntnis gestützt, dass der Muskel-nAChR mehrere Leitfähigkeitszustände aufweist (Hamill & Sakmann, 1981; Auerbach & Sachs, 1983), denn dies impliziert, dass die beiden Acetylcholin-Bindungsstellen voneinander unabhängige Konformationen einnehmen können, die wiederum unterschiedliche Kanalleitfähigkeiten bedingen.

4.2. Die Konformationen des nAChR nach der Vernetzung in Gegenwart verschiedener Liganden

Die Affinität der Agonistbindungsstelle ist nach Vernetzung in Gegenwart von kompetitiven Antagonisten etwas höher (ca. 450 nM) als nach Vernetzung in Abwesenheit von Ligand bzw. in Anwesenheit von NCIIs (ca. 900 nM). Dies könnte zwei Ursachen haben: Einerseits ist es möglich, dass durch Modifikation von Lysinresten in unmittelbarer Nähe der Agonistbindungsstellen deren Affinität leicht verringert wird, dass diese Reaktion aber verhindert ist, wenn die Bindungsstellen besetzt sind. So zeigten Watty *et al.* (1998), dass durch den Lysin-spezifischen und agonistischen Vernetzer Dimethylsuberimidat u.a. die Reste α -Lys76 und α -Lys179 modifiziert werden; jedoch blieb unklar, ob die Modifikation von der Agonistbindungsstelle aus erfolgt. Zum anderen kann man sich vorstellen, dass die Bindung von kompetitiven Antagonisten zu lokalen Konformationsänderungen im Bereich der Agonistbindungsstellen führt (*Induced Fit*), die durch die Vernetzung fixiert und in den anschließenden ACh-Bindungstests detektiert werden können. Die zweite Erklärung stünde in Einklang mit dem Sequenzmodell. Dagegen ist die Affinität für ACh nach Vernetzung in Gegenwart von Carbamoylcholin bzw. (-)-Nicotin etwa gleich hoch.

In allen Fällen, in denen durch die [³H]ACh-Bindungstests der nAChR im Ruhezustand detektiert wurde, trat neben den niedrig-affinen Bindungsstellen eine signifikante Zahl hoch-affiner Bindungsstellen (25-35% von B_{\max}) auf. Ihr Anteil ließ sich nicht durch eine Verlängerung der Vernetzungsdauer oder durch eine Erhöhung der Konzentration an Glutardialdehyd reduzieren (Watty *et al.*, 1997a). Damit ist die Existenz der hoch-affinen Bindungsstellen nicht auf unvollständig vernetzte Rezeptormoleküle zurückzuführen. Watty *et al.* nahmen daher an, dass der nAChR gemäss dem Symmetriemodell spontan in verschiedenen Konformationen vorliegt, die nach Vernetzung zur Detektion ruhender und desensibilisierte Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten führen. Da es nachweislich jedoch keine spontan desensibilisierten Rezeptoren gibt (siehe Abschnitt 4.1.), muss angenommen werden, dass die Vernetzung künstlich hoch-affine Bindungsstellen auf nicht-funktionellen Rezeptormolekülen generiert. Dafür spricht auch, dass in Fluoreszenztitrationen mit dem NCI Ethidium nach Vernetzung im Ruhezustand nur *eine* Population von Bindungsstellen identischer Affinität detektiert wurde (Abb. 3.9.); die Vernetzung ging mit einem Rückgang der maximalen Ethidiumfluoreszenz und einer Verringerung von B_{\max} um etwa 30 % einher. Ähnlich fand Watty (1997b), dass bei der

photoinduzierten Inkorporation von [^3H]TPMP⁺ in den vernetzten Rezeptor die Einbauraten im Vergleich zum nativen Zustand um etwa 35 % sank.

Ein weiterer Aspekt, der oft zur Untermauerung der Gültigkeit des Symmetriemodells herangezogen wird, basiert auf der Beobachtung, dass auch in Abwesenheit von Agonist Kanalöffnungen detektierbar sind (Jackson, 1984), denn dies scheint unmittelbar das Auftreten spontaner Zustandsänderungen widerzuspiegeln. Später erwies sich allerdings, dass sich die spontanen Kanalöffnungen deutlich von den Agonist-induzierten in ihrer Dauer und vor allem durch eine schwache Spannungsabhängigkeit in der Kinetik der Kanalschließung unterscheiden (Auerbach *et al.*, 1996). Zudem wurde in der gleichen Studie beobachtet, dass mono- und diligierte Zustände mit verschiedenen Leitfähigkeiten existieren können, die in unterschiedlichem Maße spannungsabhängig sind. Folglich scheinen die beiden Typen der Kanalöffnung distinkten Mechanismen zu folgen; dies lässt sich nicht mit dem Symmetriemodell vereinbaren. Angesichts der niedrigen Frequenz spontaner Aktivierungen ist es außerdem höchst unwahrscheinlich, dass der in dieser Arbeit bestimmte relativ hohe Anteil von Bindungsstellen solche Rezeptoren repräsentiert, die spontan über die offene Konformation hinweg desensibilisiert waren. Vermutlich kommen spontane Kanalöffnungen durch lokale Konformationsänderungen im Bereich der Pore zustande (siehe Abschnitt 4.4.).

Im Gegensatz zu kleineren Antagonisten unterscheiden α -Neurotoxine nicht zwischen der ruhenden und der desensibilisierten Konformation, denn nach kovalenter Vernetzung ist die Affinität für [^{125}I]NTII in beiden Zuständen gleich. Dies widerspricht der Auffassung, dass α -Neurotoxine durch eine bevorzugte Stabilisierung des Ruhezustands inhibitorisch wirken könnten (Moore & McCarthy, 1995). Vielmehr scheint der antagonistische Effekt allein auf einer Konkurrenz mit Acetylcholin um überlappende Bindungsstellen zu beruhen. Interessanterweise war die Affinität des Toxins nach der Vernetzung im Vergleich zu nativen Rezeptoren leicht verringert. Dies weist darauf hin, dass die Mobilität an den Kontaktflächen zwischen benachbarten Untereinheiten bzw. an der Protein-Lipid-Grenzschicht die Zugänglichkeit von α -Neurotoxine beeinflusst (siehe Abschnitt 4.6. und Saez-Briones *et al.*, 1999). Andererseits könnte die Affinität der Toxine auch sinken, weil im Verlauf der Vernetzung Lysinreste an den Kontaktflächen durch Glutardialdehyd modifiziert und damit einhergehend positive Ladungen eliminiert werden.

4.3. Strukturveränderungen im Rahmen allosterischer Übergänge

Bedingt durch die kurze Öffnungsdauer des Kanals liegen bisher nur spärliche Ergebnisse über die Eigenschaften des aktiven Zustandes vor. Weit besser charakterisiert sind dagegen der Ruhe- und der desensibilisierte Zustand. Allein die deutlich unterschiedlichen Affinitäten von Ruhe- und desensibilisiertem Zustand für Acetylcholin lassen darauf schließen, dass sich beide durch abweichende Strukturen an den Kontaktflächen im Bereich der Agonistbindungsstellen unterscheiden. In Einklang mit dieser Erkenntnis findet man Unterschiede in der Zugänglichkeit mancher Aminosäurereste für kovalente Modifikationen; so lassen sich beispielsweise die Reste α -Tyr93 und α -Trp143 im desensibilisierten Zustand leichter durch den kompetitiven Antagonisten DDF derivatisieren als im Ruhezustand (Galzi *et al.*, 1991). Andererseits sind die Konformationsunterschiede aber offenbar lokal so begrenzt, dass sie sich nicht in einer Veränderung der Affinität für α -Neurotoxine bemerkbar machen.

Auch im Bereich des Ionenkanals sind Strukturveränderungen im Anschluss an die Agonistbindung zu erwarten, denn dort entscheidet sich letztlich, ob Ionen passieren können oder nicht. Tatsächlich haben viele nicht-kompetitive Antagonisten zum Teil dramatisch unterschiedliche Affinitäten zu den beiden Zuständen (Cohen *et al.*, 1974; Cohen, 1978; Heidmann *et al.*, 1983b); auch das hier untersuchte Ethidium bindet zehnmal stärker an den desensibilisierten als an den Ruhezustand. Entsprechend verändert sich durch Anwesenheit von Agonisten die Stärke der Markierung des nAChR durch manche NCIs, so im Fall von TID (White *et al.*, 1991), Trimethisoquin (Waksman *et al.*, 1980), Phencyclidin (Haring *et al.*, 1983), Perhydrohistrionicotoxin, Chlorpromazin (Oswald & Changeux, 1981; Heidmann *et al.*, 1983b) und Tetracain (Middleton *et al.*, 1999), oder die verschiedenen Untereinheiten werden mit unterschiedlicher Präferenz markiert, wie bei TPMP⁺ (Muhn *et al.*, 1983) und Phencyclidin (Haring *et al.*, 1983). Im Gegenzug erleichtert die Bindung mancher Kanalblocker die Desensibilisierung des nAChR nach Agonistzugabe (Burgermeister *et al.*, 1977; Young & Sigman, 1981).

Dennoch sind die mit der Desensibilisierung assoziierten Strukturveränderungen im Bereich des Ionenkanals weniger weitreichend als ursprünglich angenommen: Während relativ schlecht auflösende elektronenmikroskopische Aufnahmen vom nAChR im desensibilisierten Zustand andeuten, dass vor allem die δ - und in geringerem Umfang auch die γ -Untereinheit im Vergleich zum Ruhezustand zu einer weniger symmetrischen

Quartärstruktur umorientiert werden (Unwin *et al.*, 1988), weisen die Markierungsmuster der bisher lokalisierten NCIs darauf hin, dass im Ruhe- und im desensibilisierten Zustand grundsätzlich dieselben Reste der M2-Helices ins Lumen des Ionenkanals exponiert sind. Dies wird deutlich, wenn man die Positionen der durch TPMP⁺ (desensibilisierter Zustand) bzw. durch Tetracain (Ruhezustand) modifizierten Aminosäuren vergleicht (Oberthür *et al.*, 1986; Hucho *et al.*, 1986; Gallagher & Cohen, 1999), oder wenn man bedenkt, dass die NCIs QX-222 und QX-314, die große strukturelle Verwandtschaft zu Tetracain besitzen, in Anwesenheit eines Agonisten dieselben Bereiche der α -Untereinheit kontaktieren wie Tetracain in Abwesenheit (Pascual & Karlin, 1998).

Durch eine bisher noch nicht genau spezifizierbare Aufweitung der Pore in Anwesenheit von Agonisten scheinen weiter intrazellulär gelegene Bereiche von M2 zugänglich zu werden, so dass beispielsweise TID (McCarthy & Stroud, 1989a; White & Cohen, 1992) und Diazofluoren (Blanton *et al.*, 1998) nach Zugabe von Carbachol zusätzlich um eine Helixwindung tiefer gelegene Bereiche des Ionenkanals erreichen können als im Ruhezustand, doch sind die Markierungsausbeuten an entsprechenden Seitenketten sehr gering und lassen nicht auf dominante Bewegungen von M2 schließen. Wie im spannungsabhängigen Kaliumkanal, von dem eine Röntgenstruktur vorliegt (Doyle *et al.*, 1998), und dessen Öffnungsmechanismen relativ detailliert erforscht sind (Perozo *et al.*, 1999), scheinen im nAChR also beim Übergang von einer Konformation in die andere Sekundärstrukturen weitgehend unverändert zu bleiben. Die Kanalöffnung kommt offenbar durch Translationsbewegungen der M2-Helices zustande; im Unterschied zum Kaliumkanal finden aber zumindest während der Desensibilisierung wahrscheinlich keine Rotationsbewegungen statt.

Es ist daher vielleicht nicht überraschend, dass spektroskopische Experimente keinerlei Rückschlüsse auf dominante Veränderungen der Sekundärstruktur zulassen: In CD-Spektren rekonstituierter oder Detergens-solubilisierter Rezeptoren zeigen sich keine Nettoveränderungen von Sekundärstrukturanteilen nach Desensibilisierung (Mielke & Wallace, 1988). Auch in ¹H/³H-Austauschexperimenten an nAChR-reichen Vesikeln sind keine Unterschiede in der Lösungsmittelzugänglichkeit zwischen dem desensibilisierten und dem Ruhezustand zu erkennen (McCarthy & Stroud, 1989b). Frühere FTIR-spektroskopische Ansätze wiesen auf deutliche Unterschiede in der Sekundärstruktur von ruhenden bzw. desensibilisierten Rezeptoren hin (Baenziger *et al.*, 1992; Castresana *et al.*, 1992); der β -Faltblattanteil sollte bei gleichbleibendem α -helikalem Gehalt stark

zurückgehen. Diese Effekte konnten von anderen Gruppen jedoch nicht bestätigt werden (Méthot *et al.*, 1994; Méthot *et al.*, 1995; Wirjantoro, 1996). Detektierte schwache Differenzen wurden auf lokale Veränderungen der Struktur von Aromaten und protonierten Carboxylgruppen im Bereich der Agonistbindungsstelle zurückgeführt (Baenziger *et al.*, 1993; Baenziger & Chew, 1997).

4.4. Der Phänotyp von Mutanten im Bereich des Ionenkanals

An Rezeptoren aus Mausmuskel wurde gezeigt, dass die Mutation eines hochkonservierten Leucinrestes etwa in der Mitte von M2 (L251 in der α -Untereinheit) in elektrophysiologischen Messungen die Dosis-Wirkungs-Kurve zu niedrigeren Acetylcholin-Konzentrationen verschiebt (Labarca *et al.*, 1995; Filatov & White, 1995). Die Beobachtung scheint auf den ersten Blick zu bestätigen, dass Eingriffe in die Struktur des Ionenkanals unweigerlich mit der Beeinflussung der Agonistbindungsstellen einhergehen. Bei genauerer Untersuchung stellte man jedoch fest, dass diese Verschiebung nicht auf einer Veränderung der Affinität für Acetylcholin beruhte, sondern auf einer Verlangsamung der Desensibilisierung und einer damit einhergehenden Verlängerung der Öffnungszeit des Ionenkanals. Da der Effekt umso stärker ist, je mehr Untereinheiten im Oligomer die Mutation besitzen, trägt im muskelspezifischen nAChR wahrscheinlich jeder Rest des Leucinringes in gleichem Maße dazu bei, dass die Anordnung der M2-Helices im offenen Zustand des Kanals destabilisiert wird. Es mag also im Bereich der Pore zu lokalen und konzertierten Konformationsänderungen kommen, die in spontanen Kanalöffnungen resultieren. Diese Umlagerungen sind jedoch nicht Teil einer umfassenden Konversion der Struktur im Sinne des Symmetriemodells, die auch die Agonistbindungsstellen in Mitleidenschaft ziehen muss.

Es gibt eine Reihe weiterer Mutationen im Bereich von M2, so z.B. α -V249F (Milone *et al.*, 1997) – interessanterweise liegt dieser Rest vgl. zu α -L251 auf der gegenüberliegenden Seite der putativen M2-Helix und kann somit nicht in gleicher Weise in den Ionenkanal exponiert sein – , ϵ -T264P (Ohno *et al.*, 1995), α -S247F (Weiland *et al.*, 1996; Kuryatov *et al.*, 1997) und andere, von denen viele mit einer Erhöhung der Kanalöffnungsrate, Verlängerung der Öffnungszeit, Veränderung der Permeabilität und/oder Verstärkung der Desensibilisierungsrate einhergehen und so zu Krankheiten wie dem myasthenischen

Syndrom oder bestimmter Formen der Epilepsie führen. Auch hier müssen die Phänotypen nicht unbedingt auf einer Änderung der Affinität der Agonistbindungsstelle beruhen, sondern können wie der von α -L251-Mutanten ebenso gut durch eine mit der Mutation einhergehende Stabilisierung oder Destabilisierung der Konformation in der Porenregion erklärt werden.

Im neuronalen homomeren α 7-Rezeptor spielt der konservierte Leucinrest offenbar eine komplexere Rolle als im Muskel-nAChR (Revah *et al.*, 19991): Die Mutation L247T verschiebt nicht nur die EC_{50} , sondern führt zum Auftreten eines zusätzlichen Leitfähigkeitszustandes. Außerdem bekommen kompetitive Antagonisten des Wildtyps wie Hexamethonium und β -Erythroidin an der Mutante agonistische Wirkung (Bertrand *et al.*, 1992). Die strukturellen Grundlagen dieser pleiotropen Veränderungen sind unklar, doch wurde auf der Basis des Symmetriemodells vorgeschlagen, dass die Mutation den desensibilisierten Zustand des α 7-Rezeptors leitfähig macht, und bestimmte kompetitive Antagonisten durch die Stabilisierung des desensibilisierten Zustandes den Ionenfluss hervorrufen können. Um diese Hypothese abzusichern, müssen jedoch noch genauere Kenntnisse gewonnen werden über die Kinetik der einzelnen Schritte, die zur Aktivierung neuronaler Rezeptoren führen.

Angesichts der unterschiedlichen Quartärstruktur ist es denkbar, dass die Aktivierung des neuronalen α 7-Rezeptors und des Muskel-nAChR nach abweichenden Mechanismen ablaufen: Immerhin ist der eine Rezeptor ein Homopentamer, der den perfekt-symmetrischen Anforderungen des MWC-Modells genügen könnte. Der nAChR aus *T. californica* und sehr wahrscheinlich auch der Muskel-nAChR sind dagegen Heteropentamere mit genau festgelegter Anordnung der Untereinheiten (Machold *et al.*, 1995b), in dem die einzelnen Untereinheiten folglich nicht äquivalente Positionen und Funktionen haben. Interessanterweise häufen sich in letzter Zeit Hinweise darauf, dass die α 7-Untereinheiten unterschiedlich prozessiert werden und es so posttranslational zu einer Heteromerenbildung kommen könnte (Rangwala *et al.*, 1997; Rakhilin *et al.*, 1999; Drisdell & Green, 2000). Klarheit in Bezug auf diese Frage kann letztlich erst geschaffen werden, wenn verlässliche Angaben über die Zahl der Bindungsstellen pro α 7-Monomer vorliegen.

4.5. Die Bindungsstellen für nicht-kompetitive Antagonisten

4.5.1. Die Bindungsstelle für hoch-affine NCIs im Lumen des nAChR

Auf der Grundlage von FRET-Experimenten wurde postuliert, dass Ethidium im Vestibül des nAChR etwas oberhalb der Agonist-Bindungsstellen bindet (Johnson & Nuss, 1994). Diese Lokalisation setzt einen allosterischen Mechanismus der Kanalinhhibition voraus, denn die Bindung würde weiter als 45 Å vom Ionenkanal entfernt erfolgen.

In Widerspruch zu dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit dagegen gezeigt, dass Ethidium im desensibilisierten Zustand von anderen nicht-kompetitiven Antagonisten verdrängt werden kann, selbst wenn allosterische Mechanismen durch kovalente Vernetzung unterbunden sind. Dies bedeutet, dass Ethidium und die untersuchten NCIs überlappende Bindungsstellen besetzen müssen. Ein weiterer Beweis für den nicht-allosterischen Charakter der Kompetition ergibt sich aus der Beobachtung, dass in allen Kompetitionsexperimenten der Hill-Koeffizient den Betrag eins hatte.

Ethidium bindet selbst dann noch an den nAChR, wenn durch Proteinase K alle Domänen des Rezeptors entfernt wurden, die außerhalb der Membran gelegen sind. Dass die detektierte Ethidiumfluoreszenz auch in diesem Präparat durch den NCI TPMP⁺ kompetiert werden kann, spricht für die Spezifität der Wechselwirkungen mit dem trunkierten Rezeptor. Folglich stellen die Beobachtungen am PnK-verdauten Rezeptor ein weiteres Argument gegen die postulierte extrazelluläre Lage der Ethidium-Bindungsstelle dar. In früheren Arbeiten ist gezeigt worden, dass die Transmembranbereiche des nAChR nach dem Verdaus noch Sekundärstrukturen besitzen (Görne-Tschelnokow *et al.*, 1994) und dass sie spezifische Wechselwirkungen mit dem Lipidannulus eingehen (Dreger *et al.*, 1997). Da die Bindungsstellen für luminale NCIs nicht zerstört werden, ist es wahrscheinlich, dass die detektierten Sekundärstrukturen im PnK-behandelten nAChR im Vergleich zum nativen Rezeptor zumindest im Bereich des Kanallumens nahezu unverändert sind. Zudem ist bewiesen, dass die an der Bindung beteiligten Transmembranbereiche relativ zueinander und relativ zur Membran nicht umorientiert werden.

Verschiedenen Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass TPMP⁺ die Reste α -Ser248, β -Ser254 und δ -Ser262 (Oberthür *et al.*, 1986; Hucho *et al.*, 1986) markiert, Chlorpromazin die Reste α -Ser248, β -Ser254, β -Leu257, γ -Thr253, γ -Ser257, γ -Leu260 und δ -Ser262

(Giraudat *et al.*, 1986; Giraudat *et al.*, 1987; Giraudat *et al.*, 1989; Revah *et al.*, 1990) und Tetracain die Reste α -Ile247, α -Leu251, α -Val255, β -Leu257, β -Leu260, γ -Leu260, δ -Leu265, δ -Ala268 and δ -Val269 (Gallagher & Cohen, 1999). Die meisten dieser Aminosäuren liegen in einem Bereich von Ringen homologer Reste, die ins Kanallumen exponiert sein sollen. Es ist also anzunehmen, dass Ethidium – auch wenn die genaue Lokalisation nicht durch kovalente Modifikation überprüft worden ist – ebenfalls einige dieser Reste kontaktiert. Die Lokalisation von Ethidium in der extrazellulären Domäne des nAChR erfolgte auf der Basis von FRET-Experimenten. Da die Beweglichkeit von Ethidium an seiner Bindungsstelle stark eingeschränkt ist (Herz *et al.*, 1987), mag der Abstand zwischen Ethidium und der Oberfläche der Membran (50 Å) aufgrund einer sehr ungünstigen Ausrichtung der gewählten Fluorophore jedoch stark überschätzt worden sein (Johnson & Nuss, 1994).

Quinacrin ist neben Ethidium ein weiterer hoch-affiner NCI, für den eine nicht-luminale Bindungsstelle postuliert worden ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Quinacrin im vernetzten Rezeptor die Bindung von Ethidium kompetieren kann. Folglich ist es sehr wahrscheinlich, dass auch Quinacrin mit hoher Affinität im Lumen des Ionenkanals bindet und von dieser Stelle aus den Agonist-induzierten Ionenstrom unterbricht. Dieses Resultat steht in Einklang mit Ergebnissen aus Bindungstests mit radioaktiv markiertem Ethidium, in denen eine direkte Konkurrenz der beiden NCIs beobachtet wurde (Lurtz *et al.*, 1997), die jedoch nicht völlig ausschließen konnten, dass die gemeinsame Bindungsstelle außerhalb des Kanallumens anzusiedeln ist. Die auf der Basis dieser Radioligand-Studien bestimmten Affinitäten für die beiden Antagonisten stimmen im übrigen gut mit den hier ermittelten überein. Es wurde zudem nachgewiesen, dass Quinacrin einen hohen Verteilungskoeffizienten in die Lipidphase besitzt; dieser könnte auf die relativ starke Wechselwirkung mit sauren Phospholipiden zurückzuführen sein (Mustonen *et al.*, 1998). Die Fluoreszenz dieses unspezifisch in die Membran inkorporierten Quinacrin ist leicht quencherbar durch geeignete lipophile Reagenzien (Lurtz *et al.*, 1997); es ist daher möglich, dass in den Quenchexperimenten, die schließlich zur Lokalisation der Quinacrinbindungsstelle innerhalb der Lipidgrenzschicht des nAChR führten (Valenzuela *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1993a;b; Johnson *et al.*, 1996), periannulär gebundenes Quinacrin detektiert wurde, während im Kanallumen gebundenes unerfasst blieb.

Quinacrinazid markiert fast ausschließlich die α -Untereinheit im Bereich von M1 (Cox *et al.*, 1985; DiPaola *et al.*, 1990); leider konnte noch keine vernetzte Aminosäure identifiziert werden, so dass unklar ist, an welcher Stelle von M1 die Interaktion mit Quinacrin stattfindet. Da SCAM-Experimente (Akabas & Karlin, 1995) auf einen Beitrag der N-terminalen Hälfte von M1 an der Ionenpermeation hinweisen, ist nicht ausgeschlossen, dass die Wechselwirkung im Bereich des Lumens des nAChR erfolgt. Allerdings beeinflussen bestimmte Punktmutanten im Bereich von M1 (α -Arg209; α -Pro211 und α -Tyr213, nicht aber α -Ile210 und α -Leu212) den Antagonismus von Quinacrin, ohne den von Chlorpromazin zu beeinträchtigen (Tamamizu *et al.*, 1995). Diesen Beobachtungen zufolge sind an der Bindung von Quinacrin und Chlorpromazin zwar eindeutig unterschiedliche Regionen des Vestibüls beteiligt, doch wird durch die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente eine räumliche Nachbarschaft der beiden Bindungsstellen nahegelegt. Das heißt, dass im Bereich der hoch-affinen NCI-Bindungsstellen M1 und M2 in direkten Kontakt zueinander treten und ins Lumen des Ionenkanals exponiert sein sollten.

4.5.2. Modelle zur Lage der Bindungsstelle für hoch affine NCIs

Eine gängige Vorstellung für die Bindung von Kanalblockern geht aufgrund der Markierungsexperimente und der einfachen Stöchiometrie der Bindung davon aus, dass luminale NCIs auf der Pseudo-Symmetrieachse des Ionenkanals gebunden werden und so mit allen M2-Segmenten in Berührung kommen können (Hucho *et al.*, 1986; Abb. 1.4.). Bezieht man jedoch die Fluoreszenzeigenschaften von nAChR-gebundenem Ethidium in diese Überlegungen mit ein, muss ein komplexeres Bild der Bindungsstelle gezeichnet werden. So wird die Emission von Ethidium weder durch D₂O noch durch Iodid effizient gelöscht (Herz & Atherton, 1992); dadurch deutet sich an, dass Ethidium nach Bindung von einem Hohlraum umgeben ist, der diesen hydrophilen Quenchemolekülen nur in geringem Maß Zugang gewährt. Da nAChR-gebundenes Ethidium wesentlich intensiver fluoresziert als wässrig gelöstes und es außerdem zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums zu kleineren Wellenzahlen kommt (Herz *et al.*, 1987), ist anzunehmen, dass das Milieu im Bereich der Bindungsstelle sehr hydrophob ist. Außerdem kommt es nach der Bindung zu einer signifikanten Polarisierung der Fluoreszenz, die eine

starke Immobilisierung des Fluorophors nahelegt. Ähnliche Schlussfolgerungen lassen ESR-Messungen mit einem Spin-markierten Phencyclidinderivat zu, dessen Doxylgruppe durch die Bindung stark in ihrer Beweglichkeit behindert wird und nur eingeschränkt Kontakt zu Quencher-molekülen hat (Palma *et al.*, 1986; Palma & Wang, 1991). Die Fluoreszenz von Ethidium kann im geschlossenen wie im offenen Zustand des nAChR nur sehr eingeschränkt durch Doxyl-markierte freie Fettsäuren, Phospholipide oder Steroide gelöscht werden (Arias *et al.*, 1993; Arias, 1997a; Johnson & Ayres, 1996). Also muss die Bindungsstelle auch gegen die Lipidumgebung abgeschirmt sein. Andererseits kann die Bindung von Ethidium durch permeierende Kationen wie Na^+ , K^+ oder Ca^{2+} kompetiert werden (Herz *et al.*, 1991). Folglich sind an der Interaktion mit dem nAChR unter anderem elektrostatische Wechselwirkungen beteiligt, z.B. zwischen der quartären Aminogruppe und negativ geladenen oder polaren Seitenketten des nAChR.

Sollten luminale NCI's also auf der zentralen Pseudo-Symmetrieachse gebunden werden, so muss es eine physikalische Sperre geben, die den Zugang von z.B. D_2O verhindert. Diese könnte mit der Barriere (*Aktivierungsbarriere*) identisch sein, die den Ionenfluss durch den nAChR im geschlossenen Zustand unterbricht. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sieht man, dass sich der Ionenkanal des nAChR etwa in der Mitte der intrazellulären Monolayer zu seinem engsten Punkt verjüngt (z.B. Unwin, 1993; Abb. 1.2.). Es wurde vorgeschlagen, dass der bereits erwähnte Ring konservierter Leucinreste (αL251 und homologe Reste der übrigen Untereinheiten des Muskel-nAChR) an dieser Stelle eine Art Blende bildet, die im geschlossenen Zustand zu eng für den Durchtritt von Kationen ist, die im Verlauf der Agonist-induzierten Kanalöffnung allerdings geweitet wird (Unwin, 1993; Unwin, 1995). Auerbach & Akk (1998), postulierten auf der Basis von Einzelkanalmessungen an Mausmuskel-nAChR die Existenz einer zweiten Barriere, die den Ionenkanal im Verlauf der Desensibilisierung verschließt (*Desensibilisierungsbarriere*). Sie soll physikalisch mit der Aktivierungsbarriere verbunden sein, da beobachtet wurde, dass offene Rezeptoren wesentlich schneller desensibilisieren als geschlossene. Die Desensibilisierungsbarriere könnte mit einem Abschnitt des Ionenkanals übereinstimmen, der in SCAM-Experimenten weder von extrazellulärer noch von intrazellulärer Seite aus für SH-spezifische Reagenzien zugänglich ist und zwischen den Resten $\alpha\text{-G240}$ und $\alpha\text{-T244}$ liegt (Wilson & Karlin, 1998). Der Abschnitt, der sich zur intrazellulären Seite hin direkt anschließt ($\alpha\text{7-D234}$ bis $\alpha\text{7-E237}$, entsprechend den Resten $^{238}\text{DSGE}^{241}$ in der α -Untereinheit des *Torpedo*-

Rezeptors), könnte den Selektivitätsfilter des nAChR darstellen (Corringer *et al.*, 1999). Tatsächlich markieren alle luminalen NCIs solche Reste, die weiter extrazellulär liegen als α -T244; dies ist eine hinreichende Erklärung für ihre kanalblockierenden Eigenschaften. Man kann sich vorstellen, dass ihre Bindungsstellen, sofern sie im Zentrum des Ionenkanals lokalisiert sind, zumindest teilweise zur extrazellulären Seite hin durch die Aktivierungsbarriere abgeschottet und so vor dem Zugang von Quenchern geschützt sind. Dies bedeutet mit anderen Worten, dass viele NCIs möglicherweise nach der Kanalöffnung tief im Ionenkanal binden und dann durch die mit der Desensibilisierung assoziierten Strukturumlagerungen vom extrazellulären Medium abgeschottet werden.

Alternativ lässt sich ein Modell vorstellen, in dem NCIs mit ihrem aromatischen System an den Kontaktflächen zwischen die Untereinheiten interkalieren, während ihre positiv geladenen Gruppen ins Lumen des Ionenkanals gerichtet sind. Dies bedingt eine einfache Stöchiometrie, denn die Bindung eines zweiten NCI-Moleküls im Kanallumen ist in dieser Stellung aus sterischen und/oder elektrostatischen Gründen ausgeschlossen. Zudem wird die Beeinträchtigung der Affinität von Ethidium durch kovalente Vernetzung des nAChR plausibel, denn die mit der Vernetzung einhergehende Verringerung der Mobilität an den Kontaktflächen könnte sich störend auf die Assoziation des NCIs auswirken. Die Existenz homologer, jedoch nicht-identischer Kontaktflächen könnte die Präferenz der photoinduzierten Inkorporation mancher NCIs in spezifische Untereinheiten bedingen. Tatsächlich zeichnen sich in der Wand des nAChR in elektronenmikroskopischen Aufnahmen mehrere Tunnel und Hohlräume ab (Miyazawa *et al.*, 1999), in denen auch größere Moleküle Platz finden könnten.

In Übereinstimmung mit beiden Modellen ist die Assoziation von Tetracain an den Ruhezustand verzögert, denn die Bindung müsste schrittweise und an eine nicht exponierte Region erfolgen (Gallagher & Cohen, 1999). Hier ist auf eine interessante Arbeit hinzuweisen, in der gezeigt wurde, dass bestimmte geladene NCIs ihre hoch-affine Bindungsstelle auf einem wässrigen Weg erreichen, der nur in Anwesenheit von Agonist zugänglich ist, während für ungeladene und reversibel geladene Derivate zusätzlich ein hydrophober Weg für die Assoziation offen steht, der unabhängig ist vom Öffnungszustand des Kanals (Blanton *et al.*, 1988). Demnach könnten Hohlräume die gesamte Wand des nAChR nicht nur im Bereich der Agonistbindungsstelle sondern auch in der Nähe der Membranoberfläche durchziehen und so die Annäherung allosterischer Liganden dicht an das Zentrum des Ionenkanals ermöglichen.

4.5.3. Die Bindungsstellen für Polyamin-Amide

Struktur-Funktions-Untersuchungen

In Konkurrenzexperimenten mit dem luminalen NCI Ethidium wurden die Bindungseigenschaften verschiedener Philanthotoxinderivate bestimmt. Alle durchgeführten Fluoreszenztitrationen erfolgten am desensibilisierten nAChR; d.h. dass keine Rückschlüsse auf die Affinitäten zum Ruhezustand möglich sind. Zudem ist darauf hinzuweisen, dass – im Gegensatz zu elektrophysiologischen Messungen – der Beitrag des Membranpotentials nicht erfasst werden kann. Dafür erlaubt das verwendete Testsystem wiederum die Unterscheidung zwischen direkten und allosterisch vermittelten Effekten der getesteten Substanzen. Ein Vorteil, der sich aus der Verwendung von Ethidium als Reporter-NCI etwa gegenüber dem zehnmal höher-affinen Histronicotoxin (Nakanishi *et al.*, 1997) ergibt, liegt in der mittelmäßigen Bindungsstärke, die auch die Detektion relativ schwach-affiner Liganden und die Ermittlung apparter Dissoziationskonstanten ermöglicht.

Durch die Variation von Kopf- und Schwanzgruppe des nativen PhTx-343 konnten Strukturmerkmale definiert werden, die die Assoziation mit dem Lumen des nAChR beeinflussen:

Die Ausweitung des hydrophoben Systems im Bereich der Kopfgruppe des PhTx-343, z.B. durch Verlängerung des Buttersäure- zum Dekansäurerest, verursacht eine signifikante Erhöhung der Affinität für den nAChR. Dieser Effekt ist noch eindrucksvoller im Falle der Derivate zu erkennen, bei denen die gesamte Kopfgruppe gegen ein Dihydrocarbamazepin- oder ein erweitertes Porphyrinringsystem ausgetauscht worden war. Gleichzeitig wird deutlich, dass sich durch Erhöhung der Elektronendichte im Ringsystem die Affinität steigern lässt. Durch Einführung einer oder mehrerer positiver Ladungen im Bereich der Kopfgruppe wird die Bindung der Derivate stark behindert oder ganz unterbunden.

Die Verkürzung des Polyaminschwanzes in PhTx-343 um die endständige Butylaminogruppe (PhTx-43) verhindert völlig die Konkurrenz von gebundenem Ethidium; dies könnte darauf begründet sein, dass der Schwanz dieses PhTx-Derivats nicht lang genug ist, um tief im Kanallumen gebundenes Ethidium zu erreichen. Verzweigungen im Bereich des Schwanzes oder auch die Kopplung mehrerer Schwänze, sind mit der Bindung am nAChR ebenfalls nicht vereinbar. Die Verlängerung des Schwanzes (etwa durch ein Alkylamin- oder ein Lysin) ist hingegen nur von einer geringfügigen Absenkung der Affinität der Derivate begleitet.

Die Abstände zwischen den einzelnen positiv geladenen Gruppen im Schwanz sind innerhalb der Gruppe der PhTx-Derivate kaum von Belang, und auch die Zahl der positiven Ladungen scheint nicht ins Gewicht zu fallen. Einzig die terminale Aminogruppe ist essentiell für die Bindung im Kanallumen: So hat PhTx-12 zehnmal höhere Affinität für die Ethidiumbindungsstelle als PhTx-343, obwohl sämtliche internen Amino- durch Methylengruppen ausgetauscht sind. Ähnliches wurde in elektrophysiologischen Messungen mit Derivaten beobachtet, bei denen nur eine interne Ladung deletiert oder beide Stickstoff- durch Sauerstoffatome ersetzt worden waren (Strømgaard *et al.*, 1999). Das sog. Passepartout-Modell, nach dem die Spezifität der Bindung von Polyaminen an Kationen-selektive Ionenkanäle durch die Interaktion mit den Ringen negativer Ladungen im Lumen zustande kommt, kann damit zumindest für den nAChR nicht aufrecht erhalten werden. Interessanterweise zeichnet sich PhTx-12 im Gegensatz zu PhTx-343 durch eine relativ geringe Affinität zum Quisqualatrezeptor (einem GluR) aus; dies macht deutlich, dass durch gezielte Eingriffe in die Struktur der Philanthoxine sowohl Affinität als auch Spezifität erhöht werden können.

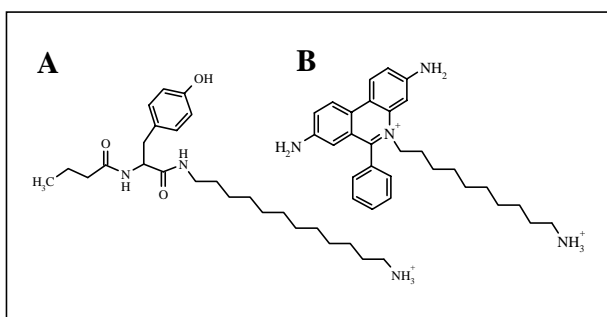


Abb. 4.2: Strukturähnlichkeit zwischen PhTx-12 (A) und Decidium (B).

Am nAChR zeigt sich zudem noch eine kompetitive Komponente der Inhibition durch PhTx-12; offenbar verhindern die internen Aminogruppen also die Assoziation mit der Agonistbindungsstelle. Hier fällt die pharmakologische Verwandtschaft zu Decidium (Abb. 4.2.) ins Auge, einem Analogon von Ethidium, das neben der endocyclischen noch eine zweite, zehn Methylengruppen entfernte quartäre Ammoniumgruppe enthält und ebenfalls neben nicht-kompetitiven kompetitive Eigenschaften besitzt (Johnson *et al.*, 1987).

Alle untersuchten Polymethylentetramine besitzen höhere Affinitäten für die Ethidiumbindungsstelle als die bisher beschriebenen Philanthoxine. Dies ist angesichts der oben aufgestellten Kriterien für eine hoch-affine Bindung an den nAChR überraschend,

sind doch die terminalen hydrophoben Gruppen relativ klein. Da die Affinität nicht auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass Methoctramin an beiden Enden des Polyaminschwanzes derivatisiert ist, muss im Gegensatz zu den Philanthotoxinen der langgestreckte hydrophobe Tetraaminschwanz eine wichtige strukturelle Voraussetzung für die Bindung an den nAChR darstellen. Es ist deshalb vielleicht nicht überraschend, dass die Verlängerung des Schwanzes zu einer 6-12-6-Einheit die nicht-kompetitiven Eigenschaften von Methoctramin verstärkt (Rosini *et al.*, 1999). Aufgrund der unterschiedlichen Anteile von Kopfgruppen bzw. Schwänzen an der Bindung von Philanthotoxinen und Methoctraminen kann man postulieren, dass die beiden Substanzklassen auf etwas unterschiedliche Weise mit dem nAChR wechselwirken.

Elektrophysiologische Messungen offenbarten, dass ein Methoctraminderivat, dem eine Methoxyphenylfunktion entfernt und durch die Kopfgruppe des PhTx-343 ersetzt wurde (Ian Mellor, persönliches Gespräch; data base) ein etwas schwächerer NCI des nAChR als das native Methoctramin darstellt, aber eine deutlich höhere Potenz aufweist als das native PhTx-343. Dies bedeutet, dass die nicht-kompetitiven Eigenschaften des Methoctramins im chimären Molekül deutlich die des PhTx überwiegen.

Die Dissoziationskonstanten der beiden photoaktivierbaren Derivate wurden nach [¹²⁵I]-Markierung auch in direkten Bindungstests bestimmt (Bixel *et al.*, 2000a; 2000b); sie lagen mit 3,7 µM im Falle des PhTx und mit 0,8 µM im Falle von MR44 etwas niedriger als die in Ethidiumkompetitionen ermittelten Werte. Die Diskrepanz kann leicht durch die Vergrößerung des hydrophoben Systems erklärt werden, die mit der Inkorporation der relativ großen Iodreste einhergeht. Dennoch unterstreicht dieses Ergebnis deutlich die Zuverlässigkeit der Affinitätsbestimmung in den Fluoreszenztitrationen. Durch Photoinduktion konnten beide Verbindungen mit allen Untereinheiten des nAChR vernetzt werden. Die Ausbeute der Reaktion schien allerdings weit weniger vom funktionellen Zustand des Rezeptors abzuhängen, als dies bei klassischen kationischen NCIs der Fall ist: Die Zugabe von Carbamoylcholin oder von α-BgTx veränderte die Selektivität und die Intensität des Einbaus nur in geringem Maße.

Die Lage der Bindungsstellen für Polyaminamide

Sowohl Methoctramine als auch Philanthotoxine sind in der Lage, luminal gebundenes Ethidium vom vernetzten nAChR zu verdrängen, so dass allosterische Mechanismen der Kompetition (etwa durch die Besetzung niedrig-affiner Bindungsstellen im Lipidannulus) ausgeschlossen werden können. Es ist daher anzunehmen, dass Polyaminamide wie die klassischen NCIs ins Lumen des Ionenkanals dirigiert werden, wo ihre positiv geladenen Gruppen mit negativ geladenen Seitenketten in Wechselwirkung treten können.

Die sterische Trennung von positiver Ladung und aromatischem System durch den Polymethylschwanz würde theoretisch ermöglichen, dass die Kopfgruppe der Polyaminamide weit entfernt vom relativ engen Kanallumen positioniert wird. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass im trichterförmige Vestibül zwei Moleküle von [¹²⁵I]-markierten Derivaten dieser Verbindungen Platz finden (Bixel *et al.*, 2000a; 2000b), während klassische NCIs mit einer Stöchiometrie von eins zu eins an den nAChR binden.

Es gibt Hinweise darauf, dass PhTx-343 die Membran durchqueren könnte (Huang *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde auf der Basis von Ergebnissen erster Photoaffinitätsmarkierungen (Choi *et al.*, 1995) postuliert, dass die Kopfgruppen von PhTx-Abkömmlingen mit intrazellulären Domänen des nAChR wechselwirken. Die Beobachtung, dass auch sterisch anspruchsvolle Derivate binden können und Ethidium auf der extrazellulären Seite der Pore in nicht-allosterischer Weise verdrängen, schließt diese Möglichkeit jedoch faktisch aus.

Beide photoaktivierbaren Derivate wurden mit dem nAChR vernetzt. Im Falle des MR44 zeichnete sich eine klare Präferenz der Inkorporation in die α -Untereinheit ab (Bixel *et al.*, 2000b), während das PhTx alle Untereinheiten bis auf die γ -Untereinheit etwa gleich stark markierte (Bixel *et al.*, 2000a). Die Bindung des Methoctramins ist demnach offenbar selektiver als die des PhTx. Das Rezeptorsegment, das mit der Kopfgruppe von MR44 wechselwirkt, ist das Peptid α -(161-175). Polyaminamide stellen also in der Tat eine Familie von Substanzen dar, mit deren Hilfe Bereiche des nAChR identifiziert werden können, die ins Vestibül ragen aber nicht direkt im engsten Bereich des Ionenkanals gelegen sind.

Das Rezeptorfragment α -(161-175) liegt zwischen den Loops B und C, die an der Agonistbindung beteiligt sind. Im neuronalen homopentameren α 7-Rezeptor spielt die entsprechende Sequenz α -(161-172) eine wichtige Rolle bei der Potenzierung des Agonist-

induzierten Ionenstroms durch Ca^{2+} (Galzi *et al.*, 1996). Ihre genaue topographische Position ist unbekannt, doch lässt die Kompetitierbarkeit von Ethidium durch MR44 darauf schließen, dass sie vom Lumen des nAChR aus zugänglich ist. Die relativ hohe Dichte negativ geladener Aminosäurereste lässt darauf schließen, dass diese Sequenz den Ionenfluss beschleunigt. Alternativ wurde postuliert, dass $\alpha 7$ -(161-172) als Teil der kompletären Komponente (als sog. D-Loop) an der Agonistbindung beteiligt ist (Galzi *et al.*, 1996). Geht man von einer homologen Faltung der Untereinheiten aus, so ist im heteropentameren nAChR aus *Torpedo* diesem Modell entsprechend der durch MR44 markierte Bereich nicht zur Agonistbindungsstelle hin orientiert, sondern zu den auf der gegenüberliegenden Seite von α positionierten Untereinheiten.

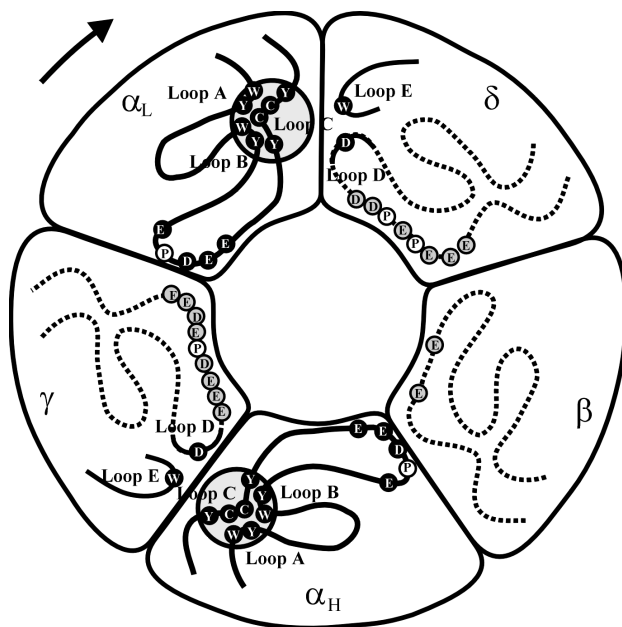


Abb. 4.3. Lage der Bindungsstelle für das Methoctraminderivat MR44 (nach Bixel *et al.*, 2000b). Das Bild zeigt einen Querschnitt durch die extrazelluläre Domäne des nAChR auf Höhe der Agonistbindungsstellen. Das durch MR44 markierte Peptid entspricht dem D-Loop der α -Untereinheit. Im Gegensatz zu Agonisten, die an den Kontaktflächen α/γ und α/δ liegen, dürfte die MR44-Bindung an den gegenüberliegenden Kontaktflächen α_H/β und α_L/γ erfolgen. Die Positionen negativ geladener Seitenketten in homologen Bereichen aller Untereinheiten sind durch Kreise markiert.

In Übereinstimmung mit diesem Bild vermitteln homologe Reste der γ -Untereinheit (γ -Pro175 und γ -Glu176) die hohe Affinität von α -Neurotoxinen. Insbesondere der negativ geladene Rest γ -Glu176 soll mit dem basischen Rest Lys27 sowie in geringerem Maße auch mit den Resten Arg33 und Arg36 eines kurzen α -Neurotoxins wechselwirken (Osaka *et al.*, 1999). Außerdem erreicht ein 9 Å langes bifunktionelles Reagenz, das vom konservierten Disulfid α -Cys192/193 ausgeht, den Rest δ -Asp165 (Czajkowski *et al.*, 1995). Diesen Beobachtungen zufolge wäre die Kopfgruppe von MR44 in einer ähnlichen "Höhle" gebunden wie α -Neurotoxinmoleküle, nur eben nicht an den α/δ - und α/γ -sondern an den benachbarten Kontaktflächen.

Der hydrophobe Kern von gebundenen α -Neurotoxinmolekülen ist nur 17 bis 22 Å von der Bindungsstelle für Tetracain, und damit 25 bis 30 Å vom engsten Punkt des Ionenkanals entfernt (Machold *et al.*, 1995a). Nimmt man an, dass die Kopfgruppen von Methoctraminen in einer ähnlichen Entfernung von der Membranoberfläche gebunden werden, so kann der über 35 Å lange Polymethylenamin-Schwanz von MR44 nach der Bindung nicht in gestreckter Konformation vorliegen, sondern muss ins Vestibül des nAChR zurückfallen. Auch wenn es bisher noch keine Hinweise darauf gibt, dass Polyaminamide in Lösung eine gefaltete Struktur annehmen, kann man spekulieren, dass durch Rückfaltung der Schwanzes eine Schleife gebildet wird, die die Wechselwirkung der terminale Amionogruppe mit dem π -System der Kopfgruppe erlaubt. Die längeren Methoctramine würden demnach größere und flexiblere Schleifen bilden als Philanthotoxine und könnten sich deshalb dem Lumen des nAChR leichter anpassen.

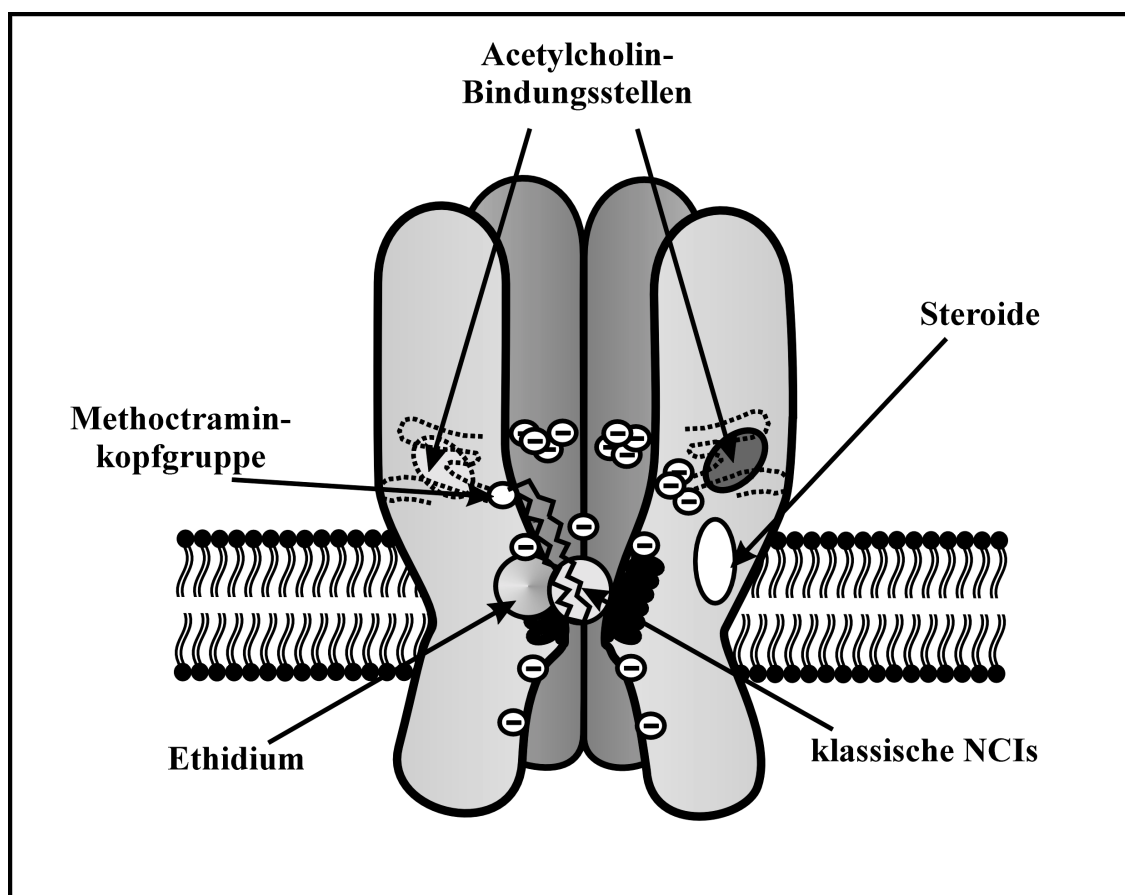


Abb. 4.4: Lage der Bindungsstellen für unterschiedliche Klassen von Liganden auf dem nAChR. Die Agonistbindungsstellen sind 15-20 Å von der Membranoberfläche entfernt. Ethidium und klassische NCI binden im Zentrum des Ionenkanals oder in dessen direkter Nachbarschaft an den Kontaktflächen zwischen benachbarten Untereinheiten. Niedrig-affine NCI und Steroide binden an sog. perianuläre Stellen an der Grenzschicht zur Membran.

Die dargestellten Ergebnisse verdichten sich zu einem Modell (Abb. 4.4.), nach dem alle Liganden des nAChR, die seine Funktion beeinflussen, innerhalb einer *aktiven Zone* mit weniger als 20 Å Entfernung vom Ionenkanal binden (Hucho *et al.*, 1996). Ins Lumen des nAChR sind viele negativ geladene Seitenketten exponiert; daneben gibt es jedoch eine Vielzahl hydrophober Taschen, die Angriffspunkte regulatorischer Liganden sein können.

4.6. Einfluss der Membranfluidität auf die Bindung von α -Neurotoxinen an den nAChR

Die Bindungstests mit [125 I]- α -BgTx resultierten in einem Widerspruch: Obwohl in nativen nAChR-reichen Membranen zwei Bindungsstellen pro Rezeptormonomer vorhanden sind, können nicht alle davon besetzt werden. Es wurde gezeigt, dass durch eine Steigerung der Membranfluidität der Anteil der zugänglichen Bindungsstellen für α -BgTx vergrößert werden kann. Die Fluidität wurde sowohl durch Zugabe von Detergens als auch mit Hilfe der Inkubationstemperatur variiert.

Der Anstieg der detektierbaren Bindungsstellen für α -BgTx in Gegenwart von Triton-X-100 könnte theoretisch darauf beruhen, dass die aus *T. calif.* präparierten nAChR-reichen Vesikel zum Teil mit der Innenseite nach außen (*inside-out*) orientiert sind, und dass im Zuge der Fluidisierung durch Umordnung der Vesikel zusätzliche Bindungsstellen exponiert werden. Der Anteil der *inside-out* orientierten Vesikel wurde in früheren Arbeiten jedoch mit nur 11 % angegeben (Czajkowski *et al.*, 1989) und kann den Anstieg der α -BgTx Bindung um 20 % bis 60 % höchstens teilweise erklären.

Vielmehr scheint die Diskrepanz in der Zahl der detektierbaren Bindungsstellen auf sterischen Behinderungen zu beruhen, die in nativen Membranen zutage treten, jedoch durch Verdünnung der Membran mit Detergens aufgehoben werden können. Doch welcher Art sind diese Behinderungen? Möglicherweise basieren sie auf der extremen Packungsdichte der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran; pro μm^2 finden sich etwa 20000 Rezeptormonomere (Abb. 4.5.). Des weiteren zeigten z.B. Johnson *et al.* (1984) durch Fluoreszenzmessungen, dass der Abstand zwischen zwei α -Cobratoxin (α -CTx)-Molekülen, die an ein und demselben Rezeptormonomer gebunden sind, wesentlich größer ist als der zwischen Toxinmolekülen an benachbarten Rezeptoren. Die Ergebnisse dieser Studie legten außerdem nahe, dass sich die an das Toxin gekoppelten Fluorophore nach der Bindung an der Außenseite der extrazellulären Domäne des nAChR befinden. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, dass in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Streptavidin, das zur Detektion von biotinyliertem α -CTx eingesetzt wurde, an der Außenseite des Rezeptor-Toxin-Komplexes erscheint (Holtzmann *et al.*, 1982). Demnach sollten die Bindungsstellen für α -Neurotoxine also von der Peripherie des nAChR aus zugänglich sein.

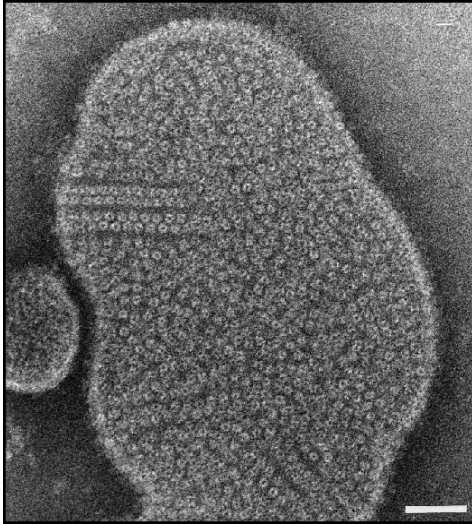


Abb. 4.5: In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man deutlich die extreme Packungsdichte der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (aus Kubalek *et al.*, 1987). Der Balken entspricht einer Länge von 500 Å.

Andererseits wurde ein photoaktivierbares Derivat von NTII mit dem Rest δ -Ala268 vernetzt, der in der extrazellulären Hälfte von M2 liegt (Machold *et al.*, 1995a). Damit ist die Toxinbindungsstelle also auch vom Lumen des Rezeptors aus zugänglich. Da derselbe Rest von Tetracain kontaktiert wird (Gallagher & Cohen, 1999), muss die Bindungsstelle nahe dem Eingang des Ionenkanals lokalisiert sein: Zieht man die Länge des verwendeten Vernetzungsreagenzes in Betracht (16,5 Å), kann der Abstand vom hydrophoben Kern des NTII zur Membranoberfläche nicht mehr als 20 Å bzw. zur luminalen Bindungsstelle für NCIs nicht mehr als 25 Å betragen.

Folglich binden α -Neurotoxine in einer Art Tunnel an den Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten im Pentamer (Hucho *et al.*, 1996), der von zwei Seiten aus zugänglich ist. Bedenkt man jedoch, dass die Maße der α -NTs 35 Å x 25 Å x 15 Å betragen (Bourne *et al.*, 1985; Love & Stroud, 1986; Betzel *et al.*, 1991; Golovanov *et al.*, 1993), die Pore aber im extrazellulären Teil des Rezeptors einen Durchmesser von nur etwa 20-25 Å hat (Unwin, 1993) und sich zum Cytosol hin weiter verjüngt, so ist es sehr unwahrscheinlich, dass α -NTs sich ihren Bindungsstellen durch das Vestibül des Ionenkanals nähern. Vielmehr scheint die Assoziation von der Peripherie des nACh aus zu erfolgen und daher sensitiv für die Packungsdichte der Rezeptoren zu sein: In nativen Membranen wird offenbar durch Bindung jedes Toxinmoleküls der Abstand zum benachbarten Rezeptor-Toxin-Komplex kontinuierlich verringert, und die Assoziation weiterer Moleküle in zunehmendem Maße behindert. Sowohl die Zugabe von Detergens als auch die Erhöhung der Temperatur könnten eine Vergrößerung der Membranoberfläche zufolge haben, die mit einer Absenkung der Packungsdichte einhergeht.

Mit einer Serie von photoaktivierbaren Derivaten von NTII, die an unterschiedlichen Stellen zusätzlich mit einem sterisch anspruchsvollen Biotinrest modifiziert waren, konnte gezeigt werden, dass für bestimmte Derivate in nativen nAChR-reichen Membranen der Zugang zur α/γ -Bindungsstelle, nicht aber der zur α/δ -Bindungsstelle (Sáez-Briones *et al.*, 1999) erschwert war. Dieser Effekt war weniger deutlich bei höheren Temperaturen zu erkennen und verschwand völlig in Anwesenheit von 0,1 % Triton-X-100. Aufgrund der Beobachtungen wurde postuliert, dass die Membran direkt den Prozess der Bindung an α/γ beeinflussen könnte. So kann man sich beispielsweise vorstellen, dass die basischen α -Neurotoxine bei der Annäherung an die α/γ -Bindungsstelle transient mit den Kopfgruppen negativ geladener Lipidspezies im Annulus um den nAChR wechselwirken müssen (Dreger *et al.*, 1997), damit sie in der richtigen Orientierung zwischen die Untereinheiten insertieren zu können, und dass diese Wechselwirkung einerseits durch unmittelbar benachbarte Rezeptormoleküle, andererseits durch die Beweglichkeit der Lipide beeinflusst wird.

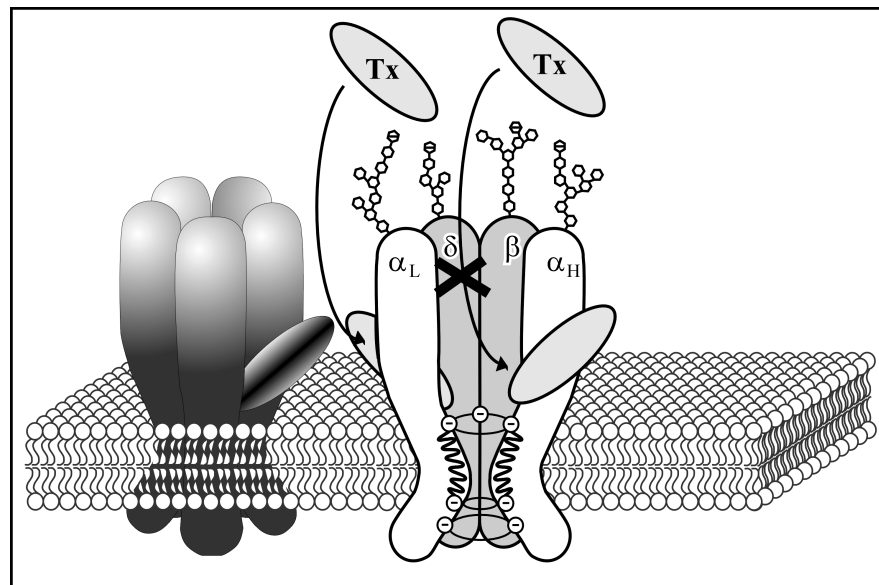


Abb. 4.?: Der Zugang von α -Neurotoxinen an ihre Bindungsstelle. Die Assoziation erfolgt wahrscheinlich nicht durch das Lumen, sondern von der Peripherie der extrazellulären Domäne her. Deshalb kommt es in der nativen Membran zu Behinderungen durch benachbarte Rezeptormonomere.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass im Zuge der chemischen Vernetzung die Affinität von NTII signifikant reduziert wird. Offenbar beeinflusst die Einschränkung der Mobilität an den Kontaktflächen also den Zugang der Toxine. Interessanterweise befinden sich an den Enden der meisten Transmembranbereiche des nAChR stark konservierte

Lysinreste; man kann sich vorstellen, dass der Verknüpfung dieser Seitenketten entweder untereinander und/oder mit Amin-Funktionen in den Kopfgruppen entsprechender Lipide bei diesem Effekt eine besondere Rolle zukommt.

Fluoreszierende α -Cobratoxinderivate sind in der Vergangenheit in FRET-Messungen eingesetzt worden, um den Abstand zwischen Rezeptor-gebundenem Toxin und der Membranoberfläche zu bestimmen (Johnson *et al.*, 1990). Durch einen ähnlichen experimenteller Ansatz könnte man überprüfen, ob α -Neurotoxine tatsächlich transient mit Lipidkopfgruppen wechselwirken: Beobachtet man zeitabhängig die Intensität des Energietransfers zwischen einem fluoreszierenden Toxinderivat und einem Reporterfluorophor in der Membran, so sollte – falls das Toxin in Kontakt mit der Membran kommt – die durch Energietransfer verursachte Fluoreszenzemission im Verlauf der Membranannäherung vorübergehend ansteigen, um dann, während das Toxin mit seiner Bindungsstelle auf dem Rezeptor assoziiert, wieder schwächer zu werden.

In Experimenten, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht vorgestellt wurden, habe ich mehrere Kombinationen von Donor- und Akzeptorfluorophoren auf ihre Brauchbarkeit für ein solches FRET-Experiment hin untersucht. Das in der oben erwähnten Arbeit verwendete Fluorescein-Derivat von α -Cobratoxin erwies sich als ungeeignet, da sich die Fluoreszenzintensitäten in wässriger Lösung von denen nach Bindung an den nAChR unterscheiden; Veränderungen in einem FRET-Experiment wären daher nicht allein auf eine möglich Annäherung an die Membran zurückzuführen, sondern auch auf den Bindungsprozess an sich. Weitere Toxin-gekoppelte Fluorophore waren Tetramethylrhodamin, Cascade Blue, Aminomethylcoumarin und Pacific Blue, die ich in verschiedenen Kombinationen mit den Membran-assoziierten Fluorophoren Octadecylrhodamin, Pyren-Buttersäure und Hexadecanoylfluorescein untersucht habe. In keinem der Fälle gelang die Detektion eines Energietransfers, nachdem das jeweilige Toxin mit dem Rezeptor assoziiert war. Die Versuche wurden daraufhin abgebrochen.

4.7. Einfluss von Cholesterin auf die Bindung von Acetylcholin

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch Einsatz von Methyl- β -cyclodextrin der Cholesteringehalt nAChR-reicher Membranen aus *T. calif.* manipuliert werden kann. Dadurch war es möglich, die Bindung von Acetylcholin in An- bzw. Abwesenheit von

Cholesterin zu analysieren. Es zeigte sich, dass nach Cholesterinentzug die Kooperativität der ACh-Bindung signifikant verstärkt wird; der Hillkoeffizient steigt von 1,45 auf 1,9. Dieser Effekt ist vollständig reversibel, denn nach Einführung von Cholesterin in depletierte Membranen sind die Ausgangsverhältnisse wiederhergestellt. Damit sind Einwände widerlegt, dass im Verlauf des Entzuges irreversible Schädigungen der Proteinstruktur auftreten würden. Außerdem ist gezeigt, dass der Effekt spezifisch auf Cholesterin beruht, und nicht durch zusätzliche Extraktion weiterer Lipidspezies mit Methyl- β -Cyclodextrin zustande kommt.

Dass in Abwesenheit von Cholesterin die Kooperativität der ACh-Bindung steigt, ist überraschend, denn andere Gruppen haben gezeigt, dass mit abnehmender Konzentration von Cholesterin die Wahrscheinlichkeit einer Agonist-induzierten Kanalöffnung sinkt (Rankin *et al.*, 1997). Folglich werden in Abwesenheit von Cholesterin zwar die allosterischen Wechselwirkungen zwischen den Agonistbindungsstellen verstärkt, hingegen ist die allosterische Kopplung mit dem Ionenkanal unterbrochen. Das heißt, dass den beiden allosterischen Interaktionen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, die in konträrer Weise durch Cholesterin moduliert sind.

Es ist angesichts der Hydrophobizität des Moleküls nicht überraschend, dass ein Azido-Derivat von Cholesterin ausschließlich Transmembranbereiche zu markieren vermochte (Corbin *et al.*, 1998). ESR-Studien legen allerdings nahe, dass an der Bindung des Steroids auch extrazelluläre Domänen des nAChR beteiligt sind, denn nach Entfernung der extramembranalen Bestandteile mit Proteinase K sind die Wechselwirkungen mit Cholesterin stark geschwächt, während die Interaktionen mit Phospholipiden weit weniger beeinträchtigt werden (Dreger *et al.*, 1997). Es gilt mittlerweile als gesichert, dass Phospholipide und Cholesterin unterschiedliche Populationen von Bindungsstellen am nAChR besetzen (Jones & McNamee, 1988; Narayanaswami & McNamee, 1993); auch neuere Untersuchungen unterstreichen die Existenz sog. *nicht-annulärer* oder *peri-annulärer* Bindungsstellen für das Steroid (Antollini & Barrantes, 1998). Zudem scheint geklärt, dass es für die Funktionstüchtigkeit des Ionenkanals ausreicht, wenn sich in der extrazelluläre Hälfte der Lipid-Doppelschicht Cholesterin befindet (Addona *et al.*, 1998).

Hier bietet sich die Möglichkeit zu einer interessanten Spekulation: Es ist denkbar, dass niedrig-affine NCIs, darunter einige Steroide wie Hydrocortison (Bouzat & Barrantes, 1996) und Progesteron (Valera *et al.*, 1992; Ke & Lukas, 1996), die an der Protein-Lipid-Grenzschicht binden und allosterisch den Ionenfluss beeinflussen, ihre Wirkung durch Konkurrenz von Cholesterin entfalten. Dieses Bild erklärte erstens die hohen

Konzentrationen an NCI, die für die Inhibition nötig sind, denn Cholesterin liegt in der Membran in großem Überschuss vor, und zweitens die Verstärkung der Kooperativität der ACh-Bindung durch manche NCIs, die in diesem Zusammenhang oft beschrieben wurde. In Übereinstimmung mit diesem Modell wurde gezeigt, dass ungeladene allosterische NCIs des nAChR sich ihren Bindungsstellen über die Lipidphase nähern können (Blanton *et al.*, 1988). Des weiteren scheint Quinacrin, wenn es an seine nicht-luminale Bindungsstellen gebunden ist, auf ähnliche Weise von Phospholipiden in der Membran abgeschirmt zu sein wie Cholesterin (Arias, 1997a).

Aufgrund der dichten Packung verschiedener Rezeptoren in der Membran wurde spekuliert, dass kooperative Wechselwirkungen möglicherweise nicht nur zwischen den Agonistbindungsstellen auf ein und demselben Rezeptormolekül auftreten, sondern auch zwischen benachbarten Rezeptormonomeren vermittelt werden könnten (Duke & Bray, 1999). Neuere elektrophysiologischen Messungen scheinen zu belegen, dass dies offenbar auch für den nAChR zutrifft (Keleshian *et al.*, 2000): Durch Korrelation der Agonist-induzierten Ionenflüsse mit der Zahl der Rezeptoren im Patch konnte gezeigt werden, dass der Öffnungszustand eines Rezeptors die Wahrscheinlichkeit der Öffnung der übrigen nAChR im Patch beeinflusste. Vor diesem Hintergrund ist es auch denkbar, dass Cholesterin in der postsynaptischen Membran neben der intramolekularen auch die postulierte intermolekulare Kooperativität beeinflusst; die Entfernung von Cholesterin würde demnach zu einer Verstärkung dieser Wechselwirkungen führen.