

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu den allosterischen Eigenschaften des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) aus *Torpedo californica* angestellt. Es ist gezeigt worden, dass durch Lysin-spezifische, kovalente Vernetzung mit dem bifunktionellen Reagenz Glutardialdehyd die allosterischen Übergänge im nAChR unterbunden werden können. Damit ist es möglich, die Bindungseigenschaften unterschiedlicher Liganden in definierten Konformationen des nAChR zu bestimmen, ohne das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen allosterischen Zuständen des nAChR zu beeinflussen.

Im ersten Teil wurden durch Konkurrenzexperimente mit Acetylcholin bzw. Neurotoxin II die Affinitäten mehrerer Agonisten und kompetitiven Antagonisten für den nAChR im Ruhezustand bzw. im desensibilisierten Zustand ermittelt. Außerdem wurden verschiedene Klassen von Liganden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Rezeptor in Abwesenheit von Agonist von der ruhenden in die desensibilisierte Konformation zu überführen. Wie erwartet, zeigten Agonisten höhere Affinität für den desensibilisierten nAChR und induzierten den Übergang des Rezeptors in diese Konformation. Im Gegensatz dazu konnte keiner der getesteten Antagonisten den Affinitätszustand des nAChR beeinflussen, obwohl alle bevorzugt an den nAChR im desensibilisierten Zustand banden. Diese Beobachtungen widersprechen eindeutig dem Symmetriemodell, das die Existenz eines präformierten Gleichgewichts zwischen allen allosterischen Zuständen auch in Abwesenheit von Agonist postuliert, und nach dem alle getesteten Substanzen die Desensibilisierung des nAChR auslösen sollten.

Auf der Basis von Energietransfer-Experimenten wurde postuliert, dass die Bindungsstelle für den fluoreszierenden nicht-kompetitiven Inhibitor (NCI) Ethidium außerhalb des Lumens des Ionenkanals liegt. Hier wurde jedoch gezeigt, dass Kanalblocker, deren Bindung im Lumen eindeutig belegt ist, Ethidium auch vom vernetzten nAChR verdrängen können; dies legt die Existenz überlappender, luminaler Bindungsstellen nahe. Mit einem ähnlichen Ansatz wird gezeigt, dass der NCI Quinacrin an einer Stelle in direkter Nachbarschaft zur Ethidium-Bindungsstelle bindet. Diese Beobachtungen helfen, die dreidimensionale Architektur im Lumen des nAChR aufzuklären.

Durch Fluoreszenztitrationen, in denen Ethidium als Reporterfluorophor diente, wurden die Affinitäten verschiedener Polyaminamidderivate für das Vestibül des nAChR bestimmt. Es wurde deutlich, dass die Bindungsstärke von Philanthotoxinen (PhTx) v.a. durch die Kopfgruppe bestimmt wird, während die Affinitäten von Methoctraminen eher von der Länge des Polyaminschwanzes abhängen. Generell scheinen hydrophobe Strukturelemente die Assoziation dieser Derivate mit dem Lumen des nAChR zu fördern. Ein vorläufiges Modell für die Bindung dieser Substanzklasse geht davon aus, dass der positiv geladene Schwanz mit dem negativ geladenen Selektivitätsfilter tief im Lumen des Kanals interagiert, während die hydrophobe Kopfgruppe mit einem weiter extrazellulär gelegenen Teil des Vestibüls wechselwirkt.

Im dritten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Membran auf die Bindung von Agonisten und kompetitiven Peptidantagonisten untersucht. Bindungstests mit [¹²⁵I]α-Bungarotoxin (α-BgTx) führten vor Augen, dass die Bindungskapazität nativer nAChR-reicher Membranen für α-BgTx in starkem Maße durch die Membranfluidität und durch die Packungsdichte der Rezeptoren beeinflusst wird. So führt die Erhöhung der Inkubationstemperatur ebenso zu einem Anstieg der Zahl zugänglicher Bindungsstellen wie die Zugabe eines nicht-denaturierenden Detergens. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass α-Neurotoxine sich ihren Bindungsstellen nicht durch das Lumen des Ionenkanals annähern, sondern von der Peripherie der extrazellulären Domäne her.

Mit Hilfe von Methyl-β-Cyclodextrin wurde der Cholesteringehalt nativer nAChR-reicher Membranen erfolgreich manipuliert. Dadurch war es möglich, den Einfluss von Cholesterin auf die Bindung von Acetylcholin zu untersuchen, ohne auf ein rekonstituiertes System ausweichen zu müssen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Extraktion von Cholesterin aus den Membranen mit einer Verstärkung der Kooperativität der Agonistbindung einhergeht. Diese Beobachtung belegt, dass es regulatorische Bindungsstellen für Steroide an der Grenzfläche zur Membran gibt, die die Funktion des Rezeptors beeinflussen.

5. SUMMARY

This work is focused on the analysis of the allosteric properties of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) from *Torpedo californica*. It has been shown that allosteric transitions can be abolished by covalently cross-linking the nAChR with the lysine-specific bifunctional reagent glutardialdehyde. Thus, it is possible to determine binding properties of various ligands in defined conformations without influencing the equilibrium between the different allosteric states.

In the first part competition experiments were performed to determine the affinities of several agonists and competitive antagonists for the resting as well as for the desensitized state. Furthermore, different classes of ligands were tested for their ability to convert the nAChR from the resting to the desensitized conformation in absence of agonist. As expected, agonists were found to bind with higher affinity to the desensitized nAChR and to induce receptor desensitization. In contrast, none of the tested antagonists was able to affect the affinity state of the nAChR although all of them bound preferentially to the desensitized nAChR. These observations clearly contradict the symmetry model which postulates the existence of a pre-formed equilibrium between all allosteric states in absence of agonist, and according to which all tested substances should trigger receptor desensitization.

Based on energy transfer experiments it was proposed that the binding site for the fluorescent non-competitive inhibitor (NCI) ethidium is located outside of the lumen of the ion channel. However, it is shown here that channel blockers, which have been proven to bind to the channel lumen, can displace ethidium even from the cross-linked nAChR; this indicates the existence of overlapping luminal binding sites. In a similar way it is demonstrated that the NCI quinacrine binds to a site in close proximity to the ethidium locus. These findings help to elucidate the three-dimensional architecture of the lumen of the nAChR.

Using ethidium as a reporter fluorophor, fluorescence titrations were applied to determine the affinities in a series of derivatives of polyamine amides for the vestibule of the nAChR. The experiments revealed that the affinities of philanthotoxins (PhTx) are strongly influenced by their headgroups, whereas the affinities of methoctramines depend predominantly on the length of the polyamine tail. In general, the association of these

derivatives with the lumen of the nAChR seems to be facilitated by the introduction of hydrophobic elements into the compounds' structures. In a preliminary model of the binding sites for this class of compounds the positively charged tails interact with the selectivity filter located deep in the channel lumen, while the hydrophobic headgroups associate with extracellular regions in the vestibule.

The third part of this study focuses on the influence of the surrounding membrane on the binding of agonists and competitive peptide antagonists. Binding assays with [¹²⁵I]α-bungarotoxin (α-BgTx) binding assays show that the binding capacity of native nAChR-rich membranes for α-BgTx is strongly influenced by the fluidity of the membrane and by the packing density of the receptor monomers: More binding sites for α-bungarotoxin are accessible when the temperature is increased or when the membrane is diluted with a non-denaturing detergent. These results indicate, that α-neurotoxins approach their binding sites from the membrane-facing periphery of the receptor's extracellular domain rather than through the channel mouth.

Using methyl-β-cyclodextrin the cholesterol content of native nAChR-rich membranes was manipulated successfully. Thus, it was possible to determine the influence of cholesterol on the binding of acetylcholine without reconstituting the nAChR into a defined lipid environment. It is shown that the extraction of cholesterol out of the membranes increases the cooperativity of agonist binding. This observation demonstrates that regulatory binding sites for steroids exist at the protein-lipid interface, which influence receptor function.