

Neuronenmodelle

Von Bernd Hamprecht^[*]

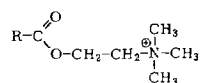
Professor Feodor Lynen zum 65. Geburtstag gewidmet

Das Nervensystem besteht aus mehreren Zellarten, die bei biochemischen Studien möglichst gesondert untersucht werden sollten. Da man bislang diese Zellarten noch nicht zu isolieren versteht, benutzt man beliebig wie Bakterien vermehrbare, von jeweils einer Einzelzelle abgeleitete Zell-Linien, die aus Tumoren des Nervensystems isoliert wurden. Zu diesen gehören aus einem Mäuseneuroblastom isolierte Zell-Linien, die manche Eigenschaften von Nervenzellen besitzen. Hybridzellen, die durch Fusion von Mäuseneuroblastoma- mit Rattengliomazellen erhalten wurden, zeigen in verstärktem Maße Charakteristika von Nervenzellen. Es werden Eigenschaften vorgestellt, die es rechtfertigen, die Hybridzellen als Neuronenmodelle zu betrachten. Sodann wird die Anwendung der Zellen auf Probleme des Nervensystems demonstriert: 1. Verarbeitung von Informationen, die in Form einander entgegengesetzter hormoneller Signale eintreffen; 2. Wirkungsweise des Morphins.

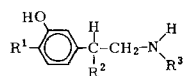
1. Einleitung

Das Gehirn ist eine komplexe, aus verschiedenen Zelltypen bestehende Struktur. Läßt man die Zellen des Blutgefäßsy-

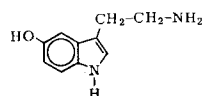
Tabelle 1. Neurotransmitter und Neurotransmitter-Kandidaten (NT) sowie einige Analoga (An).



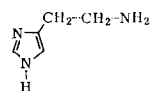
- (1a), R = CH₃, Acetylcholin (NT)
(1b), R = NH₂, Carbamoylcholin (An)



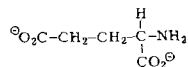
- (2a), R¹ = OH, R² = R³ = H, Dopamin (NT)
(2b), R¹ = R² = OH, R³ = H, Noradrenalin (NT)
(2c), R¹ = R² = OH, R³ = CH(CH₃)₂, Isoproterenol (An)
(2d), R¹ = H, R² = OH, R³ = CH₃, Phenylephrin (An)



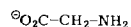
- (3), Serotonin (NT)



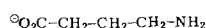
- (4), Histamin (NT)



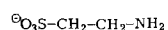
- (5), Glutamat (NT)



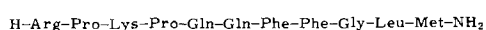
- (6), Glycin (NT)



- (7), γ-Aminobutyrat (NT)



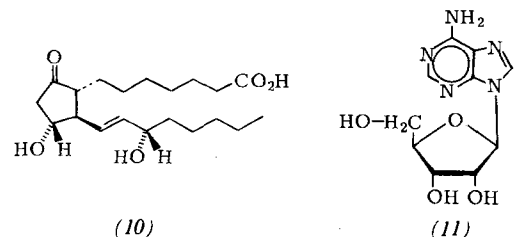
- (8), Taurin (NT)



- (9), Substanz P (NT)

stems unberücksichtigt, dann sind die wichtigsten Zellen die Neuronen (Nervenzellen) und die Gliazellen. Sie machen je etwa 50 % der Zellmasse des Gehirns aus.

Die Neuronen sind durch Schaltstellen miteinander verknüpft, die man als Synapsen bezeichnet und die eine im Elektronenmikroskop sichtbare hochspezialisierte und charakteristische Struktur besitzen (Abb. 1). An den Synapsen wird Information von einer (praesynaptischen) Nervenzelle auf eine andere (postsynaptische) Nervenzelle übertragen. Die Membranen der prae- und postsynaptischen Zellen sind durch den synaptischen Spalt getrennt. Die Information wird mit Hilfe eines kleinen Moleküls (Neurotransmitter) übertragen, das aus der praesynaptischen Zelle in den synaptischen Spalt austritt, wenn die praesynaptische Zelle erregt wird. Der Neurotransmitter diffundiert von der praesynaptischen Membran durch den synaptischen Spalt zur Membran der postsynaptischen Zielzelle. Dort wird er von hochspezifischen Rezeptoren gebunden und löst dadurch elektrische Signale in der Zielzelle aus oder unterdrückt Signale, die durch andere Neurotransmitter in anderen Synapsen auf derselben Zelle hervorgerufen werden. Neben den experimentell erwiesenen und den potentiellen Neurotransmittern [Acetylcholin (1a), Dopamin (2a), Noradrenalin (2b), Serotonin (3), Histamin (4), Glutamat (5), Glycin (6), γ-Aminobutyrat (7), Taurin (8), das Undecapeptid „Substanz P“ (9); siehe Tabelle 1] kennt man auch Substanzen, die wahrscheinlich als Modulatoren neuronaler Aktivität wirken [Prostaglandine wie Prostaglandin E₁ (10), Adenosin (11)]. Alle diese Stoffe werden zusammenfassend als Neurohormone bezeichnet.



Die Neuronen kann man nach vielen Gesichtspunkten in Klassen einteilen. Nach der Morphologie unterscheidet man in der Kleinhirnrinde fünf Arten. Sie sind auf äußerst präzise und konstante Weise im Raum angeordnet und miteinander über Synapsen verschaltet^[1].

Eine weitere Möglichkeit ist, sie nach der Art des Neurotransmitters zu ordnen, den sie synthetisieren und zur Infor-

[*] Dr. B. Hamprecht
Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Lynen
Am Klopferspitz 1, 8033 Martinsried

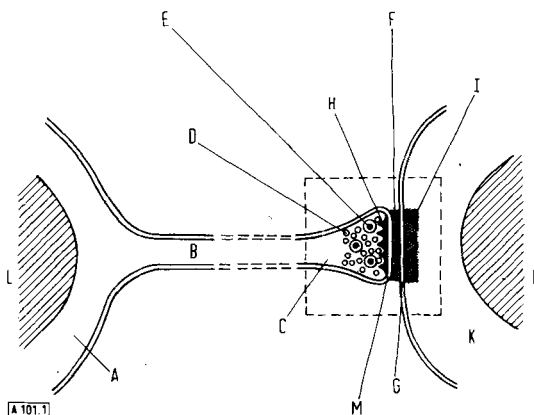


Abb. 1. Prinzipische Skizze einer Synapse zwischen zwei Nervenzellen. Die linke präsynaptische Nervenzelle (A) streckt einen Zellfortsatz (B) (Nervenfortsatz oder Axon genannt) aus, dessen Ende kolbenförmig verdickt ist (C). Die Nervenendigung enthält u. a. große Mengen von Bläschen (Vesikel), die einen Neurotransmitter speichern. Im Falle des Neurotransmitters Acetylcholin haben die Bläschen einen Durchmesser von 500 Å, im Falle des Noradrenalins einen von 2000 Å. Wegen der Elektronendurchlässigkeit in den für die Elektronenmikroskopie präparierten Proben werden die kleinen, Acetylcholin speichernden Bläschen als „klare“ Vesikel (D) bezeichnet. Entsprechend nennt man die großen Noradrenalin speichernden Bläschen wegen ihres dunklen Kerns „dense-core“-Vesikel (E). Die Nervenendigung ist durch den 250 Å breiten synaptischen Spalt (F) von der postsynaptischen Membran (G) getrennt. Im synaptischen Spalt befinden sich Proteine, die prä- und postsynaptische Zellen sehr fest aneinander kiten. Im Elektronenmikroskop erkennt man außerdem prä- und postsynaptische Spezialisierungen (H bzw. I), deren Funktionen unbekannt sind. Der Bereich der Synapse ist durch ein gestricheltes Viereck begrenzt. Man beachte, daß die Größenverhältnisse in der Skizze nicht den wirklichen entsprechen. Das Nervenende ist im Verhältnis zu den beiden Zellen, die Bläschen sind im Verhältnis zum Nervenende und der Spalt ist im Verhältnis zu den Bläschen zu groß gezeichnet. – K = postsynaptische Zelle, L = Zellkern, M = präsynaptische Membran.

mationsübertragung benutzen, also nach dem „output“. Entsprechend spricht man von cholinergen, dopaminergen, adrenergen usw. Neuronen. Man könnte sie auch nach den Neurotransmittern und Neurohormonen einteilen, auf die sie ansprechen, also nach dem „input“. Es gibt vermutlich 20 oder mehr Neurotransmitter, Neurotransmitter-„Kandidaten“ und andere hormonähnliche Faktoren^[2]. Wechselnde Kombinationen von Rezeptoren für diese Substanzen an der Oberfläche der Neuronen könnten zu einer großen Zahl verschiedener Zelltypen führen. Es ist nicht bekannt, ob es Mindest- und Höchstwerte für die Zahl der Neurohormone gibt, auf die eine Nervenzelle ansprechen, d. h. für die sie Rezeptoren an der Oberfläche besitzen kann.

Die Gliazellen werden im wesentlichen in zwei Klassen eingeteilt, die Astrocyten und die Oligodendrocyten. Letztere umhüllen die von den Neuronen ausgesandten Nervenfasern (Axons) ähnlich wie eine Kabelisolierung ein Kabel umgibt. Über die Funktion der Astrocyten ist hingegen wenig bekannt.

Will man Biochemie des Nervensystems betreiben, so kann man dies an Gewebeschnitten oder -homogenaten tun. Man erhält dann aber über alle Zellen gemittelte Durchschnittswerte und muß berücksichtigen, daß äußere Einflüsse Ketten von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellen auslösen können oder daß Bestandteile, die vorher auf verschiedene Zellen verteilt waren, im Homogenat in einem Kompartiment vorliegen. Beobachtete Effekte lassen sich also nur mit Mühe einem bestimmten Zelltyp zuordnen. Wie der Chemiker mit reinen Substanzen arbeiten möchte, so wünscht sich der Biochemiker reine Enzyme und „reine Zellen“. Er möchte jede Zellsorte isoliert untersuchen und dann durch schrittweise Kombination verschiedener Zelltypen allmählich die ursprünglichen komplexen Strukturen rekonstruieren oder neue schaffen und studieren. Bei solchen Arbeiten werden

Methoden aus den Bereichen der Biochemie, Zellbiologie, Pharmakologie, Elektrophysiologie und Immunologie hilfreich sein.

Aus Gehirnhomogenaten kann man Fraktionen abgeschnürter Nervenendigungen, sogenannte Synaptosomen, abzentrifugieren^[3]. Diese eignen sich besonders nach weiterer Fraktionierung gut für manche biochemische Untersuchungen.

Man kann, um die Eigenschaften einzelner Zelltypen kennenzulernen, Gehirne durch Enzyme und mechanische Kräfte in Einzelzellen zerlegen („dissoziieren“) und diese mit Zentrifugationsverfahren trennen^[4, 5]. Die geringe Lebensfähigkeit und Reinheit der Fraktionen angereicherter Neuronen oder Gliazellen begrenzt ihre Verwendung und die Aussagefähigkeit der gewonnenen Ergebnisse.

Suspensionen dissoziierter Gehirn- oder Rückenmarkszellen heften sich an den Boden einer Petrischale^[6]. Ein Teil der Zellen vermehrt sich. Durch Wahl der Bedingungen der Zellkultur kann man entscheiden, ob vorwiegend Neuronen oder Gliazellen überleben sollen. Vermutlich sind auch solche Kulturen Gemische verschiedener Zelltypen. In gemischten Kulturen von Zellen aus Nerven- und Muskelgewebe gelang es, Synapsen zwischen Neuronen und Muskelzellen herzustellen^[7–12].

Werden Suspensionen dissoziierter embryonaler Gehirnzellen in Erlenmeyer-Kölbchen mit bestimmter Geschwindigkeit einige Tage lang geschwenkt, dann reaggregieren die Zellen und bilden Strukturen, die denen des ursprünglichen Gewebes ähneln^[13–17]. Während dieses Prozesses treten Funktionen des Nervensystems auf, die den embryonalen Zellen noch fehlen^[15, 17].

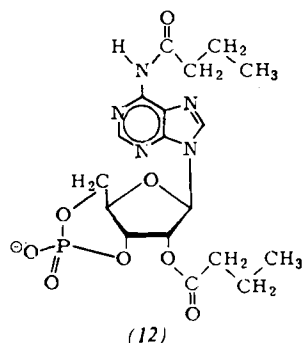
2. Neuroblastomazellen

Ein anderer Weg zu „reinen Zellen“ ist die Isolierung und Klonierung (Vermehrung der Nachkommen einer Einzelzelle) von Zellen aus Tumoren des Nervensystems. Diese Zellen können wie Mikroorganismen in großen Mengen gezüchtet werden. Im allgemeinen werden sie als Rasen auf dem Boden eines Plastik-Kulturgefäßes gezogen, das teilweise mit Wachstumsmedium gefüllt ist. Gabriella Augusti-Tocco gelang es im Labor von Gordon Sato zum erstenmal, Neuroblastomazellen an Kulturbedingungen zu adaptieren und nachzuweisen, daß sie differenzierte Funktionen des Nervensystems besitzen^[18]. Das Neuroblastom war ein spontaner Tumor, der in einer neugeborenen Maus in der Nähe der Wirbelsäule gefunden wurde. Er ist seit über 30 Jahren als Transplantationstumor weitergezüchtet worden. Mehrere Laboratorien bestätigten diese Arbeiten und bauten sie weiter aus^[19–22]. Heute werden auch Neuroblastomazellen aus Mensch^[23] und Ratten^[24] studiert. Die Eigenschaften von Neuroblastomazellen sind in einigen Übersichtsartikeln^[6, 11, 25–27] zusammengefaßt worden, sodaß wir uns hier auf die Erwähnung einiger besonders charakteristischer Funktionen beschränken können.

2.1. Zellfortsätze

Neuroblastomazellen bilden Zellfortsätze, die Nervenfasern ähneln^[18–20, 28–33]. Die Zellen senden sie aus unter Bedingungen, die für die Zellvermehrung ungünstig sind, wie Entzug des Serums aus dem Wachstumsmedium^[28, 34, 35]. Zusatz von Brom^[36, 37] oder Fluordesoxyuridin^[19], 6-Thioguanin^[38], Cytosinarabinosid^[34] oder Dimethylsulfoxid^[39], Erzeugung

eines hypertonischen Mediums^[40] und Röntgenbestrahlung^[31]. Die Bildung solcher Fortsätze wurde auch beobachtet in Gegenwart von Nervenwachstumsfaktor^[41, 42] oder eines



von Gliazellen produzierten Faktors^[43], von Prostaglandin E_1 (10)^[33], Dibutyryl-cyclo-AMP (12)^[29, 30] [*] und Inhibitoren der cyclo-AMP-Phosphodiesterase, z. B. Papaverin^[32].

2.2. Erregbarkeit der Membranen

Als weitere für Nervenzellen charakteristische Funktion können Neuroblastomazellen erregbare Membranen besitzen. Erregungen können elektrisch^[44, 45] oder chemisch^[46–48] ausgelöst werden. Im ersten Fall wird mit einer in die Zelle eingeführten Mikroelektrode ein Stromstoß durch die Plasmamembran geschickt (Abb. 2). Der Strom ist so gerichtet, daß das gegenüber dem Medium negativ geladenen Zellinnere auf weniger negative Spannungswerte depolarisiert wird. Dadurch wird eine sich über die Zelloberfläche ausbreitende Erregung der Membran, d. h. ein Aktionspotential, ausgelöst. Bei der chemischen Erregung wird das an den Schaltstellen zwischen motorischen Nerven und Muskeln als Überträgerstoff wirken-

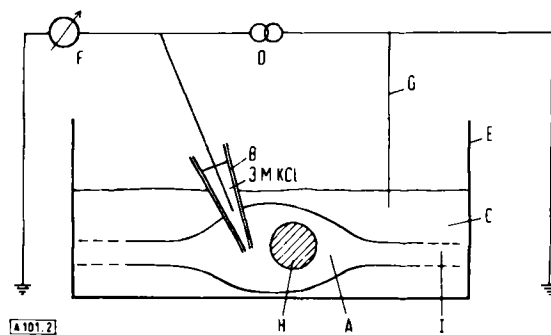


Abb. 2. Prinzip der elektrophysiologischen Untersuchung einer Einzelzelle in Kultur. Die Zelle (A) (Durchmesser 0.01 bis 0.1 mm) wird mit einer Mikroelektrode (B) angestochen. Die Elektrode ist eine mit 3 M KCl gefüllte konische Glaskapillare, deren Spitzendurchmesser unter 1 μ m liegt. Die zwischen dem Zellinneren und dem auf Erdpotential liegenden Wachstumsmedium (C) herrschende Spannung wird Membranruhepotential genannt. Im allgemeinen liegt es bei ca. –50 mV. Mit einer äußeren Spannungsquelle (D) kann dieses Potential künstlich auf Werte verändert werden, bei denen sich innerhalb von wenigen ms die Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen dramatisch ändert (Aktionspotential). Zelle und Mikroelektrode sind im Verhältnis zur Kulturschale (E) viel zu groß dargestellt. – F = Voltmeter (Oszilloskop), G = Bezugselektrode, H = Zellkern, I = Zellfortsatz (Axon).

de Acetylcholin aus Mikropipetten durch kurze Stromstöße iontophoretisch auf die Zelloberfläche dosiert.

2.3. Rezeptoren für Neurohormone

Neurotransmitter können nur dann ein Aktionspotential auslösen, wenn die Zielzellen an ihrer Oberfläche Rezeptoren für sie besitzen. Durch Bindung an diese Rezeptoren können Neurotransmitter und andere Neurohormone sowie Morphin noch andere Wirkungen auslösen: sie können die Enzyme Adenylat-^[49, 50] oder Guanylatcyclase aktivieren und damit eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cyclo-AMP^[51–55] oder cyclo-GMP^[56–60] (Abb. 3) bewirken. Die cyclischen Nucleotide wirken wahrscheinlich als intrazelluläre

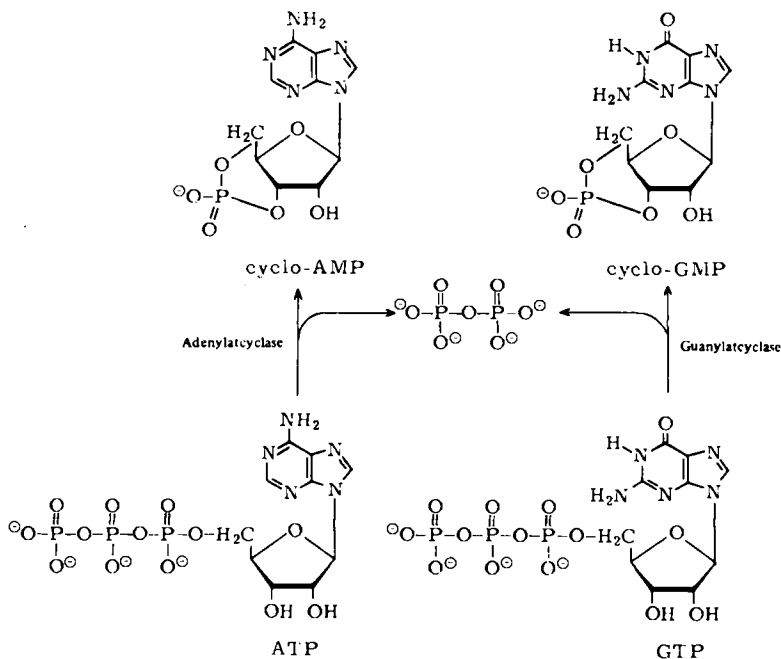


Abb. 3. Bildung von cyclo-AMP aus ATP durch das Enzym Adenylatcyclase und Bildung von cyclo-GMP aus GTP durch Guanylatcyclase.

[*] Abkürzungen: cyclo-AMP: cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat; cyclo-GMP: cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat; Dibutyryl-cyclo-AMP: cyclisches N^6, O^2 -Dibutyryl-Adenosin-3',5'-monophosphat.

Vermittler (second messengers) extrazellulärer Hormone^[61]. Überzeugend ist dies aber bisher nur für cyclo-AMP gezeigt worden^[62].

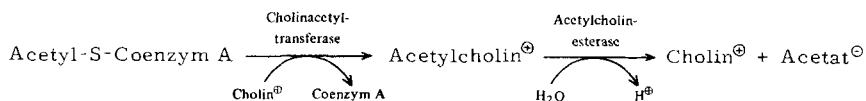
Um Rezeptoren für Neurotransmitter (und andere Hormone) nachzuweisen, kann man auch die spezifische Bindung radioaktiv markierter Neurotransmitter, deren Analoga oder kompetitiver Hemmstoffe (Antagonisten) an die Plasmamembran messen. Wegen ihrer hohen Bindungskonstanten (die durch eine niedrige Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation bedingt ist) werden meist Antagonisten für solche Studien bevorzugt. Das aus Schlangengift isolierte Polypeptid α -Bungarotoxin ist ein solcher Gegenspieler des Acetylcholins. Bisher ist es jedoch erst einem Laboratorium gelungen, α -Bungarotoxin an Neuroblastomazellen zu binden^[63].

2.4. Transportsysteme für Neurotransmitter und deren Vorläufer

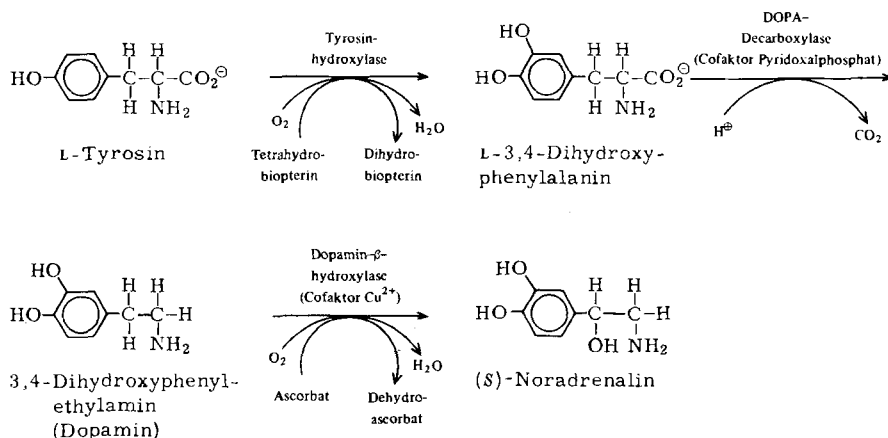
Neurotransmitter, die von der praesynaptischen Nervenzelle ausgeschüttet wurden, um die Plasmamembran der postsynaptischen Zelle zu reizen, müssen danach rasch aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Andernfalls würden sie sich dort ansammeln, und die Übertragung neuer Information durch Neurotransmitter würde unmöglich. Die Beseitigung erfolgt auf zwei Weisen. Im ersten Fall wird der Neurotransmitter im synaptischen Spalt durch membrangebundene Enzyme verändert, z. B. gespalten. Das beste Beispiel ist die Inaktivierung des Acetylcholins (1a) durch Hydrolyse in Gegenwart des Enzyms Acetylcholinesterase. Das gebildete Cholin wird wahrscheinlich von den umgebenden Zellen (Neuronen, Glia) aufgenommen, die Hauptmenge vermutlich von der praesynaptischen Zelle, die das Acetylcholin ausgeschieden hatte. Im zweiten Fall geschieht die Beseitigung allein durch Wiederaufnahme. Dies gilt z. B. für Noradrenalin (2b), Serotonin (3) und Histamin (4). Man kann also das Vorhandensein von Transportsystemen für Cholin oder Noradrenalin zu den „differenzierten Eigenschaften“ von Zellen des Nervensystems zählen. Auch Neuroblastomazellen besitzen solche Transportsysteme für Cholin^[64, 65], Dopamin (2a) und Noradrenalin^[66, 67], γ -Aminobutyrat (7)^[68, 69], Glycin (6)^[27, 70] und Taurin (8)^[70].

2.5. Enzyme, die Neurotransmitter synthetisieren

Wie Nervenzellen besitzen Neuroblastomazellen nicht nur die Fähigkeit, auf Neurotransmitter anzusprechen, sondern



Schema 1. Biosynthese und Spaltung von Acetylcholin.



Schema 2. Biosynthese von Dopamin und Noradrenalin.

selbst solche Informationsträger zu synthetisieren. Sie können das Enzym Cholinacetyltransferase [EC 2.3.1.6] enthalten^[18, 22, 24, 71–75], das die Biosynthese des Acetylcholins katalysiert (Schema 1). Andere besitzen die Enzyme Tyrosinhydroxylase [EC 1.14.3.a]^[18, 22, 74, 76, 77] und Dopamin- β -hydroxylase [EC 1.14.2.1]^[78–80], die an der Synthese des in den Zellen gefundenen Dopamins und Noradrenalins^[81–83] beteiligt sind (Schema 2).

3. (Neuroblastoma \times Glioma)-Hybridzellen

3.1. Herstellung der Hybride

Die Bildung vielkerniger Zellen durch Fusion von Einzelzellen war schon im letzten Jahrhundert bekannt. 1960 beobachteten Barski et al.^[84], daß Zellen verschiedener Mäusestämme in Kultur spontan fusionieren und Hybridzellen bilden, deren Kern Chromosomen beider Elternzellen enthält. Harris und Watkins^[85] machten sich die Beobachtung Okadas^[86, 87] zunutze, daß Sendai-Virus, ein Parainfluenza-Virus, Zellen mit hoher Ausbeute zu vielkernigen Riesenzellen verschmilzt. Sie hatten die Kühnheit, mit dieser Methode Zellen verschiedener Spezies wie Mensch und Maus zu vereinigen. Die entstehenden mehrkernigen Zellen werden Heterokaryonten genannt. Gelegentlich teilen sich solche Zellen und bilden dabei eine für die Chromosomen aller Kerne gemeinsame Teilungsspindel. Die entstehenden Tochterzellen enthalten dann nur einen Kern mit den Chromosomen beider Elternzellen und werden daher als Hybridzellen bezeichnet (Abb. 4). Verwendet man zu solcher Hybridisierung zwei Zell-Linien, die an verschiedenen für Enzyme codierenden Genorten mutiert sind^[88], so komplementieren sie sich im Hybrid zum Wildtyp^[88]. Man muß jetzt

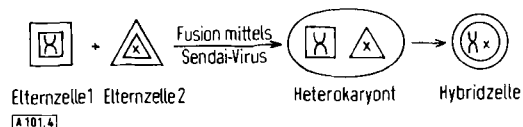


Abb. 4. Schema der Zellhybridisierung. Die Verschiedenheit der Elternzell-Linien ist durch unterschiedliche Formen symbolisiert. Die kleinen Quadrate, Dreiecke und Kreise stellen die Zellkerne dar. Die X-förmigen Gebilde deuten zwei verschiedene Chromosomenarten an.

nur noch gegen die Mutanten und für den Wildtyp selektionieren, um eine wildtyp-artige Population von Hybridzellen zu erhalten. Durch Klonierung dieser Hybridzellen gelangt man zu einigermaßen homogenen Zell-Linien.

Die Fusion einer Mäuseneuroblastoma-Linie (N4TG3 oder N18TG2^[89-92]) mit einer aus Rattengliatumor abgeleiteten Glioma-Linie (C6-BU-1) ergab Hybridzellen, die überraschenderweise hohe Cholinacetyltransferase-Aktivität besaßen. In den Elternzellen war diese Aktivität sehr gering oder fehlte.

Insbesondere die (N18TG2 × C6-BU-1)-Hybridklone 108CC5 und 108CC15 besitzen Eigenschaften von Neuronen. Von diesen soll zunächst die Rede sein um zu zeigen, daß sie als Modelle für Nervenzellen angesehen werden können. Sodann soll an zwei Beispielen demonstriert werden, wie sich mit solchen Zellen Probleme modellhaft studieren lassen, die anders nur schwer zu untersuchen sind.

3.2. Neurotransmitter-Enzyme

Die Aktivität der Cholinacetyltransferase ist regulierbar. Sie hängt stark von der Zelldichte in der Kultur ab und kann durch Züchten der Zellen in Gegenwart von Dibutyryl-cyclo-AMP (12) auf Werte gesteigert werden, wie man sie auch in Gehirnhomogenaten mißt^[91, 92]. Die Hybridzellen können aus Tyrosin weder Dopamin (2a) noch Noradrenalin

(2b) synthetisieren, da ihnen die Tyrosinhydroxylase, das erste Enzym dieses Stoffwechselweges, fehlt (siehe Schema 2). Das dritte Enzym dieses Weges, die Dopamin-β-hydroxylase, ist allerdings vorhanden^[80].

3.3. Differenzierung der Hybridzellen

Werden die (Neuroblastoma × Glioma)-Hybridlinien 108CC5 oder 108CC15 einem Wachstumsmedium ausgesetzt, das 1 mM an Dibutyryl-cyclo-AMP (12) ist, dann nimmt ihre Vermehrungsgeschwindigkeit stark ab, und sie beginnen zu differenzieren^[80, 91-93].

Die vorher meist runden Zellen (Abb. 5A) senden in ein bis zwei Wochen lange Fortsätze aus (Abb. 5 B-D). Wie die Axons normaler Nervenzellen enthalten diese Fortsätze faserige Strukturen, nämlich 100 Å lange Filamente und Bündel von Microtubuli sowie „klare“ und „dense-core“-Vesikel (Abb. 1) von 500 bis 700 bzw. 2000 bis 3000 Å Durchmesser^[93]. Die klaren Vesikel gleichen den Acetylcholin-Speichervesikeln cholinergner Nervenendigungen. Es ist ungeklärt, ob sie im Falle der Hybride das in den Zellen gebildete Acetylcholin enthalten. Die „dense-core“-Vesikel ähneln denen adrenerger Nervenzellen des sympathetischen Nervensystems. Dort enthalten sie u. a. Noradrenalin, die Energiespeichersubstanz Adenosintriphosphat und die im Schema 2 erwähnte Dopamin-β-

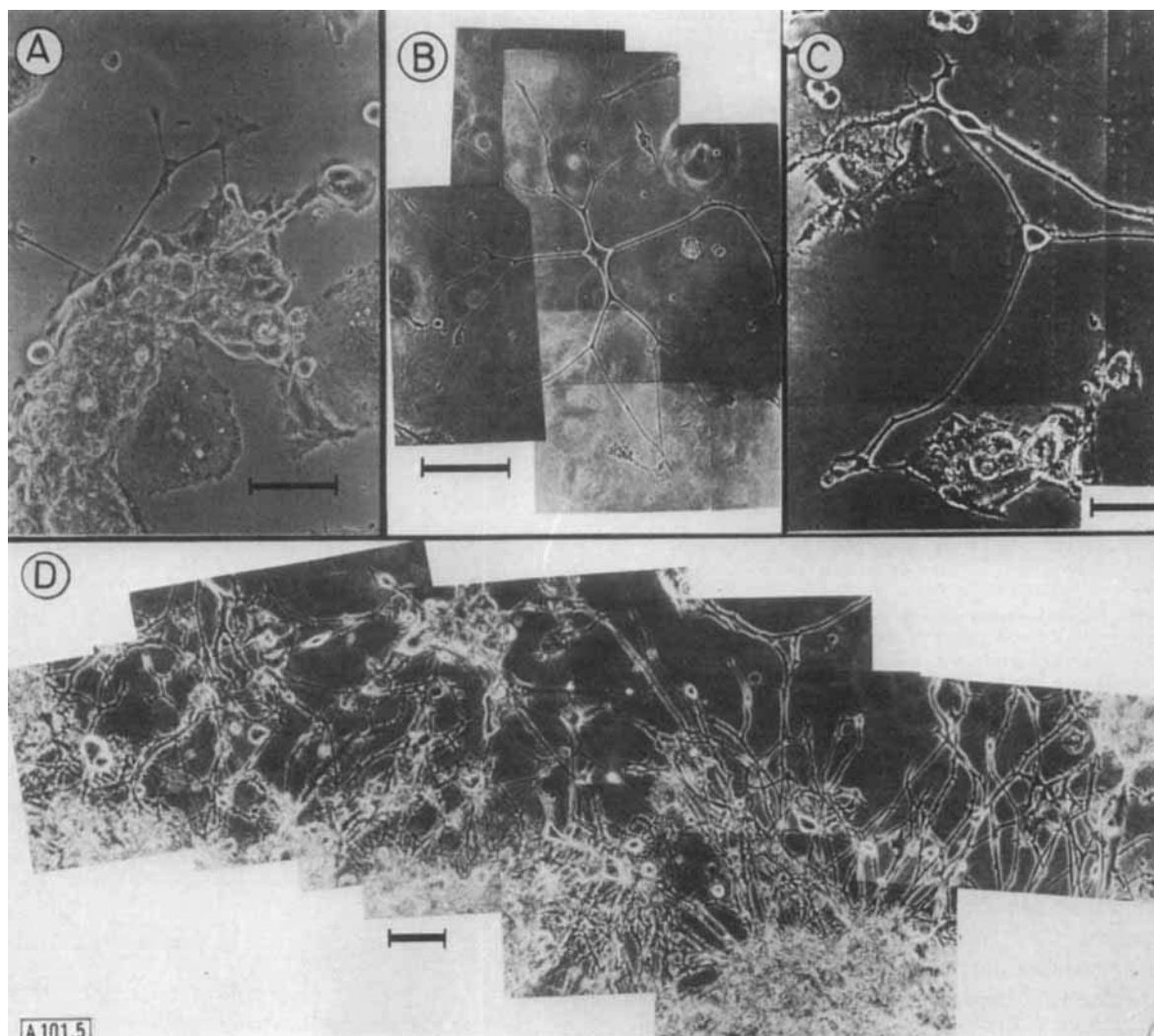


Abb. 5. A: Normal sich vermehrende (undifferenzierte) (Neuroblastoma × Glioma)-Hybridzellen 108CC5. Bilder B bis D: Durch Behandlung mit Dibutyryl-cyclo-AMP differenzierte Hybridzellen. Die Bilder A, C [91] und D [92] stammen aus früheren Publikationen. Maßstab: 100 µm

hydroxylase. Wir vermuten, daß auch bei den Hybriden dieses Enzym in den „dense-core“-Vesikeln lokalisiert ist. Noradrenalin können die Vesikel der Hybridzellen nicht enthalten, da ihnen das erste Enzym der im Schema 2 wiedergegebenen Synthesekette fehlt (siehe Abschnitt 2.5).

3.4. Elektrische Erregbarkeit und Kationen

Läßt man mit einer intrazellulär plazierten Mikroelektrode einen depolarisierenden Stromstoß durch die Plasmamembran einer differenzierten Hybridzelle fließen (Abb. 2), so feuert die Zelle ein Aktionspotential, das mit Hilfe derselben Elektrode registriert wird (Abb. 6)^[91]. Im allgemeinen rührt die ansteigende Phase des Aktionspotentials von einem passiven Einstrom von Na^+ -Ionen in die Zelle her, die abfallende Phase von einem passiven Ausstrom von K^+ -Ionen^[94]. Der Einstrom von Na^+ -Ionen in die Hybridzellen läßt sich durch Tetrodotoxin, das Gift des japanischen Kugelfisches, hemmen^[95]. Erhöht man aber die Ca^{2+} -Konzentration im Medium, so beobachtet man dramatische Veränderungen der elektrischen Eigenschaften^[91, 95]:

1. Tetrodotoxin hemmt das Aktionspotential nicht mehr.
2. Zellen mit zuvor schwach ausgeprägtem Aktionspotential (Abb. 7 A, C) haben nun ein wohl ausgeprägtes (Abb. 7 D) und reagieren oft auf einen einzigen depolarisierenden Reizimpuls mit hunderten von Aktionspotentialen (Abb. 7 D).
3. Die Reizschwelle für die Auslösung eines Aktionspotentials durch einen Stromstoß oder durch Acetylcholin ist stark erniedrigt.
4. Die hyperpolarisierenden Nachpotentiale der Zellen (Abb. 7 B, D), die auf den abfallenden Ast des Aktionspotentials folgen, werden enorm vergrößert.

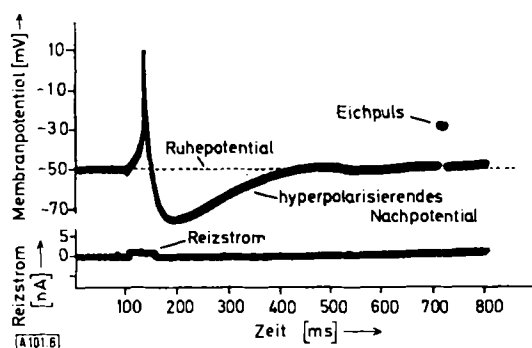


Abb. 6. Oszilloskopaufnahmen eines Aktionspotentials, ausgelöst durch depolarisierenden Reizstrom durch die Plasmamembran einer Hybridzelle 108CC5. Obere Spur: Membranpotential. Ein Eichpuls von 20 mV und 20 ms Dauer erscheint nach dem Aktionspotential. Untere Spur: Depolarisierender Strom 1 nA und 50 ms^[91].

Die Unempfindlichkeit des Aktionspotentials gegenüber Tetrodotoxin deutete an, daß bei erhöhter Ca^{2+} -Konzentration der Einwärtsstrom kein Na^+ , sondern ein Ca^{2+} -Strom sein mußte. Diese Vermutung war richtig, denn Aktionspotentiale konnten auch in Abwesenheit von Na^+ erhalten werden, sofern genügend Ca^{2+} vorhanden war. Ferner ließen sich diese Aktionspotentiale durch die Ca^{2+} -Antagonisten Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} und La^{3+} sowie durch organische Inhibitoren des Ca^{2+} -Einstromes hemmen^[95]. Die Wirksamkeit und Spezifität dieser Substanzen war an anderen Systemen mit $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Aktionspotentialen erwiesen worden.

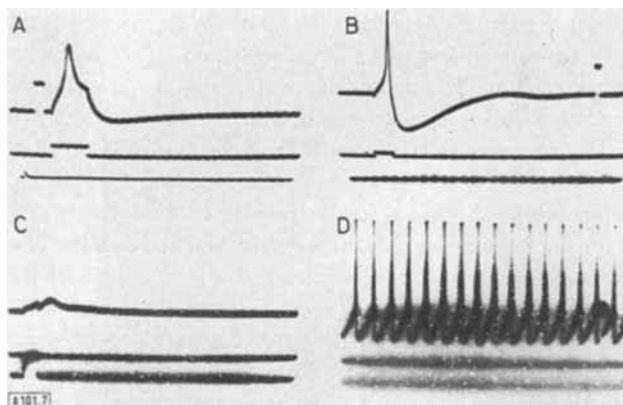


Abb. 7. Wirkung der Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im äußeren Medium auf das Aktionspotential der Hybridzellen 108CC15 (A, B) und 108CC5 (C, D). Oszilloskopaufnahmen A und C vor, B und D nach Zugabe von 10 µl (B) oder 20 µl (D) 0.5 M CaCl_2 zum Medium oberhalb der untersuchten Zelle. Bild D: Ein einziger Acetylcholin-Puls löste eine Serie von über 200 Aktionspotentialen aus, von der ein Ausschnitt gezeigt wird^[91].

3.5. Elektrische Erregbarkeit und Rezeptoren

Wird Acetylcholin iontophoretisch auf die Oberfläche differenzierter Hybridzellen dosiert, so werden Aktionspotentiale ausgelöst^[91]. Diese wandern über die Oberfläche der gesamten Zelle. Die Wirkung des Acetylcholins kann durch Atropin oder D-Tubocurarin reversibel und durch α -Bungarotoxin irreversibel gehemmt werden^[91]. Wie bei Skelettmuskelfasern verursachen hohe Dosen von Acetylcholin auch bei den Hybriden vorübergehende Unempfindlichkeit gegenüber weiterem Acetylcholin^[91].

Auch Noradrenalin und Morphin^[57] sowie Dopamin^[96, 97] depolarisieren (Abb. 2) die Hybridzellen und lösen Aktionspotentiale aus, wogegen Prostaglandin E_1 das Membranpotential erhöht (hyperpolarisiert)^[57].

3.6. Neurohormone und cyclische Nucleotide

Wie die cyclischen Nucleotide kommen Prostaglandine in allen tierischen Geweben vor, also auch im Nervensystem. Sie werden enzymatisch aus Dihomo- γ -linolensäure oder aus Arachidonsäure gebildet. Sie scheinen ihre Wirkung lokal zu

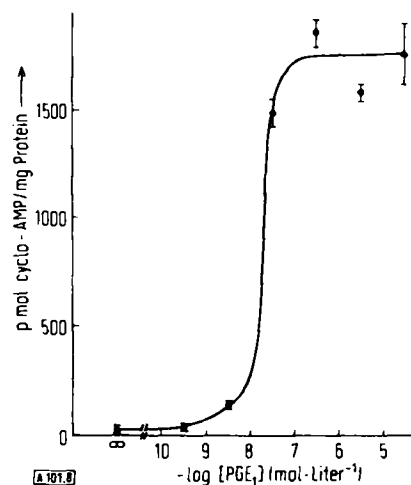


Abb. 8. Abhängigkeit der intrazellulären Konzentration von cyclo-AMP von der PGE_1 -Konzentration im Medium. Replica-Plastikschalen mit Hybridzellen 108CC15 wurden 10 min bei 37°C mit steigenden Konzentrationen PGE_1 inkubiert und anschließend auf ihren cyclo-AMP-Gehalt analysiert^[103].

entfalten, also in der Nähe der erzeugenden Zelle. Entsprechend den Funktionen der verschiedenen Organe beeinflussen sie eine Fülle von Prozessen im Organismus^[98-101]. Ein gemeinsamer Nenner der diversen Prostaglandin-Wirkungen könnte die Änderung intrazellulärer Spiegel cyclischer Nucleotide sein. Prostaglandin E₁ (10) erhöht die intrazelluläre Konzentration von cyclo-AMP in den Hybridzellen in 10 min auf das 50- bis 100fache^[102-105]. Abbildung 8 zeigt, daß der halbmaximale Effekt bei einer Konzentration von 20 nM PGE₁ eintritt^[103].

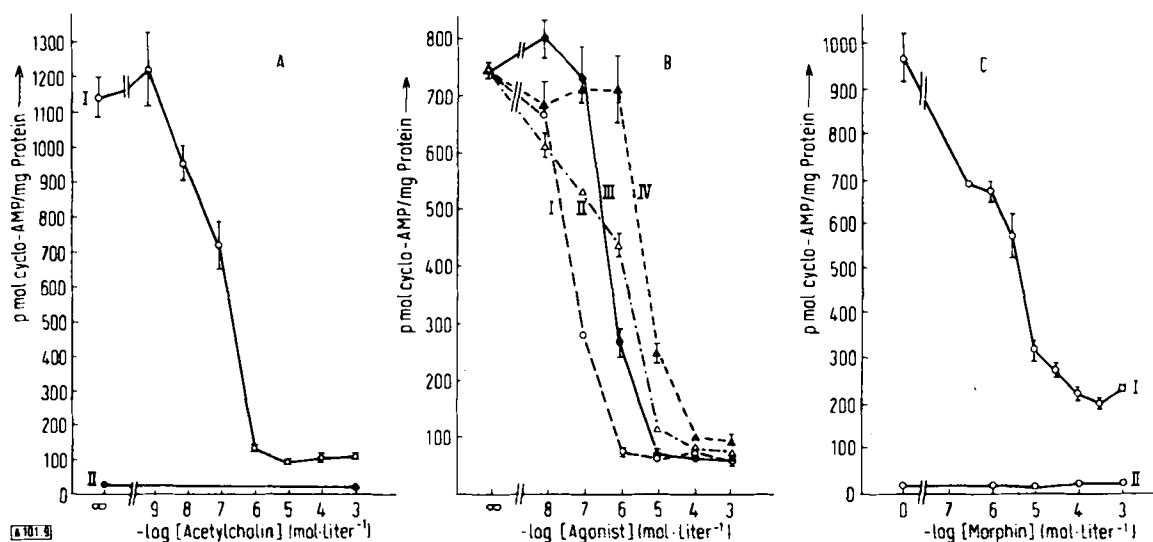


Abb. 9. Hemmung des in Hybridzellen 108CC15 durch 3 µM PGE₁ verursachten Anstiegs des cyclo-AMP-Spiegels mit Acetylcholin (A) [56], adrenergen Agonisten (B) [57] und Morphin (C) [104]. – A, Kurve I: Gegenwart von PGE₁, Kurve II: Abwesenheit von PGE₁. – B: Alle Versuche in Gegenwart von PGE₁, Kurve I: Noradrenalin (2b); II: Phenylephrin (2d), III: Dopamin (2a), IV: Isoproterenol (2c). – C, Kurve I: Gegenwart von PGE₁, Kurve II: Abwesenheit von PGE₁.

Werden die Zellen mit maximal stimulierender Konzentration von PGE₁ und steigenden Konzentrationen von Acetylcholin^[56] (Abb. 9A) oder adrenergen Neurotransmittern (Agonisten) wie Noradrenalin^[57] (Abb. 9B) oder mit Morphin (13)^[104] (Abb. 9C) inkubiert, so unterbleibt der Anstieg des cyclo-AMP-Spiegels zum größten Teil. Die Wirkung des Acetylcholins (Abb. 9A) ist durch Atropin, nicht aber durch D-Tubocurarin hemmbar, was auf einen muscarinischen, nicht aber nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor der Hybridzellen weist^[56]. Die Tatsache, daß Noradrenalin (2b) bei viel niedrigerer Konzentration wirkt als Isoproterenol (2c), läßt auf die Gegenwart eines adrenergen α-, nicht aber β-Rezeptors

Fällen wird der Anstieg des cyclo-AMP-Spiegels durch Acetylcholin^[56], Noradrenalin^[57] oder Morphin verhindert. Daraus kann man schließen, daß alle drei Substanzen den cyclo-AMP-Spiegel durch Verringerung der Synthesegeschwindigkeit senken. In Übereinstimmung damit ergeben Messungen der Adenylatcyclase-Aktivität an Homogenaten der Hybridzellen, daß Morphin die Erhöhung dieser Aktivität durch PGE₁ verhindert^[110].

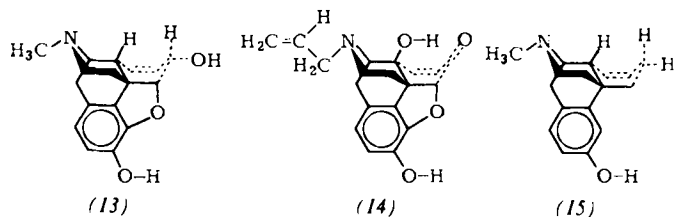
Diese Ausführungen lassen zwei Probleme erkennen, zu deren Lösung sich die Hybridzellen eignen:

1. Die Verarbeitung von Informationen, die in Form entgegengesetzter hormoneller Signale auf einer Zelle eintreffen.
2. Der Mechanismus der Opiatwirkung.

Wir wollen uns beiden Fragen in dieser Reihenfolge zuwenden.

3.7. Biochemische Verarbeitung hormongetragener Informationen

Die physiologischen Wirkungen von Hormonen, die den zellulären cyclo-AMP-Spiegel erhöhen, sind denen entgegengesetzt, die von Hormonen verursacht werden, welche den cyclo-GMP-Spiegel erhöhen^[111]. Einem Vorschlag von S. Cha folgend, stellten N. D. Goldberg et al. diesen Dualismus in Analogie zu den miteinander in Widerstreit liegenden alten chinesischen Prinzipien Yin und Yang^[112, 113]. Unsere mit diesen Vorstellungen übereinstimmende Vermutung bestätigte sich, daß die Senkung des cyclo-AMP-Spiegels durch Acetylcholin, Noradrenalin, Morphin und ihre Analoga von einem Anstieg



schließen. Ergebnisse von Versuchen mit spezifischen Antagonisten des Noradrenalins stützen diesen Schluß^[57]. Auch die Morphinwirkung ist durch einen spezifischen Inhibitor, Naloxon (14), hemmbar^[104]. Jeder Hemmstoff unterbindet nur die Wirkung des zugehörigen Agonisten. So interferiert Naloxon z. B. nicht mit der Wirkung von Acetylcholin oder Noradrenalin^[103]. Daraus und aus anderen Untersuchungen^[106] schließen wir, daß alle Rezeptoren der Hybridzellen verschiede-

des cyclo-GMP-Spiegels begleitet sein sollte^[58, 59, 114]. Überraschenderweise ist die Erhöhung des cyclo-GMP-Spiegels nur von sehr kurzer Dauer. So wird das Maximum des cyclo-GMP-Spiegels in Gegenwart von Carbamoylcholin (1b), einem synthetischen Acetylcholin-Analogen, bereits nach 1 min erreicht. Nach ca. 10 min können die Werte wieder auf den Ausgangspegel zurückgefallen sein^[58]. Ähnliche Beobachtungen wurden für Noradrenalin und Morphin gemacht^[59]. In allen Fällen zeigten die Konzentrationen von cyclo-AMP und cyclo-GMP entgegengesetzten Verlauf. Sank der Spiegel des ersteren unter seinen Ausgangswert, so stieg der des letzteren über seinen Ausgangswert und umgekehrt.

Wie sieht der molekulare Mechanismus dieser gegenläufigen Regulation aus? Auf welcher Ebene findet sie statt? Abbildung 10 enthält drei Hypothesen. Andere Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Betrachtungen^[115–117]. Zwischen den dargestellten Möglichkeiten müssen weitere Versuche mit den Hybridzellen entscheiden.

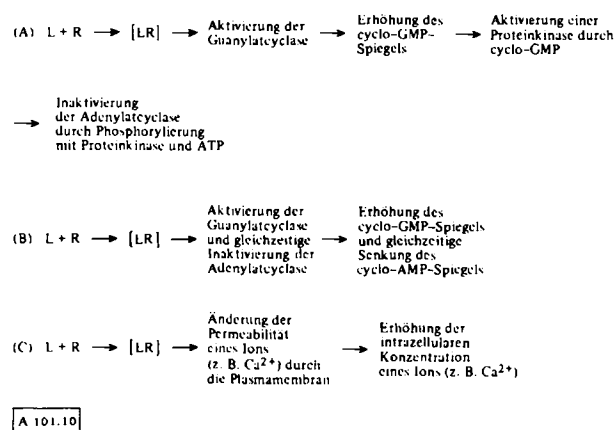


Abb. 10. Drei Hypothesen zur Aktivierung der Guanylatcyclase-Aktivität und Hemmung der Adenylatcyclase-Aktivität nach Bindung der Liganden L (Acetylcholin, Noradrenalin oder Morphin) an ihre Rezeptoren R.

Es fällt auf, daß Acetylcholin, Noradrenalin und Morphin, die den cyclo-GMP-Spiegel erhöhen, depolarisierend auf die Membran der Hybridzellen wirken, während PGE₁, das den cyclo-AMP-Spiegel erhöht, hyperpolarisierend wirkt^[57]. Ähnliche Beziehungen zwischen PGE₁ und Noradrenalin wurden an braunen Fettzellen gefunden^[118]. Diese Parallelitäten lassen vermuten, daß Depolarisation der Zellmembran und Aktivierung der Guanylatcyclase sowie Hyperpolarisation und Aktivierung der Adenylatcyclase jeweils Gruppen von Ereignissen sind, die entweder kausal verknüpft sind oder eine gemeinsame Ursache besitzen.

Wichtig erscheint ferner, daß die den cyclo-GMP-Spiegel erhöhenden Substanzen Acetylcholin, Noradrenalin und Morphin in den Hybridzellen die Wirkung der den cyclo-AMP-Spiegel erhöhenden Verbindungen PGE₁ und Adenosin ausschalten können, d. h. dominieren. Die Entscheidung darüber, welche der drei in Abbildung 10 dargestellten Hypothesen zutrifft, dürfte auch einen Hinweis auf den Mechanismus der Dominanz des Guanylatcyclase-Systems über das Adenylatcyclase-System bringen.

3.8. Studien zur Morphinwirkung

3.8.1. Akute Morphinwirkung

Die durch PGE₁ hervorgerufene Kontraktion der glatten Muskulatur des Dünndarms wird durch Morphin verhin-

dert^[119–121]. Da PGE₁ den cyclo-AMP-Spiegel in Neuroblastoma^[51, 52] und Hybridzellen^[102] erhöht, lag es nahe zu prüfen, ob Morphin auch in diesem System die Wirkung des PGE₁ unterdrücken würde. In der Tat verhindert Morphin bei intakten Neuroblastoma^[104, 106, 122] und (Neuroblastoma × Glioma)-Hybridzellen^[106] (Abb. 9C) den durch PGE₁ hervorgerufenen Anstieg des cyclo-AMP-Spiegels und hemmt in Homogenaten von Hybridzellen^[110] oder Rattengehirnen^[123] die Stimulation der Adenylatcyclase durch PGE₁. Die Gegenwart von Morphinrezeptoren wurde nicht nur mit diesen indirekten Methoden, sondern auch direkt durch stereospezifische Bindung von radioaktivem Dihydromorphin an intakte Neuroblastoma- und Hybridzellen festgestellt^[105].

Die nächste Frage ist: Sprechen *alle* Zellen, die in Gegenwart von PGE₁ ihren cyclo-AMP-Spiegel erhöhen, auf Morphin an? Rattengliomazellen und (Rattenglioma × Mäusefibroblast)-Hybride werden durch PGE₁ zur Bildung von cyclo-AMP angeregt^[102]. In keinem Fall hemmt Morphin diesen Vorgang^[106]. Die Versuche zeigen, daß die Rezeptoren für PGE₁ und Morphin unabhängig voneinander auftreten und die gestellte Frage damit negativ zu beantworten ist. Da die Hemmung der PGE₁-Wirkung durch Morphin nichtkompetitiv ist^[102], d. h. da PGE₁ und Morphin nicht um denselben Bindungsort konkurrieren, können PGE₁- und Morphin-Rezeptoren nicht identisch sein. Die Wirkung des Morphins ist unabhängig von der des PGE₁. Gleichgültig, welches Agens zur Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels eingesetzt wird, Morphin verhindert diesen Effekt^[108], sofern Morphin-Rezeptoren vorhanden sind.

Der hemmende Einfluß der Opiate auf die Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels durch PGE₁ in Neuroblastoma- und Hybridzellen ist stereospezifisch. Levorphanol (15), das sich im Tierversuch wie Morphin verhält, wirkt auch im Zellsystem wie Morphin, während Dextrorphan, das im Tier unwirksame Enantiomer des Levorphanols, auch das Zellsystem nicht beeinflusst^[57, 110]. Naloxon (14) ist ein Antagonist des Morphins, der bei Morphin-Vergiftungen angewendet wird, selbst aber keine Opiatwirkung besitzt, obwohl seine Struktur das

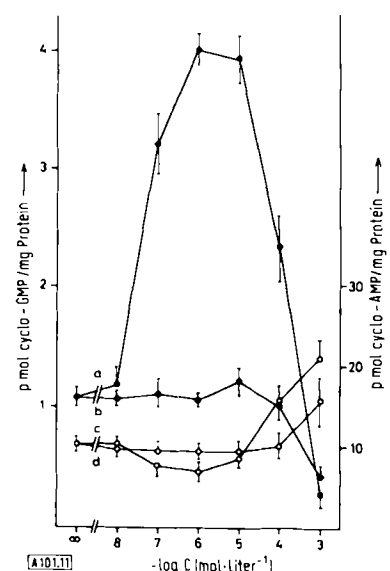


Abb. 11. Einfluß der Konzentration von Levorphanol und Dextrorphan auf die Spiegel von cyclo-GMP und cyclo-AMP in Hybridzellen. Die Zellen wurden 10 min mit Levorphanol (Kurven a und c) oder Dextrorphan (Kurven b und d) inkubiert. Kurven a und b: cyclo-GMP, Kurven c und d: cyclo-AMP [114].

Morphinan-Gerüst enthält. Auch im Zellkultursystem verhindert Naloxon die Wirkung des Morphins^[104, 105]. Wie in Abschnitt 3.6 erwähnt, geht mit der Senkung des cyclo-AMP-Spiegels ein Anstieg des cyclo-GMP-Spiegels einher^[114]. Die Opiate wirken stereospezifisch nicht nur, wenn sie den cyclo-AMP-Spiegel senken, sondern auch wenn sie den cyclo-GMP-Spiegel erhöhen: Levorphanol (15), nicht aber Dextrorphan, wirkt wie Morphin (Abb. 11, Kurven a und b). Der Effekt des Levorphanols ist maximal im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µM (Abb. 11, Kurve a). Bei höheren Konzentrationen wird geringere Erhöhung und schließlich starke Senkung des cyclo-GMP-Spiegels beobachtet. Der Senkung des cyclo-GMP-Spiegels entspricht eine Steigerung des cyclo-AMP-Spiegels (Abb. 11, Kurve c). Die mögliche Bedeutung des cyclo-GMP für die Regulation des cyclo-AMP-Spiegels wurde im Abschnitt 3.7 diskutiert.

Die Neuroblastomazellen und – wegen ihrer höheren Empfindlichkeit gegen Morphin und Neurohormone^[56, 104, 110] – vor allem die Hybridzellen, sind also hilfreiche Modelle zum Studium der Biochemie der Morphinwirkung. Bekanntlich ist die Analgesie die medizinisch wichtige akute Wirkung des Morphins. Man kann aufgrund der Studien am Modellsystem annehmen, daß eine Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels in den für die Schmerzregistrierung wichtigen Neuronen der Empfindung „Schmerz“ entspricht, eine Senkung des cyclo-AMP-Spiegels also mit Schmerzlinderung oder gar starkem Wohlbefinden korreliert ist.

Ähnlich wie die Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin verhindert Morphin den durch PGE₁ hervorgerufenen Anstieg des cyclo-AMP-Spiegels und erhöht den cyclo-GMP-Spiegel. Ist Morphin also ein Neurotransmitter? Da Morphin nicht im tierischen Körper gebildet wird, ist die Frage zu verneinen. Morphin könnte aber einen endogenen Neurotransmitter nachahmen. In der Tat ist dies inzwischen von mehreren Arbeitskreisen gezeigt worden. Das „endogene Morphin“ (Endorphin, Enkephalin) ist ein kleines Peptid^[1] der relativen Molekülmasse 1000 bis 2000^[124–130]. Auch im Hybridzellensystem zeigt partiell gereinigtes Endorphin morphinähnliche Wirkung^[131]. Außerdem gibt es Hinweise dafür, daß die Hybridzellen einen Faktor oder Faktoren produzieren, die sich ähnlich wie Morphin verhalten^[132]. Eine Analogie in der Wirkung von Noradrenalin und Morphin findet man auch am intakten Tier. In das Gehirn von Ratten injiziertes Noradrenalin wirkt wie Morphin analgetisch^[133]. Der Morphin-Antagonist Naloxon verhindert den Effekt des Noradrenalins nicht. Das läßt vermuten, daß Noradrenalin nicht indirekt durch Auslösung der Freisetzung von Endorphin wirkt.

3.8.2. Chronische Morphinwirkung, Morphin-Toleranz, -Abhängigkeit und -Entzug

Bei langdauernder Einwirkung von Morphin auf Hybridzellkulturen werden Phänomene beobachtet, die als biochemische Korrelate von Morphin-Toleranz, -Abhängigkeit und -Entzug zu werten sind^[134, 135]. Nach mindestens 15stündiger Vorinkubation von Hybridzellen mit Morphin wird bei anschließender Hauptinkubation (10 min) mit PGE₁ (in Abwesenheit von Morphin) ein etwa doppelt so hoher cyclo-AMP-Spiegel er-

reicht wie vor der Vorinkubation mit Morphin (Abb. 12, Kurve a)^[134].

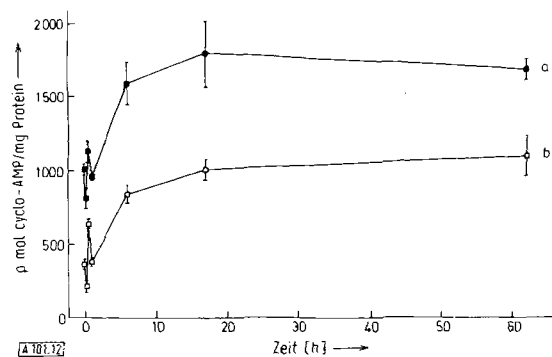


Abb. 12. Zeitlicher Verlauf der Entwicklung des erhöhten Ansprechens auf PGE₁ während der Vorbehandlung der Hybridzellen mit 10 µM Morphin. Nach den durch die Meßpunkte angegebenen Vorinkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen und anschließend 10 min bei 37°C mit 3 µM PGE₁ (Kurve a) oder 3 µM PGE₁ + 100 µM Morphin (Kurve b) inkubiert, bevor der Gehalt der Zellen an cyclo-AMP gemessen wurde^[134].

fehlt hingegen das Morphin während der Vorinkubation, so ändert sich die Reaktion der Zellen auf PGE₁ nicht. Nach allen Zeiten der Vorinkubation mit Morphin (zwischen 0 und 62 h) ist der Effekt des PGE₁ auf den cyclo-AMP-Spiegel stets durch Morphin hemmbar (Abb. 12, Kurve b).

Wir betrachten nun die Hybridzelle als Modell einer morphinempfindlichen Zelle im Gehirn. Nehmen wir an, daß der cyclo-AMP-Spiegel, der durch den ersten Meßpunkt von Kurve a (Abb. 12) angegeben wird, dem Normalbefinden eines Menschen oder Tieres entspricht, und daß der erste Meßpunkt von Kurve b (Abb. 12) besonderem Wohlbefinden nach Morphingenuß entspricht. Dann kann man annehmen, daß eine Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels einer Verringerung des Wohlbefindens bis hin zu ausgesprochen unangenehmen Empfindungen bedeutet. Wenn nach chronischer Morphingabe und anschließendem Entzug des Opiats eine konstante Menge PGE₁ einen höheren cyclo-AMP-Spiegel als vor der Morphinbehandlung hervorruft, dann bedeutet dies erhöhtes Mißbehagen (Abb. 12, Kurve a, z. B. t = 18 h). Mißbehagen kann in Normalbefinden umgewandelt werden, wenn man Morphin gibt (Übergang von Kurve a auf Kurve b, bei z. B. t = 18 h). Um ausgesprochenes Wohlbefinden zu erzeugen, muß jetzt sogar mehr Morphin gegeben werden (Morphin-Toleranz) als bei t = 0. Umgekehrt entspricht der Übergang von Kurve b auf a bei z. B. t = 18 h einem Entzugssyndrom. Die Entwicklung des gesteigerten Ansprechens auf PGE₁ hängt von der Morphin-Konzentration während der Vorinkubationsperiode (15 h) ab (Abb. 13). Die Entstehung der Morphin-Toleranz der Hybridzellen wird durch Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese, verhindert^[132, 134]. Auch in Tieren unterbinden solche Inhibitoren die Ausbildung der Toleranz^[136–138]. Über die Art der Proteine (z. B. Adenylatcyclase?), deren Synthese für die Entstehung des Toleranzphänomens wichtig ist, wissen wir noch nichts.

Da die Kurzzeiteffekte von Acetylcholin und Noradrenalin denen des Morphins gleichen (siehe Abschnitt 3.6), war diese Analogie auch für die Langzeitwirkungen zu erwarten. Wegen des raschen Abbaus von Acetylcholin (1a) und Noradrenalin (2b) in den Zellkulturen wurden deren stabile Analoga, Carbamoylcholin (1b) und Isoproterenol (2c), verwendet. Auch nach Vorinkubation mit diesen Agentien zeigen Hybridzellen

[*] Anmerkung bei der Korrektur (3. Febr. 1976): Enkephalin aus Schweinehirn wurde inzwischen von J. Hughes, T. W. Smith, H. H. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan u. H. R. Morris, Nature 258, 577 (1975) als Gemisch der beiden Pentapeptide H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH und H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH identifiziert. Die chemisch synthetisierten Peptide sind identisch mit den natürlichen und wirken ähnlich wie Morphin.

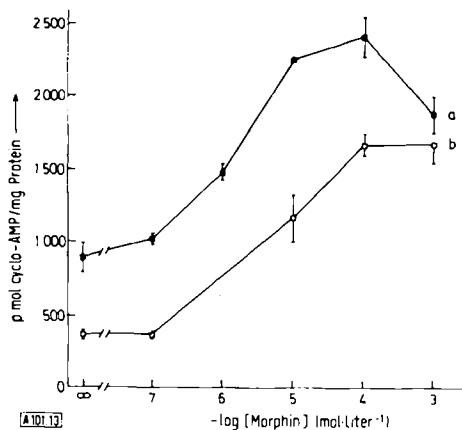


Abb. 13. Beziehung zwischen der Reaktion auf PGE_1 und der Morphin-Konzentration während der 15stündigen Vorinkubationsperiode. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen behandelt wie bei Abb. 12 beschrieben [134].

stark erhöhte Reaktion auf PGE_1 (Tabelle 2)^[134]. Daraus folgt, daß Morphin, Acetylcholin und Noradrenalin sowie deren Analoga gleiche Langzeitwirkungen hervorrufen. Diese Gleichheit in der Wirkung der drei Substanzen gilt nicht bei der Injektion in ein Tier. Acetylcholin und Noradrenalin würden in der Peripherie abgebaut, bevor sie ins Gehirn gelangten. Auch würden sie oder ihre Analoga, im Gegensatz zu Morphin, die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Sie könnten also gar nicht bis zu den Neuronen vordringen. Außerdem ist nicht unbedingt zu erwarten, daß morphin-empfindliche Zellen im Gehirn gleichzeitig Rezeptoren für Acetylcholin oder Noradrenalin besitzen. Die Versuche an den Modellzellen zeigen, daß Morphin keine Sonderstellung einnimmt und Toleranz prinzipiell auch durch andere Substanzen erzeugt werden kann.

Tabelle 2. Auswirkung der Vorinkubation (36 h) der Hybridzellen mit verschiedenen Agentien auf den cyclo-AMP-Spiegel, der nach der Hauptinkubation mit PGE_1 gefunden wird [134].

Vorinkubation mit 10 μM	Hauptinkubation mit 3 μM PGE_1 cyclo-AMP (pmol/mg Protein)
—	1310 \pm 50
Morphin (13)	2540 \pm 230
Carbamoylcholin (1b)	2560 \pm 60
Isoproterenol (2c)	5620 \pm 100

Wie hängen Kurzzeit- und Langzeitwirkung der Substanzen Acetylcholin, Noradrenalin und Morphin zusammen? Bei Applikation auf die Oberfläche der Hybridzellen ist das wichtigste Ereignis die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor. Dieser Empfang der von außen auf die Zelle treffenden Information durch den spezifischen Rezeptor entspricht der Aufnahme von Information durch eine auf einen Frequenzkanal abgestimmte Radioantenne. Die Bindung des Liganden L an den Rezeptor R (Abb. 14) hat vermutlich Veränderungen in dessen Struktur zur Folge, die zu Änderungen in der Membranstruktur führen (ΔStr). Diese wiederum haben Änderungen der Ionenpermeabilitäten (Δg) zur Folge, die zum frühest nachweisbaren Ereignis führen, der Änderung des Membranpotentials (ΔU) und der intrazellulären Ionenkonzentration (ΔC_i). Als nächstes bemerkt man die Änderungen der Aktivitäten der Cyclasen (ΔA) an der Änderung der Konzentrationen der cyclischen Nucleotide (ΔC_{cNMP}). Schließlich, nach vielen Stunden, findet man das erhöhte Ansprechen der Zellen auf

PGE_1 (Toleranz T). Wie verläuft die Kausalkette? Etwa wie in Abbildung 14 A, wo eine Änderung der Konzentration der cyclischen Nucleotide Voraussetzung für das Auftreten des Langzeiteffektes T ist? Oder wie in Abbildung 14 B, wo die Änderung der Ionenkonzentration C_i in der Zelle den Langzeiteffekt T bedingt, die Änderung der Spiegel der cyclischen Nucleotide (ΔC_{cNMP}) dagegen nur ein zur Entwicklung von T parallel verlaufendes Ereignis ist? Oder wie in Abbildung 14 C, wo die Änderung des Membranpotentials den entscheidenden Anstoß für die Entwicklung der Toleranz T gibt? Alle drei Möglichkeiten sind experimentell prüfbar. Besonders interessant erscheint es, auf ΔStr dadurch Einfluß zu nehmen, daß man die Lipidzusammensetzung der Membran verändert, was in Zellkulturen leicht möglich ist.

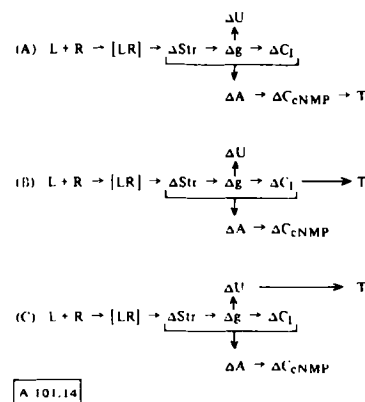


Abb. 14. Drei Hypothesen für die Entwicklung des Toleranzeffektes T bei Langzeiteinwirkung von Opiaten, cholinergen oder adrenergen Agonisten. L: Ligand (Agonist), R: Rezeptor, [LR]: Ligand-Rezeptor-Komplex, ΔStr : Strukturänderung von Rezeptor und/oder Membran, Δg : Änderung der Ionenpermeabilität, ΔC_i : Änderung der intrazellulären Ionenkonzentration, ΔU : Änderung des Membranpotentials, ΔA : Änderung der spezifischen Aktivität von Cyclasen, ΔC_{cNMP} : Änderung der intrazellulären Konzentration von cyclischen Nucleotiden, T: Toleranz.

4. Probleme, die mit dem Hybridzellsystem untersucht werden können

Die ersten Kapitel dieses Überblicks sollten die Eigenschaften der Neuroblastomazellen und der (Neuroblastoma \times Glioma)-Hybridzellen einschließlich ihrer neuronalen „Luxusfunktionen“ (Funktionen, die für das Überleben der Zellen in Kultur unnötig sind) beschreiben. Diese Charakteristika sind in Tabelle 3 noch einmal zusammengestellt. Am Beispiel der Morphinwirkung sollte verdeutlicht werden, daß man Proble-

Tabelle 3. Eigenschaften der (Neuroblastoma \times Glioma)-Hybridzellen.

- Neuronale Kennzeichen
 - Zellfortsätze (Neurite)
 - Cholinacetyltransferase
 - Dopamin- β -hydroxylase
 - Klare Vesikel (Acetylcholin-Speicherung?)
 - „dense-core“-Vesikel (Noradrenalin-Speicherung?)
 - Aktionspotential (elektrisch oder chemisch auslösbar)
- Rezeptoren [a] für
 - Acetylcholin (1a)
 - Noradrenalin (2b)
 - Morphin (13) (Endorphin?)
 - Prostaglandin E_1 (10)
 - Adenosin (11)

[a] Sofern die Wirkung aller aufgeführten Substanzen durch Rezeptoren vermittelt wird. Wahrscheinlich wird sich diese Liste aufgrund weiterer Befunde verlängern.

me, die mit Tier- oder Gewebeversuchen kaum lösbar sind, im Modellzellsystem einer Aufklärung näherbringen kann. Beispielsweise ist es heute noch nicht möglich, bestimmte Hirnregionen so rasch zu isolieren, daß sich der Spiegel cyclischer Nucleotide während der Isolierungsprozedur nicht drastisch ändert. Dies wäre aber nötig, um Morphinversuche der geschilderten Art am Tier auszuführen.

Immer wieder wird die Frage gestellt, ob die an Zellkulturen erhaltenen Ergebnisse die Geschehnisse im Tier oder im Menschen widerspiegeln und damit auf den normalen Organismus übertragbar sind. Die Frage ist berechtigt, denn die Kulturzellen sind aus dem Gewebeverband gelöst und befinden sich in einer Umgebung, deren chemische Zusammensetzung sich von der im Gewebe möglicherweise erheblich unterscheidet. Hinzu kommt, daß insbesondere die Tumor- und Hybridzell-Linien Chromosomenpopulationen besitzen, die nicht das ganzzahlige Vielfache eines einfachen Chromosomensatzes sind (Aneuploidie). Ihre Chromosomenzahl schwankt von Zelle zu Zelle um einen Mittelwert. Dennoch enthalten diese Zellen gegenüber „normalen“ Zellen keine neuen Geninformationen. Man nimmt heute an, daß ein Genom keine Informationen enthält, die nicht irgendwo im Organismus benötigt werden. Andernfalls wären sie im Verlauf der Evolution eliminiert worden. Stimmt das, so müssen alle an Zellsystemen beobachteten molekularen Funktionen irgendwann und irgendwo auch im tierischen Körper auftreten. Umgebung und Aneuploidie können dann nur noch quantitative, nicht aber qualitative Abweichungen vom Normalzustand im Tier erzeugen.

Schwierig wird es immer sein, eine Modellzelle einer bestimmten Zelle im Körper zuzuordnen, da die Modellzelle in ihren phänotypischen Merkmalskombinationen einmalig sein kann. Eine solche Zuordnung ist aber auch nicht nötig. Man wählt eben den Modellzelltyp aus, mit dem sich die interessierenden Eigenschaften am besten studieren lassen. Zusätzlich vorhandene Merkmale müssen dabei nicht notwendigerweise stören. Durch Hybridisierung anderer permanenter neuronaler Zell-Linien miteinander oder einer permanenten Zell-Linie mit isolierten Neuronen lassen sich vermutlich neue Zell-Linien mit neuen Merkmalskombinationen erzeugen. Arbeiten hierzu sind im Gang^[139]. Die Ergebnisse aus Zellkulturversuchen müssen am intakten Organismus nachgeprüft werden.

Wegen der Homogenität und der oft nahezu unbegrenzten Vermehrbarkeit des kultivierten Zellmaterials lassen sich wie in der Bakteriologie leicht Versuchsserien mit Replikakulturen durchführen. Die Zellkultursysteme erinnern aber nicht nur von der Methodik her an die Mikrobiologie. Die Bemerkung, Neuroblastomazellen seien die *Escherichia coli* der Neurobiologie^[26], liegt nahe. Aufgrund der Ergebnisse aus Versuchen an Zellkulturen lassen sich Tierversuche gezielter planen als das sonst möglich wäre. Abweichendes Verhalten der Zellkulturen von der Norm des intakten Gewebes muß kein Nachteil sein. Vielmehr hat sie bereits zur Entdeckung neuer regulatorischer hormonähnlicher Faktoren geführt^[140].

In Tabelle 4 sind Probleme aufgeführt, zu deren Lösung, so glauben wir, Modellsysteme wie die (Neuroblastoma × Glioma)-Hybridzellen geeignet sind. An oberster Stelle steht die wichtigste Funktion des Nervensystems, das Gedächtnis. Nur auf sie sei kurz eingegangen. Wie beschrieben, „erinnern“ sich die Zellen in Langzeitversuchen an den Einfluß von cholinergen und adrenergen Wirkstoffen oder von Morphin. Auch die enorme vorübergehende Steigerung der cyclo-AMP-Phos-

Tabelle 4. Probleme, die voraussichtlich mit biochemischen, zellbiologischen, pharmakologischen und physiologischen Methoden an Hybridzellen studiert werden können.

1. Gedächtnis: Speicherung, Konservierung und Abruf von Informationen
2. Synapsen: Bildung (Neuron-Neuron, Neuron-Muskel, Neuron-Drüsenzelle), Funktion, interzelluläre Wechselwirkung
3. Differenzierung: auslösende und fördernde Faktoren (Hormone), Genese von Neurotransmitter-Speichervesikeln, Regeneration von Nervenfasern
4. Interzelluläre Kommunikation: Neuron mit Astroglia, Neuron mit axon-isolierenden Schwannzellen
5. Neurotrope Viren [141]: Viruserkrankungen des Nervensystems, „slow viruses“
6. Drogen: Wirkungsweise, Stoffwechsel
7. Neuronale Membranen: charakteristische Bestandteile, Stoffwechsel, Einfluß der Membranlipid-Zusammensetzung auf Membranfunktionen (Aktionspotential, Rezeptoren), Lipid-Protein-Wechselwirkung
8. Neurotransmitter: Regulation von Bildung und Abbau, Mechanismus der Wiederaufnahme
9. Ernährung: Einfluß des Angebots an Aminosäuren, Zuckern, Lipiden auf die Entwicklung und Funktion der Neuronen und Gliazellen
10. Trophik: gerichtetes Nervenwachstum, gerichtete Wanderung von Neuronen und Gliazellen
11. Axoplasmatischer Transport
12. Zellbewegung (Pulsation)
13. Inhaltsstoffe des Nervensystems mit bekannter Struktur, aber unbekannter Funktion

phodiesterase-Aktivität nach Langzeitinkubation mit PGE_1 ^[108] kann als Gedächtnisfunktion interpretiert werden, denn die anschließende Inkubation mit PGE_1 oder Adenosin kann wegen des raschen Abbaus von cyclo-AMP nur noch eine sanfte Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels bewirken. Natürlich ist hier große Vorsicht am Platz. Man könnte ja jede Erhöhung einer Enzymaktivität in der Leber nach Injektion von Hydrocortison beim Tier als „Erinnerung“ der Leberzellen an ihre „hormonelle Vergangenheit“ bezeichnen. Allerdings gibt es einen wichtigen Unterschied zwischen Neuron und Leberzelle: Durch die Verschaltung der Neuronen miteinander kann der durch Neurotransmitter-Einfluß veränderte Zustand der Neuronen rasch „abgefragt“ und als Information im Gehirn verarbeitet werden. Im ungünstigsten Falle könnten die Versuche an Hybridzellen zeigen, was Gedächtnis nicht ist, und damit indirekt zu seiner Aufklärung beitragen.

*Meinen kritischen und fleißigen Mitarbeitern und unseren zuverlässig und konzentriert arbeitenden technischen Assistentinnen und Assistenten möchte ich für einige Jahre begeisternder Zusammenarbeit danken. Herrn Professor Lynen danke ich herzlich für Verständnis und großzügige Hilfe beim Aufbau unserer Arbeitsgruppe. Mein Dank gilt auch dem Sonderforschungsbe-
reich 51 der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung und einigen Verlagen für die Erlaubnis, bereits publiziertes Material [56, 57, 91, 92, 103, 104, 114, 134] zu verwenden.*

Eingegangen am 28. November 1975,
in veränderter Fassung am 16. Dezember 1975 [A 101]

- [1] R. R. Llinas, Sci. Am. 232, Nr. 1, S. 56 (1975).
- [2] K. Krnjević, Physiol. Rev. 54, 418 (1974).
- [3] V. P. Whittaker, Handb. Neurochem. 2, 327 (1969).
- [4] S. P. R. Rose, Handb. Neurochem. 2, 183 (1969).
- [5] O. Z. Sellinger u. J. M. Azcurra, Res. Methods Neurochem. 2, 3 (1974).
- [6] H. R. Herschman, Res. Methods Neurochem. 2, 101 (1974).
- [7] G. D. Fischbach, Science 169, 1331 (1970).
- [8] G. D. Fischbach, Dev. Biol. 28, 407 (1972).
- [9] Y. Shimada u. D. A. Fischman, Dev. Biol. 31, 200 (1973).
- [10] J. H. Peacock u. P. G. Nelson, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 36, 389 (1973).

- [11] P. G. Nelson, *Physiol. Rev.* 55, 1 (1975).
- [12] J. Hooisma, D. W. Slaaf, E. Meeter u. W. F. Stevens, *Brain Res.* 85, 79 (1975).
- [13] G. R. DeLong, *Dev. Biol.* 22, 563 (1970).
- [14] G. R. DeLong u. R. L. Sidman, *Dev. Biol.* 22, 584 (1970).
- [15] N. W. Seeds, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1858 (1971).
- [16] B. B. Garber u. A. A. Moscona, *Dev. Biol.* 27, 217 (1972).
- [17] N. W. Seeds, *J. Biol. Chem.* 250, 5455 (1975).
- [18] G. Augusti-Tocco u. G. Sato, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 311 (1969).
- [19] R. J. Klebe u. F. H. Ruddle, *J. Cell Biol.* 43, 69a (1969).
- [20] D. Schubert, S. Humphreys, C. Baroni u. M. Cohn, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 316 (1969).
- [21] P. Nelson, W. Ruffner u. M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 1004 (1969).
- [22] T. Amano, E. Richelson u. M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 258 (1972).
- [23] J. J. Tumilowicz, W. W. Nichols, J. J. Cholon u. A. E. Greene, *Cancer Res.* 30, 2110 (1970).
- [24] D. Schubert, S. Heinemann, W. Carlisle, H. Türkas, B. Kimes, J. Patrick, J. H. Steinbach, W. Culp u. B. L. Brandt, *Nature* 249, 224 (1974).
- [25] K. N. Prasad, *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* 50, 129 (1975).
- [26] S. C. Haffke u. N. W. Seeds, *Life Sci.* 16, 1649 (1975).
- [27] X. O. Breakefield, *Life Sci.*, im Druck.
- [28] N. W. Seeds, A. G. Gilman, T. Amano u. M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 160 (1970).
- [29] P. Furmanski, P. G. Phillips u. M. Lubin, *Nature* 233, 413 (1971).
- [30] K. N. Prasad u. A. W. Hsie, *Nature* 233, 141 (1971).
- [31] K. N. Prasad, *Nature* 234, 471 (1971).
- [32] K. N. Prasad u. J. R. Sheppard, *Exp. Cell Res.* 73, 436 (1972).
- [33] K. N. Prasad, *Nature New Biol.* 236, 49 (1972).
- [34] J. R. Kates, R. Winterton u. K. Schlessinger, *Nature* 229, 345 (1971).
- [35] D. Schubert, S. Humphreys, F. de Vitry u. F. Jacob, *Dev. Biol.* 25, 514 (1971).
- [36] D. Schubert u. F. Jacob, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 247 (1970).
- [37] K. N. Prasad, B. Mandal u. S. Kumar, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144, 38 (1973).
- [38] K. N. Prasad, *Int. J. Cancer* 12, 631 (1973).
- [39] I. Spector, Y. Kimhi, C. Palfrey u. U. Z. Littauer, *Abstr. 6th Int. Congr. Pharmacol., Helsinki 1975*, S. 72.
- [40] J. Ross, S. Granett u. J. L. Rosenbaum, *J. Cell Biol.* 59, 291 A (1973).
- [41] T. Waris, L. Rechardt u. P. Waris, *Experientia* 24, 1128 (1973).
- [42] R. Revoltella, L. Bertolini u. M. Pediconi, *Exp. Cell Res.* 85, 89 (1974).
- [43] D. Monard, F. Solomon, M. Rentsch u. R. Gysin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 1894 (1973).
- [44] P. Nelson, W. Ruffner u. M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 1004 (1969).
- [45] P. G. Nelson, J. H. Peacock, T. Amano u. J. Minna, *J. Cell. Physiol.* 77, 337 (1971).
- [46] A. J. Harris u. M. J. Dennis, *Science* 167, 1253 (1970).
- [47] P. G. Nelson, J. H. Peacock u. T. Amano, *J. Cell. Physiol.* 77, 353 (1971).
- [48] J. Peacock u. P. G. Nelson, *J. Neurobiol.* 4, 363 (1973).
- [49] K. N. Prasad, K. N. Gilmer u. S. K. Sahu, *Nature* 249, 765 (1974).
- [50] K. N. Prasad u. K. N. Gilmer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2525 (1974).
- [51] A. G. Gilman u. M. Nirenberg, *Nature* 234, 356 (1971).
- [52] B. Hamprecht u. J. Schultz, *FEBS Lett.* 34, 85 (1973).
- [53] S. K. Sahu u. K. N. Prasad, *J. Neurochem.* 24, 1267 (1975).
- [54] J. Schultz u. B. Hamprecht, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 278, 215 (1973).
- [55] A. Blume, C. Dalton u. H. Sheppard, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 3099 (1973).
- [56] J. Traber, K. Fischer, C. Buchen u. B. Hamprecht, *Nature* 255, 558 (1975).
- [57] J. Traber, G. Reiser, K. Fischer u. B. Hamprecht, *FEBS Lett.* 52, 327 (1975).
- [58] R. Gullis, J. Traber, K. Fischer, C. Buchen u. B. Hamprecht, *FEBS Lett.* 59, 74 (1975).
- [59] R. Gullis, J. Traber, K. Fischer, C. Buchen u. B. Hamprecht, noch unveröffentlicht.
- [60] H. Matsuzawa u. M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 3473 (1975).
- [61] E. W. Sutherland, I. Øye u. R. W. Butcher, *Recent Prog. Horm. Res.* 21, 623 (1965).
- [62] G. A. Robison, R. W. Butcher u. E. W. Sutherland: *Cyclic AMP*. Academic Press, New York 1971.
- [63] R. Simantov u. L. Sachs, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2902 (1973).
- [64] R. Massarelli, J. Ciesielski-Treska, A. Ebel u. P. Mandel, *Biochem. Pharmacol.* 23, 2857 (1974).
- [65] K. Lanks, L. Somers, B. Papirmeister u. H. Yamamura, *Nature* 252, 476 (1974).
- [66] X. O. Breakefield, *J. Neurochem.*, im Druck.
- [67] J. Zwiller, J. Ciesielski-Treska, G. Mack u. P. Mandel, *Nature* 254, 443 (1975).
- [68] H. T. Hutchinson, K. Werrbach, C. Vance u. B. Haber, *Brain Res.* 66, 265 (1974).
- [69] D. Schubert, *Brain Res.* 84, 87 (1975).
- [70] E. Richelson u. E. J. Thompson, *Nature New Biol.* 241, 201 (1973).
- [71] R. M. Rosenberg, L. Vandeventer, L. DeFrancesco u. M. E. Friedkin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1436 (1971).
- [72] J. Harkins, M. Arsenaault, K. Schlesinger u. J. Kates, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 3161 (1972).
- [73] R. Simantov u. L. Sachs, *Eur. J. Biochem.* 30, 123 (1972).
- [74] K. N. Prasad, B. Mandal, J. C. Waymire, G. J. Lees, A. Vernadakis u. N. Weiner, *Nature New Biol.* 241, 117 (1973).
- [75] B. Hamprecht u. T. Amano, *Anal. Biochem.* 57, 162 (1974).
- [76] J. C. Waymire, N. Weiner u. K. N. Prasad, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2241 (1972).
- [77] X. O. Breakefield u. M. W. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2530 (1974).
- [78] B. Anagnoste, L. S. Freedman, M. Goldstein, J. Broome u. K. Fuxe, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1883 (1972).
- [79] P. Mandel, J. Ciesielski-Treska, J. C. Hermetet, J. Zwiller, G. Mack u. C. Goridis, *Biochem. Pharmacol. Suppl.* 1, 209 (1973).
- [80] B. Hamprecht, J. Traber u. F. Lanprecht, *FEBS Lett.* 42, 221 (1974).
- [81] R. Narotzky u. W. Bondareff, *J. Cell Biol.* 63, 64 (1974).
- [82] B. Wexler u. R. Katzman, *Exp. Cell Res.* 92, 291 (1975).
- [83] X. O. Breakefield, E. A. Neale, J. H. Neale u. D. M. Jacobowitz, *Brain Res.* 92, 237 (1975).
- [84] G. Barski, S. Sorieul u. F. Cornefert, *C. R. Acad. Sci. D 251*, 1825 (1960).
- [85] H. Harris u. J. F. Watkins, *Nature* 205, 640 (1965).
- [86] Y. Okada, *Biken J.* 1, 103 (1958).
- [87] Y. Okada, *Exp. Cell Res.* 26, 98 (1962).
- [88] J. W. Littlefield, *Science* 145, 709 (1964).
- [89] T. Amano, B. Hamprecht u. W. Kemper, *Exp. Cell Res.* 85, 399 (1974).
- [90] B. Hamprecht, Hoppe-Seylers Z. *Physiol. Chem.* 355, 109 (1974).
- [91] B. Hamprecht in *L. Jaenicke: Biochemistry of Sensory Function*. 25. Mosbacher Kolloquium. Springer, Berlin 1974, S. 391.
- [92] B. Hamprecht u. T. Amano, *Exp. Cell Res.*, im Druck.
- [93] M. P. Daniels u. B. Hamprecht, *J. Cell Biol.* 63, 691 (1974).
- [94] A. L. Hodgkin u. A. F. Huxley, *J. Physiol. (London)* 116, 449 (1952).
- [95] G. Reiser, W. Kemper u. B. Hamprecht, noch unveröffentlicht.
- [96] P. R. Myers u. D. R. Livengood, *Nature* 255, 235 (1975).
- [97] P. R. Myers, D. R. Livengood u. W. Shain, *Nature* 257, 238 (1975).
- [98] U. S. von Euler u. R. Eliasson: *Prostaglandins*. Academic Press, New York 1967.
- [99] J. E. Shaw u. P. W. Ramwell: *Prostaglandins*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 180 (1971).
- [100] S. Bergström, L. A. Carlson u. J. R. Weeks, *Pharmacol. Rev.* 20, 1 (1968).
- [101] S. M. M. Karim u. K. Hiller, *Drugs* 8, 176 (1974); W. Bartmann, *Angew. Chem.* 87, 143 (1975); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14, 337 (1975).
- [102] B. Hamprecht u. J. Schultz, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 354, 1633 (1973).
- [103] J. Traber, R. Gullis u. B. Hamprecht, *Proc. 10th Meeting Fed. Eur. Biochem. Soc.* 1975, S. 165.
- [104] J. Traber, K. Fischer, S. Latzin u. B. Hamprecht, *Nature* 253, 120 (1975).
- [105] W. A. Klee u. M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 3474 (1974).
- [106] J. Traber, K. Fischer, S. Latzin u. B. Hamprecht, *FEBS Lett.* 49, 260 (1974).
- [107] P. Cuatrecasas, *Annu. Rev. Biochem.* 43, 169 (1974).
- [108] J. Traber, K. Fischer, C. Buchen u. B. Hamprecht, noch unveröffentlicht.
- [109] S. K. Sharma, W. A. Klee u. M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 3092 (1975).
- [110] S. K. Sharma, W. A. Klee u. M. Nirenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 590 (1975).
- [111] N. D. Goldberg, R. F. O'Dea u. M. K. Haddox, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 3, 155 (1973).
- [112] N. D. Goldberg, M. K. Haddox, D. K. Hartle u. J. W. Hadden, *Proc. 5th Int. Congr. Pharmacol. Karger, Basel 1973*, Bd. 5, S. 146.
- [113] N. D. Goldberg, *Hosp. Pract. Mai* (1974), S. 127.
- [114] R. Gullis, J. Traber u. B. Hamprecht, *Nature* 256, 57 (1975).
- [115] P. Cuatrecasas, *Biochem. Pharmacol.* 23, 2353 (1974).
- [116] M. D. Hollenberg u. P. Cuatrecasas, *Fed. Proc.* 34, 1556 (1975).
- [117] M. S. Amer u. J. E. Byrne, *Nature* 256, 421 (1975).
- [118] J. Moskowitz u. G. Krishna, *Pharmacology* 10, 129 (1973).
- [119] J. Sanner, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 180, 396 (1971).
- [120] R. Jacques, *Experientia* 25, 1059 (1969).
- [121] S. Ehrenpreis, J. Greenberg u. S. Belman, *Nature New Biol.* 245, 280 (1973).
- [122] J. Traber, Diplomarbeit, Universität München 1973.
- [123] H. O. J. Collier u. A. C. Roy, *Nature* 248, 24 (1974).
- [124] L. Terenius u. A. Wahlström, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 35, Suppl. 1, 55 (1974).
- [125] J. Hughes, *Brain Res.* 88, 295 (1975).

- [126] J. Hughes, *Neurosci. Res. Program Bull.* 13, 55 (1975).
 [127] J. Hughes, *Life Sci.* 16, 1753 (1975).
 [128] L. Terenius u. A. Wahlström, *Life Sci.* 16, 1759 (1975).
 [129] G. W. Pasternak, R. Goodman u. S. H. Snyder, *Life Sci.* 16, 1765 (1975).
 [130] B. M. Cox, K. E. Opheim, H. Teschenmacher u. A. Goldstein, *Life Sci.* 16, 1777 (1975).
 [131] M. Brandt, J. Traber u. B. Hamprecht, unveröffentlichte Versuche.
 [132] J. Traber, K. Fischer, C. Buchen u. B. Hamprecht, unveröffentlichte Versuche.
 [133] E. Wei, *Life Sci.* 17, 17 (1975).
 [134] J. Traber, R. Gullis u. B. Hamprecht, *Life Sci.* 16, 1863 (1975).
 [135] W. A. Klee, S. K. Sharma u. M. Nirenberg, *Life Sci.* 16, 1869 (1975).
 [136] A. A. Smith, M. Clarmin u. J. Gavitt, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 156, 85 (1967).
 [137] H. Loh, F. Shen u. E. Way, *Pharmacologist* 10, 191 (1968).
 [138] M. Feinberg u. J. Cochin, *Pharmacologist* 10, 192 (1968).
 [139] R. Heumann u. B. Hamprecht, unveröffentlichte Versuche.
 [140] D. Gospodarowicz, K. Jones u. G. Sato, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2295 (1974).
 [141] K. Koschel, R. Kürzinger, M. Halbach, G. Reiser u. B. Hamprecht, unveröffentlichte Versuche.

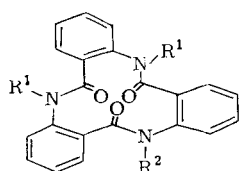
ZUSCHRIFTEN

Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einreichung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vorrangige Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

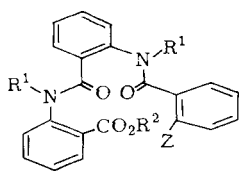
Isolierung von N,N',N'' -Tribenzyltrianthranilid in zwei diastereomeren Konformationen

Von W. David Ollis, Julia Stephanidou Stephanatou, J. Fraser Stoddart und Anthony G. Ferrige[*]

Vor kurzem beschrieben wir die Synthese von N,N',N'' -Trimethyltrianthranilid (1)^[1] und wiesen darauf hin, daß es in einer Helix-Konformation kristallisiert, die in Lösung jedoch mit 5.5% einer Propeller-Konformation im Gleichgewicht steht^[1]. Wie wir jetzt fanden, lassen sich bei N,N',N'' -Tribenzyltrianthranilid (2) zwei diastereomere Konformationen in kristalliner Form isolieren.



(1), $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$



(4), $R^1 = R^2 = \text{H}$; $Z = \text{NO}_2$

(2), $R^1 = R^2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

(5), $R^1 = R^2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; $Z = \text{NO}_2$

(3), $R^1 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; $R^2 = \text{H}$

(6), $R^1 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; $R^2 = \text{H}$; $Z = \text{NO}_2$

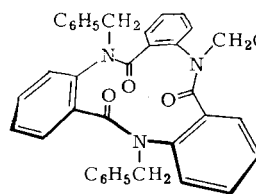
(7), $R^1 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; $R^2 = \text{H}$;

$Z = \text{NH}_2$

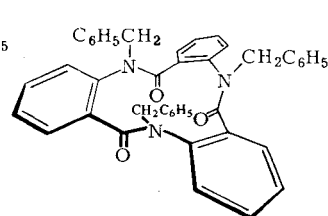
Die N -Benzylierung ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Br}$; NaH ; THF) der N -[4-(2-Nitrobenzoylamino)benzoyl]anthranilsäure (4)^[2], $\text{Fp} = 224^\circ\text{C}$ ($224^\circ\text{C}^{[2]}$), führte zu einer Mischung (Ausb. >90%) der Ester (5) und (6). Durch Reduktion^[3] dieser Mischung mit TiCl_3 und die Vervollständigung der Verseifung mit LiOH entstand das N,N' -Dibenzyl-Derivat (7) (64%, $\text{Fp} = 177\text{--}179^\circ\text{C}$).

Die Cyclisierung (Dicyclohexylcarbodiimid in CH_2Cl_2) von (7) ergab N,N' -Dibenzyltrianthranilid (3) (50%, $\text{Fp} = 177\text{--}179^\circ\text{C}$; $\tau_{\text{A}1} = 5.00$, $\tau_{\text{B}1} = 5.54$, $J_{\text{A}1\text{B}1} = 14.7\text{ Hz}$; $\tau_{\text{A}2} = 5.17$, $\tau_{\text{B}2} = 5.33$, $J_{\text{A}2\text{B}2} = 14.8\text{ Hz}$ in CDCl_3 für die konstitutionsmäßig heterotopen benzyllischen Methylenprotonen^[4, 5]). Bei der N -Benzylierung ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Br}$; NaH ; THF) von (3) entstanden zwei diastereomere Produkte – (2a) und (2b) – mit der Konstitution des N,N',N'' -Tribenzyltrianthranilids (2). Präparative Dünnschichtchromatographie auf Silicagel bei 5°C mit Ethylacetat/Petrolether ($\text{Kp} = 60\text{--}80^\circ\text{C}$) (1:1) ergab (2a) ($\text{Fp} = 134\text{--}144^\circ\text{C}^{[6]}$, Diastereomerenreinheit 93%) und (2b) ($\text{Fp} = 260\text{--}263^\circ\text{C}$, Diastereomerenreinheit >98%). Verbindung (2a) ist das kinetisch und Verbindung (2b) das thermodynamisch bevorzugte Produkt.

Ein unmittelbar nach Auflösen von kristallinem (2a) in CDCl_3 aufgenommenes ^1H -NMR-Spektrum zeigte drei gleich intensive AB-Systeme ($\tau_{\text{A}1} = 4.67$, $\tau_{\text{B}1} = 5.50$, $J_{\text{A}1\text{B}1} = 16.4\text{ Hz}$; $\tau_{\text{A}2} = 4.93$, $\tau_{\text{B}2} = 5.34$, $J_{\text{A}2\text{B}2} = 13.8\text{ Hz}$; $\tau_{\text{A}3} = 5.04$, $\tau_{\text{B}3} = 5.39$, $J_{\text{A}3\text{B}3} = 15.8\text{ Hz}$) der benzyllischen Methylenprotonen^[4]. Bei einem ähnlichen Experiment mit (2b) wurde nur ein AB-System beobachtet ($\tau_{\text{A}} = 3.96$, $\tau_{\text{B}} = 5.32$, $J_{\text{AB}} = 14.4\text{ Hz}$). Bei Raumtemperatur stellt sich in CDCl_3 langsam ein Gleichgewicht ein [(2a) : (2b) = 41 : 59].



(8), Helix



(9), Propeller

Die Spektren von (2a) und (2b) lassen auf zwei nicht-planare Konformationen schließen, die Helix (H) (8) mit C_1 -Symmetrie und den Propeller (P) (9) mit C_3 -Symmetrie, die durch Torsion um die $\text{Ar}-\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)$ - und $\text{Ar}-\text{CO}$ -Einfachbindungen der *trans*-Amidgruppen ineinander übergehen. Bei der gegenseitigen Umwandlung der H- (8) und der P-Konformation (9) und ihrer Enantiomere H^* und P^* stellt sich folgendes Gleichgewicht ein: $\text{P} \rightleftharpoons \text{H} \rightleftharpoons \text{H}^* \rightleftharpoons \text{P}^*$.

Aus den Spektren folgt, daß (2a) und die Helix (8) sowie (2b) und der Propeller (9) einander zugeordnet werden können. Die Gleichgewichtseinstellung wurde ^1H -NMR-spektroskopisch durch Messung^[7] der relativen Intensität der Benzyl-

[*] Prof. Dr. W. D. Ollis, Dr. J. F. Stoddart und J. S. Stephanatou
 Department of Chemistry, The University
 Sheffield S3 7HF (England)

A. G. Ferrige
 Wellcome Research Laboratories
 Beckenham, Kent BR3 3BS (England)