

- [84] a) A. Ehrenberg, L. E. G. Eriksson, J. S. Hyde, *Biochim. Biophys. Acta* 167 (1968) 482; b) L. E. G. Eriksson, J. S. Hyde, A. Ehrenberg, *ibid.* 192 (1969) 211; c) J. Salach, W. H. Walker, T. P. Singer, A. Ehrenberg, P. Hemmerich, S. Ghisla, U. Hartmann, *Eur. J. Biochem.* 26 (1972) 267; d) L. E. G. Eriksson, A. Ehrenberg, *Biochim. Biophys. Acta* 293 (1973) 57.
- [85] E. Jörin, F. Graf, A. Schweiger, H. H. Günthard, *Chem. Phys. Lett.* 42 (1976) 375; K. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 6105.
- [86] J. E. Roberts, T. G. Brown, B. M. Hoffmann, J. Peisach, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 825.
- [87] N. D. Chasteen, J. Francavilla, *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 867.
- [88] Govindjee: *Photosynthesis. Energy Conversion by Plants and Bacteria*, Vol. 1, Academic Press, New York 1982.
- [89] F. Lendzian, W. Lubitz, H. Scheer, C. Bubenzer, K. Möbius, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4635.
- [90] W. Lubitz, F. Lendzian, H. Scheer, M. Plato, K. Möbius in A. H. Zewail: *Photochemistry and Photobiology*, Proc. Int. Conf., Vol. II, Harwood Academic Publ., Chur 1983; W. Lubitz, F. Lendzian, H. Scheer, J. Gottstein, M. Plato, K. Möbius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, im Druck; P. J. O'Malley, G. T. Babcock, *ibid.*, im Druck.
- [91] W. Lubitz, unveröffentlicht.
- [92] M. Okamura, R. Debus, R. Isaacson, G. Feher, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 39 (1980) 1802.
- [93] J. M. Smith, L. H. Sutcliffe, W. Lubitz, S. Wiesner, H. Kurreck, unveröffentlicht.
- [94] P. Hemmerich, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 33 (1976) 451; P. Hemmerich, V. Massey, H. Michel, C. Schug, *Struct. Bonding (Berlin)* 48 (1982) 94.
- [95] M. Bock, W. Lubitz, H. Kurreck, H. Fenner, R. Grauert, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 5567.
- [96] H. Kurreck, M. Bock, N. Bretz, M. Elsner, H. Kraus, W. Lubitz, F. Müller, J. Geissler, P. M. H. Kroneck, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [97] *Bruker-Report 1* (1983) 31, Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Karlsruhe.
- [98] W. B. Mims, *Proc. Roy. Soc. A* 283 (1965) 452.
- [99] A. E. Stillman, R. N. Schwartz, *Mol. Phys.* 35 (1978) 301; A. E. Stillman, R. N. Schwartz in L. Kevan, R. N. Schwartz: *Time Domain Electron Spin Resonance*, Wiley, New York 1979, S. 173; W. B. Mims, J. Peisach in L. J. Berliner, J. Reuben: *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 3, Plenum, New York 1981, S. 250.
- [100] R. Z. Sagdeev, W. Möhl, K. Möbius, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 3183.

Biochemische Aspekte der cholinergen Reizung

Von Alfred Maelicke*

In memoriam David Nachmansohn (1899–1983)

Lebende Organismen können sich nur entwickeln und erhalten, solange eine wirksame Kommunikation zwischen ihren Einzelkomponenten – den Zellen – besteht. Diese interzelluläre Kommunikation ist hauptsächlich chemischer Natur: Sie benutzt als Botenstoffe Neurotransmitter und Hormone und als Signalempfänger Rezeptoren. Die Konzentrationen aller beteiligten Komponenten sind gewöhnlich gering. Ausnahmen gibt es bei einigen synaptischen Kommunikationssystemen wie der Nerven-Muskel-Synapse oder ihrer speziellen Form, der Nerven-Elektrozyt-Synapse in den elektrischen Organen von Zitteraal (*Electrophorus*) und Zitterrochen (*Torpedo*). Diese Systeme sind der biochemischen Analyse gut zugänglich, so daß sie sich zur Aufklärung der molekularen Grundlagen derartiger biologischer Kommunikationsprozesse eignen. Auf diese Weise ist gefunden worden, daß der nicotinische Acetylcholinrezeptor der Muskelzelle nicht nur das von der zugehörigen Nervenzelle ausgesendete Signal empfängt, sondern dieses auch selbst in eine elektrische Aktivität der Muskelzelle umsetzt. Fluoreszenzkinetische Untersuchungen der Wechselwirkung des Acetylcholinrezeptors mit seinen Liganden haben zu einem neuen Modell des molekularen Mechanismus der cholinergen Reizung geführt, das auch von physiologischen und immunologischen Befunden gestützt wird.

1. Einleitung^[1]

Das zentrale Ereignis im Verlauf der chemischen Reizung erregbarer Zellen ist die Umsetzung des chemischen Signals in die primäre Reizantwort der Zelle. Im Falle der cholinergen Reizung peripherer Muskelzellen ist hierfür ein einziges Makromolekül, der nicotinische Acetylcholinrezeptor der Muskelendplatte, verantwortlich (Abb. 1): Durch das Binden des von der zugeordneten Nervenendigung abgegebenen Neurotransmitters Acetylcholin empfängt der Rezeptor den Reiz. Die erste Reaktion darauf – die primäre Reizantwort – ist das kurzzeitige Öffnen und Schließen des Ionenkanals im Rezeptor. Diese Verknüpfung

der für Reizempfang und Reizverarbeitung zuständigen Strukturen innerhalb eines Proteins scheint typisch für viele ligandenaktivierte Ionenkanalproteine erregbarer Zellen zu sein. Somit ist der Acetylcholinrezeptor – der biochemisch am besten charakterisierte Neurorezeptor – auch ein Modellsystem für andere an der schnellen Reizübertragung im Nervensystem beteiligte, ligandenaktivierte Ionenkanäle.

Obwohl die in der Nerv-Muskel-Synapse ablaufenden Reaktionen und die daran beteiligten Komponenten gut bekannt sind (Abb. 1), ist der molekulare Mechanismus der cholinergen Reizung noch nicht geklärt. Insbesondere wird noch nicht verstanden, durch welche Struktureigenschaften des Rezeptors es zur Unterscheidung zwischen Agonisten (kanal-aktivierende Liganden wie Acetylcholin) und Antagonisten (Liganden ohne kanalaktivierende Wirkung) kommt und wie das Binden des Transmitters (und

[*] Prof. Dr. A. Maelicke
Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie
Rheinlanddamm 201, D-4600 Dortmund 1

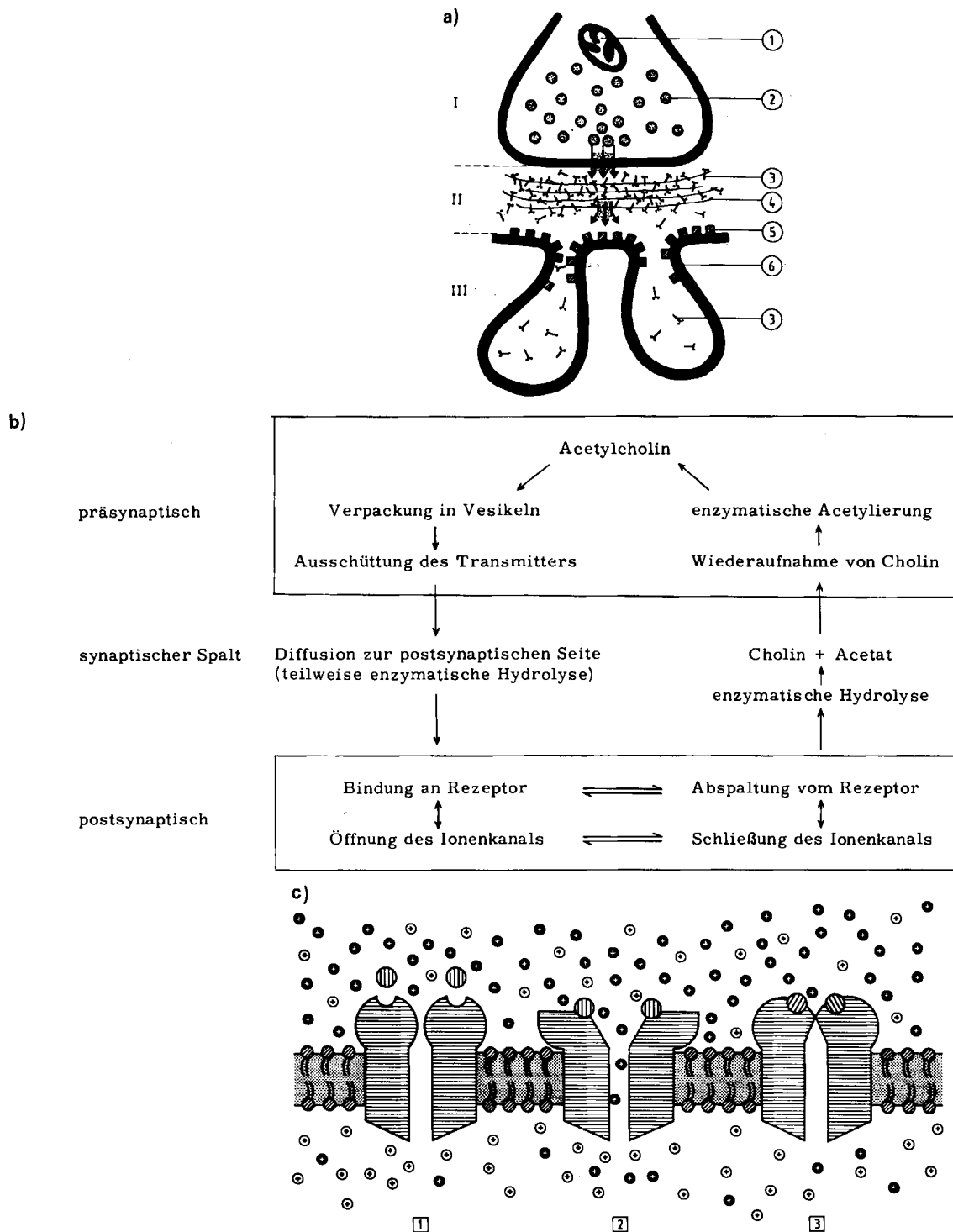


Abb. 1. a) Schematische Darstellung einer cholinergen Synapse. Typische Strukturen der präsynaptischen Nervenendigungen I sind neben den Mitochondrien ① die transmitter-enthaltenden Vesikeln ②. Die postsynaptischen Bereiche III der Muskelzellen von Säugetieren zeichnen sich durch tiefe Einbuchtungen aus: Die Acetylcholinrezeptoren ⑤ sind im wesentlichen in den knopfartigen, den Nervenendigungen gegenüberliegenden Auswüchsen der Muskelzellplasmamembran ⑥ lokalisiert. Die Acetylcholinesterase ③ findet sich sowohl im synaptischen Spalt II wie auch in den Einbuchtungen der postsynaptischen Membran; ihr Collagen-artiger Schwanz verleiht ihr eine besondere Affinität zur Basallamina ④, so daß sie, an diese angeheftet, in erhöhter Konzentration zwischen Nervenendigung und Muskelendplatte vorliegt. Es wird vermutet, daß der Inhalt einer präsynaptischen Vesikel (etwa 4000-10000 Transmittermoleküle) die kleinste beobachtbare Reizantwort („Miniaturendplattenpotential“) hervorruft. Die synaptischen Konzentrationen an Acetylcholinrezeptor und -esterase sind von gleicher Größenordnung. – b) Reaktionsfolge bei der cholinergen Reizung. Ein axonaler Impuls initiiert die präsynaptische Ausschüttung des in Vesikeln verpackten Transmitters. Nach Diffusion durch den engen synaptischen Spalt bindet Acetylcholin an seinen spezifischen Rezeptor und bewirkt dadurch das kurzzeitige Öffnen und Schließen des rezeptor-integralen Ionenkanals. Nichtgebundenes und wieder abgespaltenes Acetylcholin wird von der Acetylcholinesterase im synaptischen Spalt zu Cholin und Acetat hydrolysiert. Cholin gelangt über das präsynaptische Cholinaufnahmesystem in die Nervenendigung zurück, wo es durch die Cholinacetyl-Transferase mit Acetyl-CoA und ATP wieder zu Acetylcholin umgesetzt wird, um erneut in synaptische Vesikeln verpackt zu werden. – c) Drei-Zustände-Modell des rezeptor-integralen Ionenkanals. Ist kein Transmitter ① (oder ein anderer Agonist) am Rezeptor gebunden, so ist der Kationenkanal geschlossen (*ruhend*) (Zustand ①). Durch Binden zweier Transmittermoleküle wird der Ionenkanal kurzzeitig geöffnet (*aktiviert*); der Fluß bestimmter Kationen ist bei bestehenden Ionengradienten möglich (Zustand ②). Unter physiologischen Bedingungen dominiert ein starker Na^+ -Einstrom in die Zelle; hierdurch wird eine Depolarisierung der Plasmamembran bewirkt. Bleibt der Transmitter länger am Rezeptor gebunden – z.B. wegen hoher Transmitterkonzentration als Folge erhöhter Ausschüttung oder inaktivierter Esterase –, so geht der Ionenkanal in einen persistent geschlossenen Zustand (*desensitiviert*) über (Zustand ③).

anderer Agonisten) das Öffnen und Schließen des rezeptor-integralen Ionenkanals verursacht.

In diesem Fortschrittsbericht sollen derartige Fragen anhand biochemischer Befunde zur Wechselwirkung des Rezeptors mit Liganden diskutiert werden. Da der Acetylcholinrezeptor zentraler Baustein biologischer Systeme ist, muß auch seine physiologische Rolle erörtert werden. Das schließlich vorgestellte Modell des Mechanismus dieser chemischen Reizung ist in guter Übereinstimmung mit bekannten Ergebnissen. Dieser Fortschrittsbericht kann und will das Gebiet nicht erschöpfend behandeln, zumal eine Reihe von Übersichten zu speziellen Aspekten dieses Themas vorliegen^[1-10].

2. Elektrophysiologische Grundlagen

Die primäre physiologische Antwort der postsynaptischen Zelle auf die Reizung durch Acetylcholin ist eine kurzzeitige Änderung ihres Membranpotentials im Bereich der Synapse. Diese Änderung wird durch das Öffnen eines spezifischen Ionenkanals, der integraler Teil des Rezeptors ist, verursacht^[12-14]. Der Kanal hat etwa 7 Å Durchmesser^[15,16] und läßt somit alle Kationen, die im hydratisierten Zustand diesen oder einen kleineren Ionenradius aufweisen, durch. Unter physiologischen Bedingungen kommt es daher im Verlauf der cholinergen Reizung zu einem Nettoeinstrom von Ionen, im wesentlichen Na⁺ und K⁺ sowie wenig Ca²⁺, in die Zelle.

Makroskopisch lassen sich zwei Stromtypen, die durch die präsynaptische Ausschüttung von Acetylcholin bewirkt werden, unterscheiden^[17-19]: Die spontanen Miniaturendplattenströme (mepc) sind klein, haben eine konstante Amplitude und sollen durch Ausschüttung eines Acetylcholin-„Quantums“ (d. h. des Inhaltes einer präsynaptischen Vesikel, etwa 4000-10 000 Moleküle) zustande kommen. Die normalen Endplattenströme (epc), die nach elektrischer Reizung der präsynaptischen Nervenendigung und der dadurch bewirkten Ausschüttung von Acetylcholin fließen, sind wesentlich größer; sie entsprechen der Ausschüttung mehrerer hundert „Quanten“ an Transmitter. Die Halbwertszeiten der durch cholinerge Reizung hervorgerufenen Endplattenströme liegen bei einigen Millisekunden und sind sowohl von der Temperatur wie vom bestehenden Membranpotential abhängig^[20-26]. Die Änderungen der

Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt im Verlauf der cholinergen Reizung sind nie direkt gemessen worden. Anhand elektrophysiologischer und biochemischer Daten kann man jedoch davon ausgehen, daß die Ströme unmittelbar mit der Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt verknüpft sind. Nach Schätzungen steigt die Transmitterkonzentration nach präsynaptischer Ausschüttung schnell von etwa 10⁻⁸ M (Basalkonzentration) auf etwa 10⁻³ M an; durch enzymatische Hydrolyse und Diffusion fällt sie innerhalb einiger ms wieder auf den ursprünglichen Basalwert zurück^[10,27-31].

Durch Verkleinerung des zur Strommessung verwendeten Membranbereiches und Verbesserung der Meßempfindlichkeit ist es gelungen, die mit dem Öffnen und Schließen einzelner Ionenkanäle einhergehenden Leitfähigkeitsänderungen direkt zu messen^[32,33] (Abb. 2). Durch Einzelkanal- und Rauschmessungen^[34-36] sind unter anderem folgende physiologische Eigenschaften des rezeptor-integralen Ionenkanals gefunden worden: Der elektrische Leitwert des geöffneten Kanals beträgt etwa 25 pS^[37]; jeder Kanal trägt mit etwa 0.3 µV zur Depolarisierung der postsynaptischen Membran bei. Die Kanalöffnungszeiten nehmen mit wachsender Transmitterkonzentration ab und liegen im Sättigungsbereich bei wenigen Mikrosekunden^[38,39]. Die Schließgeschwindigkeit der Kanäle ist unabhängig von der Transmitterkonzentration; die mittleren Öffnungszeiten der Einzelkanäle sind daher konstant und liegen je nach Temperatur und Ligand (Agonist) bei 0.1-5 ms^[12,13,24,32,38,40-43].

Die Sprünge der Membranleitfähigkeit (Abb. 2b) mußten von Einzelkanalereignissen herrühren^[32], weil die meisten gleiche Amplituden aufwiesen, ihre Dauer (Öffnungszeiten) aber von Ereignis zu Ereignis variierte (Gauß-Verteilung). Neuere Ergebnisse^[44-49] zeigen nun, daß der rezeptor-integrale Ionenkanal nicht nur in zwei Zuständen (geschlossen und offen) auftreten kann, sondern daß es mehrere Zustände des offenen und des geschlossenen Kanals gibt. Diese unterscheiden sich in Leitfähigkeit und mittlerer Öffnungszeit – sofern es sich um Zustände des geöffneten Kanals handelt – und in der Dauer ihrer Inaktivitätsperioden – sofern es sich um Zustände des geschlossenen Kanals handelt. Auf molekularer Ebene sind die physiologisch definierten, diskreten Zustände des Rezeptorkanals noch unverstanden.

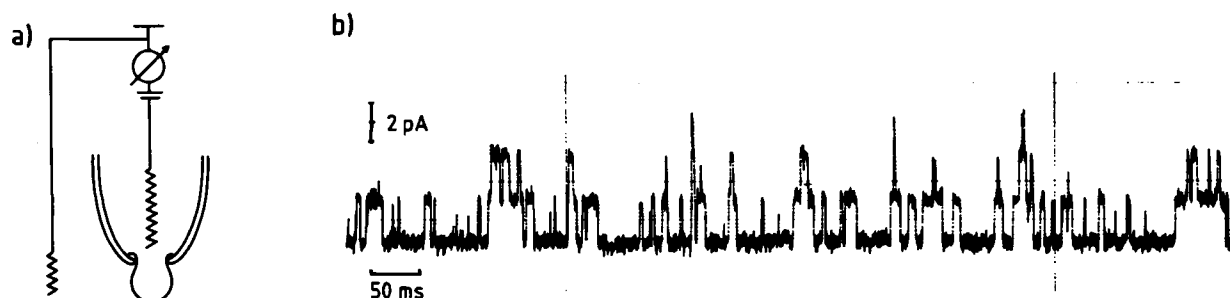


Abb. 2. Acetylcholin-induzierte Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit einzelner Ionenkanäle des Acetylcholinrezeptors. a) Nach Hamill et al. [33] wurde ein Membranstückchen eines embryonalen Rattenmuskels so an der Meßpipette festgesaugt, daß ein Übergangswiderstand von einigen GΩ erreicht wurde. Unter Bedingungen der Spannungs-klemme (die Spannung über der Membran wird während der gesamten Messung konstant gehalten) werden dann die Änderungen des Stromflusses aufgezeichnet. Diese sind den Änderungen der Membranleitfähigkeit direkt proportional. Eine derartige Anordnung wird als patch-clamp bezeichnet. Pipettenlösungen: innen 150 mM KCl, 1 mM EGTA, 4 mM HEPES, pH 7.2; außen 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 4 mM KCl, 4 mM HEPES, pH 7.2. Das Membranpotential wurde auf -70 mV festgelegt, was einer leichten Hyperpolarisation der Muskelmembran entspricht. Meßtemperatur ca. 25°C. - b) Die Strom-Zeit-Kurve wurde nach Zugabe von Acetylcholin (2 µM) zur Außenlösung aufgenommen. Wie aus den Amplituden zu erkennen ist, traten neben Einzelkanalereignissen auch Doppel- und Dreifachkanalereignisse auf (gleichzeitige Aktivierung von zwei bzw. drei Rezeptorkanälen). Die Messung wurde von Dr. C. Methfessel, Universität Bochum, durchgeführt.

Eine weitere grundlegende Eigenschaft postsynaptischer Membranen ist ihre Fähigkeit zu desensitivieren. Hierunter versteht man die Abnahme der Reizantwort – z. B. das Sinken der Stromamplitude – bei konstanter Reizung^[50–56]. Man kann die Desensitivierung als eine Schutzmaßnahme der Zelle gegen überlange Depolarisierung betrachten. Die Desensitivierung – man unterscheidet eine schnelle (in Sekunden) und eine langsame (in Sekunden bis Minuten) – ist eine Zustandseigenschaft des mit Transmitter oder Agonist besetzten Rezeptors; sie kann durch Abspaltung des Liganden vom Rezeptor wieder rückgängig gemacht werden. Die Desensitivierungsgeschwindigkeit steigt proportional mit der Agonistkonzentration, sie wird erhöht durch Temperaturerhöhung^[57], Erniedrigung der Konzentration von Na^+ und Ca^{2+} ^[58], Gegenwart nichtkompetitiver Liganden^[57, 59, 60] und Hyperpolarisation der Membran^[57]. Da auch die Resensitivierung entweder rasch oder auch relativ langsam erfolgen kann^[56, 61], scheint es für De- wie Resensitivierung jeweils wenigstens zwei Reaktionswege zu geben^[56]. Einzelkanalmessungen ergaben, daß die Desensitivierung nicht ausschließlich mit der Abnahme der Zahl der bei gleicher Agonistkonzentration aktivierten Kanäle gleichzusetzen ist, sondern daß sich unter diesen Bedingungen auch die Eigenschaften der noch öffnenden Kanäle ändern. Typisch für den desensitvierten Zustand sind eine längere mittlere Öffnungszeit des Ionenkanals, Gruppen von Öffnungs- und Schließereignissen und lange Perioden der Inaktivität^[12, 61].

Dieses sehr differenzierte Bild der elektrophysiologischen Eigenschaften postsynaptischer Muskelmembranen zeigt, daß der involvierte Rezeptor-Ionenkanal als ein in seinen Aktionsmöglichkeiten sehr variables und hoch entwickeltes biologisches Informationsübertragungselement angesehen werden muß.

3. Pharmakologische Grundlagen

Die von *Langley, Dale* und anderen^[62–64] entwickelte Rezeptorhypothese besagt, daß Verbindungen, die selbst nicht in die Zelle eindringen, deren Funktion beeinflussen können, indem sie an spezifische molekulare Strukturen an deren Oberfläche – die Rezeptoren – binden. Dieses Binden bewirkt im Rezeptor physikalische Veränderungen (z. B. Änderungen der Konformation oder des Ladungsmusters), die wiederum Eigenschaften der Zellmembran oder intrazelluläre Reaktionen beeinflussen können.

Während der Rezeptor klassisch-pharmakologisch rein funktionell definiert ist, verbinden Biochemiker mit ihm den Begriff des Moleküls oder des Molekülkomplexes. Auch in der Pharmakologie haben sich die mit dem Begriff verknüpften Inhalte verändert, da für mehrere Rezeptoren eine enge strukturelle und funktionelle Verwandtschaft gefunden worden ist. Unter dem Acetylcholinrezeptor versteht man heute nicht nur den Bereich oder die Untereinheit mit der Ligandenbindungsstelle (α -Untereinheit), sondern das Gesamt-molekül. Dieses setzt sich aus fünf Untereinheiten ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) zusammen und enthält auch den durch die Ligandenbindungsstellen regulierten Kationenkanal^[10, 12–14]. Wie sich im folgenden zeigen wird, ist diese molekulare Begriffsbildung auch deshalb nützlich, weil es mehrere Ligandentypen für den Acetylcholinrezeptor und mehrere strukturell verschiedene Bindungsstellen am Re-

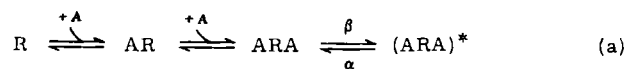
zeptor gibt. Verwendete man die klassische Definition des Rezeptors (Bindungsstelle für einen spezifischen Liganden), so stiftete dies bei der Vielzahl und der Verschiedenheit der Liganden und ihrer Bindungsstellen rasch Verwirrung.

Nach dem klassischen Besetzungsmodell der Pharmakologie^[65] gibt es nur zwei Typen von Liganden für einen Rezeptor (Bindungsstelle): *Agonisten*, deren Binden die Reizantwort induziert, und *Antagonisten*, deren Binden das von Agonisten hervorgerufene, aber keine eigene Reizantwort auslöst. Für die Liganden des Acetylcholinrezeptors erwies sich diese Einteilung jedoch als zu grob; man unterscheidet deshalb^[10, 35, 36, 66–68]:

- 1) *Agonisten* erhöhen wie Acetylcholin kurzzeitig die elektrische Leitfähigkeit der Endplatten für bestimmte Kationen und reduzieren dadurch das Membranpotential (sie wirken depolarisierend).
- 2) *Antagonisten* (kompetitive Blocker) können die Leitfähigkeit der Endplatten nicht direkt beeinflussen, kompetieren aber mit den Agonisten um die Bindungsstellen am Rezeptor. Sie können die durch Agonisten induzierte Depolarisierung der Muskelendplatte verhindern.
- 3) *Partielle Agonisten* vereinen agonistische und blockierende Eigenschaften. Sie können die durch reine Agonisten induzierte maximale Leitfähigkeitserhöhung der Muskelendplatte nicht bewirken.
- 4a) *Nichtkompetitive Blocker* beeinflussen die Eigenschaften des rezeptor-gesteuerten Ionenkanals, ohne an die Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten zu binden. Typisch für diese Klasse von Liganden sind bestimmte Lokalanästhetika.
- 4b) *Direkte Kanalblocker* blockieren den rezeptor-gesteuerten Ionenkanal, indem sie ihre Wirkung „direkt“, d. h. direkt am Kanal und nicht über die Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten ausüben. Die Abgrenzung zu den zuvor genannten nichtkompetitiven Blockern ist nicht eindeutig und wird im wesentlichen anhand elektrophysiologischer Befunde vorgenommen.

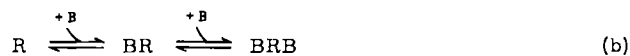
Zur Beschreibung von Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Wirkung der unterschiedlichen Ligandentypen auf den Ionenkanal werden oft die folgenden, anhand elektrophysiologischer Befunde entwickelten Modellvorstellungen herangezogen:

a) Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Kanalaktivierung ergibt sich, daß mindestens zwei Moleküle des Transmitters (oder Agonisten) A am Rezeptor R gebunden sein müssen, bevor sich der integrale Ionenkanal öffnet. In Gleichung (a) sind R, AR und ARA geschlossene (inakti-



ve) Zustände, $(\text{ARA})^*$ ist ein offener (aktiver) Zustand des Ionenkanals, k_β und k_α sind die Geschwindigkeitskonstanten des Öffnens bzw. Schließens des Kanals (die mittlere Öffnungszeit wird durch k_α bestimmt). Lediglich der letzte Reaktionsschritt ist der physiologischen Messung zugänglich; Einsicht in die vorgelagerten Schritte läßt sich nur indirekt gewinnen.

b) Kompetitive Blocker (Antagonisten) B binden an die gleichen Stellen des Rezeptors wie Agonisten, können den Ionenkanal jedoch nicht aktivieren ($k_B = 0$) und verhindern daher die Kanalaktivierung durch Agonisten [Gl. (b)].



c) Nichtkompetitive Blocker wie Lokalanästhetika L binden an spezifische Stellen am bereits durch Agonisten aktivierten (offenen) Ionenkanal [Gl. (c)]. Nach Adams^[35]



liegen diese Bindungsstellen im Kanal, so daß deren Besetzung zwei Folgen hat: Erstens wird die Kanalleitfähigkeit reduziert (teilweise Repolarisation), und zweitens wird der Zustand der Kanalöffnung „eingefroren“ (längere Kanalöffnungszeit, k_a sinkt).

d) Andere nichtkompetitive Blocker blockieren sowohl offene als auch geschlossene oder nur geschlossene Kanäle^[36].

Man muß also annehmen, daß mehrere Zustände des Agonist-gesättigten Ionenkanals existieren: nicht-aktivierter ARA, aktivierter (ARA)* und modifizierter Zustand (ARA)*L. Bedenkt man jedoch, daß bereits in Abwesenheit nichtkompetitiver Liganden elektrophysiologisch mehrere geöffnete und geschlossene Zustände des Rezeptorkanals unterschieden werden können^[44-49], so wird klar, daß obige Modelle nur grobe Vereinfachungen der wirklichen Situation sind. Dies läßt sich auch aus einer Betrachtung der Strukturformeln von Liganden (Abb. 3) folgern: 1) Die strukturellen Gemeinsamkeiten sind selbst innerhalb einer Ligandenklasse nur gering. 2) Die unterschiedlichen Wirkungsstärken der Liganden weisen darauf hin, daß selbst kompetierende Liganden nicht genau an die gleichen Bindungsstellen binden können. Die größeren, stärker hydrophoben und höher geladenen Liganden haben zusätzliche Bindungskontakte mit dem Rezeptor („subsites“), oder sie binden an andere Bindungsstellen des Rezeptors und üben ihre Wirkung über allosterische Effekte aus. 3) Die Tatsache, daß sowohl die Klassifizierung (siehe oben) der einzelnen nicotinischen Liganden als auch ihre relativen Wirkungsstärken sich für die verschiedenen nicotinisch-cholinergen Systeme unterscheiden, weist ebenfalls auf sich überhaupt nicht oder nur teilweise überlappende Kontaktstellen für die verschiedenen Liganden am Rezeptor hin.

Für den Mechanismus der Wechselwirkung von Neurorezeptoren mit ihren Liganden sind mehrere Modelle vor-

geschlagen worden. Als Alternative zum klassischen Besetzungsmodell der Pharmakologie, bei dem alle Liganden an die gleiche Bindungsstelle binden, sind schon früh allosterische Modelle eingeführt worden^[70-74]. Im Extremfall können danach zwei Liganden selbst dann vollständig kompetieren (entweder bindet nur der eine oder nur der andere an den Rezeptor), wenn sie verschiedene Bindungs-

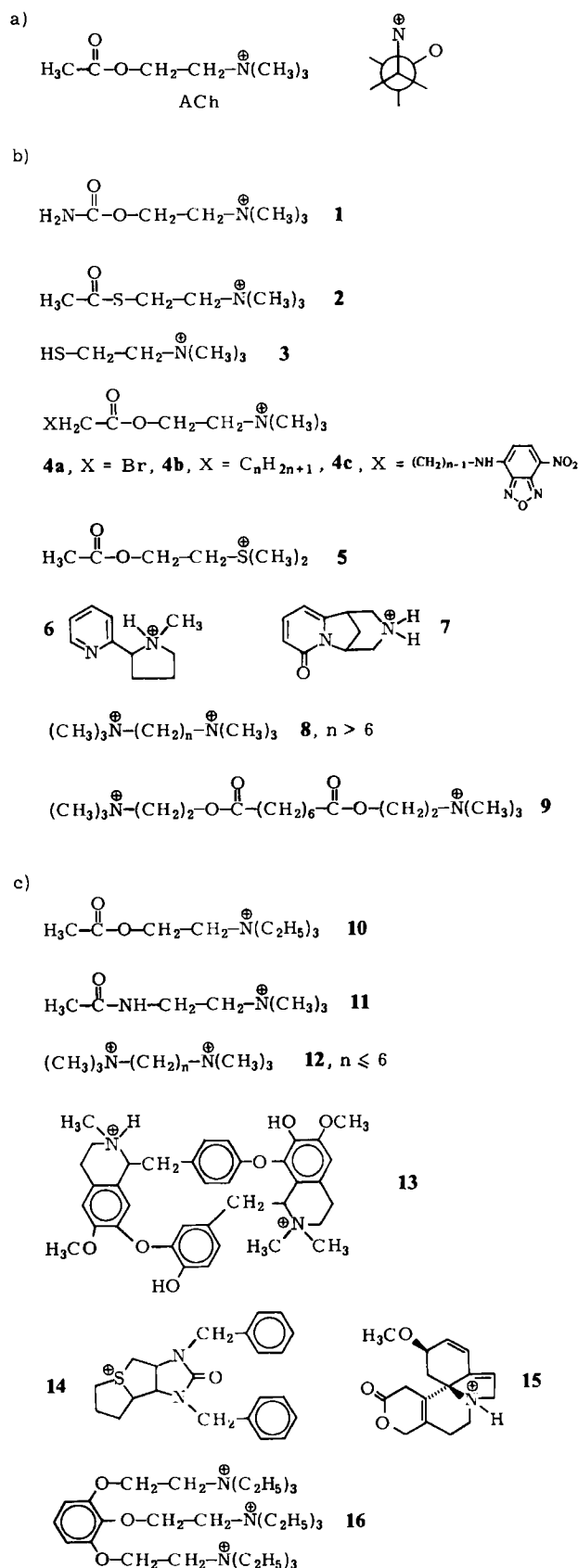


Abb. 3. Strukturformeln typischer Liganden des nicotinischen Acetylcholinrezeptors. Bei Salzen sind nur die Kationen angegeben. – a) Struktur und bevorzugte Konformation des natürlichen Transmitters Acetylcholin (ACh). – b) Strukturen nicotinischer Agonisten des Acetylcholins: 1: Carbamoylcholin, 2: Acetylthiocholin, 3: Thiocholin, 4: substituierte Acetylcholine wie Bromacetylcholin (4a), Acetylcholine (4b) und „NBD-n-acylcholine“ (Trimethyl-2-[ω-(7-nitro-4-benzofurazanyl)amino]-n-alkylcarbonyloxy]ethylammonium-Ion, 4c), 5: Sulfoniumanalogon des Acetylcholins, 6: protoniertes Nicotin, 7: protoniertes Cytisin [69], 8: „Bismethonium-Verbindungen“ (Hexamethyl-N,N'-polymethylenammonium-Ionen) mit $n > 6$, 9: Suberoyldicholin. – c) Strukturen nicotinischer Antagonisten des Acetylcholins: 10: Triethylanalogon des Acetylcholins, 11: Acetylcholinamin, 12: „Bismethonium-Verbindungen“ (Hexamethyl-N,N'-oligomethylenammonium-Ionen) mit $n \leq 6$, 13: Tubocurarin, 14: Trimethaphan, 15: β-Erythroidin, 16: Gallamin.

stellen nutzen; das Binden des einen Liganden an seine Bindungsstelle verändert die Struktur der Bindungsstelle für den anderen Liganden so, daß sie von diesem nicht mehr erkannt werden kann^[74]. Das auf *Monod et al.*^[75] zurückgehende spezielle allosterische Modell^[72,73] postuliert, daß verschiedene Zustände (Formen) des Ionenkanals bereits in *Abwesenheit* der Liganden existieren, und daß die Liganden durch ihre spezifischen Affinitäten für die verschiedenen Formen lediglich das bestehende Gleichgewicht zugunsten einzelner Formen verschieben. Dieses Modell und andere allosterische Modelle zeichnen sich unter anderem dadurch aus, daß sie in einfacher Weise die Wirkung partieller Agonisten erklären können^[76]. Der Beweis für die Gültigkeit eines der diskutierten Modelle, die andernorts im Detail beschrieben sind^[1,3,5,7,81,82], ist bisher noch nicht erbracht worden.

4. Quantitative pharmakologische und physiologische Aspekte

4.1. Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Dosis-Wirkungs-Beziehungen beschreiben die Abhängigkeit der Wirkung einer Substanz von ihrer Konzentration. Sie sind molekular umso besser zu interpretieren, je enger die untersuchte Wirkung mit der Bindungsreaktion verknüpft ist. Im Falle cholinergischer Systeme bedeutet dies, daß z. B. Messungen der Änderung der Membranleitfähigkeit (primäre Antwort) solchen der Muskelkontraktion (sekundäre Antwort) vorzuziehen sind. Grundsätzlich verbleibt jedoch, daß Dosis-Wirkungs-Kurven erst *nach* Kenntnis des zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus – und damit der Proportionalitätsbeziehung zwischen Rezeptorbesetzung und Reizantwort – quantitativ auswertbar sind. Hinzu kommen die bei einem so komplexen funktionellen Zusammenhang zu erwartenden Meßprobleme. Im cholinergen System macht sich z. B. die Desensitivierung mit höheren Agonistenkonzentrationen zunehmend bemerkbar und kann daher leicht diesen Bereich der Messung verfälschen. Deshalb werden häufig keine vollständigen Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen, sondern die relativen Wirkungen mehrerer Substanzen werden bei niedrigen Konzentrationen (bei denen die Desensitivierung noch keine Rolle spielt) verglichen.

Unabhängig davon, ob die Dosis-Wirkungs-Kurven den aktiven Zustand des Rezeptors einwandfrei beschreiben oder nicht, sind für alle cholinergen Agonisten stets nur sigmoide Kurven gefunden worden^[51,77–79], und diese lieferten Hill-Koeffizienten^[*] zwischen 1.5 und 2^[51,77,78] oder 2.7^[79]. Setzt man simultanes Binden der Agonistmoleküle an den Rezeptor voraus, so würde dies das Vorhandensein von zwei oder mehr positiv-kooperativ wechselwirkenden Agonistbindungsstellen am Rezeptor implizieren. Die nicht-ganzzahligen Hill-Koeffizienten < 2 würden auch durch sukzessives Binden zweier Agonistmoleküle an den Rezeptor zu erklären sein, da die Auftragung nach *Hill* unter diesen Bedingungen mit der Steigung 2 begänne und diese schließlich auf 1 absänke^[80].

[*] Der Hill-Koeffizient ist die Steigung des mittleren, linearen Teils der Auftragung von $\lg \frac{z}{z_{00} - z}$ gegen $\lg A$, wobei z , z_{00} und A die von der Agonistkonzentration A bewirkte Reizantwort z bzw. die maximale Reizantwort z_{00} bedeuten.

Schließt man vom Hill-Koeffizienten auf die Zahl der Bindungsstellen am Rezeptor, so nimmt man an, daß die induzierte Wirkung direkt proportional zur Rezeptorbesetzung ist. Dies muß keineswegs so sein, da die meisten physiologischen Daten darauf hindeuten, daß der Rezeptor-Ionenkanal nur nach Besetzung mit *zwei* Molekülen Agonist in den aktiven Zustand übergehen kann. Ist die Wirkung deshalb nur der Konzentration an zweifach besetztem Rezeptor – und nicht der Gesamtzahl der besetzten Bindungsstellen – proportional, so ergeben sich auch dann sigmoide Dosis-Antwort-Kurven, wenn keine Kooperativität zwischen den beiden Bindungsstellen am Rezeptor besteht^[31,81,82]. Die Form von Dosis-Antwort-Kurven und der Betrag des Hill-Koeffizienten sind daher nur von geringer Aussagekraft für den Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor.

Dagegen ist die aus Dosis-Antwort-Kurven zu erhaltende Konzentration, bei der die Hälfte der maximalen Wirkung erreicht wird („halbmaximale Wirkkonzentration“), eine wichtige Meßgröße. Direkte Proportionalität mit der Belegung beider oder der zweiten Bindungsstelle vorausgesetzt, hat sie den gleichen Betrag wie die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Besetzung der zweiten Bindungsstelle. Tabelle 1 enthält die halbmaximalen Wirkkonzentrationen und die Hill-Koeffizienten für einige wichtige Agonisten.

Tabelle 1. Halbmaximale Wirkkonzentrationen und Hill-Koeffizienten einiger cholinergischer Agonisten [a].

Ligand	K_{app} [μM]	n	n_d
Acetylcholin	27.8	2.7	2
Carbamoylcholin	336	2.2	1.8
Suberoyldicholin	18	—	—
Nicotin	—	1.7	1.5

[a] Nach *Peper et al.* [79]. Die Daten wurden bei Raumtemperatur an Skelettmuskelfasern des Frosches erhalten. K_{app} : halbmaximale Wirkkonzentration; n , n_d : Hill-Koeffizienten, gemessen an normalen und denervierten Muskelzellen. Weitere K_{app} -Werte siehe Tabelle 3.

4.2. Die maximale Reizantwort

Geht man vom klassischen Besetzungsmodell (Abschnitt 3)^[65] aus, so hängt das Ausmaß der Wirkung stets nur von der Konzentration der mit Agonist besetzten Rezeptoren ab, und alle Agonisten müßten daher die gleiche maximale Reizantwort erzeugen können. Dies trifft wie bei anderen Systemen auch im cholinergen System nicht zu. So beträgt z. B. die maximale Reizantwort auf Carbamoylcholin an Froschmuskelfasern nur etwa 80% derjenigen auf Acetylcholin^[79]. Agonisten mit einer maximalen Reizantwort, die kleiner ist als die von Acetylcholin, werden als „partielle Agonisten“ (siehe auch Abschnitt 3) bezeichnet; sie sollen eine geringere „innere Aktivität“^[83] oder „Effizienz“^[84] als Agonisten aufweisen. *Ariens*^[83] beläßt dabei die lineare Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und Wirkung, aber ordnet verschiedenen Liganden verschiedene Proportionalitätsfaktoren zu; nach *Stephenson*^[84] wird die für jeden Liganden spezifische maximale Reizantwort bei unterschiedlicher Besetzung des Rezeptors erreicht. Andere Erklärungen für die Unterschiede in der maximalen Wirkung von Agonisten und die Existenz von partiellen Agonisten erscheinen gleichermaßen plausibel^[10]. Hier werden nur di-

rekte Untersuchungen der Wechselwirkung des Rezeptors mit seinen Liganden die Klärung bringen können.

4.3. Chemische Modulation der Ligandenwirkung

Als Karlin und Bartels^[85] 1966 zeigten, daß die Reizantwort auf Acetylcholin und einige Agonisten nach Behandlung der verwendeten Präparationen mit Dithiothreitol (DTT) oder *p*-Chlormercuribenzoat (PCMP) stark reduziert ist, war dies zunächst ein wichtiger Hinweis auf die Proteinatur des Acetylcholinrezeptors. In der Folgezeit fand man^[86, 87], daß durch DTT eine Disulfidbrücke in unmittelbarer Nachbarschaft der Bindungsstelle für Acetylcholin geöffnet wird. Die freigesetzten SH-Gruppen eignen sich zur irreversiblen Affinitätsmarkierung des Rezeptors, z. B. mit Bromacetylcholin oder [4-(*N*-Maleimido)benzyl]trimethylammoniumiodid (MBTA); die Modifizierung durch DTT verändert außerdem die Wirkungsstärke und/oder die pharmakologische Klassifizierung einiger cholinergischer Liganden^[82, 86–91]. So erhöht sich an den Elektroplaxzellen des Zitteraales (*Electrophorus electricus*) die halbmaximale Wirkkonzentration von Acetylcholin um etwa eine Größenordnung, und der cholinerge Antagonist 8, n=6 (Abb. 3), wird zum Agonisten. Insbesondere aber werden nach DTT-Behandlung viele partielle Agonisten zu Agonisten des Acetylcholins. Der Redoxzustand der Disulfidbrücken des Rezeptors scheint außerdem mit der Desensitivierung in Verbindung zu stehen^[92]. Chemische Reaktionen an der Disulfidbrücke des Rezeptors sind daher zu wichtigen Hilfsmitteln bei der biochemischen Analyse der Rezeptorfunktion geworden^[82, 90–95].

5. Biochemische Präparationen und die Struktur des Acetylcholinrezeptors

Die biochemische Charakterisierung nicotinischer Acetylcholinrezeptoren begann mit Lees Entdeckung der antagonistischen Wirkung der α -Toxine von Giften der Schlangenfamilie *Elapidae*^[96]. Diese Toxine (z. B. α -Bungarotoxin, α -Cobratoxin) zeichnen sich neben ihrer hohen Affinität für den Rezeptor dadurch aus, daß ihre Komplexe mit dem Rezeptor extrem langsam dissoziieren; sie sind also besonders gute Affinitätsliganden. Von noch größerer Bedeutung war zunächst die Spezifität ihrer Wirkung: Im Gegensatz zu den bekannten niedermolekularen Antagonisten (und Agonisten) binden sie nicht an die Acetylcholinesterase. Damit ermöglichten sie erstmals die eindeutige Unterscheidung zwischen dem Rezeptor und diesem synaptischen Enzym. Bindungsstellen für die α -Neurotoxine sind inzwischen in vielen Geweben, z. B. im Gehirn^[91, 97–102], in der Retina^[103–105], im Sperma^[106] und in sympathischen Ganglionen^[107] von Säugetieren und anderen Tierklassen^[108–112], nachgewiesen worden. In einigen Systemen ähneln die Toxinbindungsproteine den nicotinischen Rezeptoren^[108, 112–114], in anderen ist diese Beziehung noch nicht geklärt^[115–117]. Von den Geweben, aus denen Acetylcholinrezeptoren in reiner Form gewonnen worden sind – den elektrischen Organen von *Torpedo* und *Electrophorus* sowie mehreren Arten von Muskelgeweben und Muskelzellkulturen^[118–131] –, beschränken wir uns hier auf die elektrischen Gewebe. Zwar sind vom medizinisch-bio-

logischen Standpunkt die Acetylcholinrezeptoren des Gehirns und der Säugetiermuskel erheblich interessanter, doch lassen sich aus den elektrischen Geweben so viel größere Mengen an Rezeptor isolieren, daß diese bisher ausschließlich für tiefergehende biochemische Studien herangezogen worden sind.

Wie bei jeder subzellulären Fraktionierung muß auch bei der Reinigung des Acetylcholinrezeptors die zelluläre Proteaseaktivität kontrolliert werden. Von besonderer Bedeutung sind hierbei SH- und Ca-aktivierte Proteasen^[125, 127, 132, 133]; sind diese inhibiert, so lassen sich stabile und in ihrer Struktur gut definierte Rezeptorpräparationen erhalten.

5.1. Der membrangebundene Rezeptor

Mit hochauflösender Autoradiographie fand man nach Markierung mit radioaktivem α -Toxin, daß die Packungsdichte der Acetylcholinrezeptoren in den synaptischen Bereichen sehr viel höher ist als in den extrasynaptischen^[134]. In den subsynaptischen Bereichen werden Rezeptordichten bis zu 30 000 pro μm^2 erreicht^[134, 135]; in den extrasynaptischen Bereichen beträgt die Rezeptordichte nur etwa 500 pro μm^2 . Durch das hohe Verhältnis von Protein zu Lipid (> 1.5)^[136] in den rezeptorreichen Gebieten sind diese nach Gewebekomogenisierung leicht durch Dichtegradienten-Zentrifugation von anderen Membranfragmenten zu separieren. In den so erhaltenen Membranen von elektrischen Organen aus *Torpedo* ist der Rezeptor bereits die Hauptproteinkomponente (bis zu 30%). Mit alkalischen Puffern^[137] lassen sich noch einige Fremdproteine entfernen, so daß der Rezeptor in den Membranen schließlich einen Anteil von 40–50% hat. Die Alkalibehandlung läßt die Fettsäure- und Phospholipidzusammensetzung der Membranen im wesentlichen unverändert^[138]; Das Cholesterin-Phospholipid-Verhältnis beträgt 0.4^[139], das Verhältnis von Phosphatidylcholin zu Phosphatidylethanolamin etwa 1^[138–140]. Das auffälligste Ergebnis der Alkalibehandlung ist die Herauslösung eines peripheren Membranproteins (α' , $M_r \approx 43\,000$), das eng mit dem Rezeptor assoziiert ist und strukturstabilisierende Wirkung hat^[137, 141–143]. Nach seiner Entfernung ist der Rezeptor in der Membran beweglicher^[94, 163–165].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen solcher Membranen von *Torpedo* zeigen nach negativer Kontrastierung eine hohe Dichte rosettenartiger Gebilde (Abb. 4a), die sich gelegentlich zu pseudohehexagonalen Reihen anordnen (in Abb. 4 nicht zu sehen). Die unsymmetrisch ringförmigen Gebilde von ca. 7–9 nm Durchmesser weisen einen kontrastreichen zentralen Fleck von ca. 2 nm Durchmesser auf (Abb. 4b). Seitenansichten negativ kontrastierter Membranen und Gefrierätzexperimente ergaben ferner, daß der Rezeptor etwa 50 Å auf der extrazellulären Seite und etwa 15 Å auf der cytoplasmatischen Seite aus der Lipidschicht herausragt. Aus einer derartigen Untersuchung vieler Partikeln ist ein Strukturmodell des Rezeptors (Abb. 4c) entwickelt worden^[143–153], das auch durch Ergebnisse von Röntgenkleinwinkel- und Neutronenstreuexperimenten gestützt wird^[145, 154]. Eine Vielzahl direkter und indirekter Versuche beweist, daß es sich bei den Ringstrukturen um Acetylcholinrezeptoren handelt; es ist auch gesichert, daß dabei weder Strukturen noch Funktionen des Rezeptors

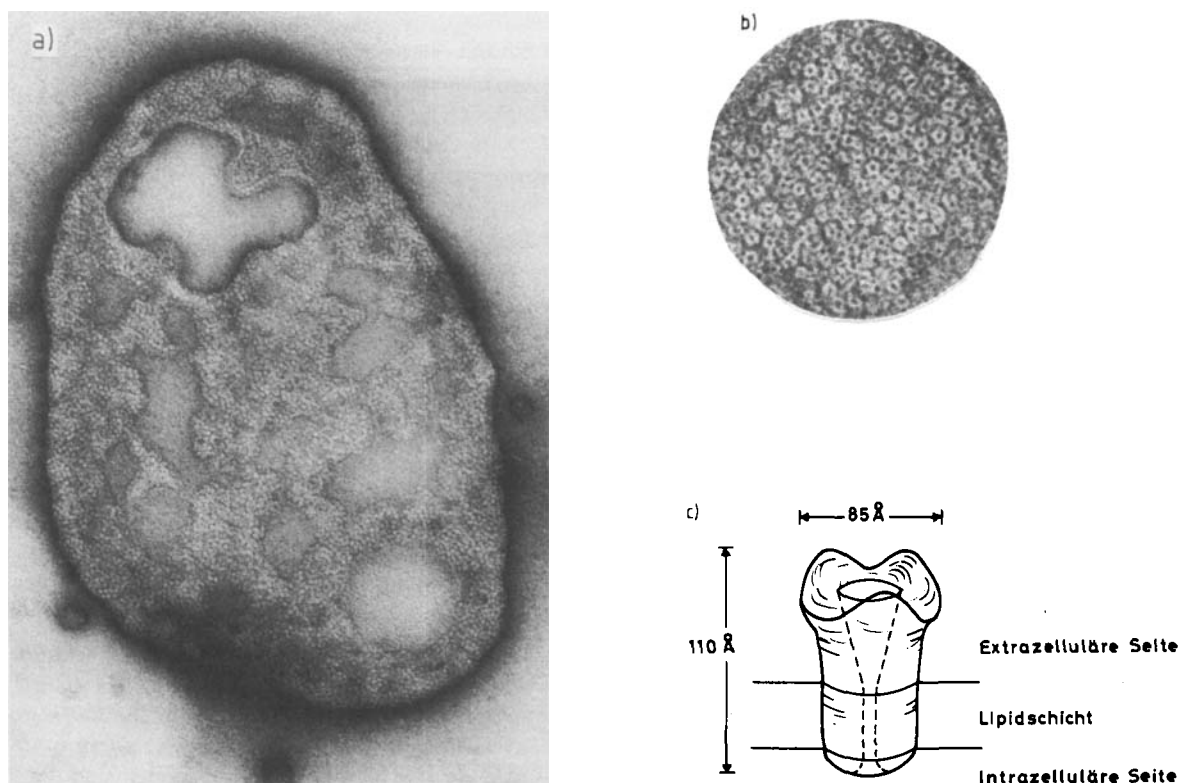


Abb. 4. a) Elektronenmikroskopische Aufnahme rezeptorreicher Membranvesikel von *Torpedo marmorata*. Membranvesikel, in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7.4, wurden mit 1proz. Phosphorwolframsäure (pH 7.4) negativ kontrastiert. Vergrößerung ca. 85 000fach. – b) Vergrößerung eines Ausschnittes; die runden Strukturen haben einen Durchmesser von 7–9 nm, ihr innerer Fleck hat einen Durchmesser von 2 nm. – c) Modell des Acetylcholinrezeptors, entwickelt anhand der elektronenmikroskopischen Befunde. Die elektronenmikroskopische Aufnahme stammt von S. Reinhardt, Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin [155]; das Modell wurde in Anlehnung an Kistler et al. gezeichnet [150].

durch die Kontrastierungsmittel verändert werden^[155]. Raman-spektroskopische Studien^[156] weisen auf einen hohen Gehalt an α -Helix in diesen Membranen hin.

Die Membranfragmente von *Torpedo* ergeben bei der SDS-Gelelektrophorese vor Alkalibehandlung zwei (Molekulargewicht 40 000, 43 000), nach Alkalibehandlung eine Hauptbande (40 000) und mehrere Nebenbanden (50 000, 60 000, 68 000 und 90 000)^[132, 140, 157–161]. Das Polypeptid mit dem Molekulargewicht 43 000 ist ein peripheres Membranprotein und das mit 90 000 ist eine Untereinheit der ATPase, beides also keine Komponenten des Rezeptors. Die übrigen Polypeptide werden auch in den Gelen des gereinigten Rezeptors beobachtet. Durch selektive Proteolyse^[162] und mit Antikörpern^[161, 166, 167] ist gezeigt worden, daß alle vier Rezeptor-Polypeptiduntereinheiten die Lipidmembran durchdringen. Das nicht zum Rezeptor gehörige 43 000-Polypeptid kann nur von der cytosolischen Seite der Membran erreicht werden^[162].

Rezeptor-reiche Membranfragmente eignen sich unter anderem für Messungen der Wechselwirkung von Liganden mit dem Rezeptor (Abschnitt 6) sowie der Agonist-induzierten Leitfähigkeitsänderungen^[9] und Ionenflüsse^[2, 6]. Somit sind sie das einfachste noch „natürliche“ System, an dem die cholinerge Reizung studiert werden kann.

5.2. Der gereinigte Rezeptor

Als integrales Membranprotein ist der Acetylcholinrezeptor nicht wasserlöslich. In wäßriger Phase kann er daher nur in mikroheterogener Form (in Micellen mit Detergens vergesellschaftet) dispergiert werden. Um die Bin-

dungsfunktion nicht zu beeinträchtigen, werden nichtionische Detergentien zur Herauslösung des Rezeptors aus der umgebenden Membran benutzt. Dabei werden Detergentien mit kleiner kritischer Micellenkonzentration verwendet, die dann gegen mildere Detergentien ausgetauscht werden^[118–120, 125].

Typische Rezeptorreinigungen^[125] beginnen mit der Homogenisierung des elektrischen Organs in Gegenwart von Proteaseinhibitoren. Die Membranfragmente werden dann zentrifugiert und mehrfach in Puffern verschiedener Ionenstärke „gewaschen“. Durch Filtration werden noch verbliebene Bindegewebsreste abgetrennt; die Membransuspension wird mit Triton X-100 bis zur Konzentration von 1% verdünnt und 1 h gerührt; Ultrazentrifugation (ca. 50 000 g, mehrere h) der Suspension liefert im Überstand den Rezeptor, der dann durch Affinitätschromatographie weiter gereinigt werden kann. Dafür bieten sich die folgenden Verfahren an: 1. Die klassische Methode benutzt α -Neurotoxine als Affinitätsliganden^[118–120]. Aufgrund ihrer hohen Affinität und kleinen Rückreaktionsgeschwindigkeit garantieren diese die optimale Abtrennung des Rezeptors von Fremdproteinen einschließlich der Acetylcholinesterase. Das Problem, daß der Rezeptor wegen der kleinen Dissoziationskonstanten nur sehr schwer vom immobilisierten Liganden verdrängt werden kann, ist nicht prohibitiv, weil die Dissoziation von Rezeptor-Toxin-Komplexen durch hohe Konzentrationen niedermolekularer Liganden um mehrere Größenordnungen beschleunigt werden kann^[74, 168, 169]. 2. Da ihre Komplexe mit dem Rezeptor bereits innerhalb von Sekunden vollständig dissoziieren, eignen sich niedermolekulare Liganden des Rezep-

tors nur begrenzt als Affinitätsliganden. Zwar wird durch die Ligandenimmobilisierung eine deutlich höhere Verweilzeit des Rezeptors am Ligand erreicht, doch können die Säulen nicht so rigoros und häufig wie die Toxinsäulen ohne Ausbeuteeinbußen gewaschen werden. Niedermolekulare Affinitätsliganden haben sich deshalb nur bei solchen Präparationen bewährt, bei denen eine geringe Anreicherung des Rezeptors ausreicht^[170]. 3. Monoklonale Antikörper gegen verschiedene Bereiche des Rezeptors^[159, 171–176] sind als Liganden prinzipiell ebenfalls für die Rezeptorreinigung geeignet. Wegen der Erfolge, die mit den beiden ersten Methoden erzielt worden sind, haben sie hierfür jedoch noch keine breite Anwendung gefunden^[177]. 4. Der Rezeptor bindet als Glycoprotein bestimmte Pflanzenlektine^[120, 121, 178–181]; ihr Wert als Affinitätsliganden ist allerdings umstritten^[121].

Die klassische Reinigung des Rezeptors an Toxin-Affinitätssäulen^[119–125, 168] benutzt α -Cobratoxin, immobilisiert an Sepharose, die mit CNBr aktiviert wurde. Um die Dissoziation des Rezeptor-Toxin-Komplexes am Affinitätsgel optimal zu gestalten, werden Gele geringer Toxinbindungskapazität verwendet^[125, 168]. Auf diese Weise wird vermieden, daß Rezeptoren über mehr als ein Toxinmolekül an das Gel gebunden werden^[182]. Affinitätsgel und Membranextrakt werden mehrere Stunden langsam gerührt, dann wird die Säule gepackt und mit Puffern gewaschen. Wenn in der Waschlösung kein Protein mehr nachweisbar ist, wird der Rezeptor mit einem Antagonist-haltigen Puffer (0.005–0.1 M an 8, n=6^[125, 168]) eluiert. Das Eluat wird über eine Säule (Hydroxyapatit^[119]) geleitet, deren Gelmaterial den Rezeptor, nicht aber den freien Liganden adsorbiert. Die rezeptorfremige Ligandenlösung wird dann zur weiteren kompetitiven Ablösung des Rezeptors

vom Toxingel wieder in die Affinitätssäule geleitet (Recycling)^[119]. Wenn nach einigen Stunden der Rezeptor vollständig von der Toxinsäule eluiert und an die Hydroxyapatitsäule gebunden ist, wird diese von der Affinitätssäule getrennt und gewaschen. Anschließend wird der Rezeptor mit Phosphatpuffer von der Hydroxyapatitsäule eluiert. Mit dieser Methode können aus 1 kg elektrischem Organ von *Torpedo* etwa 30–100 mg des reinen Rezeptors gewonnen werden^[125], der eine Esterase-Restaktivität von ca. 0.1% aufweist^[125].

Wie durch Elektrophorese, isoelektrische Fokussierung, Sedimentation in Dichtegradienten, Gleichgewichtssedimentationsstudien und Laserlichtstreuung gezeigt werden konnte^[125, 183–185], tritt der so gereinigte Rezeptor als Gemisch aus Monomer und Dimer auf (Abb. 5). Disulfid-reduzierende Reagentien oder hohen Konzentrationen nicht-ionischer Detergentien spalten das Dimer vollständig zum Rezeptormonomer^[125, 157, 160, 186–189]. Aus Präparationen von *Torpedo* ist unter gleichen Bedingungen erheblich mehr Dimer zu gewinnen als aus denen von *Electrophorus*^[125].

Die Existenz von je zwei Formen des Rezeptormonomers und des Rezeptordimers bei *Torpedo* (Abb. 5^[125]) weist bereits auf eine nichtglobuläre Struktur des Rezeptors in Lösung hin. Dabei stehen die Formen des Rezeptors miteinander in einem Gleichgewicht, das von Art und Konzentration des gebundenen Detergens sowie des Redoxzustandes bestimmter Cysteinreste abhängt (Abb. 5). Deshalb haben die hydrodynamischen Eigenschaften des Rezeptors sowie von diesen abgeleitete Größen wie das Molekulargewicht für lange Zeit zu Kontroversen Anlaß gegeben^[1, 2, 4]. Folgendes gilt heute als gesichert: Der in nichtionischen Detergentien gelöste Rezeptor von *Electrophorus*, der vorwiegend als Monomer vorliegt, hat einen

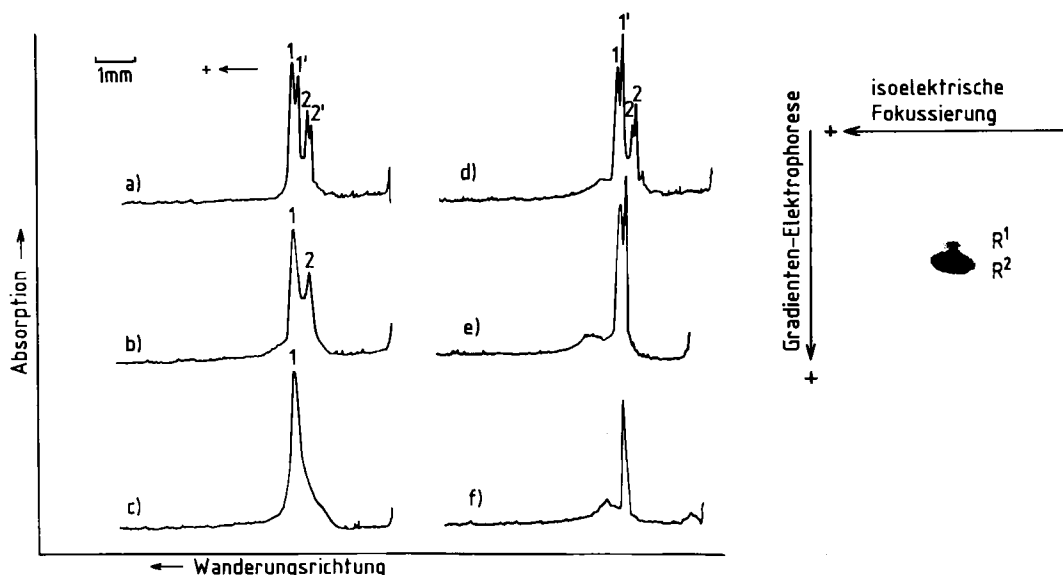


Abb. 5. Gelelektrophorese des gereinigten Acetylcholinrezeptors von *Torpedo* unter mehreren Bedingungen. – Links: Anodische Elektrophorese des von der Hydroxyapatitsäule desorbierten und durch Gelfiltration entsalzten Rezeptors in cylindrischen Gradienten-Mikrogelen in Gegenwart von a) 0.1% Octylglucosid, b) 20 mM Dithiothreitol und c) 20 mM Dithiothreitol und 1% Triton X-100. Unter nicht-denaturierenden Bedingungen (niedrige Konzentrationen eines milden Detergens) (a) tritt der Rezeptor in je zwei Formen des Monomers (1, 1') und des Dimers (2, 2') auf. Disulfid-reduzierende Reagentien (b) spalten die beiden Dimere vollständig in zwei Monomere. Diese sind ineinander umwandelbar (durch Veränderung der Konzentration oder der Art des Detergens); unter den Bedingungen c) liegt nur ein Monomer vor. – Mitte: Anodische Elektrophorese in cylindrischen Gradienten-Mikrogelen des gereinigten *Torpedo*-Rezeptors in Gegenwart von d) 0.05% Tween 80, e) 0.4% Triton X-100 und f) 2% Triton X-100. Im Vergleich zu den links gezeigten Ergebnissen a)–c) wird demonstriert, daß die Umwandlung der Dimere in die Monomere, und der beiden Monomere in die verbleibende monomere Form auch durch nichtionische Detergentien erreicht werden kann. – Rechts: Zweidimensionale Mikroelektrophorese des Acetylcholinrezeptors von *Electrophorus* und Markierung der Banden mit ¹²⁵I- α -Bungarotoxin. Zwei Rezeptor-Toxin-Komplexe, die sich in ihrer Größe, nicht aber im isoelektrischen Punkt unterscheiden, sind nachzuweisen [125].

Stoke-Radius von 7 nm^[119,120,190], Monomer und Dimer des Torpedo-Rezeptors haben Stoke-Radien von 7 nm bzw. 8.5 nm^[191,192]; durch Sucrosegradienten-Zentrifugation^[193] und durch Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit im Schwerfeld^[125] werden entsprechend Sedimentationskoeffizienten von ca. 9 S, 9.3 S bzw. 14.4 S gefunden. Da sich Monomer und Dimer nicht spontan ineinander umwandeln, können sie getrennt untersucht werden. Für das Rezeptormonomer von *Torpedo* wurde nach der Dichteanpassungsmethode von Tanford et al.^[194,195] (Ultrazentrifuge) ein Molekulargewicht von $250\,000 \pm 7000$ ^[196] bestimmt; wir fanden einen Wert von $275\,000 \pm 15\,000$ ^[125,185]. Für das Rezeptormonomer von *Electrophorus* sind Werte von $262\,000 \pm 12\,000$ (Ultrazentrifuge)^[125] und $287\,000 \pm 8000$ (Laserlichtstreuung)^[125,185] ermittelt worden. Aus den bekannten Sequenzen aller Untereinheiten des Torpedo-Rezeptors^[197-201] läßt sich bei der Untereinheitenzusammensetzung $\alpha_2\beta\gamma\delta$ ^[202] ein Molekulargewicht für das Monomer von 268 000 errechnen. Aus dem Diffusionskoeffizienten $D_{20,w} = 2.95 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und dem Sedimentationskoeffizienten $s_{20,w} = 9.29$ ^[125] ergibt sich ein Verhältnis der Reibungsfaktoren f/f_0 von 1.51^[*], was auf eine unsymmetrische Struktur des in wenig Detergens (0.05% Tween 80) gelösten Rezeptormonomers von *Torpedo* hinweist. Die relativ niedrigen Werte von $D_{20,w}$ und $s_{20,w}$ für ein Molekül dieser Größe deuten außerdem auf eine lose (z. B. teilweise entfaltete Struktur) des Rezeptors in Lösung hin.

Vergleicht man die scheinbaren Molekulargewichte der Rezeptoruntereinheiten, die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erhalten wurden, mit den aus den Proteinsequenzen ermittelten^[197-201], so erweist sich die Gelelektrophorese als relativ unzuverlässig für dieses integrale Membranprotein. Elektrophoretisch sind die folgenden scheinbaren Molekulargewichte für die Untereinheiten (exakte Werte aus den Gensequenzen in Klammern) bestimmt worden: 40 000 (50 200), 50 000 (53 681), 60 000 (56 279) und 67 000 (57 565). Danach wäre auch das typische Bandenmuster des Rezeptors, das bei der Gelelektrophorese entsteht^[68, 87, 120, 121, 123, 136, 140, 179, 183, 186, 203, 204], ein Artefakt, das durch unterschiedliche Affinitäten der Untereinheiten für die verwendeten Detergentien sowie durch unterschiedliche Formen und/oder Packungsdichten zustande kommt. Diese Probleme lassen sich auch nicht durch teilweise Vernetzung der Untereinheiten über difunktionelle Reagentien vermeiden^[203,204]. Somit können die falschen, durch SDS-Gelelektrophorese erhaltenen Molekulargewichte auch nicht ausschließlich durch die Verwendung wasserlöslicher Proteine als Standards zustande gekommen sein^[205]. Die unregelmäßigen Abweichungen von den exakten Werten müssen ihren Grund in den unterschiedlichen Strukturen der Untereinheiten in SDS-Micellen haben.

Der starke Einfluß des Detergens auf die Struktur des gelösten Rezeptors zeigt sich auch daran, daß sich die Dimere des Torpedo-Rezeptors allein durch die Anwesenheit nichtionischer Detergentien in hoher Konzentration in Monomere spalten (Abb. 5^[125,157,205-207]). Dies bedeutet, daß die Disulfidbrücke zwischen den δ -Untereinheiten des

Dimers^[186-188] auch ohne Disulfid-reduzierende Reagentien gespalten werden kann. Die detergens-induzierte Öffnung dieser Disulfidbrücke gelingt allerdings nur dann, wenn die freien SH-Gruppen des Rezeptors nicht blockiert sind^[125]. Dies deutet auf eine Umorientierung der Disulfidbrücken (aus der intermolekularen Brücke entstehen durch Wechselwirkung mit freien SH-Gruppen zwei intramolekulare Disulfidbrücken) in Gegenwart von Detergens, ein weiteres Ergebnis, das die große Strukturflexibilität des Rezeptors demonstriert.

Bisher wurden nur über δ -Untereinheiten verknüpfte Dimere in Torpedo-Präparationen gefunden^[186-188]. Ob die Bildung der entsprechenden Disulfidbrücke durch die Anordnung der Rezeptormoleküle im subsynaptischen Bereich zustande kommt^[151,152] oder von begleitenden Membrankomponenten abhängt^[186], ist noch nicht geklärt. Die Spaltung der Disulfidbrücke scheint nicht die postulierte^[186,187] besondere Membrankomponente – ein Protein mit SH-Gruppen ungewöhnlich niedrigen Redoxpotentials und großer Nähe zum Rezeptor^[186] – zu benötigen^[125]. Spaltung und Knüpfung der Disulfidbrücke können daher unter verschiedenen Bedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen^[187,189] führen.

Es ist postuliert worden, das Dimer sei die biologisch aktive Form des Rezeptors^[187]. Der hohe Anteil an Monomer in den gereinigten Rezeptorpräparationen^[118-131] entstünde durch Nebenreaktionen bei der Solubilisierung des Rezeptors, z. B. durch die Exponierung zusätzlicher SH-Gruppen^[188] (etwa 25% der Cysteinylreste des Rezeptors liegen normalerweise frei vor^[186,188]). Physiologische und biochemische Versuche sowie Rekonstitutionsexperimente^[12,14,82,85,90,91] sprechen gegen diese Annahme, obwohl eine begrenzte Modulation der Rezeptoreigenschaften durch Dimerisierung nicht ausgeschlossen werden kann. Ein quantitativer Vergleich der Eigenschaften von Monomer und Dimer ist bisher nur für die Wechselwirkung mit α -Cobratoxin angestellt worden^[125]; dabei stieß man auf keine wesentlichen Unterschiede.

Der gereinigte Rezeptor hat einen relativ niedrigen isoelektrischen Punkt ($\text{pH}_I = 5$)^[118,208,209], wobei geringe Unterschiede zwischen synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren bestehen^[210]. Alle Untereinheiten des Rezeptors sind Glycoproteine und binden daher Concanavalin A und andere Pflanzenlectine^[120,162,179,210-212].

Die Bestimmung der Aminosäuresequenzen der Rezeptoruntereinheiten hat sich als schwierig erwiesen^[201,213,214]; Klonierung und Sequenzierung der Gene des Rezeptors ermöglichten in den letzten Jahren die rasche Ermittlung der Sequenzen aller Untereinheiten des Torpedo-Rezeptors^[197-201] sowie der α -Untereinheiten der Muskelrezeptoren von Rind und Mensch^[215]. Damit können viele wichtige Probleme zur Struktur und Funktion des Rezeptors auf molekularer Ebene quantitativ untersucht werden: Die genauen Positionen der Ligandenbindungsstellen, des Ionenkanals und der Disulfidbrücke in der Nähe der Bindungsstellen für Agonisten auf der α -Untereinheit sowie der Positionen für Phosphorylierung^[216-223], *N*-Glycosylierung^[224] und Methylierung^[225], können nun festgelegt werden.

Anhand der Aminosäuresequenzen des Torpedo-Rezeptors sind Hydrophilieprofile^[226] aufgestellt und Sekundärstrukturen^[227] vorausgesagt worden. Nach diesen scheint

[*] f_0 ist der Reibungskoeffizient eines kugelförmigen Gegenstandes; f/f_0 ist daher ein Maß für die Abweichung von der kugelförmigen Gestalt.

es in allen Untereinheiten des Torpedo-Rezeptors jeweils vier Sequenzsegmente zu geben, die die Membran durchdringen und deshalb an der Bildung des rezeptor-integralen Ionenkanals beteiligt sein könnten^[197, 200, 201, 215]. Die Sequenzhomologien bei den α -Untereinheiten der Rezeptoren von *Torpedo*, Rind und Mensch machen es wahrscheinlich, daß diese Rezeptoren nach den gleichen Strukturprinzipien in die Membran eingebaut sind^[215].

Da eine Kompartimentgrenze fehlt, können mit dem gelösten Rezeptor prinzipiell keine Ionenflüsse und somit auch keine Reizantworten gemessen werden. Die Präparationen eignen sich daher besonders für das Studium der Eigenschaften des Rezeptors, die allein von der Proteinstruktur abhängen und potentialunabhängig sind; dabei ist dann eine Genauigkeit zu erreichen, die mit derjenigen der biochemischen Charakterisierung löslicher Proteine vergleichbar ist.

5.3. Der rekonstituierte Rezeptor

Der Acetylcholinrezeptor ist zunächst nur als Protein mit Bindungsstellen für cholinerge Liganden gereinigt worden^[118–132]. Dies entsprach dem klassischen pharmakologischen Konzept des Rezeptors als spezifischer Bindungsstelle^[62–64]. Erst durch Rekonstitutionsexperimente wurde bewiesen, daß der Rezeptor nicht nur die Ligandenbindungsstellen, sondern auch den von diesen gesteuerten Ionenkanal enthält^[12]. Präparationen des rekonstituierten Rezeptors sind von großer Bedeutung für die Begriffsbildung gewesen; darüber hinaus dienten sie der Untersuchung der Beziehung zwischen Rezeptor- und Membranstruktur sowie der funktionellen Eigenschaften des Ionenkanals.

Unter Rekonstitution des Acetylcholinrezeptors versteht man den Einbau des gereinigten Rezeptors in eine Lipidmembran mit anschließendem Nachweis Agonist-induzierbarer Änderungen der Membranleitfähigkeit. In Bezug auf die elektrophysiologischen Eigenschaften cholinerg postsynaptischer Membranen (Abschnitt 2) bedeutet Rekonstitution im strengen Sinne den Aufbau eines noch zur cholinergen Reizung fähigen Systems aus der kleinsten Zahl von Einzelkomponenten. Ein solches Minimalsystem sollte Einzelkanaleigenschaften aufweisen, die denen intakter Muskelendplatten ähneln und pharmakologische Spezifität zeigen. Dieses Ziel ist in den letzten Jahren schrittweise erreicht worden.

Mit den ersten Rekonstitutionsexperimenten^[183, 228–240] wollte man natürlichen Membranvesikeln ähnliche, zur Messung von Ionenflüssen geeignete Strukturen^[228, 241, 242] erzeugen. Dazu wurde der solubilisierter und gereinigte Rezeptor mit künstlichen Lipidvesikeln vermischt und das Detergens durch Dialyse oder Filtration weitgehend entfernt. Die so erhaltenen Membranvesikeln wurden dann mit radioaktiven einwertigen Kationen beladen, und die Entladungsgeschwindigkeit in Abwesenheit und Anwesenheit cholinergischer Liganden bestimmt. Auch wenn man erst in den letzten Jahren eine dem physiologischen System vergleichbare Zeitaufösung erreichte^[243, 244], so konnte doch schon früher gezeigt werden^[228–240], daß der Einbau des gereinigten Rezeptors in eine künstliche Membran zu einem cholinergisch funktionierenden Ionentranslokationssystem führt. Wie ähnlich dieses den natürlichen Sy-

stemen ist oder wie weit es von diesen abweicht, war nicht zu erkennen. Immerhin wurde klar, daß das periphere α' -Peptid mit dem Molekulargewicht 43 000 (vgl. Abschnitt 5.1) der Torpedo-Membran, von dem man zunächst angenommen hatte, es enthalte den Ionenkanal^[141], nicht an den Ionenleitfähigkeitseigenschaften der Membran beteiligt ist, und daß sich das Kanalprotein auch nicht vom Rezeptorprotein nach Solubilisierung in nichtionischen Detergentien chromatographisch abtrennen läßt. Die aus Rekonstitutionsexperimenten zunächst abgeleitete Rolle des Rezeptordimers als biologisch aktive Komponente^[244] ließ sich nicht bestätigen^[238].

Bei einer zweiten Methode zur Rekonstitution, die auf Mueller et al.^[245] sowie Montal und Mueller^[246] zurückgeht, werden planare Lipiddoppelschichten verwendet. Mit dieser Technik sind die ersten Einzelkanalmessungen an rekonstituiertem Rezeptor vorgenommen worden^[12]. Weil damals noch keine Einzelkanalmessungen an Elektrophysen durchgeföhrt worden waren, wurden zunächst rezeptorreiche Membranfragmente von *Torpedo* in die künstlichen Lipiddoppelschichten eingebaut und deren elektrische Eigenschaften mit denen von Muskelendplatten der Ratte und des Frosches verglichen (Abb. 6). Die charakteristischen, Agonist-induzierten Einzelkanalereignisse an den eingepflanzten natürlichen Membranstückchen wurden dann mit denen rekonstituierter Rezeptoren verglichen. Es zeigte sich, daß das durch Affinitätschromatographie gereinigte Rezeptorprotein bereits als Monomer der künstlichen Membran die elektrischen Eigenschaften vermittelt, die auch natürliche Endplatten haben. Somit mußte der Agonist-kontrollierte Ionenkanal integraler Teil des Rezeptorproteins sein. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen^[13, 14, 247, 248].

Eine Besonderheit der Rekonstitutionsexperimente von Boheim et al.^[12, 249] ist die Verwendung eines Phospholipids – 1-Stearoyl-3-myristoylglycero-2-phosphocholin (SMPC)^[250] – ungewöhnlich hoher Phasenumwandlungstemperatur^[251]. Dies ermöglichte es, die Rekonstitution des Rezeptors unter Bedingungen der „eingefrorenen“ Membranmatrix zu studieren: Das rekonstituierte System funk-

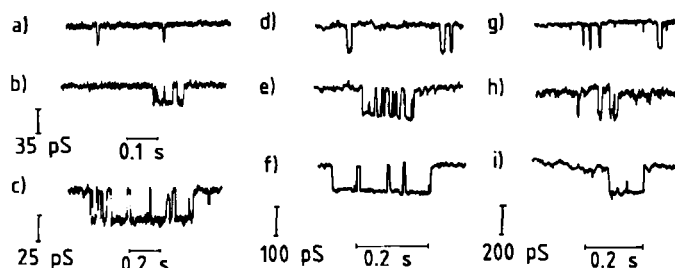


Abb. 6. Acetylcholin-induzierte Einzelkanalereignisse in natürlichen und rekonstituierten Acetylcholinrezeptor-haltigen Membranen [12]. Der Maßstab 35 pS/0.1 s gilt für a) und b), der Maßstab 100 pS/0.2 s gilt für d)–f) und der Maßstab 200 pS/0.2 s für g)–i). – a–c) Acetylcholin-induzierte Membranleitwertänderungen, die mit der patch-clamp-Methode [33] an extrasynaptischen Membranbereichen chronisch denervierter Rattenmuskeln (a, b) oder Froschmuskelfasern (c) aufgezeichnet wurden: a) Einzelkanalereignisse unmittelbar nach Zugabe von Acetylcholin; b) mehrfache Kanalöffnungen, die am gleichen Membranstückchen nach längerer Inkubationszeit beobachtet wurden; c) selten auftretende Vielfachereignisse, bei denen es sich eventuell um Resensitivierungsvorgänge handelt. d–f) Stromverlauf an einer SMPC-Doppelschicht, in die Alkali-behandelte rezeptorreiche Membranfragmente von *Torpedo* inkorporiert wurden. g–i) Stromverlauf an einer SMPC-Doppelschicht, in die gereinigtes Rezeptorprotein eingebaut wurde. Es wurden sehr ähnliche Erregungsmuster für die natürliche Membran (a–c), die teilgereinigte Torpedo-Membran (d–f) und das rekonstituierte System (g–i) beobachtet.

tionierte normal (Abb. 6^[12]), d.h. die Lipidmembran scheint lediglich als Kompartimentgrenze zu fungieren; eine größere Fluidität ist nicht nötig. Die elektrischen Eigenschaften des rekonstituierten Systems – und damit der Muskelendplatten – sind also ausschließlich Eigenschaften ihrer Proteinkomponenten. (Ganz sicher ist diese Aussage jedoch noch nicht, weil nicht ausgeschlossen werden kann, daß am gereinigten Rezeptor noch einige Moleküle natürlicher Phospholipide gebunden sind^[252].) Unabhängig von dieser verbleibenden Unsicherheit funktionieren Lipiddoppelschichten mit eingebautem Rezeptorprotein – sei es Monomer oder Dimer – sehr ähnlich wie natürliche Endplatten. Dies stellt auch sicher, daß bei Solubilisierung und Isolierung des Rezeptors die Funktionsfähigkeit erhalten bleibt^[253]. Entgegen früheren Annahmen liegt also der affinitätschromatographisch gereinigte Rezeptor nicht im desensitisierten Zustand vor.

Kürzlich^[14] sind Einzelkanalleitwerte (40 ± 5 pS) auch an rekonstituierten Systemen gemessen worden, bei denen die Lipidmembran in Anlehnung an die Methode von Neher und Sakmann^[32,33,254] die Spitze einer Pipette verschloß (vgl. Abb. 2a). Dabei wurden zwei Arten von Einzelkanalereignissen und die typische Ereignisfolge der Desensitivierung beobachtet^[14].

Die in jüngster Zeit erhaltenen rekonstituierten Rezeptorsysteme^[12–14,249] zeichnen sich durch hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit aus. Da sie biochemisch über weite Bereiche manipulierbar sind (die Lipid- und Proteinzusammensetzung, die relativen Anteile von Monomer und Dimer und die chemische Zusammensetzung des Rezeptors können variiert werden), eignen sie sich in Verbindung mit dem gereinigten Rezeptor besonders zur Analyse cholinergischer Mechanismen. Da nunmehr auch natürliche Membranvesikeln von *Torpedo* der patch-clamp-Methode zugänglich sind^[255,256], bieten die verfügbaren Präparationen des Acetylcholinrezeptors – ein kontinuierlicher Übergang vom hochgereinigten Protein über die rekonstituierten Systeme und partiell gereinigten Membranvesikeln bis zu den völlig intakten subsynaptischen Membranen – einzigartige Möglichkeiten zum Studium der molekularen Prinzipien biologischer Signalprozesse.

6. Die Wechselwirkung des Acetylcholinrezeptors mit seinen Liganden

6.1. Bindungsgleichgewichtsstudien

In diesem Abschnitt wird nur die Bindungsreaktion erörtert, die Auswirkung der Ligandenbindung auf den Ionenkanal bleibt zunächst außer Betracht. Ebenso wie man jedoch aus Messungen der Reizantwort Schlüsse auf die vorgelagerte Bindungsreaktion ziehen kann (vgl. Abschnitte 2 und 4), vermitteln die hier beschriebenen Experimente Einsichten in die zum Binden parallel und nachgelagert verlaufende Aktivierung des rezeptor-integralen Ionenkanals. Ziel aller mechanistischen Untersuchungen der cholinergen Reizung ist es, die Bindungsreaktion, die Kanalaktivierung und die Kopplung zwischen beiden auf molekularer Ebene zu verstehen.

Für die folgenden Diskussionen ist es sinnvoll, die Liganden des Rezeptors nicht nach pharmakologischen, sondern nach biochemischen Gesichtspunkten einzuteilen:

1. Niedermolekulare Liganden, die reversibel gebunden werden („reversible“ Liganden): Mehrere hundert derartiger Liganden (Abb. 3) sind für den Acetylcholinrezeptor bekannt. Sie zeichnen sich durch relativ schnelle Hin- und Rückreaktionen aus und eignen sich daher besonders für Funktionsstudien.
2. Niedermolekulare Liganden, die irreversibel gebunden werden („irreversible“ Liganden): Diese eignen sich zum Fixieren einer Struktur oder eines Zustandes des Rezeptors.
3. Neurotoxine: Einkettige Polypeptide, die in den Giften der Schlangenfamilie *Elapidae* vorkommen; sie haben sehr hohe Affinitäten für den Rezeptor und langsame Hin- und Rückreaktionen. Sie sind spezifisch für den Rezeptor und eignen sich daher für dessen Markierung, Konzentrationsbestimmung und affinitätschromatographische Reinigung.
4. Antikörper: Diese Liganden dienen insbesondere Untersuchungen der Rezeptorstruktur und Membrantopographie. Monoklonale Antikörper ermöglichen es prinzipiell, für jeden Bereich der Oberfläche des Rezeptors spezifische Markermoleküle herzustellen.

6.1.1. Neurotoxine

Neurotoxine^[96,257,258] sind kleine basische Proteine mit Kettenlängen zwischen 60 und 75 Aminosäuren. Die „kurzen“ Neurotoxine enthalten vier, die „langen“ fünf Disulfidbrücken. Die Aminosäuresequenzen vieler Neurotoxine sind bekannt, und von zwei langen Toxinen^[259,260] (Abb. 7) und einem kurzen Toxin^[261,262] liegen Röntgen-Strukturanalysen vor. Neurotoxine binden über mehrere Kontaktstellen an den Rezeptor, d.h. sie haben keine auf wenige Aminosäuren begrenzte Aktivitätsregion^[263,264]. Die Dissoziation des Toxin-Rezeptor-Komplexes ist ungewöhnlich langsam^[168,265–267].

Neurotoxine sind leicht zu reinigen^[96,168,257,258,263,273], mit radioaktiven Isotopen^[168,273–276] und fluoreszierenden Resten^[74,163,277–279] zu markieren oder mit anderen Proteinen irreversibel zu verknüpfen^[280]. Da die Toxine basische Proteine sind, der Acetylcholinrezeptor aber ein saures Protein ist, lassen sich einfache Bestimmungsverfahren mit anionenaustauscherbelegten Filtern entwickeln^[168,266,267,276]. Solche Filter halten den Rezeptor und das an ihn gebundene Toxin zurück, so daß die Konzentration der vorhandenen Rezeptor-Toxin-Komplexe bestimmt werden kann. Wegen der extrem langsamen Dissoziation dieser Komplexe kann freies Toxin mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit abgetrennt werden^[168,276,281].

Wie am gereinigten Acetylcholinrezeptor von *Electrophorus* mit ³H-markiertem α -Cobratoxin gezeigt worden ist^[168,169,276], ist die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Neurotoxin nicht durch eine einfache Hin- und Rückreaktion beschreibbar. Stattdessen entstehen zwei Komplexe unterschiedlicher Affinität ($K_{D1} = 4 \cdot 10^{-10}$ M, $K_{D2} = 2 \cdot 10^{-11}$ M) und Dissoziationsgeschwindigkeit ($k_1 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $k_3 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$), die ineinander umwandelbar sind^[168]. Die Bildung des Rezeptor-Toxin-Komplexes ist durch eine ungewöhnlich hohe positive Reaktionsentropie ($\Delta S_{298} = 99 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) gekennzeichnet; die Aktivierungsenthalpie der Reaktion ($\Delta H^+ = 12 \text{ kcal/mol}$) ist dagegen normal^[168].

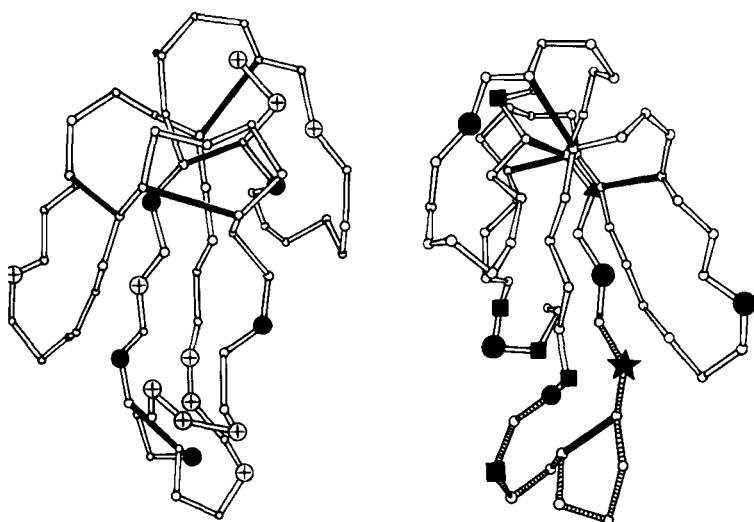
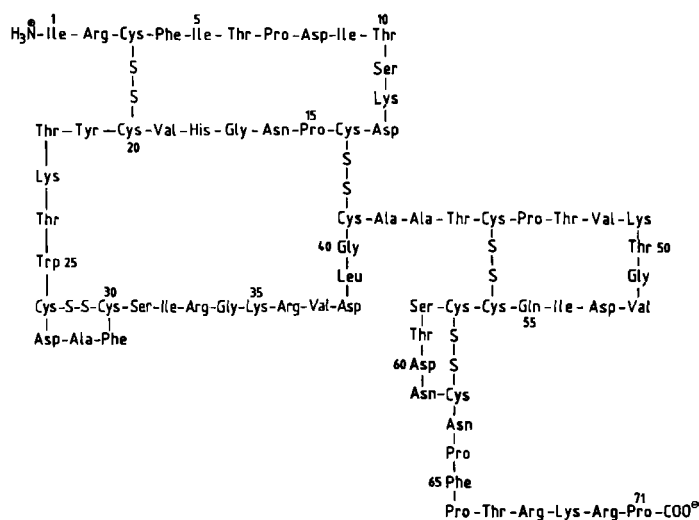


Abb. 7. Oben: Aminosäuresequenz des α -Cobratoxins. - Unten links: Perspektivische Ansicht („von hinten“) der Polypeptidkette mit den Positionen der aromatischen (●) und der eine positive Ladung tragenden (⊕) Aminosäuren. - Unten rechts: Perspektivische Ansicht („von vorn“) der Polypeptidkette mit den Positionen der von Martin et al. [263] modifizierten Aminosäuren Lysin (●), Arginin (■), Tyrosin (▲) und Tryptophan (★). Weder die Modifizierung aller Lysinreste, noch die aller Argininreste, noch die des einzigen Tyrosins kann die Toxizität von α -Cobratoxin vollständig zerstören. Auch nach der Spaltung aller fünf Disulfidbrücken und Alkylierung der freiwerdenden SH-Gruppen verbleibt noch eine Resttoxizität. Auch Peptidfragmente aus dem Bereich der fünften Disulfidbrücke (gestrichelt im Bild rechts unten) [270–272] sind noch toxisch. Experimentelle Details siehe [263, 264]; eine ausführliche Diskussion der Röntgen-Strukturanalyse des α -Cobratoxins findet sich in [259, 268, 269].

Aufgrund der hohen Genauigkeit des Toxin-Bindungs-tests eignet sich dieser auch für die Untersuchung der Gleichgewichte der Bindung niedermolekularer Liganden an den Rezeptor. Derartige Kompetitionsbindungsstudien haben gezeigt^[168], daß der gereinigte Rezeptor zwischen den verschiedenen pharmakologisch definierten Klassen von Liganden in der Bindungsreaktion unterscheidet: Antagonisten binden an zwei Bindungsstellen gleicher Affinität pro Rezeptormonomer, Agonisten binden an zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität. Da zwischen Agonisten und Antagonisten vollständige Konkurrenz besteht, lassen sich diese Befunde unter der Annahme identischer Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten, aber zusätzlicher Wechselwirkungen der Bindungsstellen nach Belegung mit Agonist interpretieren (Abb. 8). Die

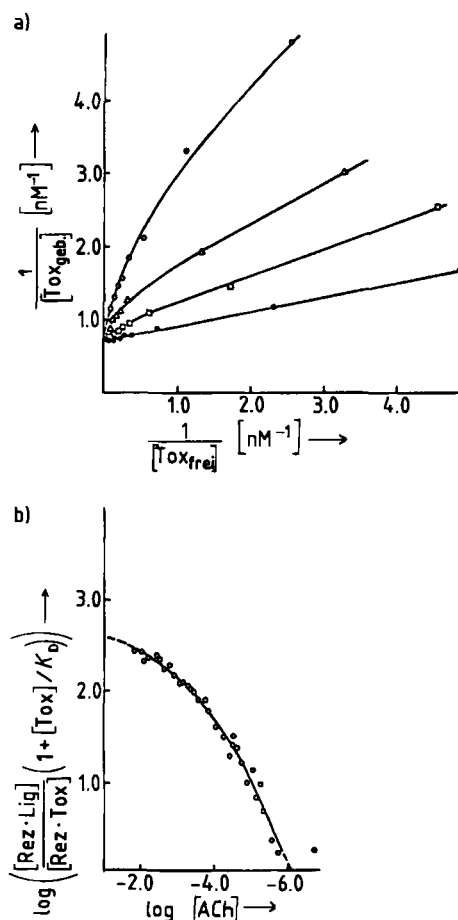


Abb. 8. Bindungsgleichgewichte zwischen ^3H - α -Cobratoxin und dem gereinigten Rezeptorprotein in Gegenwart von Acetylcholin [168]. a) Doppelt-reziproke Auftragung der Konzentrationen an gebundenem und freiem Toxin. Acetylcholin-Konzentrationen: ● 0, □ $4.1 \cdot 10^{-5}$ M, △ $2.0 \cdot 10^{-4}$ M, ○ $7.5 \cdot 10^{-4}$ M. - b) Logarithmische Auftragung nach Maelicke et al. [168]. Konzentration an Rezeptor (Rez) und Toxin (Tox): $[\text{Rez}_0] = 1.9 \cdot 10^{-9}$ M, $[\text{Tox}]_0 = 2.7 \cdot 10^{-8}$ M, Reaktionsvolumen 1.04 mL. Alle Reaktionen wurden in Gegenwart von Diisopropylfluorophosphat ($1.1 \cdot 10^{-3}$ M) (Inhibitor der Acetylcholinesterase) durchgeführt. Aus der Anfangssteigung ($m = 0.95$) ergibt sich die gleiche Zahl von Bindungsstellen für Toxin und Acetylcholin (Lig); Kompetitionskonstante der ersten Bindungsstelle $K_{\text{Lig}} = 7.9 \cdot 10^{-7}$ M. Der vollständige Zusammenhang lautet:

$$\log \left(\frac{[\text{Rez} \cdot \text{Lig}]}{[\text{Rez} \cdot \text{Tox}]} \left(1 + \frac{[\text{Tox}]}{K_D} \right) \right) = n \cdot \log [\text{Lig}] - n \cdot \log K_{\text{Lig}}$$

wobei [Rez], [Tox] und [Lig] die Konzentrationen an Toxinbindungsstellen (Rezeptor), Toxin und kompetitivem Ligand in mol/L sind. n gibt das Verhältnis der Bindungsstellen des kompetitiven Liganden und des Toxins an. K_D ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Toxin-Rezeptor-Komplexes, K_{Lig} die scheinbare Inhibitionskonstante des kompetitiven Liganden. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen ist die Konzentration an freiem Rezeptor zu vernachlässigen, so daß die Gesamtkonzentration an Bindungsstellen $[\text{Rez}_0]$ der Summe der komplexierten Bindungsstellen ($[\text{Rez}_0] = [\text{Rez} \cdot \text{Lig}] + [\text{Rez} \cdot \text{Tox}]$) entspricht. Somit sind alle Größen experimentell zugänglich.

Kompetitionskonstanten (Tabellen 2 und 3) sind für Antagonisten in guter Übereinstimmung mit ihren Wirkkonzentrationen in vivo, während für Agonisten Abweichungen von den halbmaximalen Wirkkonzentrationen von mehreren Größenordnungen gefunden werden. Dies ist insofern nicht überraschend, als bei den in diesen Experimenten notwendigen Inkubationszeiten von der vollständigen Überführung des Rezeptors in den desensitivierten Zustand ausgegangen werden muß, wenn sich der gelöste Rezeptor ähnlich wie der membrangebundene verhält^[12, 18, 44, 50–56].

Tabelle 2. Gleichgewichtsdissoziationskonstanten nicotinischer Liganden mit dem gereinigten Acetylcholinrezeptor (siehe auch Abb. 8).

Ligand	Rezeptor von <i>Electrophorus</i>			Rezeptor von <i>Torpedo</i>	
	K_{Lig} [M] [a]	K_{Lig} [M] [b]	K_{Lig} [M] [b]	K_D, K_{Lig} [M] [c]	K_{Lig} [M] [d]
Acetylcholin	$8 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-8}$	$2.5 \cdot 10^{-6}$
Carbamoylcholin	$7 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$4.5 \cdot 10^{-6}$
Nicotin	$1 \cdot 10^{-7}$	—	—	$1 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-5}$
8 , n = 10	$6 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-6}$
Tubocurarin	$1 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$
Gallamin	—	$5 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$
Benzochinonium-Ion	$6 \cdot 10^{-8}$	—	—	—	—
Alloferin	$9 \cdot 10^{-10}$	—	—	—	—
8 , n = 6	$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$

[a] Durch Kompetitionsbindungsstudien mit ^3H - α -Cobratoxin erhalten (Filtertest, [168]). [b] Kompetitionsbindungsstudien mit NBD-5-acylcholin (Fluoreszenzbindungsstudien [82]). [c] Durch Gleichgewichtsdialyse erhalten; direkte Messung für Acetylcholin und **8**, n = 10, sonst Kompetitionsbindungsstudien [120]. [d] Gleichgewichtsdialyse [411]. – Bei [a] und [b] sind mehr als eine Klasse von Bindungsstellen beobachtet worden, zwei K_D -Werte sind nur bei [82] berechnet worden.

Tabelle 3. Gleichgewichtsdissoziationskonstanten nicotinischer Liganden mit dem membrangebundenen Acetylcholinrezeptor.

Ligand	Rezeptor von <i>Electrophorus</i>				Rezeptor von <i>Torpedo</i>	
	K_{app} [M] [a]	K_{app} [M] [b]	K_p [M] [c]	K_{app} [M] [d]	K_p [M] [e]	K_p [M] [f]
Acetylcholin	$1 \cdot 10^{-6}$	—	$2 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-9}$	$8 \cdot 10^{-9}$
Carbamoylcholin	$3 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-7}$
8 , n = 10	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-7}$	$2.5 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-9}$	$8 \cdot 10^{-7}$
Trimethyl(phenyl)ammonium-Ion	$1 \cdot 10^{-5}$	—	—	—	—	—
Tubocurarin	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-7}$
Gallamin	$3 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-5}$
8 , n = 6	$3 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-5}$

[a] Elektrophysiologische Dosis-Antwort-Kurven [406]. [b] ^{22}Na -Flu β aus Membranvesikeln [241]. [c] 50% Abnahme der Anfangsgeschwindigkeit der Assoziation von ^3H -Cobratoxin mit dem Rezeptor [287]. [d] Aus Dosis-Antwort-Kurven [406]. [e] 50% Abnahme der Anfangsgeschwindigkeit der Assoziation von ^{125}I - α -Bungarotoxin mit dem Rezeptor [411]. [f] Durch Ultrazentrifugation oder Abnahme der Anfangsgeschwindigkeit der Assoziation von ^3H -Cobratoxin mit dem Rezeptor [287].

Zwei Ergebnisse dieser Studie^[168] verdienen besondere Erwähnung: Für die Reihe der Bismethonium-Verbindungen **8**, n = 4 bis n = 10 (vgl. Abb. 3) wurde bis n = 6 eine einzige Klasse von Bindungsstellen, von n = 7 ab heterogenes Binden (Antikooperativität) gefunden. Dies entspricht der pharmakologischen Klassifizierung dieser Verbindungen und zeigt, wie empfindlich auch das gelöste Rezeptorprotein auf kleine Strukturunterschiede von Liganden reagieren kann. Das zweite ungewöhnliche Ergebnis betrifft den Effekt niedermolekularer Liganden auf die Geschwindigkeit der Dissoziation von Toxin-Rezeptor-Komplexen. Bei direkter Konkurrenz sollten die kleinen Liganden nur die Gleichgewichtskonzentrationen an Rezeptor-Toxin-Komplexen, nicht aber die Geschwindigkeit der Dissoziation dieser Komplexe beeinflussen. Im Gegensatz dazu (Abb. 9^[74, 168, 169]) können kleine Liganden diese Dissoziation jedoch um den Faktor 10^2 bis 10^3 beschleunigen. Hierzu sind allerdings Ligandenkonzentrationen notwendig, die mehrere Größenordnungen oberhalb der durch direkte Bindungsstudien oder Kompetitionsmessungen bestimmten K_D -Werte liegen. Dennoch ist der Effekt sättigbar (es gibt eine maximale Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, vgl. Abb. 9a); das weist auf Bindungsstellen niedriger Affinität für kleine Liganden in Gegenwart sättigender Konzentrationen von Toxin hin. Eine genaue Analyse^[168] macht es dabei wahrscheinlich, daß es sich um die gleichen Bindungsstellen handelt, die im niedrigen Konzentrationsbereich im Wettbewerb mit Toxin besetzt werden. Das würde bedeuten, daß die Bindungsstellen für Toxin und kleine Liganden strukturell verschieden sind^[175] und daß die Konkurrenz zwischen diesen beiden Ligandentypen durch allosterische Effekte zustande kommt (Abb. 9b, vgl. auch Abschnitt 3). Unabhängig von ihrer strukturellen Basis haben diese Bindungsstellen die typi-

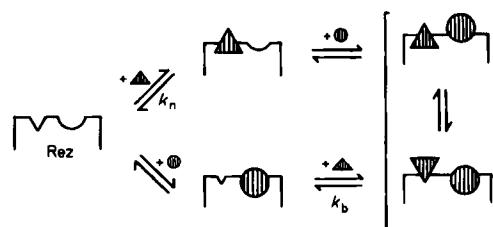
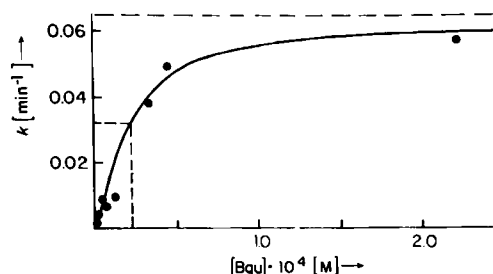


Abb. 9. Beschleunigte Dissoziation von Toxin-Rezeptor-Komplexen. Oben: Anfangsgeschwindigkeitskonstanten der Dissoziation von ^3H -Toxin-Rezeptor-Komplexen in Gegenwart des cholinergen Antagonisten Benzoquinonium (Bqu). – $k_{max} = 0.065 \text{ min}^{-1}$, $c(1/2k_{max}) = 2.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ [168]. Unter vergleichbaren Bedingungen wurden für Tubocurarin und Carbamoylcholin $c(1/2k_{max})$ -Werte von $1.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ bzw. $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ gefunden [74]. – Unten: Allosterisches Modell der beschleunigten Dissoziation. Es wird angenommen, daß die Bindungsstellen für Toxin und für kleine Liganden strukturell nicht gleich sind; dennoch soll zwischen beiden über einen weiten Konzentrationsbereich vollständige Konkurrenz bestehen. Dies ist möglich, wenn die Belegung der Toxin-Bindungsstelle die Affinität der Bindungsstelle für den kleinen Liganden wesentlich erniedrigt. Bei hoher Konzentration kleiner Liganden können diese niedrigaffinen Bindungsstellen dennoch besetzt werden; dies verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors, was die beschleunigte Dissoziation des Toxin-Rezeptor-Komplexes zur Folge hat [74, 168, 169]. ▲: Toxin, ●: Ligand. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für normale und beschleunigte Dissoziation: k_n bzw. k_b .

schen Eigenschaften zusätzlicher regulatorischer Stellen^[74, 168, 282–285].

Kompetitionsbindungsstudien mit radioaktiv markierten Toxinen und cholinergen Liganden sind auch mit anderen Präparationen des gereinigten Rezeptors^[93, 286], mit Membranvesikeln^[178, 179, 287–291] und mit ganzen Zellen^[292–298] durchgeführt worden. Letztere eignen sich insbesondere für Untersuchungen des Metabolismus des Acetylcholinrezeptors unter normalen^[296, 297] und pathologischen^[298] Bedingungen.

6.1.2. Radioaktiv markierte kleine Liganden

Mit diesen Liganden sind hauptsächlich Bindungsgleichgewichtsstudien durchgeführt worden^[137, 186, 230, 299–304]. Da sie eine geringere Affinität für den Rezeptor aufweisen als Neurotoxine, werden für diese Versuche erheblich größere Mengen Rezeptor benötigt. Deshalb sind für die meisten Studien mit diesen Liganden rezeptorreiche Membranfragmente von *Torpedo* verwendet worden. Von den benutzten Methoden – Gleichgewichtsdialyse, Filtration, Zentrifugation – hat sich letztere als am zuverlässigsten erwiesen. Die Ultrazentrifugation in der preßluftgetriebenen Minizentrifuge^[299, 301] zur Abtrennung der Membranteilchen von der homogen-wäßrigen Phase ist eine schnelle Methode (Zeitauflösung ca. 10 min). Allerdings ist diese Zeitauflösung noch immer so klein, daß bei Bindungsstudien mit Agonisten nur der desensitivierte Zustand des Rezeptors der Messung zugänglich ist. Dieser ist charakterisiert durch eine relativ hohe Bindungsaffinität

für Agonisten und durch eine geringe Kooperativität zwischen den beiden Agonistbindungsstellen pro Rezeptormolekül (Abb. 10^[303]). Es ist daher schwierig, die positive Kooperativität der Agonistbindungsstellen reproduzierbar nachzuweisen^[303], so daß verständlich wird, warum diese von manchen Gruppen beobachtet wurde^[299, 300, 303], von anderen jedoch nicht^[230, 301, 305]. Hinzu kommt, daß erst kürzlich die mathematischen Grundlagen für die vollständige Auswertung von Bindungsgleichgewichten an zwei verschiedene, sukzessiv zu besetzende Bindungsstellen geschaffen worden sind^[81, 82, 303].

Zusammengefaßt erweisen sich die Bindungsstudien mit radioaktiven cholinergen Liganden mit niedrigem Molekulargewicht als kaum aussagekräftiger, aber sehr viel schwieriger in der Durchführung als Bindungsstudien mit Neurotoxinen. Allerdings kann in direkten Bindungsstudien mit Acetylcholin und membrangebundenem Rezeptor auf diese Weise gezeigt werden, daß der Transmitter im Gleichgewicht an zwei schwach miteinander in positiv-kooperativer Wechselwirkung stehende Bindungsstellen bindet^[303]. Dieses Ergebnis könnte andeuten, daß im nicht-desensitivierten Zustand des Rezeptors tatsächlich die postulierte^[306] starke Kooperativität zwischen den Agonistbindungsstellen besteht.

6.1.3. Irreversible Liganden

Die am gründlichsten untersuchte chemische Modifizierung des Acetylcholinrezeptors ist die Reduktion einer Disulfidbrücke in der Nähe der Bindungsstelle für Acetylcholin^[82, 85–95, 299, 307–311]. Diese Reduktion verkürzt die mittlere Öffnungszeit und setzt die Leitfähigkeit des Rezeptorionenkanals herab^[90, 309–311], schwächt die Reizantwort auf einfach positiv geladene Agonisten, erhöht aber diejenige auf zweifach positiv geladene Agonisten^[85, 86, 307], erniedrigt die Hill-Koeffizienten der Agonisten auf 1^[73, 299] und macht Bismethonium-Verbindung 8, n=6, zum cholinergen Agonisten^[88]. Im Zusammenhang mit den Modellen der cholinergen Reizung (Abschnitt 3 und 7) ist bemerkenswert, daß die Verknüpfung eines einzigen Moleküls eines irreversiblen Agonisten pro Rezeptormonomer bereits für die Kanalaktivierung ausreicht^[89, 309, 313]. Werden die freigesetzten SH-Gruppen mit einem Affinitätsliganden alkyliert – z. B. ³H-Bromacetylcholin (BAC) oder ³H-MBTA (siehe Abschnitt 4.3) –, so findet sich diese Markierung ausschließlich an den α -Untereinheiten des Rezeptors. Je nach Reaktionsbedingungen und Rezeptorpräparation läßt sich nur eine^[93, 312] oder lassen sich beide^[94] der freigesetzten SH-Gruppen markieren.

Während die Markierung der α -Untereinheiten des Rezeptors Klarheit bezüglich der Position der Bindungsstellen für Agonisten bringt, sind die molekularen Grundlagen der anderen physiologischen Effekte der Disulfidreduktion und der Alkylierung der SH-Gruppen noch immer unklar. Dies gilt auch für die Entdeckungen, daß die irreversible Reaktion von BAC mit Einzelzellpräparationen von *Electrophorus* zur längeren Depolarisierung der Membran führt (kaum Desensitivierung, obwohl die lokale Konzentration an BAC sehr hoch ist) und das Amidanalogon von BAC, Bromacetylcholinamin, zwar an den reduzierten *Electrophorus*-Rezeptor bindet, diese Reaktion aber nicht zur Depolarisierung führt^[85, 314]. Diese Liganden bieten weiter-

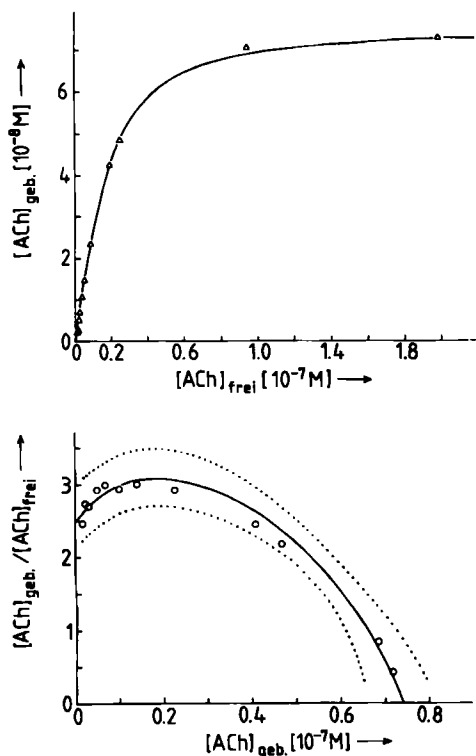


Abb. 10. Bindungsgleichgewichte zwischen ³H-Acetylcholin und Membranfragmenten von *Torpedo* [303]. Medium: 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL Rinderserumalbumin, 0.25 mM Tetram, 20 mM Tris/HCl, pH 7.2. Konzentration an Acetylcholinbindungsstellen [Rez₀] = 37 nM. Oben: Auftragung der Konzentration an gebundenem Acetylcholin gegen die Konzentration an freiem Acetylcholin. Unten: Scatchard-Auftragung der Bindungsdaten. Zwischen die beiden gepunkteten Linien fallen 90% aller experimentellen Punkte aus 56 unabhängigen Bindungsexperimenten. $K_{D1} = 30$ nM, $K_{D2} = 6$ nM.

hin gute Möglichkeiten, die molekularen Grundlagen der Kanalaktivierung und Desensitivierung verstehen zu lernen.

Das Alkylierungsgagens 3-Brommethyl-3'-trimethylamoniomethylazobenzol ist unter den irreversiblen Liganden insofern eine Besonderheit, als es photoisomerisiert werden kann^[315] und sich deshalb für Konzentrations-sprunguntersuchungen eignet^[316,317]. Dabei fand man, daß bereits ein einziges irreversibel mit dem Rezeptor verknüpft Agonistmolekül zur Kanalaktivierung ausreicht (vgl. ^[89,309,313]) und daß das Binden des Agonisten an den Rezeptor nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Kanalaktivierung ist.

Abschließend muß hier noch einmal erwähnt werden, daß im Zeitrahmen der üblichen physiologischen, zellbiologischen und biochemischen Messungen auch viele Neurotoxine und Antikörper „irreversible“ Liganden sind. Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Liganden von niedrigem Molekulargewicht können Toxine und Antikörper jedoch nicht die Ereignisse produzieren, die typisch für die Agonist-induzierten elektrischen Aktivitäten der Muskelendplatten sind.

6.1.4. Fluoreszierende kleine Liganden

Der wesentliche Vorteil derartiger Liganden liegt in ihren spektroskopischen Eigenschaften, die im Gegensatz zu anderen Markierungen eine sehr viel höhere Zeitauflösung der Messung ermöglichen. Dies wird insbesondere in kinetischen Untersuchungen der Ligandenwechselwirkung ausgenutzt (Abschnitt 6.2). In diesem Abschnitt wird nur die Anwendung dieser Liganden für Gleichgewichtsuntersuchungen erörtert.

Die chemische Struktur und die spektroskopischen und physiologischen Eigenschaften der fluoreszierenden Liganden des Acetylcholinrezeptors sind andernorts im Detail diskutiert worden^[5]. Für biochemische Untersuchungen eignen sich am besten Derivate des Acetylcholins, die den fluoreszierenden Rest über eine $(CH_2)_n$ -Kette gebunden enthalten (Abb. 11). Von diesen sind die unmodifizierten NBD-n-acylcholine reine Agonisten des Acetylcholins^[43,82,318-322], während die Dansyl-n-acylcholine zusätzliche nicht-kompetitive Eigenschaften besitzen^[323,324]. Detaillierte Bindungsstudien sind nur mit den NBD-n-acylcholinen durchgeführt worden. Beim gereinigten Rezeptor

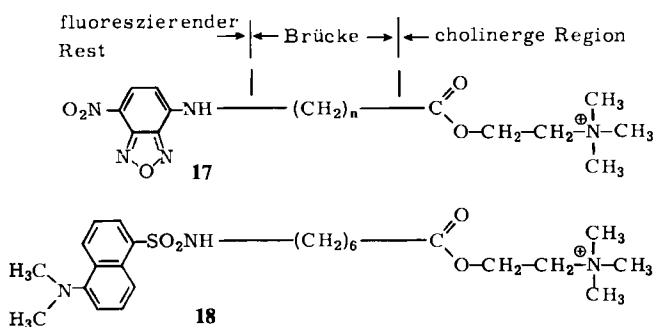


Abb. 11. Strukturformeln fluoreszenzmarkierter Acylcholine. 17: „NBD-n-acylcholine“ (systematischer Name: Alkyl(dimethyl)-2-[ω-(7-nitro-4-benzofurazanyl-amino)-n-alkylcarboxyloxy]ethylammonium-Ion). 18: „Dansyl-n-acylcholine“ (systematischer Name: 2-[6-(5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonamido)hexylcarboxyloxy]ethyl(trimethyl)ammonium-Ion oder O-2-[6-(5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonamido)hexyl-carboxyl]cholin). Das n in den Trivialnamen steht für die Zahl der CH_2 -Gruppen.

von *Electrophorus* ist das Binden des fluoreszierenden Agonisten mit dem vollständigen Löschen der Fluoreszenz verbunden^[43,82,322]. Ursache ist die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der ω-Aminogruppe des Liganden (Donor) und einer unbekannten Acceptorgruppe in einer hydrophoben Tasche des Rezeptorproteins^[322]. Obwohl der cholinerge Teil von NBD-n-acylcholinen die Spezifität ihres Bindens an den Rezeptor vermittelt^[43,322], ist durch die Fluoreszenzlösung gesichert, daß auch andere Bereiche des Moleküls an der Wechselwirkung mit dem Rezeptor teilnehmen. Es ist daher nicht überraschend, daß die Affinität der NBD-n-acylcholine von der Zahl der Methylengruppen im Molekül abhängt; Affinität und Fluoreszenzeffekte können durch chemische Modifizierung an der ω-Aminogruppe verändert werden^[322].

Die Fluoreszenzeigenschaften der NBD-n-acylcholine ermöglichen es, ihre Bindungsgleichgewichte mit Rezeptorpräparationen direkt und mit vorher nicht erreichter Genauigkeit zu messen^[82]. Kompetitionsstudien mit repräsentativen cholinergen Liganden ergaben, daß Agonisten und Antagonisten des Acetylcholins an die gleiche Zahl von Bindungsstellen am gereinigten Rezeptor binden und vollständig kompetitiv sind. Die Bindungsstellen für Antagonisten zeigen alle die gleiche Affinität; diejenigen für Agonisten scheinen in zwei Klassen (paarweise) aufzutreten, wobei bei jedem Paar negativ-kooperative Wechselwirkungen bestehen. In Übereinstimmung mit den elektrophysiologischen Beobachtungen unter gleichen experimentellen Bedingungen^[85,88,90] ändern sich nach Inkubation mit Dithiothreitol die Affinitäten für einige Agonisten; für einen normalerweise partiellen Agonisten und einen Antagonisten des Acetylcholins werden dann die für Agonisten typischen Bindungsmuster beobachtet^[82]. Diese Untersuchung stützt frühere Befunde, daß es zwei unterschiedliche Bindungsstellen für Agonisten am Rezeptor gibt. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (Tabellen 2 und 3) liefern für Antagonisten Werte, die mit den physiologischen Daten übereinstimmen, während die Werte für Agonisten auf zumindest teilweise Desensitivierung der Präparation zum Zeitpunkt der Messung hinweisen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß mit der Solubilisierung des Rezeptors kein wesentlicher Funktionsverlust einhergeht.

Untersuchungen mit anderen fluoreszierenden Liganden^[323-329] und Markermolekülen^[330,331] waren weniger aussagekräftig in Bezug auf den Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor. Mit diesen Liganden ist bisher nur eine Klasse von Agonistbindungsstellen nachgewiesen worden. Allerdings haben Heidmann und Changeux^[324] sowie Schimerlik et al.^[330] mehrere Affinitätszustände des Rezeptors für Agonisten und auch Agonist-induzierte Konformationsänderungen nachgewiesen.

6.1.5. Nichtkompetitive Blocker

Unter dem Begriff „nichtkompetitive Blocker“ werden alle diejenigen Verbindungen zusammengefaßt, die die Reizantwort auf cholinerge Agonisten nicht durch direkte Konkurrenz, sondern indirekt beeinflussen (siehe auch Abschnitt 3). Sie bewirken eine Abnahme der maximalen Reizantwort und erhöhen die scheinbare Bindungsaffinität (halbmaximale Wirkkonzentration) für den jeweiligen Agonisten. Typische Liganden dieser Klasse sind Amino-

gruppen-haltige Lokalanästhetika wie Procain und Dibucain^[287, 300, 338–340], Halluzinogene wie Phencyclidin^[334, 341], Sedativa wie Chlorpromazin^[335], verschiedene Detergentien^[6], Neurotoxine wie Histrionicotoxin und Anatoxin A^[342–345], Amantadin^[346], das lipophile Methyltriphenylphosphonium-Ion^[347] und eine Reihe weiterer strukturell sehr unterschiedlicher natürlicher und synthetischer Verbindungen^[348–352]. Die Befunde elektrophysiologischer Untersuchungen über die Wirkung dieser Verbindungen^[35, 332–334] lassen sich dahingehend interpretieren, daß die nichtkompetitiven Blocker an eine Komponente des Ionenkanals binden. Andere Wirkungsweisen – z. B. über allosterische Bindungsstellen oder über die Lipidphase^[6, 335–337] – sind jedoch gleichermaßen vorstellbar. Da am gereinigten Rezeptorprotein keine Bindungsstellen für nichtkompetitive Blocker gefunden wurden^[82, 168], können die Wirkungen dieser Verbindungen in vitro nur mit Präparationen des membrangebundenen Rezeptors untersucht werden. Dabei sind drei Arten von Bindungsstellen für nichtkompetitive Blocker identifiziert worden: Eine Bindungsstelle pro Rezeptormolekül mit hoher Affinität (K_D im mikromolaren Bereich), eine größere Zahl weiterer Bindungsstellen mindestens 10fach niedrigerer Affinität, die sich vermutlich an der Rezeptor-Lipid-Grenze befinden, sowie die Bindungsstellen für Agonisten, an die einige diese Verbindungen mit noch geringerer Affinität (20–500 μM) binden^[302, 353]. Wegen dieser je nach Struktureigenschaften des Blockers stärkeren oder schwächeren kompetitiven Wirkung^[302, 353, 354] ist der Name „nichtkompetitive Blocker“ irreführend; er wird allein aus historischen Gründen beibehalten.

Allen diesen nichtkompetitiven Blockern ist gemeinsam, daß sie durch ihr Binden an den membrangebundenen Rezeptor dessen Affinität für cholinerge Agonisten erhöhen (Abb. 12^[339, 354]). Diese Affinitätserhöhung kommt durch eine Konformationsänderung des Rezeptors zustande; sie hat den gleichen Zeitverlauf wie die Desensitivierung der Endplatten^[137, 324, 338, 340, 352, 354]. Rekonstitutionsexperimente^[355] lassen den Schluß zu, daß sich zumindest ein Teil der Bindungsstellen für nichtkompetitive Blocker am Rezep-

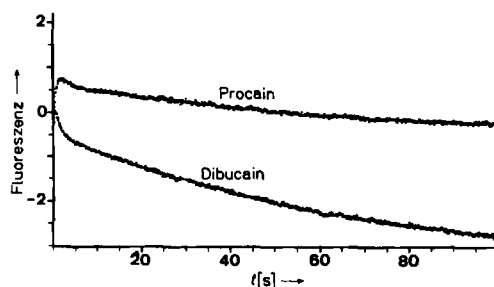


Abb. 12. Einfluß nichtkompetitiver Blocker auf die Wechselwirkung zwischen dem Agonisten NBD-5-acylcholin (Abb. 11) und dem membrangebundenen Acetylcholinrezeptor von *Torpedo* [354]. Die Konzentrationen an Membranfragmenten [0,08 μM] und fluoreszierendem Agonisten [0,045 μM] entsprechen etwa 40% Sättigung der Bindungsstellen. Unter diesen Bedingungen bewirkt die Zugabe von Procain (500 μM) oder Dibucain (10 μM) zur Zeit $t = 0$ eine Abnahme der Fluoreszenz, d. h. es wird mehr fluoreszierender Agonist gebunden. Die Belegung des Rezeptors mit Dibucain geht ausschließlich mit einer Affinitätszunahme für den Agonisten einher (nur Fluoreszenzabnahme); bei Procain kann aus der anfänglichen Zunahme der Fluoreszenz und aus deren Gleichgewichtsniveau geschlossen werden, daß neben der Affinitätserhöhung für den Agonisten auch Konkurrenz um dessen Bindungsstellen auftritt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenzabnahme ($k = 0,01 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$) entsprechen der elektrophysiologisch beobachteten langsamen Desensitivierung.

torprotein befindet. Bindungsstellen am peripheren Protein mit dem Molekulargewicht 43 000^[141, 157] sind indessen ausgeschlossen worden^[137]. Werden irreversible, radioaktiv markierte nichtkompetitive Blocker verwendet, so binden diese meist an die δ -Untereinheit^[356], gelegentlich auch an die anderen Untereinheiten des Rezeptors^[357].

Die Effekte der nichtkompetitiven Blocker werden häufig als Beleg für die Richtigkeit des speziellen allosterischen Modells des Acetylcholinrezeptors diskutiert^[2, 6, 353]. Zur Erklärung ihrer Effekte reicht jedoch bereits ein Modell aus, das von zwei sich beeinflussenden, aber für den jeweiligen Ligandentyp (cholinergem Agonist oder nichtkompetitiver Blocker) spezifischen Bindungsregionen am Rezeptor ausgeht. Hierzu sind nicht einmal allosterische Modelle notwendig, obwohl die „modulierende“ Wirkung der nichtkompetitiven Blocker zu einer derartigen Interpretation verlockt.

6.1.6. Antikörper

Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor haben sich in dreierlei Hinsicht als nützlich erwiesen: 1. Antikörper eignen sich zu Strukturuntersuchungen des Rezeptors. 2. Der membrangebundene Rezeptor ist eine genügend einfache Präparation, um die Bindungsreaktion des Antikörpers und ihren Einfluß auf die Funktion des Rezeptors quantitativ zu untersuchen. 3. Die molekularen Grundlagen der Muskelkrankheit *Myasthenia gravis* lassen sich mit solchen Antikörpern studieren. Hier wollen wir uns vor allem mit dem ersten Aspekt befassen und die anderen beiden nur streifen.

Die moderne Forschung auf dem Gebiet der *Myasthenia gravis*^[358–378] baut im wesentlichen auf zwei Entdeckungen auf: Bei Myasthenie-Kranken ist die Zahl funktionsfähiger Acetylcholinrezeptoren in den Muskeln erniedrigt^[363]; die Entstehung Myasthenie-ähnlicher Symptome bei Kaninchen nach deren Immunisierung mit körperfremdem Rezeptorprotein^[364] weist auf eine Autoimmunkomponente hin. Trotz der Fortschritte der letzten Jahre werden zur Zeit mehrere Mechanismen der Entstehung dieser Immunkrankheit diskutiert. Entsprechend sind zwar eine Reihe von Behandlungsmethoden vorhanden, doch gibt es noch keine Kausaltherapie^[182, 376–380].

Nach elektrophysiologischen Messungen an myasthenischen Ratten^[370] ist die Schwächung der Neurotransmission die Folge einer verringerten Konzentration an funktionierenden Rezeptorkanälen. Zusätzlich sind eine Erhöhung der halbmaximalen Wirkkonzentration von Acetylcholin (geringere Affinität) und Veränderungen in der Kinetik der Muskelreizung zu beobachten. Die Einzelkanaleigenschaften scheinen hingegen unverändert^[370, 376]. Die unmittelbare Blockade der Rezeptoren läßt sich nur schwer nachweisen^[381, 382].

Zu Untersuchungen der Struktur des Acetylcholinrezeptors eignen sich besonders monoklonale Antikörper (monoclonal antibody, mAb)^[383], da diese gegen jeweils nur eine Antigen determinante der Rezeptoroberfläche gerichtet sind. Solche Determinanten bestehen aus nur wenigen Aminosäuren, so daß mit monoklonalen Antikörpern die Organisation des Rezeptors mit hoher Auflösung studiert werden kann^[123, 132, 159, 171–176, 182, 238–240, 369, 373, 380, 384, 385]. Mit monoklonalen Antikörpern gegen die Rezeptoren der

Elektrozyten^[175, 384, 385] lassen sich mindestens 30 Oberflächendeterminanten des Rezeptors unterscheiden. Monoklonale Antikörper sind bisher besonders zur Bestimmung der Untereinheitenzusammensetzung von Rezeptorpräparationen^[130, 158, 386, 387] und zum Strukturvergleich^[175, 374, 388-390] herangezogen worden. Wie wertvoll sie auch für tiefergehende Struktur- und Funktionsuntersuchungen am Rezeptor sein können, zeigt die Anwendung monoklonaler Antikörper zur Strukturanalyse der Ligandenbindungsregionen des Rezeptors^[175].

Durch die Verwendung eines ELISA-Tests (ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zur Selektion der Antikörper-produzierenden Zellklone^[174] wurde es möglich, monoklonale Antikörper gegen die Bindungsregionen für cholinerge Liganden (Agonisten und Antagonisten) zu erhalten^[175]. Diese unterschieden sich dadurch von anderen Antikörpern gegen das Rezeptorprotein, daß ihr Binden an den Rezeptor durch α -Cobratoxin vollständig verhindert werden konnte. Gegenüber niedermolekularen Liganden zeigten sie darüber hinaus jedoch ein sehr unterschiedliches Verhalten^[175]: Drei Antikörper (mAb 2-4) kompetieren mit allen angebotenen kleinen Liganden um das Binden an den Rezeptor, zwei weitere mit allen, ausgenommen den „Bismethonium“-Verbindungen (mAb 1, 5); ein Antikörper kompetiert mit allen Liganden ausgenommen den „Bismethonium“-Verbindungen und Tubocurarin. Im Rahmen des klassischen pharmakologischen Besetzungsmodells (siehe Abschnitt 3^[65], siehe auch Lehrbücher^[391, 392]) wäre aus diesen Ergebnissen zu folgern, daß es wenigstens drei Sorten von Bindungsstellen für cholinerge Agonisten und Antagonisten am Rezeptor geben muß. Man kann aber auch annehmen, daß das Unvermögen einiger Antikörper, in Gegenwart bestimmter Liganden an den Rezeptor zu binden, dadurch zustande kommt, daß diese Liganden Konformationsänderungen des Rezeptors verursachen, die zum Verschwinden der entsprechenden Antigen determinante führen^[175]. Dies hieße, jeder Ligand bewirkt eine andere Konformation des Rezeptors; der Rezeptor unterschiede also nicht nur zwischen den pharmakologisch definierten Klassen von Liganden (Agonisten, Antagonisten, nichtkompetitive Blocker), sondern jeder Bindungsvorgang hätte einen individuellen Charakter.

Da alle sechs Antikörper mit Polypeptidneurotoxinen um das Binden an den Rezeptor kompetieren^[175], lag der Schluß nahe, die Bindungsstellen für kleine Liganden lägen innerhalb begrenzter Bereiche (Regionen). Wettbewerbsbindungsstudien mit den sechs Antikörpern ergaben, daß zwei solcher Bindungsregionen am Rezeptor existieren. Besonders aufschlußreich war, daß der Antikörper mAb 6 zwar das Binden der anderen fünf Antikörper an den Rezeptor vollständig verhindern konnte, umgekehrt konnten diese sein Binden jedoch nur teilweise einschränken. Ein anhand dieser Befunde entwickeltes Modell des Acetylcholinrezeptors zeigt Abbildung 13. Die Ergebnisse sind durch Wettbewerbsstudien mit radioaktiv markiertem Acetylcholin bestätigt worden^[393]. Zusätzlich wurde gefunden, daß mAb 6 nur die Hälfte aller Bindungsstellen für Acetylcholin blockieren kann.

Werden mehrere Rezeptorfunktionen (das Binden von cholinergen Liganden, nichtkompetitiven Blockern und Neurotoxinen, Ionenfluß- oder Leitfähigkeitsänderungen) in derartige Untersuchungen einbezogen, so kann man die

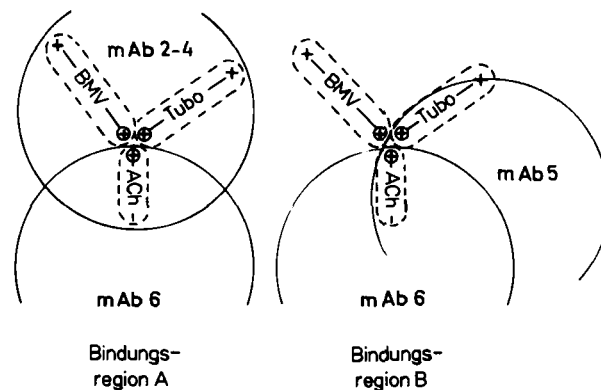


Abb. 13. Modell zur Beschreibung der Konkurrenz zwischen monoklonalen Antikörpern und cholinergen Liganden um das Binden an den Acetylcholinrezeptor^[175]. Es werden zwei Bindungsregionen – A und B – mit jeweils mindestens drei Bindungsstellen (subsites) postuliert. Erstere sind durch die Antikörper 2-4 (Region A) bzw. 5 (Region B), letztere durch die Liganden Acetylcholin (ACh), Tubocurarin (Tubo) und die „Bismethonium“-Verbindung 8, n = 6, 10 (BMV) definiert. Antikörper mAb 6 erkennt Antigen determinanten, die in beiden Regionen auftreten.

für die jeweilige Funktion verantwortlichen Bereiche der Oberfläche des Rezeptors lokalisieren. Dies könnte zur Charakterisierung der Struktur des Ionenkanals und derjenigen Bereiche führen, die die Kopplung zwischen Reizempfang und Reizantwort bewirken.

Bei den Anwendungen monoklonaler Antikörper ist zu bedenken, daß die Methode zur Erzeugung dieser spezifischen Liganden noch sehr jung ist^[383]. So weiß man unter anderem noch zu wenig über ihre Affinitäten und über die Kinetik ihrer Wechselwirkung mit dem Rezeptor noch unklar. Auch ist ihr Vorteil, daß sie, anders als Immunsereen, „reversible“ Liganden sind, noch nicht voll genutzt worden. Zusätzliche Möglichkeiten zur immunbiologischen Analyse des Rezeptors ergeben sich auch aus den seit kurzem bekannten Aminosäuresequenzen^[197-201]. Nunmehr könnten Antikörper gegen kurze Peptide aus der Sequenz des Rezeptors produziert werden, um bestimmte Hypothesen bezüglich seiner Struktur zu prüfen^[197-201, 394, 395].

6.1.7. Bindungsgleichgewichtsstudien – Was bleibt?

Zusammenfassend ergibt sich das folgende Bild über Organisation und Eigenschaften der Ligandenbindungsstellen am Acetylcholinrezeptor: Das Rezeptormonomer hat zwei Bindungsregionen für kompetitive cholinerge Liganden (Agonisten und Antagonisten). Beide Bindungsregionen unterscheiden sich in ihrer Struktur^[175]. Hierin mag der Grund dafür liegen, daß sie Agonisten^[303], aber auch einige α -Neurotoxine^[168] und einen Antagonisten^[301], mit ungleichen Affinitäten binden (zwei Klassen von Bindungsstellen). Darüber hinaus haben einige Gruppen cholinergere Liganden ihre eigene Bindungsstelle innerhalb jeder der beiden Bindungsregionen^[74, 175, 393]. Daß es dennoch zur vollständigen Konkurrenz zwischen diesen Liganden kommen kann, liegt daran, daß jeder die Bindungsregion so verändern kann, daß die Bindungsstellen der anderen Liganden nur noch eine stark verringerte Affinität aufweisen. Mit diesem Modell lassen sich z. B. die Wettbewerbsmuster monoklonaler Antikörper^[175] und die beschleunigte Dissoziation von Rezeptor-Toxin-Komple-

zen in Gegenwart cholinergischer Liganden^[74, 168, 169, 182] sowie andere allosterische Effekte^[283–285] erklären.

Für nichtkompetitive Blocker gibt es eine spezifische Bindungsstelle pro Rezeptormonomer sowie weitere Bindungsstellen an der Grenzfläche zwischen Rezeptor und Lipidumgebung und in der Lipidphase. Daß ihre spezifische Bindungsstelle mit der Solubilisierung des Rezeptors verloren geht, weist darauf hin, daß eine definierte Protein-Lipid-Organisation nötig ist. Da zwischen den kompetitiven (Agonisten und Antagonisten) und den nichtkompetitiven Liganden nur graduelle Unterschiede in der Struktur bestehen, hat jeder Ligand der einen Gruppe auch eine gewisse Affinität zu den Bindungsstellen für die Liganden der anderen Gruppe. Dies Verhalten ist bei den nichtkompetitiven Blockern besser zu erkennen, weil sie eine geringere Affinität haben und deshalb grundsätzlich in höheren Konzentrationen eingesetzt werden.

Die Struktur des Rezeptors ist durch Liganden – einschließlich Detergentien – leicht veränderbar^[125, 168]. Diese Strukturflexibilität verursacht die Komplexität der elektrophysiologisch beobachteten Zustände des Ionenkanals^[44–49], und es ist daher unwahrscheinlich, daß sich die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors mit einem Zwei- oder Drei-Zustände-Modell^[2, 6, 72, 73] erklären lassen. Solche Modelle sollten nur als Arbeitshypothesen auf dem Weg zu einem tieferen Verständnis dieses Informationsübertragungselementes betrachtet werden.

Die Gleichgewichtsstudien ermöglichen keine zuverlässige Aussage darüber, wieviel Agonistmoleküle für die Aktivierung des Rezeptors gebunden werden müssen. Unter irreversibler Verknüpfung an einer der in der Nähe der Bindungsstelle für Acetylcholin freigesetzten SH-Gruppen scheint allerdings die Aktivierung durch ein einziges Agonistmolekül möglich zu sein^[309, 313, 316, 317].

6.2. Kinetische Studien

Da der aktive (ionenleitende) Zustand des Rezeptors sehr kurzlebig ist, können die molekularen Eigenschaften dieses Zustandes nur mit Methoden studiert werden, deren Zeitauflösung im Bereich seiner Lebensdauer liegt. Geeignet sind fluoreszenzkinetische Messungen der Bindungsreaktion^[43, 324, 328–331, 396], Ionenflußmessungen hoher Zeitauflösung^[243, 244, 9] und die Kombination von beiden^[397]. Angesichts der Komplexität des Rezeptorsystems ist es sinnvoll, mit der Bearbeitung des einfachsten Systems – des gereinigten Rezeptorproteins – zu beginnen und von dort zu Systemen höherer Komplexität fortzuschreiten. Dabei zeigt sich^[354, 398], daß mit dem Übergang vom reinen Rezeptorprotein zu rezeptorreichen Membranfragmenten bereits eine erhebliche Zunahme funktioneller Variabilität des Rezeptors einhergeht. Dies betrifft insbesondere die Wechselwirkung mit nichtkompetitiven Blockern und den Mechanismus der Desensitivierung; zur Untersuchung dieser Prozesse bietet sich der membrangebundene Rezeptor daher besonders an^[324, 328–331, 354]. Da aus Ionenflußmessungen – wie auch aus anderen elektrophysiologischen Messungen – über die Wechselwirkung von Rezeptor und Ligand keine unmittelbare Aussage erhalten werden kann, sollen diese Untersuchungen^[9, 389] hier nicht betrachtet werden.

Von den Methoden zur kinetischen Analyse der Eigenschaften des Rezeptors eignen sich diejenigen am besten, bei denen Rezeptor und Ligand erst während der Messung zusammentreffen. Dies gilt vor allem, wenn der Ligand ein Agonist oder nichtkompetitiver Blocker ist, in deren Gegenwart der Rezeptor bereits im Subsekundenbereich seine Eigenschaften ändert^[35, 55, 61, 400]. Somit sind Methoden, bei denen ein Bindungsgleichgewicht zwischen Rezeptor und Ligand rasch verschoben wird, weniger geeignet^[401].

Wichtig für die Aussagekraft einer Untersuchung sind die Meßgröße – sie muß eindeutig, groß und einfach auszuwerten sein – sowie die pharmakologischen Eigenschaften der Reaktanten – ebenfalls eindeutig und möglichst einfach. Betrachtet man unter diesen Voraussetzungen die vorhandenen Methoden (detaillierte Übersicht vgl. ^[5]), so kommt nur die Fluoreszenzänderung von Liganden – am besten von reinen Agonisten oder Antagonisten – in Frage. Wegen der großen Funktionsvariabilität des Rezeptors können alle anderen Liganden oder Markermoleküle^[326–331] leicht zu Zustandsveränderungen des Rezeptors führen, so daß unabhängige grundlegende Aussagen nicht zu erhalten sind. Aus diesen Gründen sollen hier im wesentlichen die Untersuchungen mit dem Agonisten NBD-5-acetylcholin^[10, 43, 318–322, 354, 396] und den partiellen Agonisten *N-n*-Propyl-NBD-5-acetylcholin^[396] sowie Dansyl-6-acetylcholin^[323–325, 353, 397] (siehe Abb. 11) beschrieben werden.

Das Binden von NBD-5-acetylcholin an den gereinigten Rezeptor von *Electrophorus* führt zur vollständigen Löschung der Fluoreszenz des Liganden^[43, 82]. Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um die Kinetik dieser Wechselwirkung zu studieren (Stopped-Flow-Fluorimeter)^[396]. Dabei ergab die erste Analyse, daß die Assoziationskinetik (Abb. 14) aus mehreren Komponenten zusammengesetzt und daher ohne zusätzliche Annahmen nur begrenzt auswertbar ist. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Assoziation wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für physiologische Bedingungen und 20°C berechnet, die Assoziationsreaktion ist also ungewöhnlich schnell^[403].

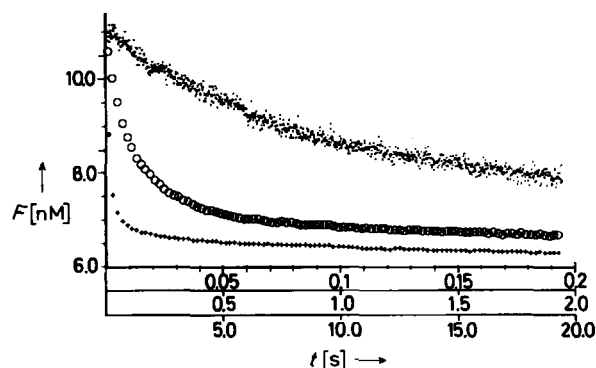


Abb. 14. Kinetik der Assoziation von NBD-5-acetylcholin an den gereinigten Acetylcholinrezeptor von *Electrophorus* [396]. Gleiche Volumina von Rezeptor (5.1 nM) und NBD-5-acetylcholin (10.95 nM) im gleichen Puffer wurden im Stopped-Flow-Fluorimeter rasch gemischt; die Abnahme der Fluoreszenz F (als Konzentration des fluoreszierenden Agens angegeben) wurde in Abhängigkeit von der Zeit t registriert (Digitaloscilloscop). Jede Spur ist aus vier Experimenten gemittelt worden; die drei Sätze von Experimenten unterscheiden sich in ihren Zeitbereichen. Zeitbereich 0.2–200 ms (O), 2–2000 ms (O·), 20–20000 ms (+). Vom Experiment mit dem kürzesten Zeitbereich sind alle 974 Punkte gezeigt, bei den beiden anderen wurden jeweils 10 Meßpunkte zu einem gemittelt.

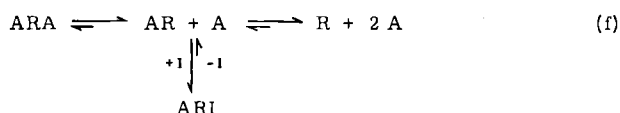
Die Dissoziationskinetik wurde auf zwei Wegen bestimmt, wobei die Ergebnisse wichtige Aussagen über den zugrundeliegenden Mechanismus lieferten: Wurde die Kinetik der Dissoziation nach rascher Verdünnung von NBD-5-acetylcholin-Rezeptor-Komplexen in Puffer gemessen, so wurden stets wenigstens zwei Reaktionsschritte beobachtet. Da beide auch bei niedriger Rezeptorbelegung – wenn nur eine der beiden Bindungsstellen am Rezeptor besetzt ist – auftraten, mußten zwei Sorten von Komplexen des halbgesättigten Rezeptors gebildet worden sein, da nur so zwei Schritte der Dissoziation möglich sind. Für diesen letzten Teil der Dissoziation können zwei Mechanismen formuliert werden [Gl. (d) und (e)] (die beiden Bindungsstellen werden parallel besetzt).



A = Agonist, R = Rezeptor

Wurde die Dissoziation der NBD-5-acetylcholin-Rezeptor-Komplexe durch Zumischen eines großen Überschusses eines nicht-fluoreszierenden, kompetitiven Liganden eingeleitet, so werden ebenfalls wenigstens zwei Reaktionsschritte beobachtet. Während die Anfangsgeschwindigkeit der Dissoziation unabhängig von Art und Konzentration des kompetierenden Liganden und vergleichbar mit der schnelleren Komponente der Verdünnungskinetik war, dissoziierte der NBD-5-acetylcholin-Rezeptor-Komplex im späteren Verlauf umso langsamer, je höher die Konzentration des kompetierenden Liganden war (Abb. 15). Tatsächlich konnte die Dissoziation der Komplexe „beliebig“ verlangsamt werden, wenn nur die Konzentration des kompetierenden Liganden genügend erhöht wurde (Abb. 15b). Diese Situation ist durch keinen ungeordneten Mechanismus der Assoziation und Dissoziation, auch nicht durch die Annahme zusätzlicher Bindungsstellen^[74, 168, 283–285] oder eines allosterischen Mechanismus^[2, 6, 72, 73] zu erklären. In all diesen Fällen dürfte die Halbwertszeit der Dissoziation niemals diejenige der am langsamsten dissoziierenden Komponente (τ_2 in Abb. 15b) überschreiten, wie dies im beobachteten Fall geschieht.

Die Dissoziationskinetik läßt sich jedoch bereits durch den einfachsten streng geordneten Mechanismus erklären [Gl. (f)].



A = Agonist, R = Rezeptor, I = kompetierender Ligand

(Zur Vereinfachung der Erklärung ist hier nur *ein* einfach besetzter Agonist-Rezeptor-Komplex angenommen worden, vgl. Gl. (d) und (e).) Bei diesem Mechanismus wäre die Dissoziation von ARA ($ARA \rightarrow AR$) (erste Komponente) unabhängig von der Gegenwart des kompetierenden Liganden, während die Dissoziation von AR ($AR \rightarrow R$) durch die Bildung von ARI verlangsamt würde. Je mehr ARI entsteht, desto weniger AR stünde für die Dissozia-

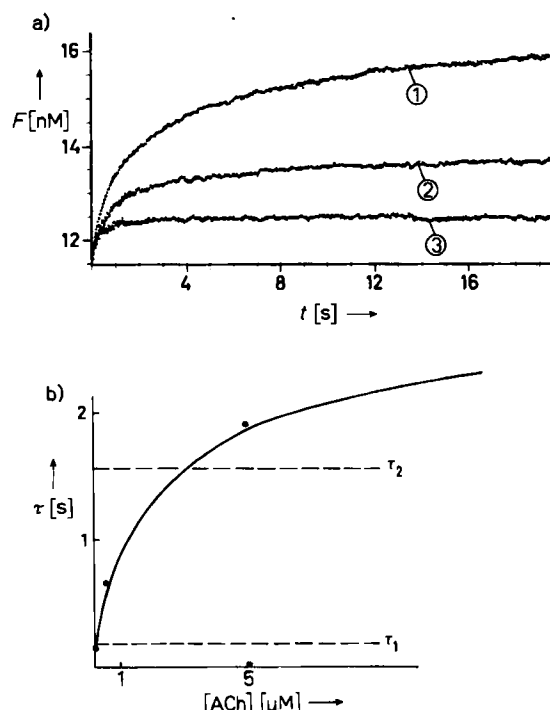
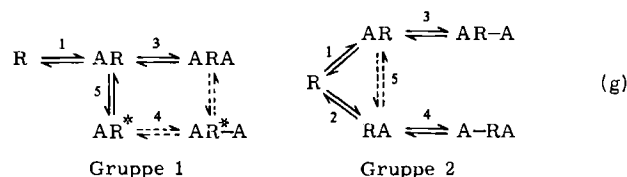


Abb. 15. Dissoziation von NBD-5-acetylcholin-Rezeptor-Komplexen in Gegenwart eines kompetierenden, nicht-fluoreszierenden Liganden. a) Gleiche Volumina von NBD-5-acetylcholin-Rezeptor-Komplexen und Acetylcholin in Standardpuffer wurden rasch vermisch und die Zunahme der Fluoreszenz als Funktion der Zeit mit einem Digitaloszilloskop aufgezeichnet. Jede Spur ist aus jeweils vier Experimenten unter gleichen Bedingungen gemittelt worden. Konzentrationen nach dem Mischvorgang: Rezeptor 5.05 nM; NBD-5-acetylcholin 20.65 nM; Acetylcholin 50 nM ③, 500 nM ② und 5000 nM ①. Zeiten, nach denen die Hälfte der NBD-5-acetylcholin-Rezeptor-Komplexe dissoziiert war: 96 ms in Abwesenheit von Acetylcholin, 138 ms ③, 636 ms ② und 1.9 s ①. – b) Halbwertszeiten τ der Dissoziation von NBD-5-acetylcholin-Rezeptor-Komplexen in Abhängigkeit von der Konzentration an Acetylcholin. Zum Vergleich sind die aus Verdünnungsexperimenten gewonnenen Halbwertszeiten der Dissoziation (τ_1, τ_2) eingezeichnet. Wie sich zeigt, kann die Halbwertszeit der Dissoziation der Komplexe in Gegenwart des kompetierenden Liganden auch diejenige der langsamsten Komponente der Verdünnungskinetik überschreiten. Daher muß die Dissoziation der an den Rezeptor gebundenen Liganden streng geordnet ablaufen, d. h. der von zwei Liganden zuerst gebundene Ligand wird zuletzt freigesetzt.

tion zur Verfügung. Somit würde die Dissoziation der im Voraus erzeugten fluoreszierenden Ligand-Rezeptor-Komplexe verlangsamt.

Werden die Ergebnisse der beiden Dissoziationsexperimente kombiniert, so ergeben sich zwei Gruppen von Reaktionsschemata [Gl. (g)].



Die gestrichelten Pfeile deuten an, daß mehrere Variationen der Grundschemata möglich sind. Plausible Funktionsmodelle zu diesen Reaktionsschemata sind in Abbildung 16 gegeben.

Anhand dieser Schemata sind Simultananpassungen kombinierter Sätze verschiedener Assoziations- und Dissoziationskinetiken und Gleichgewichtsbindungsexperimenten durchgeführt worden^[396]. Sie lieferten die Geschwindigkeitskonstanten aller in den Reaktionsschemata berück-

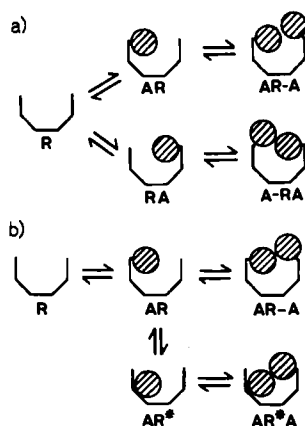


Abb. 16. Zwei Modelle zur Erklärung der aus den fluoreszenzkinetischen Befunden (Abb. 14 und 15) mit NBD-5-acetylcholin abgeleiteten Reaktionsschemata. a) Vom freien Rezeptor ausgehend werden zwei ihrer Struktur nach unterschiedliche Formen des halbbesetzten Rezeptors gebildet (AR und RA). Im vollbesetzten Rezeptor behindert der zuletzt gebundene Ligand die Abspaltung des zuerst gebundenen (sterische Hinderung). Dadurch kommt es zur streng geordneten Dissoziation der ARA-Komplexe; sie erfolgt in umgekehrter Reihenfolge wie die Assoziation. – b) Es wird zunächst nur eine Form des halbbesetzten Rezeptors gebildet (AR); diese kann spontan zu einer zweiten Form (AR*) isomerisieren. Die Wirkung des zuletzt gebundenen Liganden ist dann wie in a) beschrieben. Die Wirkung des zweiten Liganden muß nicht auf sterischer Hinderung des Zuganges zur ersten Bindungsstelle beruhen; die gleichen Effekte könnten auch durch allosterische Kopplungen zwischen den beiden Bindungsstellen zustande kommen.

sichtigen Reaktionsschritte. Sind diese bekannt, so kann man aus Anpassungen der Kompetitionskinetiken (Abb. 15) auch die Geschwindigkeitskonstanten für den kompetierenden Liganden (z. B. Acetylcholin) ermitteln. Entsprechende Daten (für Abb. 16b, vgl. Abb. 15) sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4. Reaktionsparameter für Reaktionsschema b) von Abbildung 16, erhalten aus simultanen Anpassungen von Gleichgewichts- und Kinetikstudien mit NBD-5-acetylcholin und dem gereinigten Acetylcholinrezeptor von *Electrophorus*.

Parameter	NBD-5-acetylcholin [a]	Acetylcholin [b]
k_1 [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	$4.8 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8$
k_{-1} [s^{-1}]	3.4	740
K_{D1} [M]	$7.0 \cdot 10^{-9}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$
k_3 [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	$3.4 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^6$
k_{-3} [s^{-1}]	19.4	400
K_{D3} [M]	$5.7 \cdot 10^{-8}$	$8 \cdot 10^{-5}$
k_4 [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	$7.9 \cdot 10^6$	$1.5 \cdot 10^5$
k_{-4} [s^{-1}]	0.53	0.09
K_{D4} [M]	$6.7 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-7}$
k_5 [s^{-1}]	0.52	170
k_{-5} [s^{-1}]	0.18	20
K_{D5} [M]	0.35	0.12
$K_D(1)$ [M] [c]	$1.8 \cdot 10^{-9}$	$1.6 \cdot 10^{-7}$
$K_D(2)$ [M] [c]	$6.5 \cdot 10^{-8}$	$6.7 \cdot 10^{-7}$

[a] Die Daten für NBD-5-acetylcholin wurden aus direkten Messungen erhalten. [b] Die Daten für Acetylcholin stammen aus Verdrängungskinetiken (vgl. Abb. 15) und wurden unter Konstanthaltung der für NBD-5-acetylcholin erhaltenen Parameter gewonnen. [c] $K_D(1)$ und $K_D(2)$ sind die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten, die sich für die jeweilige Bindungsstelle aus Bindungsexperimenten ergeben würden. Sie stehen wie folgt mit den Dissoziationskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte in Beziehung [81]:

$$\frac{1}{K_D(1)} = \frac{1}{K_{D1}} + \frac{1}{K_{D1} \cdot K_{D5}}$$

$$\frac{1}{K_D(1) \cdot K_D(2)} = \frac{1}{K_{D1} \cdot K_{D3}} + \frac{1}{K_{D1} \cdot K_{D4} \cdot K_{D5}}$$

Diese Daten zeigen, daß die beiden vollbesetzten Komplexe des Rezeptors, AR-A und AR*-A, sehr unterschiedliche Eigenschaften haben. AR-A entsteht und zerfällt

rasch, AR*-A wird dagegen langsam gebildet, ist jedoch auch erheblich stabiler. Aufgrund seines niedrigen K_D -Wertes (Acetylcholin) dominiert AR*-A im Gleichgewichtszustand. Da die Eigenschaften der beiden gesättigten Komplexe dem aktiven (ionenleitenden) und dem desensitvierten (inaktiven) Zustand des Rezeptors ähneln, ist postuliert worden^[396,10], daß die beschriebenen Reaktionsschemata „Minimalmodelle“ für den Mechanismus der cholinergen Reizung darstellen. Eine Simulation der cholinergen Reizung (Abb. 17) liefert tatsächlich befriedigende Übereinstimmung zwischen den aus kinetischen Daten mit dem gereinigten Rezeptorprotein berechneten zeitlichen Konzentrationsänderungen von AR-A und den elektrischen Ereignissen an der Muskellendplatte.

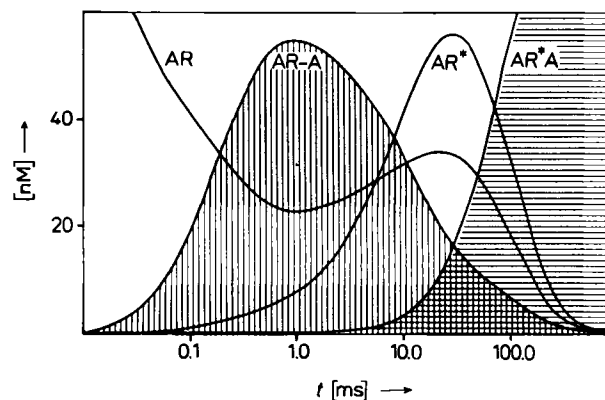


Abb. 17. Simulation der Transmitterbindungsreaktion im Verlauf eines cholinergen Reizvorganges [396]. Die Daten wurden anhand des in Abb. 16b erläuterten Reaktionsschemas mit den im Verlauf eines Reizvorganges vorhandenen Mindestkonzentrationen am Acetylcholin ($1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) und Rezeptor ($1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) berechnet. Die Auftragung macht deutlich, daß der Komplex AR-A den Charakter eines Zwischenzustandes hat, der in AR* und weiter in AR*A übergeht. Im Rahmen des von uns vorgeschlagenen Modells [10,396] – AR-A = aktiver Zustand des Rezeptors, AR*A = inaktiver (desensitvierter) Zustand – würde die Konzentrations-Zeit-Funktion für AR-A der Leitfähigkeitsänderung einer Muskelzelle unter Spannungsklemme im Verlauf der cholinergen Reizung und die Abnahme der Konzentration von AR-A der schnellen Desensitivierung entsprechen.

Mit diesen kinetischen Untersuchungen ist erstmals nachgewiesen worden^[396], daß die Assoziation von Agonisten und Rezeptor sowie die Dissoziation des Agonist-Rezeptor-Komplexes streng geordnete Prozesse sind. Dies ist wichtig sowohl für die Analyse von Rezeptorkinetiken wie auch für den Mechanismus der Ligandenerkennung und Kanalaktivierung. Da es sich bei den Assoziationen und Dissoziationen um stark geordnete Reaktionen handelt, dürfen diese nicht wie bisher üblich^[9, 32, 243, 289–291, 323–331, 397, 399–401] durch Exponentialanpassungen ausgewertet werden^[396,404], da sie dann sowohl falsche Geschwindigkeitskonstanten liefern wie auch auf kompliziertere Mechanismen hindeuten. Aus diesen Gründen kann sich ein Vergleich mit derart analysierten Daten auch nur auf wenige Eckwerte wie z. B. die Geschwindigkeitskonstanten des ersten Reaktionsschrittes beziehen. Für diese finden Heidmann und Changeux^[324] bei der Bindung von Dansyl-6-acetylcholin (Abb. 11) an Membranvesikeln von *Torpedo* ähnliche Werte ($9.5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Die niedrigeren Geschwindigkeitskonstanten um $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[401,405] beziehen sich, so lassen die für die Auswertung verwendeten Meßsignale vermuten, auf nachgeordnete Reaktionsschritte (entsprechend k_3 für Acetylcholin in Tabelle 4). Ein Reaktionsschritt mit ähnlicher Geschwindigkeitskon-

stante wird von *Heidmann* und *Changeux* nicht beschrieben. Sie beobachteten jedoch einen anderen bimolekularen langsamen Reaktionsschritt ($k = 3.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), für den es bisher kein einfaches Pendant im Aktivierungscyclus des Rezeptors gibt^[255, 256, 406]. Ein weiterer Reaktionsschritt bei der Assoziation von Dansyl-6-acetylcholin und Torpedo-Membranvesikeln ($k = 0.1 \text{ s}^{-1}$)^[324] scheint typisch für den membrangebundenen Rezeptor zu sein und wird auch mit NBD-5-acetylcholin (Abb. 12) als Ligand gefunden^[354, 398]. Auch andere^[329, 331] beschreiben derart langsame Reaktionsschritte bei der Wechselwirkung von Liganden mit dem Rezeptor. Wahrscheinlich betreffen sie den Übergang des aktivierten in den desensitivierten Zustand des Rezeptors.

Zusammenfassend liefern die hier beschriebenen kinetischen Studien der Wechselwirkung von Liganden mit dem Rezeptor bereits einen eigenständigen Beitrag zum Verständnis der Funktion des Acetylcholinrezeptors. Der Mechanismus der streng geordneten Assoziation und Dissoziation hätte durch bloße Untersuchungen der Reizantwort^[7, 9, 24, 28, 35, 47, 49, 79b, 243, 244, 397] wohl kaum gefunden werden können; er könnte aber von grundlegender Bedeutung für die Kanalaktivierung sein. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten setzen außerdem einen Rahmen für alle aus physiologischen Messungen gezogenen Schlüsse auf die Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und elektrischer Aktivität der Endplatte. Aus dem Vergleich der elektrophysiologischen und der biochemischen Befunde wird dennoch deutlich, daß letztere noch immer zu grob sind, um alle beschriebenen Funktionszustände des Rezeptors auf molekularer Ebene zu verstehen.

7. Der Acetylcholinrezeptor, integraler Signalwandler der Muskelendplatte

Schnelle cholinerge Transmission ist eine entscheidende Voraussetzung der biologischen Überlebensfähigkeit. Deshalb ist das hierfür verantwortliche molekulare System, der Acetylcholinrezeptor, mit seiner Membranumgebung, in der Evolution schon früh auf hohe Geschwindigkeit optimiert worden. Für den Gesamtvorgang sind neben den Eigenschaften des Rezeptors auch die hohe und synchronisierte Transmitterausschüttung^[27, 35, 64] sowie die kurze Verweilzeit des Transmitters im synaptischen Spalt von großer Bedeutung. Aufgrund der hohen Konzentration an Acetylcholinesterase im synaptischen Spalt^[407, 408] und ihrer extrem hohen Wechselzahl für den Transmitter^[402, 409] fällt

die Konzentration an nichtgebundenem Acetylcholin innerhalb weniger Millisekunden wieder auf ihren Basalwert zurück. Somit zeichnet sich die cholinerge Transmission durch hohe „Flankensteilheit“ (kurze Anlauf- und Abklingzeit) aus, und diese Eigenschaft ist sowohl für den gesamten Reizvorgang wie auch für jedes Einzelereignis typisch.

Für den Reaktionscyclus des Transmitters ist die Reizung des Rezeptors somit nur eine intermediäre Nebenreaktion (Abb. 1 und 18). Die kinetischen Untersuchungen mit NBD-5-acetylcholin (Abb. 11) und dem gereinigten Rezeptor machen es wahrscheinlich, daß ein vom Mechanismus ähnliches Prinzip – die für die Funktion wichtige Reaktion als intermediäre Schleife – auch für den eigentlichen Erregungsprozeß gilt (Abb. 16–18). Der durch Sättigungsbesetzung mit Agonist erreichte Zustand des ionenleitenden Rezeptorkanals wandelt sich innerhalb kurzer Zeit wieder in einen inaktiven Zustand um. Bei funktionsfähiger Esterase und begrenzter AcetylcholinKonzentration ist dies der inaktive Zustand des teilbesetzten oder freien Rezeptors, in Gegenwart hoher Transmitterkonzentrationen ist es der desensitivierte Zustand des vollbesetzten Rezeptors.

Da die Besetzung des Rezeptors mit Agonist das auslösende Signal für die Kanalaktivierung darstellt, ist es unwahrscheinlich, daß der Rezeptor sich auch in Abwesenheit von Agonisten im aktivierten Zustand befinden kann. Dies genau wäre jedoch die Konsequenz des speziellen allosterischen Modells (siehe auch Abschnitt 3)^[2, 4, 6, 8, 72, 73], das postuliert, daß die Zustände des Rezeptors auch in Abwesenheit von Liganden existieren und miteinander im Gleichgewicht stehen, und daß lediglich dieses Gleichgewicht durch Liganden verschoben wird (nach dem Modell hätten Agonisten eine höhere Affinität für den aktivierten, Antagonisten für den inaktiven Zustand des Rezeptors). Einzelkanalereignisse – d. h. die Aktivierung einzelner Rezeptormoleküle – sind jedoch niemals in Abwesenheit eines Agonisten beobachtet worden. Darüber hinaus ist eindeutig geklärt, daß auch keine Superstruktur der Synapse^[72] für die elektrische Erregung notwendig ist, sondern daß auch vereinzelt in der Membran befindliche Rezeptoren – extrasynaptische Rezeptoren – voll funktionsfähig sind. Aus diesen Gründen erscheint das spezielle allosterische Modell ungeeignet für das Verständnis der molekularen Vorgänge im Verlauf neuronaler Reizprozesse, obwohl vereinzelte Hinweise auf Gleichgewichte zwischen ver-

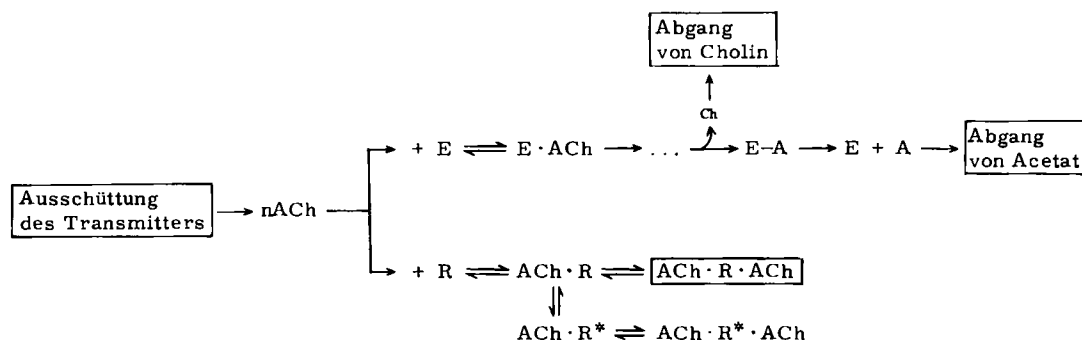


Abb. 18. Acetylcholinrezeptor R und Acetylcholinesterase E kompetieren um den ausgeschütteten Transmitter (siehe auch Abbildung 1b) [412]. Aus kinetischen Messungen mit Rezeptor, Esterase und dem fluoreszierenden Acetylcholinanalogon NBD-5-acetylcholin [321] (Abb. 11) läßt sich schließen, daß beide Makromoleküle etwa gleichschnell mit dem Transmitter reagieren. Deshalb sind Rezeptorreizung und Transmitterverseifung Parallelreaktionen. Da die Rezeptorreizung ein reversibler Prozeß ist, die Transmitterverseifung aber gerichtet verläuft, kann die Reizung als Verzögerungsschleife innerhalb der Reaktionssequenz zwischen Esterase und Transmitter betrachtet werden.

schiedenen Zuständen des freien Rezeptors existieren^[2, 6, 8, 230, 233, 324, 328].

Im Gegensatz zur Annahme mehrerer Zustände für den nicht besetzten Rezeptor scheint es dagegen klar zu sein, daß der mit Agonist besetzte Rezeptor in einer Vielzahl von Zuständen und Unterzuständen auftreten kann^[44-49, 175, 396]. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Hinweisen auf allosterische Wechselwirkungen zwischen Bereichen des Rezeptors, die relativ weit entfernt voneinander sind^[74, 168, 169, 175]. Es ist auch beachtenswert, daß nichtkompetitive Blocker ihre Wirkung bevorzugt am Agonist-besetzten Rezeptor ausüben^[35]. Aus diesen Gründen sollte die Strukturvariabilität des mit Liganden und Modulatoren besetzten Rezeptors betont werden. Dies ist auch im Sinne eines höher entwickelten biologischen Signalwandlers, nämlich auf verschiedene Liganden differenziert zu reagieren. Daß dieser oft als primitiv angesehene Rezeptor zu einem derart differenzierten Erkennungsprozeß imstande ist, deutet an, daß er bereits die wesentlichen molekularen Voraussetzungen für höhere neuronale Aufgaben (z. B. Informationsmodulation, -selektion und Gedächtnis) aufweist.

In diesem Zusammenhang ist auch die Bedeutung der streng geordneten Assoziation und Dissoziation zu sehen^[396]. Hierdurch werden zwei für die Funktion als Signalwandler wichtige Effekte erreicht: 1. Der primäre Bindungsprozeß kann schnell sein, da er selbst nicht für die Umwandlung des Rezeptors in den aktiven Zustand notwendig ist. Erst das Binden des zweiten Agonisten verursacht die Aktivität. 2. Die Verweilzeit des erstgebundenen Liganden in seiner Bindungsstelle wird durch die Besetzung der zweiten Bindungsstelle beeinflußt. Diese Effekte könnten einen Schlüssel zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Kanalaktivierung bieten: Indem zwei Agonisten für die Kanalaktivierung notwendig sind, wird die Spezifität der Reizung erhöht; sie wird durch den geordneten Mechanismus weiter gesteigert. Dadurch wird eine Wechselwirkung, die durch relativ niedrige Affinität und hohe Hin- und Rückreaktionsgeschwindigkeiten charakterisiert ist, noch hinreichend spezifisch. Noch wichtiger könnte die Verweilzeit des erstgebundenen Agonisten in seiner Bindungsstelle sein. Um dies zu verstehen, ist es günstig, statt der bisher benutzten starren Modelle solche mit „verschiebbaren“ Bindungsstellen in die Überlegungen einzubeziehen. Bei einem geordneten Mechanismus ist prinzipiell die „Verschiebung“ des erstgebundenen Liganden in eine andere Position am Molekül möglich, und ein Mechanismus dieser Art ist auch für die in ihrem Aktivitätszentrum sehr ähnlich strukturierte Esterase vorgeschlagen worden^[321, 410]. Legte man einen derartigen Mechanismus zugrunde – das Binden des zweiten Agonisten „schiebt“ den ersten an die zur Aktivierung fähige Position und hält ihn dort fest – so wären auch die Befunde bei der Kanalaktivierung durch irreversible Liganden verständlich^[89, 309, 313]; für diesen Prozeß ist gefunden worden, daß bereits ein einziges Agonistmolekül zur Aktivierung ausreicht. Dies ließe sich dadurch erklären, daß nach irreversibler Bindung eines Agonisten an die „aktivierende“ Position kein weiterer Agonist mehr notwendig ist, um den ersten in seiner Position zu halten. Diese Vorstellung läßt sich leicht an einem Modell (Abb. 19) plausibel machen. Mit diesem „Verschiebungsmodell“ lassen sich auch die

experimentellen Daten über die Desensitivierung verstehen, wenn man postuliert, daß die Besetzung der aktivierenden (ersten) Bindungsstelle keine unmittelbare Beziehung zur Desensitivierung hat, sondern daß diese durch die Besetzung der zweiten (peripheren) Bindungsstelle kontrolliert wird. Wie experimentell an Einzelpräparationen von *Elektrophorus* gezeigt worden ist, reicht die irreversible Verknüpfung eines Agonistmoleküls pro Rezeptormonomer zwar für die Kanalaktivierung, nicht aber für die rasche Desensitivierung aus.

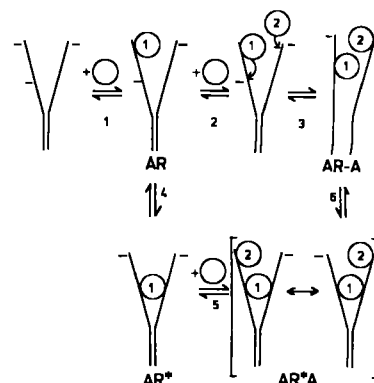


Abb. 19. „Verschiebungsmodell“ für die Agonist-induzierte Kanalaktivierung des Acetylcholinrezeptors. Es wird angenommen, daß die innere Bindungsstelle für Agonisten durch „Verschieben“ des Liganden aus einer äußeren Bindungsstelle besetzt wird. Dies kann schnell (k_1 , unter Öffnung des Ionenkanals), aber auch langsam (nach vorheriger Isomerisierung des Rezeptors, ohne Beeinflussung des Kanalzustandes) erfolgen (vgl. auch Abb. 16-18). Die Geschwindigkeitskonstanten sprechen dafür, daß AR-A ein metastabiler Zustand ist, aus dem sich schließlich AR-A* bildet.

Die hier beschriebenen Modelle sind noch neu. Sie sollen unter anderem die Entwicklung illustrieren, die unsere Vorstellungen vom Mechanismus der cholinergen Reizung genommen haben. Zuerst war die Esterase das herausragende Forschungsobjekt^[64]. Später wurde der Rezeptor als das zentrale Element des Reizvorganges vorgeschlagen^[72, 73] und nachgewiesen^[1, 2, 4] und schließlich als kompletter Signalwandler identifiziert^[12-14]. Die physiologische und biochemische Forschung der letzten Jahre ergab nun, daß der Rezeptor ein sehr komplexer, in seinen Eigenschaften vielfältig modulierbarer Signalwandler ist. Dabei werden die Zustände des Rezeptors mit Ausnahme seines Ruhezustandes durch die Bindung der Liganden bewirkt.

Die Struktur- und Funktionsvariabilität des Rezeptors darf nicht davon ablenken, daß die grundlegenden Reaktionen seiner Aktivierung und Inaktivierung nach eindeutigen Mechanismen ablaufen. Ein möglicher Mechanismus für diese Prozesse ist von uns^[396] aus rein biochemischen Befunden abgeleitet worden. Sein zentrales Element ist die streng geordnete Assoziation des Transmitters und seiner Agonisten mit dem Rezeptor und die Dissoziation der entsprechenden Komplexe. Dieser Mechanismus kann zum besseren Verständnis der bekannten elektrophysiologischen Vorgänge beitragen, er kann aber darüber hinaus auch bisher nicht verstandene experimentelle Fakten erklären. Er sollte sich daher auch bei weiteren Untersuchungen dieses Rezeptors und anderer Rezeptorsysteme als fruchtbar erweisen. Neben den Einblicken in die Biologie und Pathobiologie dieses Rezeptor-Ionenkanal-Systems könnte hier auch ein Zugang zu den komplexeren Kommunikationssystemen des Zentralnervensystems liegen. Der hier beschriebene Stand der Forschung in einem

Teilbereich der interzellulären Kommunikation zeigt auch, daß derart komplizierte biologische Systeme nicht allein durch chemische Untersuchungen verstanden werden können. Die Fortschritte der letzten Jahre auf diesem Gebiet sind zu einem wesentlichen Teil mit molekularphysiologischen, molekularbiologischen und immunologischen Methoden erarbeitet worden.

Die Arbeiten unseres Laboratoriums wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fond der Chemischen Industrie gefördert.

Eingegangen am 16. Januar 1984 [A 487]

Übersichtsartikel:

- [1] A. Maelicke, B. W. Fulpius, E. Reich in E. R. Kandel: *Handbook of Physiology, Section 1, Vol. 1*, Am. Physiol. Soc., Bethesda, MD, USA 1977, S. 493.
- [2] T. Heidmann, J.-P. Changeux, *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 317.
- [3] D. Fambrough, *Physiol. Rev.* 59 (1979) 165.
- [4] A. Karlin in C. W. Cotman, G. Poste, G. L. Nicholson: *The Cell Surface and Neuronal Function*, Elsevier, Amsterdam 1980, S. 191 ff.
- [5] A. Maelicke in A. S. V. Burgin, G. C. K. Roberts: *Topics in Molecular Pharmacology Vol. 1*, Elsevier, Amsterdam 1981, S. 1.
- [6] J.-P. Changeux, *Harvey Lect.* 75 (1981) 85.
- [7] K. Peper, R. J. Bradley, F. Dreyer, *Physiol. Rev.* 62 (1982) 1271.
- [8] B. M. Conti-Tronconi, M. A. Raftery, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 491.
- [9] G. P. Hess, D. J. Cash, H. Aoshina, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 12 (1983) 443.
- [10] A. Maelicke, H. Prinz, *Mod. Cell Biol.* 1 (1983) 171.
- [11] Zum Einstieg in die Thematik siehe auch: F. Hucho, *Biol. Unserer Zeit* 13 (1983) 1.

Originalliteratur:

- [12] G. Boheim, W. Hanke, F. J. Barrantes, H. Eibl, B. Sakmann, G. Fels, A. Maelicke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3586.
- [13] R. Anholt, D. R. Fredkin, T. Deerinck, M. Ellisman, M. Montal, J. Lindstrom, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7122.
- [14] B. A. Suarez-Isla, K. Wan, J. Lindstrom, M. Montal, *Biochemistry* 22 (1983) 2319.
- [15] L. M. Huang, W. A. Catterall, G. Ehrenstein, *J. Gen. Physiol.* 71 (1978) 397.
- [16] T. M. Dwyer, D. J. Adams, B. Hille, *J. Gen. Physiol.* 75 (1980) 469.
- [17] B. Katz: *Nerve, Muscle and Synapse*, McGraw-Hill, New York 1966.
- [18] D. Colquhoun in R. D. O'Brien: *The Receptors, A Comprehensive Treatise, Vol. 1*, Plenum Press, New York 1979, S. 93.
- [19] S. W. Kuffler, J. G. Nicholls: *From Neuron to Brain*, Sinauer, Sunderland, MA, USA 1977.
- [20] K. L. Magleby, C. F. Stevens, *J. Physiol. London* 223 (1972) 173.
- [21] P. W. Gage, R. N. McBurney, *J. Physiol. London* 244 (1975) 385.
- [22] C. R. Anderson, C. P. Stevens, *J. Physiol. London* 235 (1973) 655.
- [23] R. E. Sheridan, H. A. Lester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3496.
- [24] V. E. Dionne, C. F. Stevens, *J. Physiol. London* 251 (1975) 245.
- [25] R. E. Sheridan, H. A. Lester, *J. Gen. Physiol.* 70 (1977) 187.
- [26] A. Takeuchi, N. Takeuchi, *J. Neurophysiol.* 22 (1959) 395.
- [27] S. W. Kuffler, D. Yoshikami, *J. Physiol. London* 251 (1975) 465.
- [28] H. A. Lester, D. D. Koblin, R. E. Sheridan, *Neurosci. Abstr.* 2 (1976) 714.
- [29] J. C. Whatney, M. M. Nass, H. A. Lester, *Biophys. J.* 27 (1979) 145.
- [30] T. L. Lentz, J. Mazurkiewicz, J. Rosenthal, *Brain Res.* 132 (1977) 423.
- [31] H. Prinz, R. Jürss, A. Maelicke, *Neurochem. Int.* 2 (1980) 251.
- [32] E. Neher, B. Sakmann, *Nature* 260 (1976) 799.
- [33] O. P. Hamill, E. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, *Pfluegers Arch.* 391 (1981) 85.
- [34] K. L. Magleby, C. F. Stevens, *J. Physiol. London* 223 (1972) 151.
- [35] P. R. Adams, *J. Membr. Biol.* 58 (1981) 161.
- [36] J. J. Lambert, N. N. Durant, E. G. Henderson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23 (1983) 505.
- [37] D. Wray, *Prog. Drug Res.* 24 (1980) 9.
- [38] D. Colquhoun, B. Sakmann, *Nature* 294 (1981) 464.
- [39] M. E. Krouse, H. A. Lester, M. M. Nass, J. M. Nerbonne, N. H. Wasermaier, B. F. Erlanger, *Soc. Neurosci. Abstr.* 5 (1979) 483.
- [40] D. Colquhoun, V. E. Dionne, J. H. Steinbach, C. F. Stevens, *Nature* 253 (1975) 204.
- [41] D. J. Nelson, F. Sachs, *Biophys. J.* 37 (1982) 321.
- [42] B. Sakmann, P. R. Adams, *Adv. Pharmacol. Ther.* 1 (1979) 81.
- [43] R. Jürss, H. Prinz, A. Maelicke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 1064.
- [44] O. P. Hamill, B. Sakmann, *Nature* 294 (1981) 462.
- [45] A. Trautmann, *Nature* 298 (1982) 272.
- [46] F. J. Sigworth, *Biophys. J.* 37 (1982) 309.
- [47] A. Auerbach, F. Sachs, *Biophys. J.* 42 (1983) 1.
- [48] M. B. Jackson, B. S. Wong, C. E. Morris, H. Lecar, C. N. Christian, *Biophys. J.* 42 (1983) 109.
- [49] S. M. Sine, J. H. Steinbach, *Biophys. J.* 45 (1984) 149.
- [50] P. Fatt, *J. Physiol. London* 111 (1950) 408.
- [51] B. Katz, S. Thesleff, *J. Physiol. London* 138 (1957) 63.
- [52] E. T. Larmie, G. B. Webb, *J. Gen. Physiol.* 61 (1973) 263.
- [53] H. A. Lester, J.-P. Changeux, R. E. Sheridan, *J. Gen. Physiol.* 65 (1975) 797.
- [54] K. L. Magleby, B. S. Palotta, *J. Physiol. London* 316 (1981) 225.
- [55] A. Feltz, A. Trautmann, *J. Physiol. London* 322 (1982) 257.
- [56] T. J. Chestnut, *J. Physiol. London* 336 (1983) 229.
- [57] L. G. Magazanik, F. Vyskocil, *J. Physiol. London* 210 (1970) 507.
- [58] R. L. Parson, R. M. Schnitzler, D. E. Corane, *Am. J. Physiol.* 227 (1974) 96.
- [59] L. G. Magazanik, F. Vyskocil, *J. Physiol. London* 249 (1975) 285.
- [60] D. A. Terrar, *Br. J. Pharmacol.* 51 (1974) 259.
- [61] B. Sakmann, J. Patlak, E. Neher, *Nature* 286 (1980) 71.
- [62] J. N. Langley, *Proc. R. Soc. London Ser. B* 78 (1906) 170.
- [63] H. H. Dale, *J. Pharmacol.* 6 (1914) 147.
- [64] D. Nachmansohn, *Harvey Lect.* 49 (1955) 57.
- [65] A. J. Clark in A. Heffter: *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk, Vol. 4*, Springer, Berlin 1937, S. 62.
- [66] J. J. Lambert, N. N. Durant, L. S. Reynolds, R. L. Volle, E. G. Henderson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216 (1981) 62.
- [67] D. C. Ogden, S. A. Siegelbaum, D. Colquhoun, *Nature* 289 (1981) 596.
- [68] T. Heidmann, J.-P. Changeux, *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 317.
- [69] H. H. Dale, P. P. Laidlaw, *J. Pharmacol.* 3 (1911) 205.
- [70] B. Belleau, *Can. J. Biochem. Physiol.* 36 (1958) 731.
- [71] E. J. Ariens, *Mol. Pharmacol.* 1 (1964) 1.
- [72] J.-P. Changeux, J. Thiéry, Y. Tung, C. Kittel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57 (1967) 335.
- [73] A. Karlin, *J. Theor. Biol.* 16 (1967) 306.
- [74] S. Kang, A. Maelicke, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 7326.
- [75] J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 88.
- [76] D. Colquhoun in H. P. Rang: *Drug Receptors*, MacMillan, London 1973, S. 149.
- [77] J.-P. Changeux, T. R. Podleski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59 (1968) 944.
- [78] A. Feltz, A. Mallart, *J. Physiol. London* 218 (1971) 85.
- [79] a) F. Dreyer, K. Peper, R. Sterz, *J. Physiol. London* 281 (1978) 395; b) K. Peper, F. Dreyer, K. D. Müller, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40 (1976) 187.
- [80] R. Werman, *Comp. Biochem. Physiol.* 30 (1969) 997.
- [81] H. Prinz, *J. Recept. Res.* 3 (1983) 239.
- [82] H. Prinz, A. Maelicke, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 10263.
- [83] E. J. Ariens, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 99 (1954) 32.
- [84] R. P. Stephenson, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 11 (1956) 379.
- [85] A. Karlin, E. Bartels, *Biochim. Biophys. Acta* 126 (1966) 525.
- [86] A. Karlin, *J. Gen. Physiol.* 54 (1969) 245.
- [87] C. L. Weill, M. G. McNamee, A. Karlin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61 (1974) 997.
- [88] A. Karlin, M. Winnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60 (1968) 668.
- [89] I. Silman, A. Karlin, *Science* 164 (1969) 1420.
- [90] D. Ben-Haim, F. Dreyer, K. Peper, *Pfluegers Arch.* 355 (1975) 19.
- [91] P. Leprince, *Biochemistry* 22 (1983) 5551.
- [92] E. Bartels-Bernal, T. E. Rosenberry, H. W. Chang, *Mol. Pharmacol.* 12 (1976) 813.
- [93] V. N. Damle, A. Karlin, *Biochemistry* 17 (1978) 2039.
- [94] J. M. Wolosin, A. Lyddiatt, J. P. Dolly, E. A. Barnard, *Eur. J. Biochem.* 109 (1980) 495.
- [95] R. J. Lukas, E. L. Bennett, *J. Biol. Chem.* 255 (1979) 5573.
- [96] C. Y. Lee, *Annu. Rev. Pharmacol.* 12 (1972) 265.
- [97] V. A. Eterovic, E. L. Bennett, *Biochim. Biophys. Acta* 362 (1974) 346.
- [98] P. Salvaterra, H. Mahler, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 6327.
- [99] B. J. Morley, J. F. Lorden, G. B. Brown, G. E. Kemp, R. J. Bradley, *Brain Res.* 134 (1977) 161.
- [100] L. G. Abood, W. Lathan, S. Grassi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 3536.
- [101] R. D. Schwartz, K. J. Keller, *Mol. Pharmacol.* 24 (1983) 387.
- [102] B. J. Morley, G. R. Farley, E. Javel, *Trends Pharmacol. Sci.* 4 (1983) 225.
- [103] S. Yazulla, J. Schmidt, *Vision Res.* 16 (1976) 878.
- [104] Z. Vogel, G. Maloney, A. Ling, M. P. Daniels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 3268.
- [105] H. Betz, *Eur. J. Biochem.* 117 (1981) 131.
- [106] L. Nelson, *Exp. Cell. Res.* 101 (1976) 221.
- [107] L. A. Green, *Brain Res.* 111 (1976) 135.
- [108] H. Breer, *Neurochem. Int.* 3 (1981) 43.
- [109] G. Lees, D. J. Beadle, R. P. Bothan, *Brain Res.* 288 (1983) 49.

- [110] M. T. Filbin, G. G. Lunt, J. F. Donnellan, *Eur. J. Biochem.* 132 (1983) 151.
- [111] A. Francis, B. Schechter, *Neuroscience* 5 (1980) 293.
- [112] B. K. Schmidt-Nielsen, J. I. Gepner, N. N. H. Teng, L. M. Hall, *J. Neurochem.* 29 (1977) 1013.
- [113] G. Fels, H. Breer, A. Maelicke in F. Hucho, Y. A. Ovchinnikov: *Toxins as Tools in Neurochemistry*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 127.
- [114] I. D. Harrow, B. Hue, M. Pelhate, D. B. Satelle, *J. Physiol. London* 295 (1979) 63.
- [115] S. T. Carbonetto, D. M. Fambrough, K. J. Muller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 1016.
- [116] D. Brown, *Adv. Cytopharmacol.* 3 (1979) 225.
- [117] E. A. Barnard, J. O. Dolly, *Trends Neurosci.* 5 (1982) 325.
- [118] G. Biesecker, *Biochemistry* 12 (1973) 4403.
- [119] R. P. Klett, B. W. Fulpius, D. Cooper, M. Smith, E. Reich, L. D. Possani, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 6841.
- [120] J. Meunier, R. Sealock, R. Olsen, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 45 (1974) 371.
- [121] S. C. Froehner, C. G. Reines, Z. W. Hall, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8589.
- [122] J. P. Merlie, J.-P. Changeux, F. Gros, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 2882.
- [123] J. Lindstrom, J. Cooper, S. Tzartos, *Biochemistry* 19 (1980) 1454.
- [124] J. Lindstrom, B. Einarson, S. Tzartos, *Methods Enzymol.* 74 (1981) 452.
- [125] R. Rüchel, D. Watters, A. Maelicke, *Eur. J. Biochem.* 119 (1981) 215.
- [126] F. A. Stephenson, R. Harrison, G. G. Lunt, *Eur. J. Biochem.* 115 (1981) 91.
- [127] R. G. Shorr, A. Lydiatt, M. M. S. Lo, J. O. Dolly, E. A. Barnard, *Eur. J. Biochem.* 116 (1981) 143.
- [128] M. Y. Momoi, V. A. Lennon, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 12757.
- [129] C. Gotti, B. M. Conti-Tronconi, M. A. Raftery, *Biochemistry* 21 (1982) 3148.
- [130] B. Einarson, W. Gullick, B. M. Conti-Tronconi, M. Ellisman, J. Lindstrom, *Biochemistry* 21 (1982) 5295.
- [131] J. M. Lindstrom, J. F. Cooper, L. W. Swanson, *Biochemistry* 22 (1983) 3796.
- [132] J. Lindstrom, W. Gullick, B. M. Conti-Tronconi, M. Ellisman, *Biochemistry* 19 (1980) 4791.
- [133] K. Sumikawa, F. Mehraban, J. O. Dolly, E. A. Barnard, *Eur. J. Biochem.* 126 (1982) 465.
- [134] H. C. Fertuck, M. M. Salpeter, *J. Cell Biol.* 69 (1976) 144.
- [135] J. P. Bourgeois, J. L. Popot, A. Ryter, J.-P. Changeux, *J. Cell Biol.* 79 (1978) 200.
- [136] J.-P. Changeux, J. Giraudat, T. Heidmann, J. L. Popot, A. Sobel, *Neurochem. Int.* 2 (1980) 219.
- [137] R. R. Neubig, E. Krodell, N. D. Boyd, J. B. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 690.
- [138] J. M. Gonzalez-Ros, M. M. Llanillo, A. Paraschos, A. Martinez-Carrion, *Biochemistry* 21 (1982) 3467.
- [139] J. L. Popot, A. Demel, A. Sobel, L. M. Van Deenen, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 85 (1978) 27.
- [140] F. Hucho, G. Bandini, B. A. Suarez-Isla, *Eur. J. Biochem.* 83 (1978) 335.
- [141] A. Sobel, T. Heidmann, J. Hofler, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 510.
- [142] C. D. Strader, E. Lazarides, M. A. Raftery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92 (1980) 365.
- [143] H. P. Zingsheim, J. Frank, D.-C. Neugebauer, F. J. Barrantes, *Eur. J. Cell Biol.* 22 (1980) 254.
- [144] J. Cartaud, E. L. Benedetti, J. B. Cohen, J. C. Meunier, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 33 (1973) 109.
- [145] M. J. Ross, M. W. Klymkowsky, D. A. Agard, R. M. Stroud, *J. Mol. Biol.* 116 (1977) 635.
- [146] J. E. Heuser, S. R. Salpeter, *J. Cell Biol.* 82 (1979) 150.
- [147] M. W. Klymkowsky, R. M. Stroud, *J. Mol. Biol.* 128 (1979) 319.
- [148] J. Kistler, R. M. Stroud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3678.
- [149] D. S. Wise, J. Wall, A. Karlin, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 12624.
- [150] J. Kistler, R. M. Stroud, M. W. Klymkowsky, R. A. Lalancette, R. H. Fairclough, *Biophys. J.* 37 (1982) 371.
- [151] H. P. Zingsheim, D.-C. Neugebauer, J. Frank, W. Hänicke, F. J. Barrantes, *EMBO J.* 1 (1982) 541.
- [152] H. P. Zingsheim, F. J. Barrantes, J. Frank, W. Hänicke, D.-C. Neugebauer, *Nature* 299 (1982) 81.
- [153] A. Karlin, E. Holtzman, N. Yodh, P. Lobel, J. Wall, J. Hanifield, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6678.
- [154] D. S. Wise, A. Karlin, B. P. Schoenborn, *Biophys. J.* 28 (1979) 473.
- [155] S. Reinhardt, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin 1983.
- [156] D. Aslanian, T. Heidmann, M. Nagreie, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 164 (1983) 393.
- [157] A. Sobel, M. Weber, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 80 (1977) 215.
- [158] J. Lindstrom, J. Merlie, G. Yogeewaran, *Biochemistry* 18 (1979) 4465.
- [159] S. Tzartos, J. Lindstrom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 755.
- [160] S. C. Froehner, S. Rafto, *Biochemistry* 18 (1979) 301.
- [161] S. C. Froehner, V. Gulbrandsen, C. Hyman, A. Y. Jeng, R. R. Neubig, J. B. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 5320.
- [162] L. P. Wennogle, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 106 (1980) 381.
- [163] M. M. S. Lo, P. B. Garland, J. Lamprecht, E. A. Barnard, *FEBS Lett.* 111 (1980) 407.
- [164] F. J. Barrantes, D.-C. Neugebauer, H. P. Zingsheim, *FEBS Lett.* 112 (1980) 73.
- [165] J. Cartaud, A. Sobel, A. Rousselet, P. F. Devaux, J.-P. Changeux, *J. Cell Biol.* 90 (1981) 418.
- [166] R. Sealock, *J. Cell Biol.* 92 (1982) 514.
- [167] S. Porter, S. C. Froehner, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 10034.
- [168] A. Maelicke, B. W. Fulpius, R. P. Klett, E. Reich, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 4811.
- [169] A. Maelicke, M. McConnell in A. Karlin, V. M. Tennyson, H. J. Vogel: *Neuronal Information Transfer*, Academic Press, New York 1978, S. 171.
- [170] R. L. Huganir, E. Racker, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 9372.
- [171] C. M. Gomez, D. P. Richman, P. W. Berman, S. Burres, B. G. W. Arnason, F. W. Fitch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88 (1979) 575.
- [172] D. Moshly-Rosen, S. Fuchs, Z. Eshhar, *FEBS Lett.* 106 (1979) 389.
- [173] R. W. James, A. C. Kato, M.-J. Rey, B. W. Fulpius, *FEBS Lett.* 120 (1980) 145.
- [174] D. Watters, A. Maelicke in F. Hucho: *Neuroreceptors*, de Gruyter, Berlin 1982.
- [175] D. Watters, A. Maelicke, *Biochemistry* 22 (1983) 1811.
- [176] W. J. Gullick, J. M. Lindstrom, *Biochemistry* 22 (1983) 3312.
- [177] C. M. Fraser, R. Gregurski, B. Eddy, J. C. Venter, *J. Cell. Biochem.* 21 (1983) 219.
- [178] J. P. Brockes, Z. W. Hall, *Biochemistry* 14 (1975) 2092.
- [179] M. A. Raftery, R. L. Vandler, K. L. Reed, T. Lee, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40 (1976) 193.
- [180] C. Mattson, E. Heilbronn, *J. Neurochem.* 25 (1975) 899.
- [181] W. M. Moore, L. A. Holladay, D. Puett, R. N. Brady, *FEBS Lett.* 45 (1974) 145.
- [182] B. H. Yang, P. V. Sundaram, A. Maelicke, *Biochem. J.* 199 (1981) 317.
- [183] A. Karlin, C. Weill, M. McNamee, R. Valderama, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40 (1976) 193.
- [184] R. E. Gibson, R. O'Brien, S. J. Edelstein, W. R. Thompson, *Biochemistry* 15 (1976) 2377.
- [185] W. Doster, B. Hess, D. Watters, A. Maelicke, *FEBS Lett.* 113 (1980) 312.
- [186] H. W. Chang, E. Bock, *Biochemistry* 16 (1977) 4513.
- [187] S. L. Hamilton, M. McLaughlin, A. Karlin, *Biochemistry* 18 (1979) 155.
- [188] B. Suarez-Isla, F. Hucho, *FEBS Lett.* 75 (1977) 65.
- [189] G. Weiland, D. Frisman, P. Taylor, *Mol. Pharmacol.* 15 (1979) 213.
- [190] M. A. Raftery, J. Schmidt, D. G. Clark, R. G. Wolcott, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 (1971) 1622.
- [191] M. A. Raftery, J. Schmidt, D. G. Clark, *Arch. Biochem. Biophys.* 152 (1972) 882.
- [192] J. C. Meunier, R. W. Olsen, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 24 (1972) 63.
- [193] L. T. Pottter in H. P. Rang: *Drug Receptors*, MacMillan, London 1973, S. 295.
- [194] C. Tanford, Y. Nozaki, J. A. Reynolds, S. Makino, *Biochemistry* 13 (1974) 2369.
- [195] J. A. Reynolds, C. Tanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 4467.
- [196] J. A. Reynolds, A. Karlin, *Biochemistry* 17 (1978) 2035.
- [197] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosota, Y. Furutani, T. Hirose, M. Asai, S. Inayama, T. Miyata, S. Numa, *Nature* 299 (1982) 793.
- [198] K. Sumikawa, M. Houghton, J. C. Smith, L. Bell, B. M. Richards, E. A. Barnard, *Nucleic Acid Res.* 10 (1982) 5809.
- [199] T. Claudio, M. Ballivet, J. Patrick, S. Heinemann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 1111.
- [200] A. Devillers-Thiery, J. Giraudat, M. Bentabollet, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 2067.
- [201] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosota, S. Kikuyotani, Y. Furutani, T. Hirose, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, S. Numa, *Nature* 302 (1983) 528.
- [202] M. A. Raftery, M. W. Hunkapillar, C. D. Strader, L. E. Hood, *Science* 208 (1980) 1454.
- [203] F. Hucho, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 38 (1973) 11.
- [204] F. Hucho, A. Gordon, H. Sund in H. Sund, G. Blauer: *Protein-Ligand Interactions*, de Gruyter, Berlin 1975, S. 306.
- [205] B. S. Leach, J. F. Collawn, W. W. Fish, *Biochemistry* 19 (1980) 5734.
- [206] A. Aharonow, R. Tarrab-Hazdai, I. Silman, S. Fuchs, *Immunochimistry* 14 (1977) 129.
- [207] S. J. Edelstein, W. B. Beyer, A. T. Eldefrawi, M. E. Eldefrawi, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 6101.
- [208] M. E. Eldefrawi, A. T. Eldefrawi, *Arch. Biochem. Biophys.* 159 (1973) 362.
- [209] M. A. Raftery, J. Schmidt, M. Martinez-Carrion, T. Moody, R. Vandlen, J. Duguid, *J. Supramol. Struct.* 1 (1973) 360.
- [210] J. P. Brockes, Z. W. Hall, *Biochemistry* 14 (1975) 2100.
- [211] R. L. Vandlen, W. C.-S. Wu, J. C. Eisenach, M. A. Raftery, *Biochemistry* 18 (1979) 1845.
- [212] J. Boulter, J. Patrick, *Biochemistry* 16 (1977) 4900.

- [213] A. Devillers-Thiery, J.-P. Changeux, P. Parontaud, A. D. Stromberg, *FEBS Lett.* 104 (1979) 99.
- [214] M. W. Hunkapiller, C. D. Strader, L. Wood, M. A. Raftery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91 (1979) 164.
- [215] M. Noda, Y. Furutani, H. Takahashi, M. Toyosato, T. Tanabe, S. Shimizu, S. Kikuyotani, T. Kayano, T. Hirose, S. Inayama, S. Numa, *Nature* 305 (1983) 818.
- [216] V. I. Teichberg, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 74 (1977) 71.
- [217] A. S. Gordon, C. G. Davis, I. Diamond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 263.
- [218] V. Teichberg, A. Sobel, J.-P. Changeux, *Nature* 267 (1977) 540.
- [219] A. S. Gordon, D. Milfay, C. G. Davis, I. Diamond, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 (1979) 876.
- [220] T. Saitoh, L. P. Wennogle, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 108 (1979) 489.
- [221] T. Saitoh, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 105 (1980) 51.
- [222] T. Saitoh, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4430.
- [223] R. L. Haganir, P. Greengard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 1130.
- [224] R. D. Marshall, *Biochem. Soc. Symp.* 40 (1974) 17.
- [225] T. Ishizaka, F. Hirata, K. Ishizata, J. Axelrod, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1903.
- [226] T. P. Hopp, K. R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3824.
- [227] R. Y. Chou, G. D. A. Fasman, *Annu. Rev. Biochem.* 47 (1978) 251.
- [228] G. Hazelbauer, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 1479.
- [229] D. M. Michaelson, M. A. Raftery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4768.
- [230] H. Sugiyama, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 55 (1975) 505.
- [231] M. Briley, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 84 (1978) 429.
- [232] T. Heidmann, A. Sobel, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 94 (1978) 397.
- [233] W. Schiebler, F. Hucho, *Eur. J. Biochem.* 85 (1978) 55.
- [234] M. Epstein, E. Racker, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6660.
- [235] W. C.-S. Wu, M. A. Raftery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89 (1979) 26.
- [236] R. L. Haganir, M. A. Schell, M. A. Raftery, *FEBS Lett.* 108 (1979) 155.
- [237] J. M. Gonzales-Ros, A. Paraschos, M. Martinez-Carrion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1796.
- [238] R. Anholt, J. Lindstrom, M. Montal, *Eur. J. Biochem.* 109 (1980) 481.
- [239] J. Lindstrom, R. Anholt, B. Einarson, A. Engel, M. Osame, M. Montal, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 8340.
- [240] R. Anholt, J. Lindstrom, M. Montal, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 4377.
- [241] M. Kasai, J.-P. Changeux, *J. Membr. Biol.* 6 (1971) 1.
- [242] J. L. Popot, H. Sugiyama, J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* 106 (1976) 469.
- [243] G. P. Hess, S. Lipkowitz, G. E. Struve, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 1703.
- [244] D. L. Miller, H.-P. H. Moore, P. R. Hartig, M. A. Raftery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85 (1978) 632.
- [245] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott, *Nature* 194 (1962) 979.
- [246] M. Montal, P. Mueller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 3561.
- [247] H. Schindler, U. Quast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3052.
- [248] N. Nelson, R. Anholt, J. Lindstrom, M. Montal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3057.
- [249] G. Boheim, W. Hanke, C. Methfessel, H. Eibl, U. B. Kaupp, A. Maelicke, J. E. Schultz in R. Antolini: *Transport in Biomembranes; Model Systems and Reconstitution*, Raven Press, New York 1982, S. 87.
- [250] H. Eibl, *Chem. Phys. Lipids* 26 (1980) 239; *Angew. Chem.* 96 (1984) im Druck; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) im Druck.
- [251] G. Boheim, W. Hanke, H. Eibl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3403.
- [252] J.-P. Changeux, J. Giraudat, T. Heidmann, J.-L. Popot, A. Sobel, *Neurochem. Int.* 2 (1980) 219.
- [253] A. Maelicke, H. Prinz in H. G. Schweiger: *Cell Biology 1980*, Springer, Berlin 1980, S. 707.
- [254] R. Horn, J. Patlak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 6930.
- [255] D. W. Tank, C. Miller, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7749.
- [256] D. W. Tank, R. L. Haganir, P. Greengard, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5129.
- [257] E. Karlsson in C. Y. Lee: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52, Springer, Berlin 1979, S. 159.
- [258] A. T. Tu, *Annu. Rev. Biochem.* 42 (1973) 235.
- [259] M. D. Walkinshaw, W. Saenger, A. Maelicke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2400.
- [260] J. Kistler, R. M. Stroud, M. W. Klymkowsky, R. H. Lalancette, R. H. Fairclough, *Biophys. J.* 37 (1982) 371.
- [261] D. Tsernoglou, G. Petsko, *FEBS Lett.* 68 (1976) 1.
- [262] B. W. Low, H. S. Preston, A. Sato, L. S. Rosen, J. E. Searl, A. D. Rudko, J. S. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 2991.
- [263] B. M. Martin, B. A. Chibber, A. Maelicke, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 8714.
- [264] B. A. Chibber, B. M. Martin, M. D. Walkinshaw, W. Saenger, A. Maelicke in F. Hucho, Y. A. Ovchinnikov: *Toxins as Tools in Neurochemistry*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 141.
- [265] J.-P. Changeux, M. Kasai, C. Y. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67 (1970) 1241.
- [266] E. A. Barnard, J. Wieckowski, T. N. Chin, *Nature* 234 (1971) 207.
- [267] B. W. Fulpius, S. Cha, R. P. Klett, E. Reich *FEBS Lett.* 24 (1972) 323.
- [268] M. D. Walkinshaw, W. Saenger, A. Maelicke in M. Balaban, J. L. Sussman, W. Traub, A. Yonath: *Structural Aspects of Recognition and Assembly in Biological Macromolecules*, Balaban Int. Science Service, Glenside, PA 1981, S. 313.
- [269] W. Saenger, M. D. Walkinshaw, A. Maelicke in F. Hucho, Y. A. Ovchinnikov: *Toxins as Tools in Neurochemistry*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 151.
- [270] V. I. Tsetlin, E. Karlsson, Y. N. Utkin, K. A. Pluzhnikov, A. S. Arseniev, A. M. Surin, V. V. Kondakov, V. F. Bystrov, V. T. Ivanov, Y. A. Ovchinnikov, *Toxicon* 20 (1982) 83.
- [271] M. A. Juillerat, B. Schwendemann, J. Hauert, B. W. Fulpius, J. P. Bargetzi, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2901.
- [272] B. W. Martin, A. Chibber, A. Maelicke, *Toxicon* 20 (1983) 273.
- [273] D. Cooper, E. Reich, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3008.
- [274] A. Menez, J. L. Morgat, P. Fromageot, A. M. Ronseray, P. Boquet, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 17 (1971) 333.
- [275] B. W. Fulpius, A. Maelicke, R. P. Klett, E. Reich in P. Waser: *Cholinergic Receptors*, Raven Press, New York 1975, S. 114.
- [276] A. Maelicke, E. Reich, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40 (1976) 231.
- [277] M. J. Anderson, M. W. Cohen, *J. Physiol. London* 237 (1974) 385.
- [278] P. Ravdin, D. Axelrod, *Anal. Biochem.* 80 (1977) 585.
- [279] D. A. Johnson, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 5632.
- [280] Z. Vogel, G. J. Maloney, A. Ling, M. P. Daniels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 3268.
- [281] A. Maelicke, E. Reich in Y. Hatefi, L. Djavad-Okaniance: *Structural Basis of Membrane Function*, Academic Press, New York 1976, S. 363.
- [282] S. M. J. Dunn, M. A. Raftery, *Biochemistry* 21 (1982) 6264.
- [283] S. M. J. Dunn, B. M. Conti-Tronconi, M. A. Raftery, *Biochemistry* 22 (1983) 2512.
- [284] E. B. Pasquale, K. Takeyasu, J. B. Udgaonkar, D. J. Cash, M. C. Severski, G. P. Hess, *Biochemistry* 22 (1983) 5967.
- [285] K. Takeyasu, J. B. Udgaonkar, G. P. Hess, *Biochemistry* 22 (1983) 5973.
- [286] S. G. Blanchard, U. Quast, K. Reed, T. Lee, M. I. Schimerlik, R. Vandlen, T. Claudio, C. D. Strader, H. P. H. Moore, M. A. Raftery, *Biochemistry* 18 (1979) 1875.
- [287] M. Weber, J.-P. Changeux, *Mol. Pharmacol.* 10 (1974) 1.
- [288] G. Weiland, B. Georgia, V. Wee, C. F. Chignell, P. Taylor, *Mol. Pharmacol.* 12 (1976) 1091.
- [289] U. Quast, M. Schimerlik, T. Lee, K. Witzemann, S. Blanchard, M. A. Raftery, *Biochemistry* 17 (1978) 2405.
- [290] J. E. Bulger, G. P. Hess, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54 (1973) 677.
- [291] J. E. Bulger, J. J. L. Fu, E. F. Hindy, R. L. Silberstein, G. P. Hess, *Biochemistry* 16 (1977) 684.
- [292] D. K. Berg, R. B. Kelly, P. B. Sargent, P. Williamson, Z. W. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 147.
- [293] S. M. Sine, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 10144.
- [294] S. M. Sine, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 3315.
- [295] S. M. Sine, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 6692.
- [296] D. M. Fambrough, D. B. Drachman, S. Satyamurti, *Science* 182 (1973) 293.
- [297] D. M. Fambrough, *Physiol. Rev.* 59 (1979) 165.
- [298] R. Miskin, T. G. Easton, A. Maelicke, E. Reich, *Cell* 15 (1978) 1287.
- [299] W. Schiebler, L. Lauffer, F. Hucho, *FEBS Lett.* 81 (1977) 39.
- [300] J. B. Cohen, M. Weber, J.-P. Changeux, *Mol. Pharmacol.* 10 (1974) 904.
- [301] R. D. Neubig, J. B. Cohen, *Biochemistry* 18 (1979) 5464.
- [302] R. E. Oswald, T. Heidmann, J.-P. Changeux, *Biochemistry* 22 (1983) 3128.
- [303] G. Fels, E. K. Wolff, A. Maelicke, *Eur. J. Biochem.* 127 (1982) 31.
- [304] J.-P. Changeux, E. L. Bendetti, J.-P. Bourgeois, A. Brisson, J. Cartaud, P. Devaux, H. Grünhagen, M. Moreau, J.-P. Popot, A. Sobel, M. Weber, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40 (1975) 211.
- [305] M. A. Raftery, J. Bode, R. Vandlen, D. Michaelson, J. Deutsch, T. Moody, M. J. Ross, R. M. Stroud in H. Sund, G. Blauer: *Protein-Ligand Interactions*, de Gruyter, Berlin 1975, S. 328.
- [306] J.-P. Changeux, T. R. Podleski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59 (1968) 944.
- [307] T. R. Podleski, J. C. Meunier, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 1239.
- [308] J. Lindstrom, S. J. Singer, E. S. Lennox, *J. Membr. Biol.* 11 (1973) 217.
- [309] R. N. Cox, M. Kawai, A. Karlin, P. W. Brandt, *J. Membr. Biol.* 51 (1979) 145.
- [310] E. M. Landau, D. Ben-Haim, *Science* 185 (1974) 944.

- [311] D. A. Terrar, *J. Physiol. London* 276 (1978) 403.
- [312] V. Damle, M. McLaughlin, A. Karlin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84 (1978) 845.
- [313] R. V. Cox, A. Karlin, P. W. Brandt, *J. Membr. Biol.* 51 (1979) 133.
- [314] N. Kalderon, I. Silman, *Isr. J. Chem.* 9 (1971) 12.
- [315] E. Bartels, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 1820.
- [316] H. A. Lester, M. E. Krouse, J. M. Nerbonne, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger in N. J. M. Birdsall: *Drug Receptors and Their Effectors*, MacMillan, London 1981, S. 97.
- [317] H. A. Lester, M. E. Krouse, M. M. Nass, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *J. Gen. Physiol.* 75 (1980) 207.
- [318] R. Jürss, H. Prinz, A. Maelicke in F. Gualtieri, M. Gianella, C. Melchiorre: *Recent Advances in Receptor Chemistry*, Elsevier, Amsterdam 1979, S. 59.
- [319] A. Maelicke, R. Jürss, H. Prinz in M. Balaban: *Molecular Mechanism of Biological Recognition*, Elsevier, Amsterdam 1979, S. 353.
- [320] H. Prinz, R. Jürss, A. Maelicke in N. J. M. Birdsall: *Drug Receptors and their Effectors*, MacMillan, London 1981, S. 87.
- [321] R. Jürss, A. Maelicke, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 2887.
- [322] H.-W. Meyers, R. Jürss, H. R. Brenner, G. Fels, H. Prinz, H. Watzke, A. Maelicke, *Eur. J. Biochem.* 137 (1983) 399.
- [323] G. Waksman, J.-P. Changeux, B. P. Roques, *Mol. Pharmacol.* 18 (1980) 20.
- [324] T. Heidmann, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 94 (1979) 255.
- [325] G. Waksman, M. C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques, T. Heidmann, H. H. Grünhagen, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* 67 (1976) 335.
- [326] F. J. Barrantes, B. Sakmann, R. Bonner, H. Eibl, T. Jovin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3097.
- [327] M. Martinez-Carrion, M. A. Raftery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55 (1973) 1156.
- [328] H. H. Grünhagen, J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* 106 (1976) 497.
- [329] U. Quast, M. Schimerlik, M. A. Raftery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 (1978) 955.
- [330] M. Schimerlik, U. Quast, M. A. Raftery, *Biochemistry* 18 (1979) 1884.
- [331] S. M. J. Dunn, S. G. Blanchard, M. A. Raftery, *Biochemistry* 19 (1980) 5645.
- [332] B. Katz, R. Miledi, *J. Physiol. London* 249 (1975) 269.
- [333] E. Neher, J. H. Steinbach, *J. Physiol. London* 277 (1978) 153.
- [334] E. X. Albuquerque, M. C. Tsai, R. Aronstam, A. T. Eldefrawi, E. M. Eldefrawi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1224.
- [335] D. K. Koblin, H. A. Lester, *Mol. Pharmacol.* 15 (1979) 559.
- [336] J. B. Cohen, N. D. Boyd, N. S. Shera, *Prog. Anesthesiol.* 2 (1980) 165.
- [337] T. Heidmann, A. Sobel, J. L. Popot, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 110 (1980) 35.
- [338] G. Weiland, B. Georgia, S. Lappi, C. E. Chignell, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 7648.
- [339] E. K. Krodel, R. A. Beckman, J. B. Cohen, *Mol. Pharmacol.* 15 (1979) 294.
- [340] S. M. Sine, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 8106.
- [341] Y. Kloog, A. Kalir, O. Buchman, M. Sokolovsky, *FEBS Lett.* 109 (1980) 125.
- [342] J. W. Daly, J. Karle, C. W. Myers, T. Tokuyama, J. A. Waters, B. Witkop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 1870.
- [343] C. E. Spivak, M. A. Maleque, A. C. Oliveria, L. M. Masukawa, T. Tokuyama, J. W. Daly, E. X. Albuquerque, *Mol. Pharmacol.* 21 (1982) 351.
- [344] R. S. Aronstam, B. Witkop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4639.
- [345] C. E. Spivak, B. Witkop, E. X. Albuquerque, *Mol. Pharmacol.* 18 (1980) 384.
- [346] M. C. Tsai, N. A. Mansour, A. T. Eldefrawi, M. E. Eldefrawi, E. X. Albuquerque, *Mol. Pharmacol.* 14 (1978) 787.
- [347] L. Lauffer, F. Hucho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 2408; P. Muhn, A. Fahr, F. Hucho, *FEBS Lett.* 166 (1984) 146.
- [348] T. J. Andreasen, M. G. McNamee, *Biochemistry* 19 (1980) 4719.
- [349] C. Bon, J.-P. Changeux, T. W. Jeng, H. Fraenkel-Conrat, *Eur. J. Biochem.* 99 (1979) 471.
- [350] P. W. Gage, *Physiol. Rev.* 56 (1976) 117.
- [351] R. Bradley, K. Peper, R. Sterz, *Nature* 284 (1980) 60.
- [352] A. P. Young, D. S. Sigman, *Mol. Pharmacol.* 20 (1982) 498.
- [353] T. Heidmann, R. E. Oswald, J.-P. Changeux, *Biochemistry* 22 (1983) 3112.
- [354] M. Covarrubias, H. Prinz, A. Maelicke, *EMBO J.*, im Druck.
- [355] A. Sobel, T. Heidmann, J. Cartaud, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 110 (1980) 13.
- [356] R. E. Oswald, J.-P. Changeux, *Biochemistry* 20 (1981) 7166.
- [357] R. E. Oswald, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3825.
- [358] D. B. Drachman, *Trends Neurosci. Pers. Ed.* 6 (1983) 446.
- [359] A. Vincent, J. Newsom-Davis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 43 (1980) 590.
- [360] D. B. Drachman, R. N. Adams, E. F. Stanley, A. Pestrouk, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 43 (1980) 601.
- [361] A. Vincent, *Physiol. Rev.* 60 (1980) 756.
- [362] J. Lindstrom, P. Dau, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20 (1980) 337.
- [363] D. M. Fambrough, D. B. Drachman, S. Satyamurti, *Science* 182 (1973) 293.
- [364] J. Patrick, J. Lindstrom, *Science* 180 (1973) 871.
- [365] H. Wekerle, B. Paterson, U. P. Ketelsen, M. Feldman, *Nature* 256 (1975) 493.
- [366] S. Fuchs, I. Schmidt-Hopfeld, G. Tridente, R. Tarrab-Hazdai, *Nature* 287 (1980) 162.
- [367] D. S. Dwyer, R. J. Bradley, R. L. Furner, G. E. Kemp, *Brain Res.* 217 (1981) 23.
- [368] I. Kamo, S. Furukawa, A. Tada, Y. Mano, Y. Iwasaki, T. Furuse, N. Ito, K. Hayashi, E. Satoyoshi, *Nature* 215 (1982) 995.
- [369] S. J. Tzartos, M. E. Seybold, J. M. Lindstrom, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 188.
- [370] R. Hohlfield, R. Sterz, I. Kalies, K. Peper, H. Wekerle, *Pfluegers Arch.* 390 (1981) 156.
- [371] C. M. Gomez, D. P. Richman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4089.
- [372] D. A. Granato, B. W. Fulpius, J. F. Moody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 2872.
- [373] S. Tzartos, L. Langeberg, S. Hochschwender, J. Lindstrom, *FEBS Lett.* 158 (1983) 116.
- [374] R. W. James, C. Alliod, B. W. Fulpius, *Mol. Immunol.* 20 (1983) 1363.
- [375] U. A. Besinger, K. V. Toyka, M. Hömberg, K. Heininger, R. Hohlfield, A. Fateh-Moghadam, *Neurology* 33 (1983) 1316.
- [376] S. Bevac, R. W. Kullberg, J. Rice, *Nature* 273 (1978) 461.
- [377] *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 274 (1976): *Myasthenia gravis*.
- [378] *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 377 (1981): *Myasthenia gravis*.
- [379] J. A. Simpson, *Scott. Med. J.* 4 (1960) 419.
- [380] A. Maelicke, *J. Recept. Res.* 3 (1983) 327.
- [381] S. Heinemann, S. Bevac, R. Kullberg, J. Lindstrom, J. Rice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 3090.
- [382] C. Methfessel, G. Fels, H. R. Brenner, A. Maelicke, unveröffentlicht.
- [383] G. Köhler, C. Milstein, *Nature* 265 (1975) 495.
- [384] S. C. Froehner, K. Douville, S. Klink, J. Culp, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 7112.
- [385] W. J. Gullick, J. M. Lindstrom, *Biochemistry* 22 (1983) 3312.
- [386] J. M. Lindstrom, B. Einarson, J. P. Merlie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 769.
- [387] J. M. Lindstrom, B. Walter, B. Einarson, *Biochemistry* 18 (1979) 4470.
- [388] G. Fels, H. Breer, A. Maelicke in F. Hucho, Y. A. Ovchinnikov: *Toxins as Tools in Neurochemistry*, de Gruyter, Berlin 1983, S. 127.
- [389] J. Patrick, W. B. Stallcup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 4689.
- [390] L. W. Swanson, J. Lindstrom, S. Tzartos, L. C. Schmued, D. D. M. O'Leary, W. M. Cowan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4532.
- [391] C. R. Craig, R. E. Stitzel: *Modern Pharmacology*, Little, Brown, Boston, MA, USA 1982.
- [392] L. S. Goodman, A. Gilman: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, MacMillan, New York 1975.
- [393] G. Fels, E. Wolff, A. Maelicke, unveröffentlicht.
- [394] E. M. Kosower, *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 111 (1983) 1022.
- [395] H. R. Guy, *Biophys. J.* 45 (1984) 201.
- [396] H. Prinz, A. Maelicke, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 10273.
- [397] T. Heidmann, J. Bernhardt, E. Neumann, J.-P. Changeux, *Biochemistry* 22 (1983) 5452.
- [398] M. Covarrubias, H. Prinz, A. Maelicke, unveröffentlicht.
- [399] J. W. Walker, K. Takeyasu, M. G. McNamee, *Biochemistry* 21 (1982) 5384.
- [400] E. Neher, A. Marty, E. Fenwick, *Prog. Brain Res.* 58 (1983) 39.
- [401] E. Neumann, H. W. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3994.
- [402] G. Mooser, H. Shulman, D. S. Sigman, *Biochemistry* 11 (1972) 1595.
- [403] M. Eigen in S. L. Mintz, S. M. Wilmeyer: *Quantum Statistical Mechanisms in the Natural Sciences*, Plenum Press, New York 1974, S. 37.
- [404] C. Lancros: *Applied Analysis*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NY, USA 1956, S. 272.
- [405] F. J. Barrantes, *J. Mol. Biol.* 124 (1978) 1.
- [406] M. Moreau, J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* 106 (1976) 457.
- [407] M. M. Salpeter, H. Plattner, A. W. Rogers, *Histochem. Cytochem.* 20 (1972) 1059.
- [408] T. L. Lentz, J. Mazurkiewicz, J. Rosenthal, *Brain Res.* 132 (1977) 432.
- [409] H. C. Froede, I. B. Wilson, *Isr. J. Med. Sci.* 6 (1970) 179.
- [410] T. L. Rosenberry, *Biophys. J.* 26 (1979) 263.
- [411] M. A. Raftery, R. Vandlen, D. Michaelson, J. Bode, T. Moody, Y. Chao, K. Reed, J. Deutsch, J. Duguid, *J. Supramol. Struct.* 2 (1974) 582.
- [412] H. Prinz, R. Jürss, A. Maelicke, *Neurochem. Int.* 2 (1980) 251.