

Toxine als Werkzeuge in der Neurochemie

Ferdinand Hucho*

Neurotoxine entstanden während der Evolution als Moleküle, die spezifisch gegen wichtige Moleküle des Nervensystems gerichtet sind. Wegen ihrer Selektivität werden sie in der Forschung als Sonden zum Auffinden und zum Charakterisieren von Schlüsselproteinen der Nervenzelle verwendet. Ionenkanäle, die an der Weiterleitung von Nervenimpulsen beteiligt sind, Proteine der präsynaptischen Transmitterausschüttung und vor allem Neurotransmitterrezeptoren wurden und werden noch immer, in

Einzelfällen bis zur Charakterisierung auf atomarer Ebene, durch eine Kombination der Werkzeuge Neurotoxine, Molekularbiologie und Patch-clamp-Elektrophysiologie analysiert. In dieser Übersicht wird eine Auswahl derartiger Toxine vorgestellt und in Beziehung zu ihren molekularen Wirkorten im Nervensystem gesetzt. Einer der Schwerpunkte liegt dabei auf dem kürzlich erzielten Durchbruch bei der Erforschung des Wirkungsmechanismus von Tetanus- und Botulinustoxin; ein weiterer

auf Neurotoxinen, die vom Pflanzenalkaloid Strychnin bis zu den Peptidtoxinen bestimmter Giftschlangen reichen und die die Isolierung und die Beschreibung von Liganden-regulierten Ionenkanälen wie dem Glycin- und dem nicotinischen Acetylcholinrezeptor ermöglichten.

Stichworte: Acetylcholinrezeptor · Biomembranen · Ionenkanäle · Neurotoxine

1. Einleitung

Der Fortschritt in den experimentellen Naturwissenschaften verläuft parallel zum Fortschritt ihrer Methoden. Drei experimentelle Ansätze bilden die Grundlage der heutigen Entwicklung der Neurochemie: die Gentechnik, insbesondere in ihrer Kombination mit der Patch-clamp-Elektrophysiologie^[1], die Immunologie und schließlich die "Neurotoxinologie"^[2, 3]. Neurotoxine sind Bestandteile von Giften des Tier- und Pflanzenreichs, die spezifisch gegen das Nervensystem gerichtet sind. Während der Evolution entstanden zahlreiche Substanzen, die Pflanzen davor bewahren, gefressen zu werden, oder die Tieren dazu dienen, sich zu verteidigen oder ihre Beute zu lähmen und zu töten. Die Strukturvielfalt dieser Toxine reicht von niedermolekularen Alkaloiden bis zu Peptiden und komplexen Proteinen.

Neurotoxine sind Moleküle, die häufig nur gegen eine einzige Funktion und damit auch nur gegen ein Schlüsselmolekül des Nervensystems gerichtet sind. Wegen dieser Spezifität sind sie für den Neurochemiker, der diese Moleküle finden und grundlegende Mechanismen der Nervenfunktion aufklären möchte, ideale Werkzeuge^[4, 5]. Die Natur leistet sich keine Verschwendung: Wenn beispielsweise eine Cobra ihr Beutetier beißt, injiziert sie eine eindrucksvolle Mischung tödlicher Substanzen. Diese wären jedoch umsonst aufgewendet worden, wenn die

verwundete Maus der Schlange noch entkommen könnte und später in ihrem Loch an den cytotoxischen, hämolytischen und cardiotoxischen Proteinen stürbe, die sich in dem Cobragift befinden. Daher wird zunächst durch ein kleines Protein, α -Neurotoxin, die Flucht der Maus verhindert. Wie wir später noch diskutieren werden, blockiert dieses Protein mit enormer Effizienz den Transfer von Nervenimpulsen auf die Muskeln, die für die Flucht (oder auch für den Kampf) benötigt werden. Dies wird in Abschnitt 3.8 als ein Beispiel dafür beschrieben, wie Neurochemiker von der Cobra lernten und das α -Neurotoxin nutzten, um einen der grundlegenden molekularen Mechanismen der Nervenimpulsübertragung von Zelle zu Zelle zu erforschen^[6, 7]. Neurotoxine sind somit Sonden, die dem Wissenschaftler den Weg zu fundamental wichtigen Strukturen und Molekülen des Nervensystems eröffnen.

2. Nervenimpulse: elektrischer und chemischer Transport

Die Hauptaufgabe einer Nervenzelle ist der Transport von Signalen von einer Stelle zu einer anderen^[1, 8]. Dieser Transport erfolgt innerhalb einer Zelle elektrisch, zwischen den Zellen meist chemisch. Das zentrale Phänomen der Nervenimpuls-Leitung ist das Aktionspotential. Die chemische Nervenimpuls-Übertragung findet an spezialisierten Strukturen statt, die man Synapsen nennt und die Nervenzellen miteinander verbinden. Viele dieser Strukturen auf molekularer Ebene – sowohl die der elektrischen als auch die der chemischen Nervenimpulsübertra-

[*] Prof. Dr. F. Hucho

Institut für Biochemie der Freien Universität
Arbeitsgruppe Neurochemie
Thielallee 63, D-14195 Berlin
Telefax: Int. + 30/838-3753

gung – wurden und werden noch immer analysiert, indem Elektrophysiologen und Biochemiker unter anderem Toxine als Werkzeuge einsetzen. In dieser Übersicht soll die Anwendung von Neurotoxinen bei der Aufklärung des Aktionspotentialsmechanismus nur kurz betrachtet werden, denn diese Ergebnisse zählen bereits zur “Geschichte”. Der zweite Teil des Themas, die in Abschnitt 3 behandelte Aufklärung der synaptischen Nervenimpulsübertragung, ist zur Zeit eines der aktivsten Gebiete in der neurochemischen Forschung. Dieser Teil soll daher ausführlicher dargestellt werden.

2.1. Das Aktionspotential beruht auf der unterschiedlichen Kinetik von zwei Typen von Ionenkanälen

Im Zustand der Ruhe besteht, wie in den meisten Zellen, an der Plasmamembran von Nervenzellen ein elektrisches Potential, das Ruhepotential. Es ist ein Diffusionspotential, das auf Ionengradienten und der unterschiedlichen Durchlässigkeit der Membran für Na^+ - und K^+ -Ionen beruht. Im Zustand der Ruhe weist die Plasmamembran nur eine geringe Permeabilität für Natrium-, jedoch eine beträchtliche für Kalium-Ionen auf, so daß das Ruhepotential im wesentlichen ein Kaliumpotential ist. Sein Wert wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben. Auf einen Reiz hin wird ein Aktionspotential ausgelöst, ein Alles-oder-nichts-Ereignis, das sich entlang der Plasmamembran fortpflanzt, bis es die Nervenendigung erreicht. Dort wird es in eine Sequenz von chemischen Vorgängen umgesetzt, die in ihrer Summe die synaptische Impulsübertragung repräsentieren und die in Abschnitt 3 dieser Übersicht besprochen werden.

Vor mehr als vierzig Jahren zeigten die Elektrophysiologen Hodgkin und Huxley, daß das Aktionspotential das Ergebnis des Einströmens von Natrium-Ionen in die Nervenzelle und des zeitlich versetzten Ausströmens von Kalium-Ionen aus der Zelle heraus ist^[1, 8, 9]. Diese Ionenströme werden von diskreten Membranproteinen vermittelt, den spannungsabhängigen Kalium- und Natriumkanälen^[10], die mit Hilfe von Neurotoxinen buchstäblich “seziert” wurden. Zunächst gibt es Neurotoxine, die spezifisch und mit eindrucksvoller Potenz auf spannungsabhängige Natriumkanäle einwirken, ohne irgend einen anderen Kanaltyp zu beeinflussen (Abb. 1). Andere wiederum wirken ausschließlich auf spannungsabhängige Kaliumkanäle und las-

sen die Natriumkanäle unverändert. Klassische Inhibitoren des spannungsabhängigen Natriumkanals sind die heterocyclischen Guanidine Tetrodotoxin (TTX, ursprünglich aus bestimmten Organen des Pufferfisches *Tetraodon* extrahiert, später aber auch in anderen giftigen Organismen gefunden^[11, 12]) und Saxitoxin (STX, im Dinoflagellaten *Gonyaulax* nachgewiesen, der gelegentlich aus Muscheln, die sich von diesem Mikroorganismus ernähren, eine für den Mensch gefährliche Mahlzeit macht).

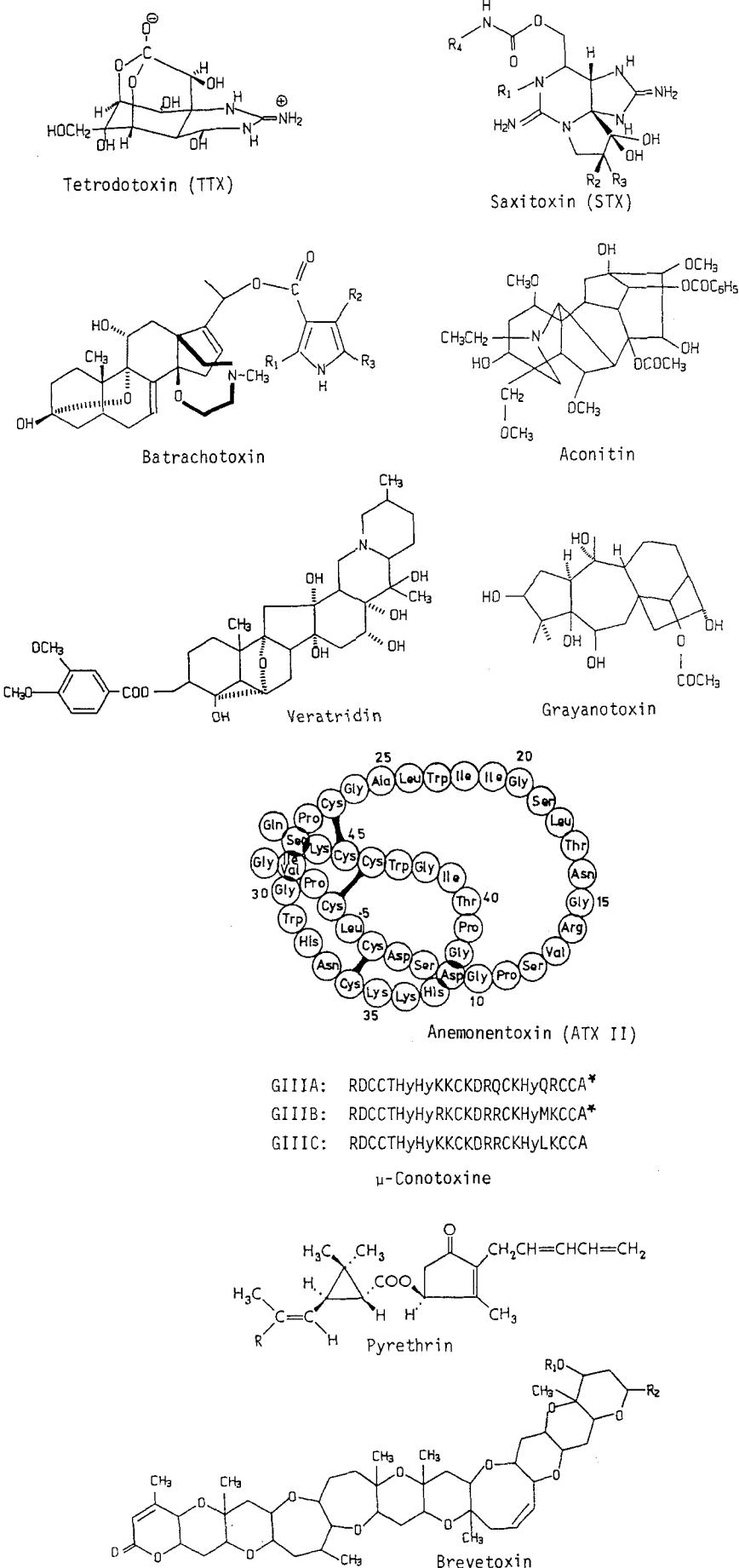
Interessanterweise sind nur relativ wenige Toxine bekannt, die den spannungsabhängigen Kaliumkanal beeinflussen^[13, 14]. Der Elektrophysiologe greift daher bei der Untersuchung des Aktionspotentials dieses Kanaltyps meist auf einfache, wenn auch weniger effektive organische Verbindungen wie Tetraethylammonium-Salze und Aminopyridine zurück, die den Kaliumstrom bei Konzentrationen im μM – mM - anstatt im nM -Bereich blockieren. Die besten natürlich vorkommenden Inhibitoren spannungsabhängiger Kaliumkanäle sind Proteine aus Skorpiongift: Noxiustoxin (NTX) aus *Centruroides noxius*^[15] und ein Toxin des Skorpions *Tityus serrulatus*^[16]. Dies gilt jedoch nur für einen speziellen Typ des Kaliumkanals, und zwar für den verzögerten Gleichrichter (delayed rectifier) oder auch Hodgkin-Huxley-Kanal genannt. Es gibt eine ganze Reihe weiterer Kaliumkanäle^[13], die entweder ebenfalls durch das Membranpotential, also spannungsabhängig (wenn auch nur transient und mit unterschiedlicher Kinetik), oder aber durch Na^+ , Ca^{2+} , ATP oder indirekt durch Neurotransmitter wie dem Acetylcholin (M-Kanal) oder Serotonin (S-Kanal) reguliert sind. Auch für diese Kanäle wurden spezifische Toxine nachgewiesen. Wir kommen auf einen von ihnen zurück, wenn wir die präsynaptischen Vorgänge diskutieren (siehe Abschnitt 3.1); ansonsten sei der an diesem komplexen Gebiet interessierte Leser auf Spezialliteratur verwiesen^[13, 14].

2.2. Sezieren des Natriumkanals mit Hilfe von Neurotoxinen

Über die Unterscheidung dieser zwei Kanaltypen hinaus – der Hodgkin-Huxley-Natrium- und der Kaliumkanal – wurden Neurotoxine als Werkzeuge für eine wesentlich detailliertere Analyse eingesetzt^[12, 17]. Spannungsabhängige Natriumkanäle weisen eine komplizierte Kinetik mit drei diskreten Phasen auf.



Ferdinand Hucho wurde 1939 in Berlin geboren und ist Professor für Biochemie an der Freien Universität Berlin. Er studierte Chemie in Freiburg/Breisgau und promovierte dort bei Kurt Wallenfels. Nach Arbeiten über die Regulation des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes als Postdoktorand bei Lester Reed an der University of Texas, Austin, war er Assistent bei Horst Sund an der Universität Konstanz. 1974 erwarb er dort seine *venia legendi*, und 1979 folgte er einem Ruf nach Berlin. Sein Hauptforschungsgebiet ist die Neurochemie mit Schwerpunkt auf den Rezeptoren, Ionenkanälen und Signaltransduktionssystemen. Er unterrichtet mit Begeisterung Biochemie.



Nach der Depolarisierung der Membran öffnet sich der Kanal zunächst schnell, ein Vorgang, der als gating bezeichnet wird und zu einem Permeabilitätsmaximum führt, und schließt sich (inaktiviert) danach spontan. Entsprechend fand man eine Gruppe von Toxinen, die das Öffnen der Kanäle begünstigt (Tabelle 1). Typische Toxine hierfür sind die lipophilen Alkaloide Batrachotoxin, Grayanotoxin, Aconitin und Veratridin (Abb. 1). Andere wie die bereits erwähnten TTX und STX blockieren den geöffneten Kanal, während eine dritte Gruppe, vor allem Peptidtoxine der Seeanemonen (die Anemonentoxine ATX I–IV) und diverser Skorpione (ScTX), die Inaktivierung, d. h. das Schließen des Kanals beeinflussen. Wichtig für den Neurochemiker war die Beobachtung, daß die meisten dieser Toxine unabhängig voneinander an unterschiedliche Stellen des Kanalproteins binden. Sie können in fünf Klassen eingeteilt werden, von denen jede ihre eigene nicht überlappende Bindungsstelle hat (Abb. 2 und Tabelle 1). Um derart viele unabhängige Bindungsstellen unterzubringen, muß der Natriumkanal ein ziemlich großes Molekül sein.

Mit Hilfe dieser Toxine wurden nicht nur die funktionellen Domänen des Natriumkanals definiert, sondern sie waren auch bei der Isolierung und bei der Charakterisierung von Kanalproteinen in rekonstituierten Systemen wichtig^[18–20]. Sie ebneten letztlich den Weg zur Klonierung und Sequenzierung der cDNAs, die für die Kanäle unterschiedlicher Organismen und Gewebe kodieren^[21]. Selbst wenn rekombinante DNA-Techniken genutzt werden, sind Toxine unerlässliche Werkzeuge: Beispielsweise muß ein klonierter Kanal zuerst in Oozyten des Krallenfroschs *Xenopus* exprimiert werden^[22]; der Beweis, daß dabei der richtige und komplett Ionenkanal vorliegt, muß durch den Vergleich der Elektrophysiologie und Toxinologie des klonierten mit der des authentischen Kanals erbracht werden. Für den Natriumkanal war dieser Schritt essentiell, denn das Protein, das man mit biochemischen Methoden aus

Abb. 1. Toxine, die als Werkzeuge zur Charakterisierung spannungabhängiger Natriumkanäle verwendet werden. Die chemische Vielfalt der toxischen Moleküle ist eindrucksvoll. Weil wir noch zu wenig Informationen über die dreidimensionalen Strukturen der Toxine und über ihre Zielmoleküle haben, beginnen wir erst langsam, von der Strukturformel auf den genauen Wirkort einer Substanz zu schließen.

Tabelle 1. Toxin-Bindungsstellen des spannungsabhängigen Natriumkanals [17].

Bindungsstelle	Liganden	Physiologische Wirkung
1	Tetrodotoxin Saxitoxin μ -Conotoxine	Hemmung des Ionentransports
2	Veratridin Batrachotoxin Aconitin Grayanotoxin	permanente Aktivierung
3	Nordafrikanische α -Skorpionsoxide, Seenanemonentoxine	Hemmung der Inaktivierung, Verlängerung der Aktivierung
4	Amerikanische β -Skorpionsoxide	Aktivierung
5	<i>Ptychodiscus-brevis</i> -Toxin Ciguatoxine	Repetitive Spikes Verlängerte Aktivierung

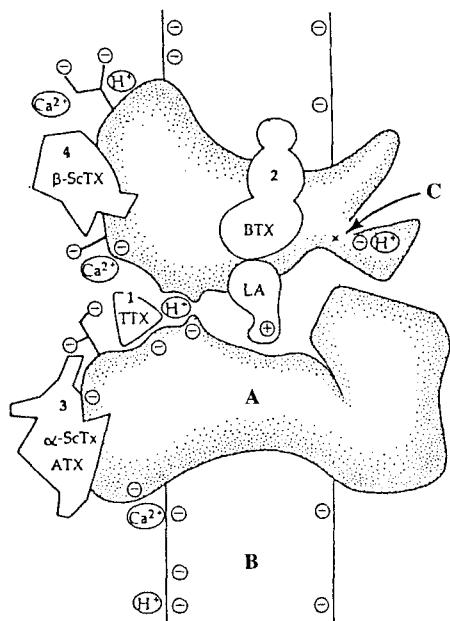


Abb. 2. Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Natriumkanals mit seinen Neurotoxin-Bindungsstellen. Das Kanalprotein A (gepunktete Region) ist groß genug (260 kDa), um Bindungsstellen für eine Vielzahl hoch- und niedermolekularer Toxinmoleküle Platz zu bieten. Mit Hilfe der in Abb. 1 gezeigten Toxine war es möglich, die funktionellen Komponenten des Kanalproteins zu "sezieren" (B = Membranlipid; C: Angriffspunkt für Pronase, Iodat und NBA; siehe auch Tabelle 2). (Aus Lit. [10] entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Sinauer.)

dem Hirn von Vertebraten als ^3H -TTX-bindendes Protein isoliert hatte, enthielt außer einer sehr großen (260 kDa) α -Untereinheit zwei kleinere (39 kDa) β -Untereinheiten^[20]. Die erwähnten Expressionsstudien zeigten, daß die für die α -Untereinheit kodierende cDNA allein die gesamte Information für das Kanalprotein enthielt, einschließlich seiner elektrischen Charakteristika und seiner Sensitivität gegenüber den unterschiedlichen Neurotoxinen. Die Funktion der kleinen mitgereinigten Untereinheiten ist bis heute unklar.

Es stellte sich heraus, daß die Primärstruktur der α -Untereinheit des Natriumkanals, abgeleitet von der klonierten und se-

quenzierten cDNA, aus vier sich wiederholenden Sequenzmotiven besteht (Abb. 3 oben)^[21, 22]. Jedes dieser Motive enthält sechs hydrophobe Sequenzen, von denen man annimmt, daß sie membrandurchspannende α -Helices bilden. Jeweils die vierte dieser vermuteten Transmembranhelices ist besonders reich an Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten (jede dritte Aminosäure ist Arginin oder Lysin). Sie wird S4 genannt und für den Spannungssensor gehalten, der das Öffnen des Kanals bewirkt, wenn sich das negative Membranpotential ändert. Der genaue Ort der Bindungsstellen für die diversen Toxine ist unbekannt und wird zur Zeit durch gerichtete Mutageneseexperimente in Kombination mit Expressionsversuchen untersucht. Der mutierte und exprimierte Kanal wird jeweils in bezug auf seine elektrischen Eigenschaften und sein Verhalten gegenüber den Toxinen charakterisiert. Zum Beispiel bewirkte eine Punktmutation, die die Aminosäure Glutamat in Position 387 des Natriumkanals von Rattenhirn durch gerichtete Mutagenese gegen Glutamin austauschte, daß der resultierende Natriumkanal unempfindlich gegenüber TTX war^[23]. Glutamat-387 befindet sich in der Schleife, die die vermuteten Transmembrandomä-

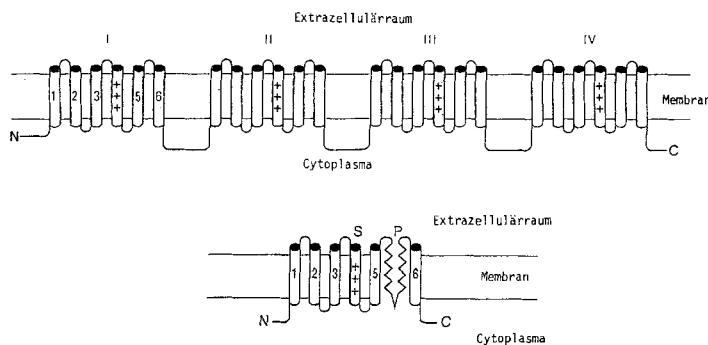


Abb. 3. Schematische Darstellung der Primärstrukturen von spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanälen (oben) sowie von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (unten). Die Zylinder stellen membrandurchspannende Aminosäuresequenzen dar, von denen man annimmt, daß sie α -Helices bilden. Das Natriumkanalprotein (oben) besteht aus einer sehr langen Polypeptidkette, die aus vier Teilstücken mit ähnlicher Aminosäuresequenz (sogenannten Repeats) aufgebaut sind. Diese Repeats sind wahrscheinlich in der neuronalen Membran so angeordnet, daß sie eine Pore, die eigentliche Kanal, bilden. Das Kaliumkanalprotein (unten) besteht nur aus einem dieser Repeats. Wahrscheinlich sind vier dieser kleineren Moleküle notwendig, um einen Kanal zu bilden.

nen 5 und 6 des ersten Motivs verbindet. Man schloß aus diesem Experiment, daß die TTX-Bindungsstelle in dieser Schleife lokalisiert ist.

Um das Bild zu komplettieren (siehe Abb. 2), sollen nun einige Informationen über den spannungsabhängigen Kaliumkanal hinzugefügt werden: Seine Primärstruktur suggeriert eine ähnliche Transmembranfaltung wie die des Natriumkanals^[24], die Größe der Polypeptidkette beträgt jedoch nur ein Viertel der des Natriumkanals. Er scheint daher nur eines statt vier jener aus sechs Transmembranhelices bestehenden Motive aufzuweisen (Abb. 3 unten). Man nimmt an, daß vier dieser Moleküle gemeinsam einen Kaliumkanal bilden, während der Natriumkanal wahrscheinlich aus nur einem jener Riesenmoleküle mit seinen vier sich wiederholenden Motiven gebildet wird. Eine weitere interessante Entdeckung sollte erwähnt werden: Die Schleife

zwischen den vermuteten Transmembranhelices 5 und 6, die zu kurz ist, um eine weitere membrandurchspannende Helix zu bilden, ist zu einem β -Strang gefaltet, der in die Membran eintaucht, ohne bis zu ihrer cytoplasmatischen Seite zu reichen. Diese Struktur, P-Schleife genannt und von den vier einen Kanal bildenden Molekülen beigesteuert, formt möglicherweise die Wand des Kanals^[25].

3. Synaptische Übertragung von Nervenimpulsen

Das Aktionspotential bewegt sich an der axonalen Membran entlang, indem sich spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle öffnen und schließen, und gelangt schließlich an die Nervenendigung. Dort bewirkt es die Impulsübertragung auf die nächste Zelle durch das Freisetzen einer Substanz, dem Neurotransmitter (Abb. 4). Diese Substanz diffundiert von dem Ort an der präsynaptischen Membran, an dem sie ausgeschüttet wurde, durch den synaptischen Spalt etwa 20–30 nm weit zur postsynaptischen Membran der nächsten Zelle. Die Transmitterfreisetzung ist gegenwärtig von großem Interesse für die neurochemische und die zellbiologische Forschung und wird vor allem mit Hilfe von Neurotoxinen untersucht^[26].

3.1. Vorgänge auf der präsynaptischen Seite

Die Transmittermoleküle sind in der Nervenendigung in kleinen Vesikeln verpackt und gespeichert (Abb. 5). Kommt ein Aktionspotential an der Endigung an, fusionieren jene Vesikel, die sich an speziellen, den aktiven Zonen der präsynaptischen Membran aufgereihten Freisetzungsstellen befinden, mit der Membran, öffnen sich dabei und entlassen den Transmitter in den synaptischen Spalt. Die leeren Vesikel werden anschließend durch Abschnürung in die Nervenendigung zurückgezogen und

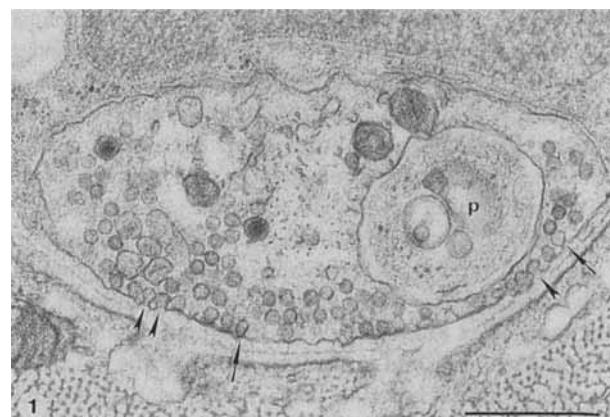


Abb. 5. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer neuromuskulären Endplatte eines Froschs. Das Präparat wurde 2.5 ms nach der elektrischen Stimulation in Gegenwart des Kaliumkanalblockers 4-Aminopyridin ultraschnell eingefroren. Deutlich sichtbar sind einige transmitterhaltige Vesikel, die gerade mit der präsynaptischen Membran fusionieren (Pfeile). Andere Vesikel scheinen sich in einem früheren oder späteren Stadium der Exozytose zu befinden. P: Ausstülpung einer Schwannzelle, invaginiert durch die Nervenendigung. Eichstrich: 0.5 mm. (Aus Lit.[121] entnommen, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.)

wieder mit Transmitter gefüllt. Die Zellbiologen nennen diesen Vorgang regulierte Exozytose im Unterschied zur konstitutiven Exozytose, dem Prozeß des zellulären Exports zahlreicher Peptide und Proteine. Gegenwärtig fragt man sich allerdings, ob diese beiden Prozesse nicht mehr gemeinsam haben als man noch kürzlich dachte. So identifizierten Rothman et al.^[27a, b] mehrere NSF(*N*-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor)- und SNAP-(NSF-attachment protein)-Proteine, die dem Fusionsapparat, der am intrazellulären Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgiapparat zur Plasmamembran, und der regulierten Exozytose synaptischer Vesikel gemeinsam sind. Die Spezifität des ansonsten sehr ähnlichen Membrantransports wird durch selektive SNAP-Rezeptoren (SNARE) sichergestellt, die jedes Vesikel zu seinem vorgesehenen Ziel dirigieren.

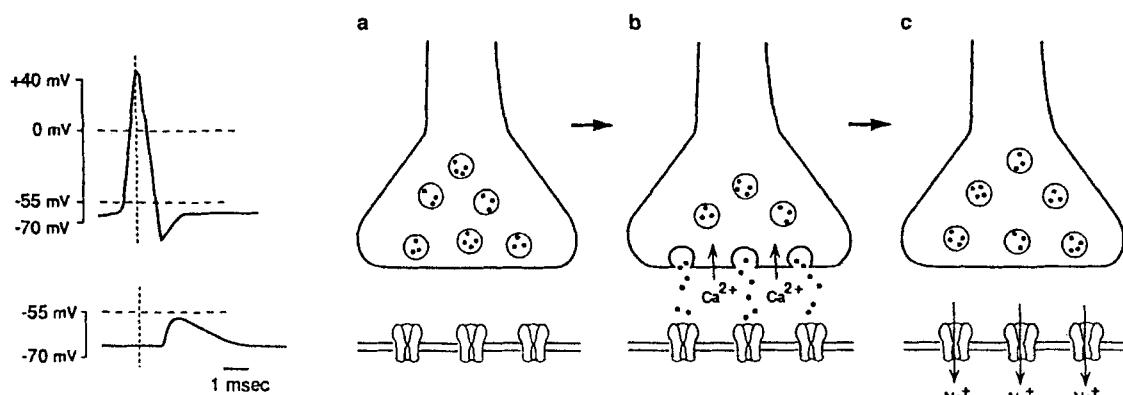


Abb. 4. Chemische Nervenimpulsübertragung an der Synapse. Links: Elektrische Vorgänge (gestrichelte, horizontale Linien entsprechen dem notwendigen Schwellenwert; Diagramm oben: präsynaptisches Aktionspotential; Diagramm unten: erregendes postsynaptisches Potential). Abb. 4a-c, oben: Vorgänge auf der molekularen Ebene auf der präsynaptischen Seite an der Nervenendigung; unten: Antwort auf der postsynaptischen Seite in der postsynaptischen Zelle. Ein großer depolarisierender Spike, das Aktionspotential, wandert das Axon entlang. Bei Ankunft in der Nervenendigung (a) löst es eine Kaskade molecularer Ereignisse aus: Einströmende Ca^{2+} -Ionen bewirken die Vesikelfusion und die Freisetzung von Neurotransmitter an der präsynaptischen Membran (b). Der Transmitter erzeugt über spezifische Rezeptoren in der postsynaptischen Membran eine transiente Depolarisierung. Beim Erreichen eines Schwellwerts initiiert diese Depolarisierung postsynaptisch wiederum ein Aktionspotential. Postsynaptische Kanäle öffnen sich, Na^+ -Ionen strömen in die postsynaptische Zelle; die Vesikel werden wiederverwendet (c). (Aus Lit.[28] entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Dr. E. R. Kandel.)

gieren. Dieses Bild eines weitverbreiteten Grundmechanismus wird durch die Beobachtung verstärkt, daß die entscheidenden Eigenschaften der "molekularen Maschinerie" der Sekretion während der Evolution von der Hefe zum Neuron konserviert wurden^[27c]. Der gesamte Vorgang besteht aus mindesten vier Schritten^[28, 29], deren Komponenten und Mechanismen auf molekularer Ebene noch längst nicht vollständig bekannt sind (Abb. 4 und 6 A): aus der Mobilisierung und dem Transport der Vesikel von ihren Speicherplätzen zu den Freisetzungstellen, dem Andocken der Vesikel an diese Stellen, der durch Ca^{2+} -Ionen ausgelösten Fusion der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran und schließlich aus der Abschließung und dem Recycling der leeren Vesikelmembran nach der abgeschlossenen Exozytose. Toxine führen uns zu einigen der zentralen Aspekte dieses komplexen Bildes.

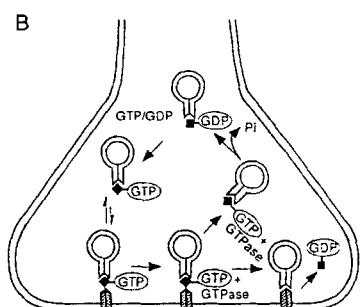
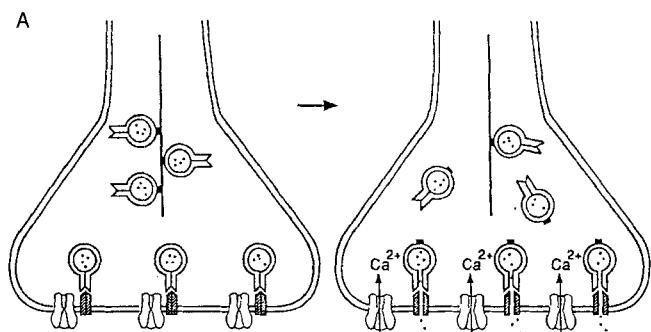
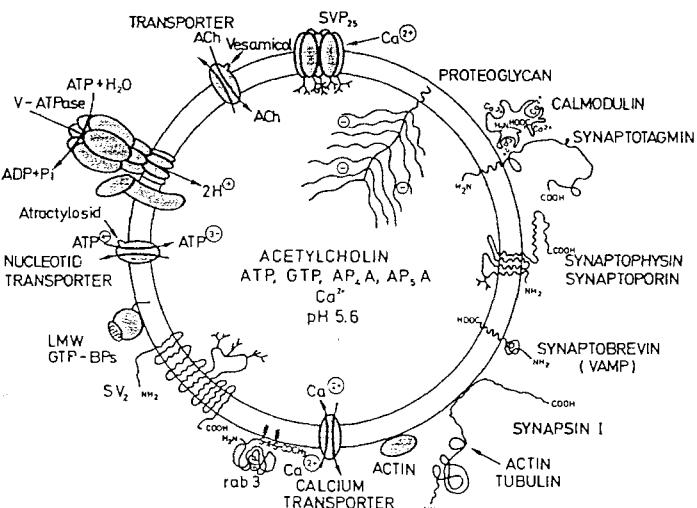


Abb. 6. Schematische Darstellung der wichtigsten Stadien der Transmitterfreisetzung aus der Nervenendigung. A: Mobilisierung und Fusion der Vesikel, ausgelöst durch das Einströmen von Ca^{2+} -Ionen. B: Regulation der Vesikelfusion (Kontrolle des Vesikelankerns) durch rab, ein Guaninnukleotid-bindendes und GTP-hydrolysierendes Protein; GTP/GDP steht für GTP/GDP-Austausch. (Aus Lit.[28] entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Dr. E. R. Kandel.)

Drei Gruppen von Molekülen sind derzeit im Blickpunkt des Interesses (Abb. 7): die erste Gruppe bilden Moleküle der präsynaptischen Membran (denn hier findet das An-docken, die Fusion und das Recycling statt), zu der zweiten zählen die Proteine der Vesikelmembran (denn unter ihnen sind die Gegenstücke oder Partner der Andock- und Fusionsproteine der präsynaptischen Membran zu suchen); die dritte Gruppe besteht aus diversen Regulatorproteinen, die locker mit den Vesikeln, den Andockstellen, dem Cytoskelett oder mit noch unbekannten intrazellulären Strukturen assoziiieren.

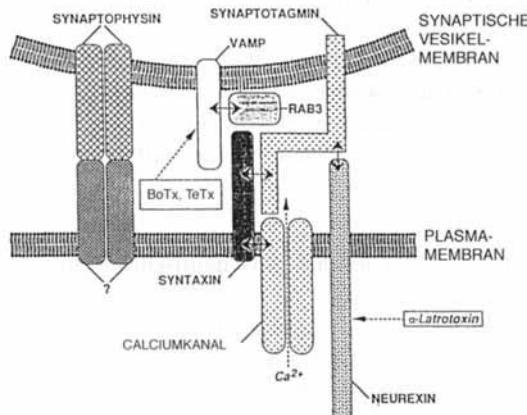


Abb. 7. Proteine der synaptischen Vesikel und der präsynaptischen Membran. Oben: schematische Darstellung eines acetylcholinspeichernden Vesikel mit den bis heute identifizierten Membranproteinen. (Reproduziert mit freundlicher Genehmigung von Dr. H. Zimmermann/Frankfurt, Lit.[122].) Unten: Proteine, die an dem Fusionsprozeß zwischen Vesikel- und präsynaptischer Plasmamembran beteiligt sind, einschließlich des Wirkungsorts einiger der im Text erwähnten Neurotoxine. (Aus Lit.[27] entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Dr. R. Scheller.)

3.2. ω -Conotoxin und Calciumkanäle vom N-Typ

Beginnen wir mit der präsynaptischen Membran, in der ebenfalls spannungsabhängige Ionenkanäle vorliegen. Eine notwendige Voraussetzung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung ist das Einströmen von Calcium-Ionen durch spezifische Kanäle, die durch die Depolarisierung der Membran als Folge des eintreffenden Aktionspotentials geöffnet werden (Abb. 6 A). Entfernt man die Calcium-Ionen aus dem extrazellulären Raum oder ersetzt sie durch Magnesium-Ionen, so ist die synaptische Impulsübertragung durch die Blockierung der Transmitterfreisetzung vollständig inhibiert.

Es wäre überraschend gewesen, wenn es keine gegen diesen für die Transmitterausschüttung so wichtigen Kanal gerichteten Neurotoxine gäbe. Meeresschnecken der Familie *Conus* produzieren ein Gift voller Neurotoxine^[30]. Neben mehreren Peptiden, die wie TTX und STX den spannungsabhängigen Natriumkanal blockieren, gibt es eine Gruppe von Peptiden, die ω -Conotoxine, die spannungsabhängige Calciumkanäle inhibieren. Die Inhibitoren des Natriumkanals werden als μ -Conotoxine be-

zeichnet (siehe Abb. 1). Selbst Peptide, die auf den postsynaptischen nikotinischen Acetylcholinrezeptor wirken, wurden gefunden. Sie werden als α -Conotoxine bezeichnet. Die Peptide der drei Gruppen sind zwischen 10 und 30 Aminosäuren lang^[31].

ω -Conotoxine waren die ersten Naturstoffe, von denen man wußte, daß sie Calciumkanäle unmittelbar beeinflussen. Sie können zur Differenzierung von Calciumkanal-Subtypen verwendet werden: Ein ω -Conotoxin (Code-Nummer GVIA) ist spezifisch für den Calciumkanal vom N-Typ, dem Subtyp, der an der Transmitterfreisetzung beteiligt ist^[32]; es hat jedoch wenig Einfluß auf die Calciumkanäle vom L- und T-Typ. Conotoxine eignen sich besonders für die Aufklärung des Aufbaus von Kanälen. Sie sind klein genug, um einfach synthetisiert werden zu können, und somit stehen Wildtyp- und synthetische Mutantentoxine zur Verfügung. Man kann Conotoxine radioaktiv markieren^[33] und für die Verwendung als Photoaffinitätsreagentien derivatisieren^[34]. Wenn sie mit Licht aktiviert wurden, können sie kovalent mit ihrem Zielprotein verknüpft werden, wodurch sie die Charakterisierung funktioneller Domänen ermöglichen.

Bisher wurden spannungsabhängige Calciumkanäle biochemisch vor allem mit anderen "Werkzeugen" untersucht, und zwar mit synthetischen Pharmaka und mit molekularbiologischen Methoden (cDNA-Klonierung und -Sequenzierung). Interessanterweise stellte sich bei diesen Experimenten heraus, daß die Calciumkanäle den spannungsabhängigen Natriumkanälen sehr ähnlich sind (siehe Abb. 3): Ihre größte Polypeptidkette (α_1 , $M_r = 230$ kDa) besteht ebenfalls aus vier sich wiederholenden Sequenzmotiven mit je sechs hydrophoben Aminosäuresequenzen und mit einer S4-Region, von der man annimmt, daß sie auch hier als Spannungssensor fungiert. Mehrere weitere Untereinheiten sind mit der α_1 -Kette assoziiert^[17].

3.3. Ein Toxin der Schwarzen Witwe

Das Gift der Spinne Schwarze Witwe (*Latrodectus tredecimguttatus*) half den Neurochemikern dabei, eine weitere wichtige molekulare Komponente der Transmitterausschüttungs-Vorgänge zu entdecken. Es enthält ein Protein der Masse 125 kDa, α -Latrotoxin, das hoch toxisch ist (ED₅₀ bei Mäusen 20 ng pro g Körpergewicht), da es die ungebremste Ca²⁺-unabhängige Transmitterausschüttung und die vollständige Entleerung der präsynaptischen Transmitterspeicher bewirkt^[35]. (An der neuromuskulären Endplatte werden die dort neben den kleinen Acetylcholin-enthaltenden Vesikeln vorhandenen peptidhaltigen Vesikel (large dense core vesicles) nicht zur Ausschüttung gebracht. α -Latrotoxin scheint daher ein Werkzeug zur Unterscheidung zwischen der regulierten und der konstitutiven Exocytose zu sein^[36].) Als Bindungsort von α -Latrotoxin wurde ein Protein der Verbindungsklasse der Neurexine ermittelt^[37, 38]. Das Neurexin interagiert möglicherweise über seine intrazelluläre Domäne mit Proteinen der Vesikelmembran wie dem Synaptotagmin^[39].

3.4. Schlangentoxine, die präsynaptisch wirken

Eine weitere Komponente des Exocytoseprozesses, die mit Hilfe von Neurotoxinen entdeckt wurde^[40], ist ein spannungs-

abhängiger, im Unterschied zum Hodgkin-Huxley-Kanal jedoch inaktivierender Kaliumkanal, der der Angriffspunkt mehrerer Toxine ist. Zu den bekanntesten dieser Toxine zählt eine Gruppe kleiner Proteine (59–61 Aminosäuren lang) aus dem Gift der Mamba, z.B. das α -, β - und γ -Dendrotoxin (DTX) sowie das Toxin I. Wie zunächst für Neuronen des Hippocampus gezeigt, begünstigt DTX – und stärker noch das Toxin I – die Transmitterausschüttung durch Blockierung eben jenes transienten Kaliumkanals^[41]. Die Hemmung eines Kaliumkanals bedeutet konkret, daß die Depolarisierung der Membran während des Aktionspotentials durch die Inhibition des repolarisierenden K⁺-Ionen-Auswärtsstroms länger anhält. Die Folge davon ist, daß die spannungsabhängigen Calciumkanäle, die die Exocytosemaschinerie mit Calcium-Ionen versorgt, länger geöffnet bleiben. Die Begünstigung der Exocytose (engl.: facilitation) durch DTX wird also letztendlich durch die Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration in der Nervenendigung bewirkt.

Vielelleicht derselbe Angriffspunkt, wenn auch ausschließlich bei cholinergen Synapsen (im peripheren Nervensystem; im zentralen Nervensystem ist die Transmitterspezifität viel weniger ausgeprägt) muß für β -Bungarotoxin vermutet werden. β -Bungarotoxin gehört zur Gruppe der Phospholipase-A₂-Toxine, zu denen auch das Notexin der australischen Tigerschlange, das Crototoxin der südamerikanischen Klapperschlange und das Tairoxin des australischen Taipans zählen (Abb. 8). Dieses sind be-

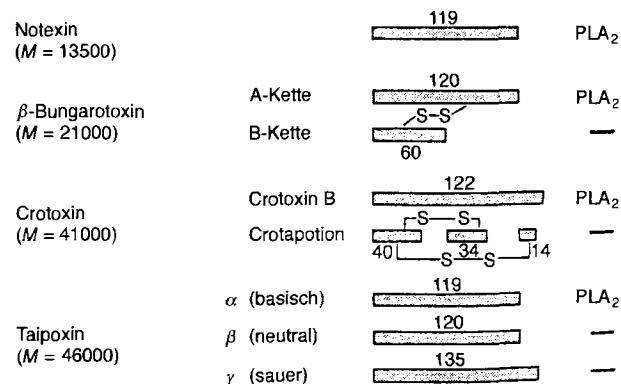


Abb. 8. Neurotoxine von Giftschlangen mit Phospholipase-A₂-Aktivität. Die Abbildung zeigt die Molekulargewichte M [Da], die Untereinheitenzusammensetzung, die Anzahl der Aminosäuren in jeder Untereinheit und welche Untereinheit die Lipaseaktivität enthält. (Aus Lit.[40] entnommen, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.)

vorzugt präsynaptisch wirkende Toxine aus Schlangengift, von denen einige aus über Disulfidbrücken verknüpften Polypeptidketten bestehen. Die eine Kette weist eine Affinität gegenüber dem Zielmolekül auf und vermittelt die Synapsenspezifität, die andere ist katalytisch aktiv und spaltet Ca²⁺-abhängig Phospholipide der Plasmamembran. Ihre Wirkung auf die Synapse folgt einem charakteristischen dreiphasigen Prozeß^[42]: Auf die anfängliche Hemmung der Transmitterausschüttung folgt die Beschleunigung und schließlich die irreversible Blockierung des Kanals. Man nimmt an, daß β -Bungarotoxin an dieselben Kaliumkanäle wie DTX bindet^[41, 43], wenn auch an unterschiedliche Bindungsstellen. Gemeinsam mit diesen beiden Toxinen kann der Kanal, der sich als Multiproteinkomplex mit interessanten regulatorischen Eigenschaften herausstellen wird, cha-

rakterisiert werden. Darüber hinaus dienen die Phospholipase-A₂-Toxine als Werkzeuge für die Aufklärung der Rolle der Phospholipide bei der Exocytose^[44].

3.5. Botulinus- und Tetanustoxin

Drei Komponenten der Mechanik, die wir die Exocytosemaschinerie genannt haben, konnten mit Hilfe von Neurotoxinen identifiziert werden: ein spannungsabhängiger Calciumkanal vom N-Typ, ein inaktivierender Kaliumkanal (A-Typ) und Neuromodulin, das α -Latrotoxin-bindende Protein, das auf noch unbekannte Weise an dem Ca^{2+} -abhängigen Andocken und/oder Fusionieren der Vesikel beteiligt ist. Ein vierter Protein, das Synaptobrevin, erregte das Interesse der Wissenschaftler im Zusammenhang mit zwei wohlbekannten Clostridientoxinen, Botulinus- (BoTx) und Tetanustoxin (TeTx). Diese zählen zu den wirksamsten präsynaptischen Inhibitoren der Transmitterfreisetzung^[45], wobei BoTx spezifisch die Acetylcholinausschüttung an peripheren Synapsen blockiert, während TeTx weniger selektiv ist und im zentralen Nervensystem wirkt. Dieser Unterschied konnte jedoch auf Differenzen bei der Bindung und bei der Aufnahme in das Neuron, jedoch nicht auf den toxischen Mechanismus im Innern der Zelle zurückgeführt werden^[46]: Injiziert man die Toxine unmittelbar in die Nervenzelle, verhindern beide die Ca^{2+} -abhängige Ausschüttung sowohl von Acetylcholin als auch von Catecholaminen^[47]. Genauer gesagt, war es die leichte Kette ($M_r = 55 \text{ kDa}$) des aus zwei Polypeptidketten bestehenden Toxins BoTx, die nach Injektion die Blockierung der Exocytose bewirkte; die schwere Kette ($M_r = 100\,000 \text{ Da}$) dient offenbar nur der Bindung und der Bildung einer Pore für den Transport durch die Zellmembran. Kürzlich konnte die Fähigkeit von BoTx, Membranen zu durchlöchern, durch Kryoelektronenmikroskopie mit anschließender Bildverarbeitung sichtbar gemacht werden^[48].

Welches Protein ist nun das intrazelluläre Ziel von BoTx und TeTx und wie wird die Blockierung der Transmitterfreisetzung bewerkstelligt? Diese Toxine führten zur Entdeckung der zentralen Rolle eines der Proteine der Vesikelmembran: Es wurde gezeigt, daß die leichten Ketten beider Toxine Zn^{2+} -Ionen enthalten und beide Aminosäuresequenzen aufweisen, die charakteristisch für Zinkproteasen sind^[49]. Und in der Tat hob sich ihre Exocytose-hemmende Wirkung auf, wenn die proteolytische Aktivität durch Entfernen der Zn^{2+} -Ionen mit einem Komplexbildner inhibiert wurde. Von dieser Beobachtung aus war es nur ein kurzer Weg bis zur Identifizierung des Vesikelproteins Synaptobrevin (auch VAMP genannt, vesicle-associated membrane protein) als dem natürlichen Substrat beider Enzymtoxine (siehe Abb. 7)^[50, 51].

Dies war jedoch nur die Einleitung zu einer Entwicklung, die immer komplexer wird. Tatsächlich gibt es sieben Isoformen von Botulinustoxin, darunter BoTx A, B, C, E, F und G. Bei dem oben erwähnten Botulinustoxin, das VAMP/Synaptobrevin spaltet, handelt es sich um BoTx B. Andere Isoformen sind ebenfalls Zinkproteasen; beispielsweise spaltet BoTx F wie BoTx B VAMP/Synaptobrevin^[52], BoTx C spaltet Syntaxin, ein 35 kDa-Protein, das in der präsynaptischen Membran verankert und wahrscheinlich beim Andocken der Vesikel beteiligt ist^[53], und BoTx A wiederum spaltet selektiv SNAP 25 (ein Synap-

somen-assoziiertes Protein der Masse $M_r = 25\,000 \text{ Da}$). SNAP 25 gehört zu den löslichen mit NSF kooperierenden Proteinen (soluble NSF accessory proteins)^[54]. Daraus folgt nach dem in Abschnitt 3.1 Gesagten, daß die Clostridientoxine als ihren Wirkort Proteine haben, die sowohl bei der regulierten als auch bei der konstitutiven Exocytose eine wichtige Rolle spielen^[55, 56] (Tabelle 2). Beispielsweise war SNAP 25 bisher als

Tabelle 2. Zielproteine der Clostridientoxine [26].

Neurotoxin	Zielprotein	Spaltstelle	Zelltyp	Intrazelluläre Lokalisation
Tetanus-toxin	VAMP/Synaptobrevin Cellubrevin	Gln76-Phe77 unbekannt	Neuron Alle Zellen	Synaptische Vesikel Vesikel des Endozytose-/Recycling-Systems
Botulinus-neurotoxin A	SNAP 25	Nahe C-Terminus	Neuron	Präsynaptische Plasmamembran und ?
BoTxB	VAMP/Synaptobrevin	Gln76-Phe77	Neuron	Synaptische Vesikel
BoTxC	Syntaxin	Nahe C-Terminus Membrananker, Spaltung erzeugt lösliches Fragment	Neuron	Präsynaptische Plasmamembran und ?
BoTxD	VAMP/Synaptobrevin Cellubrevin	Lys59-Leu60 Ala67-Asp68 unbekannt	Neuron Alle Zellen	Synaptische Vesikel Vesikel des Endozytose-/Recycling-Systems
BoTxE	SNAP 25	unbekannt	Neuron	Präsynaptische Plasmamembran und ?
BoTxF	VAMP/Synaptobrevin Cellubrevin	Gln58-Lys59 unbekannt	Neuron Alle Zellen	Synaptische Vesikel Vesikel des Endozytose-/Recycling-Systems
BoTxG	?	-	-	-

ein Protein der konstitutiven Exocytose bekannt. Die Hemmung der Transmitterfreisetzung durch BoTx A bewies nun, daß es auch an der regulierten Exocytose beteiligt ist. Die Clostridientoxine werden zur Zeit als Instrumentensatz für die Sierung der Exocytosemaschinerie genutzt. W. Huttner^[26] trug ihrer Bedeutung Rechnung, indem er für sie den Begriff Exotoxine prägte.

Abbildung 7 gibt ein vereinfachtes Bild der regulierten Exocytose, einschließlich der bisher identifizierten beteiligten Proteine. Außer denen, die mit Hilfe von Toxinen identifiziert wurden, gibt es andere, ebenso wichtige Proteine wie die Synapsine, die Proteinkinase-Substrate sind und die Speicherung und Mobilisierung der Vesikel bewirken. Ferner zählt zu ihnen RAB 3, ein kleines G-Protein, von dem man annimmt, daß es eine regulatorische Rolle beim Vesikeltransport und -andocken spielt (siehe auch Abb. 6B). Darüber hinaus sind noch die Dockingproteine Synaptophysin (ein Protein, das eventuell ähnlich wie die Gap-Junction-Proteine Poren bildet), Syntaxin und Synaptotagmin bekannt. Aber trotz dieser Fülle an Proteinen und Informationen haben wir nur eine recht vage Vorstellung von den Mechanismen, die den Transport, das Andocken, die Fusion und das Recycling der Vesikel auslösen und bewerkstelligen. Wegen ihrer spezifischen Wirkung auf nur ein oder wenige Zielmoleküle waren Toxine bisher unabdingbar bei der Aufklärung dieses fundamentalen Lebensmechanismus, und sie werden es auch weiterhin sein.

3.6. Transmitterrezeptoren als postsynaptische Angriffspunkte von Toxinen

Nachdem ein Transmitter aus der präsynaptischen Nervenendigung freigesetzt wurde, diffundiert er – wie bereits erwähnt – durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran. Dort wird er von spezifischen Rezeptormolekülen in Empfang genommen und löst in der Empfängerzelle einen Effekt aus. Dieser Effekt kann komplex sein; im einfachsten, hier betrachteten Fall kann es sich um ein Aktionspotential handeln. Wie oben beschrieben, wird ein Aktionspotential durch die Depolarisierung der Plasmamembran, verursacht durch das Einströmen von Natrium-Ionen durch Ionenkanäle, ausgelöst. Daher sind Transmitterrezeptoren, die Aktionspotentiale hervorrufen, selbst Ionenkanäle. Um sie von den spannungsabhängigen Ionenkanälen, die in Abschnitt 2 beschrieben wurden, zu unterscheiden, nennt man sie Liganden-regulierte Ionenkanäle^[57]. Liganden-regulierte Ionenkanäle gehören zu der Überfamilie der Typ-I-Rezeptoren; Typ-II-Rezeptoren wirken über Kopplungs(G)-Proteine meist auf Second-messenger-produzierende Enzyme ein. Der Liganden-regulierte Ionenkanal kann spezifisch für Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) oder für Anionen (Cl^-) sein. Das Einströmen von negativ geladenen Teilchen in eine Zelle würde sie hyperpolarisieren und damit die Auslösung von Aktionspotentialen verhindern. Synapsen mit Liganden-regulierten Anionenkanälen wirken daher inhibitorisch, jene mit Kationenkanälen exzitatorisch (verstärkend). Exzitatorische Synapsen verwenden Transmitter wie Acetylcholin und Glutamat, inhibitorische arbeiten mit Glycin und GABA (γ -Aminobuttersäure)^[58].

Soviel zum neurobiologischen Hintergrund. Kehren wir zu dem Konzept der Toxine als Werkzeuge zurück. Ich werde mich nun auf zwei exemplarische Systeme beschränken, auf die Typ-I-Rezeptoren für Glycin und Acetylcholin. Diese beiden wurden ausgewählt, weil das erstere ein Beispiel dafür ist, wie die Anwendung von Toxinen unmittelbar zur Aufklärung eines Großteils der Rezeptorstruktur führte. Der zweite Rezeptor, der nikotinische Acetylcholinrezeptor, wurde ausgesucht, da er der als erster isolierte und noch immer am besten charakterisierte Neurotransmitterrezeptor ist, ein Modell für die anderen Rezeptoren seiner Klasse und ein überzeugendes Beispiel für die Toxine-als-Werkzeuge-Technik.

3.7. Strychnin und der Glycinrezeptor

Strychnin ist nicht nur ein Mordwerkzeug in Kriminalgeschichten, es war auch der “Haken”, mit dem der Glycinrezeptor aus biologischem Material extrahiert und bis zur Homogenität gereinigt wurde. Letzteres war die Voraussetzung für die partielle Sequenzierung, Klonierung und cDNA-Sequenzierung des Rezeptors, aufgrund deren wir heute dessen Primärstruktur kennen^[59a, 60]. Das Toxin Strychnin (LD_{50} beim Menschen 1 mg pro kg Körpergewicht) bewirkt motorische Störungen, Krämpfe und den Tod durch Lähmung der Atmung^[2]. Die Krämpfe beruhen auf seiner antagonistischen Wirkung auf inhibitorische glycinerge Synapsen des Rückenmarks^[59b]. Glycin ist der wichtigste inhibitorische Transmitter im Rückenmark und im Hirnstamm; im Cortex und im Cerebellum übernimmt GABA diese Rolle. 1982 wurde der Glycinrezeptor durch Affi-

nitätschromatographie isoliert, wobei ein mit immobilisiertem Strychnin belegtes Säulenmaterial verwendet wurde^[61]. Das Rezeptorprotein erwies sich als ein Komplex aus drei unterschiedlichen Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 93, 58 (β) und 48 kDa (α_1). Die relative Gesamtmasse M_r beträgt 250 000 Da und entspricht einem Pentamer^[62, 63], das aus den 48 und 58 kDa schweren Polypeptidketten zusammengesetzt ist. Die 93 kDa-Polypeptidkette ist im Unterschied zu den anderen ein peripheres Protein. Es befindet sich an der cytoplasmatischen Oberfläche der Membran und vermittelt die Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und dem Cytoskelett^[64]. Wegen dieser Brückenfunktion wurde es Gephyrin genannt^[65]. ^3H -Strychnin half, die Ligandenbindungsstelle im Komplex zu entdecken. Wegen seiner Lichtempfindlichkeit kann es als Photoaffinitätsreagens eingesetzt werden. Beim Bestrahlen mit UV-Licht wird es irreversibel in die 48 kDa-Untereinheit eingebaut^[61, 66]. Glycin kompetiert mit Strychnin^[67]; die Bindungsstellen dieser beiden Liganden scheinen sich zu überlappen, sind aber nicht identisch^[68].

Es wurden mehrere Isoformen der α - und β -Untereinheiten, Produkte unterschiedlicher Gene und alternativem Spleißens, gefunden^[69, 70]. Darunter befindet sich eine neonatal exprimierte Untereinheit α_2 , die besonders interessant ist, weil sie entwicklungsabhängig reguliert ist und eine sehr niedrige Affinität gegenüber Strychnin aufweist^[71, 72]. Neugeborene Mäuse sind daher relativ unempfindlich gegenüber Strychnin; die Ursache hierfür ist der Austausch einer einzigen Aminosäure in der α -Untereinheit des Glycinrezeptors^[72].

Die bedeutendste Entdeckung in Zusammenhang mit dem Glycinrezeptor war seine Ähnlichkeit mit dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor^[60, 62]. Die Primärstrukturen der Untereinheiten des Glycinrezeptors gleichen sich nicht nur untereinander, sondern auch in bezug auf andere Typ-I-Rezeptoren (mit Ausnahme der Glutamatrezeptoren). Hydropathie-Diagramme weisen darauf hin, daß sie sich möglicherweise auch in ihrer Transmembranfaltung ähneln. Glycin-, GABA- und nikotinische Acetylcholinrezeptoren werden daher zu einer Überfamilie zusammengefaßt, deren Mitglieder sich eventuell während der Evolution aus einem gemeinsamen Urrezeptor entwickelt haben^[73].

Doch diese Details und viele dieser Art sind Gegenstand von speziellen Übersichten. In diesem Aufsatz möchte ich nur immer wieder auf die Rolle hinweisen, die Toxine in der Rezeptorforschung gespielt haben. Durch Bindungstests und Photoaffinitätsmarkierungen führen Toxine zur Isolierung und Aufklärung eines Rezeptors. Sie sind Voraussetzungen für die Klonierung und Sequenzierung entweder von genomischer DNA oder von cDNA (weil hierfür Oligonucleotidsonden benötigt werden, die sich aus Teilsequenzen des jeweiligen Rezeptors ableiten). Der Beweis dafür, daß die klonierte und sequenzierte DNA tatsächlich für den gewünschten Rezeptor kodiert, erfordert deren Expression in einem heterologen System, beispielsweise in *Xenopus*-Oozyten. Dort kann man die Identität des Rezeptors elektrophysiologisch testen; ein Kriterium dafür, daß man nach der Expression den richtigen und kompletten Rezeptor erhalten hat, ist dessen Reaktion auf Agonisten und Antagonisten, einschließlich der Toxine. Diese schrittweise Methode wurde inzwischen in der Rezeptorforschung zur Routine, und im folgenden wird ein weiteres klassisches Beispiel hierfür vorgestellt.

3.8. α -Neurotoxine und der nicotinische Acetylcholinrezeptor

Einen Transmitterrezeptor kennen wir relativ genau, nicht zuletzt, weil der Werkzeugkasten, den die Natur uns zu seiner Untersuchung an die Hand gab, besonders reich an Toxinen ist^[74]. Es handelt sich um den nicotinischen Acetylcholinrezeptor des peripheren^[77] und des zentralen^[75] Nervensystems von Vertebraten. Er soll hier kurz dargestellt werden, um dabei die Effizienz einiger dieser Werkzeuge bei der Sammlung von experimentellen Daten, vor allem während der vergangenen zwei Jahrzehnte, vorzustellen.

Mitte des neunzehnten Jahrhunderts, fünfzig Jahre bevor die Wissenschaft irgendetwas über Synapsen und Rezeptoren wußte, identifizierte C. Bernard die Nervenimpulsübertragung auf den Muskel – heute würden wir es als die neuromuskuläre Endplatte bezeichnen – als den Ort, an dem das Pfeilgift Curare wirkt^[76]. Man kann darin den ersten Schritt auf dem Weg der Aufklärung der Prozesse sehen, die der Nervenimpulsübertragung zugrunde liegen. Es dauerte jedoch noch bis in die frühen siebziger Jahre unseres Jahrhunderts, bis ein anderes Toxin von zentraler Bedeutung bei der Identifizierung, Isolierung und detaillierten Strukturanalyse des eigentlichen molekularen Angriffspunkts von D-Tubocurarin, einer der neurotoxischen Komponenten des Pfeilgifts, war.

Dieses andere Toxin war α -Bungarotoxin der Kraits-Giftschlange *Bungarus multicinctus*, das zu einer ganzen Familie homologer Peptidtoxine aus dem Schlangengift der Arten *Elapidae* und *Hydrophiidae*, zu denen die zahlreichen Spezies der Cobras und Seeschlangen zählen, gehört. Chang und Lee^[77] zeigten, daß das Toxin die Impulsübertragung an der neuromuskulären Endplatte blockiert, an jener Synapse also, die Acetylcholin als Transmitter für die Übertragung von Nervenimpulsen auf die gestreifte Muskulatur verwendet. (Die glatte Muskulatur und der Herzmuskel verwenden einen anderen Synapsentyp, der allerdings ebenfalls Acetylcholin nutzt. Diese Synapsen reagieren auf andere Toxine, vor allem auf pflanzliche Alkaloide wie Atropin und Muscarin. Sie werden muscarinisch cholinerg^[78] in Analogie zu nicotinisch cholinergen Synapsen, die Gegenstand dieser Übersicht sind, genannt; Abb. 9).

α -Bungarotoxin war wie das Strychnin beim Glycinrezeptor der Haken, an dem der nicotinische Acetylcholinrezeptor aus seiner Membrumgebung extrahiert wurde^[77, 77]. Es assoziiert mit sehr hoher Affinität ($K_D = 10^{-11}$ M) und extremer Selektivität mit einem der zahlreichen Proteine der postsynaptischen Membran, die im Fall der neuromuskulären Endplatte die Muskelmembran selbst ist. Jenes integrale Membranprotein ist der nicotinische Acetylcholinrezeptor, das Molekül, das den Transmitter Acetylcholin nach seiner Freisetzung aus der präsynaptischen Nervenendigung bindet. In der Nähe des Rezeptors befinden sich noch andere Acetylcholin-bindende Proteine, wie die Acetylcholinesterase, die den Nervenimpuls durch die Hydrolyse des Transmitters beendet. Diese Proteine weisen keinerlei signifikante Affinität gegenüber α -Bungarotoxin auf; gerade mit α -Bungarotoxin konnte gezeigt werden, daß die Acetylcholinesterase und der Acetylcholinrezeptor unterschiedliche Moleküle sind^[79]. Ursprünglich hatte man vermutet, daß die Esterase gleichzeitig auch der Rezeptor ist, vielleicht indem sie die postsynaptische Membran dadurch depolarisiert, daß sie Kationen

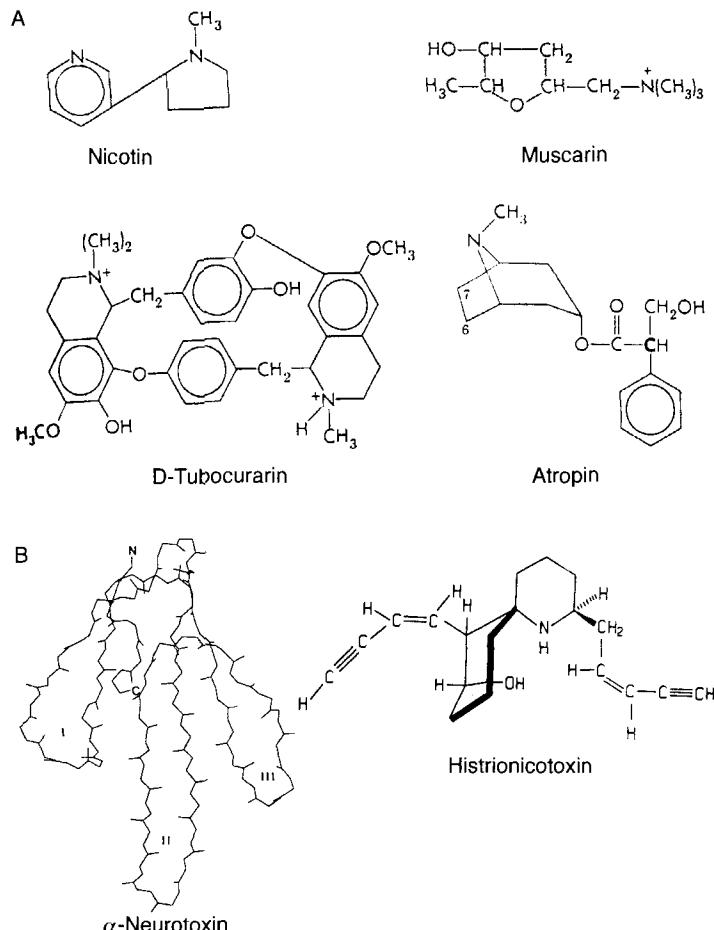


Abb. 9. Neurotoxine der cholinergen Synapse. A: Toxine, die zur Unterscheidung von Rezeptortypen verwendet werden (Unterscheidung nicotinischer von muscarinischen Rezeptoren); Nicotin und Muscarin sind Agonisten, D-Tubocurarin und Atropin kompetitive Antagonisten. B: Toxine, die zur Unterscheidung von Rezeptordomänen dienen (Unterscheidung von R- und E-Domäne des nicotinischen Acetylcholinrezeptors; siehe Text). α -Neurotoxin (Erabutoxin b) wirkt als kompetitiver Antagonist, Histrionicotoxin als nichtkompetitiver Antagonist und Kanalblocker.

an der Kontaktfläche zwischen dem Enzym und seiner Lipidumgebung hindurchtreten läßt^[80].

Die Methode, durch die ein Rezeptor definiert und quantifiziert wird, ist der Bindungstest. Tritiiertes α -Bungarotoxin^[81] wurde zur Bestimmung der Rezeptormenge verwendet, die beispielsweise in einem Gewebe oder in den Fraktionen einer affinitätschromatographischen Trennung von in Detergens gelösten Membranproteinen enthalten ist. In einem typischen Bindungstest^[82] wird hierbei eine Proteinfaktion mit ^3H - α -Bungarotoxin inkubiert. Nach Äquilibrierung wird die Inkubationsmischung durch einen Filter mit Kationenaustauscher-Eigenschaften gegossen, auf dem der Rezeptor und das gebundene radioaktive Toxin zurückgehalten werden. Ungebundenes Toxin läuft hindurch und wird weggewaschen. Die Radioaktivität der Substanz auf dem Filter ist somit ein direktes Maß für die Anzahl der Bindungsstellen (entspricht der Anzahl der Rezeptormoleküle oder, falls der Rezeptor mehr als eine Bindungsstelle hat, eines ganzzahligen Bruchteils davon) in dieser Proteinmischung.

Ebenso wurde fluoreszierend oder radioaktiv markiertes α -Bungarotoxin dazu verwendet, Rezeptoren im extra- oder sub-

synaptischen Bereich der Endplatte zu lokalisieren und zu zählen. Subsynaptisch sind ca. 20 000 Rezeptoren pro μm^2 vorhanden.

Mit diesem Werkzeug zur Hand wurde der nicotinische Acetylcholinrezeptor schon bald bis zur Homogenität gereinigt und biochemisch charakterisiert. Diese Arbeit geht vor allem auf Jean-Pierre Changeux et al. am Pasteur-Institut in Paris zurück, aber auch – mitunter in heftiger Konkurrenz – auf Arthur Karlin (New York), Michael Raftery (Pasadena), die Eldefrawis (Baltimore), Eric Barnard (London) und viele andere. Außer den Toxinen als Werkzeug stellte die Natur noch eine weitere wesentliche Hilfe zur Verfügung, und zwar das elektrische Gewebe von Zitteraalen und Zitterrochen (*Electrophorus electricus* bzw. *Torpedo spc.*). David Nachmansohn^[83] hatte beobachtet, daß diese Gewebe extrem reich an cholinriger Innervierung sind. Dadurch wurde die Isolierung von Rezeptorprotein im Milligramm-Maßstab möglich. Es stellte sich heraus, daß der Fischrezeptor während der Evolution weitgehend konserviert blieb und in seiner Biochemie, Elektrophysiologie, Immunologie, Pharmakologie und Toxikologie dem homologen Rezeptor höherer Vertebraten, einschließlich dem des Menschen, sehr ähnlich ist.

Bevor ich mit dem Thema Toxine als Werkzeuge fortfahre, sollen einige der biochemischen Eigenschaften des nicotinischen Acetylcholinrezeptors zusammengefaßt werden, soweit sie die Basis für unsere Diskussion der gegenwärtigen Nutzung von Toxinen bei der Untersuchung der Struktur-Funktions-Zusammenhänge sind.

Der nicotinische Acetylcholinrezeptor^[6,7,84–88] aus *Torpedo californica* ist ein heteropentameres Glycoprotein der Masse 290 000 Da. Er setzt sich aus zwei identischen Polypeptidketten (α , scheinbares $M_r \approx 40\,000$ Da, 437 Aminosäuren) und drei sich unterscheidenden (β , scheinbares $M_r \approx 50\,000$ Da, 469 Aminosäuren; γ , scheinbares $M_r \approx 60\,000$ Da, 489 Aminosäuren und δ , scheinbares $M_r \approx 65\,000$ Da, 501 Aminosäuren) zusammen. Die Quartärstruktur des Rezeptors ist somit $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Alle Untereinheiten sind glycosyliert, alle sind phosphoryliert, und alle durchspannen die Membran. Als die Primärstrukturen der Polypeptidketten aus den Sequenzen der entsprechenden, klonierten cDNAs abgeleitet wurden^[89–92], folgerte man, daß je vier Sequenzbereiche hydrophober Aminosäuren, ca. 22 Aminosäuren lang, die in allen Untereinheiten auftreten, dazu dienen, die Membran je viermal zu durchspannen^[93]. Bis vor kurzem wurde vorausgesagt, daß jene Transmembransequenzen sich zu α -Helices anordnen^[94], doch heute sind wir sicher, daß einige davon β -Stränge bilden. Die C- und die N-Terminali der Ketten befinden sich auf der extrazellulären Seite der Membran. Die Primärstrukturen der vier unterschiedlichen Untereinheiten sind ähnlich, ein Hinweis darauf, daß sie frühzeitig während der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen hervorgingen^[95]. Ich erwähnte bereits ihre Ähnlichkeit mit anderen Mitgliedern der Überfamilie der Liganden-regulierten Ionenkanäle^[60].

Soviel zur Struktur des nicotinischen Acetylcholinrezeptors. Zu seiner Funktion erwähnte ich bereits, daß er die Kationenpermeabilität der postsynaptischen Membran reguliert. In der oben beschriebenen Struktur müssen daher zwei funktionelle Bereiche zu finden sein: eine Tasche, die Acetylcholin (und α -Neurotoxin) bindet, und ein Ionenkanal, der durch sie reguliert

wird. Da der Ligandenbindungsreich und der Ionenkanal miteinander auf dieselbe Weise interagieren wie das aktive und das regulatorische Zentrum bei allosterischen Enzymen und Transportproteinen^[96,97], muß es wie bei diesen einen dritten funktionellen Bereich im Acetylcholinrezeptor geben, der diese Interaktion vermittelt. Diese postulierte, dreiteilige Struktur stimmt mit der allgemeinen Rezeptorarchitektur^[57] überein. Diese besteht aus einem signalempfangenden, d. h. den Liganden bindenden Bereich R, einem Effektorbereich E, der den Effekt vermittelt, den das Signal auf die Zielzelle haben soll, und einer Transduktor genannten übertragenden (transduzierenden) Struktur T, die R und E miteinander verbindet. Das RTE-Rezeptorkonzept ist die Basis der Klassifizierung von Rezeptoren in die drei Typen Typ I, II und III. Letzteres sind die Wachstumshormonrezeptoren, die nicht Gegenstand dieses Aufsatzes sind. Unter den Neurotransmitterrezeptoren definiert man den Typ I als diejenigen Rezeptoren, bei denen R, T und E (meist ein Ionenkanal) in einem einzigen Protein integriert vorliegen. Im Unterschied dazu befinden sich bei Typ-II-Rezeptoren R, T und E (das hier meist ein Enzym ist, wenn auch in neuerer Zeit diverse Ionenkanäle gefunden wurden) auf unterschiedlichen Proteinen, die mit biochemischen Methoden voneinander zu trennen sind. Beispiele von Typ-I-Rezeptoren sind der nicotinische Acetylcholinrezeptor, der GABA_A- und der Glycinrezeptor, ferner einige Subtypen der Glutamat- und Serotoninrezeptoren. Zu den Typ-II-Rezeptoren gehören die β -adrenergen Rezeptoren, die muscarinischen Acetylcholinrezeptoren, die Rezeptoren für Opiate und andere Neuropeptide sowie die Dopaminrezeptoren^[57].

Wenn die Struktureinheiten R, T und E bei den Typ-I-Rezeptoren keine separierbaren Moleküle sind, ist es eine um so schwierigere Aufgabe, sie in der Proteinstruktur aufzufinden. Auch hier waren wieder die Neurotoxine unverzichtbare Werkzeuge, wobei nochmals der nicotinische Acetylcholinrezeptor als Beispiel für ihre Anwendbarkeit herangezogen werden soll. Die α -Neurotoxine sind antagonistische Liganden von R^[74], während andere, meist niedermolekulare Toxine spezifisch an den Ionenkanal E binden^[97]. T, der Teil des Rezeptors, der den Effekt der Ligandenbindung auf den Ionenkanal überträgt, wurde ebenfalls im Ionenkanal oder in seiner unmittelbaren Nähe aufgefunden^[98].

3.9. Sezieren eines Rezeptors: R, der Signalempfängerteil

Der nicotinische Acetylcholinrezeptor wurde nach dem Nicotin benannt, einem giftigen Pflanzenalkaloid, das wie der natürliche Transmitter Acetylcholin als Agonist wirkt (Abb. 9). Um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren mit den Agonisten die kompetitiven Antagonisten, unter denen Toxine wie die α -Neurotoxine aus Schlangengift und das Pfeilgift D-Tubocurarin zu den wirkungsvollsten gehören. Die Bindungsstellen für Agonisten und kompetitive Antagonisten werden gegenwärtig durch Affinitätsmarkierung in Kombination mit Mikrosequenzierung und durch gerichtete Mutagenese kartiert. Es gibt pro Rezeptormolekül zwei dieser Bindungsstellen, je eine auf den beiden α -Untereinheiten. Mit Hilfe von ³H- α -Bungarotoxin und diversen Techniken (zusammengefaßt in Lit.^[7]) wurde gezeigt, daß die Aminosäuresequenz 180–200 der α -Untereinheit unmittelbar

an der Toxinbindung beteiligt ist. Interessanterweise weist der Rezeptor von Schlangen in diesem Bereich mehrere Mutationen auf, durch die die Affinität und somit die Toxizität der Schlangengifte herabgesetzt wird^[99].

Neuere Experimente haben gezeigt, daß auch andere Untereinheiten an der Toxinbindung beteiligt sind. Die Photoaffinitätsmarkierung des membrangebundenen Rezeptors mit radioaktiven Derivaten von D-Tubocurarin^[100] und α -Neurotoxin II aus einem Cobragift^[101] zeigten, daß die γ - und die δ -Untereinheiten dieser Toxine ebenfalls inkorporiert sind. Genauer gesagt reagierte eine zur α -Untereinheit benachbarte Polypeptidkette nur dann mit dem α -Neurotoxin, wenn dieses eine photoaktivierbare Gruppe in einer ganz spezifischen Position, und zwar am Lysinrest-26, aufweist (Abb. 10)^[102]. Befand sich die pho-

nen^[104–106] und von NMR-Untersuchungen der Toxine in Lösung^[107–109] bekannt sind (siehe Abb. 9 B). Führt man photoaktive Gruppen in definierte Positionen ein, kann man diese buchstäblich als Meßblätten zur Vermessung der Rezeptortopographie verwenden^[102, 110].

3.10. E, der Ionenkanal als das Effektorsystem des Rezeptors

Neben den *kompetitiven* gibt es auch *nichtkompetitive* Antagonisten (siehe Abb. 9 B), die die Bindung des Agonisten an R zwar nicht verhindern, aber trotzdem die Antwort, d.h. den Ionenfluß durch den Kanal, inhibieren. Neurotoxine ermöglichen es zu zeigen, daß nichtkompetitive Antagonisten unmittelbar an E, den Ionenkanal, binden und ihn dadurch sterisch (oder allosterisch) blockieren^[7, 96, 97]. Eines dieser Kanal-blockierenden Neurotoxine ist das Histrionicotoxin, das man aus der Haut von südamerikanischen Fröschen der Art *Dendrobates* isolieren kann. Histrionicotoxin wurde zu dem wichtigsten Werkzeug bei der Identifizierung des Ionenkanals innerhalb des Rezeptorproteins^[111, 112]. Die entscheidenden Kriterien für die Einstufung einer Substanz als Liganden des Ionenkanals sind die Spannungsabhängigkeit ihrer inhibitorischen Aktivität und ihre Kompetition im Bindungstest mit dem erwiesenen Kanalliganden Histrionicotoxin^[97]. Nach diesen Kriterien^[113, 114] wurde ein niedermolekulares organisches Kation, das Triphenylmethylphosphonium-Ion TPMP⁺, als Photoaffinitätsreagens eingeführt, mit dem die Kanalwand kovalent markiert und mit Hilfe proteinchemischer Methoden identifiziert wurde^[114, 115]. Das überraschende Ergebnis dieser Versuche war, daß jede der Rezeptoruntereinheiten mit dem TPMP⁺ in einer homologen Position markiert wurde^[115] und somit die fünf Untereinheiten eine homologe Aminosäuresequenz zur Wand des Kanals beisteuern. Diese Sequenz ist einer der vier hydrophoben Stränge, von denen man annimmt, daß sie die Membran in Form von α -Helices durchspannen^[92]. Genauer gesagt, handelt es sich um die vermutete Transmembranhelix M2. Daher konnte, letztlich mit Histrionicotoxin als Werkzeug, erstmals der Ionenkanal eines Rezeptors beschrieben werden (Abb. 10): E, der Ionenkanal des Acetylcholinrezeptors, wird zumindest teilweise von den fünf putativen Transmembranhelices M2 der Rezeptoruntereinheiten gebildet^[115, 116].

Dieses Ergebnis stimmt mit Daten überein, die mit ganz anderen experimentellen Methoden gewonnen wurden, z.B. mit rekombinanter DNA-Technologie in Verbindung mit der Patch-clamp-Elektrophysiologie^[117, 118].

3.11. T, der Transduktordes Rezeptors?

Der Transduktordes Rezeptors, der R mit E verbindet, wurde durch gerichtete Mutagenese und nicht durch Neurotoxine identifiziert. Es stellt sich heraus, daß diese Funktion in denselben Strukturen zu suchen ist, die auch den Ionenkanal bilden, also in dem Trichter, der von den Transmembranhelices M2 gebildet wird^[119, 120].

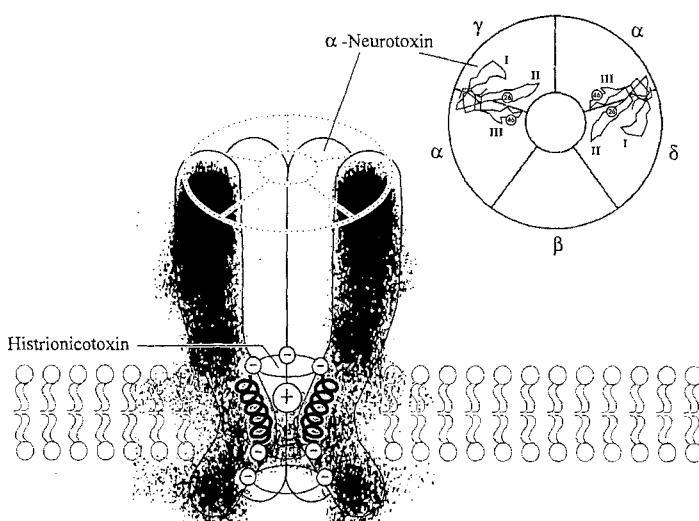


Abb. 10. Modell des nicotinischen Acetylcholinrezeptors, des Prototyps der Liganden-regulierten Ionenkanäle, der weitgehend mit Hilfe von Neurotoxinen charakterisiert wurde. α - δ geben die Strukturuntereinheiten des Rezeptors an.

toaktivierbare Gruppe am Lysinrest-46, fand die Reaktion ausschließlich mit den α -Ketten statt. Ferner war durch Bindungsstudien gezeigt worden, daß die beiden α -Ketten, obwohl sie identische Primärstrukturen haben, unterschiedliche Affinitäten gegenüber ihren Liganden aufweisen^[103], ein Hinweis auf den Einfluß der benachbarten Untereinheiten auf das Bindungsverhalten. Kompositionsexperimente mit photoaktivierbaren Toxinderivaten (Photogruppe in Position Lys-26) zeigten, daß sich die α -Untereinheit mit der höheren Affinität neben der γ -Struktur, die mit der niedrigeren Affinität sich neben der δ -Einheit befindet. Symmetriüberlegungen sprechen demnach für eine $\gamma\alpha\beta\delta$ -Struktur^[87] anstelle einer $\alpha\beta\gamma\delta$ -Anordnung^[104] in der Quartärstruktur (Abb. 10).

Zur Zeit wird die Rezeptoroberfläche und die Quartärstruktur detailliert mit Hilfe von α -Neurotoxinen als Werkzeugen kartiert. Auch ohne Röntgenstrukturanalyse wird dies ein dreidimensionales Bild – zumindest eines Teils des Rezeptors – ergeben. Dieses Vorgehen erscheint besonders aussichtsreich, da die genauen Tertiärstrukturen der Neurotoxine aufgrund von Röntgenstrukturuntersuchungen an den kristallinen Prote-

4. Schlußbemerkung

Diese Übersicht über die neuerliche Zunahme neurochemischer Entdeckungen, die auf der Anwendung von Neurotoxinen als Werkzeugen beruhen, mag den falschen Eindruck hervorrufen, als seien diese Werkzeuge auf synaptische Mechanismen beschränkt. Dies entspricht nicht den Tatsachen. Man könnte diese Übersicht auf ganz andere Gebiete ausdehnen, z. B. auf den axonalen Transport, die neuronale Entwicklung usw. In Anbetracht des Erfolgs dieser Technik auf einigen Gebieten und der kontinuierlichen Entdeckung neuer Neurotoxine, kann man mit Sicherheit spannende Anwendungen dieses "Werkzeugkastens" in der zukünftigen neurochemischen Forschung voraussagen.

Ich danke Prof. Dr. Victor Tsetlin für fruchtbare Zusammenarbeit und Diskussionen. Die Abbildungen 3 und 10 wurden von Frau K. von Etzel gezeichnet. Die in diesem Aufsatz erwähnten Arbeiten aus meiner Arbeitsgruppe wurden durch das Land Berlin, die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sfb 312) und den Fonds der Chemischen Industrie finanziert.

Eingegangen am 29. November 1993 [A 39]

- [1] Z. W. Hall, *Molecular Neurobiology*, Sinauer, Sunderland, MA, 1992.
- [2] *Handbook of Toxicology* (Hrsg.: W. T. Shier, D. Mebs), Dekker, New York, 1990.
- [3] H. Herken, F. Hucho, *Handb. Exp. Pharmacol.* 1992, 102.
- [4] *Toxins as Tools in Neurochemistry* (Hrsg.: F. Hucho, Yu. A. Ovchinnikov), de Gruyter, Berlin, 1983.
- [5] *Neurotoxins in Neurochemistry* (Hrsg.: J. O. Dolly), Horwood, Chichester, 1988.
- [6] A. Maelicke, *Angew. Chem.* 1984, 96, 193–219; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1984, 23, 195–221.
- [7] J.-P. Changeux, *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures*, Vol. 4, Raven Press, New York, 1990, S. 21–168.
- [8] F. Hucho, *Neurochemistry – Fundamentals and Concepts*, VCH, Weinheim, 1986.
- [9] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, *J. Physiol. (London)* 1952, 116, 473–496.
- [10] B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2. Aufl., Sinauer, Sunderland, MA, 1992.
- [11] M. Lazdunski, J. F. René, *Annu. Rev. Physiol.* 1982, 44, 463–473.
- [12] S. Becker, R. D. Gordon, *Handb. Exp. Pharmacol.* 1992, 102, 719–737.
- [13] N. S. Cook, *Potassium Channels*, Horwood, Chichester, 1990.
- [14] H. Meves, *Handb. Exp. Pharmacol.* 1992, 102, 739–774.
- [15] E. Carbone, E. Wanke, G. Prestipino, L. D. Possani, A. Maelicke, *Nature* 1982, 296, 90–91.
- [16] E. Carbone, G. Prestipino, E. Wanke, L. D. Possani, A. Maelicke, *Toxicon* 1983, 3, 57–60.
- [17] W. Catterall, *Science* 1988, 242, 50–61.
- [18] W. S. Agnew, *Annu. Rev. Physiol.* 1984, 46, 517–530.
- [19] J. C. Tanaka, R. E. Furman, R. L. Barchi in *Ion Channel Reconstitution* (Hrsg.: C. Miller), Plenum, New York, 1986, S. 307–336.
- [20] W. Catterall, *Annu. Rev. Biochem.* 1986, 55, 953–985.
- [21] M. Noda, S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanoka, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, M. S. Rafty, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata, S. Numa, *Nature* 1984, 312, 121–127.
- [22] M. Noda, T. Ikeda, H. Suzuki, H. Takeshima, T. Takahashi, M. Kuno, S. Numa, *Nature* 1986, 322, 826–828.
- [23] M. Noda, H. Suzuki, S. Numa, W. Stühmer, *FEBS Lett.* 1989, 259, 213–216.
- [24] O. Pongs, *Pflügers Arch.* 1989, 414, 71–75.
- [25] A. J. Yool, T. L. Schwarz, *Nature* 1991, 349, 700–704.
- [26] W. B. Huttner, *Nature* 1993, 365, 104–105.
- [27] a) T. Söllner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, J. E. Rothman, *Nature* 1993, 362, 318–324; b) S. W. Whiteheart, I. C. Griff, M. Brunner, D. O. Clary, T. Mayer, S. A. Buhrow, J. E. Rothman, *ibid.* 1993, 362, 353–355; c) M. K. Bennet, R. H. Scheller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 2559–2563.
- [28] T. M. Jessell, E. R. Kandel, *Cell* 1993, 10, 1–30.
- [29] R. B. Kelly, *Cell* 1993, 10, 43–53.
- [30] J. Striessnig, H. Glossmann, *Handb. Exp. Pharmacol.* 1992, 102, 775–805.
- [31] B. M. Olivera, J. Rivier, J. K. Scott, D. R. Hillyard, L. J. Cruz, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 22067–22070.
- [32] M. R. Plummer, D. E. Logothetis, D. Hess, *Neuron* 1989, 2, 1453–1463.
- [33] H. Glossmann, J. Striessnig, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1990, 114, 1–105.
- [34] J. L. Cruz, B. M. Olivera, *J. Biol. Chem.* 1986, 201, 6230–6233.
- [35] A. Grasso in *Neurotoxins in Neurochemistry* (Hrsg.: J. O. Dolly), Horwood, Chichester, 1988, S. 67–78.
- [36] M. Matteoli, C. Haimann, F. Torri-Tarelli, J. M. Polak, B. Ceccarelli, P. de Camilli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 7366–7370.
- [37] A. G. Petrenko, V. A. Kovalenko, O. G. Shamotienko, I. N. Surkova, T. A. Tarasyuk, Y. A. Ushkaryov, E. V. Grishin, *EMBO J.* 1990, 9, 2023–2027.
- [38] Y. A. Ushkaryov, A. G. Petrenko, M. Geppert, T. C. Südhof, *Science* 1992, 257, 50–56.
- [39] A. G. Petrenko, M. S. Perin, B. A. Davletov, Y. A. Ushkaryov, M. Geppert, T. C. Südhof, *Nature* 1991, 353, 65–68.
- [40] J. O. Dolly, *Handb. Exp. Pharmacol.* 1992, 102, 681–717.
- [41] J. O. Dolly, J. V. Halliwell, J. D. Black, R. S. William, A. Pelchen-Matthews, A. L. Breeze, F. Mehraban, I. B. Othman, A. R. Black, *J. Physiol. (Paris)* 1984, 79, 280–303.
- [42] F. Dreyer, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1990, 115, 93–136.
- [43] A. L. Breeze, J. O. Dolly, *Eur. J. Biochem.* 1989, 178, 771–778.
- [44] P. Rosenberg in *Neurotoxins in Neurochemistry* (Hrsg.: J. O. Dolly), Horwood, Chichester, 1988, S. 27–42.
- [45] H. H. Wellhöner, *Handb. Exp. Pharmacol.* 1992, 102, 357–417.
- [46] C. Montecucco, *Trends Biochem. Sci.* 1986, 11, 314–317.
- [47] B. Poulain, S. Mochida, M. Weller, B. Högy, E. Habermann, J. D. F. Wadsworth, C. C. Shone, J. O. Dolly, L. Tauc, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 9580–9585.
- [48] M. F. Schmid, J. P. Robinson, B. R. DasGupta, *Nature* 1993, 364, 827–830.
- [49] C. Montecucco, G. Schiavo, *Trends Biochem. Sci.* 1993, 18, 324–327.
- [50] G. Schiavo, F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. Polverino de Laureto, B. R. DasGupta, C. Montecucco, *Nature* 1992, 355, 832–834.
- [51] E. Link, L. Edelmann, J. H. Chou, T. Binz, S. Yamasaki, U. Eisel, M. Baumert, T. C. Südhof, H. Niemann, R. Jahn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 189, 1017–1023.
- [52] G. Schiavo, C. C. Shone, O. Rossetto, F. C. G. Alexander, C. Montecucco, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 11516–11519.
- [53] J. Blasi, *EMBO J.* 1993, 12, 4821–4828.
- [54] J. Blasi, E. R. Chapman, E. Link, T. Binz, S. Yamasaki, P. De Camilli, T. C. Südhof, H. Niemann, R. Jahn, *Nature* 1993, 365, 160–163.
- [55] S. W. Whiteheart, J. C. Griff, M. Brunner, D. O. Clary, T. Mayer, S. A. Buchrow, J. E. Rothman, *Nature* 1993, 362, 353–355.
- [56] T. Söllner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, J. E. Rothman, *Nature* 1993, 362, 318–324.
- [57] F. Hucho, *New Compr. Biochem.* 1994, 24, 3–14.
- [58] H. Betz, *Neuron* 1993, 5, 383–392.
- [59] a) H. Betz, *Angew. Chem.* 1985, 97, 363–368; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1985, 24, 365–370; b) C.-M. Becker, *Handb. Exp. Pharmacol.* 1992, 102, 539–575.
- [60] G. Grenningloh, A. Rienitz, B. Schmitt, C. Methfessel, M. Zensen, K. Beyreuther, E. D. Gundelfinger, H. Betz, *Nature* 1987, 328, 215–220.
- [61] F. Pfeiffer, D. Graham, H. Betz, *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 9389–9393.
- [62] D. Langosch, L. Thomas, H. Betz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 7394–7398.
- [63] D. Langosch, C.-M. Becker, H. Betz, *Eur. J. Biochem.* 1990, 194, 1–8.
- [64] J. Kirsch, D. Langosch, P. Prior, U. Z. Littauer, B. Schmitt, H. Betz, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 22242–22245.
- [65] P. Prior, B. Schmitt, G. Grenningloh, I. Pribilla, G. Multhaupt, K. Beyreuther, Y. Maulert, P. Werner, D. Langosch, J. Kirsch, H. Betz, *Neuron* 1992, 8, 1161–1170.
- [66] D. Graham, F. Pfeiffer, R. Simler, H. Betz, *Biochemistry* 1985, 24, 990–994.
- [67] D. Graham, F. Pfeiffer, H. Betz, *Eur. J. Biochem.* 1983, 131, 519–525.
- [68] J. C. Marvizón, J. Vazquez, M. García-Calvo, F. Mayor, Jr., A. Ruiz-Gómez, F. Valdviésco, J. Benavides, *Mol. Pharmacol.* 1986, 30, 590–597.
- [69] G. Grenningloh, V. Schmieden, P. Schofield, P. H. Seeburg, T. Siddique, T. K. Mohandas, C.-M. Becker, H. Betz, *EMBO J.* 1990, 9, 771–776.
- [70] G. Grenningloh, I. Pribilla, P. Prior, G. Multhaupt, K. Beyreuther, O. Taleb, H. Betz, *Neuron* 1990, 4, 963–970.
- [71] C.-M. Becker, W. Hoch, H. Betz, *EMBO J.* 1988, 7, 3717–3726.
- [72] J. Kuhse, V. Schmieden, H. Betz, *Neuron* 1990, 5, 867–873.
- [73] P. R. Schofield, M. G. Darlison, N. Fujita, D. R. Burt, F. A. Stephenson, H. Rodriguez, L. M. Rhee, J. Ramachandran, V. Reale, T. A. Glencone, P. H. Seeburg, E. A. Barnard, *Nature* 1987, 328, 221–227.
- [74] F. Hucho, *Handb. Exp. Pharmacol.* 1992, 102, 577–610.
- [75] E. S. Deneris, J. Conolly, S. W. Rogers, R. Duvoisin, *Trends Biochem. Sci.* 1991, 16, 34–40.
- [76] C. Bernard, *Leçon sur les Effets des Substances Toxiques et Medicamenteuses*, Beillière, Paris, 1857, S. 238–306.
- [77] C. C. Chang, C. Y. Lee, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1963, 144, 316–332.

- [78] J. Järvin, A. Rinken, *New Compr. Biochem.* **1994**, *24*, 199–220.
- [79] R. Olsen, J. C. Meunier, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* **1972**, *28*, 96–100.
- [80] J.-P. Changeux, *Mol. Pharmacol.* **1966**, *2*, 369–392.
- [81] A. Menez, J. L. Mongat, P. Fromageot, A. M. Ronseray, P. Boquet, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* **1971**, *17*, 333–338.
- [82] J. C. Meunier, R. W. Olsen, J.-P. Changeux, *FEBS Lett.* **1972**, *24*, 63–68.
- [83] D. Nachmansohn, *Harvey Lect.* **1955**, 57–99.
- [84] J.-P. Changeux, *Harvey Lect.* **1981**, 85–254.
- [85] F. Hucho, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *158*, 211–226.
- [86] T. Claudio in *Frontiers in Molecular Biology: Molecular Neurobiology Volume* (Hrsg.: D. M. Glover, B. C. Barnes), IRL, Oxford University Press, Oxford, **1989**, S. 63–142.
- [87] A. Karlin, *Harvey Lect.* **1991**, 71–107.
- [88] F. Hucho, *New Compr. Biochem.* **1994**, *24*, 113–135.
- [89] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, Y. Furutani, T. Hirose, M. Asai, S. Inayama, S. Numa, *Nature* **1982**, *299*, 793–797.
- [90] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, S. Kikyonari, Y. Furutani, T. Horose, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, S. Numa, *Nature* **1983**, *301*, 251–255.
- [91] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, S. Kikyonari, Y. Furutani, T. Horose, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, S. Numa, *Nature* **1983**, *302*, 528–532.
- [92] T. Claudio, M. Ballivet, J. Patrick, S. Heinemann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 1111–1115.
- [93] J. Finer-Moore, R. M. Stroud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 155–159.
- [94] M. A. Raftery, M. Hunkapiller, C. D. Strader, L. E. Hood, *Science* **1980**, *208*, 1454–1457.
- [95] A. Karlin, *J. Theor. Biol.* **1967**, *16*, 306–320.
- [96] J.-P. Changeux, A. Devillers-Thiéry, P. Chemouilli, *Science* **1984**, *225*, 1335–1345.
- [97] K. L. Swanson, E. X. Albuquerque, *Handb. Exp. Pharmacol.* **1992**, *102*, 611–658.
- [98] J. Giraudat, M. Dennis, T. Heidmann, J. Y. Chang, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2719–2723.
- [99] D. Neumann, D. Barchan, M. Horowitz, E. Kochva, S. Fuchs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7255–7259.
- [100] S. E. Pedersen, J. B. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2785–2789.
- [101] V. Tsetlin, K. Pluzhikov, A. Karelin, V. Ivanov in *Toxins as Tools in Neurochemistry* (Hrsg.: Yu. A. Ovchinnikov, F. Hucho), de Gruyter, Berlin, **1983**, S. 159–169.
- [102] H.-J. Kreienkamp, Yu. N. Utkin, C. Weise, J. Machold, V. Tsetlin, F. Hucho, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8239–8244.
- [103] R. R. Neubig, J. B. Cohen, *Biochemistry* **1979**, *18*, 5464–5475.
- [104] E. Kubalek, S. Ralston, J. Lindstrom, N. Unwin, *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 9–18.
- [105] B. Low, H. S. Preston, A. Sato, L. S. Rosen, J. E. Searl, A. D. Rudko, J. S. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 2991–2994.
- [106] D. Tsernoglou, G. A. Petsko, *FEBS Lett.* **1976**, *68*, 1–4.
- [107] R. A. Love, R. M. Stroud, *Protein Eng.* **1986**, *1*, 37–46.
- [108] R. C. Hider, A. F. Drake, F. Inagaki, R. J. P. Williams, T. Endo, T. Miyazawa, *J. Mol. Biol.* **1982**, *158*, 275–291.
- [109] A. P. Golovanov, A. L. Lomize, A. S. Arseniev, Yu. N. Utkin, V. I. Tsetlin, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 1213–1223.
- [110] B. Chatrenet, O. Tremeau, F. Bontems, M. P. Goeldner, C. G. Hirth, A. Menez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3378–3382.
- [111] E. X. Albuquerque, E. A. Barnard, T. H. Chun, A. J. Lapa, J. O. Dolly, S. E. Jansson, J. Daly, B. Witkop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 949–953.
- [112] T. Heidmann, R. E. Oswald, J.-P. Changeux, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3112–3127.
- [113] C. E. Spivak, E. X. Albuquerque, *Mol. Pharmacol.* **1985**, *27*, 246–255.
- [114] W. Oberthür, P. Muhn, H. Baumann, F. Lottspeich, B. Wittmann-Liebold, F. Hucho, *EMBO J.* **1986**, *5*, 1815–1819.
- [115] F. Hucho, W. Oberthür, F. Lottspeich, *FEBS Lett.* **1986**, *205*, 137–142.
- [116] F. Hucho, R. Hilgenfeld, *FEBS Lett.* **1989**, *257*, 17–23.
- [117] K. Imoto, C. Methfessel, B. Sakmann, M. Mishina, Y. Mori, T. Konno, K. Fukuda, M. Kurasaki, H. Bujo, Y. Fujita, S. Numa, *Nature* **1986**, *324*, 670–674.
- [118] J. A. Dani, *Trends Neurosci.* **1989**, *12*, 125–130.
- [119] J. Giraudat, M. Dennis, T. Heidmann, J. Y. Chang, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2719–2723.
- [120] F. Revah, D. Bertrand, J.-L. Galzi, A. Devillers-Thiéry, C. Mulle, N. Hussy, S. Bertrand, M. Ballivet, J.-P. Changeux, *Nature* **1991**, *353*, 846–849.
- [121] B. Ceccarelli, F. Valtorta, W. P. Hurlbut in *Cellular and Molecular Basis of Synaptic Transmission* (Hrsg.: H. Zimmermann), Springer, Berlin, **1988**, S. 55.
- [122] H. Zimmermann, W. Volknandt, B. Wittich, A. Hausinger, *J. Physiol. (Paris)* **1993**, *87*, 159–170.