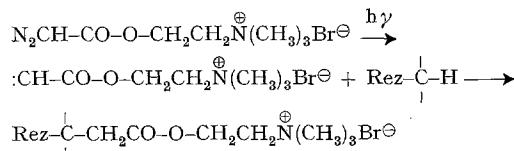


«Affinity Labelling» des cholinergischen Rezeptors der motorischen Endplatte mit Diazo-Acetylcholin

Unter verschiedenen spezifisch wirksamen Pharmaka, welche sich zur Untersuchung von Rezeptoren eignen, nimmt Acetylcholin eine Sonderstellung ein. Die starke cholinergische Wirkung wird jedoch durch die leichte Ablösung des Moleküles vom spezifischen cholinergischen Rezeptor und die Spaltung durch die Acetylcholinesterase rasch beendet. Für eine feste Markierung (affinity labeling) des Rezeptors muss das Acetylcholin eine reaktive Gruppe enthalten, welche mit der biologischen Struktur eine kovalente Bindung eingehet.

Zu diesem Zweck haben wir unter anderem die Verbindung Diazoacetylcholinbromid (DACH) verwendet. Sie wurde von J. FRANK und R. SCHWYZER¹ 1970 hergestellt und uns überlassen. Bei der photochemischen Bestrahlung mit einer Hg-Lampe sollte unter Abspaltung von Stickstoff ein reaktives Carben entstehen, um auf eine Rezeptor-CH-Bindung einwirken zu können.



Biologische Methoden. Die cholinergische Aktivität wurde mit Hilfe eines isolierten Nerv/Muskel-präparates (Phrenicus-Zwerchfellsektor der Maus) in einem 2 ml Bad (Krebs-Henseleit-Lösung, pH 7,4, 17°C, Oxycarbonbegasung) aus lichtdurchlässigem Plexiglas bestimmt. Der isolierte Nerv und der Muskel wurden alle 10 Sekunden abwechselungsweise mit Impulsen von 2, resp. 3 V und 0,01 Sek Dauer über Platinelektroden stimuliert. Die Muskelkontraktionen wurden über einen «strain gauge» Kuppler mit dem Offner Dynographen registriert. Nach Zusetzen der Versuchslösungen mit 0,1ml-Pipetten und vollem Wirkungseintritt während 5–10 min wurde das Präparat 1–3mal mit Krebs-Henseleit-Lösung gewaschen.

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Acetylcholinesterase (aus elektrischem Aal der Firma Sigma, Typ VI), wurde potentiometrisch bei pH 7,4, 25°C, unter Stickstoff-Begasung mit 0,01 n NaOH durchgeführt.

Resultate. Zugabe von DACH wirkt immer über Konzentrationen von 10^{-5} m depolarisierend auf die Endplatte: Die indirekt stimulierte Muskelkontraktion nimmt innerhalb von 10 min bis auf 0 ab, während der Grundtonus des Muskels ansteigt. Die direkt ausgelösten Muskelkontraktionen bleiben unverändert, das heisst nach Ausfall der Endplattenübertragung ist die Kontraktionsamplitude etwas vermindert.

Hohe Konzentrationen (5×10^{-5} – 2×10^{-4} m) lähmen die Endplatten innerhalb 1–2 min. Gleichzeitig kontrahiert sich der gesamte Muskel sehr stark und behält einen erhöhten Tonus. Auch nach 1–2 Stunden ist die direkt stimulierte Muskelkontraktionsamplitude kaum vermindert. Die Fusspunkte dagegen steigen nach 40-minütiger Einwirkung langsam an. Prostigminzusatz (10^{-6} m) verstärkt geringgradig den Lähmungseffekt, beeinflusst jedoch nicht die Erholung nach Auswaschen.

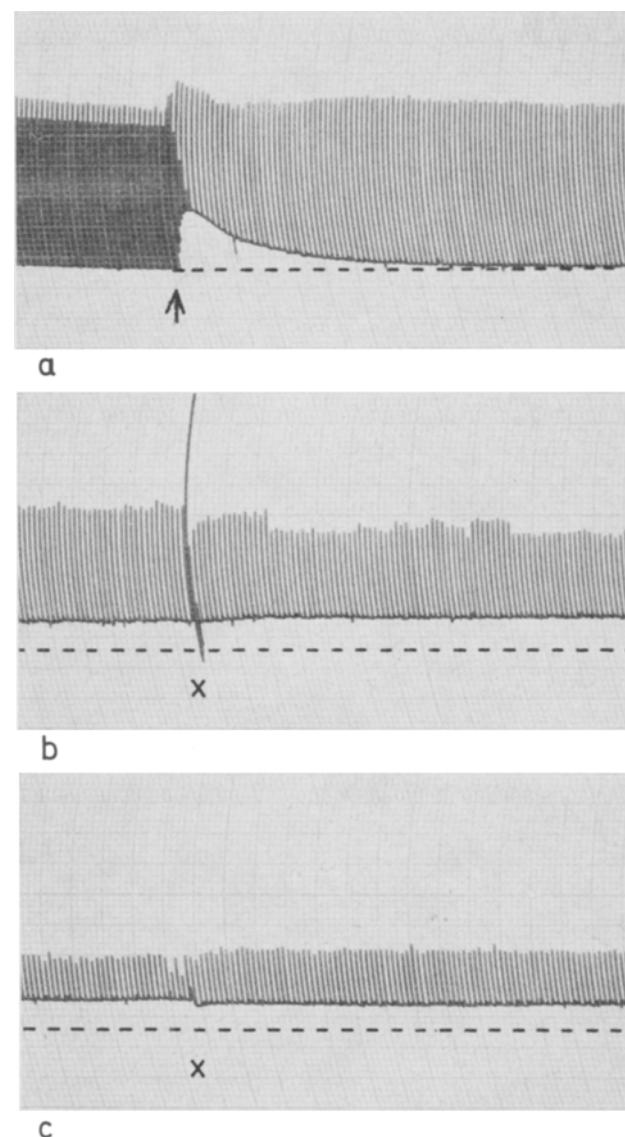
Die depolarisierende Wirkung von DACH wird nach kurzer (10 min) oder langer (300 min) Zeit der Einwirkung durch einmaliges Auswaschen langsam aufgehoben. Zweimaliges Auswaschen beschleunigt die Erholung der indirekten Reizung bedeutend. Der Zusatz von Prostigmin zur Waschlösung ist ohne Einwirkung.

Versuche unter Bestrahlung (Hg-Lampe mit und ohne Glasfilter (280 oder 366 nm)) während 60–180 min verstärken die Bindung des DACH an die Endplatten, besonders, wenn die Badlösung mit DACH alle 10 Min

erneuert wird. In einigen Fällen ist nach längerer Einwirkungszeit (>60 min) und Bestrahlung mit vollem Hg-Licht die indirekte Erregbarkeit durch mehrmaliges Auswaschen nicht wiederherzustellen. Allerdings kann sich der Lähmungszustand der Synapse ohne Badwechsel ändern, indem weitgehende Erholung der Überleitung von erneuter vollständiger Lähmung gefolgt wird. Lange

¹ J. FRANK und R. SCHWYZER, Experientia 26, (1970).

Diazo-Acetylcholin-Bromid ↑



a) Isoliertes Phrenicus-Diaphragma-Präparat im Muskelbad unter Bestrahlung mit Hg-Lampe. Abwechselnde Kontraktionen nach direkter Muskel- und indirekter Nerven-Reizung.

→, Zugabe von 2×10^{-4} M Diazoacetylcholinbromid macht Muskelkontraktur durch Depolarisation und 100% Endplattenlähmung (Ausfall der Muskelkontraktion bei indirekter Reizung über den Nerven).

b) Nach 100 min Grundtonus erhöht. X: Waschen mit Krebs-Henseleit-Lösung; Synapsenlähmung bleibt bestehen.

c) Nach 150 min Grundtonus weiterhin erhöht. X: Waschen; Lähmung bleibt bestehen.

Bestrahlung (> 120 min) hat in der Hälfte der Versuche einen schädigenden Einfluss auf die direkt stimulierten Muskelkontraktionen, deren Amplitude langsam abnimmt.

Die Acetylcholinesterase in Lösung wird durch 5×10^{-5} m DACH nicht gehemmt, aber mit 5×10^{-4} m DACH wird eine Hemmung im Vergleich zum Kontrollwert von 19% festgestellt. Andererseits wird DACH als Substrat weder von Serumcholinesterase (Pferd) noch von Acetylcholinesterase aus dem elektrischen Aal in 30 min hydrolysiert.

Diskussion. DACH blockiert die neuromuskuläre Überleitung durch Dauerdepolarisation der postsynaptischen Membran, was auch durch den synergistischen Effekt von Prostigmin durch die kurzdauernde Kontraktur und die langsame Steigerung des Muskeltonus deutlich wird. Die Acetylcholinesterase wird erst mit 50mal höherer Konzentration um etwa 20% gehemmt. Der cholinergische Rezeptor wird bevorzugt blockiert, was auch die unterschiedliche Lokalisation vom aktiven Enzymzentrum zeigt.

Unter Belichtung mit einer Hg-Lampe tritt durch Aktivierung des Moleküls zum Carben eine feste Bindung am Wirkungsort ein. Wir haben den Eindruck, dass das vom Plexiglas der Badkammer durchlässige Spektrum (10% des UV-Bereiches) die Bindung begünstigt und

dass für die Fixierung im biologischen Präparat der langwellige Teil nach Filterung mit Glas nicht genügt.

Die Bindung tritt nicht immer gleich stark ein entsprechend den experimentellen Schwierigkeiten einer Bestrahlung biologischer Präparate (Zwerchfelddicke 0.1 mm). Sie wird verbessert durch Badwechsel alle 10 min und nicht zu hohe Konzentrationen von DACH. Möglicherweise konkurriert die durch die Belichtung entstehende Metabolit (N-Methyl-Hydroxy-Acetylcholin) die Bindung an den Rezeptor.

Summary. Diazoacetylcholinebromide was used for affinity labelling of the cholinergic receptors of endplates in the mouse diaphragm. Under irradiation by light (Hg-high-pressure-lamp), irreversible depolarizing block of neuromuscular transmission developed. Acetylcholinesterase was influenced only by much higher concentrations, which demonstrates different localizations of the active enzyme center and the cholinergic receptor.

P. G. WASER, A. HOFMANN
und W. HOPFF

*Pharmakologisches Institut der Universität Zürich,
Gloriastrasse 32, CH-8006 Zürich (Schweiz),
20. August 1970.*

Halbdesmosome bei Phytoflagellaten

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Vertretern der Prasinophyceen (Chlorophyta) fanden wir Strukturen, die den Halbdesmosomen der Metazoen gleichen. Wir beobachteten diese Bildungen an Flagellaten,

die uns als *Platymonas tetrathele* (Nr. 161-2c) von der Sammlung von Algenkulturen am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen und als *Tetraselmis tetrathele* (Nr. 39936) von der Abteilung Protophytenkunde des Botanischen Instituts der Universität Marburg überlassen wurden. Beide Formen sind einander sehr ähnlich. Sie wurden mit OsO_4 oder Glutaraldehyd/ OsO_4 fixiert und in Epon eingebettet.

Platymonas hat eine Theca, die durch die Zusammenlagerung kleiner, im Golgi-Apparat gebildeter Schuppen entsteht¹. Die 4 Geisseln entspringen in einer Grube (Figur 1). Hier trägt die Theca feine, perlschnurartige

¹ J. MANTON und M. PARKE, J. mar. biol. Ass. UK 45, 743 (1965).

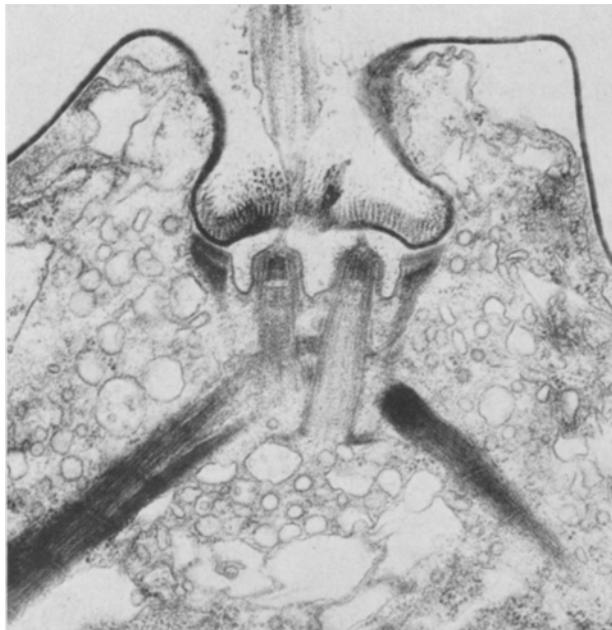


Fig. 1. Längsschnitt durch zwei Geisselbasen (eine Geissel ganz, die andere fast abgeworfen) mit Strukturen der Geisselwurzel. Links und rechts von den Geisselstümpfen hängen an den «Halbdesmosomen» Plasmalemma und Theca fest zusammen; die «Tonofibrillen» ziehen zur Mitte der Geisselbasis. $\times 30,000$.

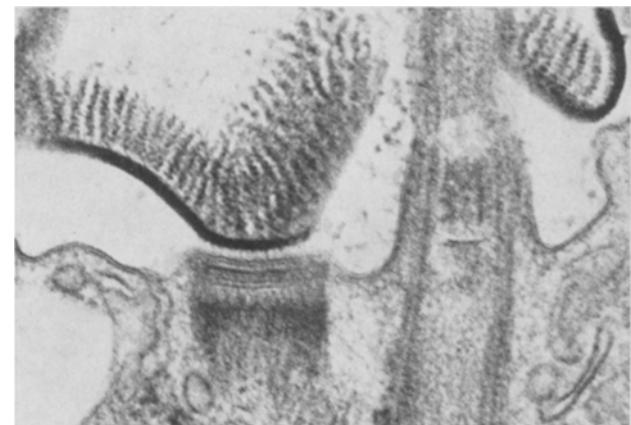


Fig. 2. An einem Halbdesmosom (links von der Geissel) mit deutlich dargestellter Endplatte sind Plasmalemma und Theca fest verbunden; von der Tonofibrille ist nur der obere Teil abgebildet. $\times 70,000$.