Cholinerge Pharmakon-Rezeptoren

Peter Gaudenz Waser

Umschlagbild:

Acetylcholin-Rezeptoren in Membranfragmenten des elektrischen Organs des Zitterrochens *(Torpedo californica).* Elektronenmikroskopische Aufnahme mit hoher Auflösung, verstärkt durch Phasenmittelung mit Computer.
Wenn kleine Münzen oder Knöpfe (∅ 10 mm) auf die abgebildeten Poren gelegt werden, entsteht das Bild einer mit Curaremolekülen (siehe Bild 21) besetzten postsynaptischen Membran.
Vergrösserung ~ 5 000 000fach
Kontrastfärbung: Uranylacetat
(M.J. Ross et al., 1977)
Struktur des Acetylcholins, bestimmt mit Röntgenbeugungsanalyse (R.W. Baker et al., 1971).
Vergrösserung: ~ 100 000 000fach. Eine 20fache Verkleinerung der Acetylcholinstruktur erlaubt einen direkten Grössenvergleich zwischen Molekül und abgebildetem Rezeptorkomplex.

Figure on *frontispiece:*

Acetylcholine receptors in membrane fragments of electric organs *(Torpedo californica).* Electron-micrograph with high resolution, enhanced by phase averaging with computer.
When small coins or buttons (∅ 10 mm) are placed on the pores in this figure, a picture illustrating how the curare molecules (see fig. 21) sit on the postsynaptic membrane is produced.
Magnification ~ 5 000 000-fold
Contrast staining: Uranyl acetate
(M.J. Ross et al., 1977)
Structure of Acetylcholine determined by X-ray diffraction (R.W. Baker et al., 1971).
Magnification: ~ 100 000 000-fold. A 20-fold reduction of the structure of acetylcholine permits the direct comparison of molecule with the pictured receptor complex.

NEUJAHRSBLATT

herausgegeben von der

Naturforschenden Gesellschaft in Zürich

auf das Jahr 1983

185. Stück

1983

Orell Füssli Graphische Betriebe AG Zürich

Veröffentlichung
der
Naturforschenden Gesellschaft in Zürich
im Anschluss an den Jahrgang 127 der
Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich
als Heft Nummer 5

Redaktion: Prof. Dr. H. H. Bosshard, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich,
Schmelzbergstrasse 25, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich

Ausgegeben am 31. Dezember 1982

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit Quellenangabe gestattet

Cholinerge Pharmakon-Rezeptoren

PETER GAUDENZ WASER

Pharmakologisches Institut der Universität Zürich

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 5

2 Geschichte der Rezeptorforschung 6
2.1 Ehrlichs Seitenketten 6
2.2 Nikotin, Curare und Rezeptoren 7
2.3 Anfang der Chemotherapie 9
2.4 Cholinesterasen und Physostigmin 10

3 Das moderne Konzept der Pharmakonrezeptoren 12
3.1 Molekularvorgänge und Kinetik 13
3.2 Der Lebenslauf von Rezeptoren 14
3.3 Sensibilität der Rezeptoren 15
3.4 Charakteristische Eigenschaften der Rezeptoren 16
3.5 Struktur und Wirkung cholinerger Agonisten 17
3.6 Konformation der Agonisten, Bindungsenergie und Aktivierung des Rezeptors 23
3.7 Molekülform und Grösse von Antagonisten 26

4 Cholinerge Synapsen; nikotinisch cholinerge Rezeptoren (nAChR) . 28
4.1 Morphologie, Strukturen und Funktionen des nikotinisch cholinergen Rezeptors (nAChR) 29
4.2 Radioaktive, curarisierende und depolarisierende Verbindungen . . 34
4.3 Acetylcholinesterase (AChE) 40
4.4 Das erste Porenmodell der Membran-Rezeptoren 43
4.5 Affinitätsmarkierung des nAChR 45
4.6 Biochemische Isolierung und molekulare Strukturaufklärung des nAChR 48
4.7 Isolierung mit Affinitätschromatographie-Säulen 52

5 Muscarinisch cholinerge Rezeptoren (mAChR) 60
5.1 Morphologie der muscarinischen Synapse und Struktur des Rezeptors 60
5.2 Affinitätsmarkierung und Funktion des mAChR 62
5.3 Biochemische Isolierung 65

6 Cholinerge Rezeptoren und Krankheiten 67
6.1 «Massgeschneiderte» Medikamente 67
6.2 Funktionelle Störungen der Cholinesterasen 68
6.3 Anomale Rezeptoren 69

7 Schlussbetrachtungen 71

8 Zusammenfassung 72

9 Summary 73

10 Literatur 75

11 Liste der Abkürzungen 83

1 Einleitung

Biologie und Medizin haben in den letzten Jahrzehnten gewaltige Fortschritte in der Erkenntnis elementarer Lebensvorgänge gemacht. Diese Wissenschaften wagten sich von der zellulären Struktur in die molekularen Bereiche hinein. Mit Hilfe der technisch-methodischen Entwicklungen in den grundlegenden Naturwissenschaften Physik und Chemie wurde eine Vielzahl von detaillierten Beobachtungen gewonnen.

Da biologische Systeme vielfältig und durch die gleichzeitige Überlagerung vieler verschiedener Funktionen schwer verständlich sind, braucht der Erkenntnisweg viel mehr Zeit, Forschungsaufwand, Geduld, Kontrollen, Korrekturen, als dies bei den Grundlagenwissenschaften der Fall ist. Lebensvorgänge laufen nicht mit der gleichen Regelmässigkeit – oder Wahrscheinlichkeit – ab, wie dies physikalische Vorgänge tun. Biologische Regelsysteme haben eine so grosse Bedeutung für die Sicherung der Funktionen und damit die Erhaltung des Lebens, dass sie jeden experimentellen Eingriff behindern und ihren Ablauf verschleiern. So dienen oft Modellsysteme mit all ihren Vor- und Nachteilen zur Abklärung einer biologischen Funktion. Aber auch hier gilt, wie bei allen Naturwissenschaften, dass neben der Betrachtung der gesamten biologischen Maschine nur die Kenntnis vom Ablauf am einzelnen Bestandteil und dessen Eigenschaften zum Verständnis des Ganzen führt. Der Forscher muss also nach der Beobachtung ein bedeutungsvolles biologisches Phänomen in einem möglichst einfachen System ungestört untersuchen. Er nimmt dazu das System schrittweise auseinander, bis er alle Bestandteile kennt, um den Organismus dann in einer vereinfachten Form wieder aufzubauen. Danach sollten die beobachteten Einzelfunktionen – ähnlich wie im ursprünglichen Naturzustand des untersuchten Systems – wieder auftreten.

Die Erforschung der Pharmakon-Rezeptoren geht diesen gleichen Weg. Wie wirken Medikamente, Hormone, toxische Stoffe? Von der phänomenologischen Beschreibung der Wirkung, d. h. der äusserlich erkennbaren Veränderung, wurde immer tiefer nach den Ursachen in Organen und Zellen geforscht. Heute ist man auf der Stufe der molekularen Strukturen (Membranen, Enzyme, kontraktile Proteine, Nukleinsäuren usw.) angelangt und sucht nach den Folgen der direkten Einflüsse durch Wirkstoffe.

Molekulare Biologie, Biochemie, Elektrophysiologie und Elektronenmikroskopie sind heute die Grundpfeiler dieser Forschung. Sie erfolgt mit der gleichen Strategie wie die molekulare Genetik. Hier stehen jedoch der Bau und die zahlreichen funktionellen Einheiten der Membran im Vordergrund des Interesses. Dazu gehören die für die Wirkung von Pharmaka, Neurotransmittoren und für Hormone verantwortlichen Rezeptoren. Über diese soll hier berichtet werden, da ihre Bedeutung für physiologische und pathologische Zustände wie auch für die Therapie immer wesentlicher wird.

In Zürich haben seit den fünfziger Jahren bedeutende Naturforscher (Biologen, Chemiker, Neurophysiologen, Molekularbiologen, Pharmakologen) an

Rezeptorproblemen gearbeitet und wichtige Beiträge geliefert. Ihnen, besonders meinen Kollegen, Mitarbeitern und Freunden, sei dieser Beitrag gewidmet.

Wir danken auch dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für seine langjährige Unterstützung der hier aufgeführten Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der molekularen Pharmakologie.

2 Geschichte der Rezeptorforschung

Die Geschichte der Pharmakon-Rezeptoren ist nicht alt – sicherlich jünger als die erste Synthese von Medikamenten, wie z. B. Aspirin, Pyramidon und Veronal. Während die Vorstellung vom atomaren Aufbau der Materie schon in der griechischen Philosophie erwogen wurde, ist die Idee vom Zusammenhang zwischen der spezifischen Wirkung von Substanzen und der biologischen Struktur von Zellrezeptoren erst in der Neuzeit aufgetaucht.

Die Rezeptortheorie ist ein Kind der modernen Biologie, die nach der Jahrhundertwende zusammen mit der raschen Entwicklung der organischen Chemie, später der Biochemie, der Histologie und der Immunologie gemeinsam immer grössere Anteile der Naturwissenschaften eroberte. Von einer Hypothese ausgehend ist die Existenz der Rezeptoren heute zur Gewissheit geworden. Sie ist für das Verständnis der Pharmakonwirkung und für die Entwicklung neuer Medikamente mit spezifischer, starker Wirkung unerlässlich.

Zwei Forscher von Weltruf werden als Entdecker der Rezeptoren genannt: John Neuport Langley (1852–1925) und Paul Ehrlich (1854–1915). Aber schon vor ihnen nahmen zwei englische Pharmakologen (Thomas Fraser und Thomas Lander Brunton) an, dass die Wirkung eines Medikamentes auf einer chemischen Interaktion mit einem Zellbestandteil beruhe. Der Engländer J. N. Langley, Physiologe in Cambridge, erklärte 1878 den Antagonismus zwischen Atropin und Pilocarpin durch Kompetition an einer spezifischen Struktur oder Substanz in der Nerven- oder Drüsenzelle derart, dass die relative Masse der zwei Moleküle und ihre Affinität wichtige Faktoren sein müssten. Erst viel später beschäftigte ihn die Idee, dass bei der Einwirkung von Nikotin oder Curare auf Muskelzellen eine spezifische rezeptive Zellsubstanz für die selektive Wirkung dieser Alkaloide verantwortlich sei (J. N. Langley, 1905, 1906).

2.1 Ehrlichs Seitenketten

Der Deutsche Paul Ehrlich, bekannt für die Synthese des Salvarsans (1907, 1909, 1910), arbeitete zuerst an histologischen Färbemethoden. Er untersuchte die Bindung eines Farbstoffes an die chemischen Seitenketten des Protoplas-

mas, die auch für die Neutralisierung der Toxine verantwortlich wären (1900). Die stöchiometrische Interaktion konnte nur durch chemische Bindung erklärt werden, wobei die freien Seitenketten der Aminosäuren auch bei gelösten Proteinen (Antikörper) Reaktionspartner wären. Toxine würden über haptophore Gruppen an die rezeptiven Zellen gebunden und ihre Wirkung über die freien toxophoren Gruppen verursachen, also eine ganz ähnliche Vorstellung wie für die histologische Gewebefärbung. Ehrlich wagte jedoch noch nicht, die gleichen Gedanken auf die Arzneimittelwirkung anzuwenden, da ja Medikamente sehr leicht aus dem Gewebe auswaschbar sind und entgegen den Toxinen nicht fest gebunden werden. Vielleicht waren sie in der Zelle mit nicht «eigentlich lebenden Teilen» instabil verbunden? Entsprechend den Lackfarben auf Stoffen müsste man dann annehmen, dass gewisse Zellen chemische Stoffe abgeben, welche Farbstoffe präzipitieren und fixieren. Der Gedanke einer chemischen Interaktion zwischen Medikament und Zellrezeptoren ohne feste kovalente oder ionische Bindung war noch nicht akzeptiert. Die Wirkung wurde mehr physiko-chemischen Moleküleigenschaften als spezifischen Bindungsstellen der Zellen zugeschrieben. Erst 1907 war P. Ehrlich auf Grund der Publikationen von J. N. Langley bereit, Chemorezeptoren an den Zellen als Angriffspunkte der Pharmaka anzuerkennen.

Bei seinen ersten Versuchen zur Entwicklung neuer Chemotherapeutica beschrieb er die Wirkung von Arsenophenylglycin auf Trypanosomen sehr bildhaft mit den folgenden Worten: «Der Arzneistoff wird gewissermassen in seinen verschiedenen Gruppierungen sukzessive von besonderen Fängen des Protoplasmas gefesselt, gleich wie ein Schmetterling, dessen einzelne Teile mit verschiedenen Nadeln fixiert werden. Genau wie der Schmetterling erst an dem Rumpf und dann sukzessive an den Flügeln aufgespannt wird, gilt das auch von den komplizierter gebauten Arzneisubstanzen. Auch hier können wir häufig eine Gruppierung experimentell festlegen, die die primäre Verankerung vermittelt. Eine solche Gruppe ist das primäre Haptophor, die andern werden die sekundären Haptophore genannt.»

2.2 Nikotin, Curare und Rezeptoren

Wie die konkrete Vorstellung eines hypothetischen Mechanismus in den Naturwissenschaften meistens zu sachlichem, logischem Denken mit entsprechenden Fragen und Beweisen führt, hat diese Beschreibung einer Medikament-Interaktion den ersten Schritt zur Annahme einer Rezeptorstelle auch an Zellmembranen der Gewebe bedeutet. So konnte J. N. Langley zeigen, dass Nikotin nicht über Nervenfasern den Muskel zur Kontraktion brachte, sondern auch beim denervierten Muskel anscheinend direkt auf die Muskelfaser wirkte. Curare war ebenfalls direkt wirksam, auch als Antagonist von Nikotin. Langley musste annehmen, dass der Antagonismus zwischen Nikotin und Curare durch Kompetition an der gleichen protoplasmatischen Substanz erfolgt. Kontraktion nach direkter Stimulierung des Muskels wurde durch diese Stof-

fe nicht verhindert; so konnte gezeigt werden, dass der kontraktile Apparat der Muskelfaser durch diese Stoffe nicht beeinflusst wurde.

Die Wirkung von Curare war schon 1857 von Claude Bernard in seinem Buch «Leçons sur les effects des substances toxiques et médicamenteuses» beschrieben worden. Mit einer einfachen Versuchstechnik konnte er demonstrieren, dass dieses Pfeilgift bei einem durch Curare gelähmten Frosch ein Bein mit unterbundener Blutzufuhr nicht lähmte, so dass ein Nervenreiz immer noch eine Muskelzuckung auslöste. Wurde ein isoliertes Nervmuskelpräparat in eine Curarelösung gebracht, in die entweder der N.ischiadicus oder der Muskel eingetaucht waren, konnte eine Lähmung nur beim Muskelbadpräparat, nicht aber beim Nerven festgestellt werden (Bild 1). Zudem blieb der curarisierte Muskel auf muskuläre elektrische Reizung erregbar. A. Kölliker, ein Schweizer Physiologe in Würzburg, hatte 1856 einen sehr ähnlichen Ver-

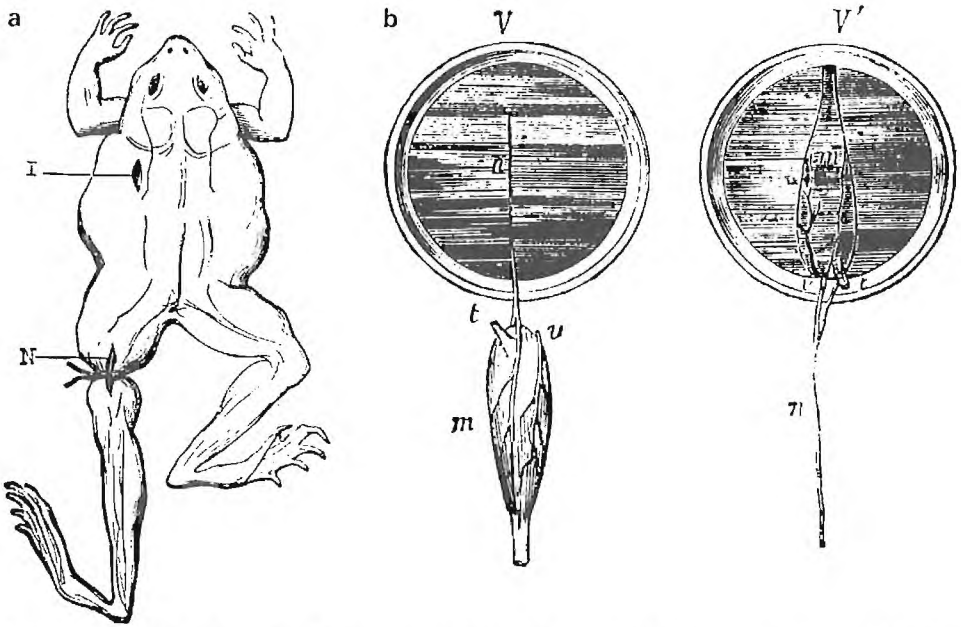


Bild 1: *a*, Claude Bernards Froschversuch, bei welchem ein Bein unter Auslassung des N. ischiadicus (N) ligiert und ein Stück Curare unter die Rückenhaut implantiert (I) wurde. *b*, Versuch mit dem Nervmuskelpräparat, bei dem der N. ischiadicus (n) oder der M. gastrocnemius (m) in die curarehaltige Badlösung eingetaucht wurde. Wenn der M. gastrocnemius curarisiert war, folgte dem Nervenreiz keine Kontraktion, dagegen blieb dieser auf direkte elektrische Reizung erregbar.

Fig. 1: *a*, Claude Bernard's experiment with the ligated leg of a frog, the sciatic nerve (N) remaining free, and implantation (I) of a piece of curare under the dorsal skin. *b*, Experiment with isolated nerve-muscle preparation. N. ischiadicus (n) or M. gastrocnemius (m) in a bath containing curarine. The curarized muscle was not contracting after nerve stimulation but remained excitable for direct electrical stimulation.

such gemacht, der zum gleichen Resultat führte. Claude Bernard war über diese unabhängig erhaltenen Resultate sehr befriedigt und schloss daraus, dass der Wirkungsort von Curare an der myoneuronalen Verbindungsstelle liegen müsse, was hundert Jahre später durch autoradiographischen Nachweis von radioaktiven Curaremolekülen in den Muskelendplatten direkt bewiesen wurde (P.G. Waser, U. Lüthi, 1956, 1957). Damit war nachgewiesen, dass die Rezeptorsubstanz der Muskelendplatte angehört und von verschiedenen Stoffen oder Giften in ihrer Funktion beeinflusst wird.

J. N. Langley nahm weiter an, dass auch andere Pharmaka über spezifische Rezeptoren wirken würden, die vielleicht als Seitenketten der Membranen oder der kontraktilen Substanz vorhanden wären.

2.3 Anfang der Chemotherapie

Wieder anhand der Trypanosomen beschrieb P. Ehrlich (1909) die Resistenzentwicklung dieser Erreger gegenüber einer Gruppe von Chemotherapeutica, während gegenüber anderen Stoffen die Empfindlichkeit weiter vorhanden war. Diesen Befund konnte er nur mit der Annahme verschiedener Rezeptoren erklären, die auf die einzelnen chemischen Wirkungsgruppen spezifisch reagierten. Damit ein Chemotherapeuticum hochwirksam und wenig toxisch sei, müsse man eine hohe Affinität für die Chemorezeptoren der Parasiten und eine tiefe Affinität für diejenigen der Gastzellen erreichen. Mit Salvarsan gelang Ehrlich dann der erste gezielte Erfolg gegen die Spirochaeten der Syphilis (1909). Die gute Wirksamkeit erklärte er mit Hilfe seiner immunologischen Versuche, aus denen er schloss, dass ein Wirkstoff zuerst durch die haptophoren Gruppen gebunden werde und dann über die toxophoren Gruppen wirke: «Wenn Spirochaeten mit Salvarsan vergiftet werden, erfolgen mindestens zwei verschiedene Bindungen. Zuerst wird die O-Aminophenol-Gruppe des Salvarsans an den Parasiten gebunden. Dann kann das 3-wertige Arsenradikal mit dem Arsenoceptor der Zelle binden und seinen toxischen Effekt ausüben.»

Die Rezeptorentheorie hat in der Pharmakologie zu Beginn weniger Interesse erweckt als in der Immunologie. Dafür dürften mehrere Gründe verantwortlich sein. Einesteils war die Pharmakologie wie auch andere biologische Wissenschaften, z. B. die Genetik zu Beginn des Jahrhunderts, noch nicht so weit entwickelt, eine Theorie anzunehmen, deren Grundlagen auf molekularen Mechanismen beruhte. Versuchstechnik und Apparate mit entsprechender Messgenauigkeit und Empfindlichkeit fehlten und wurden erst im Zeitalter der Elektronik entwickelt. Einzig A.J. Clark (1933) und später J.H. Gaddum (1937) interessierten sich für die quantitativen Verhältnisse zwischen Dosis und Wirkung auf spezifische Rezeptoren in isolierten Organen. Immerhin zeigten diese einfachen Versuche mengenabhängige Gesetzmässigkeiten, die bei chemischen Reaktionen in vitro gültig sind und auf eine molekulare Interaktion hinwiesen.

Damals waren Rezeptoren weder gesehen noch isoliert worden. Vielmehr herrschte die Meinung nach einer von W. Straub entwickelten «Potentialtheorie» vor, dass die Pharmakonwirkung, beispielsweise des Muscarins, durch das Diffusionsgefälle zwischen Aussen- und Innenseite der Zellmembran ausgelöst werde; dies sogar in beiden Richtungen, da auch beim Auswaschen eines Organpräparates eine Wirkung wie beim Eindringen beobachtet wurde. Die Potentialgiftwirkung würde durch eine unspezifische physikalische Verschiebung von Molekülen durch Membranen verursacht, was jedoch gerade für Muscarin, einem stark polar geladenen Molekül, kaum möglich ist. Auch diese cholinerge Verbindung besetzt Membranrezeptoren (P.G. Waser, 1961) und ist nach langer Einwirkungszeit beim Auswaschen sofort wirkungslos. So musste man annehmen, dass kationisch geladene Moleküle, wie auch Acetylcholin, an der Membranaussenseite der Zellen wirken und dort Rezeptoren besetzen. Sie wären mit ihren hydrophilen Gruppen auch kaum imstande, durch die lipoproteinhaltigen Membranen in die Zellen einzudringen, deren Fettgehalt schon seit der Narkosetheorie von E. Overton (1895, 1896, 1901) besonders für die nervösen Gewebe bekannt war. E. Overton untersuchte die Einflüsse von Narcotica und Pharmaka, wie Coffein, Nikotin, Morphin, Atropin auf Pflanzenzellen mit einer osmometrischen Methode. Er erklärte ihre Aufnahme in die Zelle durch Bindung an verschiedene Proteine im Zytoplasma, ohne damit spezifische Rezeptoren zu beschreiben. Doch würden grosse Moleküle wie Atropin, Curare oder gar Peptide, z. B. Botulinustoxin, bei ihrem raschen Wirkungseintritt wohl kaum in die Zellen eindringen.

Ein besonders instruktives Beispiel zu Gunsten der Rezeptortheorie an Membranen war die atropinartige Wirkung von Methylenblau auf das isolierte Froschherz. Sie tritt schon ein, wenn nur die Oberfläche der Muskelzellen mit der Substanz in Kontakt kommt, während sich das Muskelgewebe nur langsam durch die Diffusion des Farbstoffes blau färbt. Die Wirkung verschwindet beim Auswaschen, doch bleibt die Blaufärbung des Muskels bestehen. Mit Amöben wurde gezeigt, dass verschiedene Stoffe wie Butyl- oder Octylalkohol, Blausäure und Schwefelwasserstofflösungen nur von aussen auf diese Einzeller wirken, aber bei gleicher Konzentration ins Zellinnere injiziert unwirksam sind.

2.4 Cholinesterasen und Physostigmin

Für das Verständnis der Rezeptoren als Bindungsstellen von Pharmaka war die Entdeckung des Wirkungsmechanismus von Physostigmin entscheidend (O. Loewi, G. Mansfeld, 1910). Es war schon lange bekannt, dass Acetylcholin durch dieses Alkaloid in seiner Wirkung potenziert wird (R. Hunt, 1915), und H. Dale vermutete (1914), dass die verkürzte Wirkung des Acetylcholins auf Herz und Gefässe durch eine Esterase bewirkt werde. Otto Loewi (1921, O. Loewi und E. Navratil, 1926) gelang der endgültige Nachweis des neurohumoralen Überträgerstoffes, des sogenannten Vagusstoffes im Froschherz-

perfusat. Dieser wurde entsprechend dem bereits bekannten Acetylcholin rasch gespalten, es sei denn, Physostigmin war der Perfusionslösung zugesetzt. Seither wurden Anticholinesterasestoffe, auch synthetische wie z. B. Neostigmin, in vielen Versuchen zur Identifizierung von Spuren von Acetylcholin verwendet (T. Koppanyi, A.G. Karczmar, 1948; W. Hopff, G. Riggio, P.G. Waser, 1973, 1975). Doch konnte die molekulare Interaktion zwischen Hemmstoff und Enzym erst später, nach Reinigung der Cholinesterasen, in vitro eingehend untersucht werden. Man fand nämlich zwei Enzyme: erstens ein Enzym, das in den Körperflüssigkeiten gelöst vorkommt und die Hydrolyse vieler, verschiedener Ester katalysiert. Dieses Enzym ist nicht einheitlich und kann bei bestimmten Menschen vollständig fehlen. Seine physiologische Bedeutung ist bis heute nicht bekannt. Es wurde als Cholinesterase oder genauer als Acylcholin Acyl-Hydrolase (EC 3.1.1.8) klassiert. In der Literatur finden wir es auch unter verschiedenen anderen Namen, wie Serumesterase, unspezifische Cholinesterase, oder gar Procainesterase und Butyrylcholinesterase.

Vollständig davon verschieden ist das spezifische Enzym, die Acetylcholinesterase oder Acetylcholin Acetyl-Hydrolase (EC 3.1.1.7). Die Acetylcholinesterase ist in den synaptischen Membranen gebunden und absolut lebensnotwendig. Sie katalysiert sehr spezifisch praktisch nur die Hydrolyse von Acetylcholin und einiger, chemisch sehr nahe verwandter Ester und entspricht damit einem sehr hoch differenzierten Enzym. Es ist interessant zu wissen, dass dieses Enzym auch in der Erythrocytenmembran gebunden und gelöst im Sekret giftiger Schlangen vorkommt.

Im Prinzip wäre die aktive Stelle des Enzyms ein Rezeptor und historisch gesehen hat man lange geglaubt, dass die aktive Stelle des Enzyms und der «cholinerge Rezeptor» eine Einheit seien. Dafür waren besonders die Elektrophysiologen verantwortlich. Sie konnten sich schwer vorstellen, dass in den Sekundenbruchteilen, in denen Freisetzung, Stimulation und Abbau von Acetylcholin vor sich gehen sollte, das Substrat zuerst den Rezeptor erregt und dann in die aktive Stelle der Acetylcholinesterase hineindiffundiert. Die Pharmakologen hingegen, welche mit den hochspezifischen Wirkungen von Curare und den anticholinesteratisch wirkenden «Stigminen», z. B. Neostigmin, vertraut waren, forderten einen cholinergen Rezeptor, der von der aktiven Stelle der Acetylcholinesterase verschieden war. Entsprechende Untersuchungen mit histoautoradiographischer Technik ergaben verschiedene Verteilung und unterschiedliches Verhalten, besonders nach Denervierung, der beiden Bindungsstellen (P. G. Waser, 1958, 1959; P. Truog, P. G. Waser, 1970). Heute hat man beide Proteine getrennt isoliert und durch immunologische Kreuzreaktionen und biochemische Analyse feststellen können, dass es sich tatsächlich um zwei verschiedene Proteine handelt (siehe Tabellen 4 und 5).

Nachdem gezeigt war, dass Anticholinesterasestoffe eine hochspezifische Stelle im aktiven Zentrum des Enzyms besetzen und dessen katalytische Wirkung auf die Hydrolyse des Acetylcholins verhindern, stellte sich die Frage,

ob nicht viele Wirkstoffe spezifische Stellen an Zellbestandteilen besetzen und sie stimulieren oder blockieren, d. h. ob Pharmakonrezeptoren nicht ähnlich wie ein Coenzym oder aktive Enzymzentren organisiert sind.

3 Das moderne Konzept der Pharmakonrezeptoren

Ein Rezeptor ist ein Teil eines Biopolymeren (M. Calvin, 1974), z. B. eines Proteins, Lipoproteins, Glykoproteins, Phospholipids, einer Nucleinsäure oder eines Polysaccharids, in welchem er die Funktion eines Diskriminators für die Bindung von Wirkungsmolekülen übernimmt. So können diese Stoffe (Agonisten/Antagonisten) durch physiko-chemische Bindungen auf die Struktur der Biopolymere und ihre Funktion in der Zelle einwirken. Bei einem Enzym ist diese Wirkung sehr leicht zu verstehen, da das aktive Zentrum, eventuell ein Coenzym, in seiner metabolischen Leistung beeinflusst wird. Diese Wirkung kann auch relativ einfach und mit grosser Genauigkeit in vitro verfolgt werden, indem man die mit einer bestimmten Kinetik entstehenden charakteristischen Metaboliten nachweist.

Befindet sich der Rezeptor jedoch auf oder in einer Membran, also in einem komplexen System von Biopolymeren, so ist es viel schwieriger, diese Wirkung zu verstehen und mit den zur Verfügung stehenden Methoden zu messen, da in diesem Fall meistens keine Metaboliten entstehen. Man stellt sich vor, dass zwischen Rezeptor und Effektor eine Kopplung besteht, die die Einwirkung der Wirkstoffmoleküle weitermeldet und über eine Kaskade von Veränderungen – vielleicht in mehreren anderen Makromolekülen der Struktureinheit – eine physiologische Antwort auslöst. Erst diese letztere können wir wieder mit einfachen pharmakologischen Methoden messen, z. B. als Muskelkontraktion oder als Sekretion einer Drüsenzelle. Wenn auch der letzte Übertragungsmechanismus dieser Reihe von Ereignissen anscheinend häufig mit Hilfe von freigesetzten Calciumionen stattfindet, liegen viele Stufen dazwischen im Dunkeln. In Analogie zur Enzym-Substrat-Interaktion wird angenommen, dass die Besetzung des Rezeptors durch einen Agonisten eine Konformationsänderung verursacht, die als Signal weitergegeben wird, oder ein Gleichgewicht in der Zelle, z. B. das der Elektrolytionen, verändert. Es könnten so andere Enzyme oder Mechanismen des Membrantransportes aktiviert werden. Die Entdeckung allosterischer Effekte hat gerade für solche Vorgänge das Verständnis erleichert, da sie die Übertragung von Signalen über Distanzen von Makromolekülen erklärbar macht.

So wäre der Diskriminator zur Bindung des Agonisten nur ein Teil (Apo-Rezeptor) eines grösseren Rezeptorkomplexes (Holo-Rezeptor) mit verschiedenen Untereinheiten (R. Schwyzer, 1974, R. Schwyzer, G. Karlaganis, U. Lang, 1980). Ein ruhendes System wird durch die Agonistenmoleküle angestossen, wodurch ein Signal ausgelöst und bis zum eigentlichen Effektor weitergegeben wird.

3.1 Molekularvorgänge und Kinetik

In einfacher Formelsprache ausgedrückt, folgt die Bindungsreaktion dem Massenwirkungsgesetz (Bild 2). Der erste Schritt der Agonisten-Bindung geschieht viel rascher als die folgende Aktivierung des Rezeptors. Die Assoziationskonstante gibt den Anteil der an den Rezeptor gebundenen Moleküle an, welcher dem Verhältnis der pro Zeiteinheit sich bildenden und wieder zerfallenden Komplexe entspricht. Sie ist ein Mass für die Affinität eines Liganden und entspricht dem reziproken Wert der Dissoziationskonstanten. Wenn ein Medikament in Wirkung tritt, nähert sich der Anteil der besetzten Rezeptorstellen dem Gleichgewichtswert entsprechend einer einfachen exponentiellen Kurve. Die Zeitkonstante τ dieser Exponentialkurve hängt vom reziproken Wert der Summe der beiden Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und der Dissoziation für eine bestimmte Molekülkonzentration ab (Bild 2). Wird

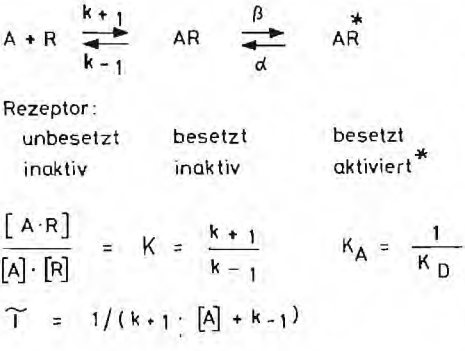


Bild 2: Agonisten (A) besetzen die Rezeptoren (R) und bilden Agonisten-Rezeptor-Komplexe (AR), die später aktiviert (*) werden. k_{+1}, Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (Bildung); k_{-1}, Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (Zerfall); K, Gleichgewichtskonstante; K_A, Affinitätskonstante = K; K_D, Dissoziationskonstante, oder Konzentration des Agonisten, bei welcher im Gleichgewichtszustand die Hälfte der Rezeptor-Bindungsstellen besetzt ist; τ, Zeitkonstante; [ ], Konzentration; α, Inaktivierungsrate; β, Aktivierungsrate.

Fig. 2: Agonists (A) occupy the receptors (R) and form agonist-receptor complexes (AR) which are activated (*) in a second step. k_{+1}, association rate constant; k_{-1}, dissociation rate constant; K, equilibrium constant; K_A, affinity constant = K; K_D, dissociation constant, or drug concentration at which half of the binding sites are occupied at equilibrium; τ, time constant; [ ], concentration; α, inactivation rate; β, activation rate.

die Konzentration der Agonisten-Moleküle plötzlich erhöht oder durch Verdünnung vermindert, muss sich mit einer bestimmten Zeitkonstante ein neues Gleichgewicht einstellen. Durch solche Konzentrationswechsel können daher die beiden Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung und den Zerfall der Bindung bestimmt werden (D. Colquhoun, 1981). Wenn z. B. mehr Moleküle auf Rezeptoren einwirken, wird die Zeitkonstante τ kürzer, da $k_{+1} \cdot [A]$ im Nenner steht; wenn aber die Molekülkonzentration 0 wird, z. B. durch Auswaschen, ist die Zeitkonstante nur noch durch die Dissoziationsgeschwindigkeit bestimmt ($1/k_{-1}$). Eine grosse Schwierigkeit bei solchen Messungen be-

steht allerdings in der relativ langsamen Diffusion der Moleküle an den Bindungsort und die Veränderung ihrer aktiven Konzentration durch die Bindung. Ungeachtet dieser experimentellen Schwierigkeiten werden heute von Elektrophysiologen zur Bestimmung der Bindung zwei verschiedene Methoden eingesetzt (P. R. Adams, 1981):

1. Relaxationsmethoden, bei denen ein plötzlicher Sprung, z. B. der Molekülkonzentration oder des Membranpotentiales (voltage jump), das Gleichgewicht stört, worauf sich das System mit einer Zeitkonstante einem neuen Gleichgewicht nähert, d. h. relaxiert (entspannt).

2. Gleichgewichtsmethoden messen einzelne molekulare Ereignisse, aus denen das Gleichgewicht als statistischer Mittelwert zusammengesetzt ist. Sogar wenn die Ereignisse, z. B. Öffnung von Ionenkanälen in einer Membran durch Rezeptorstimulierung, sehr zahlreich sind (sog. Rauschen), können entscheidende Daten aus der Amplitude und der Frequenz der Veränderungen des Membranpotentiales bestimmt werden.

3.2 Der Lebenslauf von Rezeptoren

Der dynamische Aspekt der Plasmamembranen ermöglicht ihren Bestandteilen, den Lipiden und Proteinen, sehr rasche Bewegungen wie Rotation und Konformationsänderung, so dass in erregbaren Zellen Informationen in Millisekunden übertragen werden, langsamere Einflüsse Sekunden dauern, die Membranstruktur in Minuten verändert und innerhalb Stunden bis Tagen wieder erneuert wird. Die Neubildung von Rezeptoren und ihr Umsatz erfolgen relativ langsam, sind aber entscheidend für Pharmakonwirkungen. Mit Hilfe der Markierung von cholinergen Rezeptoren mit α-Bungarotoxin (siehe 4.5) kann der ganze Lebenslauf dieser Rezeptoren verfolgt werden (D. M. Fambrough, 1981).

Cholinerge Rezeptoren ausserhalb der eigentlichen Synapsen wurden an embryonalen Hühnermuskeln in Gewebekulturen untersucht. Der Aufbau aus glykosylierten Polypeptidketten zu einer Rezeptoreinheit braucht nach Eintreffen des Befehls über eine Messenger-RNA höchstens 15 Minuten, wie mit sogenannten schweren Aminosäuren (mit ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N-Markierung) festgestellt wurde. Diese neu synthetisierten Rezeptoren werden in verschiedenen Gebieten der Zelle angetroffen. Viele gelangen sofort in die Plasmamembran, andere werden im Golgi-Apparat gespeichert. Die extrasynaptischen Membran-Rezeptoren in den Gewebskulturen haben eine Lebens-Halbwertszeit t/2 von 17 Stunden. Weder Carbachol noch D-Tubocurarin beeinflussen diesen Rezeptorumsatz. α-Bungarotoxin wird etwas langsamer als die mittlere Lebenszeit abgebaut und kann sich daher nicht vom intakten Rezeptor ablösen. Der eigentliche Abbau der Membranrezeptoren erfolgt durch Einverleibung in die Zelle und Transport zu den Lysosomen, wo sie proteolytisch metabolisiert werden. Der Abbau wird durch Antikörper gegen cholinerge Rezeptoren beschleunigt (siehe 6.3).

Für cholinerge Rezeptoren wurde bei embryonalen Muskeln festgestellt, dass sie nach ihrer Einlagerung in die Muskelmembran darin zuerst frei diffundieren können. Wenn der versorgende Nerv sich dem Muskel nähert und eine Synapse (Muskelendplatte) bildet, sammeln sie sich in der postsynaptischen Membran (siehe 4.1) an und machen diese damit chemisch erregbar (M. m. Poo, 1982). Die cholinergen Rezeptoren in den Synapsen haben eine längere Lebenszeit ($t/2$ = 1–2 Wochen). Wahrscheinlich bestehen sie aus nahe verwandten, aber etwas verschiedenen Proteinen, aufgebaut durch ein anderes Gen in einem reiferen Stadium des Muskels.

Die Synthesegeschwindigkeit von cholinergen Rezeptoren wird durch die Differenzierung der Muskulatur und durch Denervierung von ausgereiften Muskeln beschleunigt. Die Bildungsgeschwindigkeit wird verzögert durch die Innervation des Muskels und durch elektrische Reizung eines denervierten Muskels. Allgemein kann der Rezeptorumsatz in jeder Phase durch viele Einflüsse, normale und pathologische, verändert werden.

Kürzlich wurden Studien über die Rezeptoren von sympathischen Ganglien, von Insulinrezeptoren und anderen mit den gleichen Markierungsmethoden durchgeführt. Die Resultate sind ähnlich; wir dürfen daher annehmen, dass auch viele andere Rezeptoren in Entstehung, Umsatz, Abbau gleichartig kontrolliert werden wie cholinerge Rezeptoren.

3.3 Sensibilität der Rezeptoren

Ein wichtiger Unterschied von Rezeptoren in lebenden Membranen gegenüber Makromolekülen in Lösung (z. B. Enzymmolekülen) betrifft ihre wechselnde Empfindlichkeit für Wirkstoffe. Es ist anzunehmen, dass Rezeptoren in der Entwicklung der Organe an bestimmten Stellen entstehen, wo sie von grösstem Nutzen sind. So haben z. B. Synapsen des Nervengewebes für die chemischen Überträgerstoffe (Neurotransmittoren) hochspezifische Rezeptoren, die den chemischen Übertragungsmechanismus zwischen den Neuronen oder vom Neuron zum Erfolgsorgan ermöglichen. Viele Organzellen müssen Rezeptoren entwickeln, die für Hormone aus inkretorischen Drüsen empfindlich sind. Nachdem diese Rezeptoren existieren und funktionstüchtig werden, können sie ihre Sensibilität entsprechend den Bedürfnissen verändern. Nach einer Denervierung, bei welcher der versorgende Nerv eines Organes abstirbt, wird der entsprechende Rezeptoranteil auf der postsynaptischen Membran rasch so sensibilisiert, dass das Erfolgsorgan auch auf viel kleinere Neurotransmittormengen anspricht. Es werden eventuell auch vermehrt Rezeptoren gebildet oder bereits bestehende stille Rezeptoren aktiviert, so dass auch bei schlechten quantitativen Bedingungen ein Impulsübertritt möglich ist.

Umgekehrt kann durch eine grosse Agonisten-Konzentration eine Desensibilisierung eintreten, die sich entweder auf den spezifischen Rezeptor oder distal davon unspezifisch auf spätere Ereignisse bezieht. Eine rasche Desensibilisierung, z. B. Tachyphylaxie eines Medikamentes auf nicht metabolischer

Grundlage (keine Toleranzerhöhung durch Induktion), ist gewöhnlich reversibel, während eine chronische Desensibilisierung oft mit einem Verlust an Rezeptoren verbunden ist. Der Rezeptor kann in drei verschiedenen Aktivitätsstufen existieren (Bild 3), bevor der Agonist oder Ligand wieder abgespalten wird und der Rezeptor später in seine alte inaktive Form R zurückkehrt (D. I. Triggle, 1979, 1981). Die Affinität dieser drei Stufen R, R*, R^d für Agonisten ist steigend, wobei einige Antagonisten besonders gut an den desensibilisierten Rezeptor gebunden werden. Desensibilisierung kann zudem auch unspezifisch für verschiedene Rezeptortypen erfolgen, wobei wahrscheinlich eine Hyperpolarisation der Zellmembran die Rezeptorempfindlichkeit senkt.

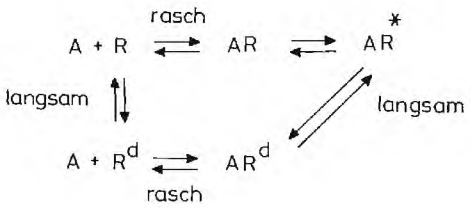


Bild 3: Verschiedene Aktivitätsstufen des Rezeptors. R, inaktiv; R*, aktiviert; R^d, desensibilisiert.

Fig. 3: Different states of receptor activity. R, inactive; R*, activated; R^d, desensitized.

Aber auch andere Mechanismen mit direkter Veränderung der Rezeptorstruktur sind möglich. Immunreaktionen sind schon lange bekannt für Tachyphylaxie, z. B. bei der therapeutischen Desensibilisierung durch wiederholten Kontakt mit Antigenen zur Heuschnupfenprophylaxe. Wie bei Pharmaka sind auch hier veränderte Membranrezeptoren, eventuell unter dem Einfluss von Calciumionen, für diese Vorgänge verantwortlich.

Desensibilisierung von Rezeptoren schützt anscheinend die Zellen vor einem überstarken oder verlängerten Stimulus, wobei die primäre Reaktion normal ausfällt, in der Folge aber rasch schwächer wird, oft mit gleichzeitigem Verlust an Rezeptoren. Viel wesentlicher ist aber die Möglichkeit, die Empfindlichkeit von Rezeptoren den wechselnden Bedürfnissen anzupassen, womit eine Modulation physiologischer Funktionen möglich wird. Dabei kann die Aufnahme von Membran-Rezeptoren in die Zelle als intrazelluläres Signal zur Regulierung der Rezeptorbiosynthese dienen und damit das Gleichgewicht der Zellaktivität steuern.

Hormonale Zyklen (Ovulation, Gestation) wie auch circadiane Lebensrhythmen (M. C. Moore Ede, 1973) werden teilweise mit dem einfachen Mechanismus der Rezeptorempfindlichkeit oder Rezeptordichte gesteuert, wie die verschiedene Ansprechbarkeit der beteiligten Organe auf Hormone zeigt. Verlust an spezifischen Rezeptoren kann aber auch zu pathologischen Funktionsausfällen führen, welche nur schwierig zu behandeln sind (siehe 6.3).

3.4 Charakteristische Eigenschaften der Rezeptoren

Eine der wichtigsten Eigenschaften von Rezeptoren ist ihre Empfindlichkeit auf hoch spezifische chemische Strukturen der Agonisten. Die Beziehung zwischen Wirkung und Struktur hat Chemiker und Pharmakologen schon immer interessiert, da sie mit Hilfe solcher Überlegungen bessere, d. h. wirksamere und selektivere Medikamente synthetisieren wollen. Wie wir später sehen werden, ist es in den letzten Jahren mit der Kenntnis von Neurorezeptoren möglich geworden, wirklich neue Medikamente von hoher Wirksamkeit herzustellen. Allerdings handelt es sich meistens um spezifische Antagonisten, deren chemische Struktur, abgesehen von einigen für die Bindung entscheidenden pharmakophoren Gruppen, zur Abdeckung einer Rezeptorstelle unterschiedlich definiert sein kann. Bei Agonisten dagegen ist das ganze Molekül für Bindung und Wirkung verantwortlich, wie aus dem folgenden Beispiel ersichtlich wird.

Acetylcholin ist ein einfaches Molekül mit starker parasympathomimetischer Wirkung in vielen Organen (isoliertes Herz des Frosches oder der Venus mercenaria, M. rectus abdominis beim Frosch, Blutegelmuskel, Dünndarm, Arterien). Die muscarinischen Rezeptoren dieser Organe werden besetzt, wodurch eine konstante pharmakologische Wirkung ausgelöst wird. Acetylcholin enthält verschiedene pharmakophore Gruppen (Bild 4: I, II, III), die für diesen Effekt verantwortlich sind.

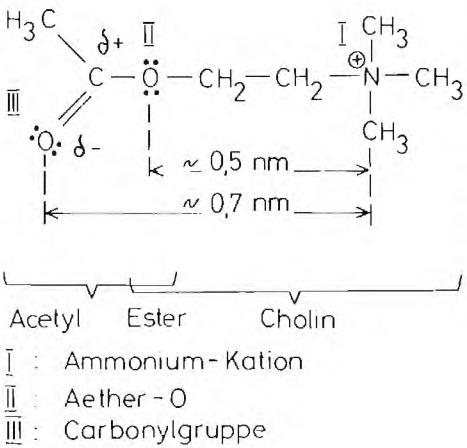


Bild 4: Chemische Struktur des Neurotransmittors Acetylcholin (Ach). ⊕, positive Ladung; :, freies Elektronenpaar; δ^+, δ^-, Polarisation einer Bindung durch π-Elektronen.

Fig. 4: Chemical structure of the neurotransmitter acetylcholine (Ach). ⊕, positive charge; :, free pair of electrons; δ^+, δ^-, polarization of bond by π-electrons.

Obwohl die Form (chemische Konformation) des aktiven Moleküles in Lösung wechselt und auch wegen seiner Beweglichkeit und Drehbarkeit der aliphatischen Kette, die aus der Kristallstruktur nicht vorausgesagt werden kann, bieten sich zahlreiche Möglichkeiten, durch Veränderung der einzelnen Molekülteile ihren Einfluss auf Bindung und Wirkung zu untersuchen.

3.5 Struktur und Wirkung cholinerger Agonisten

Aus einer grossen Zahl von Arbeiten über die Struktur-/Wirkungsbeziehungen cholinerger Stoffe sollen hier nur einige illustrative und entscheidende Beiträge erwähnt werden.

Für eine optimale cholinerge Wirkung muss die quaternäre Ammoniumgruppe des Cholins mit mindestens drei Methylgruppen besetzt sein. Alle grösseren Alkylsubstituenten (Ethyl, Propyl, Butyl) vermindern deutlich die Wirkung (Bild 8, J. H. Welsh, R. Taub, 1950). Tertiäre Amine (mit 3 Alkylsubstituenten) sind wirkungslos, ebenso der Austausch des N durch P oder As, da so das Volumen der Gruppe vergrössert wird. C. C. Pfeiffer hat 1948 erkannt, dass bei vielen stark wirksamen cholinergen Stoffen (Acetylcholinderivate und ähnliche Verbindungen, Bild 5) neben der quaternären Ammoniumgrup-

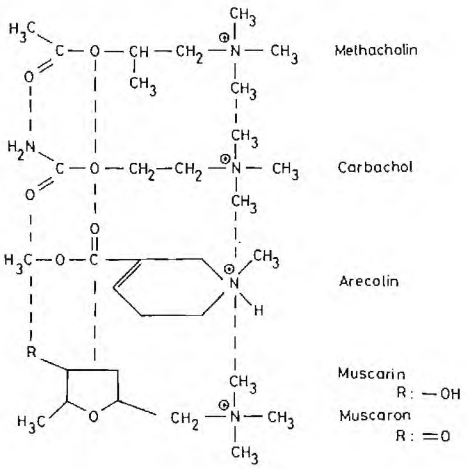


Bild 5: Cholinerge Pharmaka mit ähnlichen Distanzen zwischen den pharmakophoren Gruppen im Molekül.

Fig. 5: Cholinergic drugs with similar distances between pharmacophore groups in the molecule.

pe sauerstoffhaltige Funktionen (Acetylcholin: ein Keto- und ein Aethersauerstoff) in einer bestimmten Entfernung enthalten sind (0,54 nm und 0,70 nm mit Atommodellen gemessen), die anscheinend für den cholinergen Effekt durch Einwirkung auf Rezeptoren von Bedeutung sind (Bild 4). Auch andere Cholinergica mit aromatischen oder heterocyclischen Ringsystemen (Pilocarpin, Arecolin, Muscarin) konnten in dieser Weise dargestellt werden (Bild 5), und sogar klassische Anticholinergica (Atropin, Scopolamin, Oxyphenonium) wurden bezüglich ihrer Atomdistanzen mit Acetylcholin verglichen (J. Feeny, E. A. Piper, R. Foster, 1978) (Bild 6). Später wurden diese ungenauen Messungen an Modellen durch Röntgenbeugungsanalysen an Kristallen (nicht in Lösung!) verbessert (R. W. Baker et al., 1971, C. H. Chothia, P. Pauling, 1970, R. W. Chothia, 1970, P. Pauling, 1975). H. R. Ing (1949) konnte darauf hinweisen, dass nicht alle Moleküle mit den erwähnten drei pharmakophoren Gruppen parasympathomimetisch wirksam sind und dass andererseits wirksame

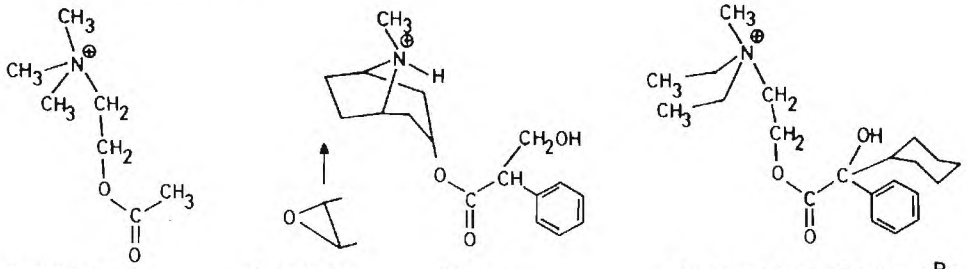


Bild 6: Chemische Strukturen von Anticholinergica verglichen mit Acetylcholin.

Fig. 6: Chemical structures of anticholinergic drugs compared to acetylcholine.

Verbindungen nicht immer alle drei Gruppen enthalten. Nach J. H. Welsh und R. Taub (1950) kommt es neben dem kationischen Kopf (N^+) im Molekül vor allem für die Wirksamkeit auf die 5-Atom-Länge der aliphatischen Kette (5-atom-rule) an (Bild 7). So sind für Acetylcholin die Grösse des kationischen Kopfes und die Länge der daran haftenden Kette neben den Sauerstoffunktionen entscheidend.

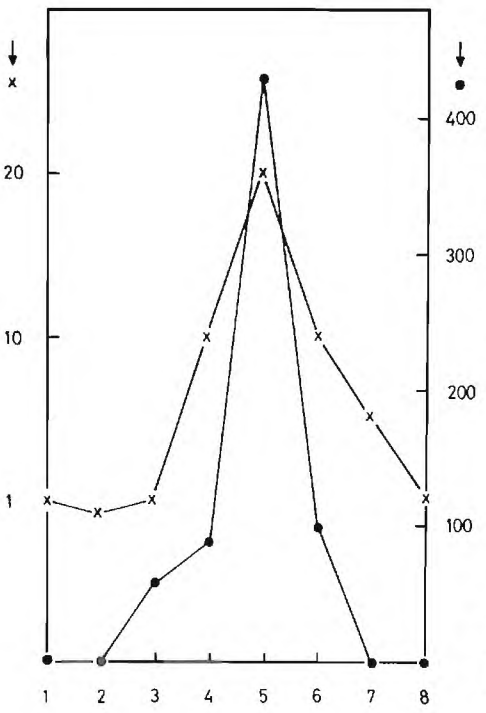


Bild 7: Relative pharmakologische Wirksamkeit von Verbindungen des Typs $(CH_3)_3 \overset{\oplus}{N} R_n$. n, Anzahl C-Atome der aliphatischen Kette R (Abszisse); x, Kontraktion des Kaninchenileums (Ordinate links); ●, Hemmung der Herzaktion bei Venus mercenaria (Ordinate rechts).

Fig. 7: Relative pharmacological activity of drugs with the structure $(CH_3)_3 \overset{\oplus}{N} R_n$. n, number of C-atoms of the aliphatic chain R (abscissa); x, contraction of the rabbit ileum (ordinate on the left); ●, inhibition of cardiac action in venus mercenaria (ordinate on the right).

Emil Fischer hat seinerzeit, angeregt durch Untersuchungen über die stereospezifische Wirkung von Fermenten, auf das Bild des Schlosses (Rezeptor, aktives Fermentzentrum) und den dazu passenden Schlüssel hingewiesen. So scheint auch die räumliche Passform des Agonisten oder Substrates wichtig zu sein (Bild 8).

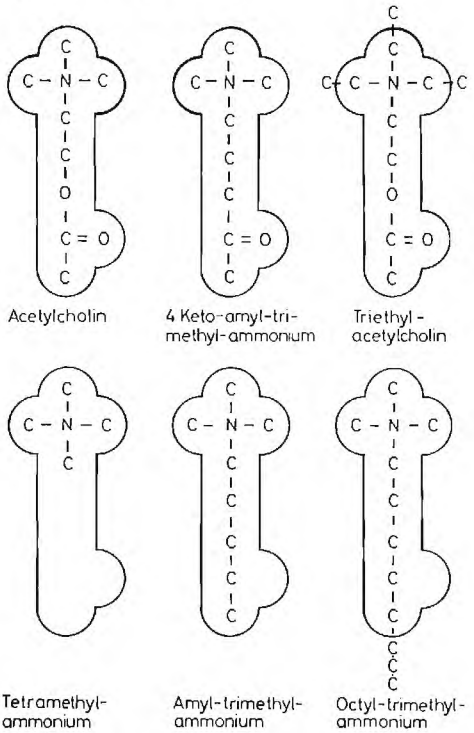


Bild 8: Agonisten als Schlüssel, die in das Schloss des cholinergen Rezeptors passen müssen, um dieses zu öffnen.

Fig. 8: Agonists as keys to the lock of the cholinergic receptor, which is opened when the key fits.

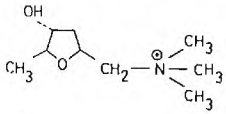
Es ist schon lange bekannt, dass sich optische Isomere in ihrer Wirkungsstärke deutlich voneinander unterscheiden; das gilt für Agonisten (D- oder L-Adrenalin) und für Antagonisten (D- oder L-Atropin) (R. B. Barlow, 1960, R. B. Barlow et al., 1972). Dieser Unterschied kommt noch viel stärker zum Ausdruck bei Stereoisomeren, wie z. B. dem Muscarin, bei welchem nicht nur die optische Aktivität, sondern auch die Stellung aller Substituenten im Ringsystem stark wirkungsbeeinflussend ist (P. G. Waser, 1961).

Muscarin (Alkaloid aus *Amanita muscaria*) eignet sich für Struktur-/Wirkungsuntersuchungen, da es sich nicht – wie beim Acetylcholin – um einen Ester handelt[1]. Die Sauerstoffunktionen sind in einem Tetrahydrofuranring als Aethersauerstoff und als Hydroxylgruppe enthalten. Es ist zudem noch

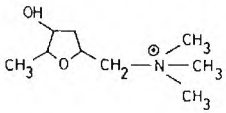
[1] Die chemische Struktur und die Pharmakologie des Muscarins wurden in Zürich abgeklärt und später die Synthese des Alkaloids und vieler Derivate durchgeführt (C. H. Eugster, 1960, 1966; C. H. Eugster, P. G. Waser, 1954; P. G. Waser, 1961)

stärker muscarinisch auf die peripheren parasympathischen Rezeptoren wirksam als Acetylcholin. Muscarin wird auch wie Acetylcholin durch Atropin antagonisiert, d. h. seine Wirkung wird kompetitiv am Rezeptor unterdrückt.

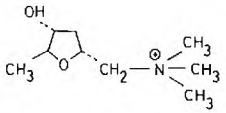
Alle Muscarinisomere (Bild 9) sind mindestens 100–1000mal weniger wirksam als das natürliche (-)Muscarin. Wird der Sauerstoff im Furanring durch Schwefel im Thiophenring ersetzt, oder die cholinerge 5-Atom-Kette vom N^+ bis zum Methylsubstituenten am Ring verkürzt bzw. verlängert (Bild 10), geht



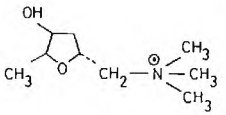
(+)-Muscarin
2S, 3R, 5S



(±)-Epimuscarin



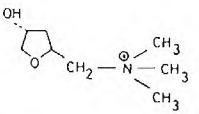
(±)-Allomuscarin



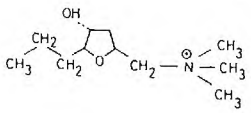
(±)-Epiallomuscarin

Bild 9: Muscarin und Stereoisomere, bei denen die Substituenten am Ring fixiert sind und nur die Methyl-Ammonium-Gruppe frei beweglich ist.

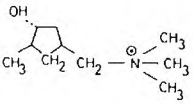
Fig. 9: Muscarine and stereoisomers with fixed substituents on the ring and movable methyl-ammonium group.



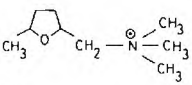
(±)-Desmethylmuscarin



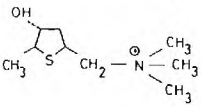
(±)-Propylmuscarin



(±)-Desethermuscarin



(±)-Desoxymuscarin

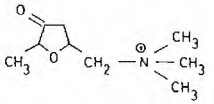


(±)-Thiomuscarin

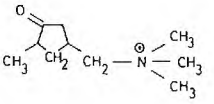
Bild 10: Einige Muscarin-Derivate mit verschiedenen Hetero-Atomen und Substituenten im Ring.

Fig. 10: Some derivatives of muscarine with different hetero-atoms and substituents in the ring.

die pharmakologische Wirkung verloren, entsprechend den früher beschriebenen Acetylcholinderivaten. Nor-Muscarin mit einem tertiären Amin in der freien Seitenkette ist beinahe wirkungslos. Allerdings sind Desoxy- und Desether-Muscarin nur 10mal weniger wirksam als Muscarin, und Muscaron (Bild 11) hat eine starke, aber kaum stereospezifische muscarinische und nikotinische Wirkung (P. G. Waser, 1961; P. G. Waser, W. Hopff, 1978).



(-)-Muscaron
2S, 5S



(±)-Desethermuscaron

Bild 11: Muscaron und Derivat.

Fig. 11: Muscarone and derivative.

Aus diesen Versuchsergebnissen muss geschlossen werden, dass die dreidimensionale Molekülform sehr gut auf oder in die Rezeptorstelle passt, und dass beim cholinergen Molekül drei pharmakophore Gruppen (quaternärer Stickstoff, Carbonyl- und Aether-Sauerstoff) zu entsprechenden Atomgruppen des Rezeptors Bindungen eingehen. Da die meisten Medikamente und insbesondere Neurotransmittoren wie Acetylcholin nur schwach gebunden sind, daher nur kurze Zeit wirken und auch leicht in isolierten Organen auswaschbar sind, können die Bindungskräfte nur schwach bis mittelstark (0,5–5 kcal/Mol) sein (Tab. 1).

Tabelle 1: Chemische Bindungskräfte.

Table 1: Chemical binding forces.

Coulomb Kräfte bei Ionenpaaren	5 kcal/mol
Wasserstoffbrücken	2–5 kcal/mol
Van der Waals Kräfte	0,5 kcal/mol
Kovalente Bindung	40–140 kcal/mol

Häufig kommen bei einer Bindung an Rezeptoren gleichzeitig mehrere dieser Kräfte, oft auch multiplikativ z. B. bei den van der Waals Bindungen durch eine Anlagerung eines Moleküles an ein Protein, zur Wirkung. Die kovalente Bindung eines Wirkstoffes an einen Rezeptor bedeutet irreversible Bindung und damit eine Inaktivierung, da eine Ablösung mit einer Veränderung der Rezeptorregion, meistens aber mit dem Abbau derselben verbunden ist. Beispiele für solche toxischen Wirkungen auf cholinerge Mechanismen sind die Nervengifte Sarin, Soman oder VX, welche als gut lipophile Organophosphate vor allem die Acetylcholinesterase durch kovalente Bindung irre-

versibel blockieren und damit zur Überflutung des Nervensystems mit Acetylcholin führen. Viele Schlangentoxine (α-Bungarotoxin, *Naja naja*-Toxin u. a.) wirken durch äusserst starke, beinahe irreversible Bindung an cholinerge Rezeptoren und töten durch curareartige Lähmung der Skelettmuskulatur, vor allem der Atemmuskulatur. Die Verwendung solcher Verbindungen und Toxine als «affinity labels» zur Isolierung von Rezeptorproteinen soll später erwähnt werden (siehe 4.5).

3.6 Konformation der Agonisten, Bindungsenergie und Aktivierung des Rezeptors

Wie bei Enzymreaktionen ist auch bei Rezeptorbesetzungen durch Agonisten oder Antagonisten Energie notwendig, um die Proteine zu aktivieren, d. h. um ihre Konformation zu ändern (T. J. Franklin, 1981).

Diese Änderung wird wahrscheinlich dadurch erreicht, dass ein Teil der inneren freien Energie des Agonisten durch seine Bindung zur Überwindung einer Energiebarriere des Zwischenstadiums verwendet wird (Bild 12). Wenn den Liganden bei der Bindung eine aktive Rolle zugeschrieben würde, d. h. wenn die notwendige Energie gering wäre, würde durch den Agonisten die Bildung des angeregten Rezeptorzustandes gefördert und die Umwandlungsgeschwindigkeit beschleunigt. Darüber gibt es heute bereits Beobachtungen an Rezeptorsystemen der Adenyl-Cyclase.

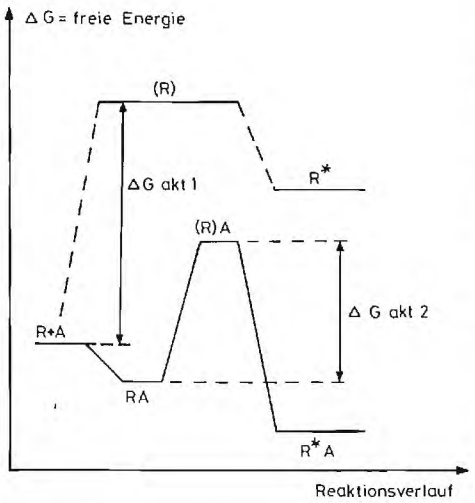


Bild 12: Energiebilanz der Interaktion des Agonisten A mit dem Rezeptor R. Ohne A muss der Rezeptor R eine hohe Energiebarriere (Δ G akt 1) für den Übergang (R) in den aktivierten Zustand R* überwinden. Bindet sich A zuerst an R, wird die Konformation des Komplexes R A verändert und damit die Energiebarriere (Δ G akt 2) zur Erreichung des aktivierten Zustandes R* A verkleinert. Dadurch läuft dieser Übergang bedeutend rascher ab. Δ G, freie Enthalpie.

Fig. 12: Energy balance shown for steps in the interaction of agonist A with receptor R. Without A the receptor R must overcome a high transition energy barrier (Δ G akt 1) to state1 (R) before being activated to R*. When A first binds to R, the receptor has a different conformation R A and the energy barrier is lower (Δ G akt 2), allowing much faster transition to the activated state R* A. Δ G, free enthalpy.

Die Konformation eines Agonisten oder die Möglichkeit, die Konformation unter Energieabgabe zu verändern, spielen für die Rezeptorbindung (Affinität) und Wirkung (intrinsic activity) eine grosse Rolle. Acetylcholin hat

eine grosse Flexibilität und kann daher verschiedene, energetisch unterschiedliche Konformationen einnehmen. Mit kristallographischen Methoden (C. Chothia, P. Pauling, 1970; C. H. Chothia, 1970; P. Pauling, T. J. Petcher, 1973; R. W. Baker et al., 1971), Kernresonanz (J. P. Behr, J. M. Lehn, 1972) und quantenmechanischen Berechnungen (B. Pullman, P. Courrière, 1972) kann die energetisch «günstigste» Form, d. h. diejenige mit der tiefsten inneren Energie und daher dem häufigsten Vorkommen bestimmt werden, von der dann angenommen wird, dass sie auch biologisch wirksam sei. Zu einem anderen Ergebnis führt die Synthese von rigiden oder halbstarren Acetylcholin-Analoga und der Vergleich ihrer Wirkungen auf biologische Rezeptorsysteme. Verbindungen mit hoher Aktivität lassen auf die aktive Konformation des Acetylcholins schliessen. Es ist deshalb möglich, dass eine energetisch «ungünstige» Strukturform am Rezeptor die Wirkung auslöst, womit für die Konformationsänderung des Rezeptors mehr Energie zur Verfügung stehen würde. Zum Vergleich stellen wir uns bewegliche Teile an eine Eisenfeder fixiert vor. Diese Teile bewegen sich nur, wenn die Feder gespannt ist, d. h. sich auf einem energetisch hohen Niveau befindet.

3-Acetoxy-chinuclidin ist muscarinisch wirksam, und die tertiäre Form hat eine höhere Affinität zum Rezeptor als das quaternäre Methojodid (Bild 13) (G. Lambrecht, E. Mutschler, 1974). Nach der absoluten Konfiguration ist das (–)-Enantiomere mit der R-Konfiguration wirksamer als das (+)-Enantiomere. Das Ringsystem hat durch die starre Struktur mit Sicherheit Bootform.

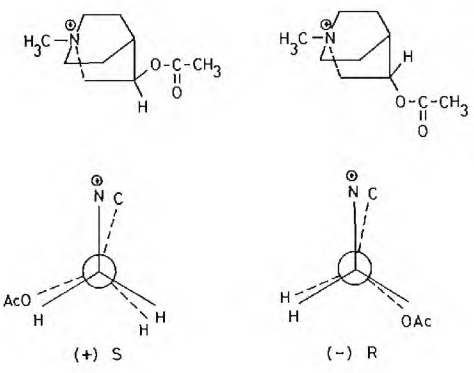


Bild 13: Absolute Konfiguration der optischen Enantiomeren von 3-Acetoxychinuclidin-Methojodid.

Fig. 13: Absolute configuration of optical enantiomers of 3-acetoxyquinuclidine-methiodide.

Demgegenüber haben bei der Vergleichsverbindung, die eine Ethylenbrücke weniger im Ringsystem besitzt (N-Methyl-3-Acetoxypiperidin), beinahe alle Moleküle Sesselform (Bild 14). Die thermodynamische Berechnung ergibt, dass nur ein Molekül von 650 in der biologisch aktiven Bootform vorliegt, weswegen die Wirkung gegenüber dem Chinuclidin ca. 500mal geringer ist. Quaternisierung am Stickstoff hemmt die Bildung des Rezeptorkomplexes mit entsprechendem Wirkungsverlust. Durch die Interaktion des Piperidinmole-

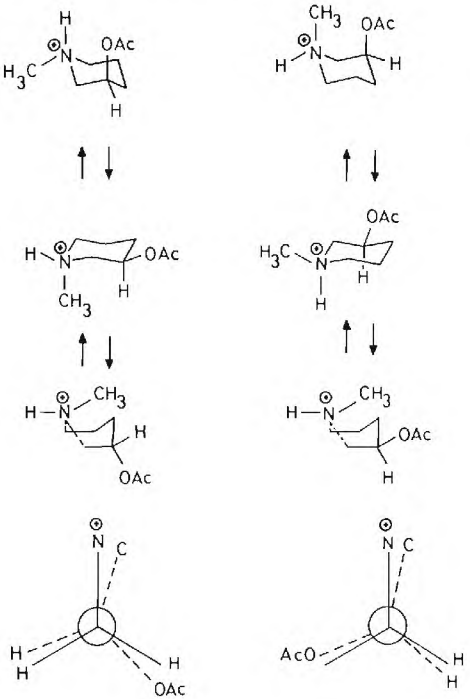


Bild 14: Theoretisch mögliche Konformationen von N-Methyl-3-Acetoxypiperidinium für ein Enantiomer.

Fig. 14: Theoretically possible conformations of N-methyl-3-acetoxypiperidinium of one enantiomer.

küls mit dem Rezeptor wird auch das Verhältnis zwischen Sessel- und Bootkonformation nicht verändert. Bei dieser Überlegung sind kleine Energiemengen (0,5 kcal/Mol) für Konformationsänderungen wie axiale/equateriale Stellung des Substituenten im Ringsystem von geringer Bedeutung. Eine grössere Umwandlungsenergie (5–6 kcal/Mol) könnte aber von den bootförmigen Molekülen bei ihrer Umwandlung in die Sesselform am Rezeptorkomplex an diesen abgegeben werden. Wenn diese Umwandlung im Lösungsgleichgewicht, wie oben erwähnt, wenig häufig ist, dürfte sie aber am Rezeptor durch chemische Interaktion gefördert werden.

Acetylcholin kommt in Lösung wie in Kristallen hauptsächlich in der gauche-Konformation vor (Bild 15). Dies ist auch bei vielen anderen biologischen Molekülen (z. B. Phospholipiden) der Fall, wahrscheinlich verursacht durch elektrostatische Interaktion zwischen dem quaternären Stickstoff und dem elektronegativen Sauerstoff (M. Sundaralingam, 1968), jedoch nicht bei den tertiären ungeladenen Aminen.

Es gibt daher auch cholinerge Agonisten in der trans-Form, die wirksam sind (H. G. Mautner, 1974). Die Konformation im Kristall oder in Lösung muss nicht unbedingt der Konformation am Wirkungsort entsprechen, da diese durch viele lokale Einflüsse (pH, Dielektrizitätskonstante etc.) beeinflusst ist.

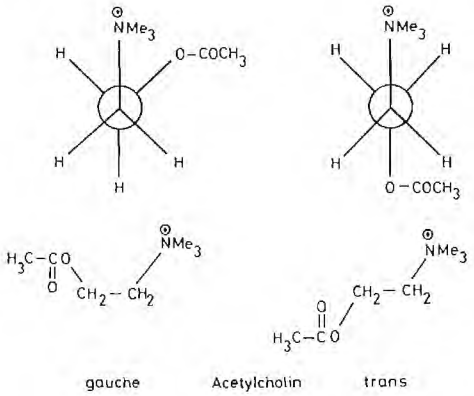


Bild 15: Konformation des Acetylcholins.
Fig. 15: Conformation of acetylcholine.

Flexibilität des Moleküles kann daher für den Agonisten von grosser Bedeutung sein, wenn er sich dem Rezeptor anpasst und dann während dessen Konformationsänderung in Bindung bleibt und diese energetisch beeinflusst. Starre Moleküle können nur an einem oder dem andern Zustand der Rezeptorkonformation gebunden sein.

3.7 Molekülform und Grösse von Antagonisten

Die Rolle der Antagonisten müsste man so verstehen, dass sie sich an eine inaktive Form des Rezeptors binden und diesen nicht nur besetzen, sondern auch immobilisieren. Partielle Antagonisten können einen Teil der freien Bindungsenergie in eine partielle Aktivierung des Rezeptors umsetzen. So wird die innere Bindungsenergie in «nicht produktive» Energie, welche den Rezeptor stabilisiert, und «produktive», aktivierende Energie geteilt. Für kleine Agonistenmoleküle ist der zweite Anteil grösser als bei partiellen Agonisten, wodurch der Anteil an aktivierten Rezeptoren oder die Geschwindigkeit der Aktivierung bestimmt werden (H. Arad, A. Levitzki, 1979).

Für viele Neurotransmittoren sind klassische Antagonisten bekannt, die den Rezeptor oder in dessen direkter Umgebung einen wichtigen funktionellen Teil des Rezeptorkomplexes besetzen. Sie verdrängen kompetitiv die Agonisten von ihren Bindungsstellen oder hindern sie an ihrer Wirkung. Sie werden wegen ihrer spezifischen Blockierung oft zur Charakterisierung von Rezeptoren und zur Differenzierung von Untergruppen von Rezeptoren verwendet. Auf Grund solcher Versuche werden die adrenergen oder histaminergen Rezeptoren immer weiter in Subtypen unterteilt, welche dann die Möglichkeit bieten, neue hochspezifische Medikamente, z. B. β_1-Blocker (Metoprolol) α_1-Antagonisten (Phentolamin) oder H_2-Antagonisten (Cimetidin) zu entwickeln.

Auffällig ist das Verhältnis von Molekülform und Grösse zwischen Agonisten und Antagonisten. Die bekannten Neurotransmittoren sind meistens klein, schlank und dadurch flexibel. Sie können sich daher einer Rezeptor-

struktur gut anpassen und konformativen Veränderungen folgen. Sie können sogar durch Membranporen dringen. Die Antagonisten dagegen sind häufig grosse, voluminöse und oft auch starre Moleküle, die wenig flexibel sind und Formveränderungen des Rezeptors erschweren oder verhindern. So kann auch bei Acetylcholin durch die teilweise oder vollständige Einbeziehung der Cholinkette in eine starre Cyclohexanstruktur (Bild 16)[2] die cholinerge Wirkung vermindert und durch eine Pyridin-Substituierung im Cholinteil (Verbindungen 3,4,6) die Beweglichkeit der Ammoniumgruppe so herabgesetzt und das Volumen vergrössert werden, dass eine atropinartige die cholinerge Wirkung ersetzt (P. G. Waser, W. Hopff, 1978).

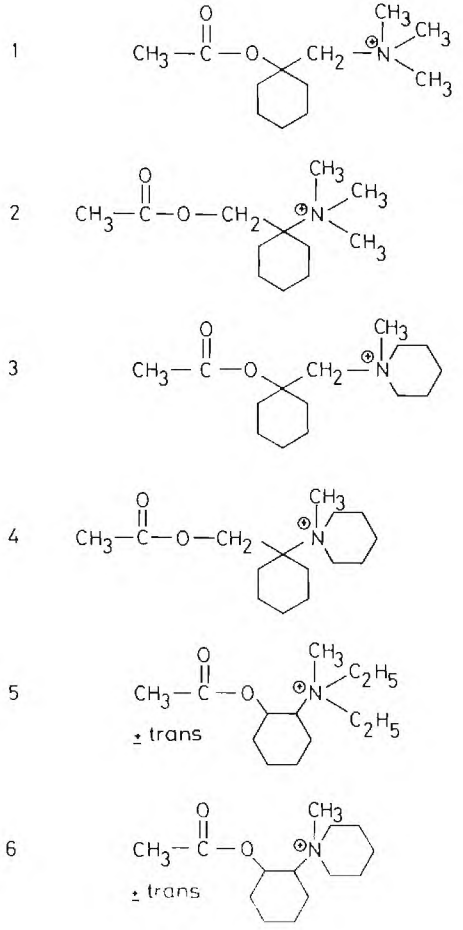


Bild 16: Cyclohexyl-Analoge des Acetylcholins, bei denen der Cholinteil zunehmend versteift und Piperidin im Ammoniumkopf vorhanden ist (Verbindungen 3, 4, 6).

Fig. 16: Cyclohexyl analogs of acetylcholine, in which the choline part is increasingly rigid and piperidine forms the ammonium head (compounds 3, 4, 6).

[2] Die Synthese dieser Verbindungen (Bild 16) wurde von J. Büchi, ETH, Zürich, durchgeführt.

Neben den reinen Agonisten mit starker stimulierender Wirkung auf den Rezeptor (starke «intrinsic activity») und den klassischen Antagonisten (Atropin, Curare, Phentolamin, Propranolol, Antihistaminica), die nur Rezeptoren besetzen, ohne damit eine eigene Wirkung (keine «intrinsic activity») auszulösen, gibt es eine viel grössere Gruppe von partiellen Agonisten oder partiellen Antagonisten. Diese beiden stimulieren die Rezeptoren in einem schwächeren Ausmass als die reinen Agonisten, so dass eine gewisse Erregungswirkung eintritt; z. B. stimuliert Nikotin autonome Ganglien zuerst, um danach die cholinergen Rezeptoren kompetitiv zu antagonisieren, so dass weder eine funktionelle noch eine elektrophysiologische Antwort möglich ist. Demnach sind diese Moleküle längere Zeit an ihre Rezeptoren gebunden, und es tritt der Antagonismus ein. Die Besetzung von wichtigen Aktionsstellen eines Rezeptors, die sogenannte Okkupation der Schlüsselstellung oder einer Zone daneben, welche die Konformationsänderung blockiert, hat zur Vorstellung geführt, dass Antagonisten-Moleküle während der gesamten Dauer ihrer festen Bindung wirken. Ähnlich entsteht bei einer Orgelpfeife ein Ton, solange die Taste gedrückt wird, welche die Luftzufuhr regelt.

Agonisten-Moleküle gehen jedoch zum Rezeptor, aktivieren diesen für kurze Zeit, werden von neuen Agonisten-Molekülen abgelöst, die wieder aktivieren. Dieser Vorgang wiederholt sich fortwährend. Eine kurzzeitige Wirkung wird ausgelöst wie bei einem Klavier, bei dem das Anschlagen einer Taste einen kurzen Ton bewirkt. Aber für lang anhaltende Töne müsste die Taste wiederholt in rascher Folge gedrückt werden («Rate-theory» von W. D. M. Paton, 1961). Wirkungsbestimmend wäre damit die wechselnde Konformationsänderung des Rezeptors, welcher seinerseits entsprechende Impulse z. B. an ein Ionophor der Membran weitergibt.

4 Cholinerge Synapsen; nikotinisch cholinerge Rezeptoren (nAchR)

Synapsen sind Kontaktpunkte zwischen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie zu peripheren Effektorzellen, bei denen Neurohormone die Funktion des chemischen Impulsüberträgers übernehmen.

Wir unterscheiden zwei pharmakologisch verschiedene Typen von acetylcholinergen Synapsen:

1. Nikotinische Synapsen mit nikotinischen Rezeptoren (nAchR) finden sich an den Verbindungsstellen der motorischen Nerven mit der quergestreiften Skelettmuskulatur. Diese Nervenendigungen haben die Form von kleinen Platten, die sogenannten motorischen Endplatten. Sie werden von quaternären Curarestoffen blockiert, wodurch eine vollständige Lähmung der willkürlichen Motorik eintritt. Die autonomen Ganglien des Sympathicus und Parasympathicus enthalten ebenfalls nikotinische Schaltstellen, welche von grösseren Konzentrationen von Nikotin und synthetischen Ganglionblockern ausgeschaltet werden. Im Gehirn haben verschiedene Regionen, z. B. die

Hirnrinde und der Hirnstamm, nikotinische Synapsen. Sie werden durch eine tertiäre Curareverbindung, Dihydro-β-Erythroidin[3] gelähmt. Alle diese cholinergen Synapsen werden aber auch durch Nikotin, ein leicht protonisierbares tertiäres Alkaloid, erregt.

2. Muscarinische Synapsen finden wir in allen Endigungen des Parasympathicus, vor allem des N. vagus. Sie übermitteln die Impulse in die glatte Muskulatur z. B. des Magen-Darmtraktes, der Bronchien, des Sphincter iridis oder der Harnblase, aber auch in den Sinusknoten und die quergestreifte Muskulatur des Herzens und in viele Drüsenzellen. In Gehirn und Rückenmark verlaufen zahlreiche cholinerge Bahnen. Die meisten sind anscheinend mit muscarinischen Rezeptoren (mAchR) versehen, obwohl Muscarin als quaternäres Alkaloid eigentlich nur periphere Rezeptoren stimuliert und nicht ins Zentralnervensystem (ZNS) über die Blut-Hirnschranke eindringt. Die historische Bezeichnung «muscarinische Synapse» ist im ZNS daher nicht angebracht. Der wichtigste universelle Antagonist ist Atropin, welcher periphere und zentrale muscarinische Rezeptoren blockiert.

4.1 Morphologie, Strukturen und Funktionen des nikotinisch cholinergen Rezeptors (nAchR)

Die zur Übertragung des nervösen Impulses von einem Neuron auf das nächste oder von einem Neuron auf ein Erfolgsorgan (z. B. quergestreifte oder glatte Muskeln, Drüsenzellen) dienenden Neurotransmittor-Moleküle werden aus einem präsynaptischen Speicher im neuronalen Axon freigesetzt, durchqueren den Synapsenspalt und erreichen die Rezeptoren in der postsynaptischen Membran. Da die chemisch einwandfreie Identifizierung der Neurohormone und Neurone im Gehirn schwierig ist, weil dort nebeneinander sehr viele verschiedene neurochemische Synapsentypen vorkommen, konzentriert sich die cholinerge Rezeptorenforschung vorderhand hauptsächlich auf periphere Synapsen, z. B. die motorische Endplatte, oder in den letzten 25 Jahren auf die elektrischen Organe von Fischen. Für diese Zwecke werden der Zitterrochen *(Torpedo marmorata*, Bild 17; *T. ocellata; T. californica)* sowie der elektrische Aal *(Electrophorus electricus)* verwendet. Bei diesen Tieren wurde im Verlaufe der Evolution die Muskulatur im Bereiche der elektrischen Organe in Platten, sogenannten Elektroplax-Einheiten, nach dem Prinzip des Volta-Elementes in Säulen angeordnet und mit einem Kanalsystem zur Speicherung grosser Strommengen umgestaltet (Bild 18). Der cholinerge Übertragungsmechanismus zur Freisetzung des Stromes, d. h. zur Auslösung eines elektrischen Schlages, blieb erhalten. Funktionell wie morphologisch, hauptsächlich aber biochemisch, ist der cholinerge Charakter der Synapse gewahrt. Deshalb dient das elektrische Organ heute häufig als Modell und besonders als ausgiebige biochemische Quelle für die Enzyme, Membranen, Vesikel, Proteine oder Rezeptoren dieses Synapsentyps (Tab. 2).

[3] In Zürich haben V. Boekelheide und V. Prelog (1955) über Erythrina Alkaloide gearbeitet.

Bild 17: *Torpedo marmorata,* männlich, 15 cm breit, von Arcachon (Frankreich); gefärbt mit Alizarin-S und aufgehellt in Benzylalkohol mit Glyzerin (F. Scheurmann).

Fig. 17: *Torpedo marmorata,* male, 15 cm wide, from Arcachon (France), stained with Alizarin-S and made transparent by benzylic alcohol and glycerol (F. Scheurmann).

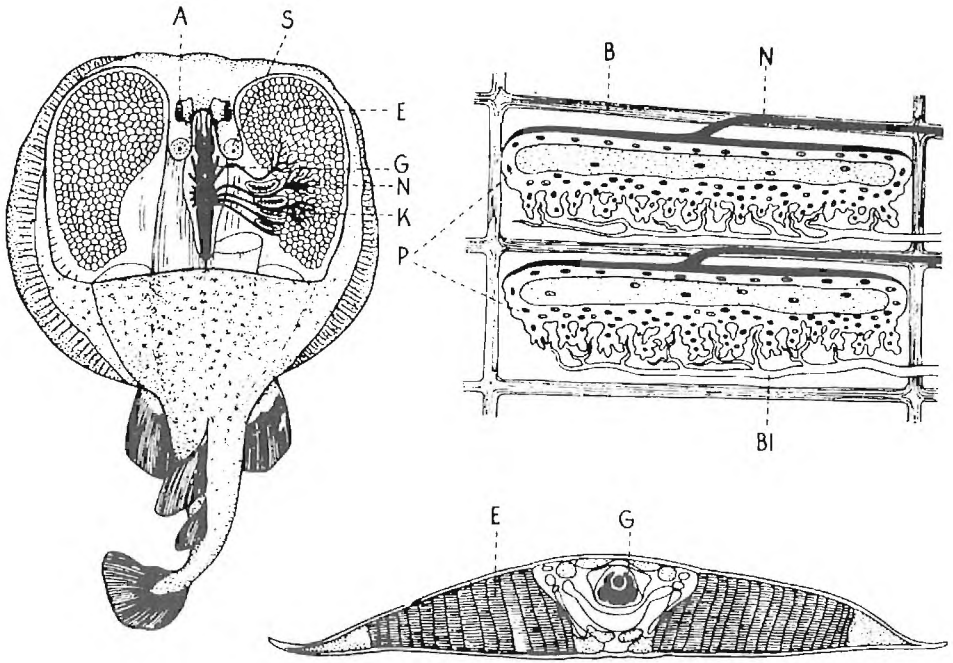


Tabelle 2: Konzentration der nikotinisch cholinergen Rezeptoren.
Table 2: Concentration of nicotinic cholinergic receptors.

Elektrisches Organ von *Torpedo marmorata*	1000 nmol/kg
Elektrisches Organ von *Electrophorus electricus*	50 nmol/kg
Skelettmuskel Endplatten	1 nmol/kg
Skelettmuskel nach Denervierung	50 nmol/kg
Gehirn	0,1–1 nmol/kg

In der motorischen Endplatte (Bild 19) enthält das Nervenaxon zahlreiche synaptische Vesikel, die Acetylcholin speichern und auf einen Nervenreiz hin in den Synapsenspalt ausstossen. Diese «Quanten» von Neurotransmittor-Molekülen diffundieren quer durch den Synapsenspalt zu der postsynaptischen Membran, die in starken und oft verzweigten Falten tief ins Sarcoplasma der Muskelfaser eindringt. Acetylcholin trifft dort auf die Rezeptoren in der Membran, und wird anschliessend durch die Acetylcholinesterase hydrolysiert. Möglicherweise wird Acetylcholin auch anstelle der Freisetzung in Quanten diffus aus dem Axoplasma durch die terminale Membran in den Synapsenspalt abgegeben und erreicht die Rezeptoren in der gegenüberliegenden Membran (Y. Dunant, 1981; P. G. Waser, 1981). Die postsynaptische Membran scheint direkt gegenüber dem Nervenende verdickt zu sein (Bild 19) und enthält im Gefrierätzbild (Bild 20) zahlreiche kleine und grössere makromolekulare Einschlüsse.

Bei diesen Partikeln muss es sich um Proteine handeln, die als Enzyme, Rezeptorproteine, Ionophore oder Carriersysteme an der Rezeptoraktivierung und der nachfolgenden Depolarisation der Membran beteiligt sind. Ihre Dichte wurde mit $5-8\times10^6/\mu m^2$ postsynaptische Membran bestimmt (P. G. Waser, 1970).

Obwohl die Grössenverhältnisse der Rezeptoren als Biopolymere kaum erlauben, strukturelle Bilder von ihrem Aufbau zu erhalten, ist man seit langem bestrebt, mit dem Elektronenmikroskop wenigstens Auskunft über die Organisation von Rezeptoren in einer Membran zu erhalten. Dabei haben viele neue Techniken, vor allem die Gefrierätzung, histochemische Verfahren wie z. B. negative Kontrastierung oder Histoautoradiographie geholfen. Es wird in naher Zukunft jedoch kaum möglich sein, mit den heute verwendbaren Elektro-

◀ Bild 18: Elektrische Organe des Zitterrochens (*Torpedo*). Links: Rückenansicht nach Wegnahme eines Teils der Rückenhaut. Rechts oben: Schematischer Querschnitt durch zwei elektrische Platten. Rechts unten: Querschnitt durch den Körper in der Kiefergegend. A, Auge; B, faseriges Bindegewebe; Bl, Blutgefässe; E, elektrisches Organ; G, Gehirn; K, Kiemenspalten; N, Nerven; P, elektrische Platten; S, Spritzloch.

Fig. 18: Electric organ of *Torpedo*. Left: dorsal view after resection of skin; right top: cross section through electroplaxes; right bottom: cross section through body at site of jaw. A, eye; B, fibrous connective tissue; Bl, blood vessels; E, electric organ; G, brain; K, gills; N, nerve; P, eletroplax; S, vent.

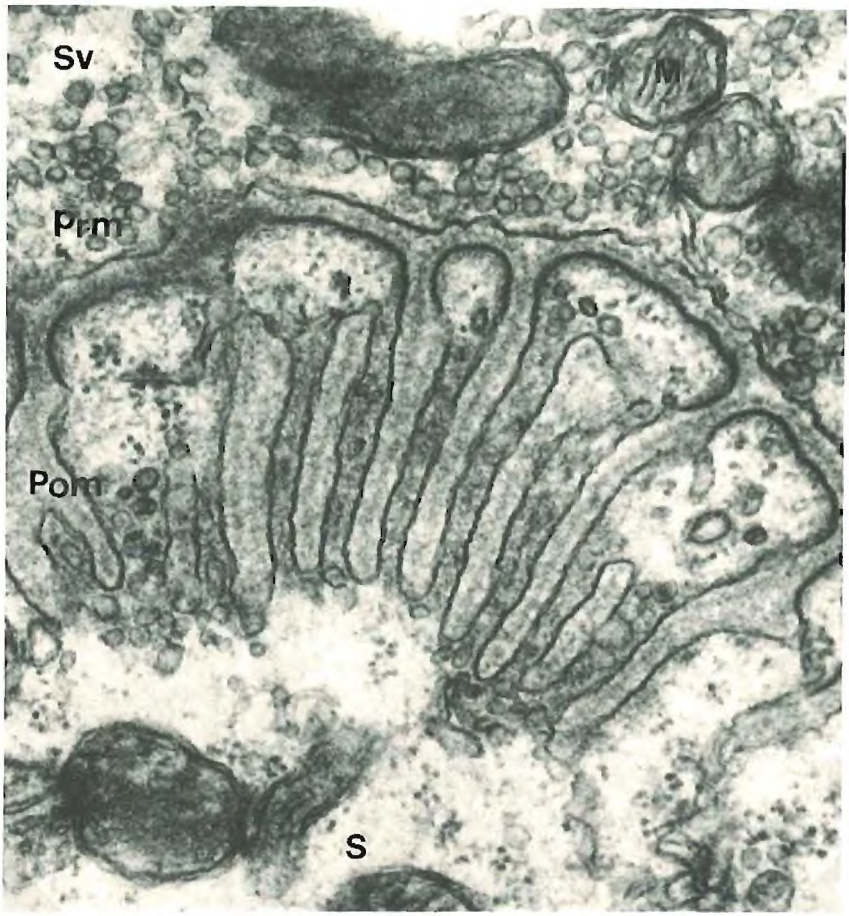


Bild 19: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittes durch eine Muskelendplatte des Maus-Zwerchfelles. Oben mit vielen hellen Vesikeln (Sv) und dunkeln Mitochondrien (M) das terminale Nervenaxon, begrenzt durch die oft etwas gewellte präsynaptische Membran (Prm). Einige offene Vesikel stehen in direktem Kontakt mit der Membran. Darunter die postsynaptische Membran (Pom) mit langen Falten ins Sarcoplasma (S) der Muskelfaser eindringend. Die Membran gegenüber dem Axon ist verdickt und enthält die cholinergen Rezeptoren sowie die Acetylcholinesterase. Der Synapsenspalt zwischen den Membranen enthält organisches Material verschiedener Dichte. Vergrösserung 100 000fach; Fixation: Glutaraldehyd/OsO_4; Kontrastierung: Uranylacetat, Reynolds lead.

Fig. 19: Electronmicrograph of thin-sectioned endplate in the mouse diaphragm. At the top the terminal nerve axon with many transparent vesicles (Sv) and dark mitochondria (M) bounded by the presynaptic membrane (Prm). The partly wavy membrane has direct contact with open vesicles. Below, the folds of the postsynaptic membrane (Pom) enter deeply into the sarcoplasm (S). The membrane is thickened directly opposite the axon and contains cholinergic receptors and acetylcholinesterase. The synaptic cleft between the membranes contains organic material of varying structure. Magnification 100000-fold; Fixation: glutaraldehyde/OsO_4; contrasted by uranylacetate, Reynolds lead.

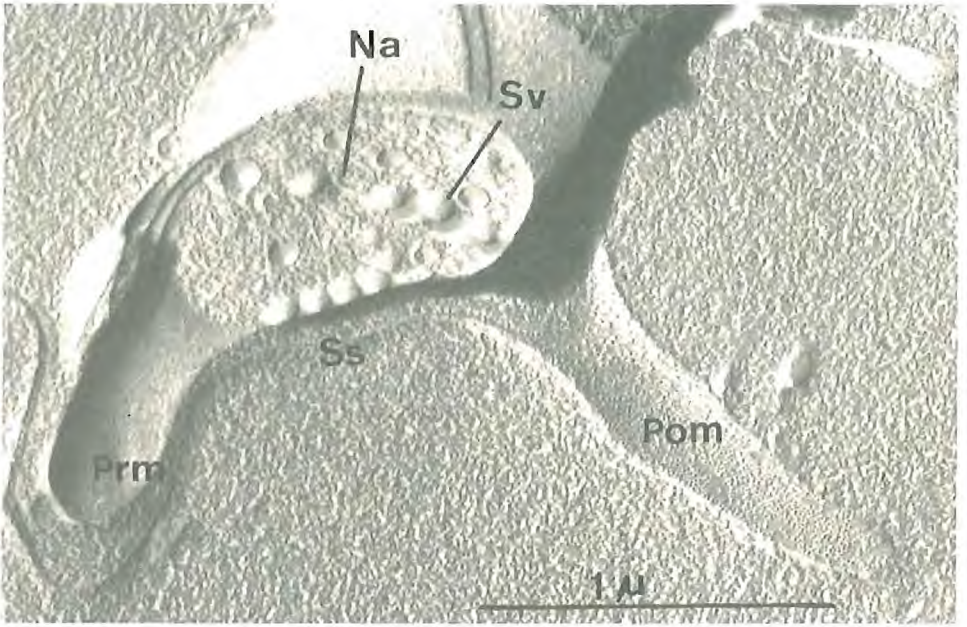


Bild 20: Elektrisches Organ des *T. marmorata* bei 4 °C, nicht stimuliert. Zahlreiche Vesikel (Sv) sind direkt an der präsynaptischen Membran (Prm) aufgereiht bereit, Acetylcholin in den Synapsenspalt (Ss) abzugeben. Die postsynaptische Membran (Pom) ist dicht mit Partikeln (Acetylcholinesterase?) und gegenüber dem Nervenaxon (Na) mit Rezeptorkomplexen besetzt. Gefrierätzung, Vergrösserung 50 000fach.

Fig. 20: Electric organ of *T. marmorata* at 4 °C, unstimulated. Many vesicles (Sv) are lined up on the presynaptic membrane (Prm), ready to deliver acetylcholine into the synaptic cleft (Ss). The postsynaptic membrane (Pom) contains many particles, some with smooth appearance in the invaginations (acetylcholinesterase?) and others with rough appearance opposite the nerve axon (Na) with receptor complexes. Freeze-etching, magnification 50 000-fold.

nenmikroskopen gute Abbildungen mit molekularer Auflösung zu erhalten, wie das ja auch für Enzyme, grosse Proteine oder Nucleinsäuren nur mit Röntgenbeugungstechnik erreicht wird. Immerhin liegen bereits Röntgenbeugungsuntersuchungen an membrangebundenen nAchR vor (Bild auf Umschlagseite), welche eine Auflösung von 2–0,17 nm erlauben (M. J. Ross et al., 1977).

Da bis heute nur für die Cholinesterasen und Cholinacetyltransferase histochemische Nachweisverfahren verfügbar sind, wurde versucht, die nikotinischen Rezeptoren durch Bindung von radioaktiven Molekülen, z. B. markierten Curarestoffen, cholinergen Verbindungen (P. G. Waser, 1960, 1962, 1963, 1971, 1975) oder mit sehr stark haftenden Schlangentoxinen und synthetischen «affinity labels» zu identifizieren (siehe 4.5). Mit Hilfe der Autoradiographie wurden so erstmals Rezeptoren dargestellt und die Anzahl gebundener Curaremoleküle oder depolarisierender Verbindungen in den motorischen

Endplatten im Zwerchfell der Maus bestimmt (P. G. Waser, U. Lüthi, 1956, 1957). Auf diese Arbeiten soll hier eingegangen werden.

4.2 Radioaktive, curarisierende und depolarisierende Verbindungen.

Natürliche und synthetische, mit ^{14}C-radioaktiv markierte Curareverbindungen[4] (Bild 21), die die postsynaptische Membran nicht depolarisieren, sondern das Membranpotential stabilisieren, werden alle in gleicher Weise an den Endplatten des Mäusediaphragmas gebunden (Bild 22). Die Radioaktivität ist auf die Endplatten konzentriert (Bild 23). Nur die weniger stark, d. h. weniger

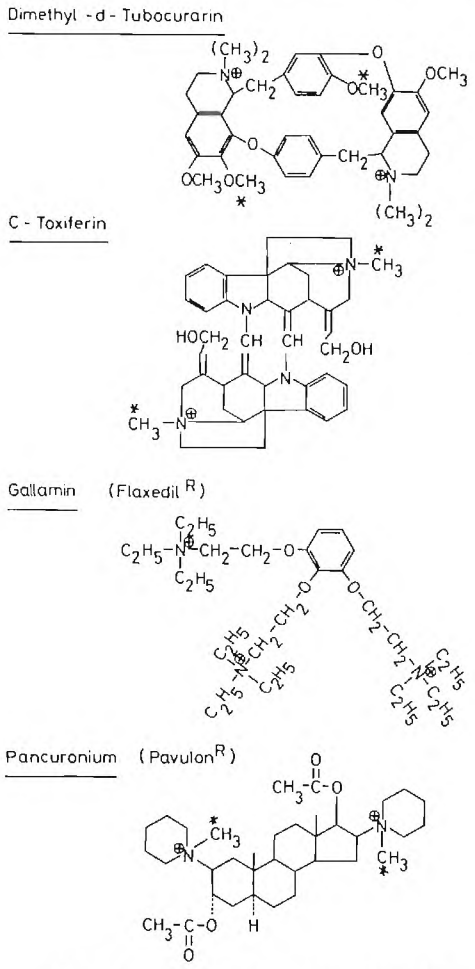


Bild 21: Verbindungen aus Tubocurare und Calebassencurare (Toxiferin) sowie synthetische Muskelrelaxantien (Gallamin, Pancuronium). Für die Wirkung sind die 2–3 quaternären N-Atome, das grosse Molekülvolumen und die meist starre Struktur wesentlich. *, radioaktives C-Atom.

Fig. 21: Curare compounds from tubo- and calabash curare (toxiferine) and synthetic muscle relaxants (gallamine, pancuronium). For the paralytic action the 2–3 quaternary N-atoms, the large molecular volume and the rigid structure are important. *, radiocarbon atom.

[4] Die Abklärung der chemischen Struktur und die Synthese zahlreicher Calebassencurare Alkaloide erfolgte in Zürich durch P. Karrer und H. Schmid (1955), die pharmakologische Charakterisierung durch P. G. Waser (1953) (vgl. P. Karrer, H. Schmid, P. G. Waser, 1960).

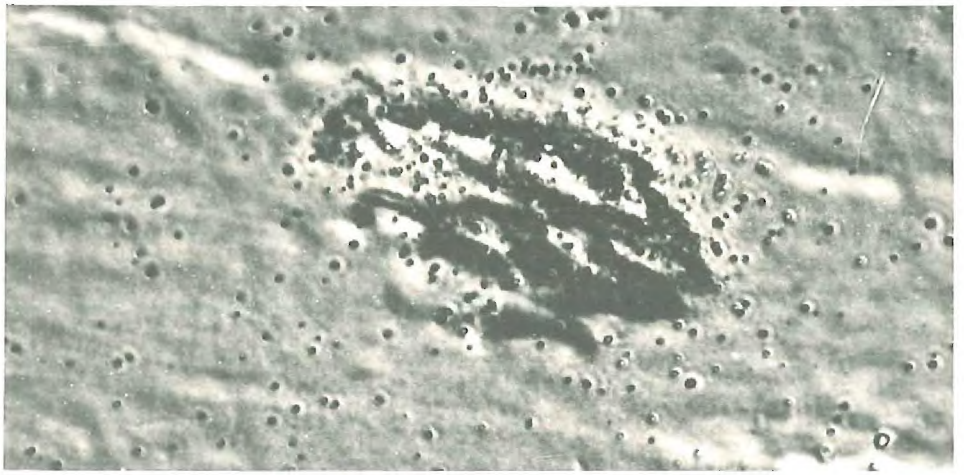


Bild 22: Autoradiographie einer Endplatte des Zwerchfells mit Koelle-Färbung der Acetylcholinesterase. Die Silberkörner, verursacht durch ^{3}H-Toxiferin, liegen direkt über den Endigungen des motorischen Nerven. Vergrösserung 2500fach.

Fig. 22: Autoradiograph of motor endplate of diaphragm, with acetylcholinesterase staining (Koelle technique). The silver grains produced by ^{3}H-toxiferine lie directly on top of the terminal branches of the nerve axon. Magnification 2500-fold.

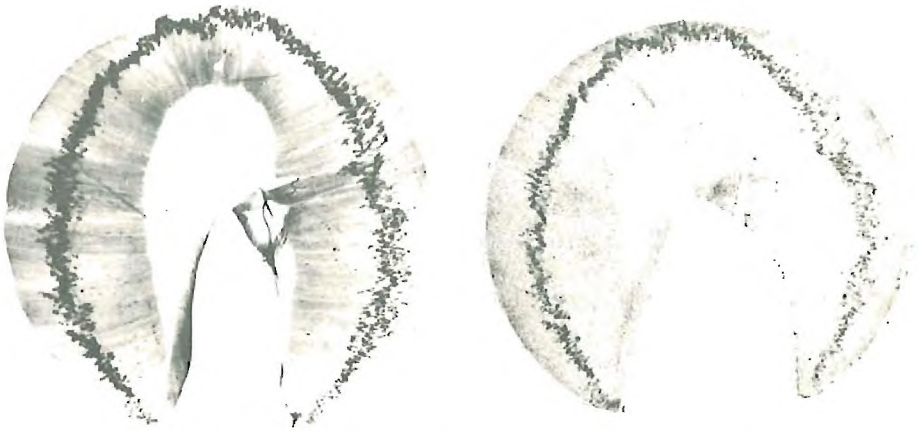


Bild 23: Mauszwerchfell von oben. Links Acetylcholinesterasefärbung der Endplatten nach G. Koelle, rechts Autoradiographie des gleichen Zwerchfelles nach intravenöser (i.v.) Injektion von ^{14}C-Toxiferin. Das Toxiferin ist in den Endplatten angereichert, wo die cholinergen Rezeptorkomplexe sind. Vergrösserung 3fach.

Fig. 23: Mouse diaphragm from above. Left side with Koelle staining of acetylcholinesterase in endplates, right side same diaphragm autoradiograph after intravenous (i. v.) injection of ^{14}C-toxiferine. Toxiferine is concentrated in the endplates where the cholinergic receptors are located. Magnification 3-fold.

spezifisch wirkenden Curarestoffe (grössere i. v. Lähmungsdosis), werden zu einem bestimmten Teil auch im Sehnengewebe (Centrum tendineum), also an einer unspezifischen Bindungsstelle an sogenannten Acceptoren gebunden (Bild 24). Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen waren folgende: Immer die gleiche Molekülzahl dieser verschiedenen Curareverbindungen ist zur Blockierung der Übertragung des nervösen Impulses auf den Muskel notwendig (Bild 25). Auch wird mit einer mehr als 10fachen Blockierungsdosis (beim Tier Letaldosis) die gleiche Anzahl Curaremoleküle ($4–5\times10^6$) pro Endplatte gefunden (Bild 26). Die Sättigung der Endplatte mit der gleichen Anzahl Moleküle verschiedener Curareverbindungen beweist, dass immer die gleichen Rezeptoren besetzt werden. Wo befinden sie sich?

Mit elektrophysiologischen Methoden kann bei einer postsynaptischen Membran im Ruhezustand ein stabiles Membranpotential infolge ungleicher Ionenverteilung gemessen werden. Wird die Membran erregt, so verliert sie diese Polarisation, weil plötzlich Natriumionen von aussen in das Zellinnere eindringen und Kaliumionen die Zelle verlassen. Diese Depolarisation ist meistens von sehr kurzer Dauer, da die Membran wieder schwer durchlässig wird und die Ionen in der Phase der Depolarisation in ihre ursprünglichen

Bild 24: Autoradiographie (rechts) eines Mauszwerchfelles nach i.v. Injektion von ^{14}C-Calebassencurarin. Acetylcholinesterasefärbung des gleichen Zwerchfelles links. Curarin ist in den Endplatten und im Centrum tendineum angereichert, d.h. an spezifischen Rezeptoren und an unspezifischen Acceptoren (saure Mucopolysaccharide im Sehnengewebe). Vergrösserung 3fach.

Fig. 24: Autoradiograph (right side) of mouse diaphragm after i.v. injection of ^{14}C-calabash-curarine. Acetylcholinesterase staining of same diaphragm on left side. Curarine is concentrated in endplates and centrum tendineum, i.e. on specific receptors and on unspecific acceptors (acid mucopolysaccharides in the tendon). Magnification 3-fold.

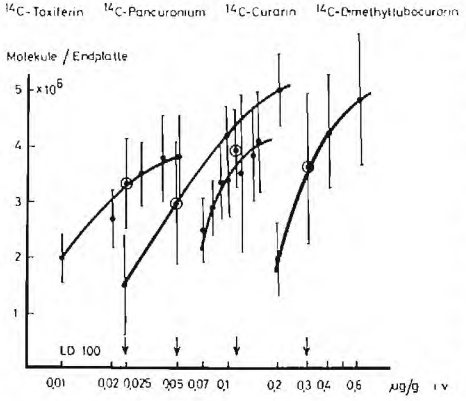


Bild 25: Molekülzahl in einer Endplatte des Mauszwerchfelles nach i.v. Injektion verschiedener Curarestoffe. Trotz unterschiedlicher Letaldosen (Pfeile für LD_{100}) annähernd gleiche Molekülzahl in den Endplatten (o) und für Sättigung der Rezeptoren (4–5×10^6 Moleküle/Endplatte) mit supraletalen Dosen.

Fig. 25: Number of molecules per endplate after i.v. injection of different doses of curarizing compounds. Lethal doses (LD_{100} indicated by arrows) are quite different, but do label a similar number of receptors in the endplates (o), and with supralethal doses for saturation of the endplate receptors (4–5×10^6 molecules/endplate).

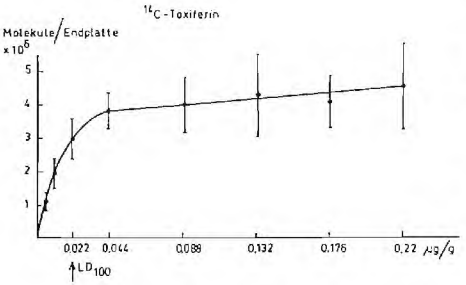


Bild 26: Sättigung der postsynaptischen Membran der Endplatten mit 4–5×10^6 ^{14}C-Toxiferin-Molekülen innerhalb der doppelten bis 10-fachen i.v. Letaldosis (Maus künstlich beatmet).

Fig. 26: Saturation of the postsynaptic membrane of endplate with 4–5×10^6 molecules ^{14}C-toxiferine within a range of twice to tenfold i.v. lethal dose (mouse artificially respirated).

Räume zurückgepumpt werden (Bild 27). Gleichzeitige Messung des postsynaptischen Membranpotentiales mit Mikroelektroden bei einem isolierten Nerv-Muskelpräparat zeigt die zunehmende Besetzung der Rezeptor-Bindungsstellen mit Curaremolekülen bei steigender Konzentration im Bad unter gleichzeitiger Abnahme der durch Nervenreizung ausgelösten Endplattenpotentiale. Nach Unterschreitung eines Schwellenwertes löst das Endplattenpotential keine Muskelkontraktion mehr aus. Durch zunehmende Curarisierung wird dieses unterschwellige Endplattenpotential noch kleiner und verschwindet vollständig (Bild 28), sobald die Membran mit Curaremolekülen gesättigt ist (C. G. Caratsch et al., 1979). Mit molekularen Begriffen erklärt, bedeutet dies die zunehmende Schliessung von Ionenkanälen in der Membran durch die voluminösen und oft starren Curaremoleküle. Sie scheinen diese temporär offenen Kanäle zu verstopfen, dadurch eine Depolarisation und in der Folge eine Muskelkontraktion durch Nervenreiz zu verhindern (P. G. Waser, 1959, 1971, 1975). Die Inkubation eines Nerv-Muskelpräparates während unterschiedlicher Dauer (1, 5, 10 oder 60 Min.) in einer Curarelösung zeigt, dass schon nach einer Minute die Sättigung der Membran fast vollständig erreicht ist und auch nach 60 Minuten höchstens 10–15% mehr Moleküle gebunden werden. Die Bindung muss daher an der Oberfläche der Membran

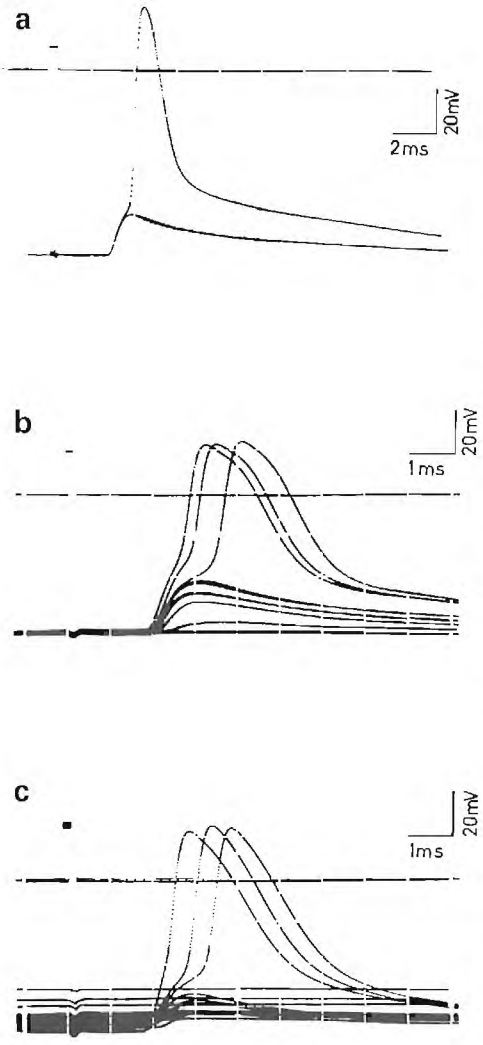


Bild 27: Membranpotentiale von motorischen Endplatten (Froschmuskel) gemessen mit intrazellulären Mikroelektroden. Obere Linie: Nullpotential mit Signal für elektrische Reizung des Nerven; untere Linie: Ruhepotential bei −70 bis −90 mV. *a*, Endplatten-Potential an der Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentiales der Muskelfaser (Spitze über 0-Potential). *b*, Mit Curare in der Badlösung zunehmende Verkleinerung des Endplattenpotentiales bis zur vollständigen Unterdrückung. Sobald das Schwellenpotential unterschritten ist, folgt kein Aktionspotential. Lähmungstyp: nicht depolarisierend, aber Membran stabilisierend. *c*, Mit Decamethonium wird das Ruhepotential durch Dauerdepolarisation vermindert und die Entstehung eines Endplatten-Potentiales zunehmend unterdrückt. Dadurch kann auch kein Aktionspotential ausgelöst werden. Lähmungstyp: Depolarisation.

Fig. 27: Membrane potentials of motor endplates (frog sartorius muscle) recorded with intracellular microelectrodes. Upper line: zero-potential with the signal for electrical stimulation of the nerve; lower line: resting potentials (−70 to −90 mV). *a*, Endplate potential at the threshold for eliciting an action potential of the muscle fiber (spike-overshoot over the zero potential). *b*, Addition of curare to the bath causes a progressive reduction of the endplate potential down to complete suppression. After falling short of the threshold level no more action potentials can be elicited. Type of paralysis: not depolarizing but membrane stabilizing. *c*, With the addition of decamethonium the resting potential of the membrane is reduced through a persistent depolarization, and therefore the rise of an endplate potential becomes progressively blocked. Type of paralysis: depolarizing.

erfolgen und kann durch Auswaschen leicht gelöst werden. Die Badtemperatur hat ebenfalls einen Einfluss auf die absorbierte Molekülmenge. In physiologischer Temperatur (37 ° C) werden mehr Moleküle bei Lähmung gebunden als bei tiefer Temperatur (17 ° C), was wahrscheinlich durch eine erhöhte Rezeptorenzahl in der Lipidmembran und durch eine verstärkte Bindung verursacht wird. Bei physiologischem pH 7,4 werden zur Lähmung mehr Moleküle gebunden als bei höherem (8,2) oder tieferem (6,2) pH. Das alles deutete darauf hin, dass die Curaremoleküle mit schwachen Bindungskräften an Proteine auf der Aussenseite der postsynaptischen Membran fixiert werden (P. G. Wa-

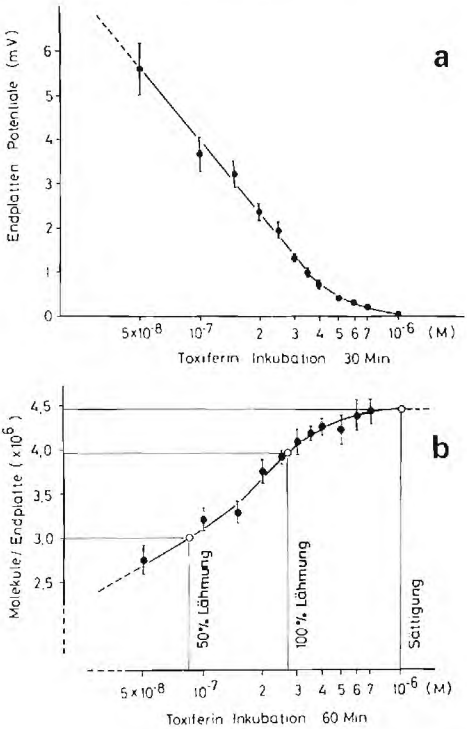


Bild 28: *a.* Wirkung von ^{14}C-Toxiferin auf die Amplitude von Endplattenpotentialen eines Mauszwerchfelles. Vollständige Unterdrükkung bei 10^{-6} M Toxiferin während 30 Minuten. *b.* Autoradiographisch bestimmte Zahl von ^{14}C-Toxiferinmolekülen in den Endplatten bei steigender Konzentration. A, 50% Lähmung; B, 100% Lähmung der Muskelzuckung; C, vollständiger Block der Depolarisation durch Acetylcholin, freigesetzt nach Stimulierung des Nerven, bei 10^{-6} M Toxiferin.

Fig. 28: *a.* Effect of ^{14}C-toxiferine on the amplitude of endplate potentials of a mouse diaphragm. Complete suppression at concentration of 10^{-6} M toxiferine applied for 30 min. *b.* Autoradiographically-measured binding of ^{14}C-toxiferine molecules at the endplates with increasing concentration. A, 50% paralysis; B, 100% paralysis of muscle twitch; C, complete block of depolarizing effect by acetylcholine, liberated after nerve stimulation, with 10^{-6} M toxiferine.

ser, 1970). Die Vorstellung, dass Curare Ionenkanäle, die mit cholinergen Rezeptoren in Verbindung stehen, verschliesst und wieder öffnet, wurde kürzlich bestätigt (A. Trautmann, 1982).

Eine Denervierung, d. h. Durchtrennung des die Endplatten versorgenden motorischen Nerven (N. phrenicus), verändert vor allem das präsynaptische Nervenaxon, die postsynaptische Membran jedoch nur wenig. Diese kann während 40–60 Tagen unverändert radioaktives Curarin binden, obwohl das präsynaptische Axon rasch zerfällt (E. Nickel, P. G. Waser, 1968). Nur unmittelbar nach der Denervierung wird auch hier etwas mehr Curare gebunden, vielleicht als Zeichen einer Sensibilisierung durch Vermehrung der cholinergen Rezeptoren. Der grösste Anteil der cholinergen Rezeptoren in Endplatten ist daher in der postsynaptischen Membran lokalisiert (P. G. Waser, 1958; P. G. Waser, I. Hadorn, 1961).

Zur autoradiographischen Darstellung der cholinergen Rezeptoren wurden depolarisierende, mit ^{14}C markierte Verbindungen wie Decamethonium, Muscaron, Carbachol (Bild 29), aber nicht das rasch hydrolysierbare Acetylcholin verwendet. Diese direkt am AchR angreifenden Pharmaka, besonders das stark radioaktive Decamethonium, zeigen eine Verteilung im Bereich der Endplatten in Form eines Bandes (Bild 30), zu dem auch Rezeptoren der Muskel-

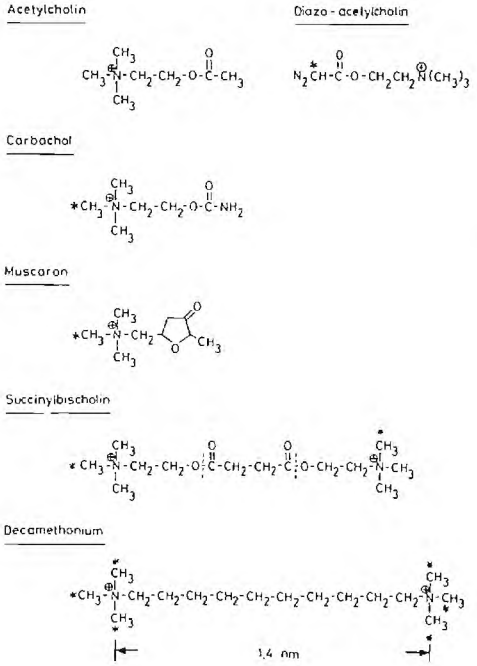


Bild 29: Depolarisierende ^{14}C-markierte Verbindungen mit cholinerger Wirkung. Succinylbischolin (Suxamethonium) und Decamethonium sind depolarisierende Muskelrelaxantien. * Radiokohlenstoff.

Fig. 29: Depolarizing ^{14}C-labeled cholinergic compounds. Succinylbischoline (suxamethonium) and decamethonium are depolarizing muscle relaxants. * radiocarbon.

membran direkt um die Endplatten gehören (P. G. Waser, 1971). Die Molekülzahl pro Endplatte ist gegenüber den Curaremolekülen ca. 10mal grösser (70×10^6); in der gesamten nahen Synapsen-Region werden sogar $1{,}6-1{,}9 \times 10^9$ Moleküle gefunden. Eine Sättigung mit Muscaron (Bild 31), dem Acetylcholin-Analogen, wird durch $50-70 \times 10^6$ Moleküle angenähert. Für das flexible und leicht verformbare Decamethonium wird keine Sättigung erreicht, weil nach 10–20 Minuten diese Moleküle durch die Poren der postsynaptischen Membran in die Muskelzelle eindringen und sich im Sarkoplasma verteilen (P. G. Waser, 1965, R. Creese, J. M. England, 1970, R. Creese, J. Maclagan, 1970). Wichtig ist auch die Feststellung, dass die depolarisierenden Verbindungen in 10fach grösserer Konzentration gebunden werden als Curare.

4.3 Acetylcholinesterase (AchE)

Die Acetylcholinesterase kann ebenfalls autoradiographisch dargestellt und die Anzahl der aktiven Zentren quantitativ bestimmt werden (P. G. Waser und J. Reller, 1965). Hierzu wurde ^{14}C-Diisopropylfluorophosphat (DFP) verwendet. In einer Endplatte wurde mit markierten Anticholinesterasen eine Sättigung mit $2-2{,}4 \times 10^7$ Molekülen DFP erreicht. Wenn man berücksichtigt, dass das grosse Molekül (MG: 320 000) der Acetylcholinesterase vier Untereinhei-

Bild 30: Autoradiographie eines Mauszwerchfelles nach i.v. Injektion von ^{14}C-Decamethonium. Breite Verteilung der Radioaktivität um die Endplatten im Gebiet der synaptischen und extrasynaptischen cholinergen Rezeptoren. Vergrösserung 3fach.

Fig. 30: Autoradiograph of mouse diaphragm after i.v. injection of ^{14}C-decamethonium. Distribution of radioactivity around endplates in the region of junctional and extrajunctional cholinergic receptors. Magnification 3-fold.

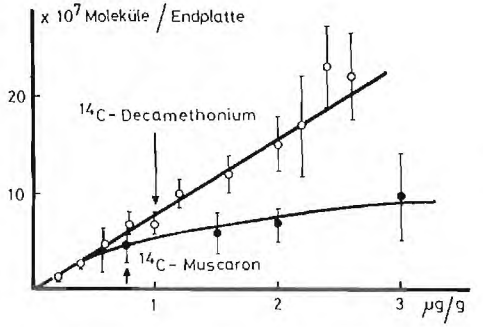
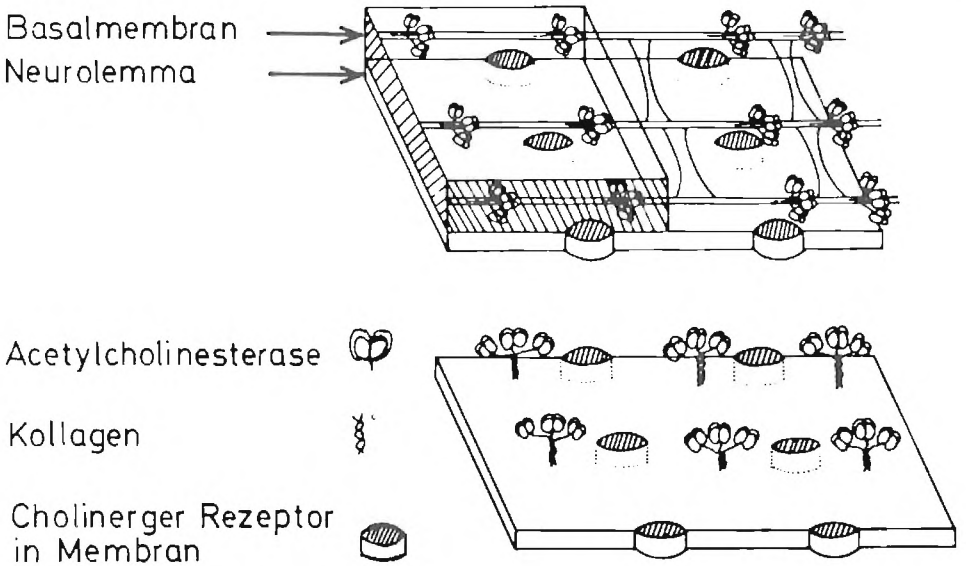


Bild 31: Anzahl depolarisierende Moleküle pro Endplatte (Maus Zwerchfell) nach steigenden i.v. Dosen. Pfeile: LD_{100}. Decamethonium ohne Sättigung, Muscaron mit Annäherung einer Sättigung.

Fig. 31: Number of depolarizing molecules occupying the endplate in mouse diaphragm after i.v. injection. Arrows: LD_{100}. No saturation with decamethonium, convergence to saturation with muscarone.

ten (Bild 32) mit je einem aktiven Enzymzentrum enthält (J. Massoulié, S. Bon, M. Vigny, 1980), können für den gesamten Enzymkomplex pro Endplatte $5-6 \times 10^6$ Moleküle errechnet werden. Diese Zahl ist vergleichbar mit den Bindungsstellen für Curare. Sie könnten daher einer gleichen strukturellen Einheit, z. B. einer Membranpore oder einem Kanal angehören, ohne dem gleichen Protein zu entsprechen (P. Taylor et al., 1978). Curarestoffe haben im übrigen sehr schlechte Anticholinesterase-Wirkung.

Die Denervierung zeigt ebenfalls den engen Zusammenhang zwischen Curare-Rezeptor und Acetylcholinesterase. Die Enzymfärbung (nach G. B. Koelle, J. S. Friedenwald, 1949 oder M. I. Karnovsky, 1964) und die gleichzeitige Bindung von ^{14}C-Curare in den Endplatten nehmen in den ersten 4 Tagen nach Denervierung deutlich zu, und dann während der nächsten 2–3 Monate langsam bis zu allgemeinen Muskelwerten ab (P. G. Waser, 1958; P. G. Waser und I. Hadorn, 1961). Demgegenüber verteilen sich nach der Denervierung die cholinergen Rezeptoren und an sie gebundenes depolarisierendes radio-



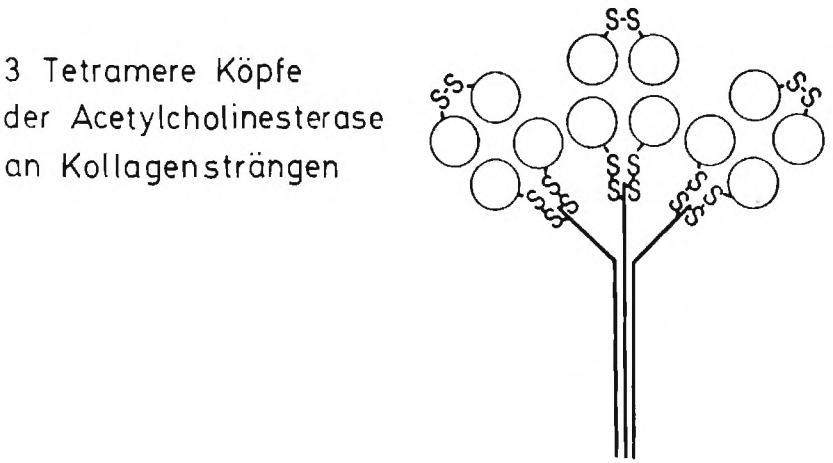


Bild 32: Modelle für die Bindung der Acetylcholinesterase an der Aussenseite der postsynaptischen Membran (P. Taylor et al. 1978) und für die molekulare Struktur dieses Enzyms (J. Massoulié et al., 1980).

Fig. 32: Models of association of acetylcholinesterase on the outside of the postsynaptic membrane (P. Taylor et al. 1978) and of the molecular structure of the enzyme (J. Massoulié et al., 1980).

aktives Decamethonium in der Autoradiographie innerhalb von 10 Tagen von den Endplatten aus über die ganze Länge der Muskelfasern (P. Truog, P. G. Waser, 1970). Nach Durchtrennung des den Muskel versorgenden Nerven (N. phrenicus) müssen neue cholinerge Rezeptoren in der Muskelmembran entstanden sein, die zwar depolarisierende Decamethonium-, jedoch keine Curaremoleküle binden.

4.4 Das erste Porenmodell der Membran-Rezeptoren

Auf Grund dieser quantitativen Messungen wurde ein Modell der postsynaptischen Membran entwickelt (Bild 33), in dem die cholinergen Rezeptoren um die Poren in der Membran gruppiert sind (P. G. Waser, 1957, 1962, 1970). Dieser Bauplan wurde später von verschiedenen Arbeitsgruppen weiterentwickelt (E. de Robertis, 1975; J. P. Changeux, 1981). In Bild 34 liegen die spezifischen cholinergen Bindungsstellen deutlich auf der Aussenseite der Membran, entsprechend den Untersuchungen von J. del Castillo und B. Katz (1955). Sie zeigten, dass iontophoretisch injiziertes Acetylcholin nur dann ein Endplattenpotential auslöst, wenn es an der Aussenseite der Membran, nicht aber im Zellinnern, d. h. an der Innenseite, injiziert wird. Dessen ungeachtet nehmen heute einige Forscher an, die cholinergen Rezeptoren seien tief in den Kanälen lokalisiert. Wir konnten mit Histoautoradiographien feststellen, dass Decamethoniummoleküle in einer zweiten Phase der Depolarisation in die Membranporen eindringen und diese vorübergehend verstopfen (P. G. Waser, 1965). Dadurch kommt es allerdings zu einem unerwarteten Wechsel vom cho-

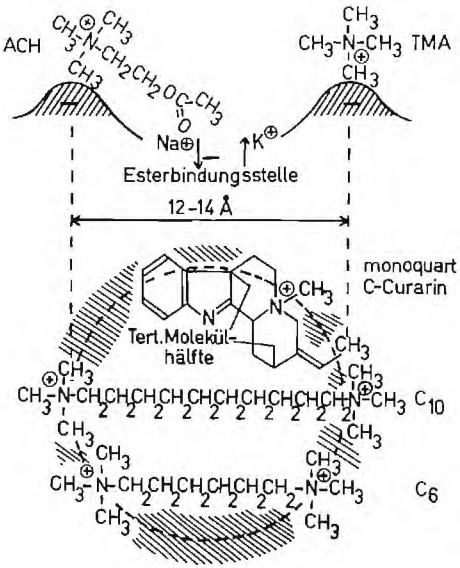


Bild 33: Erstes Porenmodell eines cholinergen Rezeptors in der motorischen Endplatte (P. G. Waser, 1957). Verschieden lange bisquaternäre depolarisierende Verbindungen werden an anionischen Rezeptorstellen gebunden. Grosse Curaremoleküle wie C-Curarin (Struktur damals noch nicht vollständig bekannt) verstopfen die Pore. C_{10}: Decamethonium, C_6: Hexamethonium, TMA: Tetramethylammonium.

Fig. 33: First model of the membrane pore in cholinergic receptor complex of the motor endplate (P. G. Waser, 1957). Different bisquaternary depolarizing molecules are bound to anionic receptor sites. Voluminous curare molecules such as C-curarine (at that time structure only partially known) plug the pore. C_{10}: decamethonium, C_6: hexamethonium, TMA: tetramethylammonium.

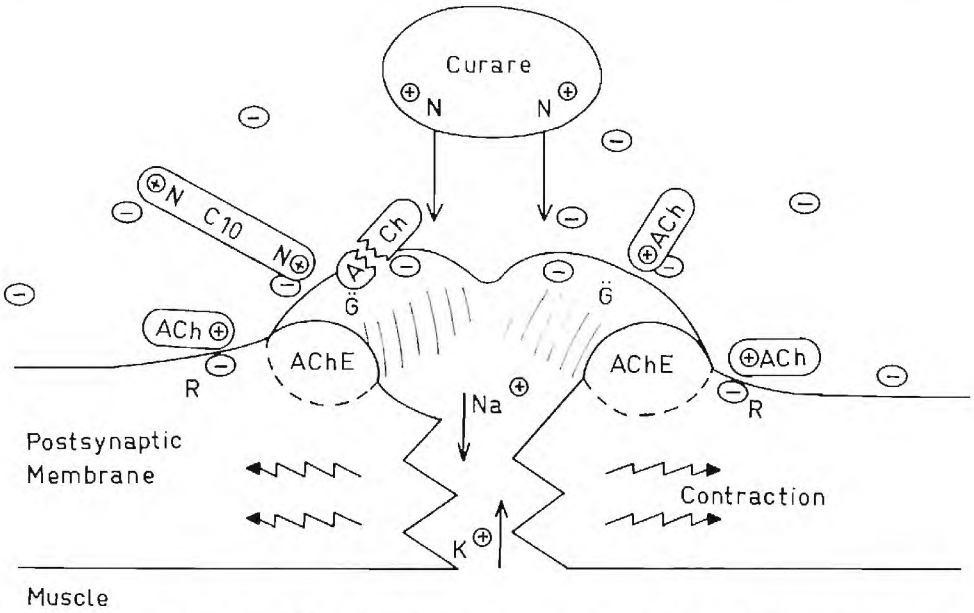


Bild 34: Porenmodell von 1970, in dem die zahlenmässigen Anteile der Bindungsstellen für Acetylcholin (ACh), Curare, Decamethonium (C 10) und die aktiven Zentren der Acetylcholinesterase (AChE) berücksichtigt sind. Aktivierung der cholinergen Rezeptoren (R) führt zur Konformationsänderung der Membranproteine und Öffnung des Ionenkanales. Die Depolarisation wird durch Verschluss des Ionenkanals mit grossen Curaremolekülen verhindert. Decamethonium (C 10) besetzt zuerst Rezeptoren ausserhalb der Pore, bevor es in diese eindringt und sie verstopft.

Fig. 34: Model of membrane pore of 1970, in which the proportion of binding sites for acetylcholine (ACh), curare, decamethonium (C 10) and active centers of acetylcholinesterase (AChE) are represented. Activation of cholinergic receptors (R) changes the conformation of membrane proteins and opens the ionic channel. Depolarization is blocked by plugging of the ionic channel by large curare molecules. Decamethonium, first occupies receptors around the pore before entering and plugging the ionic channel.

linergen Wirkungstyp, d. h. der Depolarisation zur klassischen curareartigen Lähmung, entsprechend der Abdichtung der Membran durch die grossen Curaremoleküle.

Verschiedene elektronenmikroskopische Untersuchungen mit hoher Auflösung (Bild 35) zeigen die Poren in der postsynaptischen Membran (J. P. Changeux, 1981; F. Grohovaz et al., 1982; E. Holtzman et al., 1982; W. Schiebler, F. Hucho, 1978; D. S. Wise et al., 1981). Rezeptorenkomplexe erscheinen dort als Rosetten aus 5–6 Untereinheiten mit einem äusseren Durchmesser von 8–9 nm und einer Lochbreite von 1–5 nm. Am Rande von Membranstücken erkennt man, dass sie auf der Aussenseite sitzen und in den Synapsenspalt hinausragen. Die Dichte beträgt 8–12 000/μm^2 und entspricht daher der von uns früher bei Gefrierätzung bestimmten Partikelzahl (P. G. Waser, 1971).

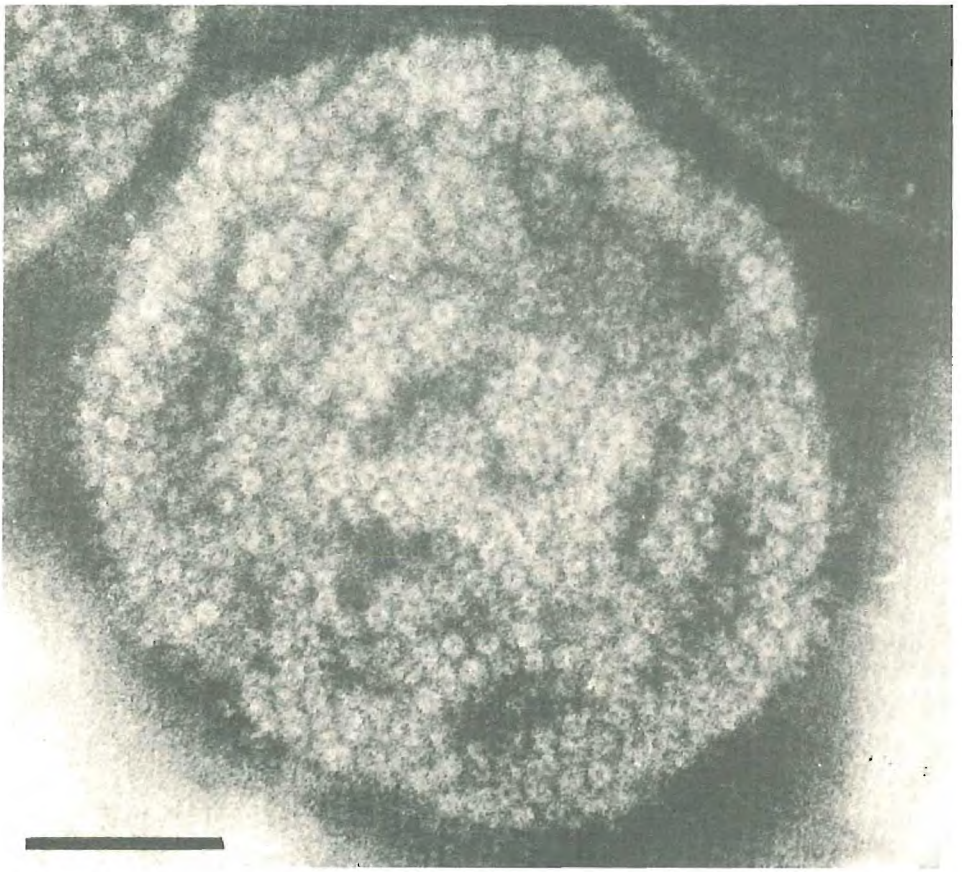


Bild 35: Elektronenmikroskopisches Bild einer Membranvesikel aus dem elektrischen Organ des *T. californica*. Dichte Besetzung mit cholinergen Rezeptorkomplexen, die am Rand deutlich herausragen (W. Schiebler, F. Hucho 1978). Balken = 50 nm. Vergrösserung 500 000fach.

Fig. 35: Electronmicrograph of membrane vesicle from electric organ of *T. californica*, densely packed with cholinergic receptor complexes extending outward from the vesical surface (W. Schiebler, F. Hucho 1978). Bar = 50 nm. Magnification 500 000-fold.

Auch die Besetzung mit 5×10^6 Curaremolekülen auf der Oberfläche von ca. 500 μm^2 unter Berücksichtigung nur der verdickten postsynaptischen Membran (Bild 19) einer Zwerchfell-Endplatte ergibt eine Dichte von etwa 10 000 Molekülen/μm^2.

4.5 Affinitätsmarkierung des nAchR

Cholinerge Rezeptorstellen können durch kovalente Bindung eines radioaktiv markierten Agonisten dargestellt werden. Diese «affinity labels» haben spezi-

fische pharmakophore Gruppen für den Rezeptor und direkt daneben eine chemisch reaktive Gruppe, die eine schwer lösbare bis irreversible Bindung mit den Biopolymeren eingeht. Dadurch wird der Rezeptor morphologisch markiert, und das gebundene Rezeptorsubstrat kann in der Folge isoliert, gereinigt und charakterisiert werden. Zu diesem Zweck werden heute meistens Elapiden-Neurotoxine (α-Bungarotoxin, das Gift der *Bungarus multicinctus* [Taiwan], Cobratoxine, besonders der *Naja naja siamensis*) verwendet, die mit ^{3}H, ^{125}I oder ^{131}I radioaktiv markiert sind. Diese Proteine haben ein Molekülgewicht von 6–8000 und wirken stark curarisierend (B. Miledi, P. Molinoff, L. T. Potter, 1971; R. Miledi, L. T. Potter, 1971). Ihre Bindung erfolgt langsam und bleibt auch bei der biochemischen Reinigung als Komplex mit den nikotinischen Rezeptoren bestehen. Es werden 30–50 000 Moleküle α-Bungarotoxin pro μm^2 im elektrischen Organ gebunden (J. P. Changeux, 1981).

Wir haben zur Affinitätsmarkierung ein viel kleineres Molekül (Bild 36), das Diazo-Acetylcholin (DAch), verwendet (P. G. Waser et al., 1970, 1973), das von R. Schwyzer und seinen Mitarbeitern (J. Frank, R. Schwyzer, 1970) zuerst hergestellt wurde. Es hat den grossen Vorteil, ein kleines Agonistenmolekül zu sein, das der Struktur des Acetylcholins sehr nahe kommt. Iontophoretisch appliziert depolarisiert es Endplatten ähnlich wie der natürliche Transmittor (P. G. Waser el al., 1975), wird aber nicht durch Acetylcholinesterase hydrolysiert. Bestrahlung mit ultraviolettem Licht spaltet Stickstoff ab. Das dadurch gebildete, ungesättigte Carben ist sehr reaktiv und bindet sich sofort kovalent an ein elektrophiles Zentrum im Rezeptorprotein direkt neben der spezifischen Acetylcholin-Bindungsstelle. Da sich in den Endplatten des sehr dünnen Mauszwerchfelles besonders viele Agonistenmoleküle in Rezeptorbindung befinden, wird dort durch UV-Bestrahlung am meisten ^{14}C-DAch irreversibel fixiert (Bild 37). In Abhängigkeit von der Konzentration im Extrazellulärraum kann DAch aber auch an anderen Proteinen der Muskelmembran gebunden werden. So lässt sich wohl eine Konzentrierung von Diazoacetylcholin an der postsynaptischen Membran nachweisen (Bild 38), doch führt die hohe Reaktivität des Carbenium-Moleküls auch zur Bindung an unspezifischen Proteinen.

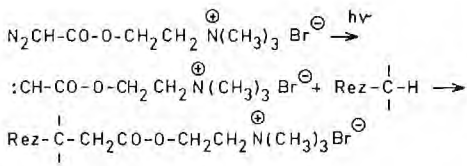


Bild 36: Diazo-Acetylcholin gibt durch UV-Bestrahlung N_2 ab und wird zu einem reaktiven Carben, das mit einer elektrophilen Rezeptorgruppe sofort eine irreversible kovalente Bindung eingeht.

Fig. 36: Diazo-acetylcholine is transformed by UV-irradiation through loss of N_2 to a highly reactive carbene, which reacts immediately with an electrophilic group on the receptor forming an irreversible covalent bond.

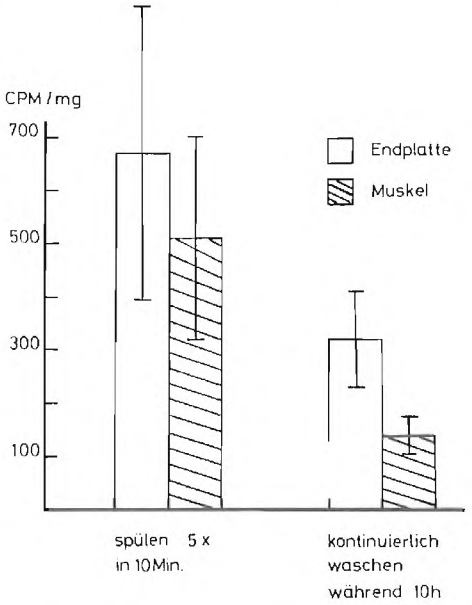


Bild 37: ^{14}C-Diazo-Acetylcholin-Bromid wird in einem isolierten Mauszwerchfell durch UV-Bestrahlung in den Endplatten irreversibel gebunden. Nach Spülen oder kontinuierlichem Waschen des Präparates bleibt die Radioaktivität (CPM) in den Endplatten konzentriert.

Fig. 37: ^{14}C-diazo-acetylcholine is fixed irreversibly in the endplates of a mouse diaphragm after UV irradiation. Even after rinsing or continuous washing the radioactivity (CPM) remains concentrated in the endplates.

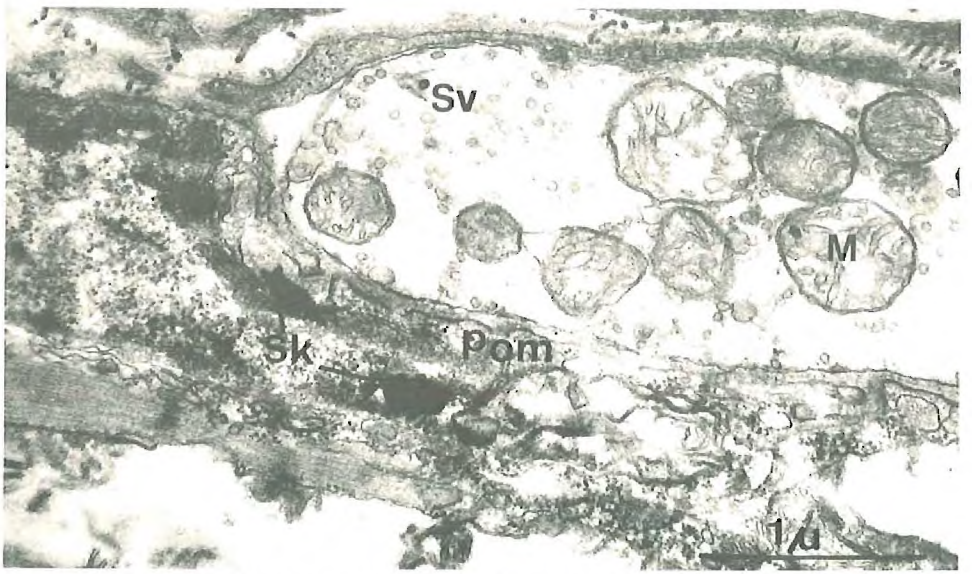


Bild 38: Autoradiographie einer Endplatte des Mauszwerchfelles nach Inkubation mit ^{14}C-Diazo-Acetylcholin (10^{-4}M) und UV-Bestrahlung. Silberkörner (SK) sind unter der postsynaptischen Membran in der Faltenregion lokalisiert. Vergrösserung: 30 000fach.

Fig. 38: Autoradiograph of endplate in mouse diaphragm after incubation with ^{14}C-diazo-acetylcholine (10^{-4}M) and UV-irradiation. Silver grains (SK) are found in the region of the postsynaptic membrane folds. Magnification: 30 000-fold.

4.6 Biochemische Isolierung und molekulare Strukturaufklärung des nAchR

Einige Forschergruppen sind mit dem Arsenal der modernen, biochemischen Methoden intensiv beschäftigt, Auskunft über die eigentliche cholinerge Rezeptorstruktur zu erhalten. Ein endgültiges Resultat liegt noch nicht vor. Doch sollen hier die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst und besprochen werden. Als Ausgangsmaterial dienen hauptsächlich elektrische Organe von *Torpedo* oder vom elektrischen Aal. Daneben werden für den nikotinischen Rezeptor Skelettmuskelhomogenate verwendet. Da dort die Endplattendichte und daher das Rezeptormaterial, verglichen mit den elektrischen Organen spärlich ist, wurde auch versucht, durch Denervierung die Rezeptordichte auf der Membran zu erhöhen. Das Gehirn ist dagegen in verschiedenen grauen Regionen reich an muscarinischen Rezeptoren und wird ebenfalls zur Isolierung als Ausgangsmaterial verwendet (Tab. 2). Sogar Insektengehirne sind auf ihre cholinergen Rezeptoren hin untersucht worden (A. T. Eldefrawi, 1976, 1980).

Wichtige Fortschritte wurden in den letzten Jahren von folgenden aktiven und hochspezialisierten Forschergruppen gemacht:

J. P. Changeux, Institut Pasteur, Paris (vgl. J. P. Changeux, 1981; J. Giraudat und J. P. Changeux, 1981; J. C. Meunier et al., 1974; R. Olsen et al., 1972).

A. T. und M. E. Eldefrawi et al., Dept. of Pharmacology, Universität Maryland, Baltimore (vgl. M. E. Eldefrawi et al.).

E. Heilbronn, Unit of Neurochemistry and Neurotoxicology, Universität Stockholm (vgl. E. Heilbronn, 1975, E. Heilbronn et al., 1972, 1974).

F. Hucho, Institut für Biochemie, Freie Universität Berlin (vgl. F. Hucho, 1981).

A. Karlin, Columbia University, New York (vgl. A. Karlin, 1979).

J. Lindstrom, Neurobiology Department, Salk Institute, San Diego (vgl. J. Lindstrom, 1979).

M. A. Raftery, California Institute of Technology, Pasadena (vgl. M. A. Raftery, 1980).

E. Reich, Rockefeller University, New York (vgl. A. Maelicke, B. W. Fulpius, E. Reich, 1977).

Ihre Techniken und Resultate sind sehr ähnlich und sollen daher gemeinsam dargestellt werden.

Die Präparation von cholinergen Rezeptorproteinen beginnt nach Homogenisierung des Ausgangsmaterials mit dem Auflösen der Membranstrukturen durch ein Netzmittel (Detergentien wie Tween, Triton X-100, Lubrol, Nonidet NP-40 oder Emulphogen in Konzentrationen von 0,5–1%). Der rohe Extrakt wird dann auf verschiedenen Chromatographie-Kolonnen über Gelfiltration, Anionenaustausch oder Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Es können auch immobiliserte Neurotoxine auf Affinitäts-Chromatographie-Kolonnen verwendet werden, sofern die Bindungsstärke nicht zu gross und eine Ablösung bei der Elution mit anderen kleinen Liganden möglich ist. Ein an-

derer Weg benützt Neurotoxin zur Bindung der Rezeptorproteine in Komplexen, die dann auf DEAE-Cellulose-Papierfiltern adsorbiert werden. Schwierigkeiten entstehen bei diesen Verfahren zuerst durch die Assoziation der Proteine mit Detergentienmicellen, die schwer abtrennbar sind, und aus der starken Bindung an die Neurotoxine, vor allem α-Bungarotoxin, welche sich nur sehr langsam (Halbwertszeit 3–15 Tage) vom Rezeptorprotein ablösen. Alle Fremdstoffe, die sich an Rezeptorproteine binden, können diese zudem denaturieren.

Durch diese Trennungsversuche wurden je nach Technik Rezeptorkomplexe mit Molekülgewichten von 180 000–380 000 isoliert. Allgemein wird heute angenommen, dass die gereinigten Proteine ein MG von 270 000 ± 10% haben, bestimmt mit SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von quervernetztem Rezeptormaterial aus *Torpedo*organen (F. Hucho et al., 1978). Weiter wurden verschiedene Untereinheiten gefunden. Zwei der fünf Polypeptidketten sind identisch, die anderen drei haben zum Teil gleiche Primärstruktur (M. A. Raftery, 1980), sind aber beträchtlich grösser. Die quaternäre Struktur des gesamten Rezeptorkomplexes hat folgende Zusammensetzung (vgl. Tabelle 3): α_2, β, γ, δ. (F. Hucho, 1981; A. Karlin et al., 1979; J. Lindstrom et al., 1979; M. A. Raftery, 1980).

Tabelle 3: Biochemische Eigenschaften des nikotinisch cholinergen Rezeptors (nAchR).

Table 3: Biochemical properties of nicotinic cholinergic receptor (nAchR).

Molekülgewicht (Dalton)	MG	270 000 ± 10%
Physikalische Daten:		
Stokes Radius		7,0 – 7,2 nm
Sedimentationswert (Ultrazentrifuge)	monomer	9 S
	dimer	13,7 S
Isoelektrisches pH		4,9
Struktur der Untereinheiten:		
Stöchiometrie		$2\alpha : \beta : \gamma : \delta$
Untereinheiten	MG	α 40–42 000
		β 48–50 000
		γ 60 000
		δ 65–68 000
Bindungsstellen für ACh		2
Bindungsstellen für α-Bungarotoxin		2

Diese Polypeptidketten enthalten wie viele andere Membranproteine (z. B. Acetylcholinesterase) Oligosaccharide, doch ist ihre Struktur und Rolle noch nicht gesichert. Zwei Rezeptorkomplexe sind in der Membran über S–S-Brükken zu einem Dimeren verbunden (W. Schiebler, G. Bandini, F. Hucho, 1980).

Elektronenmikroskopische Bilder mit Negativ-Kontrast-Technik und die detaillierte Analyse mit Computer-Bild-Mittelung ergeben eine eher hufeisen-

als ringförmige Anordnung der Untereinheiten (Bild 39), die deutlich (50 nm) aus der Lipidmembran in den Extrazellularraum herausragen, einen Durchmesser von 8–8,5 nm aussen und eine zentrale Vertiefung von 2–2,5 nm aufweisen (H. P. Zingsheim et al., 1980). Die Beziehung der Untereinheiten zueinander wurde durch Quervernetzung und SDS-Gel-Elektrophorese der Proteinanteile abgeklärt. Daraus resultiert ein Modell (Bild 39c), welches den heutigen Stand unserer Kenntnisse über die Rezeptorstruktur beschreibt (F. Hucho, 1981).

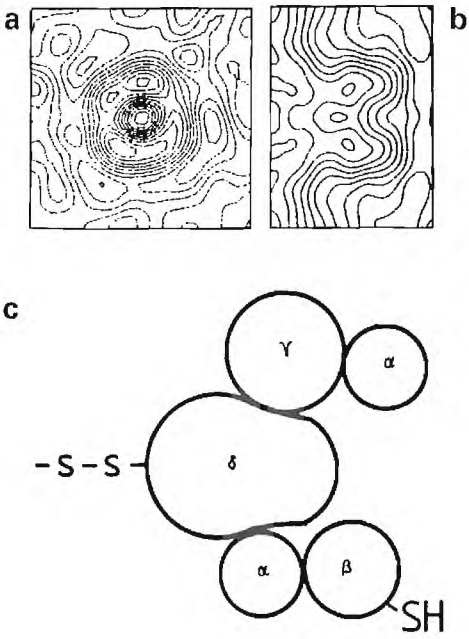


Bild 39: Computerbild-Mittelung der elektronenmikroskopischen Bilder von cholinergen Rezeptorkomplexen des *Torpedo*. Die Kurven in a und b entsprechen der gleichen Materialdichte in der Membran, aus denen das Modell c des Rezeptorkomplexes im Schnitt senkrecht zur Membranebene konstruiert wurde. -S-S-, Querverbindungen (H. P. Zingsheim et al. 1980).

Fig. 39: Computer image-averaging applied to electron micrographs of cholinergic receptor complexes of *Torpedo*. The contours in a and b represent lines of equal density in the membrane. A structural model c of the receptor complex in a cross section perpendicular to the membrane plane was constructed. -S-S-, cross linking (H. P. Zingsheim et al. 1980).

Die Funktion des quaternären Proteinkomplexes ist unbekannt, doch steht fest, dass die α-Ketten cholinerge Liganden binden. So können ihre reduzierten SH-Gruppen mit Affinitätsmarken (4-[N-Maleimido]-benzyl-tri-[^{3}H]-methylammonium-iodid) versehen oder die Ketten mit Brom-Acetylcholin alkyliert werden. α- und β-Proteine werden auch durch eine Photomarke (4-Azido-2-nitrobenzyl-trimethylammonium-fluoroborat) besetzt. α-Bungarotoxin bindet an der gleichen Stelle des α-Proteins.

Das gleiche α-Rezeptorprotein (MG 40 000) bindet auch ca. 8 Moleküle eines fluoreszierenden Lanthanides Terbium (Tb^{3+}) pro Molekül α-Bungarotoxin. Bei Anwesenheit von Calcium werden zwei verschiedene Typen von Terbium-Bindungsstellen nachweisbar, um welche die beiden Kationen konkurrieren. Calcium kann alle Terbiumionen verdrängen. Acetylcholin und Carba-

minoylcholin wirken jedoch nur am intakten Rezeptorkomplex verdrängend für 3–6 Terbiumionen, jedoch nicht auf die isolierten Proteinuntereinheiten (H. Rübsamen et al., 1978). Die Bedeutung dieses allosterischen Effektes zur Freisetzung von Calcium als «second messenger» ins Zellinnere ist nicht geklärt. Stöchiometrisch scheint der gesamte Komplex zwei Bindungsstellen für Agonisten oder Antagonisten zu haben. Die Funktion der anderen Proteine (β, γ, δ) ist ungewiss und hängt vielleicht mit Phosphorylierungsvorgängen in der Membran zusammen. Auch die Mechanismen, die zur Bildung des aktivierten Rezeptors oder seiner Desensibilisierung führen, sind bisher bei Verwendung meist denaturierter Proteine nicht abgeklärt (J. Lindstrom et al., 1979).

Die Beziehung des Rezeptors zum Ionophor (Ionenkanal) ist ebenfalls ungeklärt. Wenn der AchR den Öffnungsmechanismus (gating) durch Bindung von Agonisten in Gang setzt, wäre der Ionenkanal wohl wenig selektiv für Ionen (Na^+, K^+, Ca^{2+}, organische Kationen oder quaternäre Ammoniumionen). Der Durchmesser muss mindestens 0,6–0,8 nm betragen. Er könnte auch leicht blockiert werden durch spezifische Antagonisten (Curare, Atropin), unspezifische Phospholipasen oder Detergentien, welche sogar die gleichzeitige Bindung von spezifischen Liganden erlauben. Nicht kompetitive Antagonisten würden dagegen am Kanalprotein gebunden.

Hier müssen einige Versuche erwähnt werden, bei denen künstliche Membranen (sog. schwarze bimolekulare Lipidmembranen) zur Rekonstitution von Rezeptormembranen benützt wurden (E. de Robertis, 1975; F. Hucho, 1981; W. C. S. Wu et al., 1981). Auch Vesikel mit Rezeptorproteinen wurden hergestellt, um die Funktion der isolierten Rezeptoren durch Depolarisation mit Acetylcholin als Veränderung des Membranpotentiales zu beweisen.

Es können jedoch in solchen künstlichen Membranen auch ohne Rezeptorproteine spontan Ionenkanäle entstehen, die Depolarisationsphänomene imitieren. Anscheinend sind auch nur die globalen AchR-Komplexe (MG 270 000) membranaktiv. Die Entstehung der Ionophoren bleibt jedoch unklar. Den natürlichen Gegebenheiten am ähnlichsten sind «Mikrosäcke», die spontan aus isolierten rezeptorreichen Membranteilen gebildet werden (Bild 35). Bei diesen Vesikeln sind die Rezeptoren auf der Aussenseite, aber alle Proteine durchdringen die ganze Membran. An der Innenseite wurde ein weiteres Protein (MG 43 000) gefunden (J. P. Changeux, 1981; J. Giraudat, J. P. Changeux, 1981), dessen Bedeutung nicht geklärt ist (G. Bandini, J. Verdenhalven, F. Hucho, 1982).

Aus den elektrischen Organen des Aales *Electrophorus* werden ähnliche Proteine (A. Karlin et al., 1979) wie aus dem *Torpedo* isoliert, und auch die Rezeptoren der quergestreiften Muskeln scheinen aus gleichen Proteinen aufgebaut zu sein (C. Gotti, B. M. Conti, M. A. Raftery, 1982). Es wurde sogar schon ein phylogenetischer Stammbaum für den AChR verschiedener Tierspecies aufgestellt, der auf den gleichen Ursprung hinweist (M. A. Raftery et al., 1980).

Die Zusammensetzung aus einzelnen Aminosäuren für die *Torpedo*-Proteine α, β, γ, δ ist bekannt. Auch die N-terminale Sequenz bis zur Aminosäure 56 zeigt eine auffällige Identität von 36–50% der Aminosäuren (M. A. Raftery et al., 1980; J. Lindstrom et al., 1979). Durch Sedimentation in Sucrose-Gradienten werden zwei Arten der Rezeptorkomplexe gefunden: eine leichte L-Form mit einer Sedimentationskonstanten 8–9 S und eine schwere H-Form mit 12–13 S. Die letztere wird durch Reduktionsmittel (Mercaptoethanol, Dithiothreitol), also durch Spaltung einer Disulfidbrücke zwischen zwei grossen Proteinen (MG 66 000, d. h. δ-Protein), in die L-Form umgewandelt. Die H-Form ist daher das Dimere der L-Form.

An ähnlichen Rezeptorproteinen des Ionenkanales arbeiten A. T. und M. A. Eldefrawi et al. (1975, 1977, 1979, 1980). Auch sie benützen zur Isolierung der Rezeptorproteine Schlangentoxine, vor allem α-Bungarotoxin, um nikotinische Rezeptoren zu blockieren. Doch wurde entdeckt, dass eng mit diesen assoziiert ein Ionophor existiert, welches spezifisch Histrionicotoxin, ein Neurotoxin aus der Haut eines columbianischen Frosches, sowie Lokalanaesthetica, Amantadin, Atropin, Tetraäthylammonium u. a., aber nicht α-Bungarotoxin oder Curare bindet. Dieser Befund spricht für die Existenz eines weiteren Rezeptors im Ionophor. Diese Kanalproteine binden Stoffe, welche den Rezeptor-Komplex inaktivieren, indem sie die Poren für den Natrium/Kalium-Austausch verschliessen, auch wenn Acetylcholin den nAchR auf der Aussenseite besetzt, was mit den Resultaten der früher besprochenen Autoradiographieversuche (4.2, 4.4) übereinstimmt.

Die Charakterisierung von nAchR im Gehirn wurde mit der Bindung von ^{125}I-α-Bungarotoxin und Cobratoxin versucht. Dabei wurde aus dem Rattenhirn eine Proteinpräparation mit höchstens 1% Rezeptorgehalt gewonnen (B. J. Morley, G. E. Kemp, 1981). Die Anreicherung erfolgte in Gehirnregionen, in denen auch andere cholinerge Affinitätsmarken (siehe 5.2) gebunden werden: Cortex, Hippocampus, Hypothalamus, Raphe, Formatio reticularis, Colliculus inferior et superior, Bulbus olfactorius und andere Gebiete. Auch im Rückenmark wurde besonders im lumbalen Teil erhöhte Radioaktivität festgestellt. Es bestehen allerdings einige physikochemische Unterschiede für die Toxinbindung und Reaktionsfähigkeit dieser Proteine verglichen mit Rezeptoren aus der neuromuskulären Synapse, so dass ein struktureller Unterschied möglich ist. So wird diskutiert, ob diese nAchR präsynaptisch, nichtsynaptisch oder, wie im Muskel, postsynaptisch sind. Es wird überhaupt in Frage gestellt, ob α-Bungarotoxin und andere Neurotoxine im Gehirn sich an nAchR binden oder ob nicht bessere und spezifischere Liganden zur Markierung gefunden werden müssen.

4.7 Isolierung mit Affinitätschromatographie-Säulen

Von E. de Robertis (1971, 1975) wurde ein spezifisches hydrophobes Proteolipid mit organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Methanol, Aether) aus den

grauen Gebieten des Gehirns, aus elektrischen Organen und aus Skelettmuskeln isoliert und danach über eine Affinitätschromatographie-Kolonne, mit einem kurzen Spacer und einer cholinergen Ligandengruppe (Trimethyl-[p-aminophenyl]-Ammonium) gereinigt.

Interaktionen mit d-Tubocurarin, Serotonin, Atropin wurden mit Hilfe von Lichtstreuung und Polarisationsfluoreszenz nachgewiesen. Acetylcholin, Hexamethonium und andere cholinerge Verbindungen wurden an die Proteolipide aus elektrischen Organen mit mittlerer bis hoher Affinität (K_D $10^{-5}-10^{-7}M^{-1}$) gebunden. Unter der Einwirkung der erwähnten Pharmaka bilden sich parakristalline, stäbchenförmige Strukturen, von denen angenommen wurde, dass sie als Ionophore die Membranporen auskleiden und an der Aussenseite die Rezeptorstelle tragen würden. Für das Rezeptorprotein wurde ein Molekülgewicht von 40 000–50 000 Dalton ermittelt. Auf eine künstliche bimolekulare Membran mit Phospholipiden und Cholesterin gebracht, soll sich das Protein wie ein Kanalprotein verhalten, das die Membranporen der postsynaptischen Membran auskleidet. Durch Acetylcholin tritt an der künstlichen Membran erst bei einer hohen Konzentration ($10^{-3}-10^{-2}M$) eine Depolarisation ein, welche durch Tubocurarin blockiert wird. Die Spezifität des isolierten Proteolipides als nAchR wurde von anderer Seite angezweifelt (E. de Robertis et al., 1976; F. J. Barrantes et al., 1976).

J. Schmidt und M. A. Raftery (1973) benützten verschiedene quaternäre Ammonium-Verbindungen an Agarose zur Reinigung von nAchR aus solubilisiertem Electroplaxmaterial des *Torpedo californica,* welcher dann mit α-Bungarotoxin-Bindung nachgewiesen wurde. Nach etwa 40facher Anreicherung wurden mit SDS-Gel-Elektrophorese verschiedene Proteine (MG 34 000, 42 000 und 26 000) gefunden.

Unsere Untersuchungen wurden mit Bindungsstudien an Membranfragmenten aus den elektrischen Organen von *Torpedo marmorata* begonnen (J. T. Walser, M. C. Schaub, P. G. Waser, 1975). Homogenisiertes Material wurde in frischem Zustand mit $5\times10^{-3}M$ Sarin (zur Blockierung der AChE) inkubiert oder lyophilisiert bei −20 °C aufbewahrt. Acetylcholin sowie die cholinergen Liganden Diazoacetylcholin, Decamethonium und Carbaminoylcholin (Bild 40) binden sich nur an eine Klasse von Bindungsstellen mit verschiedener Affinität (ACh K_A: $5{,}34\times10^{6}M^{-1}$).

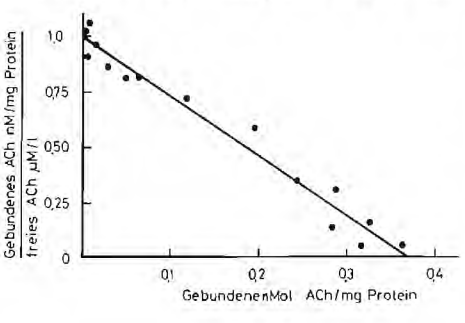


Bild 40: Scatchard Plot der Acetylcholin-Bindung an Rezeptoren in Membranfragmenten von *Torpedo*-Organen bei Gleichgewichts-Dialyse. Die Gerade weist auf nur eine Klasse von Bindungsstellen hin, mit einer mittleren Assoziationskonstanten $K_A = 5.34 \cdot 10^{-6} \cdot M^{-1}$.

Fig. 40: Scatchard plot of acetylcholine binding to receptors in membrane fragments of *Torpedo* organs in equilibrium dialysis. The straight line points to only one class of receptors with an association constant $K_A = 5.34 \cdot 10^{-6} \cdot M^{-1}$.

Der optimale pH-Wert für die Ach-Bindung liegt bei 7. Chemische Veränderungen der SH-Gruppen der Rezeptorproteine durch N-Ethyl-maleinimid (NEM-Alkylierung) beeinflussen die Ach-Bindung nicht. Dagegen wird durch Reduktion von S-S-Brücken im Protein mit Dithiothreitol (DTT) die Ach-Bindung beinahe vollständig verhindert (Bild 41). Dies geschieht sogar irreversibel, weil durch Oxydationsmittel keine Reaktivierung möglich ist. DAch verhindert die Ach-Bindung kompetitiv, wobei durch UV-Bestrahlung zur späteren Affinitätsmarkierung die Bindungskapazität um etwa 20% vermindert wurde. Eine direkte Anreicherung des AchR durch Bindung von DAch an solubilisierte Rezeptorproteine gelang jedoch wegen der grossen Reaktivität des Carbens nicht.

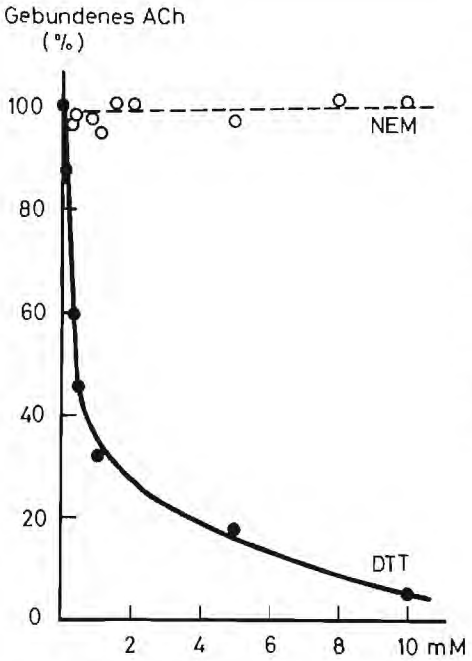


Bild 41: Einflüsse der Alkylierung mit NEM (o) und der Reduktion mit Dithiothreitol (●) auf die Bindung von Acetylcholin (Ach) an Membranrezeptoren. Während NEM SH-Gruppen im Rezeptor-Protein ausserhalb der Bindungsstellen alkyliert und ohne Einfluss auf die Ach-Bindung ist, wird durch Reduktion von -S-S-Gruppen die Bindung verunmöglicht, d.h. die Rezeptorstruktur verändert.

Fig. 41: Effect of alkylation by NEM (o) and reduction by dithiothreitol (●) on acetylcholine (Ach) binding to membrane fragments. Previous alkylation by NEM does not affect binding of Ach. Reduction by dithiothreitol however, abolished binding of Ach almost completely, as the receptor protein is changed.

Zur Isolierung der Rezeptorproteine benützen wir an Stelle der Schlangentoxine Affinitäts-Chromatographiesäulen mit chemisch definierten Liganden-, bzw. Inhibitorgruppen (P. Cuatrecasas, M. Wilcher, C. B. Anfinson, 1968). Wir verzichten auf die Verwendung von α-Bungarotoxin, welches uns als grosses Molekül (MG 8000) zur Besetzung der Rezeptorstelle nicht genügend spezifisch erschien (B. J. Morley, G. E. Kemp, 1981) und dessen starke, beinahe irreversible Bindung die spätere Reinigung des Proteins stört. Es wurde auch vermutet, dass die schlechte Bindung von ACh an die mit Toxinen isolierten Rezeptorproteine durch irreversible Konformationsänderung in der Peptidkette verursacht werde. Da als Haftgruppe Acetylcholin selbst, über ei-

ne Alkylgruppe des Ammoniumteiles mit dem Spacer verbunden, wegen seiner schnellen Hydrolyse in wässeriger Lösung als Ligand nicht in Frage kommt, synthetisierten wir verschiedene stabile Typen mit aliphatischen oder aromatischen Elementen, um entweder durch eine depolarisierende Gruppe den AchR zu binden oder um mit einer curareartigen Gruppe das entsprechende Bindungsprotein des Rezeptors zu isolieren.

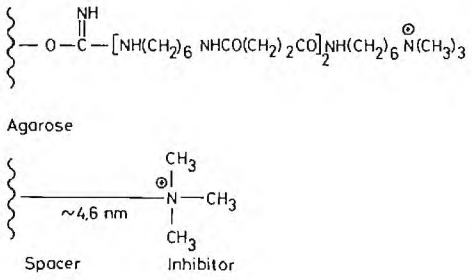


Bild 42: Affinitätschromatographie zur Isolierung von Acetylcholinesterase (AchE). Aliphatische Inhibitorgruppe mit terminalem Trimethyl-Ammoniumkopf, langer Spacer (4.6 nm) an Agarose.

Fig 42: Affinity chromatography column for isolation of acetylcholinesterase (AchE). Aliphatic inhibitor group with terminal trimethyl-ammonium head, long spacer (4.6 nm) on agarose.

Die einfachste, stabile Inhibitorgruppe für die Bindung der Acetylcholinesterase (AChE) war eine kurze aliphatische Kohlenstoffkette (Bild 42) mit endständigem Trimethyl-Ammoniumkopf (W. H. Hopff et al., 1973; W. H. Hopff, 1976). Da der Spacer, d. h. die Verbindungsgruppe zur Agarose, mindestens 4,0 nm lang ist, müssen wir annehmen, dass die grosse Selektivität dieser Chromatographiesäule zur Anreicherung und Reinigung der AChE (EC 3. 1. 1. 1. 7) auf zwei wichtigen Eigenarten beruht. Der lange Seitenarm und die endständige kationische Ammoniumgruppe ermöglichen die Bindung der voluminösen Enzymmoleküle. Die Reinigung durch diese Affinitätschromatographie-Kolonne war so gut, dass das Enzym mit höchster Aktivität erhalten wurde und aus einer konzentrierten Lösung kristallisierte (Bild 43).

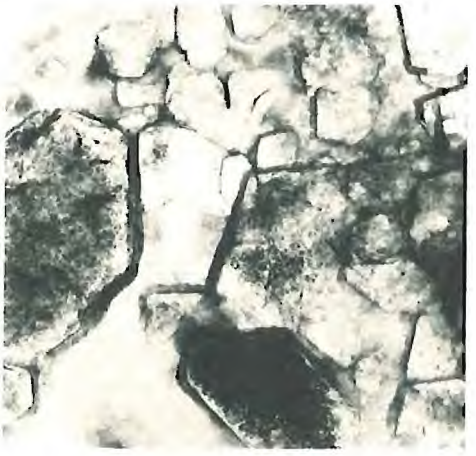


Bild 43: Kristalle der Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) aus einer mit Affinitätschromatographie konzentrierten Enzymlösung mit Ammonsulfat. Die grössten Kristalle werden bis 1/10 mm lang. Vergrösserung ca. 30 000fach.

Fig. 43: Crystals of acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) originating from concentrate of affinity chromatography with ammonium sulfate. The biggest crystals grow to 1/10 mm, magnification ca. 30 000-fold.

Über die Struktur der AchE ist bisher ausser der stöchiometrischen Zusammensetzung der Aminosäuren wenig bekannt. Auch die Sequenz der Aminosäuren konnte bisher nicht bestimmt werden. Am interessantesten ist die Zusammensetzung des aktiven Zentrums, in welchem die Aminosäuren Histidin (mit Imidazolring), Serin und Glutaminsäure vermutet wurden (K. Laidler, 1955). Spätere Versuche bestätigten die Anwesenheit eines kurzen Bruchstükkes, indem vor allem Glycin, Glutaminsäure, Serin und Alanin vorkommen (N. K. Schaffer et al., 1973). Wir versuchen heute, das aktive Enzymzentrum mit radioaktiven DFP oder Sarin kovalent zu markieren, um seine Struktur zu ermitteln. Über die Organisation des aktiven Zentrums bestehen seit einiger Zeit modellartige Vorstellungen. Mit dem einfachen «Büstenhalter»-Modell von I. B. Wilson, 1951 (Bild 44), kann die Hydrolyse des Ach im aktiven Zentrum des Enzyms elektronentheoretisch erklärt werden (K. Laidler, 1955). Wir haben uns bemüht, die aktive Stelle der AChE und der unspezifischen ChE chemisch funktionell zu charakterisieren. Dazu wurden verschiedene substratanaloge Moleküle (Ester) und Inhibitoren (nicht-Ester) synthetisiert. Die enzymkinetische Untersuchung der Analogen und der Einfluss der Inhibitoren auf die Kinetik der Hydrolyse des Acetylcholins erlauben folgende, allgemeine Feststellungen: Der kationische Kopf des Acetylcholins ist zur Hauptsache für die Bindung des Substrates verantwortlich. Der Äther-Sauerstoff und der Carbonyl-Kohlenstoff sind sowohl für die Bindung als auch für die Umsetzung des Substrates wichtig, während der Carbonyl-Sauerstoff dazu von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint (W. H. Hopff et al., 1975; P. Thanei, 1982).

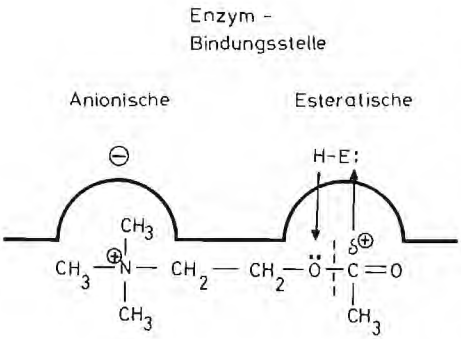


Bild 44: «Büstenhalter»-Modell des aktiven Zentrums der Acetylcholinesterase. Acetylcholin wird zuerst an der anionischen Bindungsstelle festgehalten, worauf das Carbonyl-C sich einer nucleophilen Elektronen-haltigen Gruppe (O des Serins oder N des Imidazols?) im Protein nähert und durch Bindung ein Proton freisetzt, das zum Äther-O des Cholins wandert. Damit ist die Hydrolyse erreicht und das Enzym acetyliert. Erst in einem zweiten Schritt wird die Acetylgruppe freigesetzt.

Fig. 44: "Brassière"-model of the active center of acetylcholinesterase. Acetylcholine is first bound at the anionic site. The carbonyl-C then approaches a nucleophilic eletron-rich group (the O of serine or N of imidazole?) in the protein, whereby a proton is liberated which transfers to the ether O. With this step the substrate is hydrolyzed and the enzyme becomes acetylated. This acetyl group is set free in a following step.

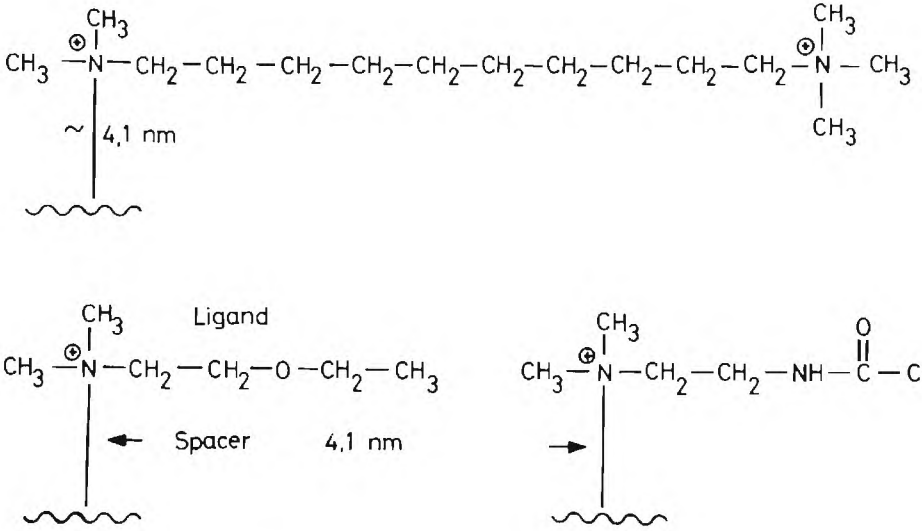


Bild 45: Liganden für Affinitätschromatographie von cholinergen Rezeptorproteinen (nAchR). Strukturanaloge des Acetylcholins mit quaternärer Ammoniumgruppe als Verbindung zum Spacer. Oben Decamethonium als selektiver Ligand.

Fig. 45: Ligands for affinity chromatography of cholinergic receptor proteins (nAchR). Structure analogs of acetylcholine with their quaternary ammonium group as link to spacer, decamethonium (on top) as a selective ligand.

Zur Reinigung des nAchR wurde eine umgekehrte Inhibitorgruppe verwendet, bei welcher der Spacer zur Ammoniumgruppe führt und dafür der sauerstoffhaltige Teil mit 5–10 Atomen terminal freisteht (Bild 45). Auch Decamethonium hat sich als depolarisierender Ligand bewährt, und es wurde damit ein reines Rezeptorprotein ohne Cholinesteraseaktivität isoliert (P. G. Waser et al., 1979; G. Riggio et al., 1980).

Mit einem Gallaminmolekül (Curareverbindung, Bild 21) als Liganden (Bild 46) wird dagegen ein anderes Protein isoliert. Es stammt ebenfalls aus dem Rezeptorkomplex und wird durch Elution mit Gallamin von der Säule abgelöst. Es könnte einem der erwähnten Kanalproteine entsprechen. Die Zusammensetzung aus Aminosäuren wurde bestimmt und mit den Ergebnissen der anderen Säulen verglichen (Tabellen 4 und 5). Die Gel-Elektrophorese lässt vermuten, dass die Struktur aus Untereinheiten für die beiden Proteine, isoliert mit depolarisierenden oder curarisierenden Liganden in Chromatographiesäulen, verschieden ist.

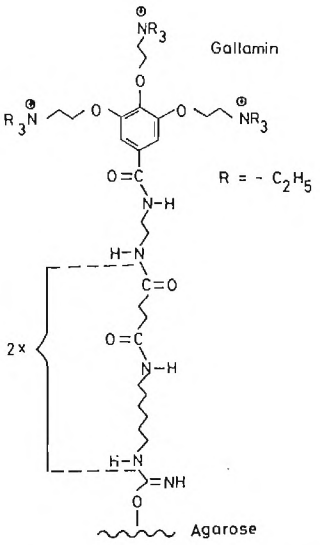


Bild 46: Ligand für Rezeptorproteine des Ionenkanales. Gallamin, eine Curareverbindung mit 3 freien quaternären Ammoniumgruppen am Ende eines langen Spacers zur Affinitätschromatographie.

Fig. 46: Ligand for channel proteins of receptor complex. Gallamine, a curare compound, with 3 free ammonium groups at the end of a long spacer, for affinity chromatography.

Tabelle 4: Aminosäuren-Zusammensetzung der Acetylcholinesterase (AchE) und des cholinergen Rezeptors (nAchR) von *T. marmorata*.

Table 4: Composition of aminoacids of acetylcholinesterase (AchE) and of cholinergic receptor (nAchR) of *T. marmorata*.

Anzahl Aminosäuren pro 10^5 g Protein		
	AChE	AChR
Cys	26	–
Asp	90	75
Thr	47	80
Ser	69	78
Glu	108	115
Pro	60	51
Gly	83	49
Ala	41	55
Val	56	49
Met	22	30
Ile	47	46
Leu	83	61
Tyr	29	21
Phe	41	34
Lys	41	53
His	19	23
Arg	39	30
Trp	15	9

Tabelle 5: Kohlenhydratzusammensetzung der Acetylcholinesterase (AchE) und des cholinergen Rezeptors (nAchR) von *T. marmorata*.

Table 5: Composition of carbohydrates of acetylcholinesterase (AchE) and of cholinergic receptors (nAchE) of *T. marmorata*.

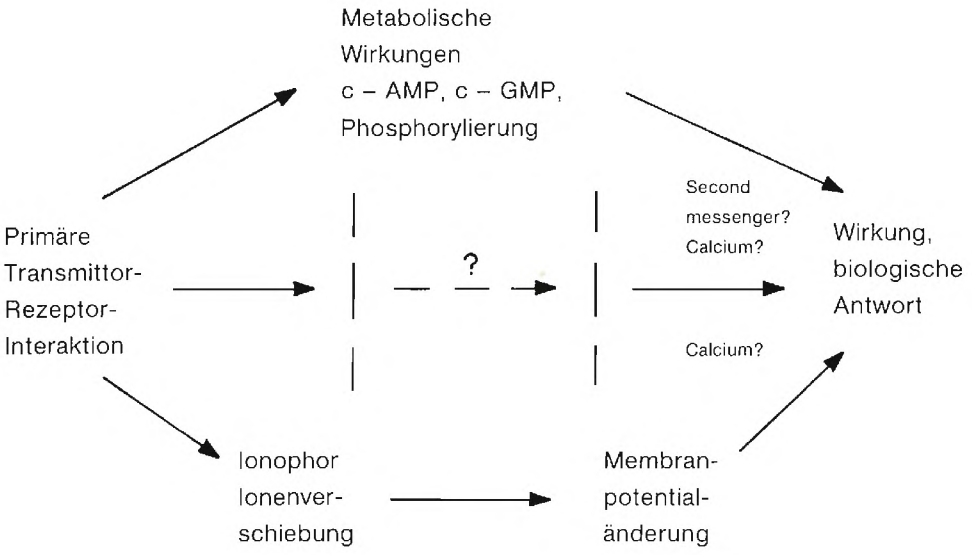
	AChE	AChR
	Gewichts-%	
Fucose	–	0,05
Mannose	2,7	0,39
Galactose	2,4	1,45
Glucose	1,4	0,21
NAc-Galactosamin	–	1,53
NAc-Glucosamin	4,0	0,85
NAc-Neuraminsäure	2,0	4,19

Wie bei der gereinigten Acetylcholinesterase enthalten die Rezeptorproteine verschiedene Zucker und Aminozucker (W. H. Hopff et al., 1981; G. Werner et al., 1978). Es sind daher Glykoproteine, bei denen die Funktion des Kohlenhydratanteiles noch nicht verstanden wird.

Zusammenfassend darf man feststellen, dass der nAchR molekular bereits teilweise bekannt ist, da die morphologische Struktur verschiedener Untereinheiten mit Hilfe von Chromatographie und Proteinanalyse isoliert und charakterisiert wurde. Das gemeinsame Funktionieren dieser Einheiten und die Beziehung zum Ionenkanal sowie die Freisetzung eines «second messenger» oder von Calcium sind im Moment noch wenig gesichert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Funktionsschema von Neuro-Rezeptoren.

Table 6: Functional scheme of neuro-receptors.



5 Muscarinisch cholinerge Rezeptoren (mAchR)

Über muscarinische Rezeptoren wissen wir bis heute viel weniger, obwohl ihre Bedeutung für die peripheren Endigungen des Parasympathicus, also die vegetative Steuerung der inneren Organe, und zahlreiche neuronale Bahnen im Gehirn überragend ist. Acetylcholin scheint schon bei sehr niederen Tieren (Paramecien, Coelenteraten, Tubularien) als reizübertragender Stoff wichtig zu sein. Aber seine grösste Bedeutung hat er erst als neuronaler Synapsenstoff bei den Vertebraten erlangt (H. Fischer, 1971). Im Nervensystem hochentwikkelter Tiere und des Menschen sind wohl die meisten zentralen Neurone cholinerg und muscarinisch. Die Bedeutung der entsprechenden Agonisten und Antagonisten (Atropin, Scopolamin, Bild 6) wurde erwähnt. Die spezifische Wirkung muscarinischer Pharmaka ist dosisabhängig. So kann Muscarin bei hoher Dosierung oder bei Sensibilisierung nach Denervierung auch nikotinisch cholinerge Synapsen, z. B. in synaptischen Ganglien, erregen (H. Konzett, P. G. Waser, 1956).

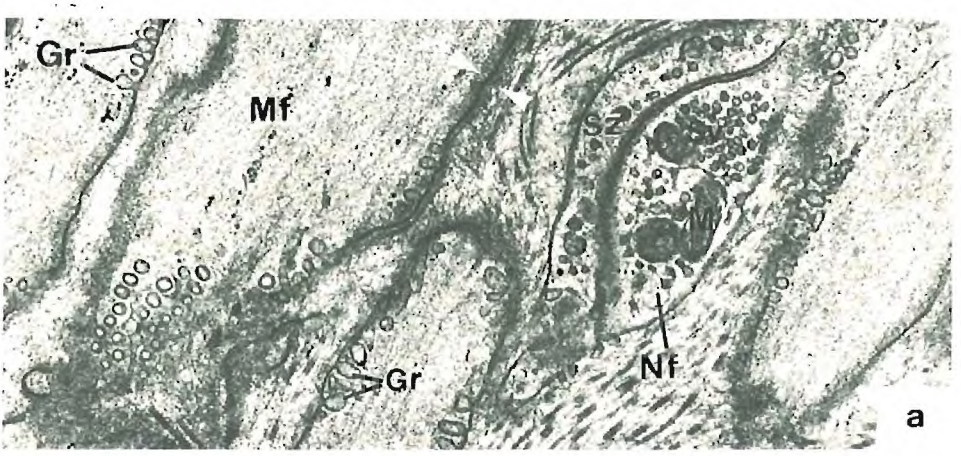
5.1 Morphologie der muscarinischen Synapse und Struktur des Rezeptors

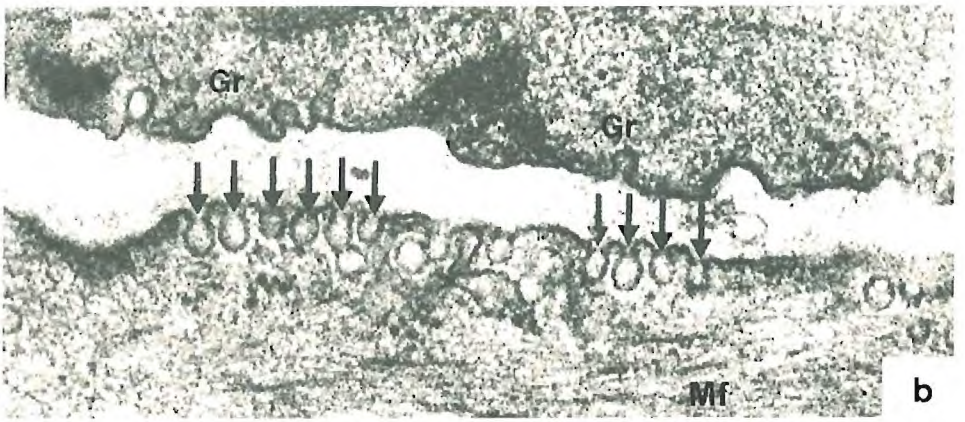
Das elektronenmikroskopische Bild typischer muscarinischer Synapsen ist wenig untersucht und anscheinend viel schwieriger erfassbar als die nikotinischen Nervenendigungen. Endplattenähnliche Strukturen fehlen, doch sind oft autonome Nerven – meistens Vagusendigungen – durch die zahlreichen acetylcholinhaltigen Vesikel im Axoplasma, nahe bei den glatten Muskelzellen, zu erkennen. Die Muskelmembran selbst ist von vielen, kleinen, flaschenähnlichen Einbuchtungen durchsetzt, welche an die tiefen Falten der postsynaptischen Membran der nikotinischen Endplatten im Skelettmuskel erinnern (Bild 47). Es muss sich daher bei diesen diskreten Grübchen um die postsynaptische Membran mit den muscarinischen Rezeptoren handeln. Im Gefrierätzbild sind diese Strukturen in der Membran der glatten Muskelfasern in re-

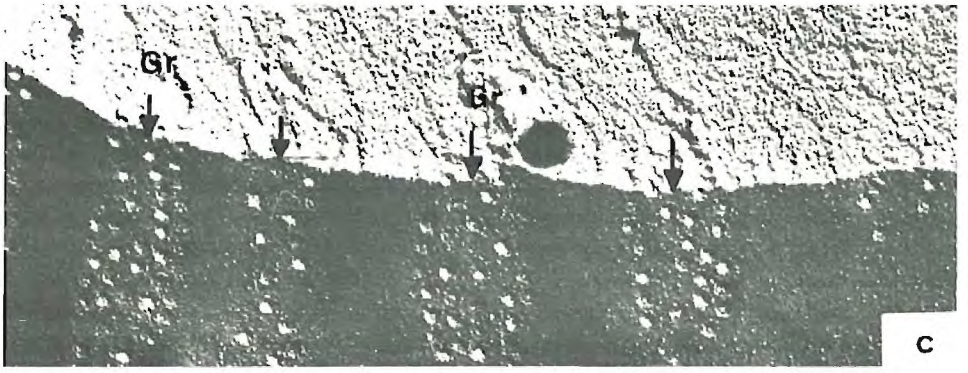
---

▶ Bild 47: Elektronenmikroskopische Bilder der Membran von glatten Muskelfasern (Mf) in a) Oesophagus, b) Arterien, c) Darm. Die zahlreichen Grübchen (Gr) an der Oberfläche der Muskeln stehen a) oft in Verbindung mit parasympathischen Nervenfasern (Nf), die Synapsenvesikel (Sv), Mitochondrien (M) enthalten und von einer Schwannschen Zelle (Sz) bedeckt sind. Aber auch bei den Arterien (b) sind sie auffällig, und in der Gefrierätzung (c) erkennt man die regelmässige Anordnung einer grossen Anzahl Invaginationen entlang der Muskelfaser. Enthalten sie muscarinische Rezeptoren? Vergrösserung 32 400fach (K. R. Porter, M. A. Bonneville, 1965; L. Orci, A. Perrelet, 1975).

Fig. 47: Electronmicrographs of smooth muscle membranes (Mf) of a) esophagus, b) artery, c) intestine. Many small pits are a) often in connection with nerve endings (Nf) of the parasympathicus, characterized by synaptic vesicles (Sv), mitochondria (M) and covered by a Schwann cell (Sz). b) The invaginations are very prominent in the membranes of arterial muscles and freeze etching (c) shows the regular distribution along the muscle fibers. Do they contain muscarinic receptors? Magnification 32 400-fold (K. R. Porter, M. A. Bonneville, 1965; L. Orci, A. Perrelet, 1975).


Gr
Mf
Sz
Mi
Gr
Nf
a


Gr
Gr
Mf
b


Gr
Gr
c

gelmässigen Strängen angeordnet. Im ZNS sind wohl cholinerge Synapsen histochemisch mit Hilfe der Acetylcholinesterase und einer Zinkjodid-Osmium-Färbung nachgewiesen (K. Akert et al. 1975; C. Sandri et al. 1978), doch ist eine morphologische Unterscheidung muscarinisch/nikotinisch bisher nicht möglich.

Synaptosomen sind terminale Nervenaxone mit den Synapsen zu anderen Neuronen, welche durch Homogenisierung und Dichtezentrifugation aus Gehirnmaterial (Cortex, Stammhirn etc.) gewonnen werden. Die künstlich entstandenen Nervenvesikel enthalten synaptische Bläschen mit Neurotransmittor, Mitochondrien und Bruchstücke von Synapsen (Bild 48). Diese sind charakterisiert durch die anhaftende postsynaptische Membran, in welcher histochemisch und biochemisch Acetylcholinesterase nachweisbar ist (C.G. Caratsch, P. G. Waser, 1973). Synaptosomen dienen ebenfalls als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von mAchR.

Bild 48: Elektronenmikroskopisches Bild eines Synaptosoms aus dem Hirnstamm (Meerschweinchen) mit Synapsenvesikel (Sv), Mitochondrien (M) und einer anhaftenden postsynaptischen Membran (Pom), Synapsenspalte (Ss). Vergrösserung 31 200fach.

Fig. 48: Electronmicrograph of synaptosome from brain stem (guinea-pig), with synaptic vesicles (Sv), mitochondria (m) and adhering postsynaptic membrane (Pom), Synaptic cleft (Ss). Magnification 31 200-fold.

5.2 Affinitätsmarkierung und Funktion des mAchR

Als sichere Marke für muscarinische Rezeptoren gilt heute ein ^{3}H-Propylderivat des Benzilylcholines (Bild 50), eines bekannten muscarinisch-cholinergen Antagonisten, der durch Alkylierung an der Bindungsstelle fest haftet (E.W. Gill, H.P. Rang, 1966). Andere Antagonisten für den gleichen Zweck sind natürlich ^{3}H-Atropin (W.D.M. Paton, H.P. Rang, 1965), und ^{3}H-N-Methyl-Scopolamin, die aber reversible Bindungen eingehen. Auch die Agonisten ^{3}H-Oxotremorin und ^{3}H-Chinuclidin-benzylat (H. I. Yamamura, S.H. Snyder, 1974) sind aus der Rezeptorbindung wieder auswaschbar.

A. Burgen und seine Arbeitsgruppe haben seit 1974 systematisch Propylbenzilylethylamin zur Lokalisation von muscarinischen Rezeptoren im Gehirn, im Herzmuskel und im Dünndarm bei verschiedenen Tieren benutzt (A.S.V. Burgen mit C.R. Hiley, J.M. Young, 1974, 1975 und später mit N.J.M. Birdsall, E.C. Hulme, C.P. Berrie, 1980, 1981; A. Rotter et al. 1979). Die kovalente Bindung am mAchR scheint im Gehirn sehr spezifisch und

dauerhaft zu sein. Nach 15 Minuten Inkubation wird eine Sättigung von dünnen Hirnschnitten erreicht, die nicht durch nikotinische Antagonisten (d-Tubocurarin, Hexamethonium) oder Physostigmin als Anticholinesterasestoff vermindert wird, aber verhindert durch muscarinische Pharmaka wie Pilocarpin, Oxotremorin oder 3-Chinuclidinbenzylat. Die Autoradiographien zeigten hohe Silberkornzahlen im Bulbus- und Tuberculum olfactorium, Cortex piriformis, Hippocampus, Gyrus dentatus, Amygdala, Thalamus, Putamen, N. caudatus und einzelnen Teilen des Neocortex. Einzelne Kerne des Mittelhirnes und des Hirnstammes sind ebenfalls muscarinisch cholinerg versorgt. Die Entwicklung der mAchR wurde im Nervensystem vom 1.–17. Lebenstag untersucht; ebenso der Einfluss der Strangdurchtrennung und Degeneration von Nervenbahnen auf die Zahl der Synapsen und Rezeptoren, welche die Affinitätsmarke binden.

Die Frage, ob alle muscarinisch cholinergen Rezeptoren in verschiedenen Organen gleich sind, ist schwierig zu beantworten. Schon im Gehirn scheinen zwei Rezeptortypen vorzukommen, welche mit Atropin und wechselndem pH in vitro verschieden reagieren und unterschiedlich gegen die Markierung mit Radioliganden geschützt werden (A. S. V. Burgen, C. R. Hiley, 1975). Das wird noch deutlicher im Herzmuskel und an der glatten Muskulatur des Darmes. Die verschiedenen Rezeptor-Subtypen variieren in den Geweben. Sie unterscheiden sich speziell in ihrer Affinität gegenüber den Agonisten, verhalten sich aber recht einheitlich gegenüber verschiedenen Antagonisten. Im Herzmuskel der Ratte haben sie eine hohe bis «superhohe» Affinität (H oder SH-Typ), welche durch Guanosintriphosphat (GTP) und einige Guanosinnucleotide fast vollständig in den L-Typ (low affinity) verwandelt werden (C. P. Berrie et al. 1979). Dabei spielt die Ionenkonzentration eine bedeutende Rolle. Ihre Erniedrigung vermindert die Affinität der meisten Muscarinrezeptoren für N-Methyl-Scopolamin sowie andere Antagonisten, erhöht sie aber für etwa 20% einer anderen heterogenen Rezeptorenklasse. GTP, GDP und ähnliche Nucleotide erhöhen dagegen die Affinität der Antagonisten für den L-Typ. Auch niedrige Konzentrationen von Mg^{++} verstärken die Hemmwirkung der Guanosinnucleotide (C. P. Berrie et al., 1979; E. C. Hulme et al., 1980, 1981, A. S. V. Burgen et al., 1981).

Diese Untersuchungen weisen auf 2 verschiedene muscarinische Rezeptorpopulationen im Herzmuskel hin. Eine wird durch Veränderungen der Ionenkonzentration und durch Guanosinnucleotide beeinflusst. Die andere wird durch Nucleotide nicht moduliert und hat eine kleinere und entgegengesetzte Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Ionenkonzentration. Der Einfluss der Guanosinnucleotide ist im Myokard des Vorhofes und der Kammer vorhanden, obwohl nur die Vorhöfe cholinerg innerviert sind. Im atrioventrikulären Reizleitungssystem ist der muscarinische Rezeptor direkt an einen Kalium-Ionenkanal gekoppelt (W. Trautwein et al., 1980), und zyklische Nukleotide spielen hier keine Rolle. Im übrigen Myokard findet eine Beeinflussung der Adenylcyclase statt, da Acetylcholin und Carbachol den Gehalt an

cGMP erhöhen, denjenigen von cAMP senken (W. J. George et al., 1973). Dies wird um so deutlicher, je höher der cAMP-Gehalt, z. B. durch Katecholamineinwirkung ist, und wirkt sich direkt negativ auf die Calciumfreisetzung und die Muskelkontraktilität aus.

Der muscarinische Rezeptor ist demnach Teil eines Komplexes aus Untereinheiten, in welchem ein nucleotidempfindliches N-Protein und die Adenylcyclase enthalten sind. Vielleicht besteht ein gemeinsamer Teil mit dem β-adrenergen Rezeptor, der einen ähnlichen Aufbau hat und für die Wirkung adrenerger Liganden auf die gleichen Herz- und glatten Muskelzellen verantwortlich ist. Auch könnte über die gemeinsame Steuerung der cAMP-Bildung der gleiche «second messenger» beeinflusst werden (Bild 49).

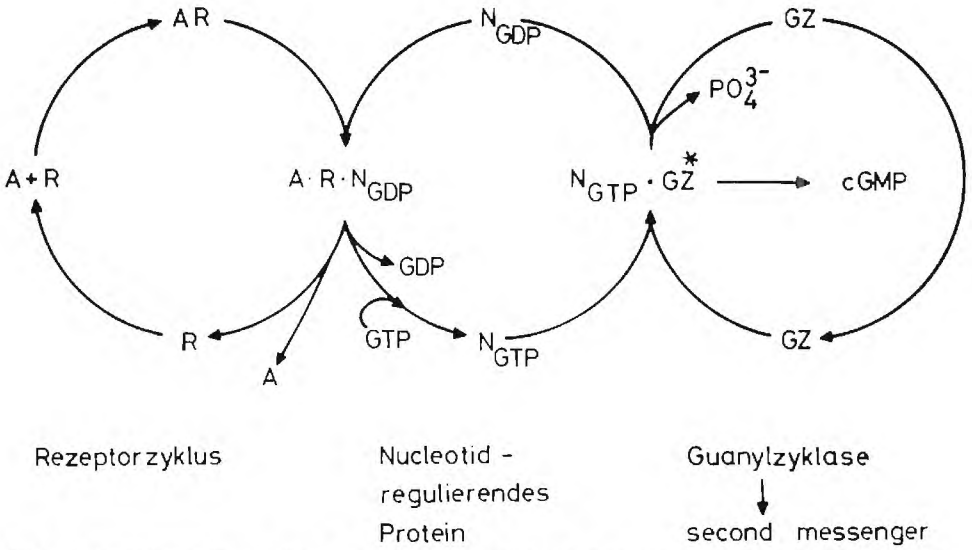


Bild 49: Funktionsschema eines muscarinisch cholinergen Rezeptors. A, Agonist; R, Rezeptor; AR, Agonist-Rezeptor-Komplex; N, regulierendes Protein; GTP, Guanosin-Triphosphat; GDP, Guanosin-Diphosphat; GZ, Guanyl-Zyklase; cGMP, zyklisches Guanosinmonophosphat.

Fig. 49: Functional scheme of muscarinic cholinergic receptor. A, agonist; R, receptor; AR, agonist-receptor complex; N, regulating protein; GTP, guanosine-triphosphate; GDP, guanosine-diphosphate. GZ, guanyl-cyclase; cGMP, cyclic guanosine monophosphate.

Es bestehen also grosse Unterschiede zwischen nikotinischen und muscarinischen Rezeptoren, indem die nAchR meistens direkt an Ionenkanäle gekoppelt sind, die mAchR dagegen nur indirekt oder vorübergehend mit einzelnen Ionenkanälen (K^+, Ca^{++}), dafür aber mit einer Reihe metabolischer Prozesse (cGMP, Phosphorylierung von Proteinen und Inositol, Glykogenabbau etc.) in der Zelle verbunden sind. Während nikotinische Wirkungen rasch ablaufen, sind muscarinische Reaktionen etwa 1000mal langsamer und treten mit ei-

ner Verzögerung ein. Eventuell wirken gleichzeitig mehrere Agonistenmoleküle oder Liganden auf den gleichen muscarinischen Rezeptorkomplex, der in verschiedenen Stufen durch Konformationsänderung von Untereinheiten einen Ionenkanal öffnet oder über einen «second messenger» in den Zellstoffwechsel eingreift.

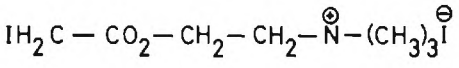
Im Gehirn ist die Beeinflussung des mAchR durch Guanosinnucleotide weniger deutlich als im Herzmuskel, aber dafür regional unterschiedlich. Beide Organe werden daher über die Aktivierung von Rezeptoren durch Agonisten gesteuert. Modulation der neuronalen Empfindlichkeit durch solche negative «feedback»-Mechanismen kann für die interneuronale Kommunikation und die Plastizität der Synapsen bedeutungsvoll sein (M. R. Meyer et al., 1982). Die Entwicklung muscarinisch cholinerger Rezeptoren im Gehirn wurde mit ^{3}H-Radioliganden (N-Methyl-Scopolamin, Propylbenzilylethylamin, Oxotremorin) in drei Hirnregionen (Cortex, Diencephalon, Medulla-Pons) verfolgt (M. J. Kuhar et al., 1980). Die Rezeptoren werden verschieden rasch gebildet. Sie treten zuerst in der Medulla, später in Diencephalon und Cortex auf. Im Cortex variiert die Affinität während der Entwicklung deutlich, indem zuerst Rezeptoren mit niederer Affinität und nach einer Woche Verzögerung meistens solche mit hoher Affinität erscheinen.

5.3 Biochemische Isolierung

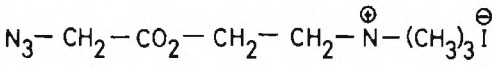
Es wäre wichtig, mehr über das muscarinische Rezeptorprotein und seine Integration im Membrankomplex zu wissen, um diese komplizierten Membranfunktionen zu verstehen. Die Solubilisierung aus der Membran ist mit der üblichen, früher beschriebenen Technik möglich. Es sind jedoch nur kleine Mengen Rezeptoren gewonnen worden, so dass eine Charakterisierung oder Rekonstitution in der Membran, ähnlich wie mit β-adrenergen Rezeptoren, bis jetzt nicht erfolgte.

Um das mAchR-Protein mit einer Affinitäts-Chromatographiesäule zu isolieren, haben wir verschiedene Affinitätsmarken synthetisiert, um diese dann als Ligandengruppen an Agarose gebunden einzusetzen. Als Agonisten wurden neben dem früher beschriebenen Diazoacetylcholin Iodacetylcholin und Azidoacetylcholin synthetisiert, als Antagonisten 2 Furaziridiniumverbindungen und ein Nitrophenyldiazonium-Salz (Bild 50). Als Testobjekt wurde der Meerschweinchendarm verwendet, an dessen mAchR diese Verbindungen haften (C. Lebbin, A. Hofmann, P. G. Waser, 1975). Acetylcholin selbst war Kontrollagonist zur Prüfung der Empfindlichkeit der Rezeptoren. Acetylcholin hat die grösste Affinität dieser cholinergen Agonisten zum Rezeptor, aber Diazoacetylcholin bewirkt die stärkste Kontraktion (intrinsic activity). Atropin antagonisiert alle Agonisten. Irreversible, d. h. während langer Zeit nicht auswaschbare Bindungen, verursachten Iodacetylcholin mit 50% andauernder Lähmung, die Furaziridine mit 30% und einzig p-Nitrophenyldiazonium Fluoroborat mit vollständiger Blockade der Rezeptoren. Diese letzte Verbin-

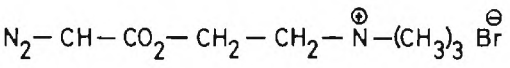
dung ist jedoch nicht selektiv für den mAchR und bindet sich auch an die Acetylcholinesterase (C. G. Caratsch et al., 1976), was für DAch jedoch nicht der Fall ist (P. G. Waser, A. Hofmann, W. H. Hopff, 1970). Zur Isolierung der muscarinischen Rezeptoren muss daher ein spezifischer Agonist oder Antagonist mit reversibler Bindung als Ligand einer Chromatographiesäule dienen, da die Proteine nach Bindung und Reinigung wieder abgelöst werden müssen, um eine konzentrierte Lösung unveränderter Proteine zu erhalten.



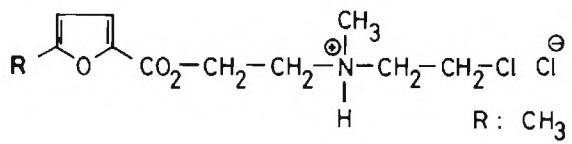
Iodacetylcholin
IACh



Azidoacetylcholin
AACh

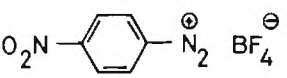


Diazoacetylcholin
DACh

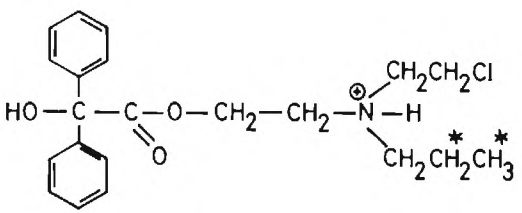


R : CH_3 Furaziridinium F

R : Br Brom-Furaziridinium BrF



Para-Nitrophenyldiazonium Fluoborat
p-NDB



N-Chlorethyl-N-Propyl-Aminoethyl-Benzilat
CPAB

Bild 50: Affinitätsmarken zur irreversiblen Bindung an muscarinisch cholinerge Rezeptoren (mAchR).

Fig. 50: Affinity labels for irreversible binding to muscarinic cholinergic receptors (mAchR).

6 Cholinerge Rezeptoren und Krankheiten

6.1 «Massgeschneiderte» Medikamente

Die klinische Bedeutung der Pharmakon-Rezeptoren ist aus den bisher gewonnenen Forschungsergebnissen leicht erkennbar. Sie sind eine Voraussetzung für die Entwicklung von Medikamenten für die neu erkannten Subtypen der Rezeptoren und bringen eine Steigerung der Wirkung durch Selektivität mit sich. Dafür gibt es genügend aktuelle Beispiele: Die Histamin-Antagonisten Cimetidin und Ranitidin blockieren die histaminergen H_2-Rezeptoren in der Magenschleimhaut und vermindern damit die Salzsäureproduktion bei der Behandlung des Magenulcus. Sie unterscheiden sich grundsätzlich von den bekannten H_1-Antihistaminica, welche bei allergischen Krankheiten, bei Asthma bronchiale, oder Übelkeit verwendet werden. Neu ist auch die grosse Gruppe der adrenergen Antagonisten zur Therapie der Angina pectoris und des Hochdruckes. Hier werden cardioselektive Mittel gesucht, die nur auf β_1-Rezeptoren am Herzen, nicht aber auf β_2-Rezeptoren der Bronchien wirken.

Auf dem cholinergen Gebiet haben wir gesehen, dass Curarestoffe auf nikotinische Rezeptoren in den Muskelendplatten selektiv wirken, Ganglienblocker jedoch sympathische Ganglien und damit den peripheren Sympathicus lähmen. Curareverbindungen werden zur Muskellähmung während der Narkose bei vielen Operationen verwendet. Die Ganglienblocker, die früher zur Senkung des artiellen Blutdruckes eingesetzt wurden, sind durch besser verträgliche Antihypertensiva ersetzt worden. Die muscarinischen Rezeptoren des Parasympathicus sind für die Muskel- und Drüsentätigkeit der meisten inneren Organe verantwortlich. Falls sich die Hypothese verschiedener muscarinischer Rezeptoren bestätigt, ist auch eine Entwicklung von Medikamenten mit selektiver Wirkung auf einzelne Organfunktionen möglich.

Im Herzmuskel scheinen tatsächlich verschiedene Subtypen zu existieren, so dass die Erregungsbildung im Sinusknoten und ihre Ausbreitung einerseits, sowie die Muskelkraft andererseits vielleicht selektiv beeinflussbar werden. Am interessantesten sind voraussichtlich die Subtypen der muscarinischen Rezeptoren im Gehirn. Das cholinerge, neuronale System ist im Zentralnervensystem der Hauptträger der Impulsübermittlung. Gesamthaft überwiegen die muscarinischen Rezeptoren die nikotinischen um etwa das 100fache. Da sich verschiedene Hirngebiete oder Hirnbahnen in ihren Rezeptorklassen unterscheiden, gibt dies die Möglichkeit, mit Medikamenten gezielt einzuwirken. Beim Morbus Parkinson besteht seit langem die Therapie, mit Atropin und ähnlichen Verbindungen, die cholinerge Überaktivität zu hemmen. Doch sind die unerwünschten Wirkungen bedeutend und neue spezifische Antagonisten dringend notwendig.

Die meisten Antipsychotica (Phenothiazine, Thioxanthene, Butyrophenone) haben als unerwünschte Wirkung nach langer Therapie extrapyramidale motorische Störungen (sog. Parkinsonismus) zur Folge. Dies hängt anschei-

nend weniger mit der Blockierung von zentralen dopaminergen Rezeptoren, gemessen an der dopaminempfindlichen Adenylcyclase im Stammhirn, als mit der schwachen antimuscarinischen Wirkung am neuronalen mAchR zusammen. Trifluoperazin, Spiperon und Flupenthixol sind schwache cholinerge Antagonisten mit häufigen extrapyramidalen Nebenwirkungen; Clozapin und Thioridazin wirken demgegenüber stärker antimuscarinisch, haben aber seltener Parkinsonismus zur Folge (R.J. Miller, C.R. Hiley, 1974).

Da cholinerge Rezeptoren im Körper weit verbreitet und beinahe überall im Nervensystem vorhanden sind, wirken bis heute Medikamente dieser Gruppe selten gezielt, sofern sie in genügender Konzentration am Wirkungsort vorkommen. Anscheinend beeinflussen chemische Stoffe auch die Umwandlung von Rezeptoren in verwandte Typen. Auf diesem Weg könnte die Förderung einer durch Degeneration oder Desensibilisierung verminderten Rezeptorklasse angestrebt werden. So richtet sich die Hoffnung einer differenzierten Pharmakotherapie auf die Unterscheidung von Rezeptoren-Subtypen und die Entwicklung entsprechend spezifischer Medikamente. Die ungleichmässige Verteilung der muscarinischen Rezeptoren im Gehirn scheint dafür eine gute Voraussetzung zu sein.

6.2 Funktionelle Störungen der Cholinesterase

Eine in der Klinik wichtige Enzymstörung betrifft die unspezifische Serumcholinesterase (E.C.3.1.1.8), welche verschiedene Ester hydrolysiert. Das Medikament Suxamethonium, das Anästhesisten für die Muskelrelaxation während operativer Eingriffe verwenden, wird durch dieses Enzym innerhalb weniger Minuten inaktiviert. Bei etwa einem auf 2800 Patienten unserer chirurgischen Kliniken bleibt jedoch die Muskellähmung während Stunden bestehen, da das Enzym durch eine genetische Störung verändert ist und das aktive Zentrum anscheinend den Succinylcholin-Ester nicht hydrolisieren kann (W. Kalow, 1962; P.G. Waser, 1967). Da es sich nicht eigentlich um eine Rezeptorkrankheit, sondern um einen Enzymdefekt handelt, soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden. Doch bleibt eine wichtige Frage offen: Sind die in der Synapsenmembran gebundenen Acetylcholinesterasen, die wir zu den Membranrezeptoren zählen können, bei diesen Patienten funktionsfähig? Die unspezifische Serumesterase wird in der Leber synthetisiert, und ihre Aktivität kann sogar als Leberfunktionstest geprüft werden. Die spezifische Acetylcholinesterase entsteht zwar in den Neuronen, aber anscheinend nach dem beinahe gleichen genetischen Muster. Es wäre daher möglich, dass auch bei diesen Trägern defekter Enzyme die nervösen Synapsen abweichende Acetylcholinesterase enthalten, die wir beim Menschen noch nicht erkannt haben. Vielleicht gehören sie zu den nur wenig verschiedenen Iso-Enzymen, deren Funktion noch in die Norm fällt, die aber biochemisch zu trennen sind.

In diesen Problemkreis gehört auch die Vergiftung der Acetylcholinesterase mit Insektiziden und mit Nervengiften im Krieg. Das gesamte cholinerge

System und besonders die Synapsenmembranen mit Rezeptoren und Enzym wird durch die Übermenge freien Acetylcholins überschwemmt und ausser Funktion gesetzt. Die Folge sind schwere Muskelkrämpfe und zentrale wie periphere Lähmungen zahlreicher Funktionen. Die cholinergen Rezeptoren werden durch Dauererregung rasch desensibilisiert und die erregbare Membran wird zerstört. Therapeutisch gibt es drei Möglichkeiten:

1. Der sichere Weg zur Behandlung der leichten Vergiftung ist die Blockierung aller muscarinischen cholinergen Rezeptoren mit grossen Dosen Atropin und eventuell Curarestoffen (nikotinische Rezeptoren), bei gleichzeitiger künstlicher Beatmung zur Wahrung der lebensnotwendigen Funktionen. Gegenüber schweren Vergiftungen mit Insektiziden oder Nervengift ist diese Therapie wirkungslos.

2. Reaktivierung der blockierten Acetylcholinesterase zur Hydrolyse des Neurotransmittors. Dieser Weg ist trotz aller Hoffnungen und befürwortenden Publikationen nie wirklich realisiert worden. Er bleibt ein Wunschtraum, besonders in der Praxis, d. h. bei der Behandlung von durch Sarin, Soman oder VX im Krieg Vergifteten. Eine Reaktivierung des vollständig blockierten Enzyms mit den sog. Antidoten (Pralidoxin, Toxogonin) ist in vivo nicht möglich, in vitro höchstens bei einem sehr geringen Anteil des Enzyms (W. H. Hopff, P. G. Waser, 1970, 1975).

3. Verminderung der produzierten Acetylcholinmenge durch Einschränkung der Acetylcholinsynthese, d. h. Hemmung der synthetisierenden Cholinacetyltransferase im Nervensystem. Diesem Forschungsprojekt geben wir gute Chancen, haben aber alle Schwierigkeiten bei der Entwicklung gut verträglicher Enzymhemmer (W. H. Hopff, G. Riggio, P. G. Waser, 1981).

6. 3 Anomale Rezeptoren

Durch die moderne Rezeptorforschung ist das pathophysiologische Verständnis für die Ätiologie einiger Krankheiten gefördert worden. Als Beispiele können die Hyperthyreose, eine Form der Insulin-Resistenz, die β-adrenerge Unterempfindlichkeit und im cholinergen Gebiet die Myasthenia gravis erwähnt werden. Überempfindlichkeit wird durch Autoantikörper gegen den entsprechenden Rezeptor ausgelöst, indem diese als Agonisten oder Antagonisten wirken.

Die Myasthenia gravis beim Menschen ist charakterisiert durch leichte Ermüdbarkeit der Skelettmuskulatur, so dass die Bewegungen der Extremitäten, des Kopfes, der Augen, der Sprachmuskeln oder der Atmung verzögert und unvollständig ausgeführt werden und später eventuell wie bei einer Lähmung mit Curare vollständig ausbleiben. Diese Ähnlichkeit führte dazu, die Myasthenie versuchsweise mit Anticholinesterasestoffen (Physostigmin und Neostigmin) zu behandeln (L. Remen, 1932; M. B. Walker, 1934, 1935). Der Erfolg dieser Therapie war überzeugend, doch leider nicht anhaltend. Deshalb wurden immer längerwirkende, sogar irreversible Anticholinesterasen wie Orga-

nophosphate therapeutisch verwendet. Voreilig wurde angenommen, die defekte Synapse setze zu wenig Acetylcholin bei der nervösen Erregung frei. Damit war auch eine Erklärung für die therapeutische Wirkung der Anticholinesterasen gefunden, die den Abbau des Acetylcholins hemmen.

Erst der Versuch von J. Patrick und J. Lindstrom (1973) zur Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem cholinergem Rezeptorprotein (nAchR) aus elektrischen Aalen zeigte, dass diese Tiere eine experimentelle Myasthenie mit den gleichen Krankheitssymptomen durch Antikörper gegen ihre eigenen nikotinischen Rezeptoren entwickeln. Auch bei anderen Tieren wurden die gleichen Veränderungen an der Endplatte und myasthenische Symptome nach der Immunisierung gesehen (E. Heilbronn, C. Mattsson, 1974; L. E. Thornell et al., 1976; A. D. Zurn, B. W. Fulpius, 1976; D. A. Granato et al., 1976; E. X. Albuquerque et al., 1979). Bei 87% der Myasthenie-Patienten wurden im Serum Antikörper gegen Rezeptorproteine nachgewiesen (J. Lindstrom, 1979), und bei ihnen waren nur noch 11–30% nAchR, verglichen mit gesunden Menschen, vorhanden. Die Empfindlichkeit der pathologischen Rezeptoren auf Acetylcholin ist elektrophysiologisch deutlich vermindert (E. X. Albuquerque et al., 1976), und auch morphologisch sind die befallenen Endplatten stark verändert. Neben der üblichen Diagnose mit Anticholinesterasen (Edrophonium, Neostigmin) oder durch Provokation der Symptome mit kleinen Dosen Tubocurarin können heute zur Erkennung der Myasthenie die Autoantikörper im Serum mit Immunopräcipitationstesten nachgewiesen werden (D. S. Dwyer et al., 1979). Diese Methode ist besonders wichtig bei Patienten, bei denen ein Thymustumor (Thymom) operativ entfernt wurde, da bei ihnen relativ oft früher oder später eine Myasthenia gravis auftritt und Antikörper gegen cholinerge Rezeptoren schon frühzeitig vor der klinischen Manifestation der Myasthenie nachweisbar sind (S. Cuénoud et al., 1980).

Ob neben der symptomatischen Behandlung der Myasthenie später auch eine kausale Therapie, d. h. die Stimulierung der Produktion normaler cholinerger Rezeptoren, möglich sein wird?

Bei einigen Epilepsiekranken wurden Antikörper gegen nAChR entdeckt, ohne dass gleichzeitig Symptome einer Myasthenie vorhanden waren. Häufig sind bei primärer Epilepsie die IgA-Immunglobuline, unabhängig von der Behandlung, z. B. mit Hydantoin, erniedrigt. Periphere und zentrale nikotinische Rezeptoren scheinen also nicht gleiche Antigeneigenschaften zu haben. Eine verantwortliche Rolle von Autoantikörpern gegen nAChR im Gehirn für die Manifestation einer Epilepsie ist nicht erwiesen (A. Fontana, B. W. Fulpius, S. Cuénoud, 1979).

Die senile Demenz vom Typ Alzheimer ist charakterisiert als primäre Degeneration cholinerger Neurone, vor allem in Neocortex und Hippocampus. Die betroffenen Hirnregionen zeigen eine Verminderung des Acetylcholin synthetisierenden Enzymes, Cholin-Acetyltransferase, und der Acetylcholinesterase (H. Henke, W. Lang, 1982), während die wichtigsten Neurotransmittor-Systeme (Dopamin, Serotonin, γ-Aminobuttersäure) nicht verändert sind

(K. L. Davis et al., 1981). Dadurch werden speziell das Langzeitgedächtnis und die kognitiven Gehirnfunktionen betroffen. Ähnliche Störungen werden bei jüngeren, normalen Versuchspersonen durch kleine Dosen Scopolamin verursacht (D. A. Drachman, J. Leavitt, 1974; D. A. Drachman, 1974). Demgegenüber sind diese Hirnfunktionen bei Dementen durch Physostigmin, ein zentral wirksamer Anticholinesterasestoff, oder Arecolin deutlich verbessert. Auch die erhöhte orale Zufuhr von Cholin oder Lecithin, den Vorstufen für die Acetylcholinsynthese, scheint von therapeutischem Nutzen zu sein (P. Davies, 1981; C. M. Smith, M. Swash, 1978).

Die Konzentration und Verteilung von nikotinischen und muscarinischen cholinergen Rezeptoren wurde im Gehirn bei Alzheimer-Demenz mit Affinitätsmarkierung mittels ^{125}I-α-Bungarotoxin und ^{3}H-N-Methyl-Scopolamin untersucht (W. Lang, H. Henke, 1982). Überraschenderweise konnte kein signifikanter Unterschied gegenüber Gesunden gefunden werden. So liegt die Hauptstörung bei dieser Demenz vor allem im präsynaptischen cholinergen Neuron, das zu wenig Acetylcholin produziert.

Erst mit zunehmender Alter nimmt die Dichte der mAchR im frontalen Cortex ab, mit 90 Jahren auf etwa 75% derjenigen bei 70 Jahren, ohne dass gleichzeitig morphologische Zeichen einer senilen Degeneration vorhanden sind. Bei der Pick'schen Krankheit wird jedoch im Temporalhirn die Rezeptordichte deutlich (bis auf 47% der Kontrollwerte) vermindert (P. White et al., 1977). Beim Morbus Parkinson wurde eine Verminderung der Cholin-Acetyl-Transferase in Cortex und Hippocampus festgestellt. Die mAchR wurden mit ^{3}H-Chinuclidinbenzylat nachgewiesen, wobei überraschenderweise eine Zunahme der Affinität dieser Rezeptoren im Nuclues caudatus und im frontalen Cortex und gleichzeitig eine Erhöhung der Rezeptorendichte in der letzteren Region gefunden wurde. Diese Zunahme der Rezeptoren könnte eine Folge der Behandlung mit Anticholinergica sein, wie bei Tierversuchen mit Scopolamin festgestellt wurde (M. Ruberg et al., 1982).

7 Schlussbetrachtungen

Es wurde einmal gesagt, Rezeptoren seien wie schöne, unbekannte Damen, denen Forscher Briefe schreiben, ohne jemals günstige oder mindestens informative Antworten zu erhalten. Das Bild hat sich in den letzten Jahren deutlich verändert. Die Rezeptoren sind uns näher gekommen, wir kennen einige schon recht gut, wobei überraschenderweise hinter einer Adresse oft verschiedene Typen verborgen sind. Der Stil unserer Briefe oder die Strategie unserer Forschung hat sich dem Problem angepasst und entsprechend entwickelt. Es kommen immer mehr interessante Antworten, und die Neugier und das Bedürfnis für eine noch bessere Bekanntschaft steigen.

Wir haben in diesem Neujahrsblatt über cholinerge Rezeptoren berichtet, weil hier die Kenntnisse im biochemisch-molekularen Bereich die fortge-

schrittensten sind. Zwei wichtige Spezialisierungen der Natur haben in den letzten Jahren gerade dieser Forschung sehr geholfen: die elektrischen Fische als Materiallieferant für die Rezeptorisolierung und einige exotische Schlangen mit ihrem Gift, welches die gleichen Rezeptoren in verschiedenen Species blockiert. Zufall der Natur oder Folge der Evolution? Sicher jedoch ein Glück für die Forscher! Unsere Gruppe hat vor allem auf dem cholinergen Gebiet seit dem ersten molekularen Nachweis von Rezeptoren gearbeitet. Das mag stellenweise ein vielleicht bevorzugtes Bild unseres eigenen Beitrages geben. Im gesamten betrachtet ist er, auch verglichen mit einer immer grösser werdenden Flut an neuen Forschungsergebnissen, wesentlich.

Andere Rezeptorarten im adrenergen, dopaminergen, histaminergen, gabaergen Gebiet oder die Opiatrezeptoren und viele andere sind genau so wichtig und interessant. Hier sind sogar mehr bekannte Pharmaka entwickelt worden, aber die technischen Schwierigkeiten der Rezeptorisolierung sind noch grösser. Wir hoffen auf den Glücksfall in der Forschung, der uns dazu das geeignete natürliche Material in genügender Menge bringt. Vermutlich sind die meisten Rezeptorsysteme auch bedeutend komplizierter als das cholinerge.

Entscheidend ist, dass die molekulare Pharmakologie mit der Erforschung von Pharmakon-Rezeptoren zum ersten Mal die Möglichkeit erhält, durch die Kenntnis molekularer Wirkungsmechanismen gezielt neue Medikamente zu entwickeln. Die neue Ära der modernen Pharmakologie löst damit die historisch erfolgreiche, empirische Forschung – Ausprobieren der Wirksamkeit von Drogen und Medikamenten am lebenden Organismus – ab. Der Übergang von der alten zur neuen Strategie wird lange Zeit dauern und viele Rückschläge erleiden. Doch wird uns die molekulare Pharmakologie neue spezifische Mittel zur gezielten Therapie von Krankheiten bringen.

8 Zusammenfassung

Um die Jahrhundertwende wurden Pharmakon-Rezeptoren zum ersten Mal von J. N. Langley und P. Ehrlich durch ihre Versuche mit Nikotin, Curare und chemotherapeutischen Arsenverbindungen nachgewiesen und als Wirkungsorte in der Zelle beschrieben. Es wurde rasch erkannt, dass ihre Struktur und Verteilung in den Organen die spezifische Einwirkung von Medikamenten ermöglicht. Nach dem Mechanismus von Schlüssel und Schloss wurden anfänglich vor allem die Schlüssel, d. h. chemische Verbindungen mit starker biologischer Wirkung, untersucht. Entscheidend für die Bindung an Rezeptoren oder Enzyme sind unter anderem die chemische Struktur, Grösse, Ladungsverteilung, Lipophilität, pharmakophore Gruppen und die Flexibilität des Moleküls. Eine Wirkung wird aber erst ausgelöst, wenn eine Reihe von meist wenig erkannten Veränderungen, häufig in der Zellmembran, abläuft: Öffnung von Ionenkanälen, Freisetzung eines zweiten Boten wie Calcium, Koppelung an Membranenzyme zur Aktivierung des Zellstoffwechsels.

Das Wesen und Funktionieren des Schlosses, d. h. der Rezeptoren, die aktiviert werden müssen, wird erst durch die spezifische Markierung von Rezeptorstellen und die quantitative Untersuchung der Reaktionsabläufe (Reaktionspartner, Zeitkonstanten, Energiebilanz) erfassbar. Mit radioaktiv markierten Pharmaka und sogenannten Affinitätsmarken werden lose bis irreversible Bindungen an spezifischen Rezeptorstellen geschaffen, welche dann ihre Isolierung und Charakterisierung ermöglichen.

Der cholinerge Rezeptor wird vom Neurotransmittor Acetylcholin erregt. Die nikotinisch cholinergen Rezeptoren finden sich in den Endplatten der Skelettmuskulatur, in nervösen Ganglien und im Zentralnervensystem. Mit Hilfe der Bindung von α-Bungarotoxin und Cobratoxinen konnten diese Rezeptoren vor allem aus den elektrischen Organen von Zitterrochen und Aalen isoliert werden. Ihr Molekülgewicht, die Struktur der fünf Untereinheiten, der Aufbau aus Glykoproteinen und die Verbindung zu Ionenkanälen in den nervösen Membranen werden jetzt untersucht. Die muscarinisch cholinergen Rezeptoren kontrollieren vor allem die glatte Muskulatur der inneren Organe sowie neuronale Synapsen des Gehirns und Herzens. Sie können spezifisch radioaktiv markiert werden, doch ist ihre Isolierung und Reinigung noch nicht abgeschlossen. Subtypen des muscarinischen Rezeptors sind besonders wichtig zur Steuerung der Herz- und Gehirnfunktionen. Muscarinische Rezeptoren sind anscheinend für das Gedächtnis und das kognitive Denken notwendig. Rezeptoranomalien der cholinergen Synapsen sind bekannt bei Myasthenia gravis (Muskelschwäche), bei seniler Demenz, bei Morbus Parkinson und eventuell bei Epilepsie.

9 Summary

At the turn of the century, the existence of pharmacon-receptors became recognized through the work of J. N. Langley and P. Ehrlich on nicotine, curare and chemotherapeutics containing arsenic, to be the sites of interaction in the living cell. It was soon after realized that their chemical structure and distribution in organs are the basis of the specific function of drugs. The concept of the lock-and-key mechanism grew up, whereby in the beginning attention was paid mainly to the keys, i. e. those chemical compounds showing strong biological effects. It was found that structure, size, charge distribution, molecular flexibility, lipophilicity, pharmacophore groups, etc., are determining factors in the binding of the drugs to receptors or enzymes. However, an interaction produces its effect only after a series of definite, mostly little-understood changes take place, which often occur in the cell membrane. These include the opening of ion channels, liberation of a second messenger such as calcium, coupling of membrane enzymes to activation of cellular metabolism, etc.

The existence and function of the lock, i. e. the receptor itself, which is activated by the key, became understood only after techniques were developed for their specific labeling and for measurements of their reaction course, e. g. determining their reaction partner, rate constants and energy balance. With the help of radioactively-labeled drugs and so-called affinity labels, binding with high strength or even irreversible binding on specific receptors can now be produced, permitting their isolation and characterization.

The cholinergic receptor is stimulated by the neurotransmitter, acetylcholine. A subgroup, the nicotinic receptors, are found in skeletal muscles, nerve ganglions and the central nervous system. These receptors can be isolated most readily from the electric organs of torpedo fish and eels with methods using the binding of α-bungarotoxin or cobratoxin. The molecular weight, structure of five subunits, compositions out of glycoproteins and coupling with ion channels in the membranes of nerve cells are today under intensive investigation. The other subgroup, the muscarinic receptors, control mainly the smooth muscles of the inner organs as well as the neuronal synapses in the brain and heart. They can also be specifically labeled, however their isolation and purification has not yet been achieved. Further subtypes of these muscarinic receptors are especially important in the regulation of heart and brain function. The muscarinic receptors seem to be necessary for the functioning of memory and cognitive perception. Anomalies in the receptors of cholinergic synapses are known in the pathological conditions of myasthenia gravis, senile dementia, morbus Parkinson and perhaps also in epilepsy.

Verdankung

Besonderer Dank gebührt Frau Elsbeth Schönenberger für ihre Hilfe bei der Abfassung und Drucklegung dieser Arbeit.

10 Literatur

Adams, P. R. (1981), Acetylcholine receptor kinetics. J. Membrane Biol. *58*, 161–174.

Akert, K.; Peper, K.; Sandri, C. (1975) Structural organization of motor end plate and central synapses. In: Cholinergic Mechanisms. Ed. P. G. Waser, Raven Press, New York. 43–57.

Albuquerque, E. X.; Eldefrawi, A. T.; Eldefrawi, M. E. (1979), The use of snake toxins for the study of the acetylcholine receptor and its ion-conductance modulator. In: C. Y. Lee ed., Snake Venoms. Springer-Verlag, Berlin. 377–402.

Albuquerque, E. X.; Rash, J. E.; Mayer, R. F.; Satterfield, J. R. (1976). An electrophysiological study of the neuromuscular junction in patients with myasthenia gravis. Exp. Neurol. *51*, 536–563.

Arad, H.; Levitzki, A. (1979) The mechanism of partial agonism in the beta-receptor dependent adenylate cyclase of turkey erythrocyte. Mol. Pharmacol. *16*, 749–756.

Baker, R. W.; Chothia, C. H.; Pauling, P.; Petcher, T. J. (1971), Structure and activity of muscarinic stimulants. Nature *230*, 439–445.

Bandini, G.; Verdenhalven, J.; Hucho, F. (1982) Protease activities and quaternary structure of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. Inhibition by α'(43K) peptide. In: Neurorezeptors. Ed.: F. Hucho, Walter de Gruyter + Co. Berlin. 275–288.

Barlow, R. B. (1960), Steric aspects of drug action. Biochem. Soc. Symp. *19*, 46–65.

Barlow, R. B.; Franks, F. M.; Pearson, J. D. M. (1972) The relation between biological activity and the degree of resolution of optical isomers. J. Pharm. Pharmacol. *24*, 753–761.

Barrantes, F. J.; Changeux, J. P.; Lunt, G. G.; Sobel, A. (1976) Reply to De Robertis et al. Nature *259*, 605–606.

Behr, J. P.; Lehn, J. M. (1972) Molecular dynamics of acetylcholine and choline. Biochem. Biophys. Res. Commun. *49*, 1573–1579.

Bernard, C. (1857). Leçons sur les effects des substances toxiques et médicamenteuses. J. B. Baillière et fils, Paris, 238–337.

Berrie, C. P.; Birdsall N. J. M.; Burgen, A. S. V.; Hulme, E. C. (1979). Guanine nucleotides modulate muscarinic receptor binding in the heart. Biochem. Biophys. Res. Commun. *87*, 1000–1005.

Boekelheide, V.; Prelog, V. (1955) Indol alkaloids. Prog. Org. Chem. *3*, 218–266.

Burgen, A. S. V.; Hiley, C. R. (1975), The use of alkylating antagonist in investigating the properties of muscarinic receptors. In: Cholinergic Mechanisms, Ed. P. G. Waser, Raven Press, New York, 381–385.

Burgen, A. S. V.; Hiley, C. R.; Young, J. M. (1974), The binding of ^{3}H-propylbenzilylcholine mustard by longitudinal muscle strips from guinea-pig small intestine. Br. J. Pharmacol. *50*, 145–151.

Burgen, A. S. V.; Hiley, C. R.; Young, J. M. (1974), The properties of muscarinic receptors in mammalian cerebral cortex. Br. J. Pharmacol. *51*, 229–285.

Burgen, A. S. V.; Hulme, E. C.; Berrie, C. P.; Birdsall, N. J. M. (1981), Membrane receptors. In: Cell membrane in function and dysfunction of vascular tissue, Ed. Godfraind and Meyer, Elsevier/North-Holland, 15–25.

Calvin, M. (1974), Biopolymers: Origin, chemistry and biology. Angew. Chemie *13*, 121–131.

Caratsch, C. G.; Waser, P. G. (1973) Tricyclic antidepressants: action on synaptosomal acetylcholinesterase and ATPase in the brain of guinea pigs and subcellular distribution. Neuropharmacol. *12*, 563–575.

Caratsch, C. G.; Waser, P. G.; Spiess, C.; Felix, D.; Walser, J. (1976), Effect of p-nitrophenyl diazonium fluoroborate on cholinergic mechanisms. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. *294*, 61–68.

Caratsch, C. G.; Waser, P. G.; Spiess, C.; Schönenberger, E. (1979) Quantitative correlation between complete block of nicotinic acetylcholine receptors and saturation of the motor endplate with ^{14}C-Toxiferine. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. *306*, 17–21.

Castillo del, J.; Katz, B. (1955), On the localization of acetylcholine receptors. J. Physiol. *128*, 157–181.

Changeux, J. P. (1981), The acetylcholine receptor: an "allosteric" membrane protein. The Harvey Lectures, Series *75*. Academic Press, New York, p. 85–254.

Chothia, C. H. (1970), Interaction of acetylcholine with different cholinergic nerve receptors. Nature *225*, 36–38.

Chothia, C.; Pauling, P. (1970), The conformation of cholinergic molecules at nicotinic nerve receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *65*, 477–482.

Clark, A. J. (1933), The mode of action of drugs on cells. Ed. Edward Arnold, London. 298 Seiten.
Colquhoun, D. (1981) How fast do drugs work? In: Towards understanding receptors. Ed. J. W. Lamble, Elsevier, North-Holland, Amsterdam. 16–27.
Creese, R.; England, J. M. (1970) Decamethonium in depolarized muscle and the effects of tubocurarine. J. Physiol. *210,* 345–361.
Creese, R.; Maclagan, J. (1970) Entry of decamethonium in rat muscle studied by autoradiography. J. Physiol. *210,* 363–386.
Cuatrecasas, P.; Wilchek, M.; Anfinsen, C. B. (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *61,* 636–643.
Cuénoud, S.; Feltkamp, T. E. W.; Fulpius, B. W.; Oosterhuis, H. J. G. H. (1980), Antibodies to acetylcholine receptor in patients with thymoma but without myasthenia gravis. Neurology, *30,* 201–203.
Dale, H. H. (1914), The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. J. Pharmacol. Exp. Ther. *6,* 147–190.
Davies, P. (1981) Theoretical treatment possibilities for dementia of the Alzheimer type: the cholinergic hypothesis. In: Strategies for the development of an effective treatment for senile dementia. Ed. Th. Crook, S. Gershon, by Mark Powley Ass., Inc., 19–31.
Davis, K. L.; Mohs, R. C.; Davis, B. M.; Levy, M.; Rosenberg, G. S.; Horvath, T. B.; De Nigris, Y.; Ross, A.; Decker, P.; Rothpearl, A. (1981) Cholinomimetic agents and human memory: Clinical studies in Alzheimer's disease and scopolamine dementia. In: Strategies for the Development of an Effective Treatment for senile Dementia. Ed. Th. Crook, S. Gershon, by Mark Powley Ass., Inc., 53–69.
Drachman, D. A. (1977) Memory and cognitive function in man: Does the cholinergic system have a specific role? Neurology, *27,* 783–790.
Drachman, D. A.; Leavitt, J. (1974) Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? Arch. Neurol. *30,* 113–121.
Dunant, Y. (1981) A critical evaluation of the vesicular hypothesis for acetylcholine release. In: Chemical Neurotransmission 75 Years. Ed. L. Stjärne, P. Hedquist, H. Lagercrantz, Å. Wennmalm. Academic Press New York. 165–178.
Dwyer, D. S., Bradley, R. J., Oh, S. J. and Kemp, G. E. (1979), A modified assay for antibody against the nicotinic acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Clin. exp. Immunol. *37,* 448–451.
Ehrlich, P. (1900) On immunity with special reference to cell life (Croonian lecture). Proc. Roy. Soc. London, *66,* 424–448.
Ehrlich, P. (1909) Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. Ber. dtsch. chem. Ges. *42,* 17–47.
Ehrlich, P.; Bertheim, A. (1907) Über p-Aminophenylarsensäure. Ber. Dtsch. Chem. Ges. *40,* 3292–3297.
Ehrlich, P.; Bertheim, A. (1910) Reduktionsprodukte der Arsanilsäure und ihrer Derivate, I. Mitteilung über Aminophenylarsenoxyd. Ber. Dtsch. Chem. Ges. *43,* 917–927.
Eldefrawi, A. T. (1976), The acetylcholine receptor and its interactions with insecticides. In: Insecticide Biochemistry and Physiology, Ed. C. F. Wilkinson, Plenum Publishing Corporation, New York, 297–326.
Eldefrawi, M. E.; Eldefrawi, A. T. (1977), Acetylcholine receptors. In: «Receptors and Recognition», Ed. P. Cuatrecasas, M. F. Greaves. Chapman and Hall, London. *4,* 199–258.
Eldefrawi, M. E.; Eldefrawi, A. T. (1979), Biochemical studies on the ionic channel of *Torpedo* acetylcholine receptor. Adv. Cytopharmacology *3,* 213–223.
Eldefrawi, A. T.; Eldefrawi, M. E. (1980), Putative acetylcholine receptors in housefly brain. In: Receptors for Neurotransmitters, Hormones and Pheromones in Insects, Ed. D. B. Satelle et al., Elsevier/North-Holland, 59–70.
Eldefrawi, M. E.; Eldefrawi, A. T.; Shamoo, A. E. (1975), Molecular and functional properties of the acetylcholine-receptor. Ann. N. Y. Acad. Sci. *264,* 183–202.
Eldefrawi, M. E.; Aronstam, R. S.; Bakry, N. M.; Eldefrawi, A. T.; Albuquerque, E. X. (1980), Activation, inactivation, and desensitization of acetylcholine receptor channel complex detected by binding of perhydrohistrionicotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *77,* 2309–2313.
Eugster, C. H. (1960), The chemistry of muscarine. Adv. Org. Chem. *2,* 427–455.
Eugster, C. H. (1966), Über den Fliegenpilz. 169. Neujahrsblatt, Vierteljahr. Naturforsch. Ges. in Zürich, 39 Seiten.
Eugster, C. H.; Waser, P. G. (1954), Zur Kenntnis des Muscarins. Experientia *10,* 298–300.
Fambrough, D. M. (1981) Biosynthesis and turnover of nicotinic acetylcholine receptors. In: Drug Receptors and their effectors. Ed. N. J. M. Birdsall, J. W. Arrowsmith Ltd. Bristol, 155–163.

Feeney, J.; Piper, E. A.; Foster, R. (1978), An NMR study of the conformations of atropine and scopolamine cations in aqueous solution. In: Adv. Pharmacol. Ther. Proc. Int. Congr. Pharmacol., 7th. Ed. J. C. Stoclet, Pergamon Press, 281–292.

Fischer, H. (1971), Vergleichende Pharmakologie von Überträgersubstanzen in tiersystematischer Darstellung. Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band *26*, Springer Verlag, Heidelberg. 1074 Seiten.

Fontana, A.; Fulpius, B. W.; Cuénoud, S. (1979) Antibodies against muscle and brain nicotinic acetylcholine receptors in IgA-deficient patients with epilepsy. In: Adv. in Cytopharmacol. *3*, Ed. B. Ceccarelli, F. Clementi, Raven Press New York, 287–292.

Frank, J.; Schwyzer, R. (1970) Diazoacetylcholine bromide. Experientia *26*, 1207–1209.

Franklin, T. J. (1981) Binding energy and the excitation of hormone receptors. In: Towards Understanding Receptors, Ed. J. W. Lamble, Elsevier – North Holland, 8–15.

Gaddum, J. H. (1937), The quantitative effects of antagonistic drugs. J. Physiol. *89*, 7P–9P.

Gaddum, J. H. (1937) Discussion on the chemical and physical bases of pharmacological action. Proc. R. Soc. London *121*, 598–601.

George, W. J.; Wilkerson, R.; Kadowitz, P. J. (1973), Influence of acetylcholine on contractile force and cyclic nucleotide levels in the isolated perfused rat heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. *184*, 228–235.

Gill, E. W.; Rang, H. P. (1966), An alkylating derivative of benzilylcholine with specific and long-lasting parasympatholytic activity. Mol. Pharmacol. *2*, 284–297.

Giraudat, J.; Changeux, J. P. (1981), The acetylcholine receptor. In: Towards understanding receptors. Ed. J. W. Lamble, Elsevier/North-Holland. 34–43.

Gotti, C.; Conti-Tronconi B. M.; Raftery M. A. (1982) Mammalian muscle acetylcholine receptor purification and characterization. Biochem. *21*, 3148–3154.

Granato, D. A.; Fulpius, B. W.; Moody, J. F. (1976) Experimental myasthenia in balb/c mice immunized with rat acetylcholine receptor from rat denervated muscle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. *73*, 8, 2872–2876.

Grohovaz, F.; Limbrick, A. R.; Miledi, R. (1982) Acetylcholine receptors at the rat neuromuscular junction as revealed by deep etching. Proc. R. Soc. London *215*, 147–154.

Heilbronn, E. (1975) Biochemistry of cholinergic receptors. In: Cholinergic Mechanisms, Ed. P. G. Waser, Raven Press, New York. 343–364.

Heilbronn, E.; Karlsson, E.; Widlund, L. (1972) Purification of a membrane constituent, possibly the nicotinic cholinergic receptor, from the electric organ of *Torpedo marmorata*. In: Transmission Cholinergique de l'Excitation. M. Fardeau, M. Israel, T. P. Manarache, Eds., Inserm Paris. 151–158.

Heilbronn, E.; Mattsson, C. (1974) The nicotinic cholinergic receptor protein: Improved purification method, preliminary amino acid composition an observed auto-immuno response. J. Neurochem. *22*, 315–317.

Henke, H.; Lang, W. (1982) Cholinergic enzymes in neocortex, hyppocampus and basal forebrain of non-neurological and senile dementia of Alzheimer type patients. Im Druck in Brain Res.

Hiley, C. R., Burgen, A. S. V. (1974), The distribution of muscarinic receptor sites in the nervous system of the dog. J. Neurochem. *22*, 159–162.

Holtzman, E.; Wise, D.; Wall, J.; Karlin, A. (1982), Electron microscopy of complexes of isolated acetylcholine receptor, biotinyl-toxin, and avidin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *79*, 310–314.

Hopff, W. H. (1976), Isolierung von Acetylcholinesterase und Charakterisierung der katalytisch aktiven Stelle. Vierteljahr. Naturforsch. Ges. Zürich *121*, 223–260.

Hopff, W.; Waser, P. G. (1970), Warum können Reaktivatoren schädlich sein? Abgehandelt am Beispiel der Reaktivierung der blockierten Acetylcholinesterase. Pharm. Acta Helvetica, *45*, 414–423.

Hopff, W.; Waser, P. G. (1975), Acetylcholinesterase therapy in organophosphate poisoning? Experientia, *31*, 729.

Hopff, W. H.; Hofmann, A. A.; Riggio, G.; Waser, P. G. (1981), Cholinergic receptor isolation. Ed. Giancarlo Pepeu and Herbert Ladinsky, In: Cholinergic Mechanisms, 323–332.

Hopff, W. H.; Riggio, G.; Hofmann, A.; Waser, P. G. (1975), Characterization of the active site of acetylcholinesterases by application of sterically modified acetylcholine homologues. Croat. Chem. Acta, *47*, 309–319.

Hopff, W. H.; Riggio, G.; Waser P. G. (1973), Affinity chromatography of acetylcholine, acetylhydrolase. EC 3.1.1.7. A new straight chain aliphatic inhibitor. FEBS Letters *35*, 220–222.

Hopff, W. H.; Riggio, G.; Waser, P. G. (1975), Progress in isolation of acetylcholinesterase. In: Cholinergic Mechanisms. Ed. P. G. Waser, Raven Press, New York. 293–298.

Hopff, W., Riggio, G.; Waser, P. G. (1981), Another approach for the treatment of organophosphate poisoning. Experientia, *37*, 69.
Hucho, F. (1981), The nicotine acetylcholine receptor. Trends Biochem. Sci. *6*, 242–244.
Hucho, F.; Bandini, G.; Suarez-Isla, B. (1978), The AChR as a part of a protein complex in receptor-enriched membrane fragments from *Torpedo californica* electric tissue. Eur. J. Biochem. *83*, 335–340.
Hulme, E. C.; Berrie, C. P., Birdsall, N. J. M.; Burgen, A. S. V. (1981), Two populations of binding sites for muscarinic antagonists in the rat heart. Eur. J. Pharmacol. *73*, 137–142.
Hulme, E. C.; Birdsall, N. J. M.; Berrie, C. P.; Burgen, A.S.V. (1980), Muscarinic receptor binding: Modulation by nucleotides and ions. In: Neurotransmitters and their receptors, Ed. U. Z. Littauer, Y. Dudai, I. Silman, V. I. Teichberg, Z. Vogel, John Wiley & Sons Ltd., 241–250.
Hunt, R. (1915), Some physical actions of the homocholins and of some of their derivatives. J. Pharmacol. Exp. Ther. *6*, 477–525.
Ing, H. R. (1949), The structure-action relationship of the choline group. Science *109*, 264–266.
Kalow, W. (1962), Heritable factors recognized in man by the use of drugs. In: Pharmacogenetics. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 231 Seiten.
Karlin, A.; Damle, V.; Hamilton, S.; McLaughlin, M.; Valderamma, R.; Wise, D. (1979), Acetylcholine receptors in and out of membranes. In: Adv. Cytopharmacol. *3*. Ed. B. Ceccarelli, F. Clementi, Raven Press, New York. 183–189.
Karlsson, E.; Heilbronn, E.; Widlund, L. (1972), Isolation of the nicotinic acetylcholine receptor by biospecific chromatography on insolubilized naja naja neurotoxin. FEBS Lett. *28*, 107–111.
Karnovsky, M. J. (1964), The localization of cholinesterase activity in rat cardiac muscle by electron microscopy. The J. Cell. Biology *23*, 217–231.
Karrer, P.; Schmid, H. (1955), Neuere Arbeiten über Curare, insbes. Calebassen-Curare und Alkaloide aus *Strychnos*-Rinden. Angew. Chem. *67*, 361–373.
Karrer, P.; Schmid, H.; Waser, P. G. (1960), Kurzer Überblick über die Chemie und Pharmakologie der Calebassencurare Alkaloide. Farmaco, Ed. Sci. *15*, 126–136.
Koelle, G. B.; Friedenwald, J. S. (1949), A histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) *70*, 617–622.
Kölliker, A. (1856), Physiologische Untersuchungen über die Wirkung einiger Gifte. Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. *10*, 3–77.
Kölliker, A. (1856), Note sur l'action du curare sur le système nerveux. C. R. Acad. Sci. (Paris) *43*, 791–792.
Kölliker, A. (1856), Sur la terminaison des nerfs dans l'organe électric de la Torpille. C. R. Acad. Sci. (Paris) *43*, 792–794.
Konzett, H.; Waser, P. G. (1956), Zur ganglionären Wirkung von Muscarin. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta *14*, 202–206.
Koppanyi, T.; Karczmar, A. G. (1951), Contribution to the study of the mechanism of action of cholinesterase inhibitors. J. Pharmacol. exp. Ther. *101*, 327–344.
Kuhar, M. J.; Birdsall, N. J. M.; Burgen, A.S.V.; Hulme, E. C. (1980), Ontogeny of muscarinic receptors in rat brain. Brain Research *184*, 375–383.
Laidler, K. (1955), Some kinetic and mechanistic aspects of hydrolytic enzyme action. Discuss. Faraday Soc. *20*, 83–96.
Lambrecht, G.; Mutschler, E. (1974), Conformational isomerism in drug action: Does the free energy of binding induce the pharmacophoric conformation of semi-rigid muscarinic agonists? In: Molecular and Quantum Pharmacology, Ed. E. Bergmann and B. Pullmann, D. Reidel, Dordrecht, Holland, 179–187.
Lambrecht, G.; Mutschler, E. (1974), Struktur- und Konformations-Wirkungs-Beziehungen bei zyklischen Acetylcholinanaloga der Piperidin- und Chinuclidin-Reihe. Arzneim.-Forsch. *24*, 1725–1729.
Lang, W.; Henke, H. (1982), Cholinergic receptor binding and autoradiography in brains of non-neurological and senile dementia of Alzheimer type patients. Im Druck in Brain Res.
Langley, J. N. (1878), II. On the physiology of the salivary secretion. J. Physiol. London. *1*, 339–369.
Langley, N. N. (1905), On the reaction of cells and nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscles to nicotine and curare. J. Physiol. London, *33*, 374–413.
Langley, J. N. (1906), On nerve endings and on special excitable substances in cells (Croonian lecture). Proc. R. Soc. London B *78*, 170–194.

Lebbin, C.; Hofmann, A.; Waser, P. G. (1975), Affinity-labelling of the muscarinic receptor of the guinea-pig ileum. Naunyn-Schmiedebergs's Arch. Pharmacol. *289*, 237–249.
Lindstrom, J. M. (1979), Autoimmune response to acetylcholine receptors in myasthenia gravis and its animal model. Adv. Immunol. *27*, 1–50.
Lindstrom, J. M.; Merlie, J. P.; Yogeeswaran, G. (1979), Biochemical properties of acetylcholine receptor subunits from *Torpedo californica*. Biochem. *18*, 4465–4470.
Loewi, O. (1921), Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung, I. Pflügers Arch. Gesamte Physiol. *189*, 239–242.
Loewi, O.; Mansfeld, G. (1910), Über den Wirkungsmodus des Physostigmins. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. *62*, 180–185.
Loewi, O.; Navratil, E. (1926), Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung, X., über das Schicksal des Vagusstoffes. Pflügers Arch. Gesamte Physiol. *214*, 678–688.
Maelicke, A.; Fulpius, B. W.; Reich, E. (1977), Biochemical aspects of neurotransmitter receptors: Handbook of Physiology, Section 1, Ed. Brookhart J. M., Mountcastle V. B., Kandel, E. R., Geiger, S. R., Amer. Physiol. Soc. Bethesda, 493–519.
Massoulé, J.; Bon, S.; Vigny, M. (1980), The polymorphism of cholinesterase in vertebrates. Neurochem. Int. *2*, 161–184.
Maulner, H. G. (1974), Studies of the conformation in solution of molecules related to acetylcholine. In: Molecular and Quantum Pharmacology. Ed. E. Bergmann and B. Pullman, Reidel Publishing Company, Dordrecht-Holland, 119–129.
Meunier, J. C.; Sealock, R.; Olson, R. W.; Changeux, J. P. (1974), Purification and properties of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* tissue. Eur. J. Biochem. *45*, 371–394.
Meyer, M. R.; Gainer, M. W.; Nathanson, N. M. (1982), In vivo regulation of muscarinic cholinergic receptors in embryonic chick brain. Mol. Pharmacol. *21*, 280–286.
Miledi, R.; Molinoff, P.; Potter, L. T. (1971), Isolation of the cholinergic receptor protein of *Torpedo* electric tissue. Nature, *229*, 554–557.
Miledi, R.; Potter, L. T. (1971), Acetylcholine receptors in muscle fibres. Nature, *233*, 599–603.
Miller, R. J. and Hiley, C. R. (1974), Anti-muscarinic properties of neuroleptics and drug-induced parkinsonism. Nature, *248*, 596–597.
Moore Ede, M. C. (1973), Circadian rhythms of drug effectiveness and toxicity. Clin. Pharmacol. Ther. St. Louis *14*, 925–935.
Morley, B. J.; Kemp, G. E. (1981), Characterization of a putative nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. Brain Res. Rev. *3*, 81–104.
Nickel, E.; Waser, P. G. (1968), Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Diaphragma der Maus nach einseitiger Phrenikotomie. I. Die degenerierende motorische Endplatte. Z. Zellforsch. *88*, 278–296.
Olsen, R.; Meunier, J. C.; Weber, M.; Changeux, J. P. (1972), Characterisation, isolation and purification of the cholinergic receptor protein from *Elcetrophorus* electric organ. FEBS Lett. *28*, 96–100.
Orci, L.; Perrelet, A. (1975), Freeze-etch histology. A comparison between thin sections and freeze-etch replicas. Springer Verlag Heidelberg. 168 Seiten.
Overton, E. (1895), Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle. Vierteljahr. Naturforsch. Ges. Zürich *40*, 159–201.
Overton, E. (1899), Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. Vierteljahr. Naturforsch. Ges. Zürich *44*, 88–135.
Overton, E. (1901), Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie (G. Fischer, Jena).
Paton, W. D. M. (1961), A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination. Proc. R. Soc. London, B *154*, 21–69.
Paton, W. D. M.; Rang, H. P. (1965), The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea-pig in relation to acetylcholine receptors. Proc. R. Soc. London, B. *163*, 1–44.
Patrick, J. and Lindstrom J. (1973), Autoimmune response to acetylcholine receptor. Science, *180*, 871–872.
Pauling, P. (1975), The shapes of cholinergic molecules. In: Cholinergic Mechanisms. Ed. P. G. Waser, Raven Press, New York, 241–249.
Pauling, P.; Petcher, T. J. (1973), Neuromuscular blocking agents: Structure and activity. Chem. Biol. Interactions *6*, 351–365.

Pfeiffer, C. C. (1948), Nature and spatial relationship of the prosthetic chemical groups required for maximal muscarinic action. Science *107*, 94–96.
Poo, M. m. (1982), Rapid lateral diffusion of functional Ach receptors in embryonic muscle cell membrane. Nature, *295*, 332–334.
Porter, K. R.; Bonneville, M. A. (1965), Einführung in die Feinstruktur von Zellen und Geweben. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 32 Tafeln.
Pullman, B.; Courrière, P. (1972), Further molecular orbital studies on the conformation of acetylcholine and its derivatives. Mol. Pharmacol. *8*, 612–622.
Raftery, M. A. (1980), Acetylcholine receptor: Complex of homologous subunits. Science, *208*, 1454–1456.
Raftery, M. A.; Witzemann, V.; Blanchard S. G. (1980), The use of photochemical probes for studies of structure and function of purified acetylcholine receptor preparations. Ann. N Y. Acad. Sci. *346*, 458–474.
Remen, L. (1932), Zur Pathogenese und Therapie der Myasthenia gravis. Dtsche Z. Nervenheilkd. *128*, 66–78.
Riggio, G.; Hopff, W. H.; Hofmann, A. A.; Waser, P. G. (1980), Specific ligands for the affinity chromatography of cholinergic proteins. Helv. Chim. Acta *63*, 488–497.
De Robertis, E. (1971), Molecular biology of synaptic receptors. Science *171*, 963–971.
De Robertis, E. (1975), Synaptic receptor proteins. Isolation and reconstitution in artificial membranes. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. *73*, 9–38.
De Robertis, E.; Fiszer de Plazas, S.; de Carlin, M. C. L. (1976), Similarities between cholinergic proteolipid and detergent-extracted cholinergic proteins. Nature *259*, 605.
Ross, M. J.; Klymkowsky, M. W.; Agard, D. A.; Stroud, R. M. (1977), Structural studies of a membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. J. Mol. Biol. *116*, 635–659.
Rotter, A.; Field, P. M.; Raisman, G. (1979), Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. III. Postnatal development of binding of (^{3}H)propylbenzilylcholine mustard. Brain Research Reviews *1*, 185–205.
Rotter, A.; Birdsall, N. J. M.; Field, P. M.; Raisman, G. (1979), Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. II. Distribution of binding of (^{3}H) propylbenzilylcholine mustard in the midbrain and hindbrain. Brain Research Reviews *1*, 167–183.
Rotter, A.; Birdsall, N. J. M.; Burgen, A. S. V.; Field, P. M.; Hulme, E. C.; Raisman, G. (1979), Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of (^{3}H)propylbenzilylcholine mustard and its distribution in the forebrain. Brain Research Reviews *1*, 141–165.
Rotter, A.; Birdsall, N. J. M.; Burgen, A. S. V.; Field, P. M.; Smolen, A.; Raisman, G. (1979), Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. IV. A comparison of the effects of axotomy and deafferentation on the binding of (^{3}H)propylbenzilylcholine mustard and associated synaptic changes in the hypoglossal and pontine nuclei. Brain Research Reviews *1*, 207–224.
Ruberg, M.; Ploska, A.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y. (1982), Muscarinic binding and choline acetylcholintransferase activity in parkinsonian subjects with reference to dementia. Brain Research, *232*, 129–139.
Rübsamen, H.; Eldefrawi, A. T.; Eldefrawi, M. E.; Hess, G. P. (1978), Characterization of the calcium-binding sites of the purified acetylcholine receptor and identification of the calcium-binding subunit. Biochem. *17*, 3818–3825.
Sandri, C.; Ris, H.; Akert, K. (1978), Comparison of active zones in spinal cord of anesthetized and unanesthetized rats: a high voltage electron microscope study. Brain Research, *159*, 247–253.
Schaffer, N. K.; Michel, H. O.; Bridges, A. F. (1973), Amino acid sequence in the region of the reactive serine residue of eel acetylcholinesterase. Biochem. *12*, 2946–2950.
Schiebler, W.; Hucho, F. (1978), Membranes rich in acetylcholine receptor: Characterization and reconstitution to excitable membranes from exogenous lipids. Eur. J. Biochem. *85*, 55–63.
Schiebler, W.; Bandini, G.; Hucho, F. (1980), Quaternary structure and reconstitution of acetylcholine receptor from *Torpedo california*. Neurochem. Int. *2*, 281–290.
Schmidt, J.; Raftery, M. A. (1973), Purification of acetylcholine receptors from *Torpedo californica* electroplax by affinity chromatography. Biochem. *12*, 852–856.
Schwyzer, R. (1974), An alternative to the cAMP second messenger concept. Pure Appl. Chem. *37*, 299–314.
Schwyzer, R.; Karlaganis, G.; Lang, U. (1980), Hormone-Receptor Interactions: A study of the molecular mechanism of receptor stimulation in isolated fat cells by the partial agonist corti-

cotropin-(5-24)-icosapeptide. In: Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology. Ed. S. N. Ananchenko, Pergamon Press Oxford und New York. 277–283.
Smith, C. M.; Swash, M. (1978), Possible biochemical basis of memory disorder in Alzheimer disease. Ann. Neurol. *3*, 471–473.
Sundaralingam, M. (1968), Conformational relationship between the O-C-C-N $^{+}$ system of phospholipids and substrates of muscarinic and cholinergic systems. Nature *217*, 35–37.
Taylor, P.; Lwebuga-Mukasa, J.; Lappi. S.; Berman, H. A. (1978), Structure of acetylcholinesterase: its relationship to the postsynaptic membrane. Sympos. on cholinergic Mechanisms, Plenum, New York, 239–251.
Thanei, P. (1982), Struktur und Wirkungsbeziehungen von Inhibitoren zur Charakterisierung des aktiven Zentrums der Acetylcholinesterase (in Vorbereitung).
Thornell, L. E., Sjöström, M., Mattsson, C. H. and Heilbronn, E. (1976), Morphological observations on motor end-plates in rabbits with experimental myasthenia. J. Neurol. Sci., *29*, 389–410.
Trautmann, A. (1982), Curare can open and block ionic channells associated with cholinergic receptors. Nature, *298*, 272–275.
Trautwein, W.; Osterreider, W; Noma, A. (1980), Potassium channel and the muscarinic receptor in sino-atrial node of the heart. In Drug receptors and their effectors, Ed. N. J. M. Birdsall, Macmillan, London, 5–22.
Triggle, D. J. (1979), The muscarinic receptor: structural, ionic and biochemical implications. In: Recent Adv. Recept. Chem., Proc. Int. Symp. Ed. F. Gualtieri, M. Gianella, C. Melchiorre, Elsevier, North-Holland. 127–146.
Triggle, D. J. (1981), Desensitization. In: Towards Understanding Receptors. Ed. J. W. Lamble, Elsevier North-Holland, Biomedical Press. 28–33.
Truog P.; Waser, P. G. (1970), Einflüsse der Denervation von Muskelendplatten auf die Lokalisation der Acetylcholinesterase und die Bindung von Decamethonium. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *266*, 101–112.
Walker, M. B. (1934), Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. Lancet. *1*, 1200–1201.
Walker, M. B. (1935), Case showing effect of prostigmine on myasthenia gravis. Proc. R. Soc. Med. *28*, 759–761.
Walser, J. T.; Schaub, M. C.; Waser, P. G. (1975), Binding studies on membrane fragments of electroplax from *Torpedo marmorata*. Ed. P. G. Waser, in: Cholinergic Mechanisms, Raven Press, New York, 365–374.
Waser, P. G. (1953), Calebassen-Curare. Helv. Physiol. Acta Suppl. VIII. 84 Seiten.
Waser, P. G. (1957), Über die Wirkungsweise von cholinergischen- und anticholinergischen Stoffen. Schw. Med. Wochenschrift *87*, 577–585.
Waser, P. G. (1958), Autoradiographie von Endplatten mit Radiocurarin nach Denervierung, Prostigmin oder SKF 525A. Helv. Physiol. Acta *16*, 171–182.
Waser, P. G. (1959), Curare and cholinergic receptors in the motor endplate. In: Curare and Curare-like Agents. Ed. D. Bovet, F. Bovet-Nitti, G. B. Marini-Bettolo, Elsevier, Amsterdam, 219–229.
Waser, P. G. (1960), The cholinergic receptor. J. Pharm. Pharmacol. *12*, 577–594.
Waser, P. G. (1961), Chemistry and pharmacology of muscarine, muscarone and some related compounds. Pharmacol. Rev. *13*, 465–515.
Waser, P. G. (1962), Die cholinergischen Receptoren der Muskelendplatten. Pflügers Archiv *274*, 431–446.
Waser, P. G. (1962), Relation between enzymes and cholinergic receptors. On Enzymes and Drug Action. Ed. J. L. Mongar and A. V. S. de Reuck, J. & A. Churchill Ltd, London, 206–217.
Waser, P. G. (1963), Nature of the cholinergic receptor. First International Pharmacological Meeting, *7*. Pergamon Press, 101–115.
Waser, P. G. (1965), The molecular distribution of ^{14}C-Decamethonium in and around the motor endplate and its metabolism in cats and mice. In Proc. of the 2nd Int. Pharmacological Meeting, Prague, Pergamon Press, Oxford, 129–136.
Waser, P. G. (1967), Pharmakogenetik. Helv. Med. Acta, Suppl. *47*, 5–14.
Waser, P. G. (1970), On receptors in the postsynaptic membrane of the motor endplate. In: Molecular Properties of Drug Receptors, Ed. R. Porter, M. O'Connor, by J.+A. Churchill, London. 59–75.
Waser, P. G. (1971), Eine molekulare Theorie zur Wirkungsweise curarisierender Stoffe. Der Anaesthesist *20*, 23–29.

Waser, P. G. (1975), Molecular basis of curare action. Ed. R. Katz, G. Katz, Muscle Relaxants, North Holland Publ. 103–123.
Waser, P. G. (1981), Neuere Untersuchungen über die Ultrastruktur der cholinergen Synapse. In: Muskelrelaxantien, Ed. W. Buzello, Thieme Verlag, Stuttgart. 1–15.
Waser, P. G.; Hadorn, I. (1961), Relations of cholinergic receptors to acetylcholinesterase of endplates in denervated muscle. Bibl. Anat. *2*, 155–160.
Waser, P. G.; Hopff, W. (1978), Structure and activity of some new muscarine derivatives and acetylcholine analogues. In: Adv. Pharmacol. Ther., Proc. Int. Congr. Pharmacol., 7th, Ed. J. C. Stoclet, Pergamon Press, Oxford, New York. 261–269.
Waser, P. G.; Lüthi, U. (1956), Autoradiography of endplates with carbon-14-calabash curarine I and carbon-14-decamethonium. Nature *178*, 981.
Waser, P. G.; Lüthi, U. (1957), Autoradiographische Lokalisation von ^{14}C-Calebassen-Curarin und ^{14}C Decamethonium in der motorischen Endplatte. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. *112*, 272–296.
Waser, P. G.; Reller, J. (1965), Bestimmung der Zahl aktiver Zentren der Acetylcholinesterase in motorischen Endplatten. Experientia *21*, 402–403.
Waser, P. G.; Hofmann, A.; Hopff, W. (1970), «Affinity labelling» des cholinergischen Rezeptors der motorischen Endplatte mit Diazo-Acetylcholin. Experientia *26*, 1342–1343.
Waser, P. G.; Hopff, W.; Riggio, G. (1979), Identification and isolation of a cholinergic receptor and acetylcholinesterase from electric organs. Ed. F. Gualtieri, M. Giannella and C. Melchiorre, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 97–110.
Waser, P. G.; Hofmann, A.; Schaub, M. C.; Hopff, W.; Karis, J. H.; Rosen, G.; Chang, A. (1973), Affinity labelling of cholinergic receptors with curarizing and depolarizing drugs. In: 5th, Int. Congr. Pharmacology, San Francisco *5*, by S. Karger, Basel, 98–112.
Waser, P. G.; Studer. E.; Caratsch, C.; Chang, A.; Hofmann, A. (1975), Affinity labeling and action of ultraviolet light on end plates. In: Cholinergic Mechanisms, Ed. P. G. Waser, Raven Press, New York. 387–393.
Welsh, J. H.; Taub, R. (1950), Structure-activity relationships of acetylcholine and quaternary ammonium ions. J. Pharmacol. Exp. Ther. *99*, 334–342.
Werner, G.; Wojnarowski, W.; Hopff, W. H.; Waser, P. G. (1978), Constituents of acetylcholinesterase. In: Cholinergic Mechanisms and Psychopharmacology, Ed. D. J. Jenden, Plenum New York. 231–237.
White, P.; Goodhardt, J. J.; Keet, J. P.; Hiley, C. R.; Carrasco, L. H.; Williams, I. E. I.; Bowen, D. M. (1977), Neocortical cholinergic neurons in elderly people. Lancet, 668–670.
Wilson, I. B. (1951), Mechanism of enzymic hydrolysis. I. Role of the acidic group in the esteratic site of ACHE. Biochim. et Biophys. Acta *7*, 466–470.
Wilson, I. B. (1951), Mechanism of enzymic hydrolysis. II. New evidence for an acylated enzyme as intermediate. Biochim. et Biophys. Acta *7*, 520–525.
Wise, D. S., Wall, J.; Karlin, A. (1981), Relative locations of the β and δ chains of the acetylcholine receptor determined by electron microscopy of isolated receptor trimer. J. Biol. Chem. *256*, 12624–12627.
Wu, W. C.-S.; Moore, H. P. H.; Raftery, M. A. (1981), Quantitation of cation transport by reconstituted membrane vesicles containing purified acetylcholine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *78*, 775–779.
Yamamura, H. I.; Snyder, S. H. (1974), Muscarinic cholinergic binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *71*, 1725–1729.
Zingsheim, H. P.; Neugebauer, D. Ch.; Barantes, F. J.:Frank, J. (1980), Structural details of membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *77*, 952–956.
Zurn, A. D.; Fulpius, B. W. (1976), Accessibility to antibodies of acetylcholine receptors in the neuromuscular junction. Clin. exp. Immunol. *24*, 9–17.

Prof. Dr. med. et phil. II Peter G. Waser, Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, Gloriastrasse 32, 8006 Zürich.

11 Liste der Abkürzungen

A	Agonist
ACh, Ach	Acetylcholin
AchE, AChE	Acetylcholinesterase
AchR	Acetylcholinrezeptor
As	Arsen
Ca	Calcium
C6	Hexamethonium
C10	Decamethonium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
ChE	Cholinesterase
DAch	Diazoacetylcholin
DEAE	Diethylaminoethyl-Zellulose
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DTT	Dithiothreitol
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
i.v.	intravenös
K	Kalium
LD	Letaldosis
M	molare Konzentration
m	muscarinisch
mAchR	muscarinisch cholinerger Rezeptor
MG	Molekülgewicht
Mg	Magnesium
N	Nervus
n	nikotinisch
Na	Natrium
nAchR	nikotinisch cholinerger Rezeptor
NEM	N-Ethylmaleinimid
P	Phosphor
R	Rezeptor
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SH	Sulfhydryl
Tb	Terbium
TMA	Tetramethylammonium
UV	Ultraviolett
VX	Organothiophosphat, Kriegsgift
ZNS	Zentralnervensystem