

Neue Entwicklungen bei der Photoaffinitätsmarkierung

Florence Kotzyba-Hibert, Isabelle Kapfer und Maurice Goeldner*

Christian Hirth in memoriam

Die Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen ist und bleibt eine Herausforderung für Chemiker und Biologen. Auf der Grundlage der Strukturaufklärung von biologischen Rezeptoren gelangt man zu einem besseren Verständnis ihrer Funktionen. Die Methode der Photoaffinitätsmarkierung ist ein biochemischer Ansatz, um Rezeptoren für weitere Strukturuntersuchungen zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Primärstruktur eines Rezeptorproteins wurde typischerweise durch reverse Genetik erhalten; dazu wurde das Protein ausgiebig gereinigt und das N-terminale Peptid sequenziert. Dies ermöglichte das Design entsprechender Oligonucleotidsonden. Deren Synthese führte durch Hybridisierung zur Identifizierung von cDNA-Klonen. Nach dieser Strategie wurden mehrere membranständige Neurotransmitterrezeptoren

und wichtige Polypeptide, die in sehr geringen Mengen im Zentralnervensystem vorkommen, identifiziert und ihre Sequenz aus der cDNA-Sequenz abgeleitet. Da bei der Photoaffinitätsmarkierung eine kovalente Bindung zwischen einem radioaktiv markierten Analogon des Liganden und der Rezeptorbindungsstelle gebildet wird, ist es theoretisch möglich, radioaktiv markierte Peptide zu isolieren und zu sequenzieren sowie dann die entsprechenden Oligonucleotide zu synthetisieren. Im Vergleich zum klassischen Ansatz können durch Photoaffinitätsmarkierung möglicherweise die kritischen Solubilisierungs- und Reinigungsschritte vermieden werden. So weit uns bekannt ist, wurde bisher noch kein Beispiel für eine Primärstrukturbestimmung durch Photoaffinitätsmarkierung veröffentlicht. Die außergewöhnlichen Fortschritte der Klonierungsme-

thoden, vor allem der Homologie- und Expressionsklonierungen, haben den oben geschilderten Ansatz jedoch vollständig überholt und so die Frage nach neuen Perspektiven für die Photoaffinitätsmarkierung aufgeworfen. In diesem Übersichtsartikel präsentieren wir eine aktualisierte Zusammenstellung ausgewählter Entwicklungen und neue Herausforderungen für diese Methode. Insbesondere eröffnet die Methode der Photoaffinitätsmarkierung nicht nur den Zugang zu Strukturelementen, sondern ist auch dafür geeignet, die Funktionen biologischer Rezeptoren, z. B. ihre Rolle bei der Signaltransduktion, zu untersuchen.

Stichworte: Aminosäuren · Photoaffinitätsmarkierung · Proteine · Radikale · Reaktive Zwischenstufen · Strukturaufklärung

1. Einleitung

Die Photoaffinitätsmarkierung wurde vor über dreißig Jahren von Westheimer et al.^[1] entdeckt und hat sich seitdem deutlich weiterentwickelt; das Grundprinzip ist allerdings unverändert geblieben. Zur Photoaffinitätsmarkierung benötigt man ein lichtaktivierbares, aber chemisch inertes Analogon des Liganden, das durch Bestrahlen mit Licht eine hochreaktive Molekülspezies bildet, die irreversibel an die Bindungsstelle des biologischen Rezeptors bindet. Abbildung 1 verdeutlicht, welche unterschiedlichen Informationen über die Struktur aus solchen Markierungsexperimenten erhalten werden können. Es gibt zahlreiche Übersichtsartikel über die Photoaffinitätsmarkierung^[2-4] und eine vollständige Untersuchung der photo-

chemischen Reagentien sowie von Bayley^[5a] eine Analyse von Photomarkierungsexperimenten.

In mehreren hundert, in letzter Zeit erschienenen Artikeln wird die Photoaffinitätsmarkierung als Methode zur Markierung von Polypeptiden mit lichtaktivierbaren Ligandenanaloga beschrieben. In vielen Fällen können mit diesen radioaktiv markierten Liganden funktionale Proteine auf Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelen charakterisiert werden. Nur wenige dieser Experimente führten jedoch bis zur Identifizierung der Aminosäurereste, die durch die radioaktiven Sonden markiert worden waren (Abb. 1). Dieser letzte Schritt liefert wichtige Strukturdaten, die Position der Bindungsstelle in der Primärstruktur des Rezeptors und genaue Angaben zur Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung. In anderen, mehr chemisch orientierten Untersuchungen wurden neue photosensitive funktionelle Gruppen beschrieben, die möglicherweise bei der Photoaffinitätsmarkierung verwendet werden können. Zum besseren Verständnis der photochemischen Reaktion wurde die Reaktivität der photochemisch gebildeten Molekülspezies untersucht.

[*] Prof. M. Goeldner, Dr. F. Kotzyba-Hibert, Dr. I. Kapfer
Laboratoire de Chimie Bio-organique, URA 1386 CNRS, Faculté de Pharmacie
Université Louis Pasteur Strasbourg
BP 24, F-67401 Illkirch cedex (Frankreich)
Telefax: Int. + 8867-8891

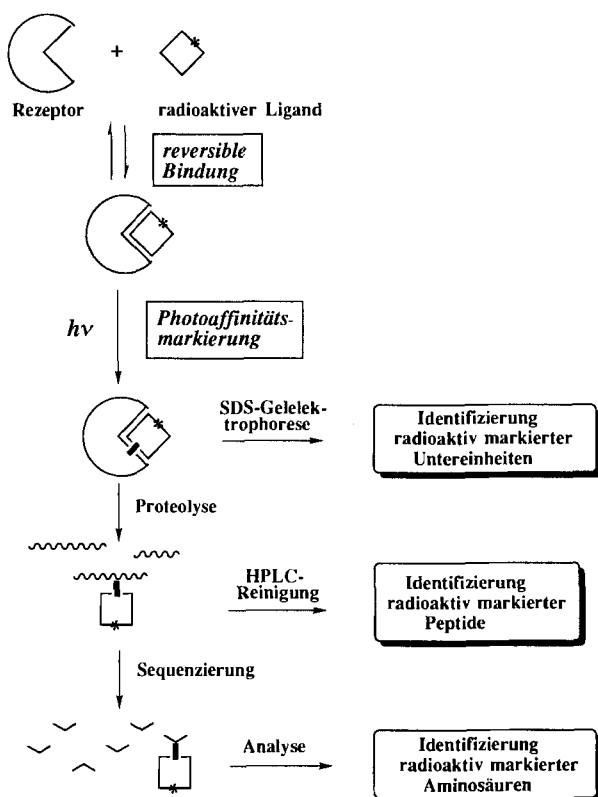


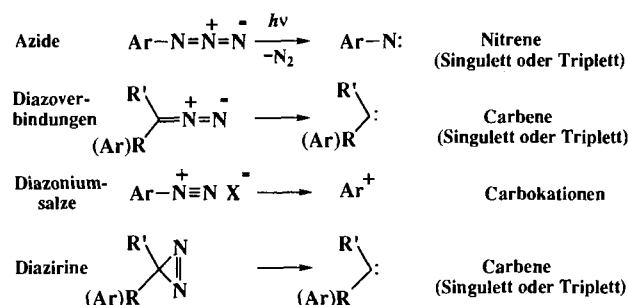
Abb. 1. Photoaffinitätsmarkierung: Prinzip und nachfolgende Schritte bis zur Identifizierung der Aminosäuren.

Im vorliegenden Übersichtsartikel soll besonderes Gewicht auf einige Photoaffinitäts-Reagentien gelegt werden: auf Fluorarylazide wegen ihres vielversprechenden Photomarkierungspotentials sowie auf Aryldiazoniumsalze und Trifluormethylaryldiazirine wegen ihrer effektiven Photokopplung an Proteine. In bezug auf die biochemischen Aspekte beleuchtet dieser Artikel außerdem die Rolle des Zielproteins bei Photoaffinitätsmarkierungen.

2. Die Suche nach idealen Photoaffinitätssonden

Viel Zeit ist für die Entwicklung neuer funktioneller Gruppen aufgewendet worden, die bei der Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt werden können. Diese Suche war hauptsächlich auf Analoga von bereits beschriebenen photosensitiven Verbindungen

gerichtet, weniger darauf, Verbindungen mit neuen chemischen Funktionen zu finden. Dies ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, daß die photochemische Bildung einer hochreaktiven Molekülspezies normalerweise von der Entstehung einer stabilen Verbindung, idealerweise eines Gases, begleitet wird. Dadurch wurde dieses Forschungsfeld erheblich eingrenzt. Photochemische Fragmentierungen, die unter Freisetzung von Stickstoff stattfinden, sind unter den beschriebenen Beispielen am häufigsten vertreten, da Stickstoff ein inertes Gas ist und einige Verbindungen als Vorstufen verwendet werden können, z. B. Azido-, Diazo- und Azoverbindungen sowie Diazirine und Diazoniumsalze. Diese sind Vorstufen für reaktive Spezies wie Nitrene, Carbene, Radikale und Carbokationen (Schema 1). Arylazide sind die bei weitem am häufigsten genutzten Reagentien zur Photoaffinitätsmarkierung. Diese Beliebtheit beruht allerdings mehr auf ihrer chemischen Stabilität im Dunkeln und ihrer einfachen Synthese als auf ihren intrinsischen photochemischen Eigenschaften.



Schema 1. Typische Verbindungen als Vorstufen für reaktive Spezies bei der Photoaffinitätsmarkierung.

2.1. Die Gruppe der Arylazide

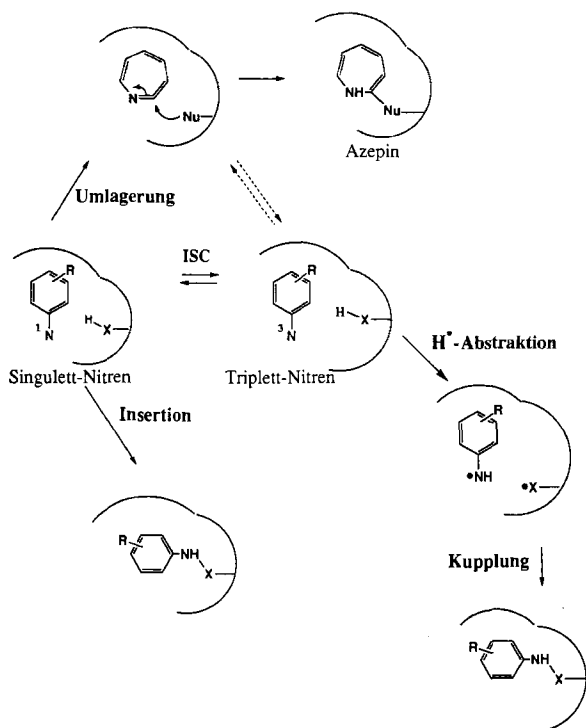
2.1.1. Auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der photochemischen Reaktion

Die Photochemie der Arylazide ist oft als verwirrend angesehen worden, vor allem wegen der widersprüchlichen Ergebnisse, die man mit einigen Derivaten bei Photoaffinitätsmarkierungen erhielt. Seit ihrer Entdeckung durch Knowles et al.^[6] im Jahre 1969 wurden viele substituierte Arylazide entwickelt, z. B. nitrosubstituierte Derivate^[7], die jenseits des Absorptionsbereichs von Proteinen aktiviert werden können. Zwischenzeitlich wurde



Maurice Goeldner, geboren 1945 in Strasbourg (Frankreich), studierte dort Chemie an der Université Louis Pasteur. Er promovierte 1972 bei Dr. J. F. Biellmann und war zu dieser Zeit als Forscher am Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, tätig. Nach einem Postdoktorandenaufenthalt bei Prof. S. Wolfe, Kingston (Kanada), und Prof. A. Eschenmoser, Zürich (Schweiz), kehrte er nach Strasbourg zurück und leitet dort, gemeinsam mit seinem Freund Prof. Christian Hirth bis zu dessen Tod, das Laboratoire de Chimie Bio-organique. 1983 wurde er Professor für Organische Chemie an der Faculté de Pharmacie. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die Bioorganische Chemie, hier vor allem auf die strukturbestimmenden Faktoren bei Membranrezeptoren und ihre Untersuchung durch Methoden zur ortsgerechten Markierung.

gezeigt, daß der Substituent am Aren die photochemische Reaktion beeinflusst und so die chemische Reaktivität des photochemisch gebildeten Intermediates prägt^[8]. In Untersuchungen, hauptsächlich aus den Arbeitsgruppen von Schuster und Platz, wurden diese photochemischen Reaktionen aufgeklärt^[9]. Die Bestrahlung der Azide führt zu einem Azid im angeregten Singulettzustand, das entweder unter Stickstoffverlust in ein Singulett-Nitren übergeht oder durch Interkombination (intersystem crossing, ISC) ein Triplett-Azid bildet, das sich dann seinerseits unter Stickstoffabspaltung in ein Triplett-Nitren umwandelt. Eine vereinfachte Darstellung (Schema 2)



Schema 2. Möglicher Mechanismus der Kupplung von Arylnitrenen an biologische Rezeptoren. ISC = Intersystem Crossing (Interkombination).

geht direkt vom Singulett-Nitren aus; dieses kann sich in eine C-H- oder eine Heteroatom-H-Bindung einschleiben, zum entsprechenden Didehydroazepin umlagern oder unter Interkombination in das Triplett-Nitren übergehen. Diese Zwischenprodukte reagieren in Photoaffinitätsmarkierungsversuchen unterschiedlich:

a) Eine weitgehend unspezifische Einschubreaktion mit einer beliebigen Aminosäure oder mit dem Lösungsmittel ist für das Singulett-Nitren zu erwarten.

b) Eine Reaktion mit einem geeigneten Nucleophil folgt auf die Didehydroazepinbildung; mögliche Nucleophile sind Cystein- oder Histidinseitenketten, während Seitenketten mit Hydroxygruppen und die protonierte Seitenkette von Lysin wahrscheinlich nicht nucleophil genug sind. Beispielsweise reagiert Methanol nicht mit Didehydroazepinen^[10].

c) Das Triplett-Nitren weist eine wenig voraussagbare Radikalchemie auf (siehe Abschnitt 2.3).

Mit wenigen Ausnahmen wie den Azidonucleotiden und den fluorierten Arylaziden (Abschnitt 2.1.2 bzw. 2.1.3) lagern sich

Arylazide entweder zu den entsprechenden Didehydroazepinen um oder gehen in das Triplett-Nitren über; Einschubreaktionen des Singulett-Nitrens wurden nicht festgestellt^[8]. Schuster et al. haben den Einfluß des Substituenten am Aren auf die photochemische Reaktion beschrieben (Tabelle 1). Die Komplexität der

Tabelle 1. Produktausbeuten der Bestrahlung von Arylaziden $\text{XC}_6\text{H}_4\text{N}_3$ in Cyclohexan ohne und in Gegenwart von Diethylamin^[8]. Die Azoverbindungen und die Aniline werden durch Triplett-, die Azepine durch Singulett-Nitren-Kupplung gebildet.

X	Azoverbindung[%]	³ H-Azepin[%][a]	Anilin[%][a]
H	15	80	–
<i>p</i> -Ph	55	71	10
<i>p</i> -SMe	71	51	18
<i>p</i> -OMe	80	27	30
<i>p</i> -NMe ₂	92	0	44
<i>p</i> -CO ₂ H	–	70	15
<i>p</i> -CONMe ₂	70	74	Spur
<i>p</i> -COCH ₃	87	70	30
<i>p</i> -CN	74	68	10
<i>m</i> -NO ₂	50	10	30
<i>p</i> -NO ₂	73	<3	80
<i>p</i> -Cl	80	100	–
<i>p</i> -Br	80	71	Spur
<i>p</i> -I	96	34	12

[a] Photolyse in Gegenwart von Et₂NH.

Reaktion läßt sich anhand der entgegengesetzten Reaktivität der *para*-Chlor- und *para*-Dimethylaminophenylazide verdeutlichen. Die Bestrahlung in Cyclohexan in Gegenwart von Diethylamin als Nucleophil lieferte ausgehend von *para*-Chlorphenylazid Azepin in 100% Ausbeute, während *para*-Diethylaminophenylazid ausschließlich zu Verbindungen umgesetzt wurde, die über Radikale gebildet werden. Daher hängt bei der Photoaffinitätsmarkierung mit Arylaziden der Verlauf der Markierungsreaktion nicht nur vom Substituenten am Aren ab, sondern auch davon, ob ein nucleophiler Rest an der Bindungsstelle vorhanden ist. Daher sind Vorhersagen über den Verlauf von Photoaffinitätsmarkierungen mit Arylaziden nahezu unmöglich.

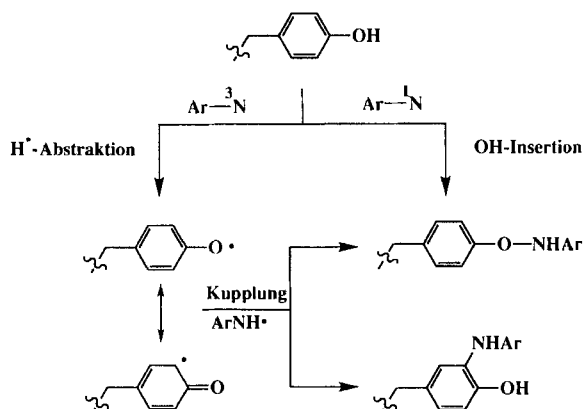
Bei der photochemischen Kupplung von Arylaziden an Rezeptoren kann die nucleophile Addition an das Didehydroazepin nur von begrenztem Nutzen sein, weil die resultierenden Azepine unter den proteolytischen Bedingungen, wie sie zur Identifizierung von Peptiden und Aminosäuren benötigt werden, nicht immer stabil sind. Allerdings waren viele Markierungen mit solchen Arylaziden erfolgreich, die als Triplett-Nitrene reagieren. Die Radikalchemie umfaßt einen vielstufigen Prozeß bei der Kupplung des Liganden an den Rezeptor. In Schema 2 ist die Abstraktion eines Wasserstoffradikals vom Protein durch das Triplett-Nitren und die Rekombination der so gebildeten Radikale unter Bildung einer kovalenten Bindung gezeigt. Mit Blick auf den Rezeptor stellt sich bei dieser Reaktion die Frage, welche Aminosäurereste am ehesten stabile Radikale bilden können (siehe Abschnitt 2.3).

Platz et al.^[11] stellten fest, daß die Bestrahlung bei tiefer Temperatur (77 K) die Bildung des Triplett-Nitrens begünstigt, indem die Umlagerung des Singulett-Nitrens zum Didehydroazepin verhindert wird. Dies konnte auf *meta*-Azidophenyl-substituiertes Acylchymotrypsin angewendet werden: Die Bestrahlung bei 77 K führt hier zu einer erhöhten irreversiblen photolytischen

Inaktivierung des Enzyms. Die Inaktivierung des Estrogenrezeptors gelang auf diese Weise allerdings nicht^[12].

2.1.2. Azidonucleotide

Azidonucleotide sind eine interessante Klasse von Arylaziden, denn sie sind sehr oft ausgezeichnete Nucleotidanaloga, deren minimale chemische Modifikation sich auf die Einführung der Azidogruppe im Heterocyclus beschränkt. Sie wurden bereits in vielen Untersuchungen zur Photoaffinitätsmarkierung mit Erfolg eingesetzt. Vor allem mit radioaktiv markiertem 2-Azido-ATP^[13, 14], 2-Azido-ADP^[15–17], 8-Azido-ATP^[18, 19], 8-Azido-GTP^[20] und 8-Azido-cAMP^[21] gelang die Identifizierung des markierten Aminosäurerestes an der Bindungsstelle des Zielrezeptors. Vergleicht man die unterschiedlichen Aminosäurereste, die mit diesen purinanalogen Azidosonden markiert werden (Tyr, Trp, Lys, Thr, Leu, Ile und Pro (siehe Abschnitt 4, Tabelle 7)), ist es nicht möglich, dem zugehörigen photochemisch gebildeten Nitren eindeutig einen Singulett- oder Triplett-Charakter zuzuordnen. Mit der Reaktivität der Singulett-Nitrene können die experimentellen Befunde ebenso erklärt werden wie durch die der Triplett-Nitrene. Eine nucleophile Addition an die Didehydroazepine, die aus den Nucleotiden gebildet werden, ist unwahrscheinlich, es sei denn, daß Tyrosinat beteiligt ist. Schema 3 zeigt den möglichen Mechanismus der Insertion in die



Schema 3. Mögliche Reaktionsmechanismen der Insertion von Singulett- und Triplett-Nitrenen in die Tyrosinseitenkette.

Tyrosinseitenkette durch beide Nitren-Spezies; Tyrosin ist die Aminosäure, die am häufigsten durch die beschriebenen purinanalogen Azidosonden markiert wird (15 Beispiele für Tyrosinmarkierungen sind in Tabelle 7 aufgeführt). Für die Azidonucleotide wurde eine Strukturanalogie zu Carbonylaziden vorgeschlagen^[5b]; von diesen ist bekannt, daß sie hochreaktive Nitrene bilden^[22]. Sicherlich wären genaue kinetische Daten und besonders die Bestimmung der Lebensdauer der zugehörigen Singulett-Nitrene ebenso wie die der Geschwindigkeiten der Umlagerungen zum Didehydroazepin und zum Triplett-Nitren sehr nützlich, um die photochemischen Reaktionen dieser Azidonucleotide besser zu verstehen.

2.1.3. Fluorierte Arylazide

Bei fluorierten Arylaziden haben sich die für die Photoaffinitätsmarkierung bei weitem vielversprechendsten Entwicklungen in

der Gruppe der Arylazide ergeben. Banks et al.^[23] beschrieben in frühen Arbeiten die Thermolyse fluorierte Arylazide sowie Einschubreaktionen in C-H-Bindungen von Mesitylen und Trimethoxybenzol. Eine detaillierte Untersuchung von Platz et al.^[10, 24–27] führte zu der Schlußfolgerung, daß sich die Singulett-Spezies von fluoriertem Arylnitren langsamer zum entsprechenden Didehydroazepin umlagert als die der unsubstituierten Verbindung, so daß das Zwischenprodukt effizient mit den meisten chemischen Bindungen, einschließlich der C-H-Bindung, unter formaler Insertion reagieren kann (Tabelle 2). Wei-

Tabelle 2. Ausbeuten an Singulett- und Triplett-Nitren-Addukten, die bei Photolyse von Pentafluorphenylazid in unterschiedlichen Lösungsmitteln RH (als Abfangreagens) gebildet werden [27].

Lösungsmittel	C ₆ F ₅ NHR [%]	C ₆ F ₅ NH ₂ [%][a]	trans-(C ₆ F ₅) ₂ N ₂ [%][a]
Cyclohexan	22	2	0
Cyclopentan	28	0	0
Cyclopentan[b]	4	12	5
Tetramethylethylen	49	[c]	[c]
Benzol	39	5	0
Benzol[b]	0	6	32
Toluol	51	12	0
Toluol[b]	10	26	6
Tetrahydrofuran	41	3	0
Dimethylsulfid	12	[c]	[c]
Dimethylsulfoxid	41	[c]	[c]
Diethylamin	58	22	0

[a] Triplett-Nitren-Addukt. [b] Triplett-sensitiviert. [c] Die Ausbeute wurde nicht bestimmt; das Produkt wurde nur in geringer Menge gebildet.

tere funktionalisierte fluorierte Arylazide als mögliche Photoaffinitäts- und Quervernetzungs-Sonden wurden synthetisiert^[28, 29]. Einige Beispiele für photochemische Quervernetzungen^[30] und Photoaffinitätsmarkierungen^[12, 31–33] mit solchen Derivaten wurden veröffentlicht. Vergleichende Untersuchungen mit fluorierten und nichtfluorierten Arylazid-Photoaffinitäts- und Quervernetzungs-Sonden gaben widersprüchliche Ergebnisse. In einem Fall waren die Markierungsergebnisse mit den beiden Sonden ähnlich^[12], in einem anderen Fall war die fluorierte Verbindung wirksamer^[34]. Diese Ergebnisse sollten jedoch mit Vorsicht bewertet werden, vor allem, wenn Daten fehlen, durch die eine analoge Positionierung der Sonden innerhalb der Bindungsstelle nachgewiesen werden kann. Eine Untersuchung über Arylazide, die in unterschiedlichen Positionen des aromatischen Rings fluoriert waren, ergab eine Korrelation zwischen der Reaktivität und dem Substitutionsmuster^[35]. Die 4-substituierten 2,6-Difluorphenylazide weisen bei minimaler Fluorsubstitution ein Maximum an Reaktivität auf. Vermutlich können diese Verbindungen in einer hydrophoben Umgebung als Singulett-Nitren reagieren, während Lösungsmittel mit Hydroxygruppen die Interkombination zum Triplett-Nitren katalysieren. Im Hinblick auf eine Photoaffinitätsmarkierung halten die Autoren diese Reagentien nur in hydrophober Umgebung für geeignet, effektive Einschubreaktionen in Einfachbindungen über die entsprechenden Singulett-Nitrene zu erzielen. Vermutlich führt die Reaktivität eines Triplett-Nitrens in einer hydrophilen Umgebung eher zu einer Spaltung des Polypeptids als zu einer Kupplung an den Rezeptor, was allerdings im Hinblick auf zahlreiche Beispiele für erfolgreiche Photoaffinitätsmarkierungen mit Triplett-Nitren hinterfragt werden kann (siehe Ab-

schnitt 2.3 und Tabelle 7 für typische Beispiele für radikalisch verlaufende Photoaffinitätsmarkierungen).

Fluorierte Arylazide können nur mit Licht einer Wellenlänge < 300 nm aktiviert werden, das empfindlichen Proteinen schaden kann; darüber hinaus erfüllen sie allerdings die meisten Kriterien, um als wirksame Reagentien für die Photoaffinitätsmarkierung verwendet werden zu können, und sollten daher allmählich die anderen, gebräuchlichen Arylazide verdrängen. Vor allem Phospholipidsonden, die fluorierte Arylazide enthalten, sind vielversprechend für die Strukturuntersuchung von Membranrezeptoren. Die vorhergesagte Singulett-Nitren-Reaktivität^[35] sollte zur Insertion in C-H-Bindungen führen, die eine Voraussetzung für die effiziente Markierung der hydrophoben Aminosäurereste von Membranproteinen ist. Schließlich sollte die Ausarbeitung von Synthesestrategien, durch die radioaktive Isotope in Fluorarylazid-Reagentien eingebaut werden können^[36, 37], diesen einen enormen Erfolg garantieren.

2.2. Effiziente Photoaffinitätssonden

Außer den Arylaziden wurden viele andere photosensitive Verbindungen als potentielle Sonden für Photoaffinitätsmarkierungen beschrieben^[5a]. Zwei Klassen sehr effizienter Verbindungen sollen im folgenden herausgegriffen werden: die Aryldiazoniumsalze und die Trifluormethylaryldiazirine. Deren bemerkenswerte Fähigkeit, an Proteine zu kuppeln, wird in Abschnitt 5 diskutiert; hier werden zunächst ihre chemischen und photochemischen Eigenschaften kurz zusammengefaßt.

2.2.1. Aryldiazoniumsalze

Aryldiazoniumsalze werden oft als schwer zu isolierende und zu handhabende Verbindungen angesehen. Dies trifft sicher für Diazoniumsalze zu, die mit elektronenziehenden Gruppen substituiert sind und die daher in nichtsaurem Milieu instabil sind. Elektronenschiebende Gruppen in *ortho*- und *para*-Stellung verleihen den Diazoniumverbindungen dagegen eine hinreichende Stabilität und darüber hinaus interessante photochemische Eigenschaften wie hohe Quantenausbeuten^[38] und Absorptionswellenlängen > 300 nm (Tabelle 3), so daß es sich bei diesen Verbindungen um gute Kandidaten für Photoaffinitätssonden handelt.

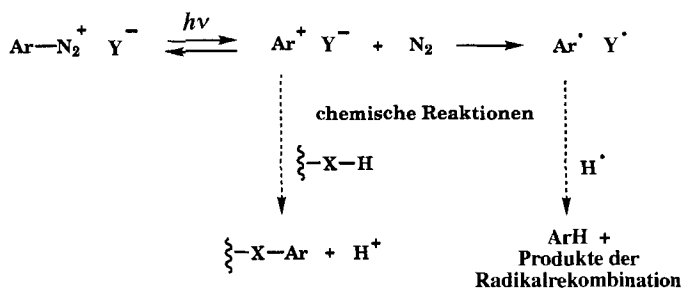
Der einleitende Reaktionsschritt bei der photochemischen Zersetzung ist die Bildung des entsprechenden Aryl-Kations, das photochemisch zum Aryl-Radikal reduziert werden kann

Tabelle 3. Absorptionsmaxima λ_{\max} , molare Extinktionskoeffizienten ϵ und Quantenausbeuten ϕ einiger *para*- oder *meta*-substituierter Diazonium-Ionen $\text{XC}_6\text{H}_4\text{N}_2^+$.

X	λ_{\max} [nm]	ϵ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	ϕ
<i>p</i> -NMe ₂	379 [a]	37 500 [a]	0.59 [a]
<i>p</i> -OCH ₃	313 [a]	23 500 [a]	0.46 [a]
<i>p</i> -I	326 [a]	12 500 [a]	–
<i>p</i> -OH	350 [b]	–	0.54 [b]
<i>p</i> -N(Me)COMe	340 [a]	16 600 [a]	–
<i>m</i> -OCH ₃	273 [a]	7 300 [a]	–
<i>m</i> -SO ₃ H	260 [c]	11 500 [c]	–
<i>m</i> -NO ₂	232 [b]	–	0.17 [b]

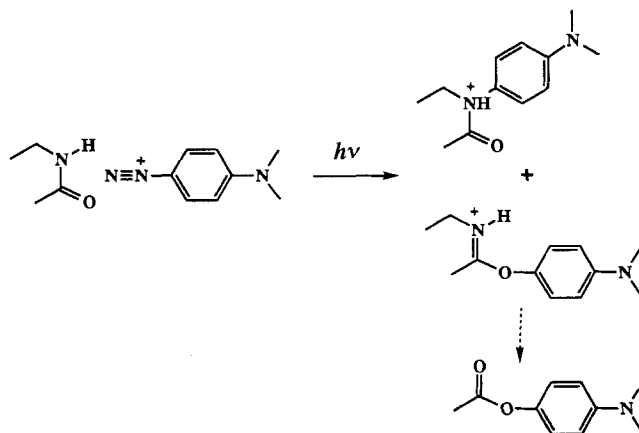
[a] Lit. [45]. [b] Lit. [38]. [c] Lit. [181].

(Schema 4). Diese Zwischenstufen führen zu unterschiedlichen chemischen Reaktionen. Vereinfacht ausgedrückt, begünstigen elektronenziehende Gruppen am aromatischen Ring die Photo-reduktion und elektronenschiebende stabilisieren das Kation durch Resonanz. So liefert die photochemische Reaktion von *para*-Nitrophenyldiazoniumsalzen in Alkoholen als Hauptkomponente Nitrobenzol, während das *para*-Dimethylamino-Derivat fast ausschließlich den entsprechenden Ether gibt^[38].



Schema 4. Photochemische Reaktivität von Aryldiazoniumsalzen $\text{ArN}_2^+ \text{Y}^-$ sowie Folgereaktionen. X = Heteroatom, CR₂.

Aryl-Kationen sind hochreaktiv, so daß ihre Lebensdauer noch nicht exakt bestimmt werden konnte^[39]. Für das Phenyl-Kation in Wasser wurde durch Laserblitztechniken indirekt eine Lebenszeit von weniger als 500 ps ermittelt^[40]. Eine direkte Untersuchung der photochemischen Zersetzung in Kohlenwasserstoffen, wobei die C-H-Bindung als Referenzbindung dient, ist schwierig, weil die Aryl-Kationen in diesen Lösungsmitteln nicht löslich sind. Dennoch wurden einige wenige Beispiele intramolekularer Reaktionen an C-H-Bindungen beschrieben^[41, 42]. Ein origineller Ansatz wurde von Speranza et al. gewählt, die ein nichtsolvatisiertes Aryl-Kation durch Radiolyse aus tritiiertem Benzol herstellten^[43]. Damit konnten interessante Aspekte der Reaktivität freier Aryl-Kationen untersucht werden, einschließlich einiger effizienter Reaktionen an C-H-Bindungen. Die photochemische Reaktion des *para*-Dimethylaminophenyldiazonium-Ions an der Amidbindung in *N*-Ethylacetamid als Modell für die Peptidbindung wurde getestet^[44]. Über 90% der Reaktion führte zur O- oder N-Alkylierung, die wegen der Solvation des geladenen Restes des Diazoniumsalzes durch die Sauerstoff- und Stickstoffatome erwartet worden war (Schema 5).

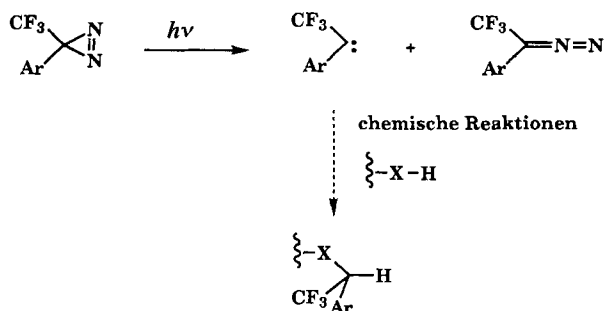


Schema 5. Analyse der photochemischen Reaktion des *p*-(*N,N*-Dimethylamino)-phenyldiazonium-Ions mit *N*-Ethylacetamid^[44].

Aryldiazoniumsalze, die mit elektronenschiebenden Gruppen substituiert sind, erfüllen alle Kriterien für Photoaffinittssonden^[45], und wir haben sie in unserer Arbeitsgruppe häufig eingesetzt, um damit cholinerge Proteine zu markieren, deren Bindungsstelle für die quartäre Ammoniumgruppe effizient mit der geladenen Diazoniumverbindung untersucht werden kann. Einige Beispiele dazu werden in den Abschnitten 4 und 5 beschrieben.

2.2.2. Trifluormethylaryldiazirine

Aryldiazirine wurden erstmals von Smith und Knowles^[46] als mögliche Photoaffinitätssonden beschrieben. Die Untersuchung dieser Verbindungsgruppe hinsichtlich geeigneter Reagentien führte zur Entdeckung der Trifluormethylaryldiazirine^[47], die sich durch vorteilhafte photochemische Eigenschaften und darüber hinaus durch eine hervorragende chemische Stabilität auszeichnen. Durch Bestrahlung (Schema 6) fragmentiert das Diazirin zum entsprechenden Carben oder isomerisiert zur linearen



Schema 6. Photochemische Reaktivität von Diazirinen sowie Folgereaktionen. X = Heteroatom, CR₂.

Diazoverbindung. Diese Umlagerungsprodukte sind unter den Bedingungen der Diazirinstrahlung langlebige Intermediate, die im Dunkeln zu unerwünschten Alkylierungsprodukten fhren^[48]. Dieses Problem tritt mit Trifluormethylaryldiazirinen ebenfalls nicht auf. Bei Photolyse in Cyclohexan wurden C-H-Insertionsprodukte in zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten^[49], während die Insertion in die O-H-Bindung die Hauptreaktion in Alkoholen war (Tabelle 4); beide Reaktionen lassen sich mit dem Singulett-Zustand des Carbens erklären. Reaktionen über Triplett-Carben wurden ebenfalls bei der Photolyse in Alkoholen erhalten^[50].

3-Trifluormethyl-3-*meta*-iodphenyl-3*H*-diazirine (TID), das durch Einführung von ¹²⁵I synthetisiert wurde^[51], ist eine hervorragende lichtaktivierbare Sonde. Dieses Reagens wurde erfolgreich bei der Markierung von hydrophoben Resten in Membranproteinen eingesetzt^[49a] und verdeutlicht damit besonders die Fähigkeit des photochemisch gebildeten Carbens, mit nichtaktivierten Aminosäureseitenketten zu reagieren. Vor kurzem wurde TID als echte Photoaffinittssonde eingesetzt, wobei das Reagens mit der Bindungsstelle für nichtkompetitive Blocker des nicotinischen Acetylcholinrezeptors wechselwirkt^[52]. Weitere außergewöhnliche Markierungsergebnisse sind in Abschnitt 5 beschrieben.

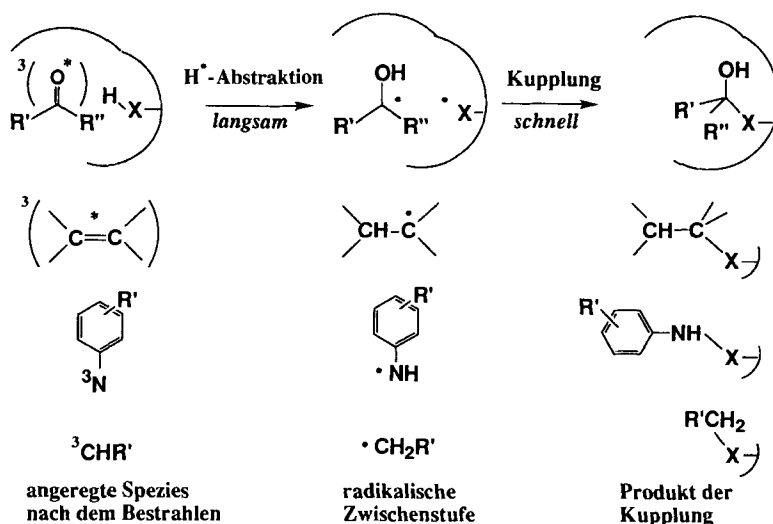
Tabelle 4. Produktverteilung nach Photolyse von zwei 3-Trifluormethyl-3-aryl-3*H*-diazirinen in organischen Lösungsmitteln [49 a].

Ar	c [mm]	Lösungsmittel	Produkt	Ausb. [%]
C ₆ H ₅	3	MeOH	ArCH(OCH ₃)CF ₃	95
	3	Cyclohexan	ArCH(C ₆ H ₁₁)CF ₃	55
C ₆ H ₄ CH ₂ CH(CO ₂ CH ₃)NHCOC ₂ H ₅	2	EtOH	ArCH(OC ₂ H ₅)CF ₃	73
			ArCOCF ₃	17
			ArCH ₂ (OH)CF ₃	6
			ArCH ₂ CF ₃	5

2.3. Radikalreaktionen bei der Photoaffinitätsmarkierung

Photochemisch gebildete freie Radikale können mit Rezeptoren entweder an das Peptid-Rückgrat oder an die Aminosäureseitenketten kuppeln. Diradikale (Triplett-Zustände von Nitrenen, Carbenen, angeregten Ketonen und Doppelbindungen) abstrahieren dabei vermutlich ein Wasserstoffradikal vom Rezeptor, und die beiden neu entstandenen Radikale rekombinieren schnell^[53] (Schema 7). Im Falle von monoradikalischen Spezies, die z. B. durch Belichtung aus Arylhalogeniden gebildet wurden, verläuft der Kupplungsproze weniger eindeutig, da das ursprünglich gebildete Radikal durch Wasserstoffradikal-Abstraktion verschwindet. Dennoch kann eine verzögerte Rekombination von zwei Radikalspezies stattfinden. Darüber hinaus kann ein weiterer Radikalmechanismus bei der Spaltung von Disulfidbrücken auftreten; diese führt zur Bildung von stabilisierten Sulfanyl-Radikalen, die mit anderen Radikalspezies rekombinieren.

Acetophenone und Benzophenone sind ausgiebig für Photoaffinitätsmarkierungen eingesetzt worden; sie sind typische Beispiele für Vorstufen von photochemisch gebildeten Radikalen. Die Eigenschaften der Radikale im angeregten Zustand, die aus diesen aromatischen Ketonen entstehen, sind gut verstanden^[58]. Die physikochemischen Voraussetzungen für die Verwendung solcher aromatischer Ketone für die Photoaffinitätsmarkierung sind erfüllt: Das reaktive Triplett-Radikal lagert sich nicht um, kann leicht bei großen Wellenlängen ($\lambda \geq 320$ nm) gebildet werden, so daß signifikante Schäden an den aromati-



Schema 7. Radikalische Kupplung von photochemisch gebildeten Triplett-Spezies an biologische Rezeptoren durch H⁺-Abstraktion.

schen Aminosäuren der Proteine vermieden werden^[53], und kann sich in C-H-Bindungen einschleiben. Abstraktions-Additions-Reaktionen des Triplett-Radikals aromatischer Ketone wurden zunächst für die selektive Einführung einer funktionellen Gruppe in Methylenpositionen von Steroiden und langkettigen Alkoholen^[55–57] und für die Photoaffinitätsmarkierung der Bindungsstellen von Peptidhormonen^[58] genutzt. Das Triplett-Radikal aromatischer Ketone reagiert nicht sehr effektiv mit Wasser^[59], was für Photoaffinitätsmarkierungen zunächst von Vorteil schien^[54]; allerdings können reaktive Moleküle, die nicht vom Lösungsmittel abgefangen werden, zu unspezifischen Markierungen führen (Abschnitt 3).

An welchen Stellen im Protein finden Reaktionen freier Radikale nun statt, und welche Aminosäurereste sind an diesen Reaktionen beteiligt? Die im Peptidrückgrat gebildeten α -Kohlenstoffradikale werden durch den Synergieeffekt der capto-dativen Substitution mit Gruppen entgegengesetzter Polarität stabilisiert^[60]. Dieser Effekt konnte jedoch bei Messungen der thermodynamischen Reaktions- und Aktivierungsparameter der Bildung von α -Cyano- α -methoxyalkyl-Radikalen nicht festgestellt werden^[61]. Die bevorzugte Reaktivität von Glycinresten bei Reaktionen von freien Radikalen mit Peptid-Modellsubstanzen wurde der selektiven Wasserstoffradikal-Abstraktion vom α -Kohlenstoffatom des Glycinrestes zugeschrieben. Diese Präferenz war unerwartet, da Glycin durch Homolyse der C_α -H-Bindung sekundäre Radikale bildet, während die analoge Reaktion bei anderen Aminosäure-Derivaten thermodynamisch bevorzugte tertiäre Radikale liefert. Diese ungewöhnliche Stabilität des Glycyl-Radikals wurde von Easton et al. anhand der Reaktivität von NBS gegenüber *N*-Acylglycin-Derivaten untersucht^[62–64]; die Stabilität wurde auf eine günstige Konformation des Radikals zurückgeführt, das planar und relativ frei von nichtbindenden Wechselwirkungen ist, so daß eine maximale Delokalisation des ungepaarten Elektrons möglich ist. In Gegenwart von C_α -Substituenten treten ungünstige nichtbindende Wechselwirkungen infolge sterischer Hinderungen auf (Tabelle 5). Die bevorzugte Reaktivität von Glycinresten wurde

Tabelle 5. Relative Geschwindigkeit k_{rel} der Reaktion von *N*-Bromsuccinimid (NBS) mit drei Aminosäure-Derivaten $PhCONHCHRCO_2CH_3$ [62, 63].

R	entsprechende Aminosäure	k_{rel} [a]
$(CH_3)_2CH$	Valin	1
CH_3	Alanin	7.7 ± 1.1
H	Glycin	23 ± 3.5

[a] Bestrahlt unter Stickstoff in CCl_4 unter Rückfluß.

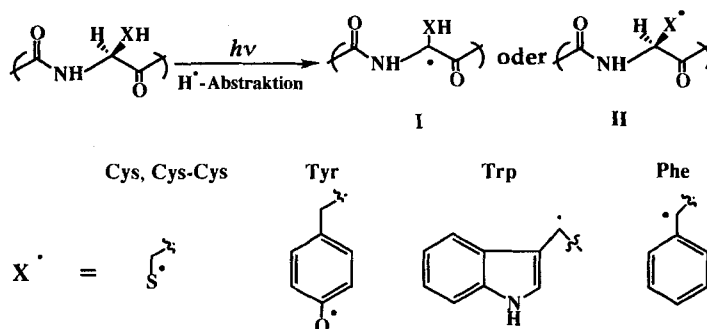
auch an Modellreaktionen gezeigt, wie der oxidativen Abspaltung eines C-terminalen Peptids mit Nickeloxid^[64] und der Photoalkylierung einiger synthetischer glycinhaltiger Polypeptide mit 1-Buten oder Toluol^[65]. Allerdings ist ein Protein ein komplexes Polypeptid, und die Selektivität hängt von der Position des Glycinrestes im Peptid, d. h. von seiner Zugänglichkeit, ebenso ab wie von der Konformation des Peptids^[66].

In Tabelle 6 sind für eine Reihe von Verbindungen Bindungs-Dissoziationsenergien aufgelistet^[67, 68], die mit den relativen Energien für eine Wasserstoffradikal-Abstraktion (oder Disulfid-Dissoziation) von Aminosäureseitenketten korreliert wer-

Tabelle 6. Bindungs-Dissoziationsenergien E_{dis} von Vergleichsverbindungen für Aminosäureseitenketten [67, 68].

Aminosäure	Seitenkettenradikal	Vergleichsverbindung	E_{dis} [kcal mol ⁻¹] [67]
Ala	$\dot{C}H_2$	CH_3CH_2-H	98
Val	$\dot{C}(CH_3)_2$	$(CH_3)_3C-H$	91
Leu	$\dot{C}H_2C(CH_3)_2$		
Ile	$\dot{C}(CH_3)CH_2CH_3$		
Phe	$\dot{C}HCH_2C_6H_5$	$C_6H_5CH_2-H$	85
His	$\dot{C}H-CH_2$ (Imidazolring)		
Trp	$\dot{C}H-CH_2$ (Indolring)		
Tyr	$\dot{C}HCH_2-C_6H_4-O^\bullet$	C_6H_5O-H	86.5 [68]
Ser	$\dot{C}HOH$	$CH_3CH(OH)-H$	90
Thr	$\dot{C}(CH_3)OH$		
Cys	$\dot{C}H_2S^\bullet$	CH_3S-H	88
Cys-Cys	"	CH_3S-SCH_3	69
Met	$\dot{C}HSCH_3$		
Pro	\dot{N} (Pyrrolidinring)		
Lys	$\dot{C}(CH_2)_4CHNH_2$		
Arg	$\dot{C}(CH_2)_3CHNH-C(=NH_2)NH_2$		
Asp	$\dot{C}HCO_2^-$	CH_3COCH_2-H	92
Glu	$\dot{C}H_2CHCO_2^-$		
Asn	$\dot{C}HCONH_2$		
Gln	$\dot{C}H_2CHCONH_2$		

den können. Ganz offensichtlich ist die Disulfid-Dissoziation der bei weitem am wenigsten energieaufwendige Prozeß und sollte daher zu einer effizienten radikalinduzierten Spaltung von Disulfidbrücken im Protein führen. Auch für andere Aminosäuren können Hypothesen über die Stabilisierung entsprechender Radikale aufgestellt werden. Die aufgrund ihrer Bindungs-Dissoziationsenergien (Tabelle 6) zu erwartenden Angriffsstellen für photochemisch gebildete Radikale sind in Schema 8 aufge-



Schema 8. Radikalische Reaktivitäten von Peptiden: Radikale des Peptidrückgrats (I) und stabilisierte Radikale der Seitenketten (II).

führt. Kandidaten sind stabilisierte Radikale wie das Phenoxyl-Radikal für Tyr, benzyllische Radikale für Trp, Phe und His sowie das Sulfanyl-Radikal für Cys. Auch Radikale in α -Position zu Heteroatomen (O in Ser und Thr sowie N in Arg, Lys, Pro) und in α -Position zu Carbonylgruppen (Asp, Asn, Glu, Gln) sind stabilisiert und werden möglicherweise durch Wasserstoffradikal-Abstraktion gebildet, ebenso tertiäre Alkyl-Radikale (Val, Leu, Ile). Demnach könnten also alle Aminosäureseitenketten an Radikalreaktionen beteiligt sein, die durch Wasserstoffradikal-Abstraktion eingeleitet werden.

Die Existenz weiterer Radikalspezies wurde kürzlich durch γ -Bestrahlung von Proteinen und Protein-DNA-Komplexen nachgewiesen^[69]. Das Radikal, das unter diesen Bedingungen durch Elektronenverlust hauptsächlich gebildet wird, wurde durch ESR als N-Radikal des Peptidrückgrats identifiziert und nicht als C-Radikal, wie in früheren Arbeiten angeführt wurde; Radikalkationen der Seitenkette, wie Trp^{•+} und Tyr^{•+}, wurden dagegen nur in vergleichsweise geringen Ausbeuten erhalten^[70]. Allerdings findet ein solcher Prozeß unter klassischen Bestrahlungsbedingungen nicht statt. Auch die photochemische Zerstörung von Proteinen verläuft höchstwahrscheinlich über die Bildung von Radikalen, an der vor allem die lichtempfindlichen Aminosäuren, wie Cys–Cys, Trp, Phe und Tyr^[71], beteiligt sind.

3. Ein Hauptproblem der Photoaffinitätsmarkierung: die unspezifische Markierung

Sonden, die auf das aktive Zentrum zielen, werden im allgemeinen benutzt, um die Wechselwirkungen zwischen einem Liganden und einem biologischen Makromolekül zu untersuchen. Diese Strategie setzt voraus, daß eine schwache und reversible Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor, wie sie durch den Übergangscharakter des Komplexes bedingt ist, durch die Bildung einer stabilen kovalenten Bindung ersetzt wird. Um für die Untersuchung von Wert zu sein, muß diese chemische Reaktion ortsspezifisch sein, d.h. sie darf ausschließlich an der Bindungsstelle des Zielmoleküls und nicht an anderen Proteindomänen oder an anderen Verbindungen im Inkubationsansatz stattfinden. Das Problem der unspezifischen Markierung findet sich oft bei photoinduzierten Markierungen, da hochreaktive Spezies in unmittelbarer Nähe der Proteine gebildet werden. Je größer der Überschuß an Ligand während der Markierungsreaktion ist (bei niedrig-affinen Sonden), desto größer ist der Anteil an unspezifischer Markierung. Ein anderes Beispiel für eine unspezifische Markierung wurde bei photochemisch gebildeten Spezies mit einer längeren Lebensdauer festgestellt, die zu Pseudoaffinitätsmarkierungen führen könnte^[72]. Die Verwendung von Radikalfängern wurde empfohlen, und es gelang mit ihnen, reaktive Zwischenprodukte im umgebenden Medium abzufangen, so daß die chemische Reaktion auf die Bindungsstelle beschränkt blieb^[54]. Offensichtlich wurden die meisten erfolgreichen Photoaffinitätsmarkierungen (siehe Tabelle 7) mit gereinigten Proteinen durchgeführt, die in großen Mengen verfügbar waren. So konnte die photochemische Reaktion bei hohen Rezeptorkonzentrationen und verringertem Ligandenüberschuß durchgeführt werden, so daß die unspezifische Markierung zurückgedrängt werden konnte. Doch wie können unspezifische

Markierungen bei Rezeptoren vermieden werden, die nur in sehr kleinen Mengen in einer Präparation vorkommen?

3.1. Das historische Beispiel

Die Markierung von α -Chymotrypsin mit Diazoacetylchymotrypsin^[1] ist ein Beispiel für eine geschickte ortsspezifische Markierung, bei der die photoreaktive Spezies ausschließlich im aktiven Zentrum gebildet wurde. Die chemische Stabilität des acylierten Enzyms reichte aus, um das überschüssige licht-sensitive Substrat, *p*-Nitrophenyldiazoacetat, abzutrennen und so eine effiziente Photomarkierung eines stöchiometrisch modifizierten Enzyms zu erreichen^[73, 74]. Abgesehen von Problemen, die durch die Umlagerung der Diazoacetylsonde auftraten, ist dieses Experiment ein bemerkenswertes Beispiel für eine selektive Photoaffinitätsmarkierung am aktiven Zentrum, bei der eine unspezifische Markierung vermieden wird.

3.2. Lichtinduzierte Quervernetzungen bei langlebigen Komplexen

Durch die Verwendung von Ligand-Analoga mit sehr hoher Affinität für eine Bindestelle ist es am einfachsten möglich, einen Überschuß an Ligand bei Markierungsreaktionen zu vermeiden und so das Ausmaß an unspezifischer Markierung zu verringern. Eine hohe Affinität entspricht im allgemeinen einer sehr niedrigen Dissoziationsgeschwindigkeit des Ligand-Rezeptorkomplexes und ermöglicht daher sehr vorteilhafte Markierungsbedingungen, in diesem Falle den Einsatz von sehr verdünnten Lösungen des Liganden; so entstehen nach einer angemessenen Inkubationszeit quasistöchiometrische Ligand-Rezeptorkomplexe. Der Erfolg der Photomarkierungsreaktion hängt dabei ausschließlich von der intrinsischen Reaktivität der photochemisch gebildeten Spezies ab.

Neurotoxine sind eine außergewöhnlich vielfältige Gruppe hochspezifischer Liganden mit extrem hohen Affinitäten für viele Neurorezeptoren (Affinitätskonstanten bis zu 10^{-12} M)^[75]. So werden bei diesen Liganden typische Beispiele für langlebige Komplexe angetroffen. Wegen der nahezu irreversiblen Bindung an den Rezeptor im Dunkeln müssen radioaktiv markierte Toxine verwendet werden, um weitere Analysen unter denaturierenden Bedingungen durchführen zu können. Im allgemeinen werden die Toxine spezifisch (d.h. an Cys- oder Lys-Resten) mit einem photochemisch aktivierbaren quervernetzenden Reagens markiert^[56]. Schlangengift-Neurotoxine, die auf den nicotinischen Acetylcholinrezeptor wirken, wurden mit bifunktionellen Reagentien modifiziert und so intensiv zur Untersuchung des genannten Rezeptors eingesetzt^[76–81]. Die relativ große Oberfläche dieser Neuropeptidsonden (ihre Molekülgröße liegt zwischen 70 und 80 kDa) bietet viele Möglichkeiten für Wechselwirkungen zwischen Sonde und Rezeptor; so können mehrere, an unterschiedlichen Positionen markierte Derivate entworfen werden, mit denen unterschiedliche Stellen des Rezeptors untersucht werden können. Diese Photoaffinitätssonden schränken die unspezifische Markierung ein und sind daher für Strukturuntersuchungen gut geeignet. Die Bestimmung der räumlichen Strukturen von Membranrezeptoren befindet sich noch in einem frühen

Stadium, vor allem hinsichtlich heterooligomerer Polypeptidkomplexe, für die derzeit nur Daten von niedrig aufgelösten (9 Å) Tieftemperatur-elektronenmikroskopisch bestimmten Strukturen verfügbar sind^[82]. Daher kann die Markierung mit solchen Toxinen zu einer eleganten Methode werden, um die Quartärstruktur von Rezeptor-Polypeptiden zu charakterisieren^[76–81].

3.3. Lichtinduzierte Selbstmord-Markierung

Es ist klar, daß modifizierte Neurotoxine sehr spezielle Werkzeuge sind, die dem Wissenschaftler nicht immer zur Verfügung stehen. Daher ist die Entwicklung einer Methode, bei der die unspezifische Markierung minimiert ist und die auf häufig eingesetzte Verbindungen als Ligand-Analoga angewendet werden kann, von allgemeinem Interesse. Lichtinduzierte Selbstmord-Inhibitoren sind Ligand-Analoga, deren selektive Zersetzung durch Licht durch die intrinsischen Eigenschaften des Zielproteins ausgelöst wird^[83]. Diese Methode, eine Weiterentwicklung der gebräuchlicheren Selbstmord- oder k_{cat} -Enzymhemmung^[84], verbindet die hohe Reaktivität der photochemisch gebildeten Sonden und eine selektive Aktivierung innerhalb der Bindungsstelle.

Drei Methoden zur bevorzugten Photoaktivierung von rezeptorgebundenen Liganden sind bisher beschrieben worden. Bei der ersten werden Nitrosamine bevorzugt photoaktiviert, die sich in einer hydrophoben Umgebung der Bindungsstelle befinden^[85]. Die zweite Methode besteht in einer enzyminduzierten Verschiebung der Absorptionsbande des Chromophors, wodurch die selektive Photoaktivierung des enzymgebundenen Reaktionsproduktes möglich wird^[86]. Der dritte Ansatz beinhaltet die Photoaktivierung eines Liganden mit einem geeigneten Chromophor durch einen tryptophanvermittelten Energietransfer (Abb. 2)^[87]. Für diese Aktivierung ist ein Tryptophanrest an

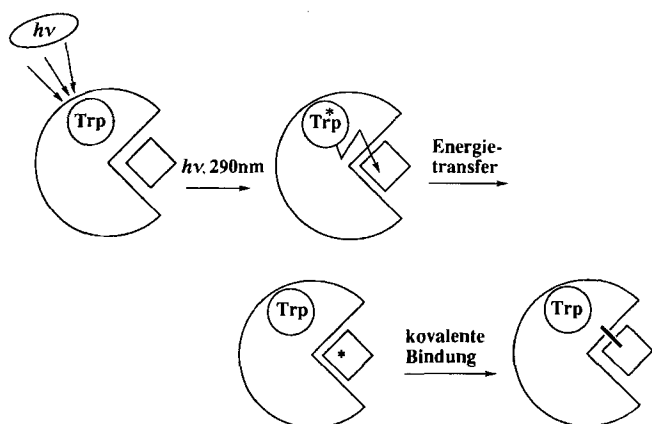
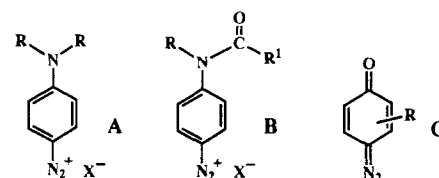


Abb. 2. Photomarkierung durch tryptophanvermittelten Energietransfer.

der Bindungsstelle oder in deren Nachbarschaft und eine Sonde mit geeigneten spektroskopischen Eigenschaften erforderlich. Diese sollte möglichst wenig bei der Anregungs- ($\lambda_{exc} \approx 290$ nm) und möglichst stark bei der Emissionswellenlänge von Trp absorbieren ($\rightarrow \lambda_{max}(\text{Sonde}) \approx 320\text{--}340$ nm). Drei Arten von Molekülen mit brauchbaren lichtsensitiven Chromophoren sind in Schema 9 gezeigt. Eine Verbesserung der Markierungsreaktion



λ_{max} [nm]	ca. 380	ca. 340	ca. 350
ϵ [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]	> 35 000	ca. 15 000	> 25 000

Schema 9. Spektroskopische Eigenschaften von Aryldiazonium- und Diazoverbindungen A–C, die für eine Photoaktivierung durch tryptophanvermittelte Energieübertragung geeignet sind. R, R' = Alkyl.

durch Energietransfer-Photoaktivierung ($\lambda_{exc} \approx 290$ nm) im Vergleich zur gewöhnlichen Photomarkierungsreaktion ($\lambda_{exc} \approx \lambda_{max}(\text{Sonde})$) wurde zuerst bei der Inaktivierung der Acetylcholin-Esterase durch ein Aryldiazonium-Derivat gezeigt (Verbindung A, Schema 9)^[87]. Diese Methode sollte in vielen Fällen anwendbar sein; inzwischen wurden weitere erfolgreiche Beispiele für Rezeptormarkierungen durch tryptophanvermittelte Photoaktivierung beschrieben^[88–92].

4. Identifizierung markierter Aminosäurereste

Zahlreiche Aminosäurereste, die mit Photoaffinitätssonden markiert wurden, sind in jüngster Zeit identifiziert worden. Dieser Erfolg hängt mit der wachsenden Zahl an bekannten Proteinsequenzen, die von entsprechenden klonierten Genen abgeleitet wurden^[93, 94], wodurch das Sequenzieren der Peptide und die Identifizierung der Aminosäuren erheblich erleichtert wird, sowie mit den neueren Fortschritten bei Mikrosequenzierungsmethoden zusammen, durch die auch sehr geringe Peptidmengen sequenziert werden können^[95].

Diese Untersuchungen haben mehrere Konsequenzen. Erstens ermöglichen sie es, die Position der Ligandenbindungsstelle in der Proteinsequenz zu bestimmen und daraus wichtige Informationen über die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung abzuleiten. Außerdem ist es, wenn die räumliche Struktur des Zielrezeptors bekannt ist, sehr wichtig für Kristallographen, auch Strukturdaten zu erhalten, die im festen Zustand nicht zugänglich sind. Zweitens sind die identifizierten Aminosäuren geeignete Ziele für die ortsspezifische Mutagenese. Je größer die Zahl der identifizierten Aminosäuren ist, desto mehr Informationen erhält man daraus selbstverständlich auch über die Struktur des Rezeptors in Lösung.

In Tabelle 7 sind die durch erfolgreiche Photoaffinitätsmarkierungen identifizierten Aminosäurereste, die verwendeten Sonden und die Zielrezeptoren aufgeführt. Dazu einige Bemerkungen:

a) In der Regel wurden Proteine eingesetzt, die in gereinigter Form und in ausreichenden Mengen verfügbar waren. Bemerkenswerte Ausnahmen sind der β -adrenerge^[96], der GABA-^[97] und der Vasopressinrezeptor^[98].

b) Viele unterschiedliche photosensitive Sonden wurden verwendet: klassische Arylazide, Diazirine, Diazoketone, Aryldiazoniumsalze und aromatische Halogenverbindungen. Die Tat-

Tabelle 7. Aminosäuren, die in biologischen Rezeptoren durch Photomarkierung identifiziert wurden; sie sind nach abnehmender Markierungshäufigkeit geordnet.

Aminosäure	radioaktive Sonde	Zielrezeptor	Lit.
Tyr	2-Azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$	mitochondriale F_1 -ATPase aus Rinderherz (β -Untereinheit)	[15]
	$[\text{H}]\text{SAM}$, $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{-AdoMet}$	Guanidinoacetat-Methyl-Transferase	[101]
	2-Azido- $[\beta,\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 2-Azido- $[\beta,\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$	Chloroplasten- F_1 -ATPase (β -Untereinheit)	[14]
	2-Azido- $[\beta,\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	F_1 -ATPase aus Rinderherz (β -Untereinheit)	[16]
	8-Azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	RecA-Protein aus <i>E.coli</i>	[18]
	8-Azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$	cAMP-abhängige Protein-Kinase	[21, 127]
	$[\text{C}]\text{Gly-Pro-Arg-N-(4-Azido-2-nitrophenyl)-Lys-NH}_2$	Fibrin (γ -Kette)	[117]
	$[\text{P}]\text{Azidonitrophenylphosphat}$	mitochondriale F_1 -ATPase	[118]
	$[\text{H}]\text{DDF[a]}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[106, 107]
	$[\text{H}]\text{Nicotin}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[103]
	$[\text{H}]\text{2,4-Dinitrophenylazid}$	Anti-Dinitrophenyl-Antikörper Myeloma-Protein 460	[130 b]
	$[\text{H}]\text{Azidonevirapin}$	virale reverse Transkriptase (Typ 1)	[141]
	$[\text{P}]_2\text{-Azido-NAD}^+$	Lactat-Dehydrogenase (LDH)	[142]
	3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl-ATP	Chloroplasten-Kopplungsfaktor 1	[139]
	$[\text{H}]\text{DDF[a]}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[106]
	$[\text{H}]\text{GTP}$	Tubulin (β -Untereinheit)	[102]
Cys	$[\text{P}]\text{dTTP}$	<i>E.coli</i> -Ribonucleotid-Reduktase	[138]
	Arylazido- β - $[\text{3-}^3\text{H}]\text{alanyl-NAD}^+$	D-(\rightarrow)- β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	[119]
	$[\text{H}]\text{Nicotin}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[103]
	$[\text{I}]\text{TID[b]}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[111]
	α -(4-Azido-2-nitrophenyl)-L-lysin	Kaninchen-Antikörper	[134]
	Arylazido- β - $[\text{3-}^3\text{H}]\text{alanyl-NAD}^+$	Kaninchenmuskel-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	[143]
	$[\text{H}]\text{Promegeston}$	Glucocorticoidrezeptor der Ratte	[144]
	$[\text{H}]\text{dTTP}$	<i>E.coli</i> -Ribonucleotid-Reduktase (β 1-Untereinheit)	[145]
	8-Azido-2'-O- $[\text{C}]\text{dansyl-ATP}$	Kaninchenmuskel-Adenylat-Kinase	[150]
	$[\text{C}]\text{Azidoatrazin}$	Reaktionszentrum des Photosystems 2	[116]
Met	$[\text{H}]\text{p-Benzoylphenylalanin-enthaltende Peptide}$	Calmodulin	[120]
	$[\text{I}]\text{TID[b]}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[111, 112]
	$[\text{H}]\text{p-Benzoyl-L-phenylalanin-enthaltendes Peptid}$	cAMP-abhängige Proteinkinase	[133]
	$[\text{H}]\text{Promegeston}$	humaner Progesterinrezeptor	[144]
	$[\text{H}]\text{Promegeston}$	Glucocorticoidrezeptor der Ratte	[144]
	$\Delta^6\text{-}[\text{H}]\text{Testosteron}$, $\Delta^6\text{-}[\text{H}]\text{Estradiol}$	humanes Geschlechtshormon-bindendes Globulin	[148]
	$[\text{H}]\text{d-Tubocurarin}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[105]
Trp	2-Azido- $[\text{H}]\text{ATP}$	Skelettmuskel-Myosin	[17]
	$[\text{H}]\text{NANDP[c]}$	Skelettmuskel-Myosin	[115]
	8-Azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$	cAMP-abhängige Protein-Kinase	[21]
	$[\text{H}]\text{DDF[a]}$	Acetylcholin-Esterase von <i>Torpedo</i>	[92, 124]
	$[\text{H}]\text{DDF[a]}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[106, 107]
	$[\text{I}]\text{Iodcyanpindololdiazirin}$	β -adrenerger Rezeptor	[96]
	$[\text{I}]\text{Iodazidobenzylpindolol}$	Truthahn-Erythrocyten	
Lys	$[\text{H}]\text{d-Tubocurarin}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[105]
	8-Azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, 8-Azido- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$	Glutamat-Dehydrogenase	[20]
	$[\text{H}]\text{Physostigmin}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[104 b]
	$[\text{H}]\text{2,4-Dinitrophenylalanyl-diazoketon}$	Anti-Dinitrophenyl-Antikörper Myeloma-Protein 460	[130 a]
	4-Maleimidobenzophenon[d]	Troponin I	[140]
	$[\text{H}]\text{Azido-N-}\beta\text{-ADP}$	Pterinbindestelle der Phenylalanin-Hydroxylase	[146]
	$[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{dTTP}$	heterodimere reverse Transkriptase von HIV-1	[147]
Glu	$[\text{H}]\text{ADP}$	Myosin aus Vögel-Kaumägen	[99]
	$[\text{H}]\text{UDP}$	Myosin aus Vögel-Kaumägen	[100]
	$[\text{H}]\text{m-Diazirinophenyl-Derivat des Retinals}$	Bacteriorhodopsin	[123]
	$[\text{C}]\text{m-Diazirinophenyl-Derivat von Phospholipiden}$	Glycophorin A	[128]
	Diazoacyltrypsin	Trypsin	[137]
	$[\text{P}]_2\text{Azido-NAD}^+$	Glutamat-Dehydrogenase (GDH)	[142]
Ser	$[\text{C}]\text{3'-(2'-O-(4-Benzoyl)benzoyl-ATP)}$	Kaninchenmuskelmyosin	[122]
	$[\text{H}]\text{Chlorpromazin}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor	[108, 110]
	$[\text{H}]\text{m-Diazirinophenyl-Derivat des Retinals}$	Bacteriorhodopsin	[123]
	$[\text{C}]\text{Uridin-2'-(3'),5'-diP(pUp)}$	RNase	[129]
	$[\text{H}]\text{Trimethylphenylphosphonium-Ion}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[131]
	$[\text{I}]\text{TID[b]}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[52, 112]
Thr	2-Azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	Entkopplungsprotein aus braunem Fettgewebe	[13]
	8-Azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	Entkopplungsprotein aus braunem Fettgewebe	[19]
	$[\text{H}]\text{Chlorpromazin}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[108]
	$[\text{C}]\text{Uridin-2'-(3'),5'-diP(pUp)}$	RNase	[129]
	$[\text{I}]\text{TID[b]}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[111]
	8-Lysyl- ϵ -N-amidino-4-azidophenyl-Vasopressin	Vasopressinrezeptor	[98]
Leu	2-Azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ADP}$	mitochondriale F_1 -ATPase aus Rinderherz (β -Untereinheit)	[15]
	$[\text{H}]\text{Chlorpromazin}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[108]
	$[\text{H}]\text{DDF[a]}$	Acetylcholin-Esterase von <i>Torpedo</i>	[126]
	$[\text{I}]\text{TID[b]}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[52, 112]
	8-Azido-2'-O- $[\text{C}]\text{dansyl-ATP}$	Kaninchenmuskel-Adenylat-Kinase	[150]
Arg	$[\text{H}]\text{NANDP[c]}$	Muschel-Myosin	[125]
	$[\text{H}]\text{Quinacrinazid}$	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[132]
	8-Lysyl- ϵ -N-amidino-4-azidophenyl-Vasopressin	Vasopressinrezeptor	[98]
	4-Maleimidobenzophenon[d]	Troponin I	[140]

[a] DDF = *p*-(*N,N*-Dimethylamino)phenyldiazonium-tetrafluorborat. [b] TID = 3-Trifluormethyl-3-*meta*-iodphenyl-3*H*-diazirin. [c] NANDP = 2-[(4-Azido-2-nitrophenyl)amino]ethyl-diphosphat. [d] Ein Quervernetzungsreagens.

Tabelle 7. (Fortsetzung).

Aminosäure	radioaktive Sonde	Zielrezeptor	Lit.
Ile	2-Azido-[α - 32 P]ADP [32 P]Azidonitrophenylphosphat [14 C]Uridin-2'(3'),5'-diP(pUp) [125 I]TID [b]	mitochondriale F ₁ -ATPase aus Rinderherz (β -Untereinheit) mitochondriale F ₁ -ATPase RNase nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[15] [118] [129] [112]
Pro	2-Azido-[α - 32 P]ADP [14 C]3'(2')-O-(4-Benzoyl)benzoyl-ATP 4-Maleimidobenzophenon [d] [3 H]Quinacrinazid	mitochondriale F ₁ -ATPase aus Rinderherz (β -Untereinheit) Myosin aus Vögel-Kaumägen Troponin I nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[15] [121] [140] [132]
Gly	[3 H] <i>p</i> -Benzoyl-L-phenylalanin-enthaltendes Peptid N-2,4-Dinitrophenyl- <i>p</i> -aminobenzoat [125 I]TID [b]	cAMP-abhängige Protein-Kinase Anti-Dinitrophenyl-Antikörper nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[133] [135, 136] [112]
Phe	[3 H]DDF [a] [3 H]Muscimol [125 I]TID [b]	Acetylcholin-Esterase von <i>Torpedo</i> und elektrischem Aal GABA-Rezeptor der Rindergroßhirnrinde nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[44, 124] [97] [112]
Ala	ϵ -(4-Azido-2-nitrophenyl)-L-lysin Diazoacyltrypsin	Kaninchen-Antikörper Trypsin	[134] [137]
Asp	3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl-ATP Δ^6 -Testosteron-Agarose	Chloroplasten-Kopplungsfaktor 1 Δ^5 -3-Oxosteroid- Δ^5 - Δ^4 -Isomerase	[139] [151]
His	N-2,4-Dinitrophenyl- <i>p</i> -aminobenzoat [α - 32 P]dTPP	Anti-Dinitrophenyl-Antikörper <i>E. coli</i> -DNA-Polymerase I (Pol I)	[135, 136] [149]
Asn	[125 I]TID [b]	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[112]
Gln	[32 P]Azidonitrophenylphosphat	mitochondriale F ₁ -ATPase	[118]
Val	[125 I]TID [b]	nicotinischer Acetylcholinrezeptor von <i>Torpedo</i>	[52, 111, 112]

[a] DDF = *p*-(*N,N*-Dimethylamino)phenyldiazonium-tetrafluoroborat. [b] TID = 3-Trifluormethyl-3-*meta*-iodphenyl-3*H*-diazirin. [c] NANDP = 2-[(4-Azido-2-nitrophenyl)amino]ethyl-diphosphat. [d] Ein Quervernetzungsreagens.

sache, daß Arylazide die am häufigsten aufgeführten Verbindungen sind, läßt eher auf eine rege Anwendung, denn auf bessere Markierungseigenschaften der gebildeten Spezies schließen. Die Liste enthält auch nicht durch Licht aktivierbare Sonden wie unmodifizierte Nucleotide^[99–102] sowie Nicotin^[103], Physostigmin^[104] und d-Tubocurarin^[105]. Der Einsatz solcher Sonden als ortsspezifische photochemische Inaktivatoren ist eine gebräuchliche Alternative zur Photoaffinitätsmarkierung, doch ist der genaue Mechanismus der Kupplung an das Protein noch unbekannt.

c) Unter den unterschiedlichen Sonden gibt es nur wenige, mit denen mehrere Aminosäuren innerhalb der Bindungsstelle markiert werden können. So ist *para*-Dimethylaminophenyldiazonium-tetrafluoroborat (DDF; A, R = CH₃, X = BF₄; Schema 9)^[89–92] ausgesprochen reaktiv, besonders gegenüber dem nicotinischen Acetylcholinrezeptor^[106, 107], bei dem acht Aminosäurereste der α -Untereinheit identifiziert werden konnten: Cys 192, Cys 193, Tyr 93, Tyr 151, Tyr 190, Tyr 198, Trp 86 und Trp 149. Auch das Monochlorphenothiazin Chlorpromazin^[108–110] ließ sich, wenn auch nur sehr schwach, lichtinduziert einbauen; es wurde an sieben Aminosäuren (α Ser 248, β Ser 254, β Leu 257, γ Thr 253, γ Ser 257, γ Leu 260, δ Ser 262) im Segment M2 des nicotinischen Acetylcholinrezeptors gebunden, das vermutlich an der Kanalbildung beteiligt ist. Eine bemerkenswerte Vielfalt in der Markierung wurde mit [125 I]TID^[49b] festgestellt, mit dem eine umfassende Markierung des nicotinischen Acetylcholinrezeptors gelang: Acht Aminosäurereste (β Leu 257, δ Leu 265, β Val 261, δ Val 269, β Ser 250, β Ser 254, δ Ser 258, δ Ser 262) in den kanalbildenden M2-Segmenten der β - und δ -Untereinheiten^[52] wurden so identifiziert. Betrachtet man die an der Lipid-Protein-Grenzfläche liegende Region des Rezeptors von *Torpedo*, sind die Markierungserfolge noch beeindruckender: Fünf Aminosäurereste (Cys 412, Cys 418,

Met 415, Thr 422, Val 425) des hydrophoben M4-Segments der α -Untereinheit^[111] und sechzehn Aminosäurereste (3 Phe, 3 Met, 3 Ile, 2 Ser, 2 Asn, Gly, Val, Leu) der M3-Segmente der β -, γ - und δ -Untereinheiten waren markiert^[112]. Mit einigen anderen Sonden, die in Tabelle 7 aufgeführt sind, wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, allerdings in wesentlich geringerem Umfang.

d) Jede der zwanzig Aminosäuren ist mindestens einmal markiert worden. Tyr und Cys sind, was die Häufigkeit der Markierung betrifft, dominierend. Die Markierung dieser Reste kann mit unterschiedlichen Sonden erreicht werden, die Nitrene, Carbene, Aryl-Kationen oder sogar bislang nicht definierte reaktive Spezies bilden. Überraschenderweise wurde der nucleophile Histidinrest, der oft mit spezifischen Reagentien zur Proteinmodifikation^[113] und mit Affinitätsreagentien^[114] umgesetzt wird, nur zweimal in Photoaffinitätsmarkierungen identifiziert. Andere Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in den Seitenketten (Met, Trp, Lys, Glu, Ser, Thr) wurden häufig, hydrophobe Aminosäuren (Leu, Ile, Pro, Phe, Ala, Val) nur gelegentlich markiert. Bemerkenswerterweise gelang die Markierung der hydrophoben Aminosäurereste hauptsächlich mit Sonden, die besonders reaktive Spezies wie Carbene und Aryl-Kationen bilden (Abschnitt 2.2).

Der Überblick in Tabelle 7 zeigt erstens, daß die meisten Ergebnisse aus Veröffentlichungen der letzten Jahre stammen; dies spiegelt den technischen Fortschritt auf diesem Forschungsgebiet wider. Zweitens läßt sich offenbar kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der markierten Aminosäure und der Reaktivität der photoaktivierbaren Sonde herstellen; ein solcher Zusammenhang läßt sich umso schwerer bewerten, als in vielen Veröffentlichungen quantitative Befunde über irreversible Markierungen fehlen. Darüber hinaus sind die Verbindungen, mit denen mehrere unterschiedliche Aminosäurereste effektiv markiert werden können, möglicherweise wertvolle Sonden zur

Untersuchung der Topographie von Membranrezeptoren, an denen ein wachsendes Interesse besteht. Dieser Aspekt wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

5. Topographische Markierung

5.1. Definition

Die topographische Markierung kann als Markierungsmuster definiert werden, das die gesamte Umgebung eines Liganden innerhalb einer Bindungsstelle umfaßt. Eine solche Markierung kann entweder auf makromolekularer Ebene durchgeführt werden, indem man unterschiedliche Untereinheiten markiert, die die Bindungsstelle am Rezeptor bilden, oder auf molekularer Ebene, indem man die Aminosäuren markiert und identifiziert, die die Bindungsstelle umgeben (Abb. 3). Es ist klar, daß eine

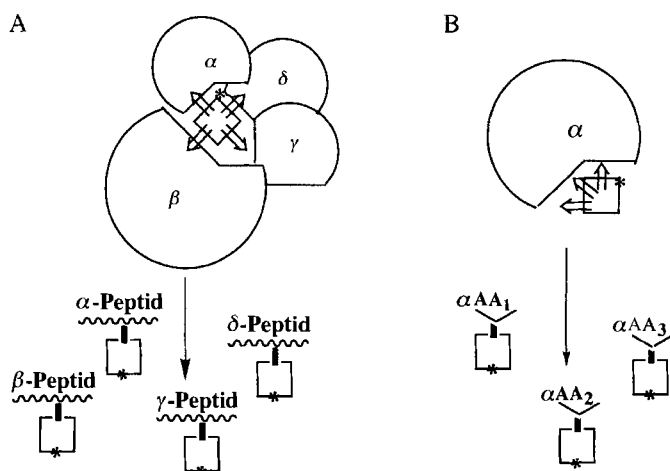


Abb. 3. Definitionen der topographischen Markierung: A) auf makromolekularer Ebene: Markierung aller Peptid-Untereinheiten α - δ , die an der Bildung der Bindungsstelle beteiligt sind; B) auf molekularer Ebene: Markierung aller Aminosäurereste AA_n , aus denen die Bindungsstelle zusammengesetzt ist.

solche topographische Markierung notwendigerweise mit der intrinsischen Reaktivität der photochemisch gebildeten Spezies zusammenhängt. Dafür sind nur Sonden mit einer besonders hohen, „universellen“ Reaktivität geeignet, da mit diesen Sonden die gesamte Umgebung des Liganden markiert werden soll, indem sie mit allen benachbarten Aminosäureresten, einschließlich derer mit einer chemisch inerten Alkylseitenkette, reagieren. Die Sonden sollten also nicht nur mit nucleophilen Resten reagieren, denn dies würde zu einer partiellen Markierung der Bindungsstelle führen. Die Reaktivität der Sonde bestimmt man am besten dadurch, daß man die Lebensdauer der photochemisch gebildeten Spezies in unterschiedlichen Medien, von Wasser bis hin zu Kohlenwasserstoffen, mißt; dabei ist sicherzustellen, daß die Sonde effektiv mit einer C-H-Bindung (z. B. des Lösungsmittels) reagieren kann, die jeweils als universelle Bindung stellvertretend für jede beliebige Bindung einer Ligandenbindungsstelle eines Rezeptors dient.

5.2. Grenzen der Methode

Die Verwendung hochreaktiver Sonden reicht nicht aus, um eine topographische Markierung sicherzustellen. In Abbildung 4 sind unterschiedliche Situationen gezeigt, die bei Photoaffinitätsmarkierungen auftreten können. So kann die photochemisch gebildete Sonde durch umgebende Wassermoleküle

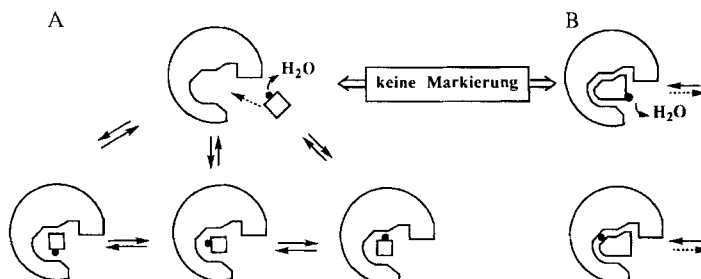


Abb. 4. Unterschiede in der Markierung von Rezeptoren, die sich durch die Verwendung von hochreaktiven Photoaffinitätssonden mit mäßiger (A) und hoher Bindungsaffinität (B) ergeben: A) topographische Markierung, die durch eine dynamische Wechselwirkung (schnelle Trennung) der Sonde mit der Bindungsstelle gewährleistet wird; B) spezifische, aber partielle Markierung, die durch eine „statische“ Wechselwirkung (langsame Trennung) der Sonde mit der Bindungsstelle entsteht.

abgefangen werden, wenn die Umgebung der gebundenen Sonde hydrophil ist (Abb. 4A). Wir haben beispielsweise die Markierung einer Rezeptorbindungsstelle, die zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen kann, mit einer hochreaktiven photoaktivierbaren Sonde untersucht: Dabei war in einer Konformation eine sehr effektive Markierung möglich, während es in der anderen Konformation zu keiner Markierung kam, möglicherweise, weil der reaktive Rest zum wässrigen Medium hin orientiert war^[89]. Eine andere mögliche Beschränkung für eine vollständige topographische Markierung ist die Verwendung von Sonden, die eine starke Affinität zur Bindungsstelle aufweisen. Diese Sonden dissoziieren im allgemeinen (wenn auch nicht notwendigerweise) sehr langsam von der Bindungsstelle. Dies geht wahrscheinlich auf eine statische Wechselwirkung zwischen dem lichtaktivierten Liganden und einer begrenzten Region der Bindungsstelle zurück (Abb. 4B). Diese Schwierigkeit tritt typischerweise bei der langsamen photochemischen Kupplung von modifizierten Neurotoxinen und Peptidhormonen auf (Abschnitt 3.2). Demgegenüber ist für die topographische Markierung eine dynamische Wechselwirkung erforderlich, bei der die Sonde innerhalb der Bindungsstelle unterschiedliche Positionen einnehmen kann. Die extreme Reaktivität der angeregten Spezies garantiert eine effektive Markierung aller Regionen der Bindungsstelle. Per definitionem weisen die besten topographischen Sonden daher eine mäßige Affinität zu ihrer Erkennungsregion auf, was zu einer effizienten dynamischen Markierung führt. Theoretisch sollten Sonden mit geringerer Affinität zu einer Verstärkung der unspezifischen Markierung führen (Abschnitt 3). In diesem Fall ist die unspezifische Markierung allerdings im allgemeinen von untergeordneter Bedeutung, weil die photochemisch gebildeten Spezies weitgehend vom Lösungsmittel abgefangen werden.

5.3. Erwartete Konsequenzen

Oligomere Proteinkomplexe treten bei biologischen Vorgängen häufig auf; dabei stellt sich die Frage nach der genauen Lokalisation einer Bindungsstelle innerhalb des aus vielen Untereinheiten bestehenden Proteinkomplexes. Die Aufklärung der hochorganisierten Quartärstrukturen einiger Membranrezeptoren, z. B. Neurotransmitter-abhängiger Rezeptoren^[152], war nur mit angemessenen Sonden zur Identifizierung der Ligandenbindungsstellen möglich. Beispielsweise gelang die Markierung des Ionenkanals des nicotinischen Acetylcholinrezeptors mit photosensitiven kanalblockierenden Verbindungen an fünf Untereinheiten, die am Aufbau des Kanals beteiligt sind^[109, 110, 131, 153]. Topographische Sonden sind am besten geeignet, um Rezeptorstellen von unterschiedlichen Untereinheiten zu markieren. In vielen Publikationen wurde die Markierung einer Untereinheit in einem Komplex aus vielen Untereinheiten beschrieben, doch sollte man sich vor falschen Interpretationen hüten, nach denen sich die Bindungsstelle nur auf der markierten Untereinheit befindet. Mit reaktiveren topographischen Sonden sollten auch weitere, zu anderen Untereinheiten gehörende Aminosäurereste markiert werden können.

Von den Sonden, die in Tabelle 7 aufgeführt sind (siehe auch Abschnitt 2.2 und 4), können nur zwei als topographische Sonden eingestuft werden: das Aryldiazoniumsalz DDF^[90, 106, 107] und das Diazirin TID^[49b, 52, 111]. Beide Verbindungen bilden hochreaktive Zwischenstufen und führen zur irreversiblen Markierung am nicotinischen Acetylcholinrezeptor in hohen Ausbeuten, wodurch die Identifizierung mehrerer Bindungsstellen möglich wird. Die entsprechenden Bindungsaffinitäten sind recht niedrig ($K_i = 200 \mu\text{M}$ für DDF an der Acetylcholinbindungsstelle^[90], $6.5 \mu\text{M}$ für TID an der nichtkompetitiven Bindungsstelle^[52]). Das bemerkenswerte Markierungsmuster, das man mit DDF an der α -Untereinheit des nicotinischen Acetyl-

cholinrezeptors erhält, kann durch die extreme Reaktivität des photochemisch gebildeten Aryl-Kations (Lebensdauer in Wasser $\leq 0.5 \text{ ns}$ ^[40]) und den idealen Ersatz der Ammoniumgruppe des Acetylcholins durch die geladene Diazoniumgruppe der photoreaktiven Sonde erklärt werden. Abbildung 5 zeigt eine Zusammenfassung der Markierungsergebnisse mit allen Verbindungen, die an der Acetylcholinbindungsstelle des nicotinischen Acetylcholinrezeptors getestet wurden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Effizienz von DDF als topographische Sonde.

Die erschöpfende Markierung von Membranprotein-Domänen mit hydrophoben Verbindungen kann man als Erweiterung der topographischen Markierung einer Bindungsstelle an der Lipid-Protein-Grenzfläche auffassen. Auch hier wurde ein herausragendes Ergebnis mit $[^{125}\text{I}]\text{TID}$ erzielt^[112]: 16 Aminosäurereste des M_3 -Transmembransegmentes des nicotinischen Acetylcholinrezeptors wurden identifiziert, was zu interessanten topographischen Analysen der Membrankonstituenten führte.

6. Ortsspezifische Markierung und ortsspezifische Mutagenese

Sowohl die ortsspezifische Markierung als auch die ortsspezifische Mutagenese wurden entwickelt, um funktionale Proteine – allerdings auf unterschiedliche Weise – zu untersuchen. Das wichtigste Ziel bei ortsspezifischen Markierungen ist, möglichst viele Informationen über die Struktur der Ligandenbindungsstelle zu erhalten, indem die Aminosäurereste der Bindungsstelle identifiziert werden. Wie in diesem Übersichtsartikel verdeutlicht wird, ist die topographische Markierung dafür am besten geeignet. Bei der ortsspezifischen Mutagenese werden die Aminosäurereste identifiziert, deren Mutationen die Funktion des biologischen Rezeptors verändern. Durch die Auswertung dieser Veränderungen der Funktion wird eine Struktur-Funktions-Beziehung erhalten. Bei ortsspezifischen Markierungen gehen die Funktionseigenschaften dagegen vollständig verloren. Die Analyse der durch Markierung identifizierten Aminosäuren durch Mutagenese ist eine sinnvolle Verbindung zwischen den beiden Methoden. Für die Anwendung der ortsspezifischen Mutagenese werden allerdings Informationen über die Struktur benötigt. Liegen Kristallstrukturdaten, besonders solche von Protein-Ligand-Komplexen vor, sind ideale Voraussetzungen für Mutagenese-Versuche gegeben. Eine andere Möglichkeit, Stellen zu identifizieren, die die Funktion des Proteins bestimmen, besteht darin, Sequenzübereinstimmungen innerhalb von Proteinfamilien zu finden^[158]. Das Ziel dieser Suche nach Sequenzübereinstimmungen ist es – abgesehen von evolutionsbiologischen Gesichtspunkten – die konservierten Regionen zu lokalisieren, die für die Funktion unverzichtbar sein könnten, und die hochkonservierten Aminosäurereste genauer zu identifizieren. Diese Methode ist besonders interessant geworden für die vor wenigen Jahren klonierten und sequenzierten Membranrezeptoren^[159], von denen Strukturbestimmungen mit ausreichender Auflösung noch nicht verfügbar sind. So wurden bereits viele Befunde durch ortsspezifische Mutagenese dieser Rezeptoren erhalten; weitere werden sicher hinzukommen^[160]. Allerdings ist aber auch klar, daß viele dieser Mutationen Funktionsänderungen hervorrufen, die nicht von einer direkten Änderung der Wechselwirkungen innerhalb der Bindungsstelle herrühren. Viele Bei-

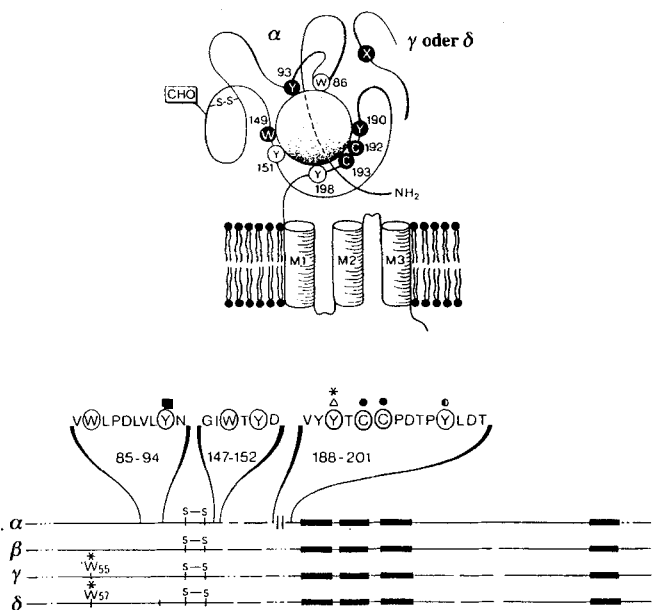


Abb. 5. Aminosäuremarkierung in der cholinergen Bindungsregion des nicotinischen Acetylcholinrezeptors von *Torpedo*^[157]: chemische Affinitätsmarkierung mit 4-(*N*-Maleimido)benzyltrimethylammonium(-iodid; MBTA) [154] (●), Lophotoxin [155] (Δ) und Acetylcholinylisothiocyanat [156] (■); Photoaffinitätsmarkierung mit DDF [90, 106, 107] (○), d-Tubocurarin [105] (*) und Nicotin [103] (◐).

spiele beziehen sich auf somatische Mutationen, die über weite Entfernungen Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften des Liganden haben, wie sich durch Kristallstrukturanalysen belegen ließ^[161–164]. Schließlich kann die Lipid-Protein-Grenzfläche, die eine wichtige Rolle bei der Regulation von allosterischen Übergängen von Membranrezeptoren spielen kann^[165, 166], nicht durch klassische Mutation untersucht werden, sondern nur durch eigens entwickelte photochemische Markierungsexperimente^[149a]. Kurz, beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile; im Idealfall wird man versuchen, Daten aus Mutagenesestudien mit biochemischen Techniken abzusichern und umgekehrt.

7. Die Zukunft der Photoaffinitätsmarkierung

7.1. Photoaffinitätsmarkierung von rekombinanten Rezeptoren

Die Photoaffinitätsmarkierung von rekombinanten Rezeptoren ist die ideale Methode, um Fragen zu beantworten, die in jüngster Zeit von Molekularbiologen gestellt worden sind. Besonders die Heterogenität vieler Rezeptoren auf molekularer Ebene wurde vor allem im Bereich der Neurobiologie durch Isolierung von Genen gezeigt, die viele Isoformen kodieren^[167]. Diese Heterogenität führt innerhalb eines Organs zu unterschiedlichen Rezeptor-Subtypen, die einen hohen Grad an Homologie aufweisen; die Komplexität nimmt weiter zu, wenn heterooligomere Rezeptoren berücksichtigt werden^[168, 169]. Mit rekombinanten Rezeptoren die in Zelllinien exprimiert werden, die diese Rezeptoren normalerweise nicht exprimieren, kann das Heterogenitätsproblem überwunden werden, indem die Zelllinien mit cDNAs transfiziert werden, die die gewünschten Rezeptor-Subtypen codieren. Die legitime Frage nach der physiologischen Bedeutung der so exprimierten Rezeptoren ist kein schwerwiegender Einwand gegen die Photoaffinitätsmarkierung, sofern die Funktionseigenschaften, vor allem die Liganden-Bindungseigenschaften, erhalten bleiben. Durch Photoaffinitätsmarkierungen solcher rekombinanter Rezeptoren^[170, 171] wurde zunächst die molekulare Identität mit dem nativen Rezeptor nachgewiesen und so die Bedeutung dieses biologischen Materials unterstrichen. Auch Photoaffinitätsmarkierungen von einigen rekombinanten *N*-Methyl-D-asparaginsäure-(NMDA)-Rezeptoren mit einem hochspezifischen [¹²⁵I]iodarylazido-NMDA-Antagonisten wurden beschrieben^[172]. Unterschiedliche Markierungsmuster, die durch Autoradiographie auf Natriumdodecylsulfat-Gelen bestimmt worden waren, ergaben sich entsprechend der Zusammensetzung aus den Untereinheiten; gleichzeitig wurde so auch der Wert der beschriebenen Methode für die Analyse von Struktur-Heterogenitäten verdeutlicht. Über die erfolgreiche Markierung eines klonierten purinergen Rezeptors wurde ebenfalls berichtet^[173] und dabei die Frage aufgeworfen, ob dieser Rezeptor spezifische Bindungsstellen für ATP und UTP aufweist.

Auf die Photoaffinitätsmarkierung rekombinanter Rezeptoren folgt die Identifizierung der Bindungsstellen auf den Polypeptidketten. Wie in Abschnitt 4 und 5 erwähnt, gelingt die Identifizierung der Aminosäuren am besten, wenn effiziente

Sonden (topographische Sonden) und gereinigte, in ausreichenden Mengen verfügbare Peptide eingesetzt werden. Dies erfordert ein effizientes Expressionssystem für den interessierenden rekombinanten Rezeptor. Insektenzellen, die mit Baculoviren infiziert wurden, sind für die Überexpression einiger Rezeptoren sehr gut geeignet^[174], und es besteht kein Zweifel, daß dieses und/oder andere leistungsstarke Expressionssysteme in Zukunft häufig verwendet werden.

7.2. Photoaffinitätsmarkierung und Signaltransduktionsmechanismen

Es gibt zwei grundsätzliche Typen von Rezeptoren bei der Signaltransduktion: intrazelluläre Rezeptoren, die nach ihrer Aktivierung durch den Effektor direkt mit der DNA wechselwirken und dadurch das genetische Programm der Zelle verändern, und membrangebundene Rezeptoren, die im allgemeinen an der Zelloberfläche durch die zugehörigen Hormone oder Neurotransmitter aktiviert werden und ihr Signal ins Innere der Zelle übermitteln. Die membrangebundenen Rezeptoren wurden in drei Hauptklassen und diese in mehrere Unterklassen eingeteilt^[152]. Typische Strukturmerkmale ausgewählter Rezeptoren der drei Hauptklassen sind in Abbildung 6 gezeigt: a) die ligandenstimulierten Tyrosin-Kinasen oder Guanylat-Cyclasen sind Monomere oder Dimere von Polypeptiden mit nur einer hydrophoben Domäne, b) die G-Protein-verknüpften Re-

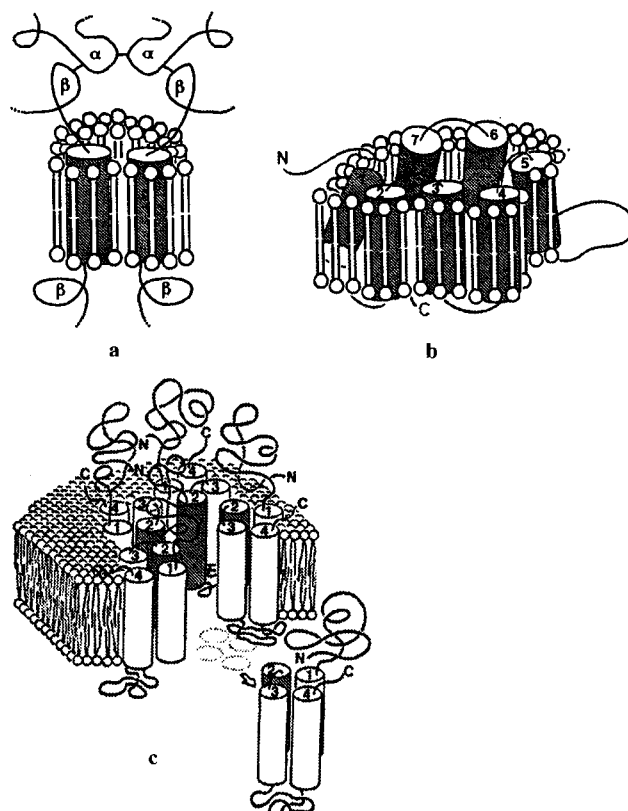


Abb. 6. Die drei Klassen membrangebundener Rezeptoren: a) Polypeptide mit nur einer hydrophoben Transmembran-Domäne (ligandenstimulierte Tyrosin-Kinasen und Guanylat-Cyclasen); b) Peptide mit sieben hydrophoben Transmembran-Domänen (G-Protein-verknüpfte Rezeptoren); c) Peptide mit vier hydrophoben Transmembran-Domänen (transmitterabhängige Ionenkanäle).

zeptoren bestehen aus einem Polypeptid, das typischerweise sieben hydrophobe Transmembran-Domänen aufweist, und c) die transmitterabhängigen Ionenkanäle, die (hetero)oligomere Komplexe bilden und bei denen vermutlich vier Transmembran-Helices in jeder Polypeptidkette die Membran durchspannen.

Wie kann nun die Photoaffinitätsmarkierung zur Untersuchung der Funktion solcher biologischer Rezeptoren eingesetzt werden? Wie bereits erwähnt, kann durch ortsspezifische Mutagenese der Aminosäuren, die durch die Markierung identifiziert worden sind und die an der Erkennung der Liganden unmittelbar beteiligt sind, direkt eine Struktur-Funktions-Beziehung aufgestellt werden. Solche Mutationen sollten je nach Art der Mutation unterschiedliche Veränderungen in den Eigenschaften der Ligandenbindung induzieren. Eine andere Möglichkeit, Strukturelemente und Funktionen zu korrelieren, besteht darin, mit Photoaffinitätssonden Rezeptorbindungsstellen in unterschiedlichen Konformationen zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, sind topographische Sonden dafür besonders geeignet. Mit dem cholinergen Antagonisten DDF wurden die Strukturveränderungen untersucht, die sich bei der Desensibilisierung des Acetylcholinrezeptors ergeben, indem man die markierten Aminosäurereste im ruhenden und im desensibilisierten Zustand des Rezeptors bestimmte^[175]. Analog wurden mit TID^[52] die kanalbildenden Regionen des nicotinischen Rezeptors von *Torpedo* im ruhenden und im desensibilisierten Zustand untersucht.

Die Umwandlung des ruhenden in den desensibilisierten Zustand verläuft über eine aktivierte Zwischenstufe, in der der Ionenkanal für eine kurze Zeit (≈ 10 ms) geöffnet bleibt. Dieser schnelle Signaltransduktionsprozeß^[176, 177], der durch die Bindung eines Agonisten ausgelöst wird, könnte analysiert werden, wenn die Zwischenstufe abgefangen werden könnte; dies erfordert allerdings darauf zugeschnittene Analysemethoden. Vor allem benötigt man schnelle Mischtechniken (Stopped-flow-Ausrüstung) und geeignete photochemische Verfahren (zeitabhängige Blitzphotolyse)^[178]. Für solche Experimente müssen lichtaktivierbare Agonisten entworfen und synthetisiert werden, die die photochemischen Eigenschaften einer topographischen Sonde haben, um sicherzustellen, daß die lichtinduzierten Kupplungen schneller sind als die Konformationsänderungen des Rezeptors. Durch die Analyse dieser zeitabhängigen Markierungsreaktionen am Rezeptor sollten die Strukturänderungen charakterisiert werden können, die bei einem physiologischen Prozeß ablaufen. Für den nicotinischen Acetylcholinrezeptor haben wir unterschiedliche photosensitive Agonisten entwickelt, mit denen wir die Konformationswechsel dieses heterooligomeren Rezeptors bei der Bindung des Agonisten verfolgen könnten^[179, 180]. Die Analyse kann auf makroskopischer Ebene durchgeführt werden, indem der gesamte Proteinkomplex mit einem Agonisten inkubiert wird, der einen entfernt liegenden photoaktivierbaren Rest trägt. Bei der lichtaktivierbaren Verbindung AC₅ (Abb. 7) ist beispielsweise die Ammoniumgruppe des Cholinrestes in einer gestreckten Konformation bis zu 14,5 Å von der lichtaktivierbaren Diazoniumgruppe entfernt. Der flexible Spacer verleiht diesem Liganden eine ausreichende Beweglichkeit, so daß alle Untereinheiten des pentameren Acetylcholinrezeptor-Komplexes erreicht werden können. Aufeinanderfolgende Übergänge des Rezeptorkomplexes vom Ruhezustand hin zum desensibilisierten Zustand wurden durch Untersuchung mit der

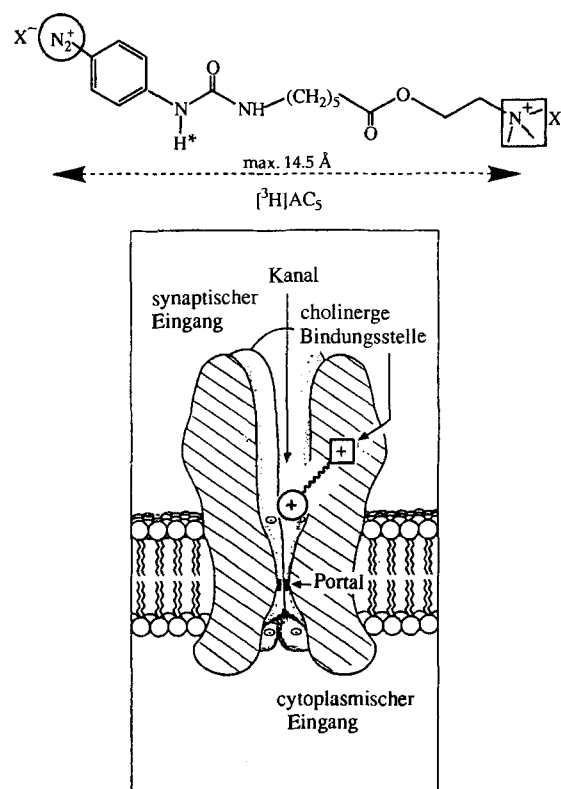


Abb. 7. Der lichtaktivierbare Agonist AC₅ sowie die hypothetische Position von AC₅ in der cholinergen Bindungsstelle des nicotinischen Acetylcholinrezeptors^[82].

radioaktiv markierten Sonde [³H]AC₅ veranschaulicht, indem die Radioaktivität, die unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (mit Blitzphotolyse nach einer Vorinkubationszeit von 30 ms und im Gleichgewicht) in die Untereinheiten des Rezeptors inkorporiert wurde, bestimmt wurde^[180] (Abb. 8). Bei einer ähnlichen Analyse auf molekularer Ebene würde man einen

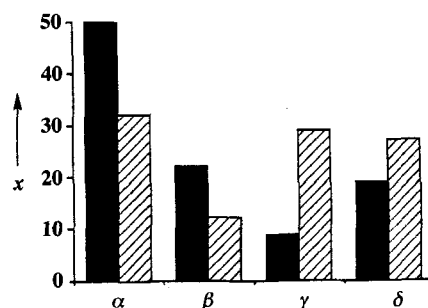


Abb. 8. Markierungsmuster einer Photoaffinitätsmarkierung mit [³H]AC₅ an allen vier Untereinheiten α–δ des nicotinischen Acetylcholinrezeptors in zwei Konformationszuständen, hauptsächlich im Ruhezustand (Vorinkubationszeit 30 ms) (▨) und im desensibilisierten Zustand (■)^[180]. x = Anteil an spezifisch eingebauter Radioaktivität.

lichtaktivierbaren Agonisten entsprechender Größe verwenden, um die Bindungsstelle des Agonisten direkt zu untersuchen. Dabei müssen im Anschluß an die Photolyse, die wiederum ein zeitlich kontrolliertes Mischen mit dem Agonisten und eine anschließende Blitzphotolyse umfaßt, die markierten Aminosäurereste identifiziert werden. Unseres Wissens ist eine solche Untersuchung bislang noch nicht durchgeführt worden. Durch eine solche Identifizierung der Aminosäurereste, die maßgeblich an

den Konformationsübergängen von Rezeptoren beteiligt sind, sind möglicherweise Informationen über die Struktur zugänglich, die für das Verständnis der Funktion von Rezeptoren entscheidend sind.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl die Photoaffinitätsmarkierung schon mehr als dreißig Jahre alt ist, ist sie eine nützliche und verlässliche Methode für Strukturuntersuchungen von Rezeptorbindungsstellen. Sie bleibt auch ein klassisches Forschungsgebiet für Chemiker, die neue photoaktivierbare Reagentien entwerfen und synthetisieren; diese werden dann von Biochemikern und Biologen verwendet, um damit Rezeptoren zu identifizieren und zu charakterisieren. Im vorliegenden Übersichtsartikel haben wir nicht versucht, einen Überblick über diese Aspekte zu geben oder den neuesten Stand der Forschung zu diesem Thema zu referieren; Bayleys Monographie^[5a] ist hier noch immer ein Standardwerk. Stattdessen richteten wir unser Augenmerk auf die Bedeutung der Identifizierung von Aminosäureresten an den Bindungsstellen des Zielrezeptors, um so zu einem tieferen Verständnis der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu gelangen. Wir haben eine aktualisierte Übersicht über die Aminosäurereste präsentiert, die bei unterschiedlichen biologischen Rezeptoren durch Photoaffinitätsmarkierung identifiziert wurden und wandten uns dabei hauptsächlich den photochemischen Sonden zu, durch die eine erschöpfende Markierung der Bindungsstellen möglich ist. Schließlich haben wir neue Perspektiven für die Photoaffinitätsmarkierung aufgezeigt; dabei macht besonders die Möglichkeit, Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen dynamisch zu untersuchen, die beschriebene Methode noch attraktiver und eröffnet ein neues Forschungsgebiet zur Untersuchung von schnellen physiologischen Vorgängen.

Die Photoaffinitätsmarkierung ist allerdings eine arbeitsintensive Methode, die mit der Synthese radioaktiv markierter Sonden beginnt und sich bis zur Sequenzierung der Rezeptor-Peptide erstreckt. Demgegenüber kann die ortsspezifische Mutagenese im allgemeinen schneller durchgeführt werden. Aus den durch die Mutagenese hervorgerufenen Änderungen der Funktion können viele Informationen erhalten werden. Ohne ausreichende Strukturdaten ist jedoch Vorsicht vor übereilten Deutungen solcher Ergebnisse in Richtung auf eine direkte Struktur-Funktions-Beziehung geboten. Die Photoaffinitätsmarkierung bleibt daher eine zuverlässige Methode, die man als Ergänzung und nicht als Konkurrenz zur ortsspezifischen Mutagenese verstehen sollte.

Wir möchten den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, die viele der hier beschriebenen Ergebnisse in den letzten zehn Jahren erarbeitet haben, sowie Dr. M. Hibert und Dr. B. Winsor für die kritische Durchsicht des Manuskripts herzlich danken.


Eingegangen am 9. März,
ergänzte Fassung am 1. Juli 1994 [A 54]
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [4] D. I. Schuster, W. C. Probst, G. K. Ehrlich, G. Singh, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 785–804.
- [5] a) H. Bayley in *Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology* (Hrsg.: T. S. Work, R. H. Burdon), Elsevier, Amsterdam, **1983**; b) in Lit.[5a], S. 32; c) in Lit.[5a], S. 15; d) in Lit.[5a], S. 107; e) in Lit.[5a], S. 116.
- [6] G. W. J. Fleet, R. R. Porter, J. R. Knowles, *Nature (London)* **1969**, *224*, 511–512.
- [7] J. R. Knowles, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 155–160.
- [8] Y.-Z. Li, J. P. Kirby, M. W. George, M. Poliakov, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8092–8098.
- [9] Übersichtsartikel: G. B. Schuster, M. S. Platz, *Adv. Photochem.* **1992**, *17*, 69–143.
- [10] N. Soundararajan, M. S. Platz, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2034–2044.
- [11] K. Kanakarajan, R. Goodrich, M. J. T. Young, S. Soundararajan, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6536–6541.
- [12] K. G. Pinney, K. E. Carlson, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2421–2431.
- [13] P. Mayinger, M. Klingenberg, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10536–10543.
- [14] Z. Xue, C. G. Miller, J.-M. Zhou, P. D. Boyer, *FEBS Lett.* **1987**, *223*, 391–394.
- [15] J. Garin, F. Boulay, J.-P. Issartel, F. Lunardi, P. V. Vignais, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4431–4437.
- [16] R. L. Cross, D. Cunningham, C. G. Miller, Z. Xue, J.-M. Zhou, P. D. Boyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5715–5719.
- [17] J. C. Grammer, H. Kuwayama, R. G. Yount, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5725–5732.
- [18] K. L. Knight, K. McEntee, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 10185–10191.
- [19] E. Winkler, M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 295–304.
- [20] M. T. Shoemaker, B. E. Haley, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1883–1890.
- [21] J. Bubis, J. J. Neitzel, L. D. Saraswat, S. S. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 9668–9673.
- [22] G. B. Schuster, *NATO ASI Ser. Ser. C*, **1989**, *272*, 31–41.
- [23] R. E. Banks, N. D. Venayak, T. A. Hamor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 900–901.
- [24] M. J. T. Young, M. S. Platz, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2199–2202.
- [25] M. J. T. Young, M. S. Platz, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6403–6406.
- [26] R. Poe, J. Grayzar, M. J. T. Young, E. Leyva, K. A. Schnapp, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3209–3211.
- [27] R. Poe, K. Schnapp, M. J. T. Young, J. Grayzar, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5054–5067.
- [28] J. W. F. Keana, S. X. Cai, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3640–3647.
- [29] M. Golinski, M. Heine, D. S. Watt, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1553–1556.
- [30] P. J. Crocker, N. Imai, K. Rajagopalan, M. A. Boggess, S. Kwiatkowski, L. D. Dwyer, T. C. Vanaman, D. S. Watt, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 419–424.
- [31] K. G. Pinney, J. A. Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3125–3133.
- [32] R. R. Drake, J. T. Slama, K. A. Wall, M. Abramova, C. D'Souza, A. D. El-bein, P. J. Crocker, D. S. Watt, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 69–73.
- [33] I. Kapfer, J. E. Hawkinson, J. E. Casida, M. P. Goeldner, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 133–140.
- [34] I. Kapfer, P. Jacques, H. Toubal, M. Goeldner, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 109–114.
- [35] K. A. Schnapp, R. Poe, E. Leyva, N. Soundararajan, M. S. Platz, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 172–177.
- [36] a) S. X. Cai, J. W. F. Keana, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5409–5412; b) S. X. Cai, D. J. Glenn, J. W. F. Keana, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1299–1304.
- [37] M. Golinski, M. Heine, D. J. Orlicky, T. A. Fitz, D. S. Watt, *Eicosanoids* **1992**, *5*, 87–97.
- [38] „Photochemistry of the diazonium and diazo groups“: W. Ando in *The chemistry of diazonium and diazo groups, Part 1* (Hrsg.: S. Patai), Wiley, Chichester, **1978**, S. 355.
- [39] H. B. Ambroz, T. J. Kemp, *Chem. Soc. Rev.* **1979**, *8*, 353–365.
- [40] J. C. Scaiano, K. T. Nguyen, *J. Photochem.* **1983**, *23*, 269–276.
- [41] R. W. Stumpe, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4891–4892.
- [42] R. Huisgen, W. D. Zahler, *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 736–746.
- [43] a) M. Speranza, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1983–1986; b) G. Angelini, C. Sparapani, M. Speranza, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 4865–4871.
- [44] B. Kieffer, M. Goeldner, C. Hirth, R. Aebersold, J.-Y. Chang, *FEBS Lett.* **1986**, *202*, 91–96.
- [45] B. Kieffer, M. P. Goeldner, C. G. Hirth, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 398–399.
- [46] R. A. G. Smith, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5072–5073.
- [47] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313–3318.
- [48] A. H. Ross, R. Radhakrishnan, R. J. Robson, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4152–4161.
- [49] a) J. Brunner, *Methods Enzymol.* **1989**, *172*, 628–687; b) *Trends Biochem. Sci.* **1981**, *44*–46.
- [50] M. Nassal, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7540–7545.
- [51] J. Brunner, G. Semenza, *Biochemistry* **1981**, *20*, 7174–7182.
- [52] B. H. White, J. B. Cohen, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 15770–15783.

[1] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3006–3008.
 [2] V. Chowdhry, F. H. Westheimer, *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 293–325.
 [3] H. Bayley, J. R. Knowles, *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 69–114.

- [53] N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, **1978**, S. 374.
- [54] G. E. Galaray, L. C. Craig, M. P. Printz, *Nature (London)* **1973**, *242*, 127–128.
- [55] R. Breslow, S. W. Baldwin, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 732–734.
- [56] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 170–177.
- [57] J. E. Baldwin, A. K. Bhatnagar, R. W. Harper, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1970**, 659–661.
- [58] R. E. Galaray, L. C. Craig, J. D. Jamieson, M. P. Printz, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3510–3518.
- [59] C. Hélène, *Photochem. Photobiol.* **1972**, *16*, 519–522.
- [60] a) H. G. Viehe, R. Merényi, L. Stella, Z. Janousek, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 982–997; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 917–932; b) H. G. Viehe, Z. Janousek, R. Merényi, L. Stella, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 148–154.
- [61] a) H. Birkhofer, J. Hädrich, H.-D. Beckhaus, C. Rüchardt, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 592–594; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 573–575; b) H. D. Beckhaus, C. Rüchardt, *ibid.*, **1987**, *26*, 770–771.
- [62] C. J. Easton, M. P. Hay, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 55–57.
- [63] V. A. Burgess, C. J. Easton, M. P. Hay, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1047–1052.
- [64] C. J. Easton, S. K. Eichinger, M. J. Pitt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1295–1296.
- [65] a) J. Sperling, D. Elad, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 967–971; b) *ibid.* **1971**, *93*, 3839–3842.
- [66] R. B. Johns, F. D. Looney, D. J. Whelan, *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, *147*, 369–380.
- [67] J. A. Kerr, *Chem. Rev.* **1966**, *66*, 465–500.
- [68] J. Lind, X. Shen, T. E. Eriksen, G. Merényi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 479–482.
- [69] a) G. D. D. Jones, J. S. Lea, M. C. R. Symon, F. A. Taiwo, *Nature (London)* **1987**, *330*, 772–773; b) P. M. Cullis, G. D. D. Jones, M. C. R. Symon, J. S. Lea, *ibid.* **1987**, *330*, 773–774.
- [70] F. G. Liming, W. Gordy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *60*, 795–806.
- [71] K. C. Smith, P. C. Hanawalt in *Molecular Biology-Inactivation and Recovery* (Hrsg.: B. Horecker, N. O. Kaplan, J. Marmur, H. A. Scheraga), Academic Press, New York, **1969**, S. 85.
- [72] A. E. Ruoho, H. Kiefer, P. E. Roeder, S. J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 2567–2571.
- [73] J. Shafer, P. Baronowsky, R. Laursen, F. Finn, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 421–427.
- [74] C. S. Hexter, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 3928–3933.
- [75] Y. Ishikawa, A. Menez, H. Hori, H. Yoshida, N. Tamiya, *Toxicol.* **1977**, *15*, 477–488.
- [76] V. Witzemann, D. Muchmore, M. A. Raftery, *Biochemistry* **1979**, *18*, 5511–5518.
- [77] F. Hucho, *FEBS Lett.* **1979**, *103*, 27–32.
- [78] N. M. Nathanson, Z. W. Hall, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 1698–1703.
- [79] B. Chatrenet, O. Tremeau, F. Bontems, M. P. Goeldner, C. G. Hirth, A. Ménez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3378–3382.
- [80] R. A. Myers, G. C. Zafaralla, W. R. Gray, J. Abbott, L. J. Cruz, B. M. Olivera, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9370–9377.
- [81] M. Hervé, L. Pillet, P. Humbert, O. Tremeau, F. Ducancel, C. Hirth, A. Ménez, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *208*, 125–131.
- [82] N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 1104–1124.
- [83] M. P. Goeldner, C. G. Hirth, B. Kieffer, G. Ourisson, *Trends Biochem. Sci.* **1982**, *7*, 310–312.
- [84] K. Bloch, *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 193–202.
- [85] P. Eid, M. P. Goeldner, C. G. Hirth, P. Jost, *Biochemistry* **1981**, *20*, 2251–2256.
- [86] L. Ehret-Sabatier, B. Kieffer, M. P. Goeldner, C. G. Hirth, *NATO ASI Ser. Ser. C*, **1989**, *272*, 107–122.
- [87] M. Goeldner, C. G. Hirth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 6439–6442.
- [88] M. P. Goeldner, C. G. Hirth, B. Rossi, G. Ponsio, M. Lazdunski, *Biochemistry* **1983**, *22*, 4685–4690.
- [89] F. Kotzyba-Hibert, J. Langenbuch-Cachat, A. Jaganathan, M. Goeldner, C. Hirth, *FEBS Lett.* **1985**, *198*, 297–301.
- [90] J. Langenbuch-Cachat, C. Bon, C. Mulle, M. Goeldner, C. Hirth, J.-P. Changeux, *Biochemistry* **1988**, *27*, 2337–2345.
- [91] B. Ilien, C. Hirth, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *183*, 331–337.
- [92] I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 155–159.
- [93] K. Moriyoshi, M. Masu, T. Ishii, R. Shigemoto, N. Mizuno, S. Nakanishi, *Nature (London)* **1991**, *354*, 31–37.
- [94] N. Nakayama, T. Yokota, K.-I. Arai, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, *3*, 497–505.
- [95] J. Fernandez, M. DeMott, D. Atherton, S. M. Mische, *Anal. Biochem.* **1992**, *201*, 255–264.
- [96] S. K.-F. Wong, C. Slaughter, A. E. Ruoho, E. M. Ross, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7925–7928.
- [97] G. B. Smith, R. W. Olsen, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20380–20387.
- [98] E. Kojro, P. Eich, G. Gimpl, F. Fahrenholz, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13537–13544.
- [99] T. E. Garabedian, R. G. Yount, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10126–10132.
- [100] T. E. Garabedian, R. G. Yount, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 22547–22553.
- [101] Y. Takata, M. Fujioka, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4369–4374.
- [102] B. D. Shivanna, M. R. Mejillano, T. D. Williams, R. H. Himes, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 127–132.
- [103] R. E. Middleton, J. B. Cohen, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6987–6997.
- [104] a) A. Schrattenholz, T. Coban, B. Schröder, K. O. Okonjo, J. Kuhlmann, E. F. Pereira, E. X. Albuquerque, A. Maelicke, *J. Recept. Res.* **1993**, *13*, 393–412; b) A. Schrattenholz, J. Godovac-Zimmermann, H.-J. Schäfer, E. X. Albuquerque, A. Maelicke, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216*, 671–677.
- [105] J. B. Cohen, M. P. Blanton, D. C. Chiara, S. D. Sharp, B. H. White, *Abstr. Pap. Soc. Neurosci.* **1993**, *19*, T003.
- [106] M. Dennis, J. Giraudat, F. Kotzyba-Hibert, M. Goeldner, C. Hirth, J. Y. Chang, C. Lazure, M. Chrétien, J.-P. Changeux, *Biochemistry* **1988**, *27*, 2346–2357.
- [107] J.-L. Galzi, F. Revah, D. Black, M. Goeldner, C. Hirth, J.-P. Changeux, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10430–10437.
- [108] F. Revah, J.-L. Galzi, J. Giraudat, P.-Y. Haumont, F. Lederer, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4675–4679.
- [109] J. Giraudat, M. Dennis, T. Heidmann, J.-Y. Chang, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2719–2723.
- [110] J. Giraudat, M. Dennis, T. Heidmann, P.-Y. Haumont, F. Lederer, J.-P. Changeux, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2410–2418.
- [111] M. P. Blanton, J. B. Cohen, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3738–3750.
- [112] M. P. Blanton, J. B. Cohen, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2859–2872.
- [113] R. L. Lundblad, C. M. Noyes, *Chemical Reagents for Protein Modification*, CRC, Boca Raton, FL, **1984**, S. 105.
- [114] R. F. Roberta in *Protein Function. A Practical Approach* (Hrsg.: T. E. Creighton), IRL, Oxford, **1989**, S. 77.
- [115] Y. Okamoto, R. G. Yount, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 1575–1579.
- [116] J. P. Whitelegge, P. Jewess, M. G. Pickering, C. Gerrish, P. Camilleri, J. R. Bowyer, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 1077–1084.
- [117] K. Yamazumi, R. F. Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 2893–2896.
- [118] J. Garin, L. Michel, A. Dupuis, J. P. Issartel, J. Lunardi, J. Hoppe, P. Vignais, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1442–1448.
- [119] M. Yamaguchi, S. Chen, Y. Hatefi, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4864–4868.
- [120] K. T. O'Neil, S. Erickson-Viitanen, W. F. DeGrado, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14571–14578.
- [121] D. G. Cole, R. G. Yount, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 22537–22546.
- [122] R. Mahmood, M. Elzinga, R. G. Yount, *Biochemistry* **1989**, *28*, 3989–3995.
- [123] K.-S. Huang, R. Radhakrishnan, H. Bayley, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13616–13623.
- [124] M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. Axelsen, I. Silman, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9031–9035.
- [125] B. A. Kerwin, R. G. Yount, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 328–336.
- [126] I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth in *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions* (Hrsg.: A. Shafferman, B. Velan), Plenum, New York, **1992**, S. 117.
- [127] A. R. Kerlavage, S. S. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8483–8488.
- [128] A. H. Ross, R. Radhakrishnan, R. J. Robson, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4152–4161.
- [129] A. Havron, J. Sperling, *Biochemistry* **1977**, *16*, 5631–5635.
- [130] a) C.-L. Hew, J. Lifter, M. Yoshioka, F. F. Richards, W. H. Konigsberg, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4669–4673; b) J. Lifter, C.-L. Hew, M. Yoshioka, F. F. Richards, W. H. Konigsberg, *ibid.* **1974**, *13*, 3567–3571.
- [131] F. Hucho, W. Oberthür, F. Lottspeich, *FEBS Lett.* **1986**, *205*, 137–142.
- [132] A. Karlin, *Harvey Lect.* **1991**, *85*, 71–107.
- [133] W. T. Miller, E. T. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5429–5433.
- [134] G. W. Fleet, J. R. Knowles, R. R. Porter, *Biochem. J.* **1972**, *128*, 499–508.
- [135] J. G. Lindemann, D. K. Woodard, M. E. Woehler, G. E. Chism, R. E. Lovins, *Immunochimistry* **1975**, *12*, 849–854.
- [136] L. E. Cannon, D. K. Woodard, M. E. Woehler, R. E. Lovins, *Immunology* **1974**, *26*, 1183–1194.
- [137] R. J. Vaughan, F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 217–218.
- [138] B. Kierdaszuk, S. Eriksson, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4952–4956.
- [139] A. Admon, G. G. Hammes, *Biochemistry* **1987**, *26*, 3193–3197.
- [140] J. Leszyk, J. H. Collins, *Biochemistry* **1987**, *26*, 7042–7047.
- [141] K. A. Cohen, J. Hopkins, R. H. Ingraham, C. Pargellis, J. C. Wu, D. E. H. Palladino, P. Kinkade, T. C. Warren, S. Rogers, J. Adams, P. R. Farina, P. M. Grob, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14670–14674.
- [142] H. Kim, B. Haley, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 142–147.
- [143] S. Chen, T. D. Lee, K. Legesse, J. E. Shively, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5391–5395.
- [144] P.-E. Strömstedt, A. Berkenstam, H. Jörnvall, J.-Å. Gustafsson, *J. Carlstedt-Duke, J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12973–12977.
- [145] S. Eriksson, B.-M. Sjöberg, H. Jörnvall, M. Carlquist, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1878–1882.

- [146] B. Shuster Gibbs, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1991**, 30, 6795–6802.
- [147] N. Cheng, B. M. Merrill, G. R. Painter, L. W. Frick, P. A. Furman, *Biochemistry* **1993**, 32, 7630–7634.
- [148] C. Grenot, A. de Montard, T. Blachère, M. R. de Ravel, E. Mappus, C. Y. Cuilleron, *Biochemistry* **1992**, 31, 7609–7621.
- [149] V. N. Pandey, K. R. Williams, K. L. Stone, M. J. Modak, *Biochemistry* **1987**, 26, 7744–7748.
- [150] H. Chuan, J. Lin, J. H. Wang, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 7981–7988.
- [151] M. Hearne, W. F. Benisek, *Biochemistry* **1985**, 24, 7511–7516.
- [152] E. A. Barnard, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 368–374.
- [153] F. Kotzyba-Hibert, A. Jaganathan, M. Goeldner, C. Hirth, in *Sigma and Phencyclidine Compounds as Molecular Probes in Biology* (Hrsg.: E. F. Domino, J.-M. Kamenka), NPP Books, Ann Arbor, **1988**, S. 223.
- [154] P. N. Kao, A. J. Dwork, R. R. J. Kadalny, M. L. Silver, J. Widemann, J. Stein, A. Karlin, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 11 662–11 665.
- [155] S. N. Abramson, Y. Li, P. Curver, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 12666–12672.
- [156] J. B. Cohen, S. D. Sharp, W. S. Liu, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 23354–23364.
- [157] J.-L. Galzi, J.-P. Changeux in *Membrane Proteins: Structures, Interactions and Models* (Hrsg.: A. Pullman et al.), Kluwer, Dordrecht, **1992**, S. 127.
- [158] M. Delarue, O. Poch, N. Tordo, D. Moras, P. Argos, *Protein Eng.* **1990**, 3, 461–467.
- [159] W. C. Probst, L. A. Snyder, D. I. Schuster, J. Borsius, S. C. Sealfon, *DNA Cell Biol.* **1992**, 11, 1–20.
- [160] T. M. Savarese, C. M. Fraser, *Biochem. J.* **1992**, 283, 1–19.
- [161] N. C. Chien, V. A. Roberts, A. M. Giusti, M. D. Scharff, E. D. Getzoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5532–5536.
- [162] T. B. Lavoie, W. N. Drohan, S. J. Smith-Gill, *J. Immunol.* **1992**, 148, 503–513.
- [163] J. Foote, G. Winter, *J. Mol. Biol.* **1992**, 224, 487–499.
- [164] G. Bucht, E. Artursson, B. Häggström, A. Osterman, K. Hjalmarsson in *Multidisciplinary approaches to cholinesterase functions* (Hrsg.: A. Shafferman, B. Velan), Plenum, New York, London, **1992**, pp 185–188.
- [165] T. M. Fong, M. G. McNamee, *Biochemistry* **1987**, 26, 3871–3880.
- [166] F. J. Barrantes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1989**, 24(5), 437–478.
- [167] N. L. Novere, A. Bessis, C. Léna, M. Piccioto, M. Zoli, *Médecine/Sciences* **1993**, 9, 41–49.
- [168] H. Lüddens, W. Wisden, *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, 12, 49–51.
- [169] D. R. Burt, G. L. Kamatchi, *FASEB J.* **1991**, 5, 2916–2923.
- [170] C. D. Ulrich, D. I. Pinon, E. M. Hadac, E. L. Holicky, A. Chang-Miller, L. K. Gates, L. J. Miller, *Gastroenterology* **1993**, 105, 1534–1543.
- [171] K. Touhara, K. A. Lerro, B. C. Bonning, B. D. Hammock, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1993**, 32, 2068–2075.
- [172] T. Marti, D. Benke, S. Mertens, R. Heckendorn, M. Pozza, H. Allgeier, C. Angst, D. Laurie, P. Seeburg, H. Möhler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 8434–8438.
- [173] L. Erb, K. D. Lustig, D. M. Sullivan, J. T. Turner, G. A. Weisman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10449–10453.
- [174] D. B. Carter, D. R. Thomsen, W. B. Im, D. J. Lennon, D. M. Ngo, W. Gale, H. K. Im, P. H. Seeburg, M. W. Smith, *BioTechnology* **1992**, 10, 679–681.
- [175] J.-L. Galzi, F. Revah, F. Bouet, A. Ménez, M. Goeldner, C. Hirth, J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 5051–5055.
- [176] H. Prinz, A. Maelicke, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 10273–10282.
- [177] T. Heidmann, J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 94, 255–279.
- [178] T. Heidmann, J.-P. Changeux, *Biochemistry* **1986**, 25, 6109–6113.
- [179] B. Chatrenet, F. Kotzyba-Hibert, C. Mulle, J.-P. Changeux, M. P. Goeldner, C. Hirth, *Mol. Pharmacol.* **1992**, 41, 1100–1106.
- [180] B. Chatrenet, *Etudes topographiques des sites agonistes du récepteur nicotinique de l'acétylcholine*, Dissertation, Université Louis Pasteur, Strasbourg, **1990**.
- [181] M.-J. Bouchet, A. Rendon, C. G. Wermuth, M. Goeldner, C. Hirth, *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 2222–2227.

 Weinheim, New York

 Akademie Verlag

 Ernst & Sohn

 ACADEMY GROUP LTD

 Verlag Helvetica Chimica Acta

SIEMENS, Publicis MCD Verlag

 Chemical Concepts

VCH Software

VCH PUBLISHING GROUP

Information available on Internet

www.vchgroup.de