

Versuche zur Anreicherung und Solubilisierung des muscarinischen Acetylcholinreceptors aus dem Nucleus caudatus vom Rind

Attempts to Enrich and to Solubilize the Muscarinic Acetylcholinereceptor from Bovine Caudate nucleus

Klaus-Peter Rueß, Manfred Liefländer und K. H. Herzog

Chemisches Institut der Universität Regensburg

Z. Naturforsch. **34 c**, 51–59 (1979); eingegangen am 28. September/20. November 1978

Acetylcholinesterase, Muscarinic-Acetylcholinreceptor, Na^+/K^+ -ATP-Posphohydrolase, Postsynaptic Membranes, Solubilization

Neuronal membranes of postsynaptic origin twofold enriched in acetylcholinesterase, muscarinic acetylcholinereceptor and (Na^+/K^+) -ATP-Phosphohydrolase, proteins associated with cholinergic nerve excitability, were prepared with yields between 60 and 75% from bovine caudate nucleus.

On subfractionation of these membranes an additional twofold enrichment of the mentioned proteins is achieved in different subfractions. SDS-gradient gel electrophoresis shows that these subfractions have slightly different polypeptide compositions.

Neuronal membranes of presynaptic origin on the other hand, prepared from purified synaptosomes, possess only small amounts of the mentioned proteins, showing no enrichment with respect to the homogenate.

Solubilization of acetylcholinesterase with 1 M NaCl as well as of muscarinic acetylcholinereceptor with 2 M NaCl does not succeed. These proteins are therefore not solely bound by ionic forces to the isolated membranes from bovine caudate nucleus.

Rezeptorproteine, die nicotinische und muscarinische Drogen binden, vermutet man allgemein als integrale Bestandteile der postsynaptischen Membran [1, 2]. Dementsprechend hat sich das atropinbindende, muscarinische Rezeptorprotein aus dem Gehirn von Säugetieren als sehr schwer zu solubilisieren erwiesen, was auf seine innige Verankerung in der Lipidmembran zurückgeführt wird [2, 3]. Durch die Einwirkung von Detergentien wird die Konformation des m-AChR offenbar so verändert, daß seine Bindungsfähigkeit für Atropin erlischt [4, 5].

Eigene Erfahrungen bei der Isolierung der AChE aus dem Nucleus caudatus vom Rind haben gezeigt, daß sich dieses Protein ebenfalls wie ein integrales Membranprotein verhält und nur mit Detergentien gut zu solubilisieren ist [6, 7].

Unter diesen Gesichtspunkten erscheint die beschriebene Solubilisierung des m-AChR mit 2 M NaCl aus den Gehirnen von Ratte [4, 5] und Rind [8] als sehr erstaunlich.

Abkürzungen: AChE, Acetylcholinesterase; m-AChR, muscarinischer Acetylcholinreceptor; (Na^+/K^+) -ATPase, (Na^+/K^+) -aktivierte, ouabainsensitive ATP-Phosphohydrolase; $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$, N-[2',3'- $^3\text{H}_2$]propyl-N-2-aziridinumäthylbenzilat.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Klaus-Peter Rueß, Chemisches Institut der Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, D-8400 Regensburg.

Der Bereich des Corpus striatum im Gehirn von Säugetieren ist besonders reich an Enzymen des cholinergen Reizübertragungssystems [9]. Es war deshalb die Aufgabe dieser Arbeit, eine neuronale Membranfraktion aus dem Nucleus caudatus vom Rind mit einer hohen Ausbeute an m-AChR bei gleichzeitig guter Anreicherung herzustellen. Diese in ihrer enzymatischen Zusammensetzung reproduzierbar herstellbaren Membranen können als Ausgangsmaterial für Versuche zur Solubilisierung dieses Proteins dienen.

Material und Methoden

Reagenzien, Aktivitätsbestimmungen und Enzymbestimmungen

Die verwendeten Puffersubstanzen vom Reinheitsgrad p. A. wurden von der Firma Merck, Atropin von der Firma Fluka, Ficoll (Charge 0092, Molekulargewicht ca. 400 000) von der Firma Pharmacia, Triton X 100 p. A. von der Firma Serva und Lubrol WX (von sauren Verunreinigungen durch Ionenaustauscherchromatographie befreit) von der Firma Sigma bezogen.

Als Markierungsreagenzien für den m-AChR wurde entweder $[^3\text{H}]\text{Atropin}$ (Amersham, spez. Akt. 201 mCi/mmol) oder das nach A. S. V. Burgen *et al.* [10] synthetisierte N-[2',3'- $^3\text{H}_2$]propyl-N-



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

2''-chloräthyl-2-aminoäthylbenzilat (Tritierung, Isotopenverdünnung und Kristallisation durch Isotopendienst West GmbH, 6072 Dreieich 1; spez. Akt. 4,4 Ci/mmol; Konzentration der Stammlösung in Alkohol $6,5 \times 10^{-3}$ M) verwendet. Letzteres wurde unmittelbar vor dem Test in Phosphatpuffer 10 mM, pH 7,6 bei einer Konzentration von 0,13 mM 1 Stunde zum irreversibel bindenden N-[2',3'- $^3\text{H}_2$]propyl-N-2-aziridiniumäthylbenzilat (^3H -PrBCM) cyclisiert [10]. Die Cyclisierungsreaktion wurde mit eiskaltem Phosphatpuffer durch Verdünnung 1 : 1000 auf eine Konzentration von $1,3 \times 10^{-7}$ M beendet.

Die Auszählung der Aktivitäten erfolgte im Packard Tricarb 3380 Szintillationszähler unter Verwendung der Cocktails Quickzint 212 (Zinsser) oder Rotiszint 22 (Searle). Die Aktivität wurde in dpm ausgedrückt, wobei Ausbeute und Quenchkorrektur nach einer Standardkurve Berücksichtigung fanden. Spezifische Bindungskapazitäten sind in pmol gebundenes [^3H]PrBCM (bzw. [^3H]Atropin) pro mg Protein angegeben.

Die enzymatischen Bestimmungen erfolgten wie in den angegebenen Literaturstellen beschrieben; 1 U entspricht immer der Spaltung von 1 μmol Substrat pro Minute; eventuelle Abweichungen sind in Klammern angegeben. Acetylcholinesterase [E.C. 3.1.1.7] nach *l.c.* [11] (0,45 mM Acetylthiocholin); $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -aktivierte ATP-Phosphohydrolase [E.C. 3.6.1.3] und (Na^+/K^+)-ATPase [E.C. 3.6.1.4] nach *l.c.* [12]) (1 U entspricht der Spaltung von 1 μmol ATP pro Stunde); L-Lactat-NAD-oxidoreduktase [E.C. 1.1.1.27] nach *l.c.* [13]; Succinat-Cytochrom C-oxidoreduktase [1.3.99.1] nach *l.c.* [13] (ohne Zusatz von Triton X 100, um geschlossene Partikel nicht zu zerstören). Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Lowry-Methode mit Rinderserumalbumin als Standard [14].

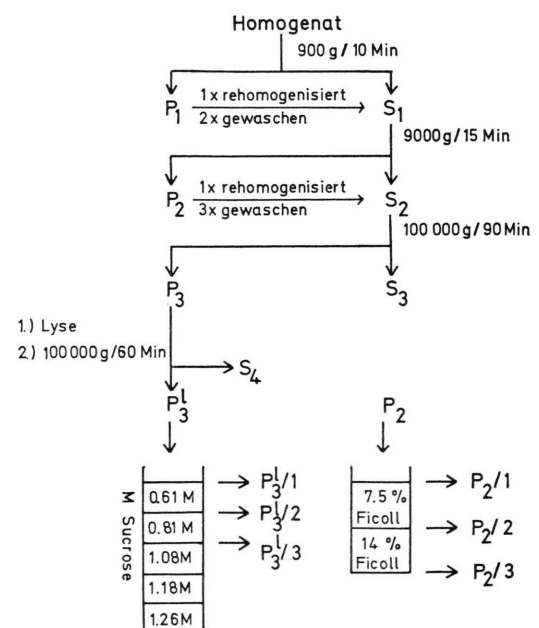
Zur Gleichgewichtsdialyse wurde die Gleichgewichtsdialyseapparatur DIANORM (Firma Bachhofer, 7410 Reutlingen 11) mit den Makrozellen Typ 2 (Arbeitsvolumen 2 ml pro Halbzelle) und Membranen aus regenerierter Cellulose (Spectrapor, Firma Bachhofer) verwendet.

Herstellung der neuronalen Membranen

Die Nuclei caudati vom Rind wurden ca. 15 Minuten nach der Schlachtung entnommen und bis zum Beginn der Verarbeitung ca. 1 Stunde in Eis aufbe-

wahrt. Aus 12,5 g nahezu ausschließlich grauer Substanz wurde durch einminütiges Homogenisieren (ca. 600 U/Min.) in einem Teflon-Glas-Homogenisator (Thomas C.; Wirkabstand 0,15–0,23 mm) ein 7,5proz. Homogenat in Tris-HCl-Puffer 5 mM, pH 7,4/0,32 M Sucrose hergestellt. Zentrifugation des Homogenates im Rotor SS 34 der Sorvall-Zentrifuge RC 2-B (vgl. Schema 1) lieferte den S_1 -Überstand und das P_1 -Pellet. P_1 wurde einmal mit 35 ml Homogenisierungspuffer rehomogenisiert (30 sec), zentrifugiert und zweimal ausgewaschen. Zentrifugation der vereinigten S_1 -Überstände (ca. 250 ml) lieferte den S_2 -Überstand und das rohe Mitochondrienpellet P_2 , das einmal rehomogenisiert und dreimal ausgewaschen wurde. Zentrifugation der vereinigten S_2 -Überstände (ca. 460 ml) im Rotor 30 der Beckman-Ultrazentrifuge L 2-65 lieferte den membranfreien S_3 -Überstand und das „mikrosomale“ P_3 -Pellet. Das P_3 -Pellet wurde bei einer Proteinkonzentration von 5–6 mg/ml in Tris-HCl-Puffer 5 mM pH 8,6 vier bis acht Stunden bei 4 °C lyso- und die neuronalen Membranen durch Zentrifugation bei $100\,000 \times g$ in 1 h zum P_3^1 -Pellet sedimentiert (Lysatüberstand als S_4 in Tab. I aufgeführt).

40–50 mg Protein der in Tris-HCl-Puffer 5 mM, pH 7,4 resuspendierten P_3^1 -Membranen wurden auf einem diskontinuierlichem Sucrosegradienten (4 ml 1,26 M, je 7 ml 1,18 M, 108 M, 0,81 M und 0,61 M



Sucrose in Tris-HCl-Puffer 5 mM, pH 7,4) durch Zentrifugation im SW 27 Beckman-Rotor bei 25 000 U/min, 2 Stunden ($52\,000 \times g_{\min}$; $113\,000 \times g_{\max}$) weiter aufgetrennt. Dabei wurden an den jeweiligen Grenzschichten fünf Fraktionen erhalten, von denen die drei obersten $P_3^{1/1}$ bis $P_3^{1/3}$ in Tab. I aufgeführt sind.

50 mg Protein des rohen Mitochondrienpellets P_2 wurden zur Herstellung von Synaptosomen auf einem diskontinuierlichem Ficollgradienten (je 16 ml 7,5% und 14% Ficoll in Tris-HCl-Puffer 5 mM, pH 7,4, 0,32 M Sucrose) im SW 27 Rotor bei 25 000 U/min, 90 min aufgetrennt. Die an der Grenzschicht 7,5/14% gesammelten Synaptosomen wurden wie für das P_3 -Pellet beschrieben lysiert und zur Gewinnung synaptosomaler Plasmamembranen auf einem analogen Sucrosegradienten weiter aufgetrennt.

Für einige Solubilisierungsexperimente diente auch eine Partikelfraktion $P_{2/3}$, die entsprechend ihrer Herstellung aus dem S_1 -Überstand durch Zentrifugation bei $100\,000 \times g$, 1 Stunde, als vereinigt P_2 - P_3 -Pellet anzusehen ist.

Test auf membrangebundenen muscarinischen Acetylcholinreceptor

4 ml der zu testenden Membranfraktion (Proteinkonzentration 0,2–0,4 mg/ml) wurden mit 4 ml 2×10^{-7} M Atropin in modifizierter Ringerlösung (Ca^{2+} -Ionenkonzentration 0,5 mM), eine zweite 4 ml Probe nur mit 4 ml modifizierter Ringerlösung versetzt. Beide Proben wurden 10 min bei 37 °C aufbewahrt, zu jeder 400 µl der ^3H -PrBCM-Reagenzlösung (Testendkonzentration $5,7 \times 10^{-9}$ M) zugefügt, 15 min bei 37 °C inkubiert und danach die Markierungsreaktion durch Zugabe von 8 ml 40 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 20 mM MgCl_2 in Ringerlösung abgestoppt. Von jeder der beiden Proben wurden je nach gewünschter Proteinmenge 2 ml bis 5 ml (jede Probe dreifach) über Milliporefilter Typ HAWP 02500 filtriert. Die Filter wurden siebenmal mit je 4 ml Ringerlösung ausgewaschen, verbrannt und die Aktivitäten mit Ausbeuten zwischen 31% und 35% ausgezählt.

Der Bindungstest mit dem reversibel bindenden ^3H Atropin wurde analog dem beschriebenen Test mit ^3H PrBCM ausgeführt (Testendkonzentration an ^3H Atropin $1,6 \times 10^{-8}$ M gegen 10^{-6} M kaltes Atropin).

Der atropinsensitive Bindungsteil ergab sich aus der Differenz der dpm-Werte der jeweiligen Proben mit und ohne kaltes Atropin.

Gleichgewichtsdialyse mit ^3H Atropin

Die Überprüfung von Solubilisaten auf atropin-insensitive Bindung von ^3H Atropin erfolgte durch Gleichgewichtsdialyse in Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,4 mit ^3H Atropin (Testendkonzentration $0,84 \times 10^{-7}$ M) bei Proteinkonzentrationen von 1,3 bis 1,5 mg/ml in Gegenwart von $0,84 \times 10^{-4}$ M Atropin und in Abwesenheit von Atropin.

Wie Vorversuche gezeigt hatten, war unter den vorliegenden Bedingungen das Gleichgewicht nach 3 Stunden erreicht und die Bindung von ^3H Atropin an die Membranen vernachlässigbar gering.

Je 1,5 ml der beiden Zellenhälften wurden mit Zählausbeuten zwischen 33 und 35% ausgezählt und die Differenz der dpm-Werte der beiden Zellenhälften bestimmt. Die atropinsensitive Bindung ergab sich als Differenz zwischen den so ermittelten dpm-Werten von zwei Zellen mit bzw. ohne kaltes Atropin (doppelte Differenzbildung).

Zur Überprüfung der Gleichgewichtsdialyseapparatur und der verwendeten Methode wurde die Bindung von ^3H Atropin an membrangebundenen Receptor mittels Gleichgewichtsdialyse wie oben beschrieben untersucht und die erhaltenen Werte mit den Werten aus dem Filtrationstest verglichen.

Versuche zur Solubilisierung des muscarinischen Acetylcholinreceptors

Verschiedene Membranfraktionen ($P_{2/3}$, P_3 , $P_3^{1/1}$ und $P_3^{1/2}$) wurden mit den Solubilisierungsmitteln zur gewünschten Endkonzentration verdünnt. Die Extraktionen mit den Detergentien Triton X 100 und Lubrol erfolgten mit Detergenzkonzentrationen zwischen 0,01% und 0,5%, bei Detergenz-Proteinverhältnissen zwischen 0,06 mg/mg Protein und 3 mg/mg Protein in ca. 2 Stunden bei 4 °C.

Das P_3 -Pellet wurde außerdem, in Analogie zur Solubilisierung der Acetylcholinesterase, aus dem Nucleus caudatus vom Rind nach S. L. Chan *et al.* [15] mit 1 mM EDTA, 0,32 M Sucrose 12 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. Bei der Extraktion mit 2 M NaCl wurde 3–12 Stunden bei 4 °C gerührt und dann weiter, wie in *l.c.* [8] beschrieben, verfahren.

Das extrahierte Membranmaterial wurde durch Zentrifugation bei $100\,000 \times g$, 2 Stunden im TI 60-Rotor (Beckman) abzentrifugiert.

Ergebnisse

Bindungstests

Nach Burgen *et al.* [16] liefert das irreversibel bindende Alkylierungsreagenz [^3H]PrBCM in Gegenwart und in Abwesenheit von 10^{-7} M Atropin einen atropinsensitiven Bindungsanteil, der repräsentativ ist für die Anzahl der Antagonistbindungsstellen des m-AChR. Der Bindungstest kann nur dann zuverlässig sein, wenn die verwendeten Filtrationsmembranen selbst keine atropinsensitive Bindung des jeweiligen Markierungsmittels hervorrufen und so die Anwesenheit von m-AChR vortäuschen.

Wie Blindversuche ohne Protein gezeigt haben, wird [^3H]Atropin bei einer Konzentration von $1,6 \times 10^{-8}\text{ M}$ unter den angewendeten Auswaschbedingungen an Milliporefilter nur sehr schwach gebunden (40–80 dpm pro Filter; 0,5–1% der aufgetragenen Menge). Bei Verwendung von [^3H]PrBCM wurden je nach Charge des Filters 2 bis 6% der aufgetragenen Aktivität festgehalten. Diese Mengen waren unabhängig davon, ob gleichzeitig Atropin im Test vorhanden war oder nicht.

Anders verhielt sich eine Membran aus reiner Nitrocellulose (Sartorius BA 85), die in *l.c.* [8] zum Bindungstest auf löslichen m-AChR verwendet wird. Sie wies eine ca. fünfmal stärkere Bindung für [^3H]PrBCM und eine um den Faktor 10 bis 50 stärkere Bindung von [^3H]Atropin auf. Letztere erwies sich dabei als deutlich abhängig von der Konzentration an [^3H]Atropin, von der Konzentration an Atropin und als sehr empfindlich gegenüber Änderungen von Menge und Ionenkonzentration des Auswaschpuffers. Auf diese Weise ergab sich eine quasi-atropinsensitive Bindung an die Membran, die das Vorhandensein wechselnder Mengen von m-AChR vortäuschen kann.

Unter Verwendung der für den Filtrationstest geeigneten Milliporefilter wurde der Bindungstest auf membrangebundenen m-AChR mit [^3H]PrBCM durch folgende Versuche abgesichert.

Wie Abb. 1 a zeigt, ist die atropinsensitive Bindung mit ansteigender Konzentration an [^3H]PrBCM sättigbar. Gleiches gilt unter den hier angewendeten Testbedingungen auch für die zeitabhängige Sättigung (Abb. 1 b). Da sich die atropinsensitive Bindung auch als proportional der eingesetzten Proteinmenge erweist (Abb. 1 c), kann der Test zur Verfolgung der Anreicherung des m-AChR bei der subcellulären Fraktionierung benutzt werden.

Keine atropinsensitive Bindung wurde erhalten bei ausschließlicher Gegenwart von löslichem Protein (z. B. S_3 -Überstand), nach der Hitzedenaturierung von Membranfraktionen und nach der Hydrolyse des Aziridiniumderivates [^3H]PrBCM.

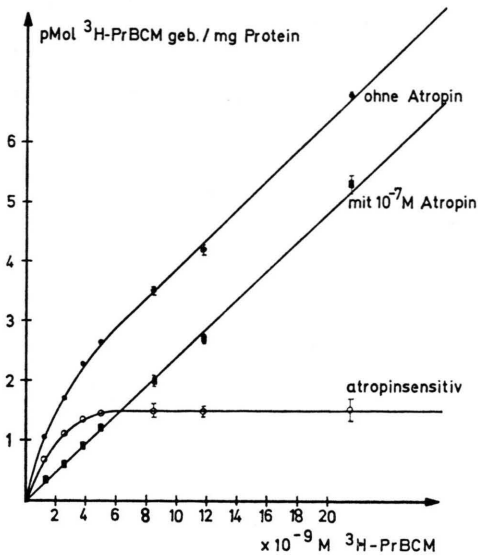
Verwendet man, wie in *l.c.* [4], an Stelle von [^3H]PrBCM das reversibel bindende ^3H -Atropin unter sonst identischen Testbedingungen als Markierungsmittel, so erhält man für die Receptorkonzentration um 30–50% niedrigere Werte. Zudem werden infolge der geringeren spezifischen Aktivität des [^3H]Atropins die Meßfehler deutlich größer.

Der membrangebundene m-AChR erwies sich als recht stabil. Eine $\text{P}_{2/3}$ -Fraktion hatte nach einer Woche Lagerung bei 4°C noch nichts an atropinsensitiver Bindungsfähigkeit eingebüßt. Dasselbe galt für die P_3^1 -Membranen und ihre Subfraktionen nach zweimonatiger Lagerung bei -20°C .

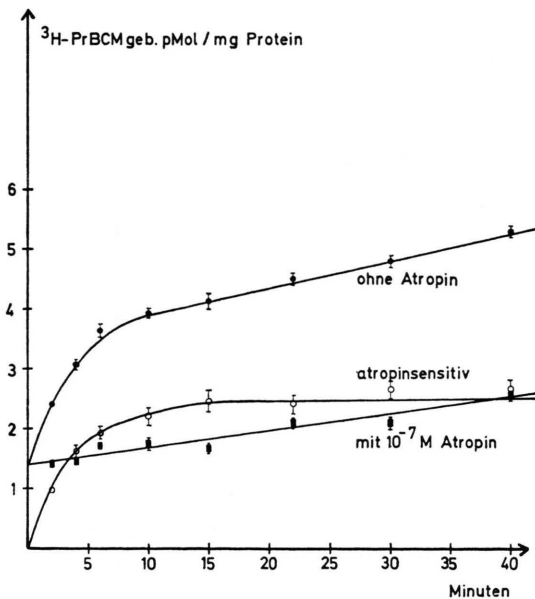
Der Nachweis von löslichem m-AChR unter Verwendung von [^3H]PrBCM durch anschließende Abtrennung des markierten Proteins entweder durch Filtration über DEAE-Cellulose-Filter oder durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat und anschließender Filtration über Milliporefilter erwies sich als unsicher, denn unter den vorliegenden Testbedingungen hielten DEAE-Filter 10–15%, Milliporefilter 25 bis 30% der aufgetragenen Aktivität unspezifisch zurück. Zur Prüfung der Extrakte auf atropinsensitive Bindung wurde deshalb die Methode der Gleichgewichtsdialyse herangezogen. Sie erwies sich bei der Bestimmung der atropinsensitiven Bindung an membrangebundenen Receptor mit [^3H]Atropin als brauchbar. Es wurden Werte gefunden, die mit den Werten der atropinsensitiven Bindung von [^3H]PrBCM im Filtrationstest übereinstimmten.

Subcelluläre Fraktionierung

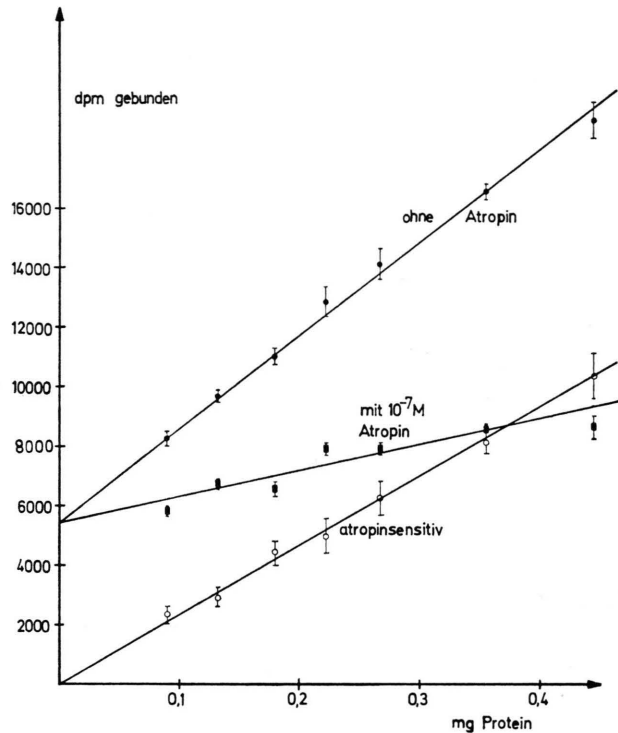
Enzymverteilung und Anreicherungsfaktoren sind in der Tab. I, die spezifischen Aktivitäten der für die cholinerge Reizleitung in Betracht kommenden Proteine in der Tab. II angegeben. Gebundene Lactatdehydrogenase, gemessen als Differenz zwischen freier Lactatdehydrogenase und in Anwesenheit von 1% Triton vorhandener Gesamt-Lactatdehydrogenase, wird als Leitenzym für Vesikel mit eingeschlossenem Cytoplasma angenommen. Wie die Werte in Tab. I zeigen, werden im P_2 -Pellet gegenüber dem Homogenat nur Succinatdehydrogenase stark, gebundene Lactatdehydrogenase und ($\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$)-abhängige ATP-Phosphohydrolase schwach angereichert. Die für die cholinerge Reizleitung mit-



a. Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$ an eine $\text{P}_{2/3}$ -Fraktion als Funktion der Konzentration von $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$.



b. Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$ $5,7 \times 10^{-9} \text{ M}$ an eine P_3 -Fraktion als Funktion der Zeit.



c. Bindung von $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$ $5,7 \times 10^{-9} \text{ M}$ an eine P_3 -Fraktion als Funktion des Proteingehaltes der Probe.

Abb. 1. Bindung von $[^3\text{H}]\text{PrBCM}$ an subcelluläre Fraktionen aus dem Nucleus caudatus vom Rind in Gegenwart von 10^{-7} M Atropin (—■—■—), in Abwesenheit von Atropin (—●—●—) und atropinsensitiv (—○—○—). Die Punkte repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus dreifachen Bestimmungen, die, wie im Text beschrieben, durchgeführt wurden. Die vertikalen Striche stellen die Standardabweichungen dar.

verantwortlichen Proteine sind in diesem Pellet nicht angereichert. Die Hauptmenge dieser Proteine findet sich im P_3 -Pellet ca. zweifach angereichert. Die in diesem Pellet vorhandenen Membranvesikel konnten durch Behandlung mit niederosmolarem Puffer bei einem schwach basischen pH [17] zu 60–80% lytiert werden. Nach der Sucrosedichtgradienten-

zentrifugation der nach der Lyse erhaltenen P_3^1 -Membranen waren die AChE in der $\text{P}_3^1/1$ -, der m-AChR in der $\text{P}_3^1/2$ - und die ATP-Phosphohydrolasen in der $\text{P}_3^1/3$ -Fraktion nochmals gegenüber P_3 zweifach angereichert, so daß sich im Hinblick auf das Homogenat insgesamt eine vier- bis fünffache Anreicherung ergab.

Tab. I. Prozentuale Verteilung ^a und Anreicherungs faktoren ^b RSA von Protein und Enzymen bei der subcellulären Fraktionierung eines Homogenates aus dem Nucleus caudatus vom Rind auf die primären Subfraktionen und auf die Subfraktionen des P₂- und des lysierten P₃-Pellets.

Fraktion	Protein %	AChE		m-AChR		Mg/Ca ATPase		Na/K ATPase		LDH geb.		SDH	
		%	RSA	%	RSA	%	RSA	%	RSA	%	RSA	%	RSA
P ₁	13	2	(0,15)	3	(0,23)	9	(0,7)	10	(0,77)	5	(0,4)	11	(0,85)
P ₂	29	12	(0,4)	20	(0,7)	46	(1,6)	29	(1,0)	35	(1,2)	80	(2,8)
P ₃	34	72	(2,1)	75	(2,2)	35	(1,0)	59	(1,7)	60	(1,8)	5	(0,15)
S ₃	22	14	(0,64)	0		0		0		0		0	
P ₂ /1 [0/7,5% Ficoll]	6	3	(0,5)	4,5	(0,75)	5	(0,9)	4,5	(0,8)	3,5	(0,6)	2,5	(0,43)
P ₂ /2 [7,5%/14% Fricoll]	6	2,5	(0,43)	3	(0,5)	11,5	(2,0)	6,5	(1,1)	11,5	(1,9)	24	(4,0)
P ₂ /3 [Pellet in 14% Ficoll]	15	4	(0,26)	8,5	(0,6)	23	(1,5)	12,5	(0,85)	15	(1,0)	48	(3,2)
S ₄ [Lysatüberstand]	20	9	(0,45)	—		—		—		—		—	
P ₃ ¹ /1 [0/0,61 M Sucrose]	12	28	(2,3)	18	(1,5)	11	(0,9)	7	(0,6)	—		—	
P ₃ ¹ /2 [0,61 M/0,8 M]	19	31	(1,6)	37	(2,0)	25	(1,3)	26	(1,4)	—		—	
P ₃ ¹ /3 [0,8 M/1,08 M]	27	23	(0,85)	26	(1,0)	44	(1,6)	55	(2,0)	—		—	
P ₃ ¹ /4 [1,08 M/1,26 M]	18	5	(0,3)	7	(0,4)	18	(1,0)	10	(0,55)	—		—	

^a Die angegebenen Prozentwerte sind Mittelwerte aus 4 (für die Subfraktionen von P₂ und P₃¹) bis 8 (für die primären Subfraktionen) Fraktionierungen und beziehen sich mit Ausnahme von S₄ und der Subfraktionen von P₃¹ auf das Homogenat gleich 100%; die Prozentwerte von S₄ und der Subfraktionen von P₃¹ beziehen sich auf P₃ gleich 100%.

^b Die Anreicherungs faktoren (angegeben als relative spezifische Aktivität RSA: %-Ausbeute an Enzym bzw. Receptor dividiert durch %-Ausbeute an Protein) sind in Klammern angegeben und geben mit Ausnahme von S₄ und den Subfraktionen von P₃¹ die Anreicherung bezogen auf das Homogenat wieder; die Anreicherungs faktoren bei S₄ und bei den Subfraktionen von P₃¹ geben die Anreicherung gegenüber der P₃-Fraktion wieder.

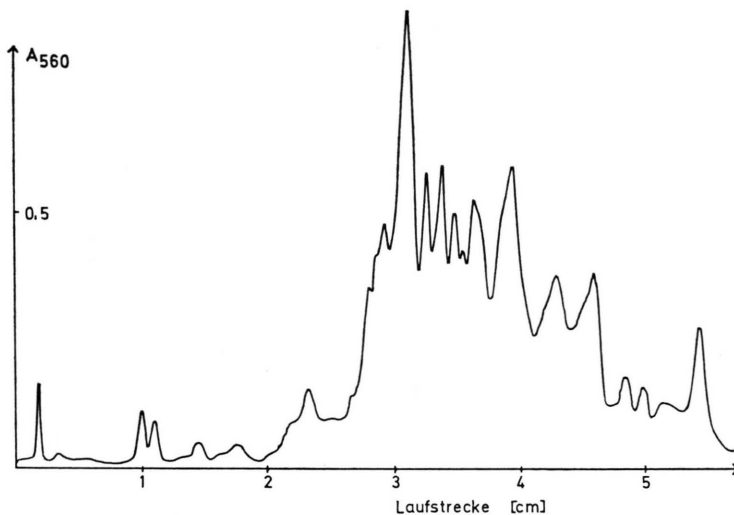
Die Membranen der P₃¹/1- und der P₃¹/2-Fraktion wurden nach Solubilisierung mit SDS unter reduktiven und unter nicht reduktiven Bedingungen auf einem SDS-haltigen linearen Polyacrylamidgradienten elektrophoretisch aufgetrennt [24]. Die dabei erzielten sehr guten Auftrennungen der in diesen Membranen vorhandenen Polypeptide sind in Abb. 2 wiedergegeben und vermitteln einen Eindruck von der Vielzahl der noch in den Membranen vorhandenen Proteine.

Zur Gewinnung von Synaptosomen wurde das P₂-Pellet auf einem Ficollgradienten aufgetrennt [17].

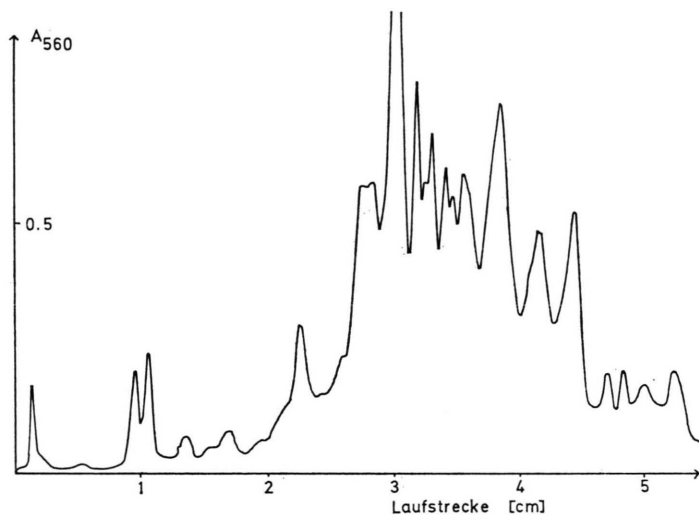
Gegenüber dem Homogenat trat für die AChE, den m-AChR und die Na⁺/K⁺-ATPase in der P₂/2-Synaptosomenfraktion keine, bzw. nur eine schwache Anreicherung ein; die Verluste an diesen Proteinen dagegen waren hoch. Auch nach der Lyse der P₂/2-Synaptosomen und nach Auftrennung der synaptosomalen Membranen auf einem Sucrosegradienten, wie für die P₃¹-Membranen beschrieben, ergaben sich in den einzelnen Fraktionen immer niedrigere spezifische Aktivitäten als bei den Membranen aus der P₃¹-Fraktion; dabei waren die Ausbeuten bezogen auf das Homogenat kaum noch nennenswert.

Fraktion	Acetylcholinesterase	muscarinischer Acetylcholinreceptor	Na/K-ATPase
	[μmol/min mg Prot.]	[pmol geb./mg Prot.]	[μmol/h mg Prot.]
H	0,40 ± 0,02	1,1 ± 0,1	5,1 ± 0,4
P ₂	0,16 ± 0,02	0,9 ± 0,1	4,7 ± 0,3
P ₃	0,84 ± 0,03	2,6 ± 0,2	8,7 ± 0,5
P ₂ /1	0,18 ± 0,02	0,8 ± 0,1	4,1 ± 0,3
P ₂ /2	0,22 ± 0,02	0,6 ± 0,1	5,6 ± 0,4
P ₃ ¹ /1	1,9 ± 0,1	3,9 ± 0,3	5,2 ± 0,4
P ₃ ¹ /2	1,35 ± 0,05	5,2 ± 0,4	11,8 ± 0,6
P ₃ ¹ /3	0,72 ± 0,03	2,7 ± 0,2	17,5 ± 1,2

Tab. II. Spezifische Aktivitäten von Acetylcholinesterase, Na⁺/K⁺-ATPase und spezifische, atropinsensitive [³H]PrBCM-Bindung an subcelluläre Hirnfraktionen aus dem Nucleus caudatus vom Rind (Mittelwerte aus 4 Versuchen).



a. $P_3^1/1$ -Fraktion solubilisiert mit 1% SDS und 1% Mercaptoäthanol;



b. $P_3^1/2$ -Fraktion solubilisiert mit 1% SDS und 1% Mercaptoäthanol.

Abb. 2. SDS-Polyacrylamidgradientengelelektrophorese (linearer Gradient 4% bis 28%; Gellänge 9 cm) von zwei P_3^1 -Subfraktionen. Aufgetragen jeweils 50 μ g Protein; Anfärbung mit Coomassie-Blau und densitometrische Auswertung bei 560 nm.

Versuche zur Solubilisierung des muscarinischen Acetylcholinreceptors und der Acetylcholinesterase

Bei keiner der angewandten Solubilisierungsmethoden konnte im Solubilisat eine atropinsensitive Bindung von [3 H]Atropin nachgewiesen werden. Membranen, die mit 2 M NaCl, mit EDTA/Sucrose oder mit Detergenzkonzentrationen von 0,01% behandelt worden waren, hatten dabei ihre atropinsensitive Bindungsfähigkeit völlig erhalten. Nach der Extraktion von Membranen mit Tritonkonzentrationen >0,05% oder mit Lubrolkonzentrationen >0,02% konnten maximal nur noch 10% der ursprünglich in den Membranen vorhandenen

atropinsensitiven Bindungsfähigkeit nachgewiesen werden. Mit 1-proz. Triton oder mit 0,1-proz. Lubrol behandelte Membranen hatten ihre atropinsensitive Bindungsfähigkeit völlig verloren.

Die in *l.c.* [4, 5] beschriebene Solubilisierung der AChE aus dem Gehirn der Ratte mit 1 M NaCl, gelingt bei den Membranen aus dem Nucleus caudatus vom Rind weder mit 1 M NaCl noch mit 2 M NaCl; aus verschiedenen Membranfraktionen konnten dabei nur 1–2% der Enzymaktivität extrahiert werden. Besser gelingt die Solubilisierung, wie in *l.c.* [15] beschrieben, im ionenfreien Medium mit EDTA/Sucrose; dabei wurden 15–20% an AChE-Aktivität aus P_3^1 -Membranen extrahiert. Wie bekannt [4], ge-

lingt die Solubilisierung mit Tritonkonzentrationen $>0,1\%$ mit Ausbeuten zwischen 90 und 100%.

Diskussion

Um subzelluläre Hirnfraktionen, die reich an muscarinischem oder nicotinischem Acetylcholinrezeptor sind, zu gewinnen, war es bisher üblich, vom rohen Mitochondrienpellet P_2 auszugehen [16, 18–21]. Bei der Herstellung dieses Pellets kommt es jedoch zu drastischen Verlusten sowohl an Rezeptorprotein als auch an AChE, die zum großen Teil erst im P_3 -Pellet sedimentieren. Zur Verringerung dieser Verluste wird häufig bei der Herstellung des P_2 -Pellets höhertourig zentrifugiert (bis zu $350 \times 10^3 \times g$ [18, 19, 21], obwohl nach Untersuchungen von Cotman *et al.* [22] Zentrifugationsbedingungen von $140 \times 10^3 \times g$ ausreichen sollten, um alle Mitochondrien und 80% der Synaptosomen im P_2 -Pellet zu sedimentieren.

Wenn es richtig ist, daß die Rezeptorproteine und auch die AChE Bestandteile der postsynaptischen Membran sind, erscheint es sinnvoll, diese Membranen von den präsynaptischen Bestandteilen (Synaptosomen) des P_2 -Pellets abzutrennen. Dieses gelingt, wie Tab. I zeigt, durch niedertouriges Zentrifugieren des S_1 -Überstandes, Rehomogenisieren und sorgfältiges Auswaschen des P_2 und auch des P_1 -Pellets. Dabei werden wahrscheinlich an den Synaptosomen verbliebene postsynaptische Membranfetzen abgeschert, die dann wegen ihrer relativ geringen Dichte ins P_3 -Pellet gelangen. Es kommt so zu den erwünschten Ausbeuten der an der cholinergen Reizleitung postsynaptisch beteiligten Proteine AChE, m-AChR und (Na^+/K^+) -ATPase in diesem Pellet. Im P_2 -Pellet verbleiben die an diesen Proteinen relativ armen präsynaptischen Bestandteile (Synaptosomen), aus denen sich auch nach Lyse und Auftrennung der präsynaptosomalen Membranen keine Fraktion gewinnen läßt, in der diese Proteine gegenüber dem Homogenat angereichert sind.

Im Gegensatz dazu gelingt bei der Auftrennung der aus dem P_3 -Pellet durch Lyse erhaltenen Membranen eine weitere leicht unterschiedliche Anreicherung dieser Proteine in Subfraktionen verschiedener Dichte. Die gegenüber dem Homogenat erzielte 3,5- bis 5fache Anreicherung ist unter Berücksichtigung der recht hohen Ausbeute zufriedenstellend, denn bei Proteinen aus neuronalen Membranen werden maxi-

mal Anreicherungsfaktoren von 5 bis 12 für möglich gehalten [17, 23].

Die hier gefundenen Anreicherungen liegen in der Größenordnung der in *l.c.* [1] gefundenen, für vermutlich an postsynaptische Membranen gebundene Rezeptoren, erhalten durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation eines nicht lysierten P_3 -Pellets aus dem Gehirn der Ratte. Die aus den in *l.c.* [5] angegebenen Werten berechnete ca. 50fache Anreicherung des m-AChR gegenüber dem Homogenat (Ratte), erscheint uns wesentlich zu hoch. Es ist nach unseren Erfahrungen nicht recht vorstellbar, daß durch eine einmalige Dichtegradientenzentrifugation eines nicht lysierten P_3 -Pellets wie dort angegeben eine 10fache Anreicherung zu erzielen ist.

Die ebenfalls in *l.c.* [5] angegebene atropinsensitive Bindungskapazität für $[^3H]$ Atropin im Rattenhirnhomogenat ist um den Faktor 6 geringer als die in *l.c.* [1, 21] ebenfalls fürs Rattenhirnhomogenat bestimmten Werte von ca. 1,1 pmol/mg. Letzterer liegt in der Größenordnung der hier von uns für das Rinder-Nucleus caudatus-Homogenat bestimmten atropinsensitiven Bindungskapazität von 1,1 pmol/mg $[^3H]$ PrBCM (bzw. $[^3H]$ Atropin)/mg Protein im Filtrationstest und im Gleichgewichtsdialysetest. Die Ergebnisse unserer Bindungstests werden durch die Anwesenheit der AChE nicht verfälscht, da dieses Enzym weder durch PrBCM noch durch Atropin bei den vorliegenden Konzentrationen gehemmt wird (der K_i -Wert für Atropin liegt bei $0,7 \times 10^{-3} M$ [24]).

Die in *l.c.* [8] beschriebenen Ergebnisse für den löslichen m-AChR erscheinen uns nach unseren Erfahrungen mit dem dort verwendeten, selbst stark Atropin bindenden Nitrocellulosefilter sehr fraglich, zumal die gemessenen Rezeptorkonzentrationen bis herab zu 1 pmol/mg wegen der nötigen Differenzbildung und der niedrigen spezifischen Aktivität des verwendeten $[^3H]$ Atropins an der unteren Grenze der Meßbarkeit liegen dürften.

Wie bekannt, gelingt die Solubilisierung der AChE und auch des nicotinischen AChR mit Detergentien aus dem Hirn von Säugetieren gut [6, 25, 26]. Der m-AChR dagegen verliert seine Bindungsfähigkeit schon bei relativ niedrigen Detergenzkonzentrationen völlig. Ob dieser Rezeptor dabei aus der Membran herausgelöst wird, oder ob er in der Membran durch die Detergentien so verändert wird, daß er seine Bindungsfähigkeit verliert, muß untersucht werden.

Eindeutig ist, daß weder die AChE noch der m-AChR durch hohe Salzkonzentrationen aus den Membranen des Rinder-Nucleus-caudatus extrahiert werden, wie es im Gegensatz dazu für Rattenhirn [5] und selbst für Cortexmaterial vom Rind [8] gefunden wurde. Der von uns angereicherte m-AChR und auch die AChE erweisen sich also als Proteine,

die nicht überwiegend durch ionische Kräfte an die Membranoberfläche gebunden werden.

Wir danken Herrn Karlheinz Berghausen für seine Mitarbeit sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung durch Sachbeihilfen.

- [1] A. de Blas u. A. R. Mahler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 24 (1976).
- [2] N. J. M. Birdsall u. E. C. Hulme, *J. Neurochem.* **27**, 7 (1976).
- [3] R. S. Aronstam, L. G. Abood u. J. Baumgold, *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1689 (1977).
- [4] T. Bartfai, J. Anner, M. Schultzberg u. J. Montelius, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 725 (1974).
- [5] P. Alberts u. T. Bartfai, *J. Biol. Chem.* **251**, 1543 (1976).
- [6] K.-P. Rueß, M. Weinert u. M. Liefänder, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**, 783 (1976).
- [7] K.-P. Rueß u. M. Liefänder, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**, 1543 (1977).
- [8] S. Carson, S. Godwin, J. Massoulie u. G. Kato, *Nature* **266**, 176 (1977).
- [9] C. R. Hiley u. A. S. V. Burgen, *J. Neurochem.* **22**, 159 (1974).
- [10] A. S. V. Burgen, C. R. Hiley u. J. M. Young, *British J. Pharmacol.* **50**, 145 (1974).
- [11] G. L. Ellmann, K. D. Courtney, V. Andres u. R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
- [12] M. A. Verity, *J. Neurochem.* **19**, 1305 (1972).
- [13] C. H. S. McIntosh u. D. T. Plummer, *J. Neurochem.* **27**, 449 (1976).
- [14] H. Stegemann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **319**, 64 (1960).
- [15] S. L. Chan, D. Y. Shirachi, H. N. Bhargava, E. Gardner u. A. J. Trevor, *J. Neurochem.* **19**, 2747 (1972).
- [16] A. S. V. Burgen, C. R. Hiley u. J. M. Young, *British J. Pharmacol.* **51**, 279 (1974).
- [17] C. W. Cotman u. D. A. Matthews, *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 380 (1971).
- [18] H. I. Yamamura u. S. H. Snyder, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 1725 (1974).
- [19] V. A. Eterovic u. E. L. Bennet, *Biochim. Biophys. Acta* **362**, 346 (1974).
- [20] P. M. Salvaterra, H. R. Mahler u. W. J. Moore, *J. Biol. Chem.* **250**, 6469 (1975).
- [21] T. Bartfai, P. Berg, M. Schultzberg u. E. Heilbronn, *Biochim. Biophys. Acta* **426**, 186 (1976).
- [22] C. W. Cotman, D. H. Brown, B. W. Harrel u. N. G. Anderson, *Arch. Biochem. Biophys.* **136**, 436 (1970).
- [23] I. G. Morgan, L. S. Wolfe, P. Mandel u. G. Gombos, *Biochem. Biophys. Acta* **241**, 737 (1971).
- [24] K.-P. Rueß, unveröffentlichte Versuche.
- [25] W. McChesney-Moore u. R. N. Brady, *Biochem. Biophys. Acta* **444**, 252 (1976).
- [26] C. McQuarrie, P. M. Salvaterra u. H. R. Mahler, *J. Biol. Chem.* **253**, 2743 (1978).