

Untersuchung von Proteinen – Acetylcholinesterase AChE

Lernziele

- Sie kennen die Protein Data Bank als Ort für Dateien von Biomolekül-Kristallstrukturen und wissen, wie man Eigenschaften eines Moleküls untersucht
- Sie können nachvollziehen, warum Sarin als irreversibler Inhibitor bei Acetylcholinesterase wirkt und deshalb extrem toxisch ist.

Wichtige Begriffe (Glossar)

Die folgenden Fachbegriffe sollten geläufig sein:

Axon ein oft langer, schlauchartiger Nervenzellfortsatz

Agonist (griechisch agonistís - der Tätige, Handelnde, Führende) Substanz (Ligand), die durch Besetzung eines Rezeptors die Signaltransduktion in der zugehörigen Zelle aktiviert. Ein Agonist kann sowohl eine körpereigene Substanz sein (zum Beispiel ein Hormon oder ein Neurotransmitter) als auch eine nicht-körpereigene Verbindung, die einen bestimmten Botenstoff in seiner Wirkung imitiert beziehungsweise ersetzt.

Antagonist Substanz, die einen agonistisch wirkenden Stoff in der Regel durch Blockierung seiner Bindungsstelle (des Rezeptors) in seiner Wirkung hemmt, ohne selbst einen Effekt auszulösen. Gemäss ihrer Wirkweise wird zwischen kompetitiven und nichtkompetitiven Antagonisten unterschieden. Kann der Antagonist durch eine höhere Agonistenkonzentrationen - entsprechend dem Massenwirkungsgesetz - wieder verdrängt werden, so spricht man von einem kompetitiven Antagonist. Ein nicht-kompetitiver Antagonismus kann vorliegen, wenn der Antagonist nicht an der Bindungsstelle des Agonisten an einem Rezeptor bindet, sondern an einer anderen „allosterischen“ Position. Antagonisten, die eine irreversible Bindung mit dem Rezeptor eingehen, wie etwa mit Alkylantien, führen ebenso zu einem nicht-kompetitiven Antagonismus.

Ganglion (Plural Ganglien) ist eine Anhäufung von Nervenzellkörpern im peripheren Nervensystem

Hormon Sammelbezeichnung für verschiedene biochemische Botenstoffe, die von spezialisierten Zellen produziert und abgegeben werden, um spezifische Wirkungen oder Regulationsfunktionen an den Zellen der Erfolgsorgane zu verrichten. Hormone wirken nur auf bestimmte Zielorgane. Nur dort finden sich spezielle Hormonrezeptoren, an welche die Hormonmoleküle binden. Häufig sind diese Rezeptoren Membranproteine, die auf der Zelloberfläche das Hormon binden und auf der Innenseite der Membran nach Hormonbindung Signale auslösen. Bekannte Vertreter sind etwa **Insulin** und **Adrenalin**.

Ionenkanäle sind porenbildende Transportmembranproteine, welche Ionen das Durchqueren von Biomembranen ermöglichen. Der Transport erfolgt dabei entlang des bestehenden elektrochemischen Gradienten. Dadurch unterscheiden sie sich von aktiven Transportproteinen wie den Ionenpumpen, die ihrerseits unter Energieverbrauch den Transport über Ionenkanäle ermöglichen.

Muscarinischer Acetylcholinrezeptor membranständige Rezeptoren, die im parasympathischen Nervensystem vorkommen und als Substrat den Neurotransmitter **Acetylcholin** (ACh) binden, aber auch durch **Muscarin** (Gift des Fliegenpilzes) aktiviert werden können.

Neurotransmitter sind endogene, biochemische Stoffe, welche die Information von einer Nervenzelle zur anderen über die Kontaktstelle der Nervenzellen, der Synapse, weitergeben. In die Synapse einlaufende elektrische Impulse (Aktionspotenziale) veranlassen die Ausschüttung der chemischen Botenstoffe aus ihren Speicherorten, den synaptischen Vesikeln. Das geschieht durch Exozytose, wobei durch die Fusion der Vesikelmembran mit der präsynaptischen Membran die Transmittermoleküle in den synaptischen Spalt gelangen und zu den Rezeptoren des nachgeschalteten postsynaptischen Neurons diffundieren. Die Neurotransmitter werden nach ihrer Ausschüttung auf verschiedene Weise deaktiviert und/oder abgebaut. Der wichtigste erregende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) ist **Glutamat**, und die wichtigsten hemmenden sind **Gamma-Aminobuttersäure** (GABA) und **Glycin**. Andere bekannte Neurotransmitter sind **Acetylcholin**, **Noradrenalin**, **Dopamin** und **Serotonin**.

Nicotinischer Acetylcholinrezeptor membranständige Rezeptoren in verschiedenen Bereichen des Nervensystems und der motorischen Endplatte, die als Substrat den Neurotransmitter **Acetylcholin** (ACh) binden, aber auch durch **Nikotin** aktiviert werden können.

Parasympathikus eine der drei Komponenten des vegetativen Nervensystems, das für die unwillkürliche, das heisst nicht dem Willen unterliegende, Steuerung der meisten inneren Organe und des Blutkreislaufs verantwortlich ist. Er

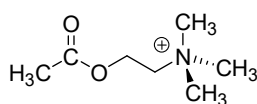
wird auch als „Ruhenerve“ bezeichnet, da er dem Stoffwechsel, der Regeneration und dem Aufbau körpereigener Reserven dient. Er sorgt für Ruhe, Erholung und Schonung. Die Überträgersubstanz (Neurotransmitter) des parasympathischen Nervensystems ist **Acetylcholin** (ACh).

Rezeptor spezialisierte Bindungsstellen für die Steuerung der Zellfunktion durch Wechselwirkung mit Botenstoffen. Rezeptoren sind Zellstrukturen, die durch die Bindung mit einem Liganden gemäss dem Schlüssel-Schloss-Prinzip einen Signalprozess auslösen, welcher wiederum einen bestimmten Effekt hervorruft. Man unterscheidet intrazelluläre (also im Cytoplasma oder Zellkern lokalisierte) und membranständige Rezeptoren.

Sympathikus Die meisten Organe werden vom Parasympathikus und dem enterischen Nervensystem (Darmnervensystem) gesteuert, die als Gegenspieler (antagonistisch) wirken und dadurch eine äusserst feine Regulation der Organtätigkeit ermöglichen. Der Sympathikus hat in diesem System eine ergotrope Wirkung, das heisst, er erhöht die nach aussen gerichtete Handlungsbereitschaft. Zielgewebe des Sympathikus sind vor allem die glatte Muskulatur der Blutgefässe und Drüsen. Wie die übrigen Anteile des vegetativen Nervensystems steuert der Sympathikus lebenswichtige Vorgänge. Diese Regulation erfolgt weitgehend ohne bewusste Wahrnehmung und kann kaum willentlich beeinflusst werden. Der Sympathikus bewirkt insgesamt eine Leistungssteigerung des Organismus (Ergotropie). Er versetzt den Körper in hohe Leistungsbereitschaft, bereitet ihn auf Angriff oder Flucht oder andere aussergewöhnliche Anstrengungen vor (Stressreaktion). Neurotransmitter des Sympathikus sind **Acetylcholin** und **Noradrenalin**.

Synaptischer Spalt schmaler Zwischenraum zwischen der Membranregion eines Axons einer Nervenzelle einerseits und der Membranregion einer nachgeschalteten Zelle andererseits

Acetylcholin und Acetylcholinesterase



Acetylcholin

Je nach Ort im Körper stehen dem in den synaptischen Spalt freigesetzten Acetylcholin zwei Rezeptor-Typen zur Verfügung.

Im zentralen Nervensystem und im Herzmuskel bindet Acetylcholin an Rezeptoren, welche enzymatische Reaktionen (G-Proteine, PhospholipaseC, Adenylatcyclase) in Gang setzen – diese Rezeptoren werden **muscarinische Rezeptoren** genannt, da dort **Muscarin** (Gift des Fliegenpilzes) als Agonist wirkt. Folge dieser enzymatischen Reaktionen ist meistens, dass K⁺-Ionenkanäle ganz geöffnet werden, was zu einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran führt.

An der motorischen Endplatte im Skelettmuskel bindet Acetylcholin an Rezeptoren, welche mit einem Na⁺-Ionenkanal verbunden sind – man spricht von **nicotinischen Rezeptoren**, da diese auch durch **Nicotin** aktiviert werden können. Substanzen, die an diese Rezeptoren binden, werden als nicotinerge klassifiziert. Bei der Bindung des Acetylcholins an diesen Rezeptor öffnet sich der Na⁺-Ionenkanal und Na⁺-Ionen strömen ein – dies führt zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran.

Rezeptor-Typ	Ort im Körper	Agonist	Antagonist
Muscarinischer ACh-Rezeptor: ein G-Protein gekoppelter Rezeptor	vom unteren Motoneuron des Parasympathikus innervierte Nerven	ACh Muscarin	Atropin
Nicotinischer ACh-Rezeptor: ein Ligand-gesteuerter Ionenkanal	Zellleib des unteren Motoneuron in Ganglien vom Sympathikus und Parasympathikus Motorische Endplatte	ACh Nicotin ACh Nicotin	Trimetaphan δ-Turbocurarin

Der folgende Abschnitt beschränkt sich im Wesentlichen auf Effekte am nicotinischen Rezeptor – die prinzipielle Wirkungsweise von Agonisten/Antagonisten sind jedoch auch auf andere Rezeptor-Typen übertragbar.

Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung durch Nervenzellen. Es ist an membranäre Glykolipide gebunden und wird in den synaptischen Spalt hinein ausgeschüttet. Dort ist es für den Abbau des cholinergen Transmitters Acetylcholin und damit für die Kontrolle der Reizweiterleitung zuständig. AChE wirkt dabei wie eine Art Staubsauger, der die ausgeschütteten Acetylcholinmoleküle aufnimmt, umwandelt und dadurch abbaut.

AChE findet sich hauptsächlich in der Nerven-Muskel-Synapse, in den autonomen Ganglien, dem Nebennierenmark und in den cholinergen Synapsen des Zentralnervensystems. Aber auch Drüsenaktivitäten der Haut, der Augen, des

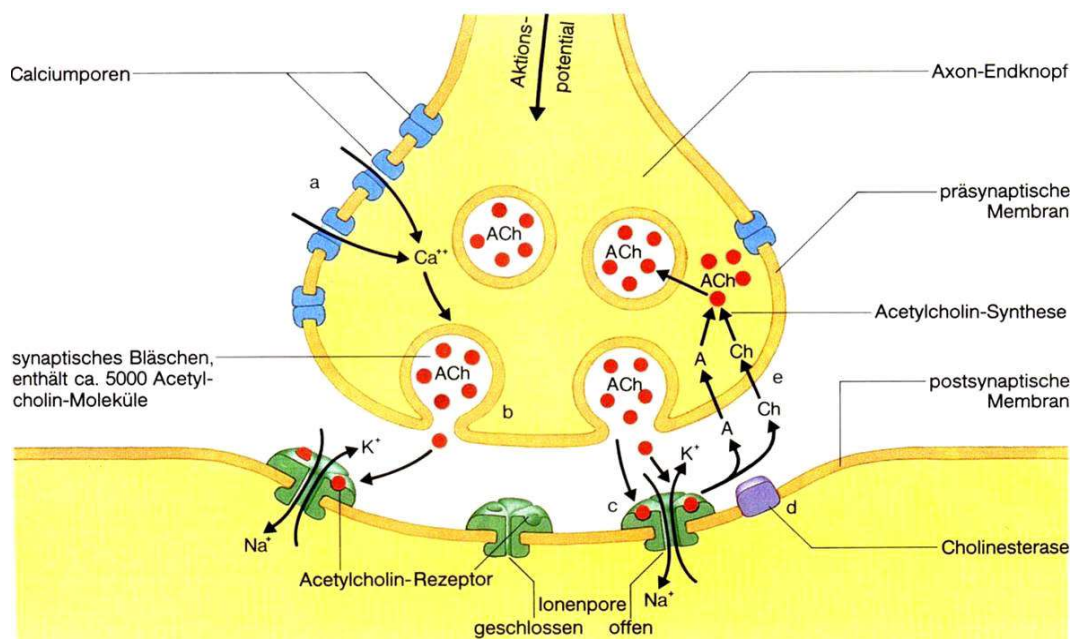
Verdauungstraktes und der Blase, sowie die Aktivität des Herzmuskels und der glatten und quergestreiften Muskulatur werden von der AChE beeinflusst.

Das Acetat und Cholin werden über eigene Rücktransport-Proteine in der präsynaptischen Membran wieder in das Axon-Endköpfchen aufgenommen. Das Acetat wird im normalen Zellstoffwechsel im Endköpfchen eingebaut und in den dort vorhandenen Mitochondrien unter Energieverbrauch enzymatisch zu Acetyl-CoenzymA umgewandelt. Im Endköpfchen wird das Cholin durch die Cholinacetyltransferase mit dem Cofaktor Acetyl-CoenzymA wieder acetyliert. Das dabei entstehende Acetylcholin wird durch ein Transportprotein durch die Vesikelmembran ins Vesikelinnere geschleust.

Die neuromuskuläre Übertragung der Erregung vom motorischen Nerv auf die Skelettmuskelfaser geschieht an der motorischen Endplatte. Der Nervenimpuls setzt Acetylcholin aus dem Nervenende frei, welches an die nicotinischen ACh-Rezeptoren der Endplatte bindet. Für eine Kanalöffnung müssen jeweils zwei ACh-Moleküle an den Rezeptor binden. Dies macht den Kanalöffnungsmechanismus unempfindlich gegen kleine Neurotransmitterkonzentrationen und hoch empfindlich für Konzentrationen, wie sie während der synaptischen Übertragung vorliegen.

Einfluss auf Acetylcholin und dessen Rezeptor

Wenn diese Bindungsstellen durch den Transmitter besetzt sind, ändert sich durch die Interaktion mit dem gebundenen Molekül die dreidimensionale Struktur und es öffnet sich eine Kanalpore, durch die Ionen durch die Zellmembran gelangen können. Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen strömen somit in die Zelle ein, K^+ -Ionen strömen (in wesentlich geringerer Menge) aus der Zelle hinaus. Durch die Ladungsverschiebungen entsteht ein Strom über die Zellmembran, den man entsprechend seiner Richtung (von aussen in die Zelle hinein) als Depolarisation der Zelle bezeichnet, da er die vorbestehende polare Ladungsverteilung an der Zellmembran (innen negativ, aussen positiv) vermindert und kurzzeitig sogar umkehren kann. Die erhöhte Konzentration an Calcium-Ionen führt schliesslich zu einer Kontraktion des betreffenden Muskels.



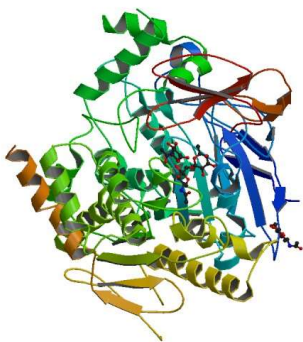
Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung diffundieren die ACh-Moleküle nach kurzer Zeit wieder von der Bindungsstelle ab und werden durch das Enzym Acetylcholinesterase zu Cholin und einem Acetylrest abgebaut. Dadurch schliesst sich der Rezeptor wieder.

Zahlreiche Medikamente sowie pflanzliche Alkaloide beeinflussen diesen Rezeptor. Muskelrelaxantien besetzen den Acetylcholin-Rezeptor, ohne allerdings ein Aktionspotential zu bewirken. In der Folge kommt es durch die ausbleibende Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen zu einer Erschlaffung der Muskulatur. Beispiele hierfür sind das Pfeilgift **Curare** (kompetitiv) und das Schlangengift **α -Bungarotoxin** (irreversibel). Den ACh-Rezeptor vom Neuronentyp kann man beispielsweise mittels **Hexamethonium** blockieren. Früher wurden solche Arzneistoffe als Ganglienblocker benutzt, heute sind sie wegen der zahlreichen Nebenwirkungen (Ausschalten des gesamten vegetativen Nervensystems) jedoch obsolet. **Nicotin** (das Gift des Tabaks), **Coniin** (das Gift des Schierlings) und **Cytisin** (das Gift des Goldregens) öffnen diesen neuronalen ACh-Rezeptor und sind wegen ihrer starken Wirkung auf das vegetative Nervensystem höchst toxisch (Herzstillstand, Atemlähmung). Das Gift **Botulinustoxin** verhindert eine Ausschüttung von Acetylcholin aus den

Nervengenden – der Tod tritt durch Lähmung der Atemmuskulatur ein. Die folgende Tabelle zeigt einige Wirkstoffe, welche auf das ACh/AChE-Rezeptor-System Einfluss nehmen können.

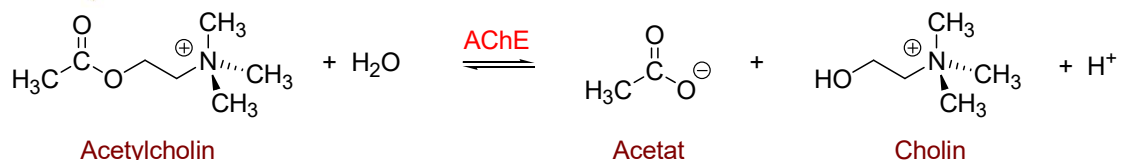
Wirkstoff	Typus	Wirkung	Gegenmittel
Curare	kompetitiver Antagonist am nicotinischen Rezeptor	ACh-Rezeptor-Blockade	AChE-Hemmer
α -Bungarotoxin (Giftnattern)	Irreversibler Antagonist am nicotinischen Rezeptor	ACh-Rezeptor-Blockade	Linderung der Symptome
Botulinustoxin		Hemmung ACh-Ausschüttung	
ω -Conotoxin (Kegelschnecke)	blockiert Ca^{2+} -Ionenkanäle in präsynaptischen Bereichen	Hemmung ACh-Ausschüttung	Linderung der Symptome AChE-Hemmer
α -Latrotoxin (Schwarze Witwe)	dauerhafte Öffnung der Ca^{2+} -Ionenkanäle	unkontrollierte, schlagartige Ausschüttung von Acetylcholin	Linderung der Symptome
Nicotin	Agonist	Absenkung des Aktionspotentials am Nerv	
Atropin	Kompetitiver Antagonist am Muscarin-Rezeptor	ACh-Rezeptor-Blockade	AChE-Hemmer Physostigmin
Organophosphate (E605, Sarin ...)		AChE-Hemmung	Atropin

Das Enzym Acetylcholinesterase



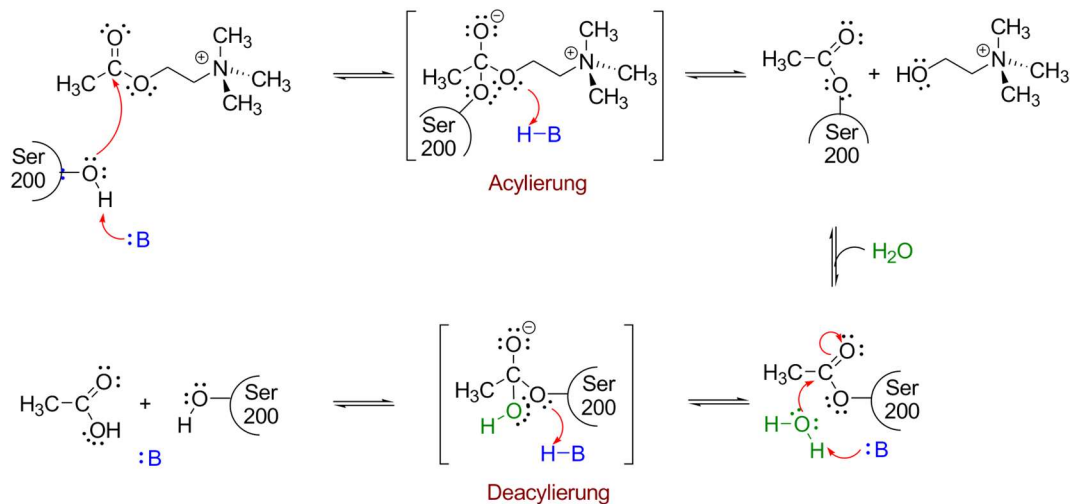
AChE hydrolysiert Acetylcholin zu Acetat und Cholin. Das Enzym ist sehr effizient, die Umsetzung von Acetylcholin erfolgt ausserordentlich schnell und ist weitgehend diffusionskontrolliert. Die katalytischen Fähigkeiten der AChE ermöglichen eine schnelle Weiterleitung der Aktionspotenziale der Nervenzelle.

Bei der durch AChE katalysierten Hydrolyse von Acetylcholin zu Acetat und Cholin handelt es sich um eine basenkatalysierte Esterspaltung. Während das Acetat über den postsynaptischen Spalt diffundiert, wird das Cholin durch die Nervenzelle wieder aufgenommen und erneut zu Acetylcholin umgebaut.



Die AChE ist etwa 400-mal grösser als ihr Substrat Acetylcholin. Das aktive Zentrum der AChE hat die Form einer tiefen Tasche. Um das Acetylcholin in diese Tasche zu leiten, wirkt das gesamte Enzymmolekül - und besonders die aromatischen Reste - wie eine Art Dipol und dirigiert durch die elektrostatischen Anziehungskräfte die Acetylcholin-Moleküle direkt in das aktive Zentrum. Die geladenen Gruppen wirken ausserdem stabilisierend auf den Enzym-Substrat-Komplex.

Bei Acetylcholinesterase handelt es sich um eine sogenannte Serinprotease. Damit wird ausgedrückt, dass die Aminosäure Serin im katalytischen Zentrum des Enzyms eine entscheidende Rolle spielt. In Serinproteasen wird die katalytische Triade aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin gebildet, deren Aminosäurereste über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind. Die drei Aminosäuren fungieren dabei als Säure, Base und Nukleophil.



Die Aminosäurereste der katalytischen Triade können in der Aminosäuresequenz weit auseinanderliegen und erst durch die Enzymfaltung, der Ausbildung einer komplexen dreidimensionalen Struktur, in räumliche Nähe gebracht werden.

Nervenkampfstoffe: Hemmung der Acetylcholinesterase

Acetylcholinesterase-Inhibitoren haben blockierende Wirkung auf das Enzym und werden entsprechend eingeteilt; sie blockieren entweder die Acyl-Bindungsstelle im Enzym, den Cholin-Bindungsort oder die peripher gelegene, anionische Stelle.

Ihre Wirkung entfalten sie nahezu sofort, sobald sie über Haut oder Atemwege aufgenommen worden sind. Ihren Namen haben sie erhalten, weil sie die Übertragung der Nervenimpulse im Nervensystem verhindern. Sie hemmen das Enzym Acetylcholinesterase und damit den Abbau des Botenstoffs Acetylcholin. Dadurch wird dessen Wirkung an den Schaltstellen extrem verstärkt und das Nervensystem gerät ausser Kontrolle.

Organische Phosphat-Verbindungen gehören zu den gängigsten Inhibitoren, die kovalent und irreversibel an die AChE binden. Es kommt dann zu einer ständigen Reizweiterleitung, da das Acetylcholin nicht mehr abgebaut wird. Diese Substanzen führen teilweise bereits in minimalen Mengen zu Lähmungen und zum Tod durch Ersticken. Zu den gefährlichsten irreversiblen Inhibitoren der AChE zählen **Diisopropylfluorophosphat (DIPF)**, Insektizide wie **Malathion** oder extrem toxische Nervengifte wie **Sarin** oder **Tabun**. Sie bilden sehr stabile Bindungen mit dem Enzym aus und blockieren es somit. Vom Kampfstoff **VX** ist bereits eine Menge von 10 mg über die Haut aufgenommenes Gift tödlich.

Typische Symptome bei einer leichten Nervengasvergiftung sind erhöhter Speichelfluss, eine laufende Nase und Druckgefühl im Brustbereich. Die Augenpupillen verengen sich, wodurch auch die Nahsichtigkeit eingeschränkt wird. Dies wird begleitet durch Kopfschmerz, Müdigkeit, Halluzinationen, Übelkeit und undeutlichem Sprechen. Bei höheren Dosen verstärken sich die Symptome, dazu kommen Atemprobleme, übermässiger Speichelfluss, starkes Schwitzen, Magenkrämpfe und Erbrechen. Ausserdem sind Muskelkrämpfe, Darm- und Blasenentleerung festzustellen. Bei noch höheren Dosen kann es sein, dass das Opfer nach anfänglichen Muskelkrämpfen sofort ohnmächtig wird.

Die durch Nervenkampfstoff verursachte Muskellähmung betrifft auch die Atmungsmuskulatur. Zusammen mit der Schädigung des ZNS führt dies zum Tod durch Ersticken. Gegenmassnahmen müssen innerhalb der ersten Minute durch Injektion des Nervengifts Atropin, das die Wirkung des im Übermass vorhandenen Acetylcholins hemmt, erfolgen. Eine nachfolgende Behandlung erfolgt mit verschiedenen Oximen, die das blockierte Enzym Acetylcholinesterase wieder reaktivieren und so den Abbau des Acetylcholins ermöglichen.

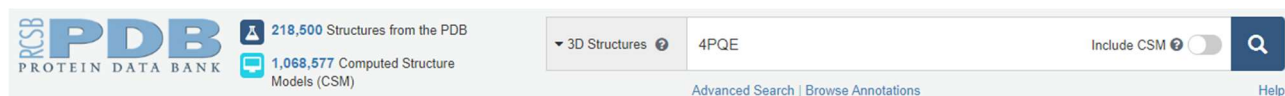
Proteinstrukturen sind in der Protein Data Bank der Royal Chemical Society kostenlos abrufbar. Die im Folgenden erklärte Vorgehensweise basiert auf Mol*, einem Werkzeug zur Betrachtung von Molekülstrukturen, welches standardmässig in der Protein Data Bank aktiviert ist. Das Programm kann auch getrennt unter www.molstar.org aufgerufen werden kann.

Im Zusammenhang mit Acetylcholinesterase bieten sich unter anderem die folgenden Strukturen an:

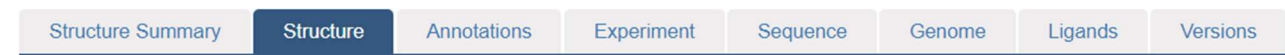
- 4PQE** Menschliche Acetylcholinesterase (ohne Substrat/Ligand)
- 7XN1** Menschliche Acetylcholinesterase mit Alzheimer-Medikament Tacrin
- 7E3H** Menschliche Acetylcholinesterase mit Alzheimer-Medikament Donepezil
- 5FPQ** Menschliche Acetylcholinesterase mit Nervengift Sarin

1.: Untersuchung des katalytischen Zentrums der Acetylcholinesterase

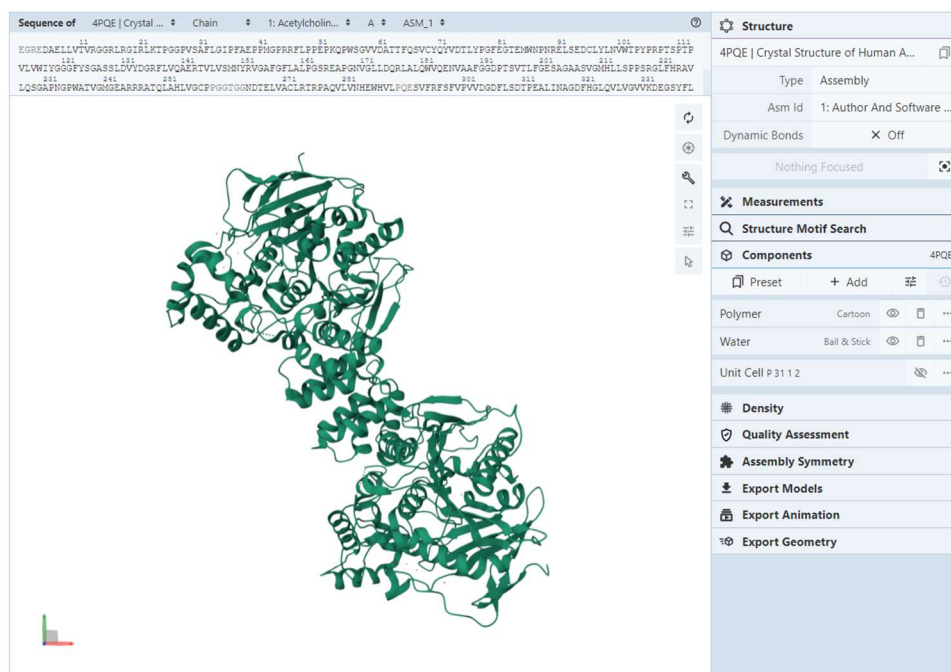
Rufen Sie über Ihren Browser die Seite www.rcsb.org auf, geben Sie dann bei **3D Structures** den Code für die gewünschte Kristallstruktur ein (in diesem Fall **4PQE**) und klicken Sie dann auf **Enter**.





Wählen Sie nun den Tab **Structure** aus – in der Folge erscheint die Struktur des Proteins in der sogenannten Cartoon-Darstellung.



Am oberen Rand des Fensters ist die Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, gezeigt. Wählt man hier eine Aminosäure (repräsentiert durch den Ein-Buchstaben-Code), so wird die entsprechende Stelle in der Cartoon-Darstellung hervorgehoben.



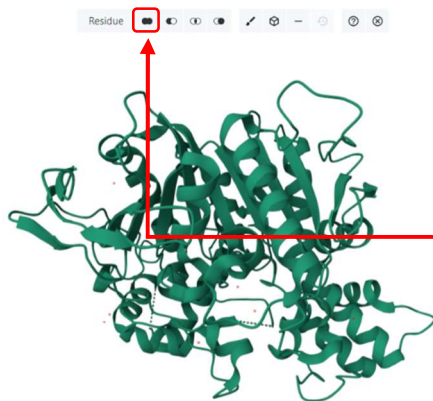
In Kristallstrukturen von Proteinen finden sich meist noch Wassermoleküle (als rote Punkte erkennbar). Diese stammen vom Lösungsmittel, aus welchem das Protein kristallisiert wurde und sind für die weiteren Untersuchungen nicht von Bedeutung sind. Unter **Components** sind die unterschiedlichen Bestandteile der Struktur aufgelistet. Durch Klicken auf das **Augen-**  beziehungsweise **Mülleimer-Symbol**  können diese ausgeblendet, beziehungsweise gelöscht werden. Für die weiteren Betrachtungen sind immer nur die Komponenten Polymer und Ligand von Bedeutung. Alle übrigen Bestandteile können ausgeblendet oder gelöscht werden.

Aufgabe 1a

Entfernen Sie alle überflüssigen Komponenten wie oben beschrieben, mit Ausnahme des Polymers und beschreiben Sie dann, welche Strukturelemente eines Proteins in der Struktur erkennbar sind und welche nicht.

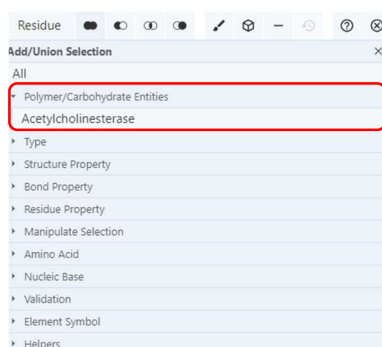
Erkennbare Strukturelemente	Nicht erkennbare Strukturelemente

Sie sollen sich nun mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms vertraut machen. Dieses besteht in dieser Struktur aus den drei Aminosäuren Ser203, Glu334 und His447.

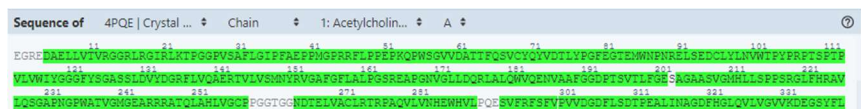


Wählen Sie zuerst das Pfeil-Icon aus. Daraufhin erscheint oberhalb der Struktur eine neue Menü-Leiste.

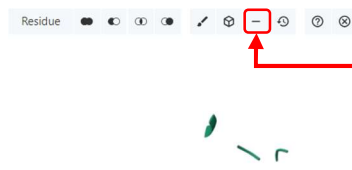
Wählen Sie hier den schwarzen Doppelkreis aus



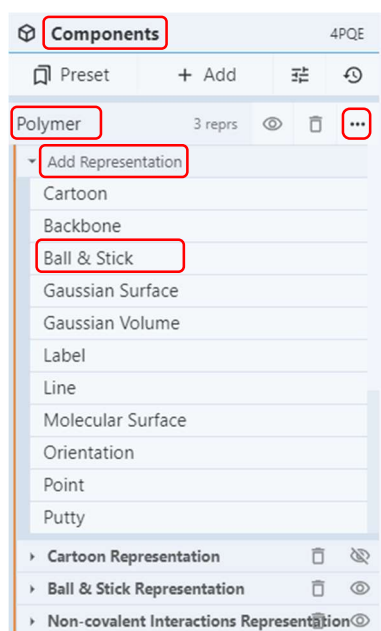
Im neu erschienen Fenster wählen Sie den Eintrag Polymer/Carbohydrate Entities aus, gefolgt vom Tab Acetylcholinesterase. In der Folge ist das gesamte Enzym grün markiert, ebenso alle Aminosäuren in der Aminosäuresequenz.



Wählen Sie nun in der Aminosäuresequenz die Aminosäuren Nummer 203 (Repräsentiert mit Buchstaben S), 334 (E) und 447 (H) aus – diese verlieren nun wieder ihre grüne Farbe. Gegebenenfalls müssen Sie Scrollen, um alle Aminosäuren zu sehen.



Klicken Sie nun in der oberen Menü-Leiste aus das Minus-Zeichen – es verschwindet nun alles, ausser den drei ausgewählten Aminosäuren in der Cartoon-Darstellung.

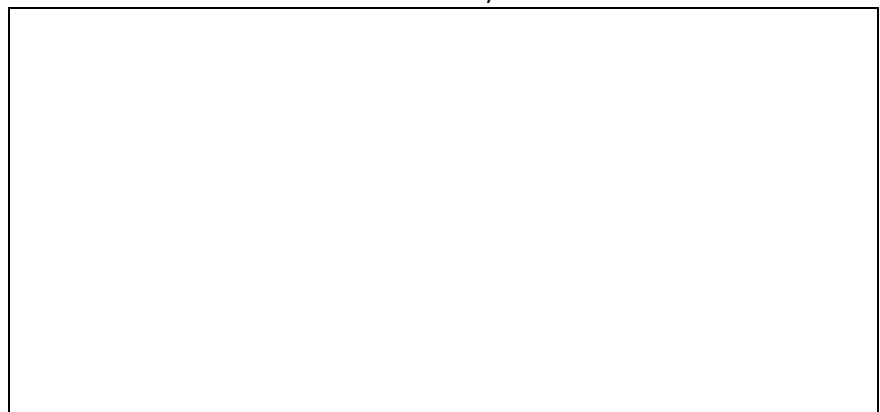


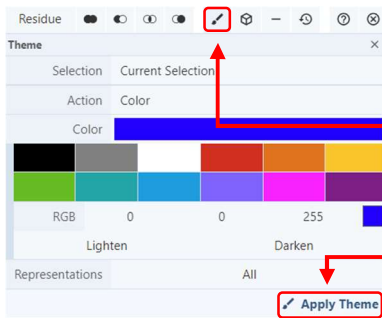
Wählen Sie nun bei Components beim Eintrag Polymer die drei Punkte ... aus und wählen Sie dann beim Tab Add Representation die Option Ball&Stick aus.

Scrollen Sie nun noch innerhalb dieses Fensters weiter nach unten und wählen Sie dann noch den Eintrag Non-covalent Interactions aus – damit werden die Wasserstoffbrücken zwischen den drei Aminosäuren angezeigt.

Aufgabe 1b

Erstellen Sie nun einen Screenshot des katalytischen Zentrums.

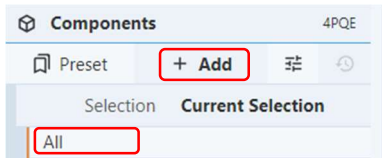




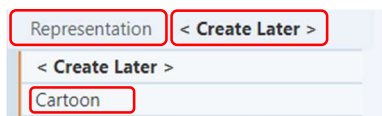
Abschliessend sollen Sie sich ein Bild davon machen, wo sich das katalytische Zentrum im Molekül befindet. Klicken Sie hierzu nacheinander auf die drei Aminosäuren – diese sollten nun grün hervorgehoben sein.

Wählen Sie dann aus der Menüleiste das **Pinsel-Symbol** und dann die Farbe **Magenta**.

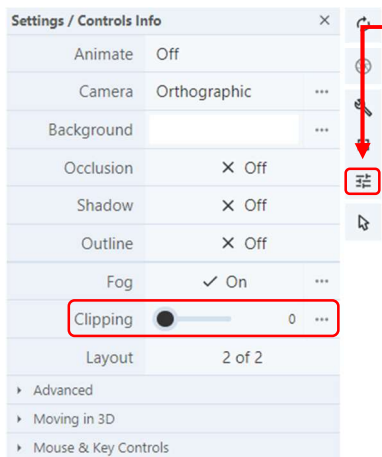
Klicken Sie auf **Apply Theme**, um Ihre Auswahl zu bestätigen – die drei Moleküle sollten nun Magenta gefärbt sein.



Wählen Sie nun bei **Components** den Tab **+ Add** aus und wählen Sie dann bei **Current Selection** den Eintrag **All**.



Wählen Sie nun bei **Representation** unter **<Create Later>** den Eintrag **Cartoon** aus und quittieren Sie Ihre Auswahl, indem Sie abschliessen auf **+Add Component** klicken.

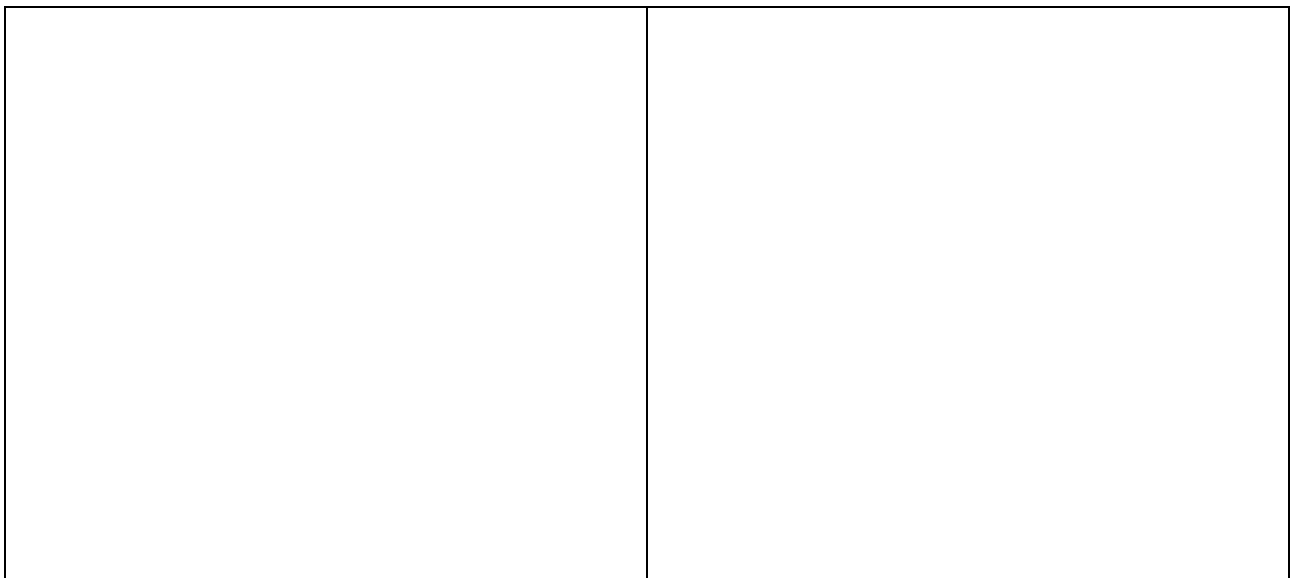


Möglicherweise erscheint das Enzym nun unvollständig. Um dies zu beheben klicken Sie auf das Icon mit den **Schiebereglern**

Verschieben dann im erscheinenden Fenster den Regler bei **Clipping** auf 0 – es sollte nun das gesamte Enzym mit dem hervorgehobenen katalytischen Zentrum sichtbar sein.

Aufgabe 1c

Erstellen Sie nun einen Screenshot des katalytischen Zentrums. Wählt man dann als Darstellung für **All** anstatt Cartoon die Option **Molecular Surface**, so kann man – je nach Orientierung des Enzyms - erkennen, dass es einen Kanal gibt, welcher zum katalytischen Zentrum hinführt. Versuchen Sie diesen zu finden und machen Sie auch hiervon einen Screenshot.



2.: Untersuchung des Tacrin-Enzym-Komplexes

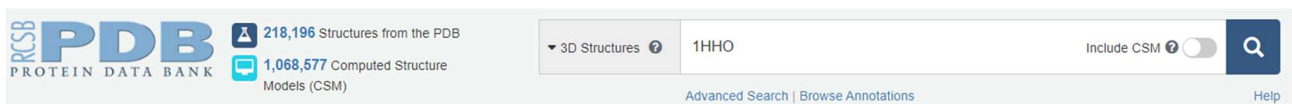
Tacrin ist ein reversibler Hemmstoff der Acetylcholinesterase und wurde in den USA als erste Substanz dieser Gruppe zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit zugelassen (Handelsnamen: *Cognex*; *Romotal*). Der Wirkstoff führt dabei zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungen.

Aufgabe 2a

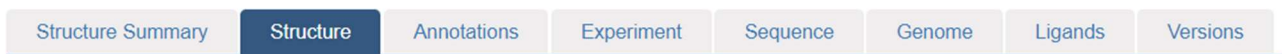
Recherchieren Sie die Molekülstruktur des Alzheimer-Medikaments **Tacrin** und zeichnen Sie das Molekül in der Skelettdarstellung



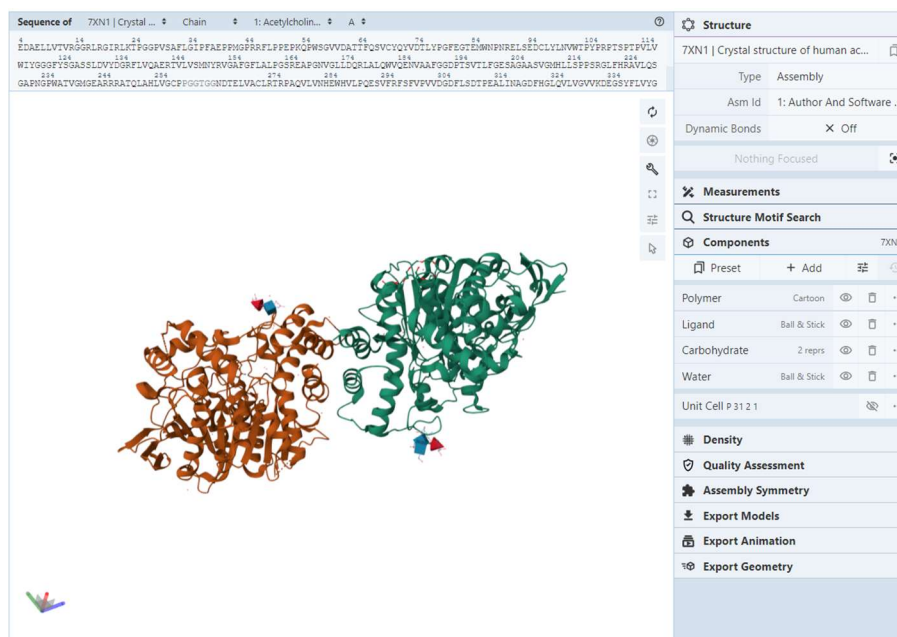
Rufen Sie über Ihren Browser die Seite www.rcsb.org auf, geben Sie dann bei **3D Structures** den Code für die gewünschte Kristallstruktur ein (in diesem Fall **7XN1**) und klicken Sie dann auf **Enter**.





Wählen Sie nun den Tab **Structure** aus – in der Folge erscheint die Struktur des Proteins in der sogenannten Cartoon-Darstellung.



Am oberen Rand des Fensters ist die Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, gezeigt. Wählt man hier eine Aminosäure (repräsentiert durch den Ein-Buchstaben-Code), so wird die entsprechende Stelle in der Cartoon-Darstellung hervorgehoben.




In Kristallstrukturen von Proteinen finden sich meist noch Wassermoleküle (als rote Punkte erkennbar). Diese stammen vom Lösungsmittel, aus welchem das Protein kristallisiert wurde und sind für die weiteren Untersuchungen nicht von Bedeutung. Unter **Components** sind die unterschiedlichen Bestandteile der Struktur aufgelistet. Durch Klicken auf das **Augen-**  beziehungsweise **Mülleimer-Symbol**  können diese ausgeblendet, beziehungsweise gelöscht werden.

Sie sollen sich nun mit der Wechselwirkung zwischen Ligand und Enzym beschäftigen.

Blenden Sie nun im **Components**-Fenster **Polymer**, **Water** und **Carbohydrate** aus, indem Sie jeweils auf das Auge-Symbol klicken – es sollten nun nur noch zwei **Tacrin**-Moleküle sichtbar sein, ausserdem ein kettförmiges Molekül, welches vermutlich ein für die Kristallisation verwendetes Lösungsmittel ist.

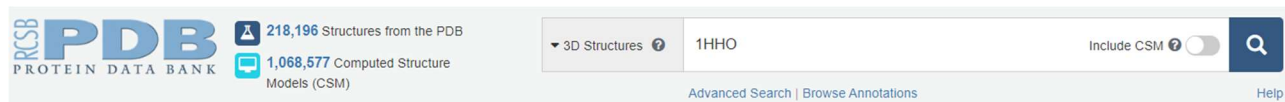
Aufgabe 2b



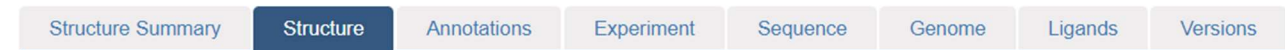
3.: Untersuchung des Sarin-Enzym-Komplexes

Sarin ist ein chemischer Kampfstoff aus der Gruppe der Phosphonsäureester, zu denen auch Tabun und Soman gehören. Strukturell hohe Ähnlichkeit besitzt auch die Insektizide Parathion (E605), Malathion und das Nervengift VX.

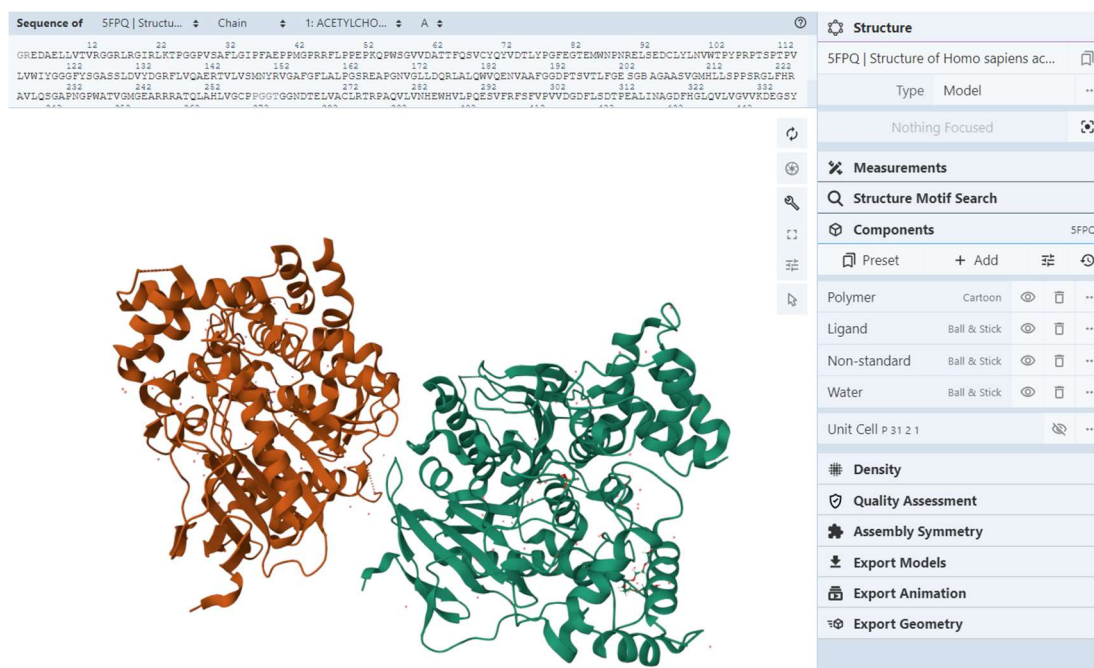
Rufen Sie über Ihren Browser die Seite www.rcsb.org auf, geben Sie dann bei 3D Structures den Code für die gewünschte Kristallstruktur ein (in diesem Fall 5FPQ) und klicken Sie dann auf Enter.



Wählen Sie nun den Tab **Structure** aus – in der Folge erscheint die Struktur des Proteins in der sogenannten Cartoon-Darstellung.



Am oberen Rand des Fensters ist die Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, gezeigt. Wählt man hier eine Aminosäure (repräsentiert durch den Ein-Buchstaben-Code), so wird die entsprechende Stelle in der Cartoon-Darstellung hervorgehoben.



In Kristallstrukturen von Proteinen finden sich meist noch Wassermoleküle (als rote Punkte erkennbar). Diese stammen vom Lösungsmittel, aus welchem das Protein kristallisiert wurde und sind für die weiteren Untersuchungen nicht von Bedeutung. Unter **Components** sind die unterschiedlichen Bestandteile der Struktur aufgelistet. Durch Klicken auf das **Augen-** beziehungsweise **Mülleimer-Symbol** können diese ausgeblendet, beziehungsweise gelöscht werden. Für die weiteren Betrachtungen sind immer nur die Komponenten Polymer und Ligand von Bedeutung. Alle übrigen Bestandteile können ausgeblendet oder gelöscht werden.

Components		5FPQ		
Preset	+ Add			
Polymer	Cartoon			...
Ligand	Ball & Stick			...
Non-standard	Ball & Stick			...
Water	Ball & Stick			...

Um die Bindungsverhältnisse zwischen Sarin und AChE genauer nachvollziehen zu können, blenden Sie nun alle Komponenten mit Ausnahme von **Non-standard** aus (siehe Abbildung links).

Es sollten nun noch zwei Moleküle in der Ball-and-Stick Darstellung im Fenster zu sehen sein (je einmal für die beiden Enzymeinheiten).

Aufgabe 3a

Zoomen Sie auf eines dieser Moleküle und zeichnen Sie die Skelettformel des Moleküls in das linke Fenster. Recherchieren Sie dann die Molekülstruktur des Nervengifts **Sarin** und zeichnen Sie dessen Struktur in der Skelettdarstellung in das rechte Fenster.

Substrat im Enzym	Sarin

Aufgabe 3b


Vergleichen Sie die beiden Strukturen miteinander – was fällt auf?

Zeichnen Sie eine Reaktionsgleichung zwischen Sarin und einer Aminosäure, welche zum Substrat im Enzym führt.

Fokussieren Sie nun auf eines der beiden Substrat-Moleküle, indem Sie dieses anklicken. Sie sehen nun sämtliche Aminosäuren in der unmittelbaren Umgebung des Substrats. Untersuchen Sie die Bindungsverhältnisse zwischen **Sarin** und dem Enzym.

Aufgabe 3c

Erstellen Sie zuerst einen Screenshot, welcher die unmittelbare Umgebung von **Sarin** zeigt.



Tacrin ist ein reversibler Inhibitor der Acetylcholinesterase, **Sarin** hingegen ein irreversibler Inhibitor. Erläutern Sie das unterschiedliche Verhalten; worin liegt ein entscheidender Unterschied?