# Untersuchung von Proteinen – Acetylcholinesterase AChE

## Motivation

Die Untersuchung von Proteinstrukturen bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten für den Unterricht. Insbesondere im Schwerpunktfach ist es daher lohnend, wenn sich die Schülerinnen und Schüler Grundfertigkeiten im Umgang mit der Oberfläche Mol\*, in der Seite der Protein Data Bank implementiert ist, erarbeiten. Das Enzym Acetylcholinesterase ist von entscheidender Bedeutung bei der Reizweiterleitung im synaptischen Spalt und viele bekannte Gifte, deren Namen auch den Schülerinnen und Schülern geläufig sein dürften, wirken an diesem Enzym.

## Voraussetzungen

* Grundkenntnisse hinsichtlich dem Aufbau von Proteinen
* Wasserstoffbrücken

## Ablauf

1. Untersuchen der Kristallstruktur von Acetylcholinesterase ohne Substrat und Betrachtung des katalytischen Zentrums
2. Untersuchen der Kristallstruktur von Acetylcholinesterase mit einem Alzheimer-Medikament – Betrachtung der Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym
3. Untersuchen der Kristallstruktur von Acetylcholinesterase mit dem Nervengift Sarin – Betrachtung der Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym – Korrelation zwischen Struktur und Toxizität

#### Vorteile:

* Untersuchung anhand von echten kristallographischen Daten
* Blaupause für die Untersuchung anderer Strukturen

#### Nachteile:

* Die Benutzeroberfläche von Mol\* ist nicht ganz einfach und tendenziell etwas überladen

### Hinweise und Einschränkungen

Die Erläuterungen für die Untersuchung der jeweiligen Kristallstruktur wiederholen sich teilweise – somit kann man problemlos eine Struktur weglassen, ohne etwas an den Instruktionen ändern zu müssen.

Falls man sich nicht genau an die Abfolge der Kommandos hält, kann es leicht passieren, dass man zu einer Ansicht gelangt, welche nicht mehr die beschriebene Vorgehensweise zulässt … am einfachsten ist es in so einem Fall, nochmals von vorne zu beginnen.

Wenn man im Umgang mit Mol\* noch ungeübt ist, so empfiehlt es sich, das Video zu dieser Unterrichtseinheit anzuschauen, um die verschiedenen Schritte nachzuvollziehen.

Wörter in Magenta verweisen auf Felder/Buttons, welche geklickt werden müssen, Wörter in Blau auf Websites oder Dateien, Wörter in Braun auf chemische Substanzen.

# 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 Nervensystemsund der motorischen Endplatte, die als Substrat den Neurotransmitter Acetylcholin(ACh) binden, aber auch durch Nikotinaktiviert 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 „Ruhenerv“ 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

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

Im zentralen Nervensystem und im Herzmuskeln 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 einen 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 nicotinerg 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 | ACh  Nicotin | Trimetaphan |
| Motorische Endplatte | ACh  Nicotin | d-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.

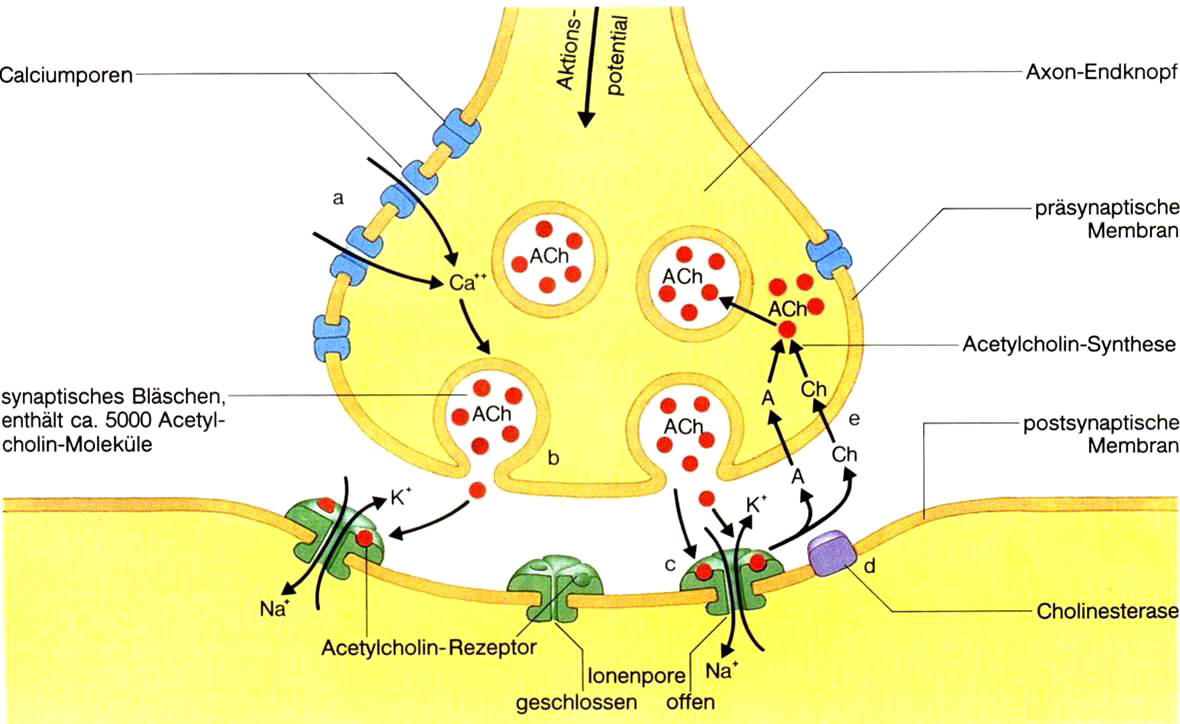
AChE findet sich hauptsächlich in der Nerven-Muskel-Synapse, in den autonomen Ganglien, dem Nebennierenmark und in den cholinergen Synapsen des Zentralnervensystems. Aber auch Drüsenaktivitäten der Haut, der Augen, des Verdauungstraktes und der Blase, sowie die Aktivität des Herzmuskels und der glatten 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 Cholinacyltransferase 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

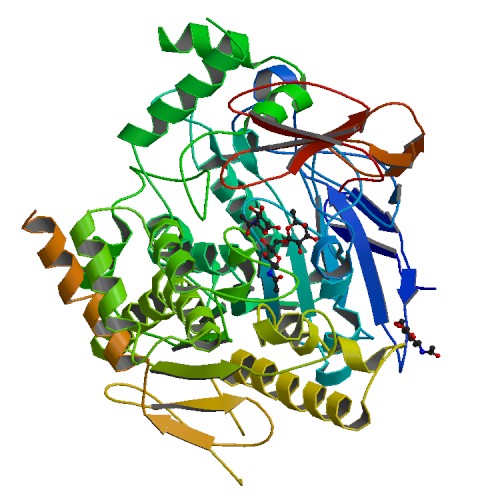
Wenn diese Bindungsstellen durch den Transmitter besetzt sind, ändert sich durch die Interaktion mit dem gebundenen Molekül die dreidimensionale Struktur und es eröffnet sich eine Kanalpore, durch die Ionen durch die Zellmembran gelangen können. Na+- und Ca2+-Ionen strömen somit in die Zelle ein, K+-Ionen 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.



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 Ca2+-Ionen zu einer Erschlaffung der Muskulatur. Beispiele hierfür sind das Pfeilgift Curare (kompetitiv) und das Schlangengift a-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 Nervenenden – 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 |
| a-Bungarotoxin  (Giftnattern) | Irreversibler Antagonist am nicotinischen Rezeptor | ACh-Rezeptor-Blockade | Linderung der Symptome |
| Botulinustoxin |  | Hemmung ACh-Ausschüttung |  |
| v-Conotoxin  (Kegelschnecke) | blockiert Ca2+-Ionenkanäle in präsynaptischen Bereichen | Hemmung ACh-Ausschüttung | Linderung der Symptome  AChE-Hemmer |
| a-Latrotoxin  (Schwarze Witwe) | dauerhafte Öffnung der Ca2+-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

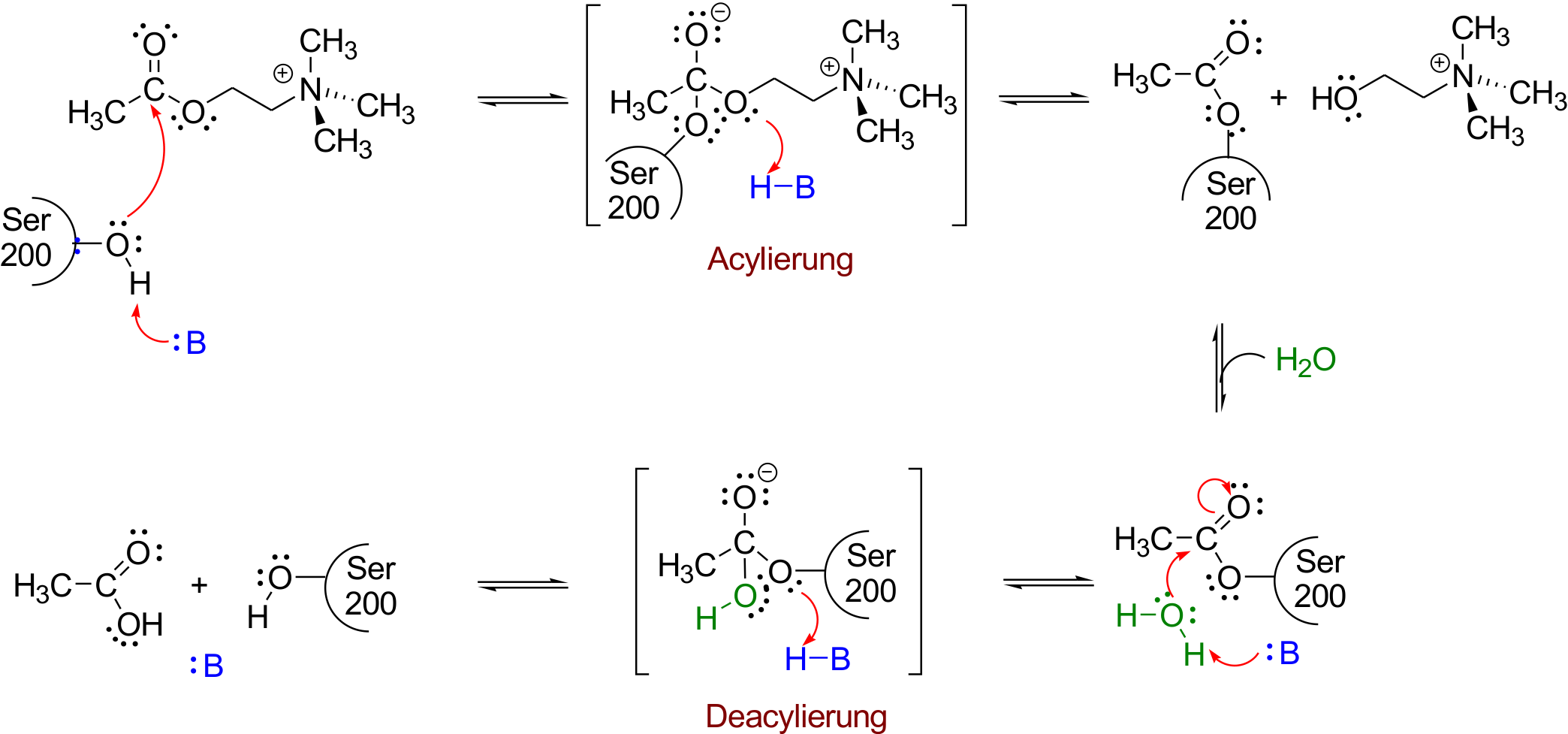
AChE hydrolysiert Acetylcholin zu Acetat und Cholin. Das Enzym ist sehr effizient, die Umsetzung von Acetylcholin erfolgt ausserordentlich schnell und ist weitgehend diffusionskontrolliert. Die katalytischen Fähigkeiten der AChE ermöglichen eine schnelle Weiterleitung der Aktionspotenziale der Nervenzelle.

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. Allerdings ist bei einer Somanvergiftung keine Renaturierung des Enzyms möglich.

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](http://www.molstar.org) aufgerufen werden kann.

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

4PQE Menschliche Acetylcholinesterase (ohne Substrat/Ligand)

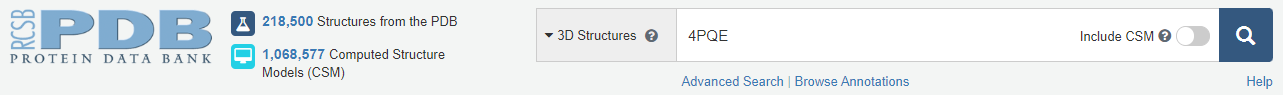
7XN1 Menschliche Acetylcholinesterase mit Alzheimer-Medikament Tacrin

7E3H Menschliche Acetylcholinesterase mit Alzheimer-Medikament Donepezil

5FPQ Menschliche Acetylcholinesterase mit Nervengift Sarin

### 1.: Untersuchung des katalytischen Zentrums der Acetylcholinesterase

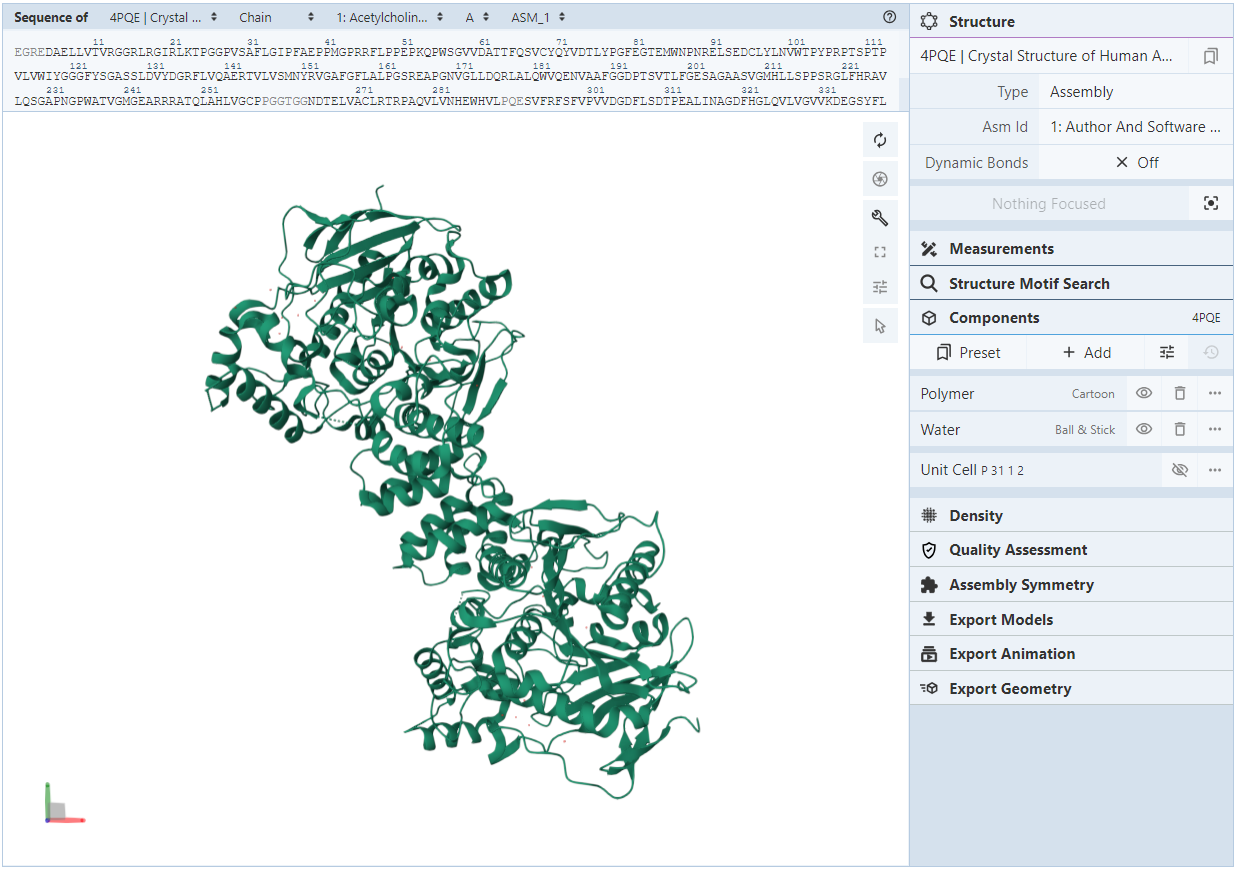
Rufen Sie über Ihren Browser die Seite [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) auf, geben Sie dann bei 3D Structures den Code für die gewünschte Kristallstruktur ein (in diesem Fall 4PQE) und klicken Sie dann auf Enter.



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 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.



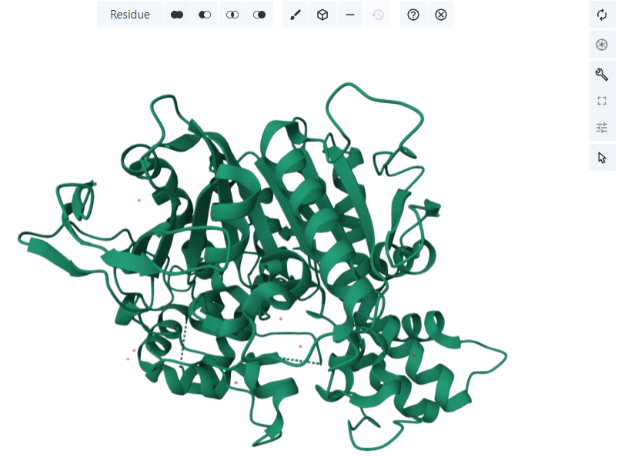
In Kristallstrukturen von Proteinen finden sich meist noch Wassermoleküle (als rote Punkte erkennbar). Diese stammen vom Lösungsmittel, aus welchem das Protein kristallisiert wurde und sind für die weiteren Untersuchungen nicht von Bedeutung sind. Unter Components sind die unterschiedlichen Bestandteile 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 |
| Sekundärstruktur  Alpha-Helices  Beta-Flatblätter (parallel und antiparallel)  Bereiche ohne übergeordnete Struktur  Tertiärstruktur  Quartärstruktur | Primärstruktur  Komplexiertes Substrat |

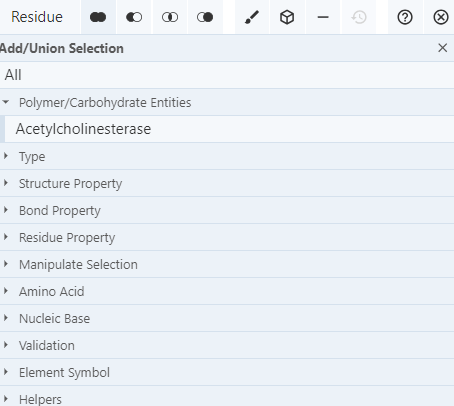
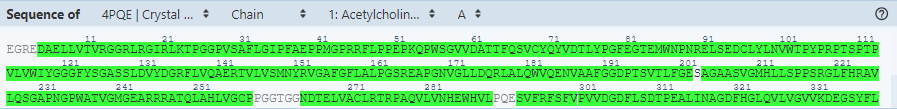
Sie sollen sich nun mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms vertraut machen. Dieses besteht in dieser Struktur aus den drei Aminosäuren SER203, Glu334 und HIS447.



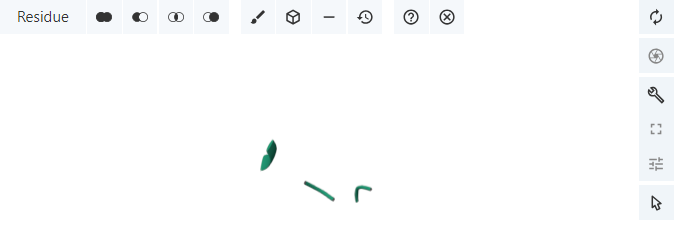
Wählen Sie zuerst das Pfeil-Icon ⬁ aus. Daraufhin erscheint

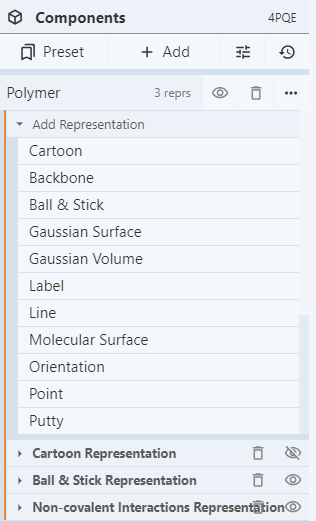
oberhalb der Struktur eine neue Menü-Leiste.

Wählen Sie hier den schwarzen Doppelkreis aus

Im neu erschienen Fester 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.



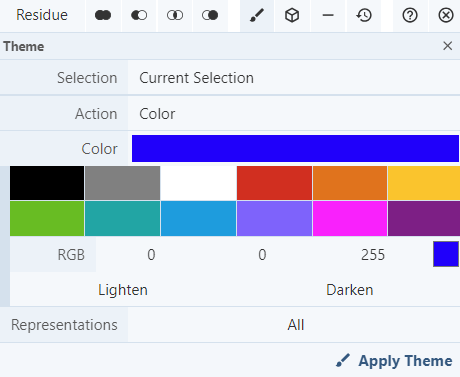
Wählen Sie nun bei Components beim Eintrag Polymer die drei Punkte ··· aus und wählen Sie dann beim Tab Add Representation die Option Ball&Stick aus.

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**

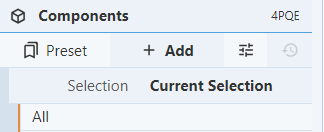
Erstellen Sie nun einen Screenshot des katalytischen Zentrums.

|  |
| --- |
|  |

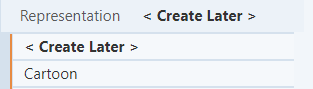
Abschliessend sollen Sie sich ein Bild davon machen, wo sich das katalytische Zentrum im Molekül befindet. Klicken Sie hierzu nacheinander auf die drei Aminosäuren – diese sollten nun grün hervorgehoben sein.

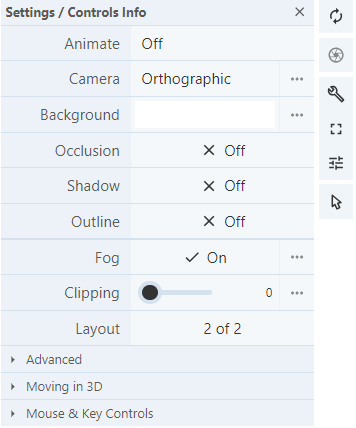
Wählen Sie dann aus der Menüleiste das Pinsel-Symbol und dann die Farbe Magenta.

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

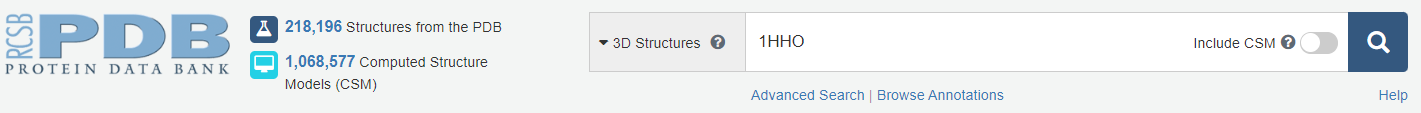
Tacrin ist ein reversibler Hemmstoff der Acetylcholinesterase und wurde in den USA als erste Substanz dieser Gruppe zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit zugelassen (Handelsnamen: *Cognex*; *Romotal*). Der Wirkstoff führt dabei zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungen.

**Aufgabe 2a**

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

|  |
| --- |
|  |
| Tacrin |

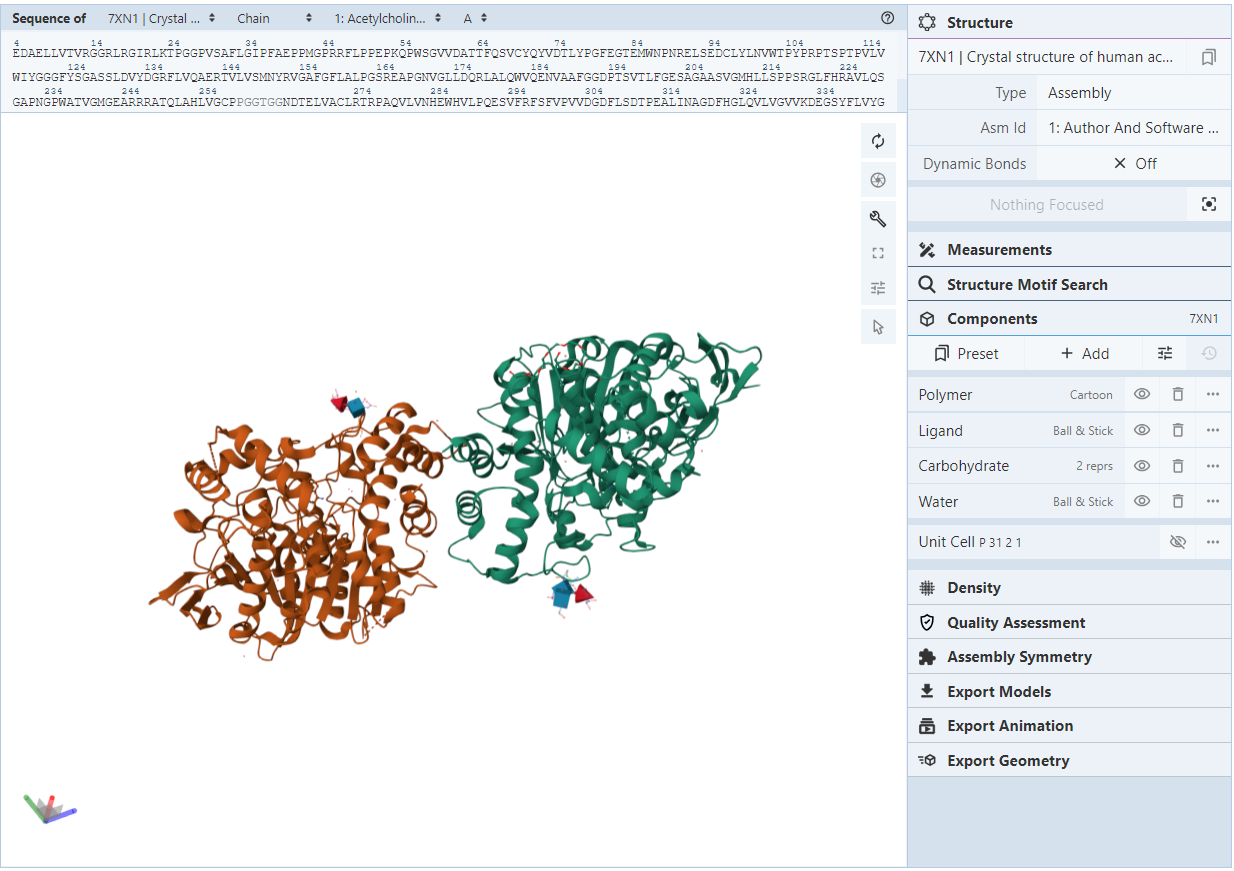
Rufen Sie über Ihren Browser die Seite [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) auf, geben Sie dann bei 3D Structures den Code für die gewünschte Kristallstruktur ein (in diesem Fall 7XN1) und klicken Sie dann auf Enter.



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

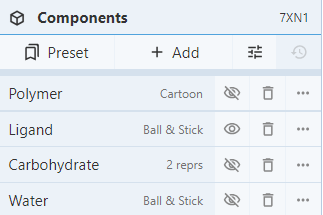


Am oberen Rand des Fensters ist die ist die Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, gezeigt. Wählt man hier eine Aminosäure (repräsentiert durch den Ein-Buchstaben-Code), so wird die entsprechende Stelle in der Cartoon-Darstellung hervorgehoben.



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.

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-Moleüle sichtbar sein, ausserdem ein Kettförmiges Molekül, welches vermutlich ein für die Kristallistaion verwendetes Lösungsmittel ist.

Untersuchen Sie die Bindungsverhältnisse zwischen Ligand Tacrin und dem Enzym, indem Sie auf eines der Moleküle klicken – es wird nun die unmittelbare Umgebung rund um das Molekül angezeigt.

|  |
| --- |
|  |

**Aufgabe 2b**

Erstellen Sie zuerst einen Screenshot, welcher die Interaktion von Tacrin mit dem Enzym zeigt.

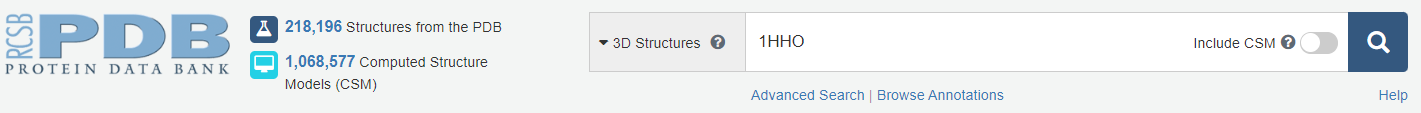
Beschreiben Sie die Art der Wechselwirkungen zwischen Tacrin und Enzym und geben Sie an, welche Aminosäuren beteiligt sind.

Tacrin bildet eine Wasserstoffbrücke zu HIS444 aus – dies ist eine der Aminosäuren der katalytischen Triade. Ausserdem sieht man p-stacking zu TRP83

### 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.

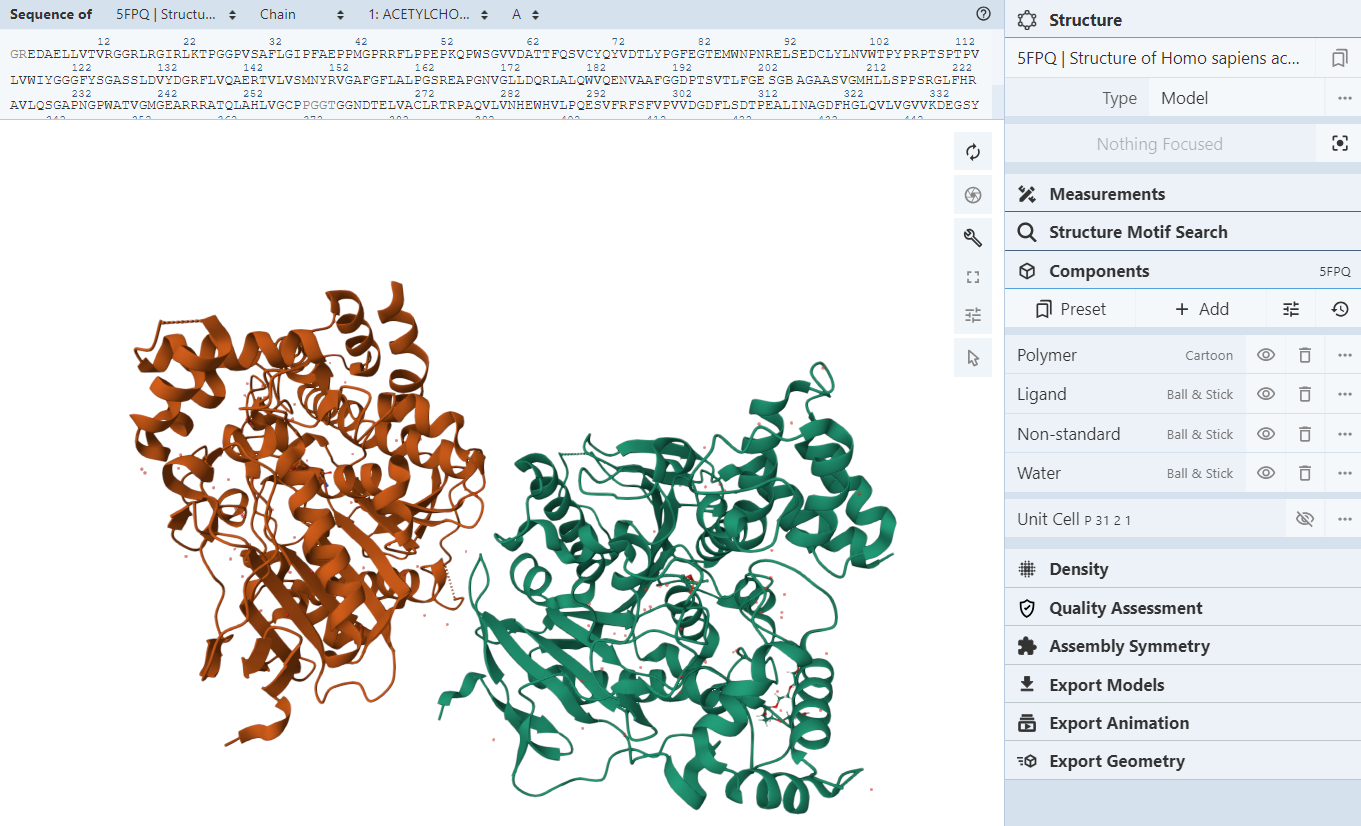
Rufen Sie über Ihren Browser die Seite [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) auf, geben Sie dann bei 3D Structures den Code für die gewünschte Kristallstruktur ein (in diesem Fall 5FPQ) und klicken Sie dann auf Enter.



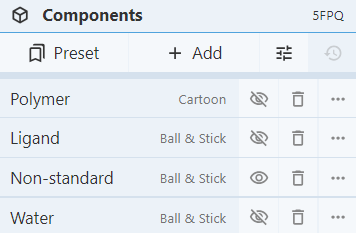
Wählen Sie nun den Tab Structure aus – in der Folge erscheint die Struktur des Proteins in der sogenannten Cartoon-Darstellung.



Am oberen Rand des Fensters ist die 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.

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?

Anstatt dem Fluor-Atom im Sarin findet man ein Molekülfragment, welches Teil der Aminosäuresequenz des Enzyms ist.

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.

Beschreiben Sie die Art der Wechselwirkungen zwischen Sarin und Enzym und geben Sie an, welche Aminosäuren beteiligt sind.

Zwei H-Brücken zu HIS446 (Teil der katalytischen Triade)

Zwei H-Brücken zu GLY120

Eine H-Brücke zu Ala203

Kovalente Bindung mit SER202 (Teil der katalytischen Triade)

**Aufgabe 3d**

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

Entscheidend ist, dass Sarin kovalent mit der Aminosäure Serin im katalytischen Zentrum bindet und somit nicht mehr durch Acetylcholin verdrängt werden kann. Das Enzym ist dauerhaft blockiert, in der Folge kommt es zu einer anhaltend überhöhten Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt, was eine dauerhafte Erregung der Muskeln zur Folge hat.