

**Molecular-Modelling Untersuchungen
auf dem Weg zum Verständnis der
Alzheimer'schen Krankheit**

Von der Fakultät für Naturwissenschaften

Department Chemie
der Universität Paderborn
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von

Edgar Luttmann

aus Lippstadt

Paderborn 2004

Eingereicht am: 21.04.2004

Mündliche Prüfung am: 07.05.2004

Referent: Prof. Dr. G. Fels

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. B. Westermann

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von **Januar 2001 bis März 2004** im Fach Organische Chemie des Department Chemie der Universität Paderborn angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Fels danke ich für die interessante Themenstellung, für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, und für die vielen Freiheiten, die er mir immer einräumte.

Herrn Priv.-Doz. Dr. B. Westermann danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. K. Huber und Thomas Witte danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Lichtstreuungsmessungen.

Prof. Dr. D. Lamba und seiner Arbeitsgruppe in Monterotondo, Italien möchte ich für die freundliche Arbeitsumgebung, in der ich die Aufreinigung der Esterase lernen durfte, danken. Zusätzlich möchte ich mich auch für die Überlassung mehrerer Proben hochreiner *TcAChE* bedanken.

Prof. Dr. A. Maelicke in Mainz und seinen Mitarbeitern - speziell Dr. Jürgen Ludwig - gebührt besonderer Dank, weil ich in ihren Räumen die Aufreinigung der AChE wiederholen durfte und sie mir immer mit Ratschlägen und Diskussionen in biochemischen und biologischen Fragen zur Verfügung standen.

Dem „Paderborn Center for Parallel Computing“ (PC)² möchte ich für die Bereitstellung von Rechenzeit auf dem hpcLine-Rechencluster danken.

Der Dr. Hilmer Stiftung zur Förderung der Forschung auf pharmazeutischem Gebiet danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Danken möchte ich der Universität Paderborn für die Verleihung des „Forschungspreises 2003“.

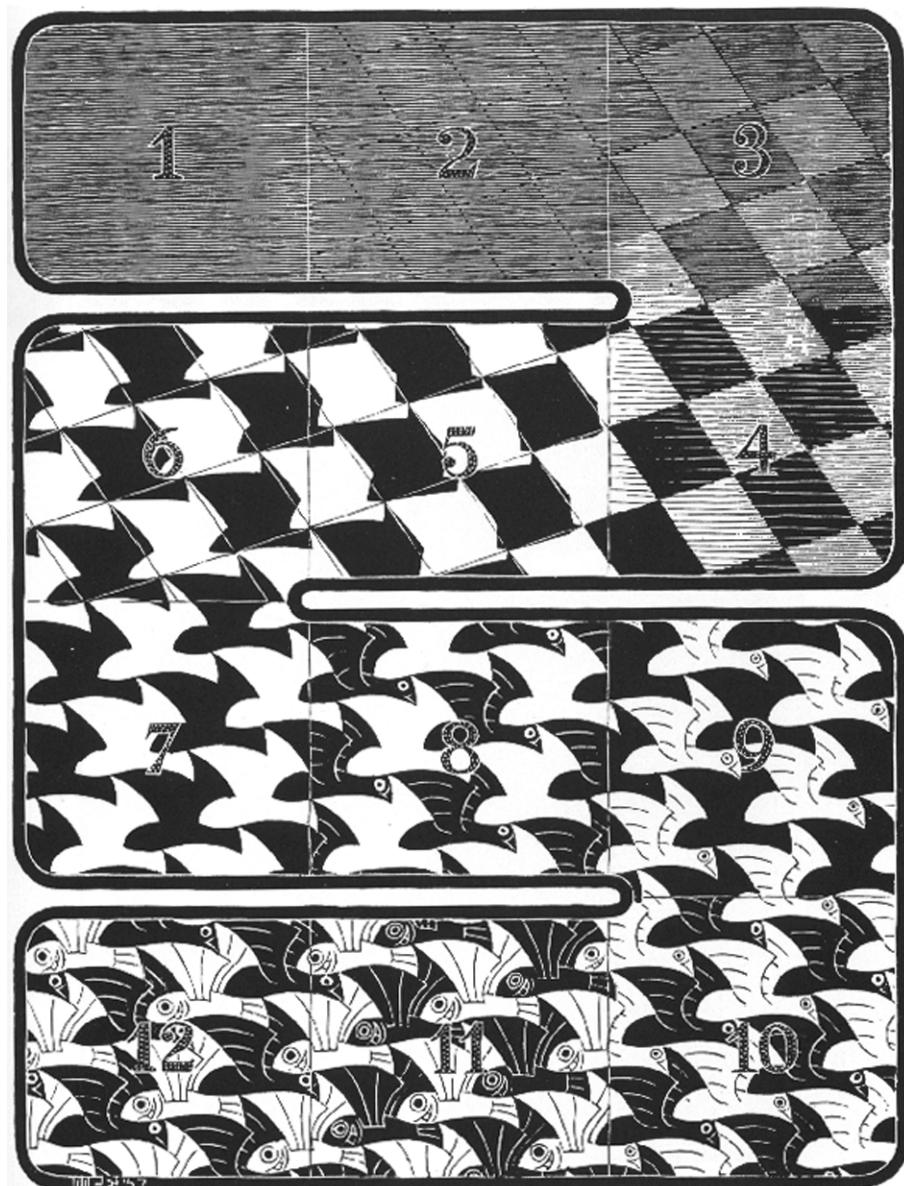
Dr. Christian Pilger danke ich für die vielen Tipps, die Geduld und Bereitschaft alle meine Fragen im Bezug auf Molecular-Modelling zu beantworten.

Dr. Christian Pilger und Dr. Elmar Linnemann danke ich für die Einführung in das Themengebiet „Galanthamin“.

Dr. Mario „Paul“ Kröger und Dr. Axel Dietrich danke ich vor allem für ihr soziales Engagement.

Christiane Neuhaus danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Department Chemie für deren Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken.



„die Metamorphose einer Idee“ - frei nach Goethe

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Das Nervensystem.....	3
2.2 Alzheimer'sche Krankheit.....	9
2.3 Amyloid-Hypothese.....	12
2.4 Homologie-Modellierung.....	15
2.5 Molekular-Dynamik-Berechnungen.....	16
2.6 Hauptkomponentenanalyse.....	20
2.7 Flexibles Liganden-Docking	21
3 Aufgabenstellung.....	24
4 Durchführung.....	26
4.1 Rezeptorarbeiten.....	26
4.1.1 Modellbildung.....	26
4.1.2 Modell-Validierung.....	30
4.1.3 Lokalisierung der APL-Bindungsstelle.....	40
4.2 Esterase-Arbeiten.....	56
4.3 β -Amyloid-Arbeiten.....	66
4.3.1 Modellbildung & Validierung.....	69
4.3.2 Lichtstreuungsmessungen.....	89
5 Ausblick.....	93
6 Experimenteller Teil.....	94
6.1 Computer-Chemie-Methoden.....	94
6.1.1 Homologie-Modellierung.....	94
6.1.2 MD-Simulationen.....	94
6.1.3 Clusteranalyse.....	96
6.2 Lichtstreuungsmessungen.....	97
6.2.1 Probenvorbereitung.....	97
6.2.2 Durchführung.....	97
6.3 Esterase-Aufreinigung.....	98
6.3.1 Präparation des Affinitätsgels.....	98
6.3.2 Durchführung.....	100
6.4 Ellman-Test.....	102
6.5 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	102
6.6 Verwendete Substanzen, Puffer, Lösungen und Geräte.....	105

6.6.1 Substanzen.....	105
6.6.2 Pufferlösungen.....	105
6.6.3 Stammlösungen.....	105
6.6.4 Verwendete Geräte.....	106
7 Literaturverzeichnis.....	107
Anhang A - Abkürzungen.....	116
Anhang B - Sequenzabbildungen.....	117

1 Zusammenfassung

Bei der Alzheimer'schen Demenz (AD) scheint das Versagen der cholinergen Synapse ein wesentlicher Schritt in der Entwicklung dieser Krankheit zu sein. Vor diesem Hintergrund wurden mit Hilfe von Computer-Chemie Methoden neue mechanistische Aspekte entscheidender Proteine der cholinergen Synapse im Rahmen der vorliegenden Dissertation erarbeitet. So wurden Strukturmodelle des extrazellulären Teils des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) erstellt, Inhibitoren der durch die Acetylcholinesterase (AChE) induzierten Aggregation von β -Amyloid-Peptiden postuliert, ein biophysikalischer Assay erarbeitet und Faltungsvorgänge des β -Amyloid-Peptids berechnet. Aufbauend auf diesen Ergebnissen eröffnen sich nun neue Ansätze für die Weiterentwicklung der symptomatischen Therapie und wichtige Erkenntnisse auf dem Weg zu einer kausalen Therapie.

Als Grundlage für die Modellierungsarbeiten am nAChR wurden Homologie-Modelle für den extrazellulären Teil dieses Proteins erstellt, die mit existierenden experimentellen Erkenntnissen gut übereinstimmen. Mit diesen Modellen wurden einerseits Docking-Studien zur Vorhersage der Bindungsstelle allosterisch potenzierender Liganden (APL) wie zum Beispiel Galanthamin durchgeführt. Andererseits wurden die Modelle erfolgreich verwendet, um nAChR-Mutanten zu definieren, die anschließend im Arbeitskreis Maelicke hergestellt und ihrerseits für die Untersuchung der APL-Bindungsstelle eingesetzt wurden. Mit diesen Modellen stehen nun erstmals dreidimensionale Informationen über diese - für die symptomatische AD-Therapie bedeutende - Bindungsstelle zur Verfügung. Dadurch wird der Weg zu einem strukturbasierten Design für APL-Verbindungen eröffnet.

Die Modelling-Untersuchungen an der AChE befassten sich aufbauend auf der Beeinflussung der β -Amyloid-Aggregation durch spezielle AChE-Inhibitoren mit der Auswahl besserer und selektiverer Inhibitoren, für die ein effizientes Bewertungsverfahren entwickelt wurde. Beispielhaft wurde dabei ein bis-Galanthamin als neuartiger bis-funktioneller Wirkstoff vorgeschlagen. Auf dem Weg zu einem umfassenden Verständnis des Aggregationsprozesses der β -Amyloide wurde die Wechselwirkung zwischen AChE und den β -Amyloiden, sowie das dynamische Verhalten des monomeren β -Amyloids in Lösung durch Docking- bzw. Molekular-Dynamik-Berechnungen untersucht. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnten wichtige Beiträge zum Verständnis des Faltungsweges dieses Peptids als Startpunkt einer β -Amyloid-Plaque-Bildung geleistet werden. Neben diesem theoretischen Verfahren wurde ein biophysikalischer Assay basierend auf Lichtstreuungsmessungen aufgebaut, der in der Lage ist, die Aggregation zeitaufgelöst zu charakterisieren.

2 Einleitung

In diesem Kapitel werden die Motivation und ein Überblick über die Hintergründe der vorliegenden Arbeit gegeben. Es wird dabei eine Brücke von den molekularen Hintergründen der Alzheimer'schen Krankheit bis hin zu komplexen Methoden der Computer-Chemie zu schlagen.

2.1 Das Nervensystem

Das menschliche Nervensystem dient der Verarbeitung von Informationen und der Kontrolle von Muskel- und Drüsentätigkeiten. Diese hochkomplexe Aufgabe wird von vielen Milliarden Einzelzellen erfüllt, deren besondere Fähigkeiten nicht nur von den Eigenschaften der Nervenzellen (Neuronen), sondern auch von deren Verknüpfungen zu einem sehr komplizierten Netzwerk abhängen. Untergliedert wird das Nervensystem in zentrales und peripheres Nervensystem, wobei letzteres noch weiter in vegetatives und somatisches aufgespalten wird. Das zentrale Nervensystem umfasst das Gehirn und das Rückenmark, das vegetative ist für die Versorgung der inneren Organe und das somatische für die Sinnesorgane und Skelettmuskulatur verantwortlich [1].

Die spezielle Bedeutung des Gehirns beim Menschen, welches aus ca. dreizehn Milliarden einzelner Nervenzellen besteht, wird z. B. durch seinen Sauerstoffbedarf klar. Im Ruhezustand verbraucht das Gehirn eines Erwachsenen etwa 20 % des aufgenommenen Sauerstoffs, obwohl das Gehirn nur ca. 2 % des Körpergewichts ausmacht [2].

In Abbildung 2.1 ist eine Nervenzelle schematisch dargestellt. Der Zellkörper hat eine große Anzahl Verzweigungen, die so genannten Dendriten, welche Anknüpfungspunkte für Axone anderer Nervenzellen anbieten. Unter einem Axon versteht man einen speziellen Fortsatz eines Neurons, welcher der intrazellulären Weiterleitung eines Impulses dient und beim Menschen bis zu einem Meter lang sein kann. Impulse sind Änderungen im Membranpotential, welches durch die unterschiedlichen Na^+ - und K^+ -Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle entsteht. Dieses Ungleichgewicht kommt zum einen durch unterschiedliche Permeationskoeffizienten für die beiden Ionen und zum anderen durch aktiven Ionentransport mit Hilfe des Proteins ($\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$)-ATPase zustande.

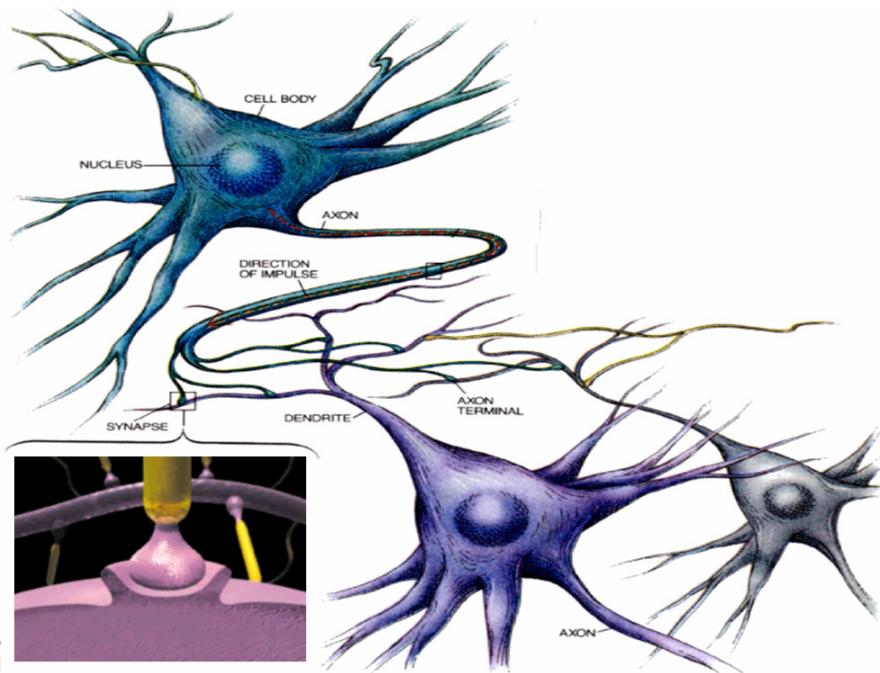


Abbildung 2.1: Darstellung einiger Nervenzellen, welche die starke Vernetzung der Axonen mit den Dendriten und beispielhaft eine Synapse (links unten) zeigt.

Im Ruhezustand wird ein Gleichgewicht erreicht, bei dem ein geringer Überschuss an Kationen im extrazellulären Raum herrscht, welcher für ein Potential von -60 mV verantwortlich ist. Bezieht man dieses geringe Potential auf die Membrandicke von ca. 4 nm, so ergibt sich ein beeindruckendes elektrisches Feld von etwa 136.000 Vcm $^{-1}$ [2]. Ein Nervenimpuls bzw. Aktionspotential ist in diesem Zusammenhang eine Depolarisation der Membran auf etwa $+30$ mV. Dies geschieht durch Öffnung von spannungsgesteuerten Ionenkanälen für Na $^{+}$ -Ionen, wodurch die Durchlässigkeit der Membran für Na $^{+}$ -Ionen zunimmt und so für etwa $0,5$ ms Na $^{+}$ -Ionen mit einer Geschwindigkeit von ca. 6.000 Ionen pro Millisekunde und Kanal in die Zelle einströmen. Bevor das neue Gleichgewichtspotential von etwa $+60$ mV erreicht wird, schließen sich die Na $^{+}$ -Kanäle nach ca. $0,5$ bis 1 ms und die K $^{+}$ -Kanäle öffnen sich. Auf diese Weise wird das Potential wieder verringert, bis das entsprechende Gleichgewichtspotential bei etwa -75 mV erreicht ist (Hyperpolarisation). Das Ruhepotential stellt sich erst nach einer Erholungsphase von etwa einer weiteren Millisekunde wieder ein, so dass eine Nervenzelle frühestens nach zwei Millisekunden für den nächsten Impuls bereit ist. Ausgelöst wird das Aktionspotential, sobald das Potential -40 mV überschreitet, da dann die beschriebene Kaskade der Potentialerhöhung nicht mehr aufzuhalten ist (Abbildung 2.2).

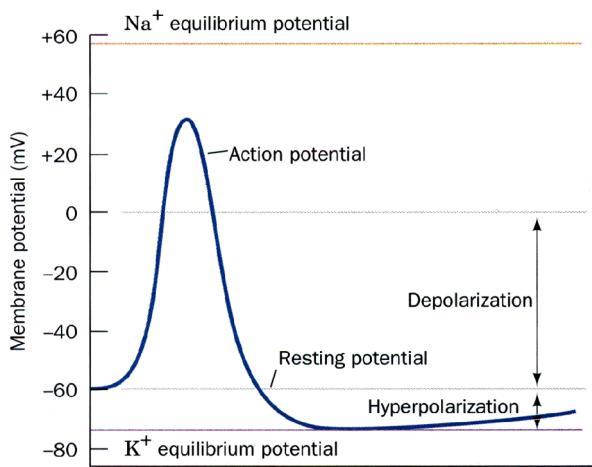


Abbildung 2.2: Potentialverlauf eines Impulses. Vom Ruhepotential steigt das Potential schnell bis kurz unter das Gleichgewichtspotential für Na^+ -Ionen, bevor es dann bis zum Gleichgewichtspotential der K^+ -Ionen fällt. Von dort aus steigt es langsam wieder bis zum Ruhepotential [2].

Trifft ein Impuls am Ende des Axons ein, so muss der Impuls auf die angrenzende Nervenzelle übertragen werden. An den Kontaktstellen der Zellen, den so genannten Synapsen, kommen zwei grundlegende Verfahren der Übertragung (Neurotransmission) in Frage. In einigen Fällen findet die Übertragung direkt durch das ankommende elektrische Feld statt, den so genannten elektrischen Synapsen. Bei Synapsen mit einem größeren Abstand - ab ca. 20 nm - sind chemische Botenstoffe, die Neurotransmitter, nötig. Eine derartige chemische Synapse ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Dort werden bei Eintreffen eines Aktionspotentials Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, wodurch letztlich das Verschmelzen von Vesikeln mit der Zellmembran ausgelöst wird. Unter Vesikeln versteht man synaptische Vorratsbläschen, welche die Neurotransmitter in großen Mengen speichern. Die auf diese Weise ausgeschütteten Botenstoffe, z. B. das Acetylcholin (ACh), diffundieren in etwa 0,1 ms durch den synaptischen Spalt. Sie binden an der postsynaptischen Membran an Acetylcholinrezeptoren (AChR), welche daraufhin geöffnet werden und durch Na^+ - und K^+ -Fluss erneut ein Aktionspotential auslösen.

Das ACh, welches nach dem Impuls im synaptischen Spalt vorhanden ist, wird durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) in Acetat und Cholin gespalten, um den Impuls zu terminieren. Beide Substrate werden vom Axon-Endkopf wieder aufgenommen, um dort durch ein weiteres Enzym, die Cholintransferase, erneut zu ACh synthetisiert zu werden und für weitere Impulse zur Verfügung zu

stehen. Neben der in Abbildung 2.3 als membrangebunden dargestellten AChE kommt diese auch gelöst im synaptischen Spalt vor.

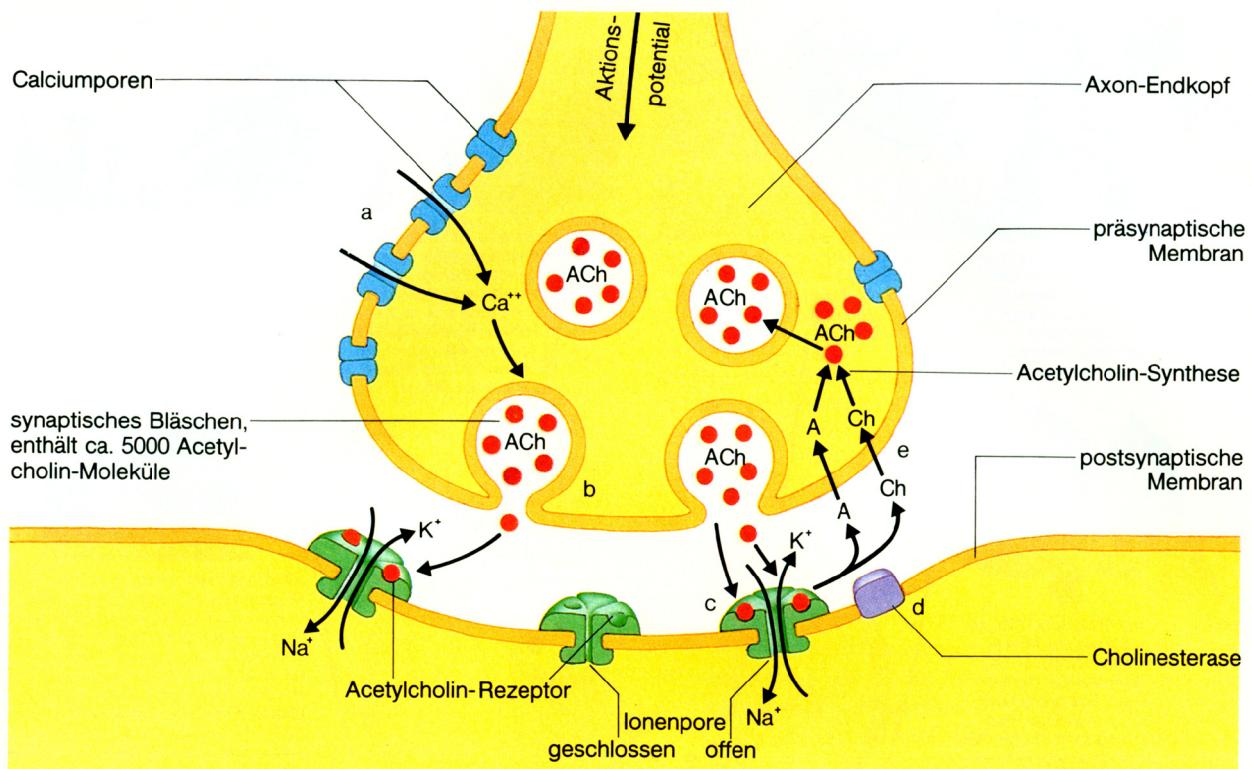


Abbildung 2.3: Chemische Synapse. Beim Eintreffen eines Nervenimpulses wird durch Öffnen von Calciumkanälen (a) die Ausschüttung von ACh (b) ausgelöst. Das ACh initiiert dann am ACh-Rezeptor den Impuls in der nächsten Zelle (c), bevor es von der AChE gespalten wird (d). Zuletzt werden die Spaltprodukte des ACh wieder vom Axon aufgenommen (e) und zur Synthese für neue Neurotransmitter genutzt [1].

Speziell die AChE, das Enzym, welches die Neurotransmitter spaltet, und die ACh-Rezeptoren, welche auf Kontakt mit dem Neurotransmitter hin das Aktionspotential in der nächsten Nervenzelle auslösen, sind die zentralen Forschungsobjekte der vorliegenden Arbeit. Bei den ACh-Rezeptoren unterscheidet man zwei generelle Klassen, da ein Teil der Rezeptoren auf Muskarin - ein Alkaloid aus Fliegenpilzen - reagiert, wohingegen der andere Teil auf Nikotin anspricht. Vor allem die nikotinischen ACh-Rezeptoren (nAChR) sind gut untersucht und kommen in den meisten Nerv-Muskel-Verbindungen wie auch dem zentralen Nervensystem vor.

Die Rezeptoren selbst sind Transmembranproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 290 kDa

und ragen bei ihrer Länge von 11 nm etwa 1,5 nm in das Zytosplasma der Zelle und etwa 5,5 nm in den synaptischen Spalt hinein. Aufgebaut sind sie aus fünf Untereinheiten, welche senkrecht zur Zellmembran betrachtet kreisrund angeordnet sind. Mit einem Außendurchmesser von 8 nm erzeugen sie eine zentrale Öffnung oder Pore mit einem Durchmesser von 2,5 bis 3 nm [3]. Diese Abmessungen konnten durch eine Elektronenmikroskop-Aufnahme (links in Abbildung 2.4) mit einer Auflösung von 4,6 Å ermittelt werden [4]. Rechts in Abbildung 2.4 sind diese Angaben schematisch zusammengefasst. Es sei speziell auf den großen extrazellulären Teil des Rezeptors hingewiesen, weil dieser das Ziel der Modellierungen der vorliegenden Arbeit ist.

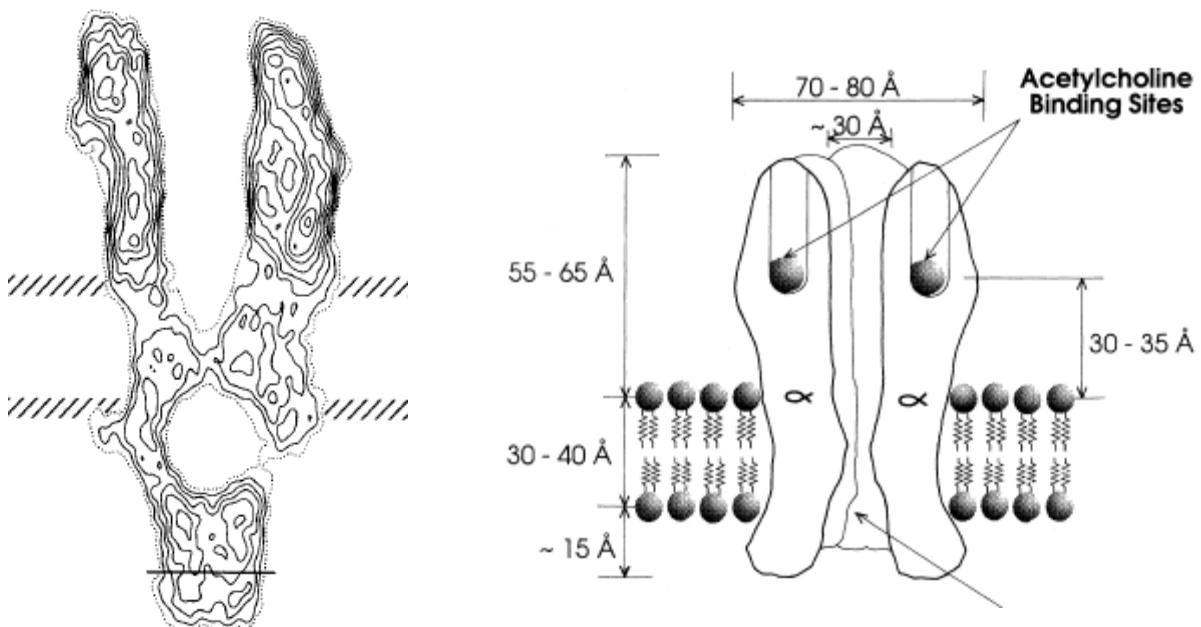


Abbildung 2.4: Elektronenmikroskop-Aufnahme eines nikotinischen AChR (links), mit deren Hilfe die Dimensionen eines solchen Rezeptors bestimmt werden konnte. Im rechten Teil der Abbildung sind diese Abmessungen schematisch dargestellt, und die relative Lage der Neurotransmitter-Bindungsstellen zur Membran ist angegeben [3].

Da eine Vielzahl verschiedener Untereinheiten existiert, besteht durch die Wahl der Untereinheiten und deren Anordnung zueinander eine große Variationsmöglichkeit der Rezeptoren. Im peripheren System gibt es im Wesentlichen Rezeptoren aus zwei α - und jeweils einer β -, γ -, δ - oder ϵ -Untereinheit, wie z. B. das $(\alpha_1)^2\beta\gamma\delta$ -Heteropentamer. Dahingegen sind neuronale nAChR häufig aus zwei α - und drei β - bzw. fünf gleichen α -Untereinheiten aufgebaut. Die breite Vielfalt der neuronalen Rezeptoren kommt durch die Kombinatorik der zur Zeit bekannten α - (α_1 bis α_9) und β -Untereinheiten

(β_1 bis β_4) zustande [5]. In Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Neurotransmitter-Bindungsstellen an den Kontaktflächen der Untereinheiten lokalisiert sind, und zwar immer unter Mitwirkung mindestens einer α -Untereinheit (vgl. Abbildung 2.5) [6].

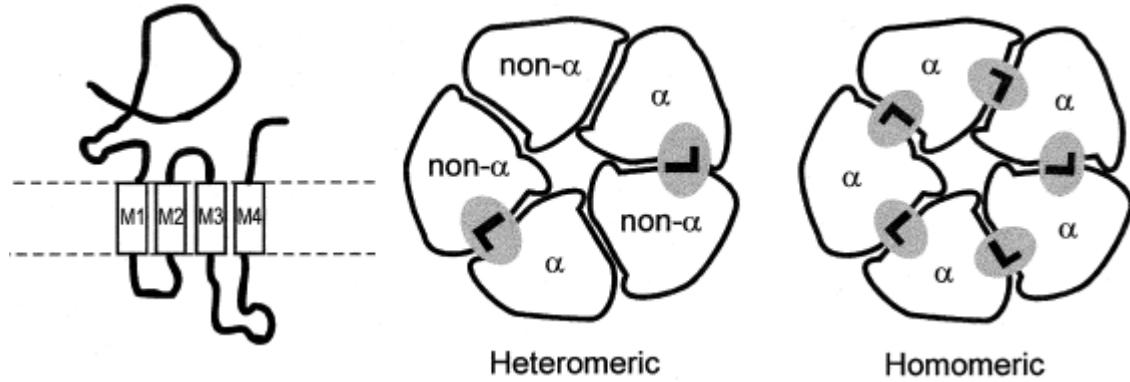


Abbildung 2.5: Generische Darstellung der ACh-Rezeptoren. Jede Untereinheit besteht aus vier Abschnitten, welche transmembran verlaufen (M1 bis M4), zwei zytosolischen Schläufen und einem großen N-terminalen extrazellulären Teil (links). Der extrazelluläre Teil kann als Heteropentamer mit zwei α -Untereinheiten (Mitte) nur zwei Bindetaschen oder als Homopentamer (rechts) ganze fünf Bindetaschen bilden [6]. Die jeweiligen Bindetaschen sind durch den grauen Bereich und das L markiert.

Die nikotinischen ACh-Rezeptoren können zudem durch einen allosterischen Effekt positiv beeinflusst werden. Bei diesem allosterischen Effekt fungieren Liganden wie (-)-Physostigmin oder Galanthamin als allosterisch potenzierende Liganden (APL). Durch ihre Anwesenheit wird die Reaktion auf das ACh verstärkt, ohne dass diese Liganden den Neurotransmitter-Effekt selber auslösen können [7].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstellen der Neurotransmitter und der APL nicht identisch sind, da keine Kompetition zwischen Vertretern dieser Ligandenklassen gefunden wurde. Es gibt jedoch neben den Neurotransmittern durchaus Liganden, die den Neurotransmitter-Effekt auslösen, wie z. B. das zuvor erwähnte Nikotin. Eine Klasse von Liganden, welche einen Effekt an einem Rezeptor auslösen, werden als Agonisten bezeichnet. Mit Hilfe der zwei Antikörpern WF6 und FK1 konnte zudem gezeigt werden, dass die Bindetaschen unterschiedlich sind, da diese Antikörper selektiv die Agonistenbindung (WF6) oder die APL-Bindung (FK1) verhindern [7].

Ein detailliertes Verständnis der molekularen Hintergründe der APL-Wirkung fehlt bislang, würde je-

doch die Entwicklung therapeutischer Anwendungen sehr erleichtern. Unglücklicherweise existieren nur wenige strukturelle Informationen über die APL-Bindetasche. Lediglich durch eine Serie von Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten konnte eine Aminosäure, das Lys125 aus den AChR des *Torpedo Californica* (kalifornischer Zitterrochen) identifiziert werden [8]. Die elektrischen Organe der Spezies *Torpedo* enthalten auf ihrer postsynaptischen Membran hohe Konzentrationen eines nAChR, der große Homologie zum menschlichen nAChR besitzt und daher häufig als Modellverbindung für die neuronalen nAChR des Menschen genommen werden kann.

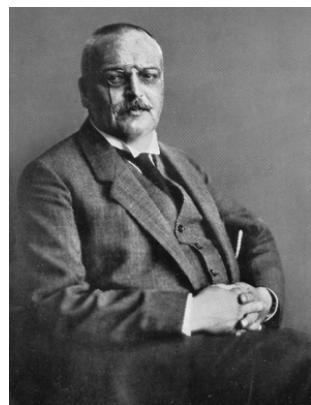
Zusätzlich konnten mit Hilfe des zuvor erwähnten Antikörpers FK1 einige kurze Fragmente des Rezeptors identifiziert werden, welche aufgrund ihrer Wechselwirkung mit dem Antikörper ein Teil der APL-Bindungsstelle sein könnten [9].

2.2 Alzheimer'sche Krankheit

Wenn das Nervensystem beim Menschen nicht mehr einwandfrei funktioniert, manifestieren sich verschiedenste Krankheiten (z. B. Alzheimer, Parkinson oder Huntington). Über die Hintergründe der Alzheimer'schen Krankheit existieren viele Theorien und die zurzeit populärsten sollen in diesem Abschnitt kurz beschrieben werden.

Ihren Namen trägt die Alzheimer'sche Demenz (AD), auch Morbus Alzheimer genannt, aufgrund ihres Entdeckers, Alois Alzheimer, ein Arzt aus München, der 1907 eine Arbeit über eine neue Krankheit publizierte.

In dieser Veröffentlichung beschrieb A. Alzheimer die Symptome seiner Patientin Auguste D. folgendermaßen [10]:



„.... Eine Frau von 51 Jahren zeigte als erste auffällige Krankheitserscheinung... eine rasch zunehmende Gedächtnisschwäche...; sie fand sich in ihrer Wohnung nicht mehr zurecht... Sie ist zeitlich und örtlich desorientiert. Gelegentlich macht sie Äußerungen, daß sie alles nicht verstehe, sich nicht auskenne... Zeitweilig ist sie völlig delirant... und scheint Gehörshalluzinationen zu haben. Oft schreit sie viele Stunden lang mit gräßlicher Stimme. Ihre Merkfähigkeit ist aufs schwerste gestört. Zeigt man ihr

Gegenstände, so benennt sie dieselben meist richtig, gleich darauf hat sie alles wieder vergessen... Beim Sprechen gebraucht sie häufig Verlegenheitsphrasen, einzelne paraphrasische Ausdrücke... Den Gebrauch einzelner Gegenstände scheint sie nicht mehr zu wissen... Nach 4½ jähriger Krankheitsdauer tritt der Tod ein. Die Kranke war schließlich völlig stumpf, mit angezogenen Beinen zu Bett gelegen... “

In den folgenden Jahren wurde immer mehr über diese Krankheit bekannt: Es handelt sich bei ihr um eine degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche zu einem deutlichen Verlust an Nervenzellen im Gehirn führt (vgl. Abbildung 2.6).

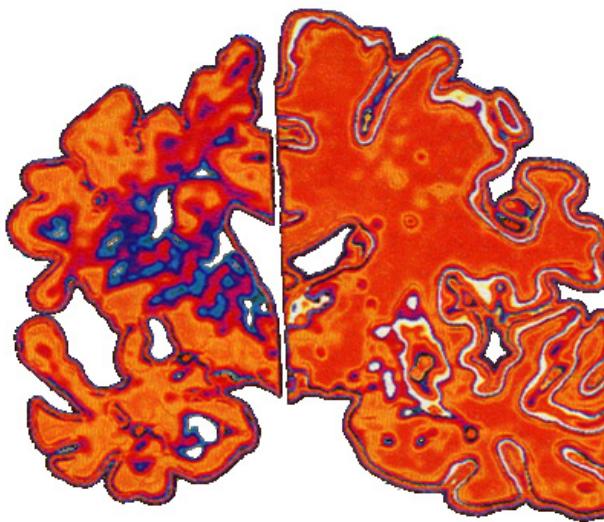


Abbildung 2.6: Schnitt durch das Gehirn eines Patienten, welcher an Alzheimer gestorben ist (links), und eines gesunden Menschen (rechts).

Aktuelle Arbeiten beschreiben die AD als ein Versagen der Synapsen, was den Erkenntnisstand gut zu erklären vermag, da sowohl frühe (mit Verlust der Synapsenaktivität) als auch späte Stadien (mit Verlust an Nervenzellen) beschrieben werden können [11]. Im Verlauf dieser Erkrankung, welche ultimativ zum Tode führt, verändern sich das Gedächtnis, das Denken und das Verhalten stark. Eine besondere Schwierigkeit bei der Diagnose ist das schleichende Voranschreiten der Krankheit und die Überlagerung mit normalen Alterserscheinungen der Patienten.

Das Auftreten der AD ist stark altersabhängig. Die Zahl der Erkrankten beläuft sich auf etwa 10 %

bei den über 65-Jährigen, wohingegen bei Personen älter als 85 Jahren etwa 50 % als betroffen gelten. Seltene vererbliche Formen der AD können schon in einem Alter von etwa 30 Jahren auftreten [12][13].

Es herrscht große Einigkeit darüber, dass die kritischen biologischen Ereignisse, welche zu den Symptomen führen, die Störung der Kommunikation zwischen Nervenzellen und deren Zerstörung sind. Über die Hintergründe dieses Verlustes an Gehirnzellen und über ein mögliches therapeutisches Vorgehen dagegen haben sich mehrere prominente Theorien herauskristallisiert. Dabei handelt es sich um die „cholinerge Hypothese“, die „Amyloid-Hypothese“, die „Tau-Theorie“ und einzelne Beobachtungen bei der Anwendung von verschiedenen Medikamenten. So ist z. B. aufgefallen, dass Personen, welche Östrogene oder Entzündungshemmer zur Therapie von Arthritis nehmen, ein geringeres Risiko einer Alzheimer-Erkrankung haben. Ebenso sind Blutdrucksenker bei der Behandlung von Herzkrankgefäß-Problemen positiv aufgefallen.

Speziell Entwicklungen aufgrund der „cholinergen Hypothese“ haben sich als sehr wirksam erwiesen, weil alle fünf bislang zugelassenen Medikamente auf dieser Hypothese beruhen. So sind vier der Substanzen AChE-Inhibitoren, also Liganden, welche die AChE blockieren und somit den Neurotransmitter-Spiegel bei einem Nervenimpuls länger aufrechterhalten. Das sind die Wirkstoffe Tacrin (als Cognex® seit 1995), Donapezil (als Arizept® seit 1997), Rivastigmin (als Exelon® seit 1999) und Galanthamin (als Reminyl® seit Anfang 2001) [14][15][16]. Galanthamin führt zusätzlich zu einer verstärkten Antwort auf einen Stimulus eines Neurotransmitters. Das neueste fünfte Medikament gegen AD am Markt (Memantine als Axura® seit 2003) reguliert das Wachstum, die Lebensdauer und die Reparatur von Nervenzellen und kann somit dem Verlust an Nervenzellen entgegenwirken.

Die „Tau-Theorie“ weist dem Tau-Protein eine kausale Rolle bei der Entstehung der AD zu [17]. Normalerweise ist das Tau-Protein dafür zuständig, das interne „Skelett“ einer Zelle zu formen und zu stabilisieren. Eben diese Fähigkeit geht bei Patienten der AD verloren. Dies führt so weit, dass die Tau-Proteine zu so genannten neurofibrillären Gewirr (engl. „neurofibrillary tangles“) aggregieren, welche maßgebliche Merkmale des Gehirnverfalls sind.

Ein zweites sehr entscheidendes Merkmal der Alzheimer'schen Erkrankung sind charakteristische Proteinablagerungen, die so genannten β -Amyloid-Plaques. Im Rahmen der „Amyloid-Hypothese“ wird versucht, von der Entstehung bis zu dem Abbau dieser Plaques wirksam einzugreifen [18]. Dies ist das zurzeit am intensivsten bearbeitete Gebiet. So sind z. B. die Hälfte aller Anträge, welche bei

der Alzheimer-Association zur Forschungsförderung eingehen, dieser Theorie zuzuordnen [19], und auch Beiträge dieser Arbeit basieren auf der Amyloid-Hypothese.

2.3 Amyloid-Hypothese

Im Rahmen der Amyloid-Hypothese spielen die β -Amyloid-Proteine ($A\beta$) eine entscheidende Rolle. Diese Proteine kommen in verschiedenen Längen zwischen 39 und 42 Aminosäuren vor, und speziell die vermehrte Produktion der Peptide mit 40 oder 42 Aminosäuren ($A\beta_{1-40}$ bzw. $A\beta_{1-42}$) scheint ein wichtiger Meilenstein bei der Entstehung der AD zu sein. Erzeugt werden die unterschiedlichen β -Amyloide durch die enzymatische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP, engl. „amyloid precursor protein“) an verschiedenen Stellen. Die verminderte Aktivität der α -Sekretase scheint für die vermehrte Produktion der verschiedenen Amyloide verantwortlich zu sein. Dieses Enzym sollte die Amyloide spalten, so dass die pathogenen Proteine nicht mehr produziert werden können. Als therapeutisches Ziel kommt zusätzlich die γ -Sekretase in Betracht, da eine vermehrte Aktivität dieses Enzyms zu einer stärkeren Produktion der Amyloide pathogener Länge führt. Somit könnte sich eine Inhibition positiv auswirken (vgl. Abbildung 2.7) [20].

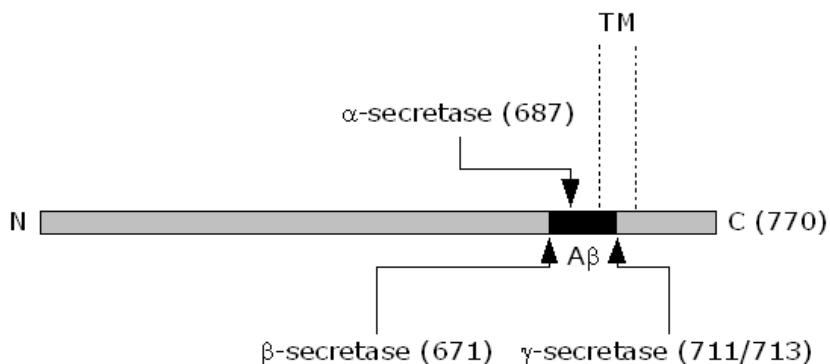


Abbildung 2.7: Skizze des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) mit den Angriffspunkten der verschiedenen Sekretasen. Erwähnenswert ist hier auch, dass der Schnittpunkt der γ -Sekretase in den transmembranen Teil (TM) des APP fällt [21].

Die verschiedenen so produzierten Proteine neigen zur Umfaltung in toxische Formen, die ihrerseits die Umfaltung zu beschleunigen scheinen. Die Analogie zu den Prion-Erkrankungen, wie z. B. Rinderwahnsinn oder Creutzfeldt-Jakob, lässt Synergien zwischen diesen beiden Feldern der For-

schung erwarten [22]. Im Laufe der Umfaltung oder im Anschluss daran aggregieren diese β -Amyloid-Proteine über Subprotofibrillen zu Protofibrillen und weiter zu Fibrillen [23], welche dann in Form der Plaques im interzellulären Raum gefunden werden (vgl. Abbildung 2.8). Die so entstandenen Plaques stehen im Verdacht neurotoxisch zu wirken [24] oder zumindest die interzelluläre Kommunikation stark zu beeinträchtigen.

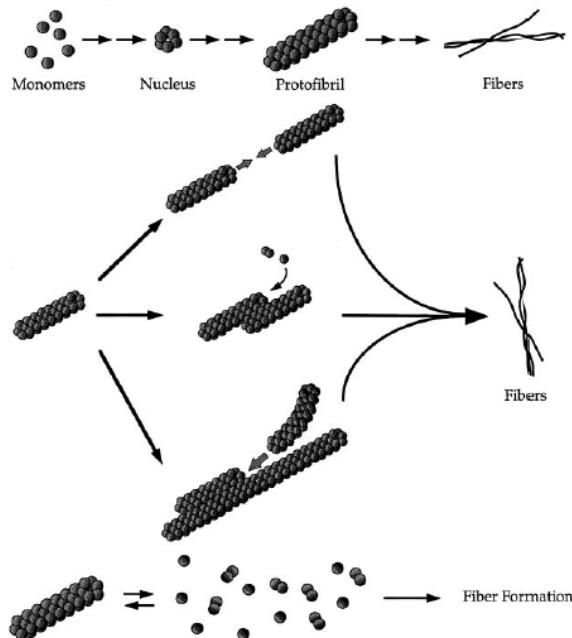


Abbildung 2.8: Drei potentielle Wege der Fibrillbildung: Ein strikt konsekutiver Weg (oben), ein Weg über assoziierende und wachsende Protofibrillen (Mitte) und ein Weg, welcher die Protofibrillen in Konkurrenz zu den Fibrillen sieht (unten) [25].

Hier ist die zuvor erwähnte AChE von Interesse, da nachgewiesen werden konnte, dass die AChE die Aggregation fördert [26][27]. In diesen Arbeiten konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die so genannte periphere anionische Bindungsstelle (PAS, engl. „peripheral anionic site“) dieses Proteins für die Aggregationsbeschleunigung verantwortlich ist. Die PAS liegt am Rande des Zugangs zur eigentlichen Substrat-Bindungsstelle der AChE und kann durch spezifische Inhibitoren blockiert werden, wodurch auch der beschleunigende Effekt der Ablagerung aufgehoben wird [28]. Sogar ein isoliertes Fragment der AChE aus 35 Aminosäuren, welches die PAS enthält, zeigte denselben beschleunigenden Effekt [29].

Dieser Prozess, illustriert in Abbildung 2.9, zeigt eine Reihe von therapeutischen Angriffszielen auf.

So könnten Inhibitoren der Sekretasen die Produktion der β -Amyloide verringern, und erste γ -Sekretase-Inhibitoren befinden sich bereits in Erprobung. Weiterhin wäre es denkbar, die Umfaltung zu blockieren oder zu einer nicht toxischen Form zu fördern. Die Aggregatbildung eignet sich ganz analog als Wirkstoffziel, indem man versucht, die Aggregation zu verhindern oder die Aggregate wieder aufzulösen [30].

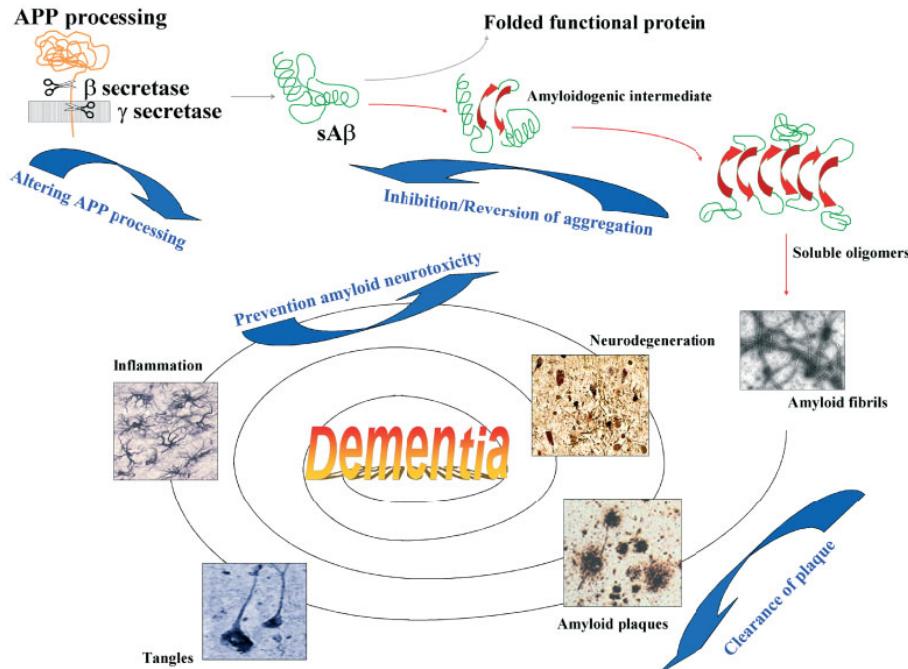


Abbildung 2.9: Amyloid-Kaskade, welche vier potentielle Angriffsziele zeigt (blaue Pfeile). Eine Veränderung der A β -Produktion, Verhinderung oder Umkehrung der Missfaltung, Entfernung der Plaques oder Absenkung des neurotoxischen Potentials [30].

Eine theoretische Untersuchung der verschiedenen Effekte wird durch die fehlenden strukturellen Informationen über die β -Amyloid-Peptide erschwert. Alle diese Peptide haben sich bislang erfolgreich einer Charakterisierung auf molekularer Ebene unter physiologischen Bedingungen entzogen. Es existieren einige Strukturlösungen basierend auf NMR-Untersuchungen, welche jedoch alle kritisch zu betrachten sind: Alle diese Untersuchungen wurden nicht unter physiologischen Bedingungen oder nur mit kurzen Fragmenten des jeweiligen β -Amyloids durchgeführt [31][32]. Die Strukturaufklärung der Peptide ist durch die experimentell sehr schwierigen Bedingungen beim Umgang mit ihnen eine große Herausforderung. So zeigt sich z. B. eine starke Abhängigkeit der Löslichkeit je nach

Lieferant oder Vorbehandlung des lyophilisierten β -Amyloids [33]. Aufgrund dieser Schwierigkeiten existieren neben den oben erwähnten NMR-Lösungen lediglich eine Röntgenstrukturanalyse der Fibrillen und ein Homologie-Modell des Monomeren. Dieses Modell wurde mit Hilfe der Homologie zu einem Proteinabschnitt der Triosephosphatisomerase und der Fähigkeit dieses Fragmentes zur Aggregation erstellt [34]. Die Röntgenstrukturanalyse der zuvor magnetisch ausgerichteten Fibrillen liefert sehr wichtige Erkenntnisse über die Struktur der endgültigen Fibrillen [35], sagt jedoch leider wenig über die frühen Schritte auf dem Weg zu den Fibrillen aus.

2.4 Homologie-Modellierung

Die Erstellung von Strukturmodellen für Proteine, von denen lediglich die Sequenz bekannt ist, ist heutzutage mit verschiedenen Methoden möglich [36]. Bei der Modellbildung aufgrund von Homologien werden dreidimensionale Modelle für ein Protein mit Hilfe von Verwandtschaften zu anderen Proteinen erstellt. Es muss dementsprechend ein homologes Protein existieren, von dem neben der Sequenz auch die atomare Struktur bekannt ist. Dieses kann dann als Vorlage, auch Templat genannt, dienen. In einem ersten Schritt müssen die beiden Sequenzen ausgerichtet (engl. „aligned“) werden, so dass einzelne Aminosäuren einander zugeordnet werden. Für die Bewertung eines solchen Alignments werden paarweise Austauschwahrscheinlichkeiten zweier Aminosäuren und Strafsterme für Lücken im Alignment in Matrizen gespeichert. Erwähnt werden sollen hier die von M. O. Dayhoff entwickelten klassischen PAM-Matrizen (engl. „percentage accepted mutation“), von denen z. B. eine PAM250-Matrix noch bei einer Sequenzübereinstimmung von 20 % akzeptable Ergebnisse liefert [37]. Als weiteres Beispiel einer neueren und robusteren Methode sei die im Verlauf dieser Arbeit verwendete T-Coffee Methode erwähnt [38].

In das Peptidrückgrat (engl. „backbone“) des Templat wird entsprechend des Alignments Aminosäuren eingefügt bzw. entfernt. Die Seitenketten werden bei identischen Aminosäuren übernommen und bei den übrigen durch die entsprechende mutierte Seitenkette ersetzt. Die Konformation der jeweiligen Seitenkette stammt daher aus dem Templat, wird in neueren Methoden aus Datenbanken geladen oder es werden erschöpfend alle Möglichkeiten auf der Suche nach der besten Konformation überprüft [39].

Ein derart erzeugtes initiales Modell muss sorgfältig inspiziert werden, wofür sich neben der manu-

ellen Untersuchung vor allem verschiedene automatische Evaluationsverfahren anbieten [40][41]. Im Allgemeinen ist zu erwarten, dass sich z. B. zu enge Kontakte zwischen Atomen, nicht ebene aromatische Seitenketten und andere Probleme ergeben, welche durch Energieminimierungen oder kurze Molekular-Dynamik-Berechnungen zu entfernen sind.

2.5 Molekular-Dynamik-Berechnungen

Molekular-Dynamik-Berechnungen (MD) erlauben es zurzeit, die dynamischen Bewegungen von ca. 10^6 Atomen über mehrere Nanosekunden zu simulieren. Die nachfolgenden Ausführungen sollen nur einen groben Überblick über die Methode vermitteln. Für eine detaillierte Beschreibung der MD-Berechnungen sei auf die Literatur verwiesen [42][43].

Prinzipiell müsste man für eine exakte Beschreibung der atomaren Bewegungen die zeitabhängige Schrödingergleichung

$$i\hbar\partial_t\Psi(R,r,t)=\hat{H}\Psi(R,r,t)$$

lösen, wobei r und R die Elektronen- und die Atomkernpositionen sind und \hat{H} der Hamilton-Operator ist, welcher die kinetische und potentielle Energie beschreibt. Da numerische Berechnungen dieser Art mit heutiger Rechenleistung nicht praktikabel sind, werden im Allgemeinen die folgenden drei Näherungen herangezogen, um die Systeme zu simulieren. Der erste Schritt zur Vereinfachung trennt die Kernbewegung von der Elektronenbewegung, die so genannte Born-Oppenheimer-Näherung. Diese basiert darauf, dass die Kernmassen um etwa drei bis vier Größenordnungen größer als die Masse eines Elektrons sind und daher die Wellenfunktionen der Elektronen jeder Kernbewegung sofort folgen. Das führt dazu, dass die Elektronen durch die zeitunabhängige Schrödingergleichung

$$\hat{H}_e\Psi_e(R,r)=E_e(R)\Psi_e(R,r)$$

beschrieben werden können. Daraus resultiert, dass die Kernbewegung nur vom Grundzustandspotential $E_e(R)$ abhängt und sich die zeitabhängige Schrödingergleichung für die Kernbewegungen somit zu

$$i\hbar\partial_t\Psi_N(R,t)=(T_N+E_e(R))\Psi_N(R,t)$$

ergibt. Die zweite Näherung verwirft den quantenmechanischen Ansatz und geht zurück auf die klassische Beschreibung der Bewegung anhand der Newtonschen-Bewegungsgleichungen für Punktmasse

$$m_i \frac{d^2}{dt^2} R_i = -\nabla E_e(R_1, R_2, \dots, R_N), i=1 \dots N$$

wobei m_i die jeweilige Kernmasse und R_i die jeweilige Kernposition beschreibt. Das letzte aufwändige Problem, welches durch die dritte Näherung vereinfacht wird, ist das Potential, welches im Allgemeinen durch semi-empirische Funktionen beschrieben wird. Hierzu werden verschiedene Potentialerme für die jeweiligen Energiebeiträge aufsummiert, von denen einige beispielhaft in Abbildung 2.10 dargestellt sind. Eine spezielle Ausprägung der möglichen Konstanten für die Potentialerme, welche durch ab-initio Rechnungen berechnet oder durch experimentelle Daten kalibriert werden, nennt man Kraftfeld (z. B. CHARMM [44], AMBER [45] u.v.m.).

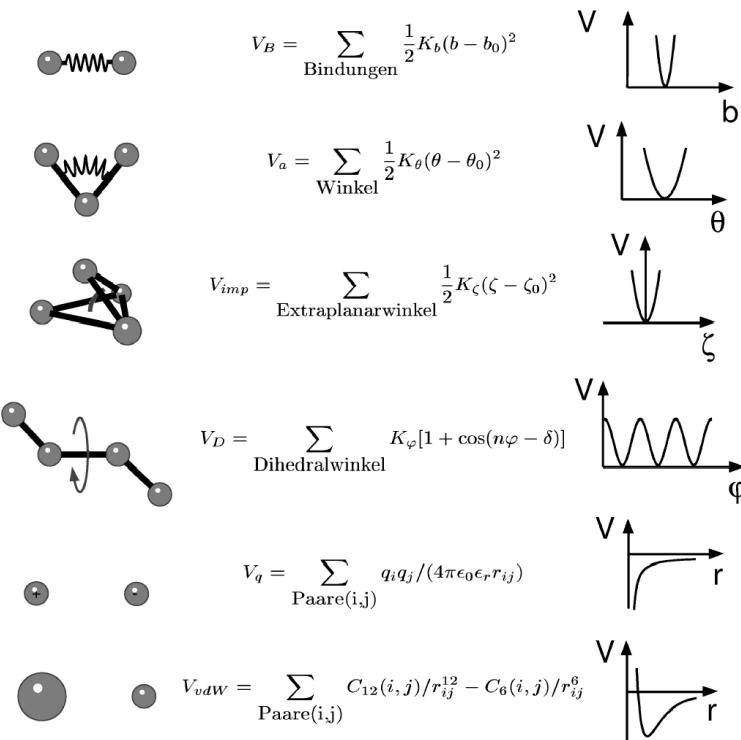


Abbildung 2.10: Potentialerme, welche ein Kraftfeld ausmachen. Hier sind die ersten drei Terme für die Bindungslängen, Bindungswinkel und Extrapolanarwinkel durch harmonische Potentiale beschrieben. Neben der Beschreibung des Potentials für Dihedralwinkel sind das Coulomb-Potential für elektrostatische Wechselwirkungen und das Lennard-Jones-Potential für van der Waals-Wechselwirkungen dargestellt.

Mit Hilfe dieser Näherungen lässt sich die Bewegung jedes Atoms durch Integration der Bewegungsgleichung berechnen. Diese Berechnung bestimmt die Kräfte, welche auf ein Atom wirken, um mit Hilfe der resultierenden Kraft die Position des Atoms für den nächsten Zeitpunkt in der Zukunft zu errechnen. Es wird davon ausgegangen, dass die Kräfte während dieses Schrittes in der Zeit (engl. „timestep“) konstant sind. Daher ist es verständlich, dass diese Schrittweite so klein wie möglich gewählt werden sollte. Zu kleine Schrittweiten führen allerdings dazu, dass die Berechnungen zu lange dauern. In Abbildung 2.11 sind für den trivialen Fall zweier Atome eine zu kleine, eine zu große und eine angemessene Zeitspanne illustriert, wobei sich für den letzten Fall Schrittweiten von ca. 1 bis 10 fs in der Praxis bewährt haben. Dies führt zu einer Trajektorie, welche Momentaufnahmen des Systems zu bestimmten Intervallen entlang der Zeitachse speichert und es ermöglicht, thermodynamische Größen als Zeitmittel zu bestimmen [46].

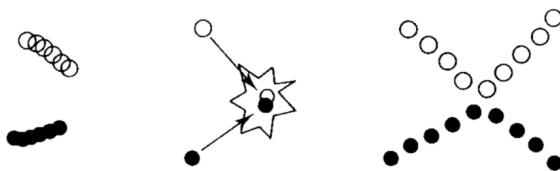


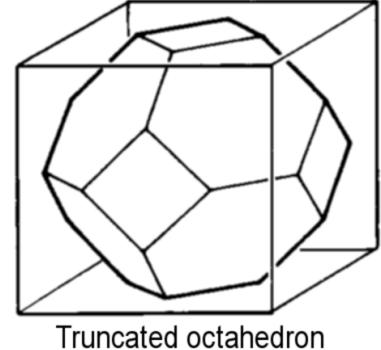
Abbildung 2.11: Drei mögliche Verläufe der Berechnung der molekularen Positionen je nach Wahl der Schrittweite. Im Fall ganz links ist die Schrittweite zu klein - es wird kaum Raum abgesucht, wohingegen im mittleren Fall die Schrittweite zu groß ist. Ganz rechts ist ein Fall aufgeführt, in dem die Schrittweite angemessen gewählt wurde [46].

Neben der Schrittweite bei der Simulation gibt es eine Vielzahl weiterer Parameter, welche von der Auswahl des Integrationsalgorithmus bis hin zu der möglichen Kopplung der Temperatur oder des Druckes - um diese Parameter während der Simulation konstant zu halten - reichen. Für einen kompletten Überblick sei das Handbuch zu der jeweiligen Software empfohlen (z. B. GROMACS [47]).

An dieser Stelle sei exemplarisch auf zwei kritische Parameter eingegangen: Zum einen die Form der verwendeten Elementarzelle und zum anderen die Methode zur Berechnung der weitreichenden Wechselwirkungen.

Um Oberflächeneffekte zu vermeiden, hat sich die Benutzung von so genannten periodischen Randbedingungen als sehr hilfreich erwiesen. Hierbei wird eine Elementarzelle, z. B. eine kubische, betrachtet, welche exakt wie bei Kristallen durch Wiederholungen ein unendliches Gitter aufspannt. Auf diese Weise scheint es für ein Molekül eine unendliche Umgebung zu geben, da am Rand der

Zelle ohne Übergang die gleiche Zelle wieder benutzt wird. Somit wird aber auch ein Abbild des Moleküls in allen Nachbarzellen existieren, und dies kann bei zu kleinen Abständen zu ungewollten Effekten führen. Aus diesen Gründen ist es einzusehen, dass eine optimale Zelle die Gratwanderung zwischen einem möglichst kleinen System - schnelle Simulation - und einem möglichst großen Abstand zwischen Bild und Abbild - keine Nebeneffekte - zu meistern hat. Als eine optimale Zelle für viele dieser Berechnungen hat sich der Kuboktaeder (engl. „truncated octahedron“) bewährt, weil diese Form den gleichen Abstand wie ein Würfel gewährleistet und das Volumen verringert. Ein Kuboktaeder hat im Vergleich zum Würfel abgeschnittene Ecken, wodurch das Volumen verkleinert wird. Eine ideale Zelle sollte daher so klein wie möglich sein, ohne dass sich Bild und Abbild zu nahe kommen. Allerdings spielt hier die Form des Objektes in der Zelle eine Rolle, und die Form kann sich durchaus während der Simulation ändern, so dass eine Zelle besser etwas zu groß als zu klein gewählt werden sollte.



Truncated octahedron

Wann „fühlt“ nun ein Bild sein Abbild? Dies hängt neben der Größe der Zelle vor allem von der Methode zur Berechnung der weitreichenden Wechselwirkungen ab. Zu den sehr schnellen Methoden zählen die cutoff-Methoden, bei denen ab einer gewissen Entfernung (engl. „cutoff distance“) die Wechselwirkungen einfach auf Null gesetzt werden. Dies führt dazu, dass während eines Schrittes in der Simulation nur direkte Nachbarn für die Berechnung in Frage kommen. Diese können sehr effizient in einer Liste gespeichert werden (engl. „neighbour list“), welche in regelmäßigen Abständen aktualisiert werden muss [48]. Allerdings führt diese Unstetigkeit des Potentials dazu, dass ein wenig Energie verloren geht. Diese muss dem gesamten System wieder zugeführt werden (z. B. in Form kinetischer Energie über die Kopplung zu einem Thermostaten), um die Erhaltung der Energie zu gewährleisten [46].

Als korrekteste Methode hat sich die Ewald-Summation etabliert, bei der die Ladungen auf einem unendlichen Gitter durch Annäherung mit Hilfe der schnellen Fourier-Transformation (FFT, engl. „fast fourier transformation“) berechnet werden. Diese gängige und hoch effiziente Methode steht als „particle mesh ewald“ (PME)-Summation zur Verfügung [49]. Durch die PME-Methode werden vor allem die elektrostatischen Interaktionen - Coulomb-Kräfte - deutlich besser beschrieben, da diese nur sehr langsam mit r^{-1} abnehmen. Die atomaren Fluktuationen, welche bei Berechnungen mit Hilfe

der PME-Methode gefunden werden, stimmen sehr gut mit experimentell bestimmten Temperaturfaktoren aus der Röntgenstrukturanalyse überein und sind etwa halb so groß wie bei Berechnungen mit cutoff-Methoden [50].

2.6 Hauptkomponentenanalyse

Bei der Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. „principle component analysis“) werden hochdimensionale Daten durch neue Variablen maximaler Varianz beschrieben, um somit durch wenige prinzipielle Variablen die gleichen Daten zu beschreiben [51]. In einem einfachen zweidimensionalen Beispiel wird ein neues Koordinatensystem erzeugt, so dass die eine Achse, welche der ersten prinzipiellen Komponente entspricht, so angeordnet wird, dass die Daten entlang dieser Achse maximale Varianz aufweisen. Im zweidimensionalen Fall ist die zweite Achse dann durch die Orthogonalität ebenfalls festgelegt.

Große Konformationsräume, wie sie die Ergebnisse einer MD-Simulation darstellen, lassen sich mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse elegant auf essentielle dynamische Bewegungen hin untersuchen. Dazu werden n Konformationen, welche jeweils von m Variablen abhängen, als n Punkte in einem m -dimensionalen Raum betrachtet. Die m Variablen entsprechen bei einer Konformation den drei Raumkoordinaten eines jeden Atoms, und somit ergibt sich m bei einem Molekül aus 100 Atomen zu 300. Die prinzipiellen Komponenten eines solchen m -dimensionalen Raumes wären demzufolge eine Menge von m orthogonalen Vektoren - eine Basis eines Vektorraumes. Diese Basis hätte zusätzlich die spezielle Eigenschaft, dass in ihr eine Ordnung existiert. Aufgrund dieser Ordnung zeigen die Daten entlang des ersten Vektors maximale Varianz, mit dem zweiten Vektor ist die zweitgrößte Varianz assoziiert und so weiter. In der Praxis hat sich gezeigt, dass bei korrelierten Daten fast die gesamte Varianz bereits in den ersten wenigen prinzipiellen Komponenten steckt, wodurch sich diese Transformation der Basis gut zur Datenaufbereitung eignet. Finden lässt sich eine solche Basis mit den entsprechenden Eigenschaften bezüglich der Varianz durch die Bestimmung der Eigenvektoren einer Kovarianzmatrix. Die Elemente S_{ij} der Kovarianzmatrix S lassen sich durch:

$$S_{ij} = \frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_{kj} - \bar{x}_j) \cdot (x_{ki} - \bar{x}_i), \text{ mit } 1 \leq i, j \leq m$$

berechnen. Hierbei sind \bar{x}_i der Mittelwert bezüglich der i -ten Variablen und $x_{k,i}$ die Ausprägung der i -ten Variablen im k -ten Experiment, was einer Konformation bei einer MD-Berechnung entspricht.

In einem einfachen Beispiel mit drei Variablen (z. B. Länge, Breite und Höhe flacher Plättchen) und fünf Experimenten seien folgende Ausprägungen der Variablen gegeben:

$$X = \begin{bmatrix} 4,0 & 2,0 & 0,60 \\ 4,2 & 2,1 & 0,59 \\ 3,9 & 2,0 & 0,58 \\ 4,3 & 2,1 & 0,62 \\ 4,1 & 2,2 & 0,63 \end{bmatrix}, \text{ und mit } \bar{x} = (4,1 \ 2,08 \ 0,604)$$

Mit Hilfe dieser Werte lässt sich dann die Kovarianzmatrix berechnen. Bemerkenswert ist, dass die klassische Varianz in der Diagonalen zu finden ist, wo $i = j$ gilt.

$$S = \begin{bmatrix} 0,02500 & 0,00750 & 0,00175 \\ 0,00750 & 0,00700 & 0,00135 \\ 0,00175 & 0,00135 & 0,00043 \end{bmatrix}$$

2.7 Flexibles Liganden-Docking

Flexibles Liganden-Docking versucht Liganden-Protein-Komplexe vorauszusagen. Allerdings liegt das Hauptaugenmerk einiger Programme nicht auf der exakten Vorhersage eines Komplexes, sondern auf der Verdichtung großer Liganden-Datenbanken. Verdichten bedeutet in diesem Zusammenhang, dass mehr gut als schlecht bindende Liganden gut bewertet werden und analog sollten die schlechten Liganden im Wesentlichen auch schlechter bewertet werden. Dies würde dazu führen, dass z. B. die bessere Hälfte der Datenbank mehr als die statistisch zu erwartenden 50 % der guten Liganden enthält [52].

Das Vorgehen aller Docking-Prozeduren besteht dabei im Grunde aus zwei Schritten: Zum einen aus der Konformationserzeugung und zum anderen aus der Bewertung (engl. „scoring“). Der erste Schritt, die Suche im Konformationsraum, ist dabei im Allgemeinen der langsame Schritt, da der Konformationsraum hochdimensional ist und erschöpfend abgesucht werden muss. Die Hochdimensionalität kommt durch die sechs Freiheitsgrade der Position im Raum und vor allem durch die vielen intramolekularen Freiheitsgrade des Liganden, wie z. B. Bindungslängen, Bindungswinkel,

Torsionswinkel oder Ringkonformationen, zustande. Wegen dieser großen Komplexität muss noch vieles stark vereinfacht werden. So werden bislang die Freiheitsgrade des Proteins, speziell die Seitenkettenflexibilität, wie auch Lösemitteleffekte weitgehend ignoriert, obwohl diese implizit in manchen Bewertungsfunktionen enthalten sind. Ein weiterer häufig übersehener Einfluss sind die verschiedenen möglichen Isomere eines Liganden. Denn die meisten Programme sind nicht in der Lage Stereoisomere, verschiedene Protonierungszustände oder gar Keto-Enol-Tautomere automatisch zu untersuchen. Aus diesem Grund müssen für einen Liganden verschiedene Isomere manuell erzeugt werden. Diese werden dann unabhängig voneinander gedockt. Problematisch ist nach diesem Vorgehen allerdings die Vergleichbarkeit der verschiedenen Ergebnisse, da Vorsicht geboten ist, um nicht „Äpfel mit Birnen“ zu vergleichen. Abgesucht wird der Konformationsraum für ein jeweiliges Isomer programmspezifisch mit verschiedenen Verfahren. So verwendet z. B. QXP statistische oder Monte-Carlo-Methoden [53], Autodock genetische Algorithmen [54] und FlexX inkrementelle Aufbaustrategien [55].

Das Scoring als zweiter Schritt des Dockings weist jeder berechneten Konformation eine Punktzahl (engl. „score“) zu, wobei diese Punktzahl die Bewertung von schlecht bis gut ermöglicht. Da unabhängig von der Technik, mit der eine Konformation erzeugt wird, alle Programme gleiche Konformationen absuchen sollten, macht das Scoring den wesentlichen Unterschied aus und entscheidet über Erfolg oder Misserfolg. Scorings reichen dabei von Kraftfeldern, mit denen Energien berechnet werden, bis zu analytischen Funktionen, welche die verschiedenen Wechselwirkungsarten aufsummieren [56]. In letzter Zeit haben sich zudem Kombinationen, so genannte Consensus-Scoreings, etabliert, welche viele verschiedene Scorings berechnen und dann daraus in geeigneter Kombination ein Fazit ziehen. Diese geeigneten Kombinationen wie auch die analytischen Funktionen werden dabei mit Hilfe experimenteller Daten kalibriert.

Um die Menge der gedockten Konformationen nach einem Docking-Lauf zu verdichten, werden die Ergebnisse einer Clusteranalyse unterzogen. Hierzu wird die beste Konformation, z. B. in Bezug auf die Energie, ausgewählt. Alle strukturell sehr ähnlichen Lösungen werden dann zusammengefasst, bilden einen Cluster und werden aus der Menge der Lösungen entfernt. Für die Berechnung der strukturellen Ähnlichkeit wird der RMSD-Wert (engl. „root mean square distance“), die Wurzel der gemittelten quadratischen Abweichung, herangezogen

$$RMSD = \sqrt{\sum \frac{(r_i - r'_i)^2}{N}}$$

wobei N die Anzahl der Atome in einer Konformation und r bzw. r' die Koordinaten der zusammengehörigen Atome zweier Konformationen sind. Ist auf diese Weise die Menge der Lösungen bearbeitet worden, so wird das gleiche Vorgehen iterativ wiederholt, bis alle Konformationen einem Cluster zugeordnet sind.

Vorsicht ist bei der Verwendung von RMSD-Werten aus zwei Gründen geboten, da einerseits der RMSD-Wert ein Mittelwert ist und somit viele kleine Abweichungen wenige große Abweichungen verstecken können. Andererseits besteht eine Schwierigkeit im Vergleichen unterschiedlicher Moleküle. In derartigen Fällen kann die Zuordnung der entsprechenden Atome in den beiden Molekülen schwierig sein, da z. B. unterschiedliche Atome existieren, wie beim Vergleich von Anilin mit Phenol. Für die Lösung derartiger Suchprobleme (engl. „matching“) existieren viele verschiedene Algorithmen je nach Aufgabe und Ziel [57].

3 Aufgabenstellung

Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, entscheidende Vorgänge an der cholinergen Synapse mit Hilfe von Molecular-Modelling Methoden zu untersuchen. Dazu sollten vor allem die APL-Wirkung am nAChR und der Aggregationsprozess des β -Amyloid-Peptids untersucht werden.

Da die APL-Bindungsstelle auf dem extrazellulären Teil der nAChR- α -Untereinheit lokalisiert ist, sollte zur Aufklärung der allosterisch potenzierenden Wirkung der Galanthamin-Derivate ein Modell der nAChR- α -Untereinheit erstellt werden, das mit den zur Verfügung stehenden experimentellen Daten in Einklang steht. Hierfür sollte auf Verfahren der Homologie-Modellierung zurückgegriffen werden, um so das Problem der Proteinfaltung bei der Vorhersage der dreidimensionalen Proteinstruktur zu umgehen. Mit Hilfe dieser Methode sollte für die bislang unbekannte dreidimensionale Struktur der nAChR- α -Untereinheit auf der Basis eines strukturell bekannten ACh-bindenden Proteins aus der Schneckenart *Lymnaea stagnalis* ein Strukturvorschlag erarbeitet werden. Zwar ist die Sequenzidentität der beiden Proteine mit ca. 30% an der unteren Grenze einer Sequenzvergleichbarkeit, aber das Vorgehen ist durch die ähnliche Funktion der beiden Proteine (bis hin zur Ligandenbindung) legitimiert. Die Verifikation und Verfeinerung dieses Modells sollte anschließend mit Hilfe von Dockingstudien erfolgen, die einen Vergleich von Komplexenergien mit experimentellen Affinitätsdaten erlauben. Zuerst sollte die ACh-Bindungsstelle untersucht werden, da für diese die meisten experimentellen Daten durch Bindungsstudien mit verschiedenen Liganden und durch Punktmutationen des Proteins vorliegen.

Erst wenn ein Modell sich in Bezug auf die ACh-Bindungsstelle als zuverlässig erwiesen hat, sollte die Lokalisierung der potentiellen APL-Bindungsstelle vorgenommen werden, da hierfür bislang nur vergleichsweise wenig experimentelle Daten zur Verfügung stehen. Diese beschränken sich einerseits auf einzelne Radiomarkierungsexperimente, sowie andererseits auf zum Teil noch unveröffentlichte elektrophysiologische Messdaten, die uns aus der Arbeitsgruppe Prof. Maelicke (Universität Mainz) zur Verfügung stehen.

Um Einblicke in das Faltungsverhalten des β -Amyloid-Peptids zu bekommen, sollte ein biophysikalisches Messverfahren zur Erfassung der Plaquebildung (Plaque-Assay) etabliert werden. Aus

ersten Experimenten in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Huber, Universität Paderborn, ergab sich, dass die Methode der statischen Lichtstreuung für dieses Vorhaben geeignet ist. Für den Plaque-Assay waren unter anderem die Probenmengen, die Probenaufbereitung, sowie die experimentellen Parameter der Lichtstreuungsmessungen zu optimieren. Für die kontinuierliche Bereitstellung der AChE, zur Untersuchung der AChE induzierten Aggregation, musste ein Aufreinigungsverfahren für AChE aus *Torpedo Californica* vor Ort etabliert werden, um von der derzeitigen Bezugsquelle (Dr. Lamba, CNRI, Triest, Italien) unabhängig zu werden.

Diese experimentellen Arbeiten zum Aggregationsprozess der β -Amyloid-Peptide sollten durch theoretische Untersuchungen vervollständigt werden. Hierzu sollte zunächst ein Homologie-Modell für das β -Amyloid-Protein während der Interaktion mit der AChE erstellt werden. Dieses sollte dann parallel zu den bekannten dreidimensionalen Strukturen des Monomers auf sein dynamische Verhalten in Lösung untersucht werden, um so ein Verständnis für wichtige Punkte innerhalb des Faltungswege des β -Amyloid-Proteins zu gewinnen.

4 Durchführung

4.1 Rezeptorarbeiten

4.1.1 Modellbildung

Dank der im Jahre 2001 veröffentlichten Röntgenstrukturanalyse eines ACh-bindenden-Proteins (AChBP) aus *Lymnaea stagnalis*, große Teichschnecke, stehen strukturelle Hinweise über das Aussehen einer ACh-Bindungsstelle zur Verfügung [58][59]. Dieses Protein dient der Schnecke zur Regulierung der synaptischen Funktion und bindet nAChR-Agonisten und kompetitive Antagonisten, wie Acetylcholin, Nikotin oder verschiedene Toxine. Diese funktionelle Ähnlichkeit des AChBP zu den nAChR, der Aufbau aus fünf gleichen α -Untereinheiten und die Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz (Tabelle 4.1) macht das AChBP zu einem hervorragenden Templat für die Homologie-Modellierung. Das AChBP entspricht lediglich dem extrazellulären Teil der Rezeptoren, aber weil der extrazelluläre Teil der nAChR die Bindungsstellen enthält, sollten Modelle aufgrund des AChBP in der Lage sein, die Bindetaschen gut wiederzugeben. Die eigentlichen Schaltungsvorgänge der Rezeptoren sollten schwieriger zu untersuchen sein, weil im AChBP keine analogen Abschnitte für den Transmembranteil und die intrazellulären Schlaufen vorhanden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Modelle für verschiedene nAChR erstellt. So ist für den menschlichen pentameren α_7 -Rezeptor (h_a7) ein Modell erstellt worden, weil er für das Gehirn der wichtigste Rezeptor ist. Zusätzlich sind der menschliche $\alpha_4\beta_2$ - (h_a4b2) und der α_7 -Rezeptor vom *gallus gallus*, Huhn, (gg_a7) modelliert worden, da diese beiden Rezeptoren in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Maelicke in Mainz experimentell untersucht werden können.

Tabelle 4.1: Statistische Informationen der Sequenz-Alignments. Die erste Zahl beschreibt die Ähnlichkeit und die zweite die Identität der beiden Aminosäuresequenzen (in Prozent).

	AChBP_α	gg_α ₇	h_α ₇	h_α ₄	tc_α ₁
gg_α ₇	52 / 25				
h_α ₇	53 / 25	98 / 94			
h_α ₄	42 / 21	65 / 64	65 / 44		
tc_α ₁	50 / 20	64 / 37	64 / 36	69 / 51	
h_β ₂	46 / 19	66 / 39	66 / 38	68 / 51	68 / 46

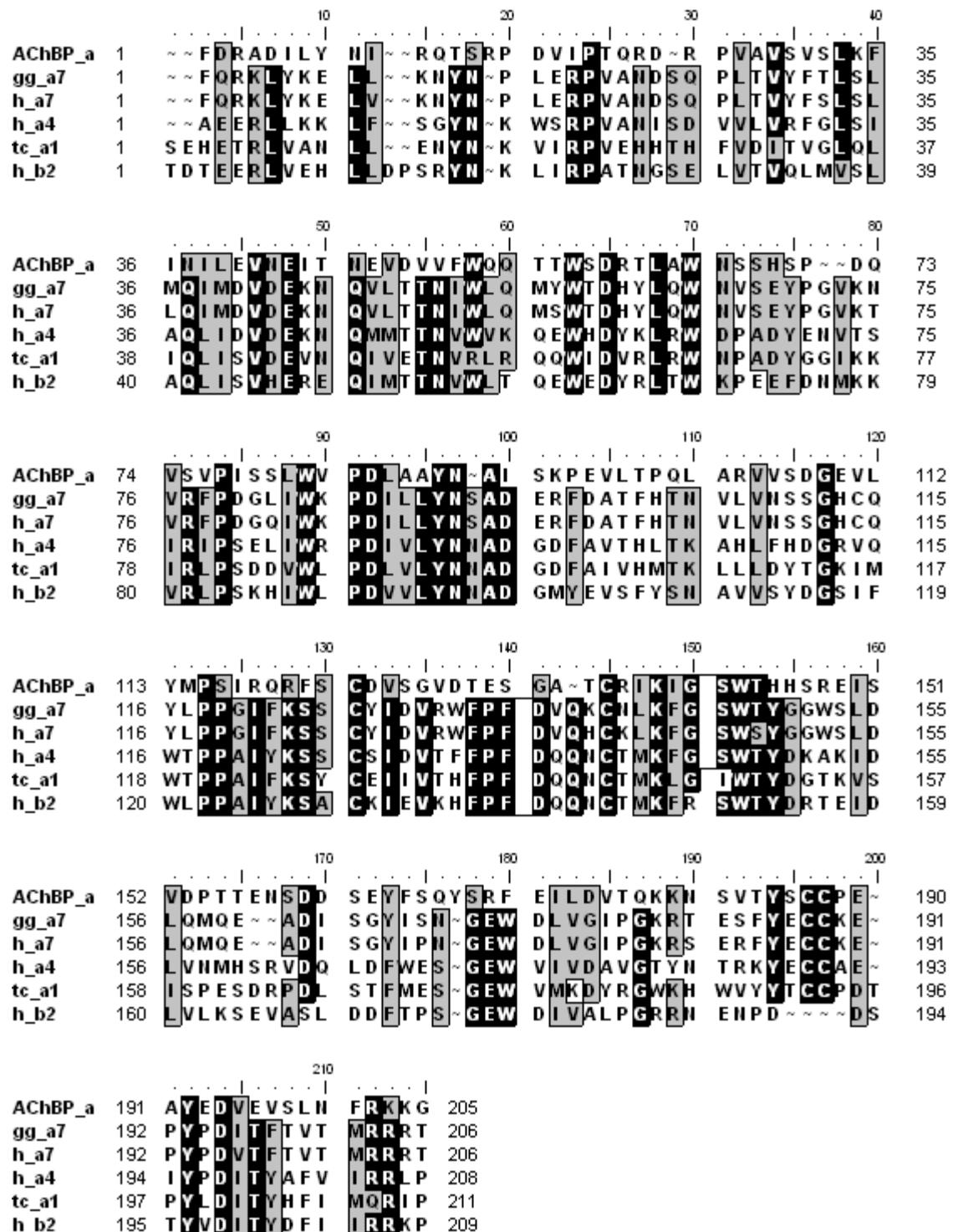


Abbildung 4.1: Sequenz-Alignment für den extrazellulären Teil verschiedener Untereinheiten des nAChR. An die α -Untereinheit des AChBP (AChBP_a) wurden Huhn α_7 (gg_a7), Mensch α_7 , α_4 und β_2 (h_a7, h_a4, h_b2) sowie *Torpedo californica* α_1 (tc_a1) aligned.

Die für die Modellierung notwendigen Alignments sind in Abbildung 4.1 aufgeführt. Zusätzlich zu den verschiedenen Untereinheiten für die zu modellierenden Rezeptoren ist auch die α -Untereinheit des *Torpedo Californica* aufgeführt, weil diese Teil des wichtigen $\alpha^2\beta\gamma\delta$ -Rezeptors aus diesem Zitterrochen ist. Die große Bedeutung dieses Rezeptors resultiert daraus, dass er relativ einfach in großen Mengen aus den elektrischen Organen der Zitterrochen gewonnen werden kann. Somit basiert eine Vielzahl der zur Verfügung stehenden experimentellen Daten auf diesem Rezeptor.

Allerdings verkompliziert das Alignment die Vergleichbarkeit der Aminosäuren aus verschiedenen Spezies oder Untereinheiten. Denn es ist sehr fehleranfällig, anhand des Alignments die sich entsprechenden Aminosäuren zweier Sequenzen zu identifizieren. Um dieses Vorgehen zu vereinfachen, wurden Abbildungstabellen erstellt und im Anhang B aufgeführt. Mit Hilfe dieser Tabellen kann einfach zu einer gewünschten Aminosäure die entsprechende homologe Aminosäure ermittelt werden.

In Abbildung 4.2 ist das Homologie-Modell des extrazellulären Teils des menschlichen homopentameren α_7 -Rezeptors dargestellt, wie es mit Hilfe des Swiss-Model-Servers erstellt worden ist (s. Kapitel 6.1.1). In dieser groben Ansicht unterscheidet es sich nicht von den anderen Modellen der verschiedenen Subtypen der nAChR und es sei an dieser Stelle wiederum auf Abbildung 2.4 verwiesen, wo der extrazelluläre Teil in Bezug auf die Membran und den gesamten Rezeptor dargestellt ist. Die pentamere Struktur ist links in Abbildung 4.2 durch die unterschiedlich gefärbten Untereinheiten zu erkennen und wird aufgrund der Form häufig mit einem „Donut“ verglichen.

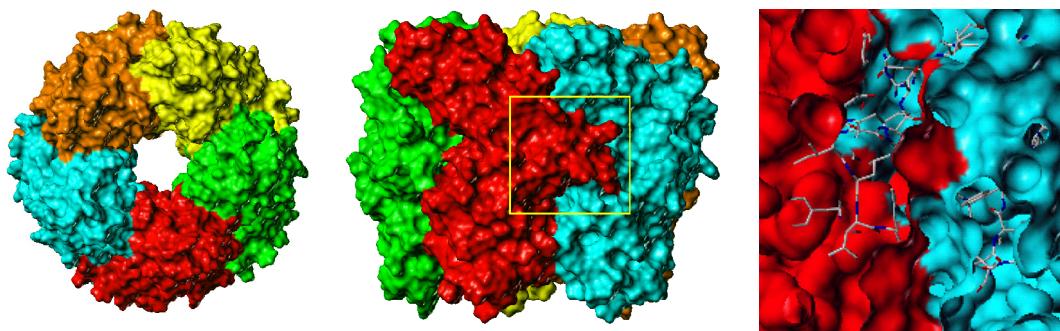


Abbildung 4.2: Gesamtstruktur der Modelle des extrazellulären Teils. Links ist der extrazelluläre Teil dargestellt, wobei durch den Kanal vom Zellinneren nach außen geblickt wird. Die mittlere Abbildung zeigt den gleichen extrazellulären Teil von der Kanalaußenseite betrachtet und die Bindetasche - der Kasten in der Mitte - ist rechts dargestellt, wobei der „Cys Loop“ weggeschnitten ist.

In der Mitte von Abbildung 4.2 ist der extrazelluläre Teil von außen betrachtet dargestellt, wo sich die Membran am unteren Bildrand befinden müsste. Zentral in der Abbildung ist die erste Untereinheit (rot) zu erkennen, welche einen „Finger“ nach rechts über die nächste Untereinheit ausstreckt. Dieser „Finger“ deckt dabei die Bindetasche von außen zu und wird aufgrund zweier benachbarter Cysteine „Cys Loop“ genannt. Wirft man einen Blick in die Bindetasche (vgl. Abbildung 4.2, links), indem der „Cys Loop“ weggeschnitten wird, so ist zu erkennen, wie die beiden Untereinheiten an ihrer Kontaktfläche die Rückseite der Bindetasche bilden - wo der rote und der blaue Bereich sich berühren. Einige Residuen rund um die Bindetasche sind zur Orientierung dargestellt.

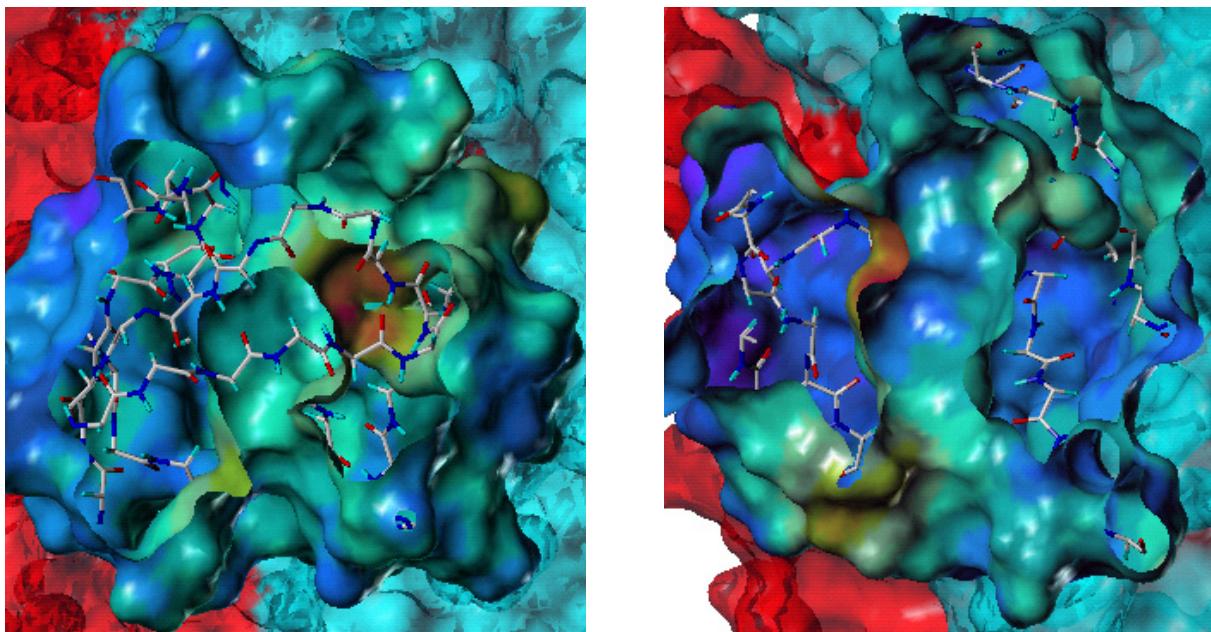


Abbildung 4.3: Die Bindetasche mit dargestelltem elektrostatischem Potential. Links kann man den „Cys Loop“ erkennen, welcher sich von links nach rechts über die Bindetasche erstreckt (links). Blickt man senkrecht auf die Kontaktfläche (rechts), wobei die Außenseite des Rezeptors links ist, kann man sowohl den oberen als auch den unteren Eingang zur Bindetasche sehen.

Betrachtet man die Bindetasche im Detail (Abbildungen 4.3 und 4.4), so kann man den „Cys Loop“ erkennen, wie er die Bindetasche von oben abdeckt (links). Links in der Abbildung 4.3 sind durch das elektrostatische Potential sogar die beiden Cys-Residuen zu lokalisieren, da an der Stelle der beiden Cysteine das elektrostatische Potential erhöht ist - erkennbar an der rötlichen Stelle. Das ansonsten geringe elektrostatische Potential innerhalb der Bindetasche und die hydrophobe Oberfläche (s. Abbildung 4.4) innerhalb der Tasche lassen sich gut in Einklang mit den aromatischen Seiten-

ketten der Aminosäuren bringen, welche die Bindetasche bilden.

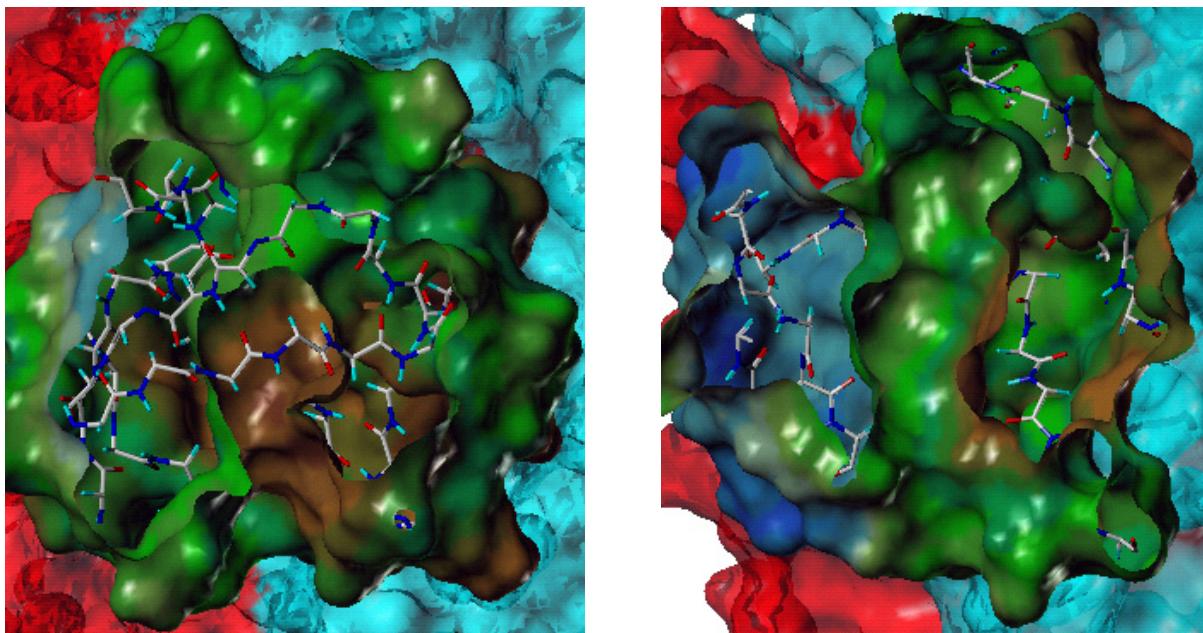


Abbildung 4.4: Die Bindungsstelle mit dargestelltem lipophilem Potential. Die Ansichten sind exakt die gleichen wie in Abbildung 4.3. Die Färbung erstreckt sich hierbei von blau als hydrophil über grün hin zu braun als lipophil und zeigt erwartungsgemäß, dass die Außenseite (der blaue Bereich am linken Rand) hydrophil und die Bindetasche selber eher lipophil (grün bis braun) ist.

4.1.2 Modell-Validierung

Überblick über den Stand der Forschung

Die Neurotransmitter- oder allgemeiner Agonistenbindungsstelle des *Torpedo Californica* $\alpha^2\beta\gamma\delta$ -Rezeptors wurde bereits mit Hilfe von Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten und Mutationsstudien analysiert [6]. In Tabelle 4.2 sind daraus die Aminosäuren angegeben, die eine räumliche Nähe oder einen Einfluss auf die Agonistenbindungsstelle zeigten. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Zitterrochen auf den Menschen oder das Huhn zu belegen, wurden die entsprechenden homologen Aminosäuren ebenfalls aufgeführt. Auffällig ist hier die vollständige Identität, wodurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse möglich sein sollte. Mensch und Huhn können gleich behandelt werden, da die beiden (α_7)⁵-Rezeptoren fast identisch sind und die Aminosäuren in der Sequenz die gleiche Nummerierung aufweisen.

Tabelle 4.2: Auszug der Bestandteile der ACh-Bindungsstelle im nAChR (aus *Torpedo Californica*), welche durch Photoaffinitätsmarkierungsexperimente mit Agonisten identifiziert wurden, und deren homologe Aminosäuren im homopentameren α_7 -Rezeptor aus Mensch oder Huhn.

schematische Bindungsstelle des $\alpha^2\beta\gamma\delta$ -Rezeptors aus <i>Torpedo Californica</i> [6]	homologe Aminosäuren aufgrund des Alignments beim $(\alpha_7)^5$ -Rezeptor (Mensch und Huhn)
α {Cys192, Cys193, Tyr198, Tyr190, Tyr93}, γ Trp55	α {Cys188, Cys189, Tyr193, Tyr186, Tyr91}, α Trp53

Basierend auf diesen und weiteren Daten konnte in der Literatur ein schematisches Modell der Bindungsstelle aufgestellt werden, welches in Abbildung 4.5 dargestellt ist.

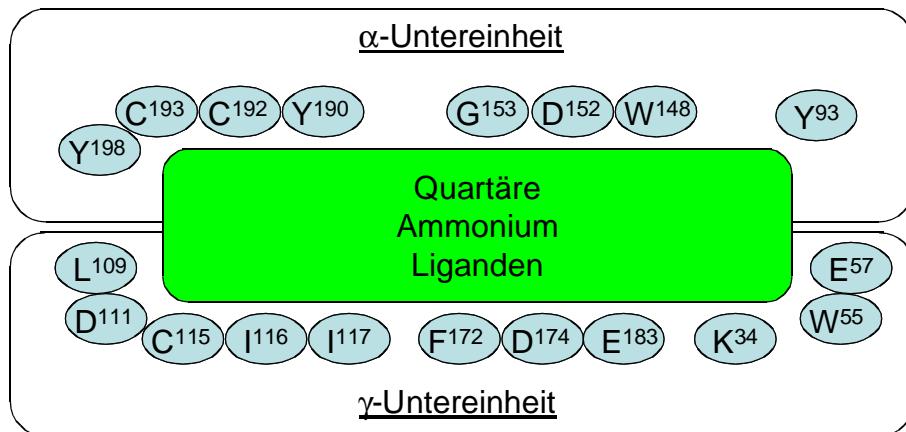
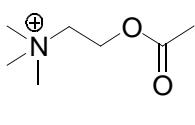


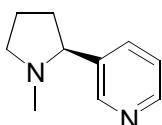
Abbildung 4.5: Schematische Bindetasche, wie sie durch diverse Experimente vorausgesagt wird [6]. An der Kontaktfläche zwischen einer α - und einer γ -Untereinheit, wo quartäre Ammonium-Liganden binden, konnten verschiedene Aminosäuren identifiziert werden.

Agonisten-Docking

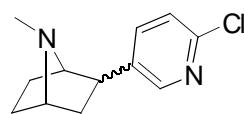
Ausgehend von diesen Erkenntnissen aus der Literatur konnte nun versucht werden, die Modelle zu validieren. Für diese Überprüfung der Agonistenbindungsstelle bieten sich Docking-Studien mit flexiblen Liganden an, und für eine positive Beurteilung sollten die Liganden in der Nähe experimentell identifizierter Aminosäuren binden. Von den möglichen Agonisten wurden Acetylcholin, (S)-(-)-Nikotin und (rac)-Epibatidin ausgewählt (vgl. Abbildung 4.6).



Acetylcholin



(S)-(-)-Nikotin



(rac)-Epibatidin

Abbildung 4.6: Drei verschiedene Agonisten für den nikotinischen AChR. Acetylcholin, (S)-(-)-Nikotin und (rac)-Epibatidin.

Aufgrund der pentameren Struktur des Templaats (AChBP) existieren auf den ersten Blick fünf gleichartige Bindetaschen. Allerdings sind die fünf Untereinheiten in der Röntgenstrukturanalyse nicht exakt gleich, sondern weisen kleinste Unterschiede auf, wodurch auch die fünf Bindetaschen in den Modellen marginale Unterschiede aufweisen. Diese Unterschiede sind mit dem bloßen Auge kaum wahrnehmbar, wie durch Überlagerung aller fünf Bindungsstellen in Abbildung 4.7 demonstriert wird, und betragen gerade einmal 0,48 Å im Mittel. Im linken Teilbild ist die Innenseite des „Cys Loops“, aus der Bindetasche heraus betrachtet, dargestellt. Der „Cys Loop“ ist die zentrale Schleife, die anhand des Peptidrückgrates (türkis) zu erkennen ist, und an dessen Spitze die beiden Cys-Residuen zu sehen sind. Diese sind durch die (gelbe) Cys-Brücke verbunden und das Cys188 ist namentlich kenntlich gemacht. Durch die blaue Färbung der Atome ist in dieser Abbildung eine größere Variation der Atome in den fünf Bindetaschen visualisiert. Das rechte Teilbild stellt den komplementären Teil der Bindungsstelle dar, es wird also von der Bindetasche aus in das Rezeptorinnere geblickt. In diesem Bild sind auch die Aminosäuren hinter der ersten Schicht zu erkennen, welche so dargestellt sind, dass sie schnell verblassen.

Diese beiden Abbildungen sollen einen Eindruck vermitteln, dass die Bindetaschen sich sehr stark ähneln und die meisten Unterschiede im Bereich des „Cys Loops“ und des Trp53 liegen.

Um unvoreingenommen zu docken, wurde das gesamte pentamere Protein mit ca. 8.500 Schweratomen und nicht nur eine Teilmenge des Proteins benutzt. Zudem wurde die zu untersuchende Bindetasche nicht vorgegeben. Dies bedeutet, dass die Liganden sich an jeder beliebigen Stelle des Proteins anlagern können, was wiederum bei der Auswertung zu berücksichtigen ist.

So können also zwei Docking-Lösungen in zwei verschiedenen Kontaktflächen die exakt gleiche Anordnung in Bezug auf die umgebenden Aminosäuren aufweisen und sollten daher als gleichwertig betrachtet werden. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse einer Koordinatentransformation und

einer Clusteranalyse unterzogen, deren Details dem Kapitel 6.1.3 entnommen werden können.

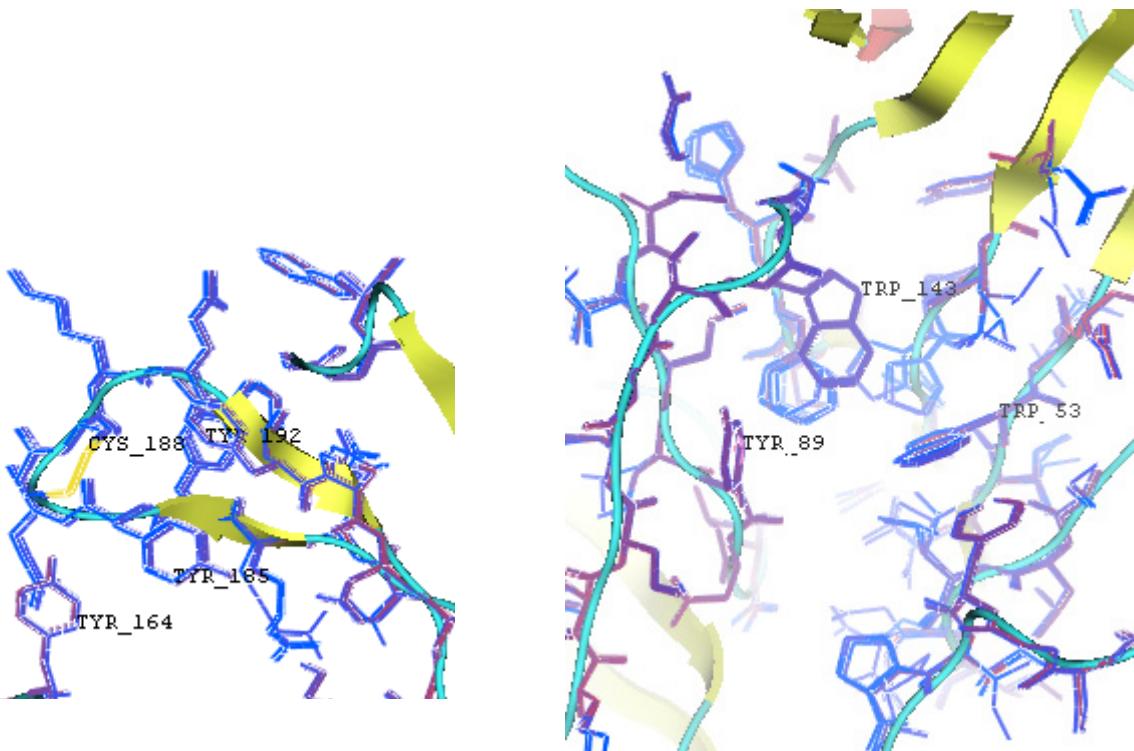


Abbildung 4.7: Überlagerung der fünf Bindetaschen des menschlichen $(\alpha_7)^5$ -Rezeptors. Der Standpunkt des Betrachters ist in der Agonistenbindetasche, wobei im linken Bild nach außen geblickt wird, was nur den „Cys Loop“ sehen lässt. Rechts ist der Blick zum Rezeptorinneren gerichtet, wodurch die Rückseite der Bindetasche zu sehen ist. Die Aminosäuren sind derart eingefärbt, dass ihre Flexibilität von gering (rot) bis stark (blau) erkennbar ist. Flexibel erscheinen in beiden Darstellungen der gesamte „Cys Loop“ und innen in der Bindetasche das Trp53.

Betrachtet man nun die Ergebnisse für das ACh, und diese wie zuvor angedeutet in allen fünf Bindetaschen gleichwertig, so fällt auf, dass von 100 berechneten Docking-Lösungen nach einer Clusteranalyse nur noch 24 strukturell verschiedene Bindemodi übrig bleiben. Die Clusteranalyse betrachtet dabei Strukturen mit RMSD-Werten kleiner 1,5 Å als strukturell gleichwertig und ordnet sie demselben Cluster zu. In Tabelle 4.3 sind die ersten 10 Cluster dieser Analyse aufgeführt, welche bereits 70 % aller gefundenen Docking-Lösungen enthalten.

Zu jedem Cluster sind in Tabelle 4.3 die RMSD-Werte in Bezug auf die beste Docking-Lösung aufgeführt, die zusammen mit den Distanzen zwischen den quartären Stickstoffatomen ein Maß dafür sind, ob eine Docking-Lösung in der Bindetasche ist. Zusätzlich zu den Angaben, in welcher

Kontaktfläche der jeweiligen Cluster-Vertreter gefunden wurde, und der Größe des jeweiligen Clusters ist auch eine Beurteilung der Lage des Liganden gegeben. Die Beurteilung beschreibt dabei die Ausrichtung der Liganden in der Bindetasche als „nach oben“ oder „nach unten“ gerichtet, weil der Acetylrest des ACh in der Neurotransmitter-Bindungsstelle zum oberen oder zum unteren Eingang der Bindetasche zeigen kann. Die aufgeführten Cluster außerhalb der Bindetasche sind „unten vor“ dem Eingang zur Bindetasche oder ganz an der „Oberkante“ des extrazellulären Teils des Rezeptors zu finden.

Tabelle 4.3: Ergebnisse von den Docking-Simulationen des ACh gegen das menschliche α_7 -Homopentamer. Die 100 gedockten Lösungen fallen in 24 Cluster, von denen hier nur die ersten 10 angegeben sind, die bereits 70 Konformationen enthalten. Zu jedem Cluster sind die Docking-Energie und der RMSD-Wert relativ zur besten Konformation angegeben, in welcher Kontaktfläche die Docking-Lösung gefunden wurde, die Distanzen des quartären Stickstoffatoms relativ zur besten Lösung, die Größe des jeweiligen Clusters und eine qualitative Beurteilung der Lage.

Cluster	Energie [kJ/mol]	RMSD [Å]	Kontaktfläche	Distanz [Å]	Cluster- Größe	Beurteilung
1	-6,464	0,000	BC	0,000	10	nach unten
2	-5,786	5,839	BC	0,466	7	nach oben
3	-5,734	2,529	CD	1,064	6	nach unten
4	-4,978	8,504	EA	9,885	18	unten vor
5	-4,962	1,640	AB	0,714	2	nach unten
6	-4,797	8,230	AB	9,613	4	unten vor
7	-4,762	6,172	CD	0,314	10	nach oben
8	-4,654	32,186	BC	29,919	3	Oberkante
9	-4,606	9,277	AB	10,830	7	unten vor
10	-4,565	6,790	BC	0,885	3	nach oben

Besonders bemerkenswert ist die Lage des quartären Stickstoffatoms, welches nahezu unabhängig von der sonstigen Ausrichtung des Moleküls immer an der gleichen Position im Raum gefunden wird (vgl. Abbildung 4.8).

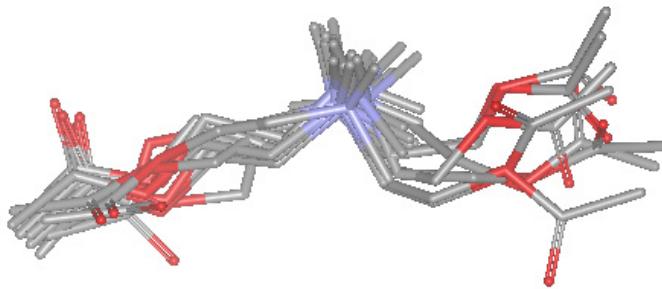


Abbildung 4.8: Überlagerung einiger Vertreter der ACh-Cluster, welche innerhalb der Agonistenbindetasche zu finden sind. Die Distanz der Stickstoffatome der hier ausgewählten Docking-Lösungen beträgt nicht mehr als 0,47 Å.

Betrachtet man nun die Wechselwirkungen der verschiedenen Docking-Lösungen des ACh mit den umgebenden Aminosäuren des Rezeptors, so fällt bereits für den ersten Cluster auf (vgl. Abbildung 4.9 links), dass die erwartete Bindungsstelle gut wiedergefunden wird.

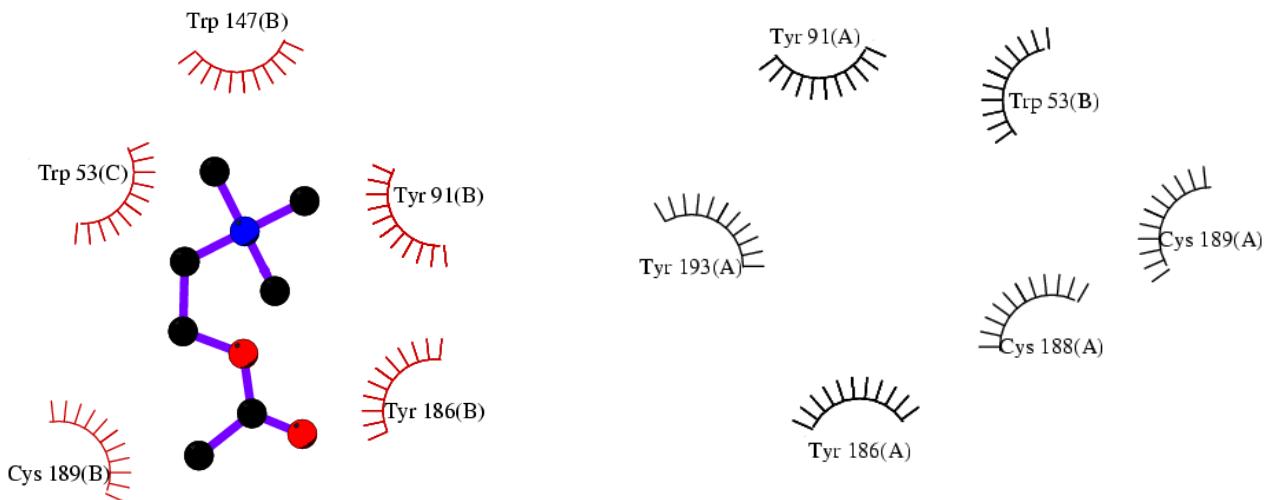


Abbildung 4.9: Darstellung der Wechselwirkungen zwischen ACh (dem besten Treffer) und dem Rezeptor (links) sowie der Bindetasche, welche durch die Wechselwirkungen der verschiedenen Acetylcholine gebildet wird (rechts). Die angegebenen Buchstaben in Klammern beschreiben die Untereinheit, zu welcher die jeweilige Aminosäure gehört. Unabhängig davon, ob die AB- (rechts) oder die BC-Kontaktfläche (links) benutzt wird, bilden die gleichen Aminosäuren die Bindetasche.

Überlagert man alle ACh-Bindemodi, die in der Bindungsstelle gefunden werden, so ergibt sich ein Bild der Bindungsstelle, das genau dem entspricht, das aufgrund der Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten mit Hilfe verschiedener Agonisten zu erwarten ist (vgl. Abbildung 4.9 rechts). So werden alle homologen Aminosäuren zu den in der Literatur beschriebenen gefunden (vgl. Tabelle 4.2).

Bei Docking-Studien des (S)-(-)-Nikotins stellt der Protonierungszustand ein Problem dar, da Nikotin zwei Stickstoffatome enthält, die prinzipiell beide protonierbar sind. Das Stickstoffatom des Pyrrolidinrings (pK_a -Wert von 7,9) sollte bei einem physiologischen pH von 7,4 zu etwa 68 % protoniert vorliegen, wohingegen die Protonierung des Pyridinrings (pK_a von 3,1) eher unwahrscheinlich ist¹. Allerdings können diese Verhältnisse in einer Bindetasche vollkommen anders liegen, wenn z. B. durch die Anwesenheit eines Protons am Pyridinring eine Wasserstoffbrückenbindung den Komplex hinreichend stabilisieren könnte. Aus diesem Grund wurde keine der Möglichkeiten bevorzugt und alle möglichen Isomeren des (S)-(-)-Nikotins in Betracht gezogen. Dies führte zu acht diskreten (S)-(-)-Nikotinstrukturen, wobei einerseits die Ringkonformation des Fünfringes zwischen axial (aS) und äquatorial (eS) variiert und andererseits das Pyridin- (pyrH) bzw. Pyrrolidin-Stickstoffatom (N4H) protoniert oder unprotoniert wurde. Die Möglichkeit einer zweifachen Protonierung wurde ausgeschlossen. Daher wurden sechs verschiedene Isomere gedockt, was zu insgesamt 600 Docking-Lösungen führt. Generell sind in dieser Arbeit keine Docking-Experimente mit Liganden, die mehr als ein protoniertes Atom besitzen, durchgeführt worden.

Behandelt man alle Docking-Ergebnisse gleich und betrachtet nur die insgesamt besten zehn (aufgeführt in Tabelle 4.4), so ist das Bild weniger klar als im Falle des ACh. Man kann jedoch die deutliche Bevorzugung des Pyrrolidin-protonierten Nikotins erkennen. So tauchen in der Tabelle 4.4 überhaupt nur eine unprotonierte und eine am Pyridinring protonierte Docking-Lösung auf. Speziell die unprotonierten Docking-Lösungen lassen sich leicht durch die schlechteren FlexX-Energien disqualifizieren. Dies steht im Einklang damit, dass keine unprotonierte Lösung in Wechselwirkung mit der Bindetasche gefunden wird. Von den Pyridin-protonierten Nikotinen werden zwar einige in der Nähe der Bindungsstelle gefunden, diese werden aber im Allgemeinen schlechter bewertet als die Docking-Lösungen mit protoniertem Pyrrolidin-Stickstoffatom. Eine Beurteilung der Strukturen ist in Tabelle 4.4 nicht aufgeführt, weil lediglich der achte Cluster (Distanz 2,435) in der Bindetasche zu finden ist. Die Einteilung der Docking-Lösungen lässt sich bequem durch die Distanzen ablesen, weil die Distanzen den Abstand des Pyrrolidin-Stickstoffatoms von der Position des Stickstoffatoms in der besten ACh-Lösung beschreiben. Die erste Docking-Lösung (Distanz 12,477) kann als Beispiel für eine Struktur am unteren Zugang zur Agonistenbindetasche betrachtet werden. Die Cluster 2 und 10 (Distanzen 11,358 und 11,240) sind außen auf dem „Cys Loop“ platziert.

1 <http://web.ucr.edu/web/schools/CNAS/entm/tmiller/1/modules/page30.html>

Tabelle 4.4: Die insgesamt besten zehn Cluster des Nikotin-Dockings. Aufgeführt ist jeweils ein Vertreter, die beste Energie (FlexX Score), der RMSD-Wert im Vergleich zum besten Treffer, die Kontaktfläche, in welcher die Lösung gefunden wurde, die Distanz zu einem fixen Punkt innerhalb der Bindetasche und die Größe des jeweiligen Clusters.

Cluster	Vertreter	Energie [kJ/mol]	RMSD [Å]	Kontakt- fläche	Distanz [Å]	Cluster- Größe
1	aS_N4H_001	-14,900	0,000	CD	12,477	6
2	eS_N4H_001	-14,38	19,886	EA	11,358	2
3	eS_N4H_002	-14,112	32,006	BC	24,955	9
4	eS_N4H_004	-13,831	23,617	CD	20,610	8
5	aS_pyrH_001	-13,749	33,597	DE	29,037	1
6	eS_N4H_005	-13,526	22,904	CD	30,470	8
7	eS_N4H_008	-13,398	32,332	DE	26,098	4
8	eS_N4H_010	-13,265	13,923	AB	2,435	4
9	eS_001	-13,116	23,131	CD	14,198	2
10	eS_N4H_012	-12,841	8,466	AB	11,240	13

Untersuchungen der detaillierten Wechselwirkung der Nikotine mit dem Rezeptor (dargestellt in Abbildung 4.10) zeigen wesentliche Bestandteile der Bindetasche, indem die Aminosäuren Trp53, Tyr91, Cys189 und Tyr193 gefunden werden (vgl. Tabelle 4.2). Die beste gedockte Konformation (links in Abbildung 4.10) zeigt die Wechselwirkungen am unteren Zugang zur Bindetasche, wo bereits Trp53 und Tyr91 lokalisiert sind. Die Aminosäure Tyr193, welche in Experimenten am stärksten radioaktiv markiert wurde (80 % der Radioaktivität [60]), wird dagegen erst bei dem achten Cluster gefunden. Wie zuvor angedeutet ist dieses Bild nicht so klar wie bei den ACh-Untersuchungen. Wenn aber Docking-Lösungen in der Agonistenbindetasche gefunden werden, so zeigen diese die erwarteten Wechselwirkungen.

Mit (rac)-Epibatidin als dritten und größten Liganden sind die Docking-Experimente noch problematischer als beim Nikotin, da die Zahl der Isomeren, welche zu berechnen sind, sich in diesem Fall auf zwölf verschiedene beläuft. Dies röhrt daher, dass das verbrückende Stickstoffatom ein Pseudo-Stereozentrum darstellt und protoniert werden kann.

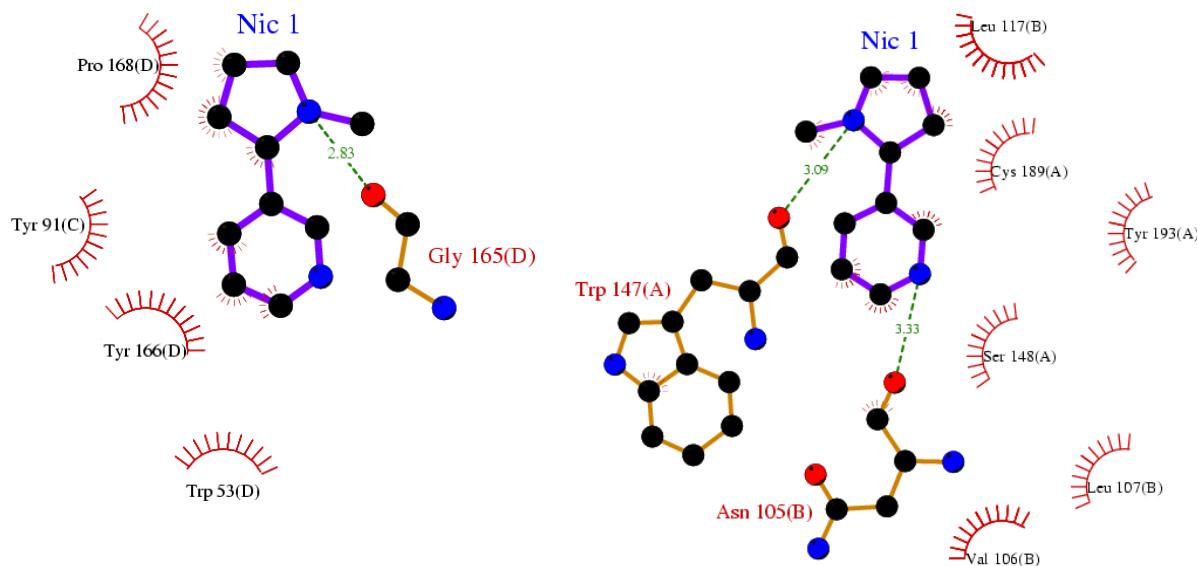


Abbildung 4.10: Bindemodi zweier (S)-(-)-Nikotin-Docking-Lösungen, bei denen zum einen die energetisch beste Lösung (links) und zum anderen die beste Lösung in Bezug auf die Bindungsstelle (rechts) dargestellt ist. Der Ligand (blau) und Aminosäuren, zu denen Wasserstoffbrückenbindungen (grün gestrichelte Linie) existieren, sind mit allen Schweratomen dargestellt. Alle übrigen Wechselwirkungen sind schematisch (rot) dargestellt.

Somit ergeben sich für das Stickstoffatom vier Möglichkeiten (n7R, n7S, n7RH oder n7SH). Zusätzlich gibt es ein echtes Stereozentrum am C4 (c4R oder c4S) und abschließend kann das Pyridin-Stickstoffatom protoniert werden (pyrH). Dies führt zu theoretisch sechszehn verschiedenen Isomeren, von denen vier doppelt protonierte nicht diskutiert werden. Bei den einfach positiv geladenen Liganden (entweder n7RH, n7SH oder pyrH) lassen die Energien keine Unterscheidung zu. Es werden jedoch in allen Fällen einige Docking-Lösungen von außen an der Bindetasche und genau eine Docking-Lösung (c4S, n7S, pyrH) in der Bindetasche gefunden. Von den ungeladenen (rac)-Epibatidin-Konformationen ist das (c4S, n7S)-Isomer sehr auffällig, weil es in mehreren Clustern innerhalb der Bindetasche gefunden wird, obwohl die Energien etwas höher liegen.

Für das (rac)-Epibatidin ist der Vergleich mit den Ergebnissen vom $(\alpha_4)^2(\beta_2)^3$ -Rezeptor interessant, da (rac)-Epibatidin ein besonders guter Agonist für diesen Rezeptor ist. Doch leider ist aufgrund der Docking-Ergebnisse am $(\alpha_4)^2(\beta_2)^3$ -Rezeptor keine eindeutige Aussage möglich. Zwar fallen die Energien etwas niedriger aus, die Docking-Lösungen bleiben jedoch für diesen anderen Rezeptor-Subtyp ebenso ungeordnet wie zuvor. Für die Validierung der Neurotransmitter-Bindungsstelle

bringt (rac)-Epibatidin dementsprechend keine neuen Erkenntnisse, und im Wesentlichen ergibt sich das gleiche Bild wie beim (S)-(-)-Nikotin.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit steigender Größe der Liganden die Ergebnisse unklarer werden. Das kleine ACh zeigt ein sehr schönes und konsistentes Bild, wohingegen (S)-(-)-Nikotin und (rac)-Epibatidin weniger klare Antworten liefern. Dieser Befund lässt sich allein durch die Größe der Liganden erklären, da das AChBP, welches als Templat diente, ohne Liganden kristallisiert wurde. Somit wird die Bindetasche stärker geschlossen sein als im Zustand eines gebundenen Liganden. In der PDB-Datei („Protein Data Base“ [61]) des AChBP ist zwar ein Puffermolekül (HEPES) in der Bindetasche anwesend. Da dieses jedoch aufgrund geringer „Restelektronendichte“ hinein modelliert wurde, ist es zweifelhaft, dass dieses Molekül in jeder Bindetasche steckt. Da die Röntgenstrukturanalyse aber ein Mittel aller Strukturen liefert, wird die Bindungsstelle aufgrund von Bindetaschen ohne Ligand nicht vollkommen offen sein.

Neben der beschriebenen geringen Elektronendichte innerhalb der Bindetasche lässt sich dies auch durch die hohen Temperatur-Faktoren (B-Faktoren) z. B. am „Cys Loop“ belegen, weil durch die hohen B-Faktoren eine gewisse Flexibilität dieser Bereiche beschrieben wird. Auch dies ist ein Anzeichen dafür, dass es eine Verteilung zwischen offenen und geschlossenen Bindetaschen gibt.

Weiterhin kann das gute Abschneiden des ACh im Vergleich zum Nikotin durch die Gleichgewichtskonstanten unterstrichen werden, welche für ACh bei etwa 15 nM [62] und für Nikotin bei etwa 600 nM [60] liegen.

Die ACh-Bindungsstelle der Modelle entspricht den experimentellen Daten, da die Aminosäuren, welche die Bindungsstelle bilden, denen bei Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten identifizierten entsprechen. Weiterhin werden die ausgewählten Liganden bei Docking-Simulationen innerhalb der Bindetasche platziert, wobei lediglich die genaue Orientierung nicht identifizierbar ist. Die genaue Lage, also z. B. „nach oben“ oder „nach unten“ beim ACh, ist auch gar nicht das Ziel der meisten Docking-Programme (s. Einleitung). Zudem ist nicht festgelegt, dass nur die eine korrekte Lage eines Liganden in einer derartigen, zweiseitig offenen Bindetasche existiert.

Die Ausführungen dieses Abschnittes basieren vollständig auf den Simulationen am extrazellulären

Teil des menschlichen (α_7)⁵-Rezeptors. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die analogen Untersuchungen mit den übrigen Modellen nicht aufgeführt, da deren Analyse zu keinen anderen Erkenntnissen führt. All diese Untersuchungen sorgen für Vertrauen in die Modelle, und daher konnte der zweite Schritt, die Charakterisierung der APL-Bindungsstelle, gewagt werden.

4.1.3 Lokalisierung der APL-Bindungsstelle

Überblick über den Stand der Forschung

Die Identifizierung der APL-Bindungsstelle gestaltet sich im Gegensatz zu der ACh-Bindungsstelle schwieriger, da sich die experimentellen Daten auf nur ein Photoaffinitätsmarkierungsexperiment und eine Bindungsstudie mit einem Antikörper beschränken. Wie zuvor für die ACh-Bindungsstelle wurde der Rezeptor mit einem radioaktiven Liganden, in diesem Fall [³H]-(-)-Physostigmin, markiert [8]. Die Analyse führte zu dem Ergebnis, dass lediglich die Aminosäure Lys125 (Nummerierung für *Torpedo Californica*, entspricht Lys123 beim Menschen oder Huhn) markiert wurde und somit vermutlich zur APL-Bindungsstelle gehört. Mit Hilfe des Antikörpers FK1, welcher selektiv den APL-Effekt blockiert (jedoch nicht die ACh-Bindungsstelle), konnten Fragmente des Rezeptors bestimmt werden, an die der Antikörper schwach, mittelmäßig und stark bindet [9]. In den Experimenten wurden isolierte Fragmente benutzt, welche sich in Lösung nahezu beliebig falten können. Die Fragmente müssen nicht, können aber sehr wohl in der gleichen räumlichen Anordnung wie im kompletten Rezeptor existieren. Zusätzlich sollte der Antikörper aufgrund starker Wechselwirkungen eben die Konformation stabilisieren, die er erkennt.

FK1 wechselwirkt mit zwei Fragmenten der α -Untereinheit, einem Fragment von Trp118 bis Lys145 sowie einem Fragment von Tyr181 bis Val216 (jeweils *Torpedo Californica*-Nummerierung). Diese sind zusammen mit den homologen Residuen des α_7 -Homopentamers vom Menschen und vom Huhn und einer rein qualitativen Beurteilung in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Das zweite Fragment (Tyr181-Val216), welches den zuvor erwähnten „Cys Loop“ enthält, gehört zur Agonistenbindestelle. Da der Antikörper FK1 jedoch die Agonistenbindung nicht beeinträchtigt, wurde dieses Fragment genauer untersucht [9]. Durch diese Arbeiten wurden die folgenden Aminosäuren als dominierende Residuen identifiziert: Tyr181, Trp184, Trp187, Cys192, Asp195 und Asp200.

Tabelle 4.5: Fragmente des *Torpedo Californica* (α_1)² $\beta\gamma\delta$ -Rezeptors, welche mit dem FK1-Antikörper schwach, mittel, stark oder sehr stark wechselwirken.

Fragmente beim <i>Tc</i> (α_1) ² $\beta\gamma\delta$	Fragmente beim menschl. (α_7) ⁵	Fragmente beim Huhn (α_7) ⁵	qualitative Einteilung
Trp118-Phe137	Tyr116-Phe135	Tyr116-Phe135	stark
Ser126-Lys145	Ser124-Lys143	Ser124-Lys143	schwach
Tyr181-Asp200	Ile177-Asp195	Ile177-Asp195	sehr schwach
Trp184-Tyr203	Lys180-Phe198	Lys180-Phe198	mittel
Pro197-Val216	Pro192-Leu211	Pro192-Leu211	mittel

Um einen Eindruck dieser experimentellen Daten zu gewinnen, sind diese in Abbildung 4.11 an einem Trimer des *gallus gallus* (α_7)⁵-Rezeptormodells visualisiert. Links in der Abbildung ist die Innenseite des extrazellulären Teils des Rezeptormodells zusammen mit dem Lys123 (rot) dargestellt.

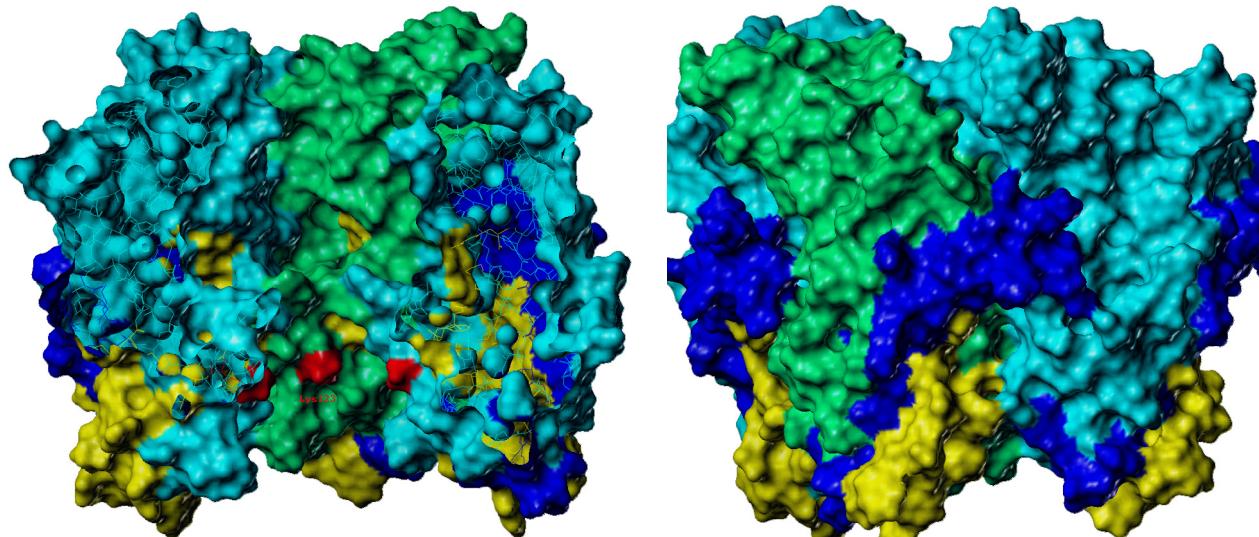


Abbildung 4.11: Blick auf ein Trimer der *gallus gallus* (α_7)⁵-Rezeptorinnenseite (links) sowie der Außenseite (rechts), wo sich am unteren Bildrand die Zellmembran befinden würde. In beiden Teilbildern ist die zentrale Untereinheit hellgrün und die beiden angrenzenden sind hellblau eingefärbt. Zusätzlich sind dort experimentelle Erkenntnisse visualisiert: das Lys123 rot, das hochaffine Fragment von Tyr116 bis Lys143 gelb und das niederaffine Fragment von Lys180 bis Thr206 blau.

Eine Bindung des Antikörpers an der Rezeptorinnenseite ist wegen der Größe des Antikörpers nicht anzunehmen. Umso überraschender ist es auf den ersten Blick, dass auch auf der Innenseite ein

kleiner „gelber Bereich“, also ein Bereich hoher Affinität zum FK1-Antikörper, zu finden ist.

Dies lässt sich durch die zuvor erwähnte experimentelle Arbeitsweise mit Fragmenten des Rezeptors erklären, weil alle Aminosäuren in den isolierten Fragmenten für den Antikörper zugänglich sind. An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass Lys123 unterhalb einer Verengung des extrazellulären Bereichs zu finden ist.

Betrachtet man die Außenseite des Rezeptors (Abbildung 4.11, rechts), so sind beide Bereiche, welche Wechselwirkungen mit dem Antikörper zeigen, zu sehen. Diese Bereiche sind deutlich größer als die auf der Innenseite gefundenen Abschnitte. Da die Agonistenbindetasche unterhalb des „Cys Loops“ ist (zentraler „blauer Bereich“), bedeckt der Antikörper große Bereiche des unteren Zugangs zur Agonistenbindungsstelle.

Identifikation möglicher Kavitäten

Die Identifikation möglicher Kavitäten mit Hilfe des „Alpha Site Finder“ aus MOE [63] führt zu zwei Bindetaschen auf der Innenseite des Rezeptors, von denen jeweils eine oberhalb und eine unterhalb der Verengung liegt (links in Abbildung 4.12).

Die untere Bindetasche wird dabei links und rechts von Lys123 eingerahmt (als rote Kalotten dargestellt). Beide Bindetaschen befinden sich in räumlicher Nähe zu den zuvor beschriebenen Strukturmerkmalen. Die Außenseite (rechts in Abbildung 4.12) zeigt vier Stellen der Bindung, welche rund um den „Cys Loop“ (blaue Schleife) verteilt sind.

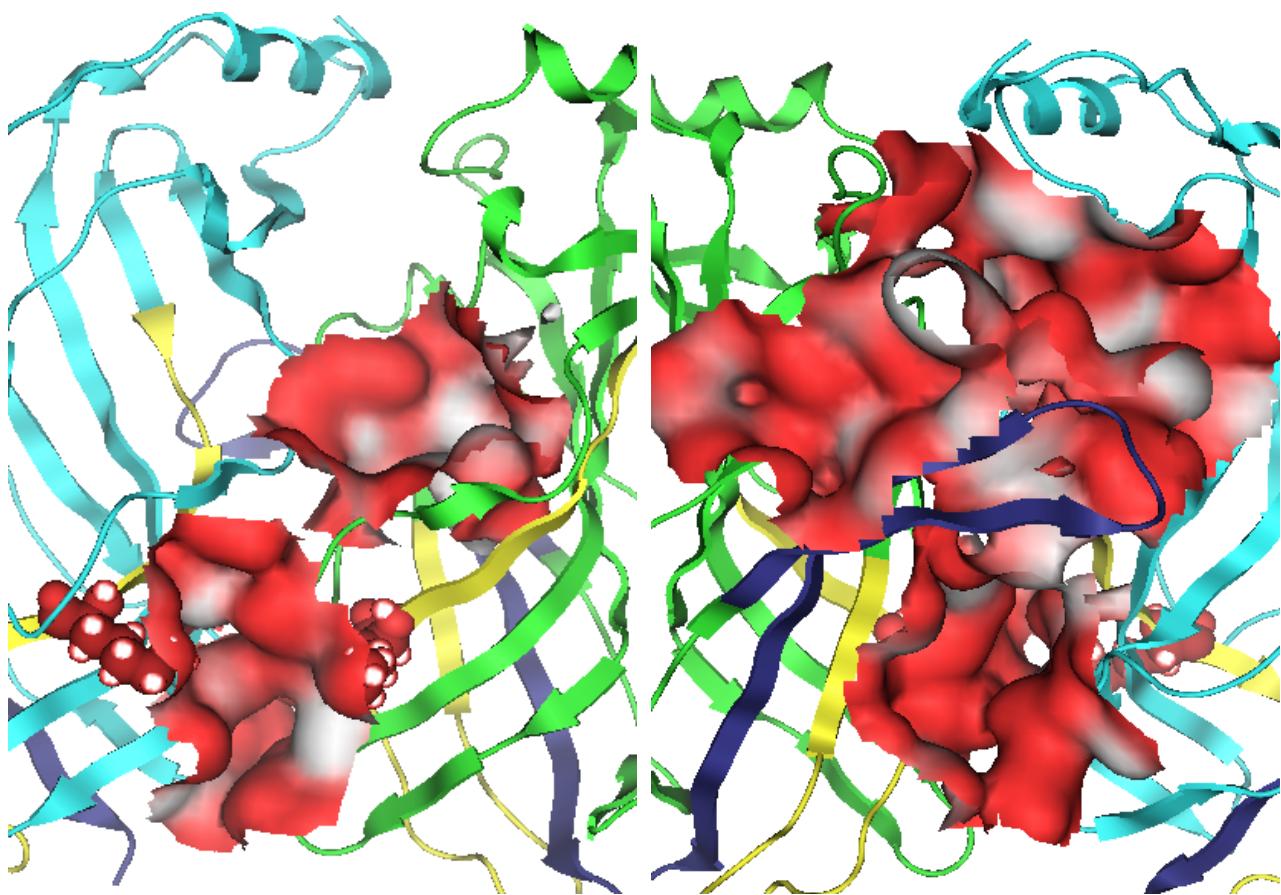


Abbildung 4.12: Identifizierte Bindetaschen auf der Innenseite (links) und der Außenseite (rechts) eines Rezeptor-Dimers, dessen Monomere in hellblau bzw. grün als Cartoon-Darstellung gegeben sind. Zusätzlich sind die Fragmente der Antikörper-Interaktion in gelb (hohe Affinität) bzw. blau (niedrige Affinität) hervorgehoben. Die Lys123-Residuen sind als rote Kalotten dargestellt. Die Bindetaschen selber sind durch Oberflächen angedeutet, welche von weiß (hydrophob) bis rot (hydrophil) eingefärbt sind.

Eine Kavität befindet sich auf der Rückseite des „Cys Loops“ (links), zwei an den Eingängen zur Agonistenbindungsstelle (oben und unten) zusammen mit einer vierten (verdeckt durch den „Cys Loop“), welche die Agonistenbindungsstelle darstellt. Die letzten drei Bindungsstellen gehen dementsprechend nahtlos ineinander über.

Weiterhin wurden auch potentielle Bindetaschen am unteren und oberen Ende des extrazellulären Teils des Rezeptors identifiziert. Diese werden jedoch nicht weiter betrachtet, da Bindungen unten in Gegenwart der Membran unmöglich werden und Bindungsstellen oben viel zu weit von allen experimentellen Indizien entfernt sind. Dies führt zu sechs potentiellen Bindetaschen, von denen die

beiden oberen (innen und außen) sowie die auf der Rückseite des „Cys Loops“ weniger interessant sind, da auch diese weit von den experimentell identifizierten Indizien entfernt sind. Die Agonistenbindetasche kann als weniger wichtig betrachtet werden, da die allosterisch potenzierenden Liganden keinen competitiven Einfluss auf die Agonistenbindung zeigen. Lediglich 5-Hydroxytryptamin stellt eine Ausnahme dar. Dies wird im nachfolgenden Abschnitt näher erläutert.

Dies ergibt die folgende qualitative Einteilung (s. Tabelle 4.6), welche über die Distanzen zu den C_{α} -Atomen der Aminosäuren Phe102 (innen, oben), Lys123 (innen, unten), Ser125 (außen, unten), Trp147 (Agonistenbindetasche) und Cys189 („Cys Loop“) quantitativ erfasst werden kann. Beispielsweise befindet sich ein Ligand, dessen geometrischer Mittelpunkt nicht weiter als 15 Å vom C_{α} -Atom des Lys123 entfernt ist, in der Bindetasche „innen unten“.

Tabelle 4.6: Einteilung und Bezeichnung der identifizierten Bindetaschen und Abschätzungen der notwendigen Abstände für die Klassifizierung. Diese Werte beziehen sich auf die Abstände des C_{α} -Atoms der angegebenen Aminosäuren zu dem geometrischen Mittelpunkt eines Liganden. Alle Abstände sind in Å angegeben.

	Phe102	Lys123	Ser125	Trp147	Cys189
„innen unten“	> 20	< 15	< 15	> 20	> 25
„innen oben“	< 20	> 15	> 20	< 20	> 20
„außen unten“	> 25	< 20	< 15	< 20	< 20
„außen oben“	> 25	> 25	> 25	< 20	< 20
Rückseite „Cys Loop“	> 15	> 20	> 15	> 10	< 20
Agonistenbindetasche	> 15	> 15	> 15	< 15	< 15

APL-Docking

Um die so visuell identifizierten Bindetaschen genauer zu untersuchen und um abzuwägen, ob von diesen Taschen eine die APL-Bindetasche sein kann, wurden Docking-Untersuchungen mit bekannten APL durchgeführt. Bei den ausgewählten Liganden handelt es sich um (-)-Physostigmin, da dieses wie zuvor erwähnt in der Nähe von Lys123 bindet, und Galanthamin, von dem bekannt ist, dass es bei dem Heteropentamer selektiv an die α -Untereinheit bindet [64][65]. Zusätzlich sollten noch zwei weitere Liganden mit APL-Effekt, Codein und 5-Hydroxytryptamin (5HT), gedockt werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. Alle ausgewählten Liganden sind in Abbildung 4.13 dargestellt.

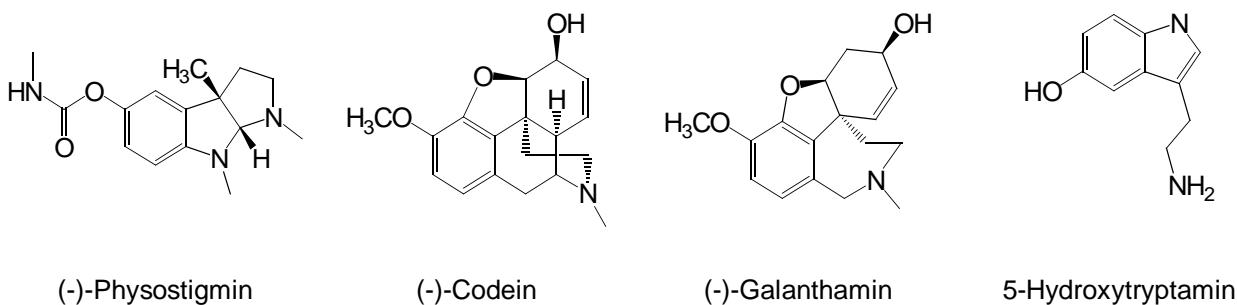


Abbildung 4.13: Abbildungen der zum Docking verwendeten allosterisch potenzierten Liganden

Das (-)-Physostigmin zeigt eine große Variationsmöglichkeit, da die beiden Stickstoffatome in den Fünfringen protonierbar sind und Pseudo-Stereozentren darstellen. Die Kombinatorik dieser Möglichkeiten führt zu sechszehn verschiedenen Strukturen, von denen allerdings vier aufgrund doppelter Protonierung wieder wegfallen. Für die Docking-Experimente sind dementsprechend zwölf verschiedene Isomere genutzt worden. Die besten Treffer sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 4.7: Die energetisch besten Docking-Ergebnisse des (-)-Physostigmins gegen den *gallus gallus* (α_7)-Rezeptor. Für jeden aufgeführten Cluster sind ein Cluster-Vertreter, dessen gedockte Energie, die Cluster-Größe, die Abstände zu den C_α -Atomen fünf verschiedener Aminosäuren und eine qualitative Beurteilung angegeben. Die Energien sind in kJ/mol und die Abstände in Å gegeben.

Cl.	Vertreter	Energie	Cl.-Gr.	Lys123	Phe102	Ser125	Trp147	Cys189	Beurteilung
1	12S_17S_14S_n17H_001	-22,497	12	15,536	8,577	21,162	16,542	28,295	innen oben
2	12S_17S_14S_001	-21,712	16	34,979	27,943	36,963	20,658	29,839	Oberkante
3	12S_17S_14S_002	-21,504	17	13,086	11,067	17,941	13,079	24,584	innen oben
4	12S_17R_14R_001	-20,158	9	38,424	35,300	38,654	21,330	26,374	Oberkante
5	12S_17S_14R_n17H_002	-19,950	5	18,493	20,905	21,542	14,943	22,253	innen oben
6	12S_17R_14R_n14H_001	-19,891	10	26,179	19,701	29,412	14,838	25,944	innen oben
7	12S_17S_14S_007	-19,623	2	34,771	36,247	33,419	16,839	17,758	außen oben
...
15	12S_17S_14R_n14H_002	-16,718	7	15,396	30,142	8,797	17,264	16,003	außen unten
...
20	12S_17S_14S_022	-16,471	4	14,970	30,145	14,594	29,406	31,304	innen unten

Trotz der Fülle der untersuchten Konformationen werden nur sehr wenige Docking-Lösungen in der Bindetasche „innen unten“ gefunden (z. B. Cluster 20), die sich in direkter Nachbarschaft zum

Lys123 befindet. Speziell dort wären energetisch günstige Bindemodi zu erwarten gewesen, weil in den zuvor erwähnten Experimenten dort die radioaktive Markierung gefunden worden ist. An der Außenseite sind etwas bessere Strukturen zu entdecken (s. Cluster 7 und 15), aber die meisten und energetisch besseren Lösungen werden „innen oben“ gefunden.

In der Darstellung einzelner Strukturen (s. Abbildung 4.14), welche in den zuvor angedeuteten Bindetaschen zu finden sind, lässt sich trotzdem erkennen, dass diese Konformationen die Bereiche der Antikörper-Interaktion abdecken. Diese Ergebnisse erlauben noch keine sicheren Schlussfolgerungen, geben aber erste Hinweise, dass die zuvor identifizierten Bindetaschen für die Liganden in Frage kommen.

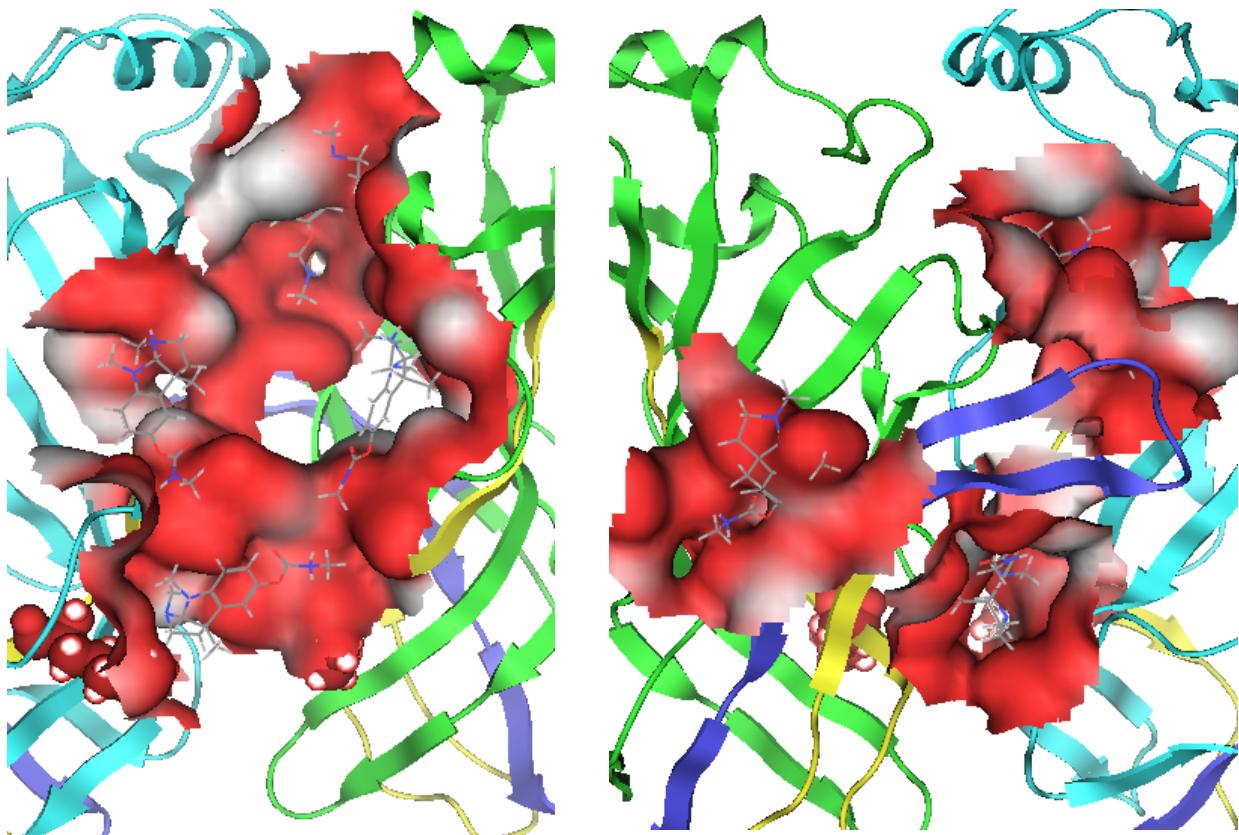


Abbildung 4.14: Ausgewählte Komplexe des (-)-Physostigmins an der Innenseite (links) sowie der Außenseite (rechts) des extrazellulären Teils des *gallus gallus* (α_7)⁵-Rezeptors. Die Bereiche der Antikörper-Interaktion sind blau bzw. gelb angedeutet und das Lys123 ist als rotes Kalottenmodell dargestellt. Die Oberfläche zeigt das hydrophile Potential, welches sich von hydrophil (rot) bis hydrophob (weiß) erstreckt.

(-)-Galanthamin wurde in Form von vier Isomeren gedockt, bei denen zwei mögliche Ringkonformationen des Siebenringes - axial oder äquatorial - und ein unprotoniertes oder protoniertes Stickstoffatom (N4H) variiert wurden. In Tabelle 4.8 sind die energetisch besten Cluster aller (-)-Galanthamin-Ergebnisse aufgeführt. Es fällt auch hier auf, dass im Allgemeinen die am Stickstoffatom protonierten (-)-Galanthamine energetisch besser bewertet werden als die unprotonierten und dass Cluster 4 mit 64 Strukturen (16 % aller Lösungen) ein breites Minimum in der Potential-Hyperfläche darzustellen scheint.

Neben den kleinen Clustern 1 und 5 docken auch einige weitere Strukturen außerhalb der untersuchten Bindetaschen (z. B. Cluster 13) und werden nicht weiter betrachtet.

Tabelle 4.8: Ein Auszug der energetisch besten Cluster der Docking-Läufe des (-)-Galanthamins gegen den (α_7)⁵-Rezeptor vom Huhn. Die Cluster, welche mit „außerhalb“ markiert sind, finden sich nicht in der Nähe einer der zuvor erwähnten Bindungsstellen des Modells. Die Energien sind in kJ/mol und die Abstände in Å gegeben.

Cl.	Vertreter	Energie	Cl.-Gr.	Lys123	Phe102	Ser125	Trp147	Cys189	Beurteilung
1	gala_eq_N4H_001	-21,041	1	25,827	39,342	19,980	20,203	10,035	außerhalb
2	gala_ax_N4H_001	-18,562	13	18,006	19,674	21,363	14,662	22,685	innen, oben
3	gala_eq_N4H_002	-18,207	11	9,124	24,753	9,964	24,636	28,282	innen, unten
4	gala_ax_001	-17,451	64	12,828	27,813	13,226	28,446	31,355	innen, unten
5	gala_eq_N4H_009	-16,531	3	28,630	43,652	22,474	26,076	16,129	außerhalb
6	gala_ax_N4H_005	-16,304	5	18,089	18,731	21,851	15,370	23,872	innen, oben
...
12	gala_eq_N4H_023	-14,694	7	17,900	30,399	12,535	13,637	11,262	außen, unten
13	gala_eq_N4H_026	-14,633	7	25,901	43,073	20,729	36,596	33,542	Unterkante
14	gala_eq_N4H_032	-14,320	3	15,684	27,895	10,940	11,733	11,663	außen, unten
15	gala_eq_N4H_036	-14,101	1	30,519	32,635	29,376	12,371	14,434	außen, oben

Ganz analog zu den Physostigmin-Ergebnissen fällt auch für das (-)-Galanthamin auf, dass die Docking-Lösungen an der Innenseite häufiger und vor allem mit niedrigeren Energien gefunden werden. Stellt man die Cluster dar (vgl. Abbildung 4.15), so erkennt man gut die Konformationen unter- und oberhalb der Verengung auf der Innenseite, die Konformationen nah am Lys123 sowie die Docking-Ergebnisse am oberen bzw. unteren Zugang zur Agonistenbindetasche.

Um weitere Indizien für die vermutete APL-Bindungsstelle zu sammeln, wurde (-)-Codein in Form zweier Isomeren mit (N4H) und ohne Proton am Stickstoffatom untersucht. Ein Auszug der besten Cluster ist analog den vorherigen Ausführungen in Tabelle 4.9 gegeben. Auch hier sind aus Gründen der Übersichtlichkeit einige Cluster ausgeblendet, die im Wesentlichen innen binden. Der Cluster 21 ist angegeben, weil es sich dabei um den ersten handelt, welcher Docking-Lösungen unten auf der Außenseite des Rezeptors repräsentiert.

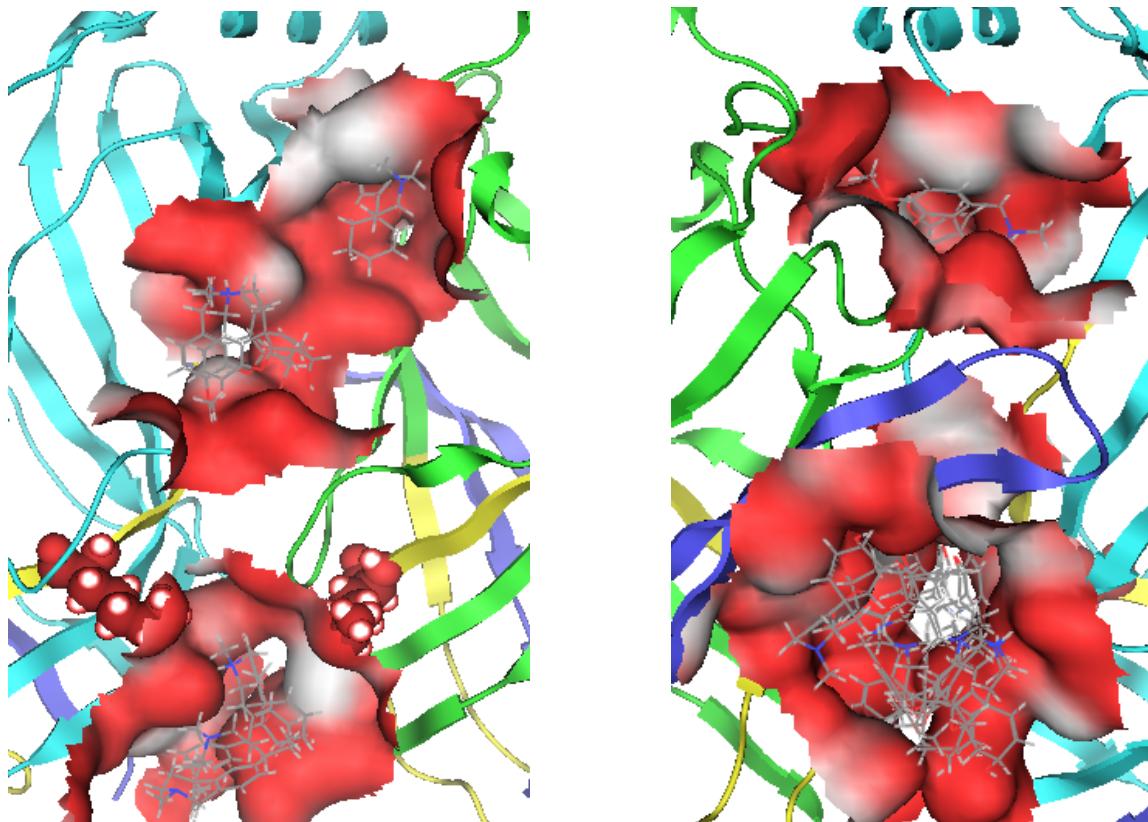


Abbildung 4.15: Bindemodi der (-)-Galanthamine an der Innenseite (links) sowie der Außenseite (rechts) des extrazellulären Teils des *gallus gallus* (α_7)⁵-Rezeptors. Die Bereiche der Antikörper-Interaktion sind blau bzw. gelb gegeben und das Lys123 ist als rotes Kalottenmodell dargestellt. Die Oberfläche zeigt das hydrophile Potential, wobei hydrophile Bereiche rot und hydrophobe Bereiche weiß illustriert sind.

Tabelle 4.9: Auswahl der (-)-Codein-Ergebnisse zusammen mit den zugehörigen Energien vom Docking, den Distanzen zu den Fixpunkten des Proteins und der Zuordnung zu einer der zuvor erwähnten Bindetaschen.

Cl.	Vertreter	Energie	Cl.-Gr.	Lys123	Phe102	Ser125	Trp147	Cys189	Beurteilung
1	codeine_N4H_001	-18,409	15	23,708	18,364	26,971	13,049	24,395	innen oben
2	codeine_001	-17,328	12	20,503	16,569	23,902	11,417	23,082	innen oben
3	codeine_N4H_004	-15,949	5	21,986	16,790	25,400	12,270	24,085	innen oben
4	codeine_002	-15,806	5	35,116	35,742	34,119	17,112	19,022	außen oben
5	codeine_003	-15,044	14	13,951	10,819	18,332	12,058	24,255	innen oben
6	codeine_N4H_006	-14,564	12	17,318	33,617	14,964	31,456	32,002	Unterkante
7	codeine_N4H_009	-14,365	12	9,782	24,848	11,087	25,561	29,359	innen unten
8	codeine_N4H_010	-14,330	2	21,492	16,720	24,892	11,930	23,708	innen oben
...
21	codeine_042	-11,656	1	18,321	30,684	12,907	14,041	11,704	außen unten

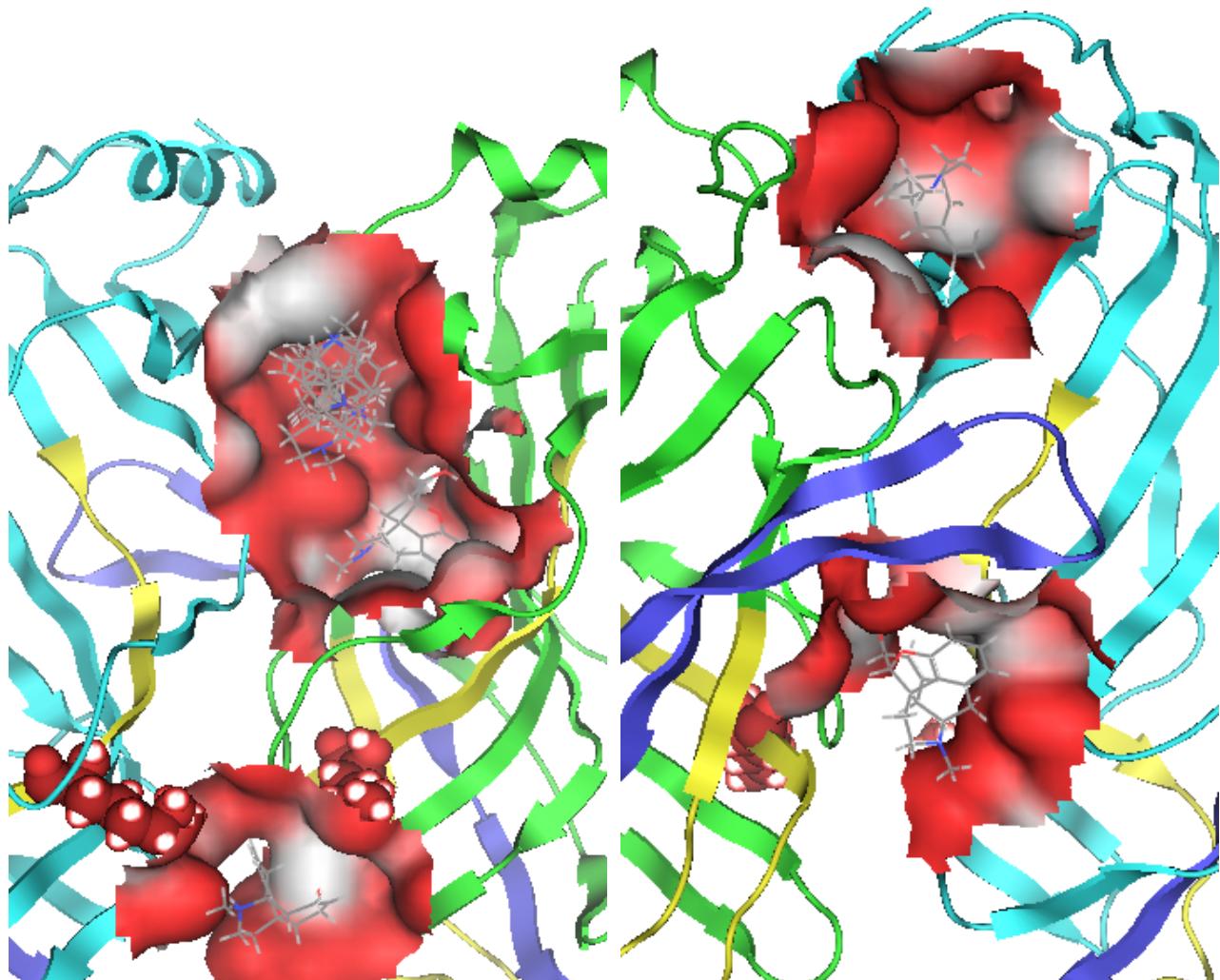


Abbildung 4.16: Gedockte Konformationen des (-)-Codeins. Die Illustrationen sind analog Abbildung 4.15.

Es gilt dementsprechend für das (-)-Codein: Es werden mehr und energetisch günstigere Komplexe gefunden, bei denen das (-)-Codein innen am Rezeptor wechselwirkt. Dieser Sachverhalt lässt sich auch in Abbildung 4.16 erkennen, wo viele Strukturen „innen oben“ binden und die angegebene Struktur für die „äußere untere“ Bindetasche zudem relativ weit nach rechts verschoben ist.

Als letzter bislang bekannter allosterisch wirkender Ligand wurde 5HT untersucht, das in Form zweier Isomere, wiederum mit (N4H) und ohne Proton am Stickstoffatom, berechnet wurde. Hier bietet sich ein sehr analoges Bild zu den übrigen APL (vgl. Tabelle 4.10), indem viele Strukturen innen gefunden werden, doch diesmal in größerer Anzahl unten. Auch hier werden Konformationen unten an der Außenseite entdeckt, wie z. B. Cluster 36, welche jedoch näher an den Bereichen der Antikörper-Interaktion lokalisiert sind.

Tabelle 4.10: Die besten Docking-Ergebnisse der Berechnungen mit 5HT.

Cl.	Vertreter	Energie	Cl.-Gr.	Lys123	Phe102	Ser125	Trp147	Cys189	Beurteilung
1	5ht_N4H_001	-21,957	12	7,778	14,959	14,140	20,704	28,777	innen unten
2	5ht_N4H_003	-20,936	1	6,922	14,456	13,501	20,262	28,494	innen unten
3	5ht_N4H_004	-20,189	5	9,608	22,020	12,379	20,825	25,586	innen unten
4	5ht_N4H_006	-19,818	1	33,000	26,854	34,888	18,231	27,433	Oberkante
5	5ht_N4H_008	-18,805	1	29,929	34,028	28,172	12,167	10,825	außen oben
6	5ht_N4H_010	-17,956	2	9,990	19,032	14,810	21,929	28,407	innen unten
...
12	5ht_001	-17,431	8	21,438	27,386	20,303	5,622	8,975	Agonist
...
36	5ht_N4H_058	-15,282	5	21,794	33,286	16,572	14,526	9,497	außen unten

Zur Abbildung 4.17 muss angemerkt werden, dass hier auch eine Konformation innerhalb der Agonistenbindetasche (Cluster 12) existiert. Diese ist jedoch nicht zu sehen, da die Struktur von dem „Cys Loop“ verdeckt wird.

Das Auffinden von 5HT-Komplexen, bei denen der Ligand in der Agonistenbindungsstelle lokalisiert ist, ist bemerkenswert, da aus der Literatur bekannt ist, dass 5HT bei geeigneten Konzentrationen als Agonist wirkt [6]. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass für sehr hohe Konzentrationen alle APL den Kanal blockieren und somit auch als nicht kompetitive Inhibitoren wirken. Die Effekte

der APL und beim 5HT zusätzlich der agonistische Effekt treten dementsprechend nur in einem begrenzten Konzentrationsbereich auf.

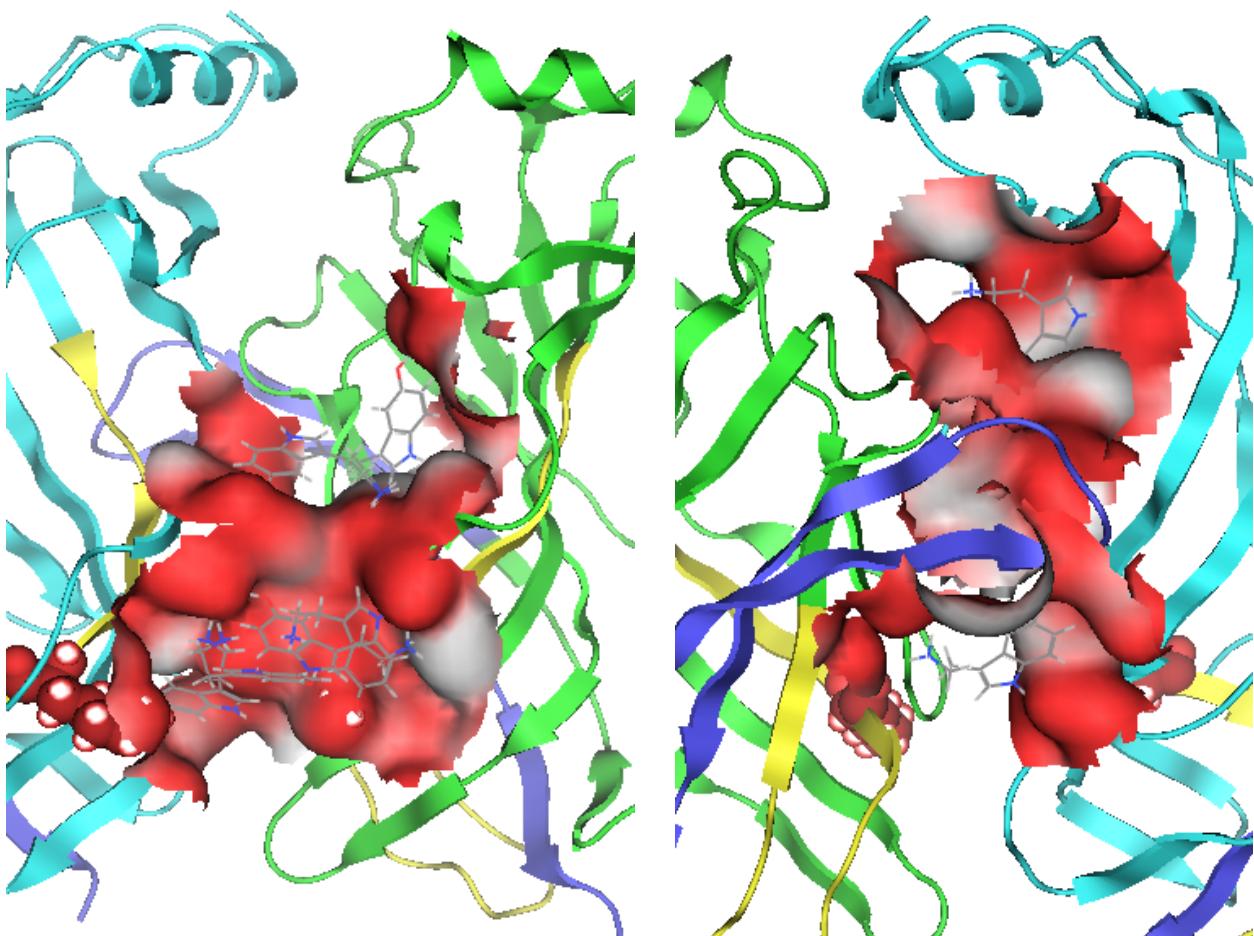


Abbildung 4.17: Ergebnisse der Docking-Experimente mit 5HT, wobei die gleichen Darstellungsbedingungen gewählt wurden wie in den Abbildungen zuvor.

Mutationsarbeiten

Die vorherigen Ausführungen erlauben es nun, einige wenige Kandidaten für die potentielle APL-Bindetasche auszuwählen, wodurch sich neue Experimente für präzisere Schlussfolgerungen anbieten. Aufgrund der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Maelicke, Universität Mainz, sollten Residuen ausgewählt werden, welche Teil einer potentiellen Bindetasche sind, um diese in Mutationsexperimenten durch andere Aminosäuren zu ersetzen und so deren Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Rezeptoren zu untersuchen. Das Lys123 sowie die in der Sequenz benachbarten Residuen sollten trivialerweise einen Einfluss haben. Vor der Veröffentlichung der Röntgenstruk-

turanalyse des AChBP ist es nicht möglich gewesen, weitere Residuen in der räumlichen Nähe des Lys123 zu identifizieren, weil keine Informationen über die Umgebung des Lys123 vorhanden waren.

Erst mit Hilfe von dreidimensionalen nAChR-Modellen ist es möglich, Aminosäuren auszuwählen, welche aufgrund der Proteininfaltung an der Bildung der Bindetaschen beteiligt sind. In Abbildung 4.18 ist die Kontaktfläche zwischen zwei Untereinheiten des extrazellulären Teils des Rezeptors dargestellt.

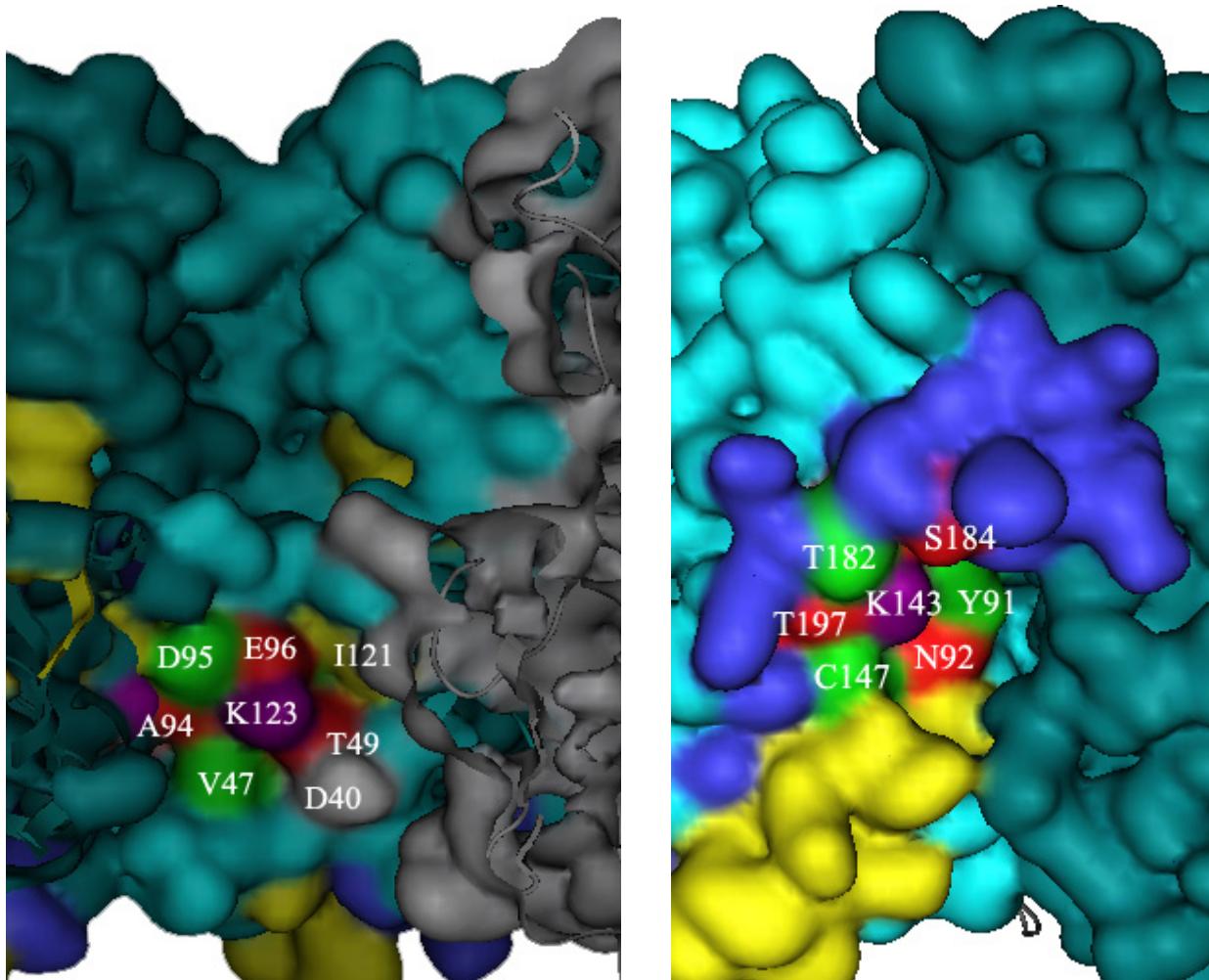


Abbildung 4.18: Ansicht der Innenseite (links) und der Außenseite (rechts) des Rezeptormodells, wobei die dargestellten Untereinheiten helltürkis, dunkeltürkis und grau eingefärbt sind. Neben den Fragmenten der Antikörper-Interaktion (blau und gelb) sind Aminosäuren an der Oberfläche der potentiellen Bindungsstellen (verschiedene Farben und Beschriftungen) dargestellt.

Für die Untersuchung der potentiellen Kavitäten für den APL-Effekt wurden nur die Bindungsstellen

innen unten sowie außen unten betrachtet. Um nun den Einfluss der jeweiligen Aminosäure auf die Oberfläche beurteilen zu können, sind die verschiedenen Aminosäuren unterschiedlich eingefärbt worden.

Auf diese Weise sind die folgenden Aminosäuren identifiziert worden, welche die innere untere Bindetasche bilden: D40, V47, T49, A94, D95, E96, I121 und K123. Analog sind die Aminosäuren Y91, N92, K143, C147, T182, S184 und T197 identifiziert worden, die die äußere untere Kavität erzeugen. Aus diesem Grund sollten die Aminosäuren in Tabelle 4.11 großen Einfluss auf die vermeintliche APL-Bindungsstelle haben, wobei dort zusätzlich die Aminosäuren aufgeführt sind, deren Seitenketten nicht an der Oberfläche zu finden sind.

Die Aminosäuren sind in drei Gruppen eingeteilt worden: Zwei Bereiche der Antikörper-Interaktion und eine Gruppe mit zusätzlichen visuell identifizierten Residuen, die nur anhand der Modelle identifiziert werden konnten.

Tabelle 4.11: Visuell identifizierte Residuen, welche die beiden unteren Bindetaschen (innen bzw. außen) ausmachen. Aufgeführt sind neben den Fragmenten, welche mit dem Antikörper FK1 wechselwirken, einige zusätzliche neu gefundene Aminosäuren, welche an der Bildung der jeweiligen Bindetasche beteiligt sind.

Innenseite, unten	Außenseite, unten	
D40; V47, L48, T49, T50 A94, D95, E96	Y91, N92 C147	zusätzliche visuell identifizierte Bereiche
I129 I121, F122, K123, S124	S125, C126 K139, C140, N141, L142, K143	gelber Bereich
	T182, E183, S184 I196, T197, F198, T199	blauer Bereich

Mit Hilfe dieser Liste vermeintlich wichtiger Aminosäuren ist von Dr. Anja Höffle, Dr. Jürgen Ludwig und Anisa Kosan - alle Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Maelicke, Universität Mainz - unter mithilfe von FII-Praktikanten und -Praktikantinnen (E. Copanaki, M. Breinich, M. Felkl, J. Reineke und M. Wenz) versucht worden, Primer für die entsprechenden Mutationen zu erstellen. Die Mutationen sind anschließend an dem chimären Rezeptormodell, aus dem extrazellulären Teil des α_7 -Rezeptors vom Huhn und dem Transmembranteil des 5HT3-Rezeptors, sowie an dem $(\alpha_4)^2(\beta_2)^3$ -Rezeptor durchgeführt worden.

Von den bearbeiteten Mutationen waren die in Tabelle 4.12 aufgeführten Mutationen erfolgreich. Erfolgreich bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Zellen mutierte Rezeptoren gebildet haben und diese Rezeptoren ein normales Verhalten auf die Stimulierung mit Nikotin oder anderen Agonisten zeigen. Für jede Mutation ist dort eine Zuordnung zu einer Bindungsstelle und eine Beschreibung des beobachteten Effektes aufgeführt. Die Effekte können in drei Gruppen eingeteilt werden, weil es Mutationen gibt, die keinerlei Effekt, die einen Effekt auf die Agonistenbindung oder auf die APL-Bindung zeigen.

Tabelle 4.12: Auflistung der erfolgreichen Mutationen und deren Klassifizierungen.

Mutation	Bindungsstelle	Effekt
N92S	außen unten	keiner
K123G	innen, unten	keiner
P119L	Agonistenbindungsstelle	verminderter Agonisteneffekt
F122G	innen unten	verminderter Agonisteneffekt
K143G	außen unten	verminderter APL-Effekt
I196G	außen unten	verminderter APL-Effekt
T197A	außen unten	kein APL-Effekt mehr
F198L	außen unten	verminderter APL-Effekt

Besonders bemerkenswert ist, dass die Mutation des Lys123 keinerlei Einfluss auf den APL-Effekt zeigt, obwohl dies die Aminosäure war, welche mit dem radioaktiven (-)-Physostigmin ausschließlich markiert wurde. Weiterhin fällt auf, dass die Mutation des Thr197 die APL-Wirkung vollständig verschwinden lässt. Da die übrigen Residuen, welche einen leichten Einfluss zeigen, in direkter räumlicher Nachbarschaft zum Thr197 liegen und all diese Aminosäuren sich unten auf der Außenseite befinden, ist zu vermuten, dass die Bindetasche, welche den APL-Effekt verursacht, die untere äußere, am Eingang zur Agonistenbindungsstelle, ist.

Zusammenfassung

Bevor versucht wird, diese Erkenntnisse zusammenzuführen, sollen die Docking-Experimente mit den APL zur Übersicht zusammengefasst werden:

1. Es werden energetisch günstigere Lösungen auf der Innenseite gefunden, was für eine höhere

Komplex-Stabilität und somit auch für eine höhere Affinität der Liganden zur Innenseite steht (thermodynamischer Grund).

2. Es werden häufiger Lösungen innen gefunden, wodurch die Erreichbarkeit dieser Minima besser sein kann, was wiederum für eine höhere Affinität zu den Bindetaschen auf der Innenseite spricht (kinetischer Grund).
3. Agonistische Effekte lassen sich durch die Bindemodi unter dem „Cys Loop“ oder an den Eingängen zur Agonistenbindungsstelle erklären.
4. Eine inhibierende Wirkung der untersuchten Liganden bei hohen Konzentrationen lässt sich durch die Verengung des Kanals beim Binden an die Innenseite erklären.

Diese Erkenntnisse führen zu der Annahme, dass es zwei Bindungsstellen für die allosterisch wirkenden Liganden gibt: eine innen mit hoher Affinität und eine außen mit deutlich geringerer Affinität. Zu dieser Annahme passt das Radiomarkierungsexperiment mit dem $[3\text{H}]$ -(-)-Physostigmin, welches ausschließlich das Lys123 markierte, da bei einer Bindetasche innen, mit einer deutlich höheren Affinität, die Radioaktivität nur an diesem Lysin zu erwarten ist. Aufgrund der pentameren Struktur existiert jede Bindetasche analog fünfmal. Das führt dazu, dass bei hohen Konzentrationen durchaus mehr als ein APL an der Rezeptorinnenseite bindet und somit der Kanal blockiert werden kann. Die Fragmente, welche starke Wechselwirkungen mit dem Antikörper zeigen, und die neuesten Mutationsexperimente weisen weiterhin darauf hin, dass der APL-Effekt von der Bindetasche außen, am unteren Zugang zur ACh-Bindungsstelle, verursacht wird. Anhand der für alle untersuchten APL gefundenen geringeren Docking-Energien kann vermutet werden, dass diese äußere Bindetasche eine geringere Affinität als die innere aufweist. Zusätzlich kann aus Bindungsstudien des (-)-Galanthamins - an Rezeptoren des Rattenhirns - ein Hill-Koeffizient von etwa 0,4 errechnet werden [66]. Hill-Koeffizienten kleiner eins sprechen entweder für zwei unterschiedlich affine Bindetaschen oder für zwei Bindungen mit einem negativ kooperativen Effekt [2]. Allerdings muss dieser Hill-Koeffizient mit Skepsis betrachtet werden, weil (-)-Galanthamin ein sehr schwach bindender Ligand ist und somit das Signal kaum aus dem „Hintergrund-Rauschen“ heraustritt.

4.2 Esterase-Arbeiten

Aus der Literatur ist bekannt, dass die AChE die Bildung von Amyloid-Plaques beschleunigt. Genauer ist es die periphere anionische Bindungsstelle (PAS) der AChE, welche für diesen Effekt verantwortlich ist, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass PAS-Inhibitoren den beschleunigenden Effekt der AChE aufheben [26][67]. Bei früheren Docking-Experimenten mit (-)-Galanthamin und der AChE ist in unserer Arbeitsgruppe beobachtet worden, dass (-)-Galanthamin nicht nur mit dem katalytischen Zentrum der AChE komplexiert, sondern auch mit der PAS [68][69]. Dieser potentielle Plaque-Inhibierungseffekt sollte daher genauer untersucht werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Erarbeitung einer einfachen und effizienten Methode, die es erlaubt, mögliche PAS inhibierende Liganden zu identifizieren.

Ausgehend von den zwei verschiedenen Bindemodi des (-)-Galanthamins, wie sie in Abbildung 4.19 dargestellt sind, war es naheliegend, die beiden (-)-Galanthamine über eine Methylenkette zwischen den Stickstoffatomen zu verbinden.

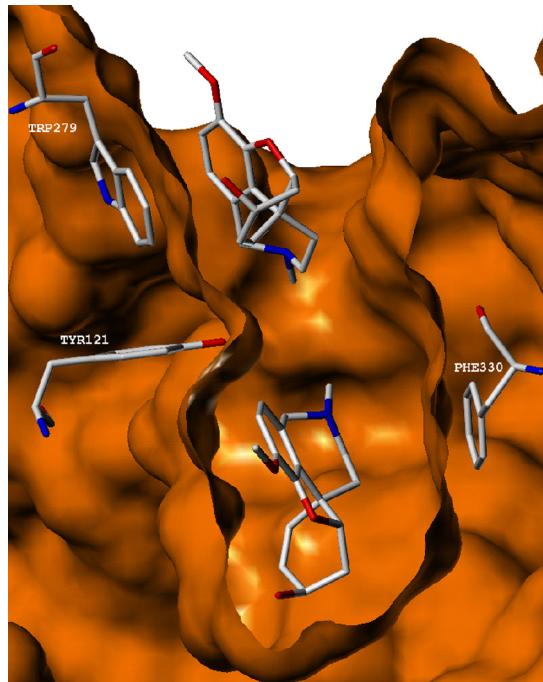


Abbildung 4.19: Zwei verschiedene Bindemodi des (-)-Galanthamins als Resultat von Docking-Experimenten [69], zum einen im katalytischen Zentrum (unten) und zum anderen an der PAS (oben).

Die so erzeugten bis-Galanthamine wurden daher systematisch untersucht, indem die Kettenlänge (engl. „spacer length“) von zwei bis zwölf Kohlenstoffatomen variiert wurde. Als Enzymstruktur wurde die *TcAChE* (PDB Code 1QTI [70]) anstelle der menschlichen AChE genutzt, weil für die menschliche AChE keine Röntgenstrukturanalyse existiert und die 1QTI-Struktur einen Galanthamin-AChE-Komplex darstellt. Weiterhin beträgt die Sequenz-Homologie 77 % bezüglich der Bindetasche und das katalytische Zentrum wie auch die PAS sind konserviert. Für die Docking-Experimente mit QXP und FlexX wurde die Struktur von allen Wassermolekülen und dem Liganden befreit. In QXP wurden zusätzlich nur die Aminosäuren zur Berechnung herangezogen, welche in der Originalstruktur nicht weiter als 7,5 Å von der Galanthamin-Position entfernt sind, da QXP nicht mit mehr als 2000 Atomen arbeiten kann.

Um nun die Interaktion der bis-Galanthamine mit der PAS quantifizieren zu können, wurde der Anteil der lipophilen Wechselwirkungen an der Gesamt-Wechselwirkungsenergie bestimmt, indem nur dieser Anteil der Wechselwirkungsenergie mit Hilfe von FlexX ausgelesen wurde.

Neben der Lipophilie wurden auch vier geometrische Parameter berechnet, die eine zusätzliche Bewertung der Interaktion eines Liganden mit der PAS der AChE erlauben. Diese vier Parameter (s. Abbildung 4.20) sind:

1. der Abstand d zwischen dem Zentrum des Indolringes im Trp279 und dem aromatischen Ring des Galanthamins,
2. der Winkel α zwischen der Ebene des aromatischen Galanthaminringes und der Ebene des Indolringes im Trp279,
3. der Winkel ω zwischen der Senkrechten auf der Indol-Ebene (Trp279) und dem Verbindungsvektor zwischen den beiden Ringzentren und
4. die Raumerfüllung rund um das Trp279.

Für die Raumerfüllung wird das Volumen des Liganden als überlappende Kugeln mit van der Waals-Radien berechnet. Das so ausgerechnete Volumen wird im Anschluss daran mit einer Kugel vom Radius 5 Å rund um das Zentrum des Indolringsystems des Trp279 zur Überlappung gebracht. Dieses „Überlappungsvolumen“ wird dann relativ zum Gesamtvolumen der 5 Å-Kugel als Raum-

erfüllung in Prozent angegeben. Derartige relative Werte müssen immer deutlich kleiner als 50 % sein, da sich mehr als die Hälfte der 5 Å-Kugel in das Proteininnere erstreckt und somit niemals mit dem Liganden überlappen kann. Für die Berechnung dieser vier Parameter wurde das Programm „VolumeScore“ geschrieben.

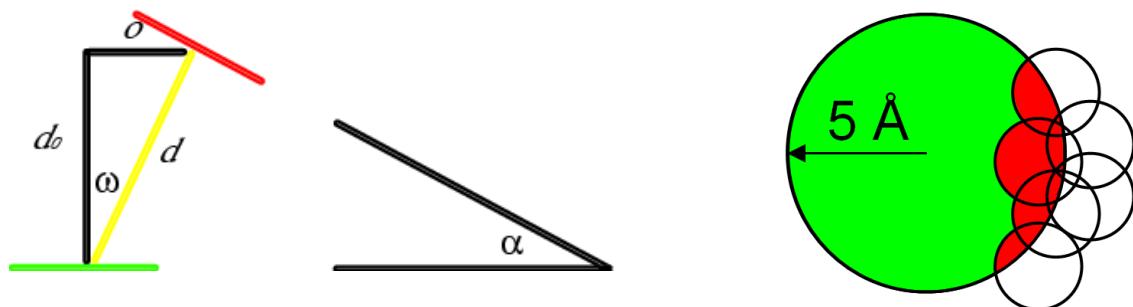


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der Parameter (links) und des „Überlappungsvolumens“ (rechts), die für die geometrische Bewertung der Wechselwirkungen herangezogen werden. Mit Hilfe der links dargestellten Distanz d und den beiden Winkeln α und ω zwischen dem Indolring des Trp279 (grün) und dem aromatischen Ring des Galanthamins (rot) lassen sich die übrigen Größen, die parallele Verschiebung (σ) und der Abstand paralleler Ebenen d_0 durch trigonometrische Operationen berechnen. Für die Erläuterung des „Überlappungsvolumens“ ist rechts ein analoger zweidimensionaler Fall, dementsprechend mit Kreisen statt Kugeln, dargestellt. Der große Kreis mit einem Radius von 5 Å (grün) überlappt mit Teilen der kleinen Kreise (rot) und dieser Anteil der Überlappung kann prozentual angegeben werden.

Die verwendeten Liganden (vgl. Abbildung 4.21) wurden unprotoniert, jedoch mit jeweils zwei verschiedenen Ringkonformationen für den Galanthamin-Siebenring (axial und äquatorial) untersucht. Für die anschließende Auswertung wurden diese drei - aufgrund der Symmetrie nicht vier - verschiedenen Isomere gleich behandelt, so dass nur die Variation der Methylenkette als Parameter auftritt.

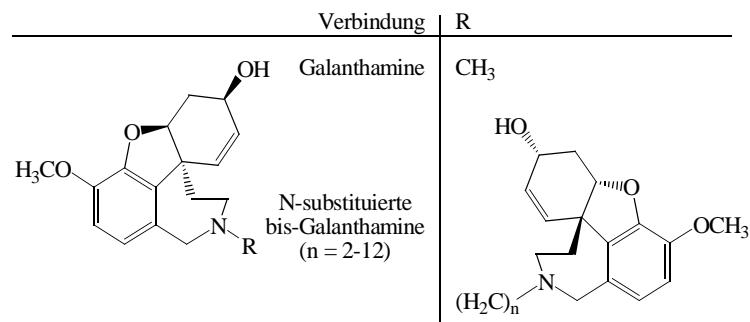


Abbildung 4.21: Galanthamin-Derivate für die Docking-Studie.

Trägt man die Energien der Docking-Ergebnisse der beiden Programme zusammen mit den lipophilen Energiebeiträgen auf, so ergeben sich die beiden Grafen in Abbildung 4.22. Die Energien sind nicht vergleichbar, weil beide Programme für die Berechnung unterschiedliche Methoden verwenden. Es ist jedoch möglich, deren relativen Verlauf zu interpretieren. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass bei Energien ein kleinerer Wert und bei der Lipophilie ein größerer Wert für eine starke Wechselwirkung sprechen. Zur Vereinfachung werden die Strukturen mit BG_n bezeichnet, wobei *n* für die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Kette steht.

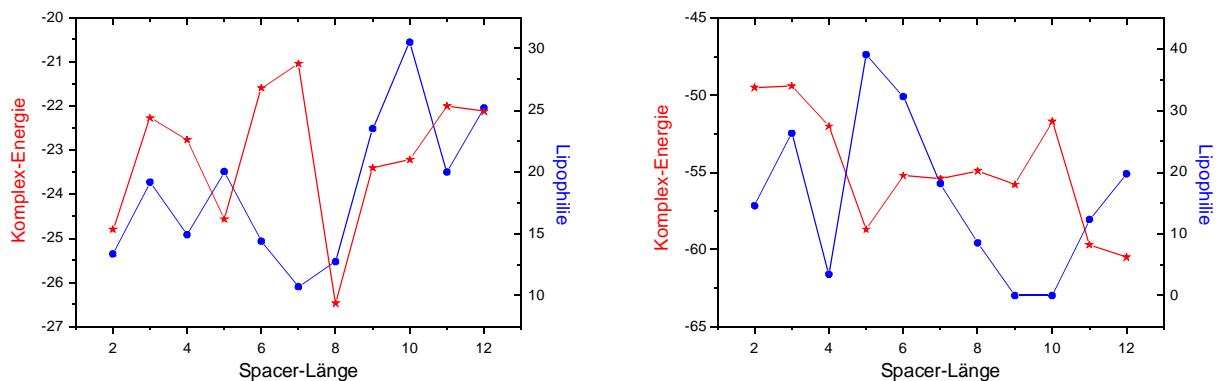


Abbildung 4.22: Energie (Sterne) und Lipophilie (Kreise) von BG-TcAChE-Komplexen in Abhängigkeit der Methylenkettenlänge als Ergebnisse der QXP- (rechts) bzw. der FlexX-Docking-Experimente (links).

Aus dem linken Teil der Abbildung 4.22 lässt sich erkennen, dass QXP keine eindeutige Aussage anhand der Energie zulässt, da sowohl die kurze Struktur mit fünf als auch längere Strukturen mit elf

oder zwölf Kohlenstoffatomen gut bewertet werden. Berücksichtigt man jedoch die Lipophilie, so zeigt sich, dass von den QXP-Ergebnissen das BG5 und evtl. das BG6 günstige AChE-Komplexe liefern.

Alle gedockten Konformationen weisen eines der beiden Galanthamine im unteren Bereich der Bindetasche auf, nahezu exakt an der Position des Galanthamins aus der Röntgenstrukturanalyse, was durch RMSD-Werte für das untere Galanthamin-Fragment von 0,28 bis 0,77 Å belegt wird. Bemerkenswert ist der drastische Einbruch der hydrophoben Wechselwirkungen für das BG4 sowie für die BG10- und BG11-Derivate. Die visuelle Inspektion (vgl. Abbildung 4.23) der Konformationen zeigt, dass die langen Strukturen, mit zehn oder mehr Atomen in der Kette, schon aus der Bindetasche herausragen.

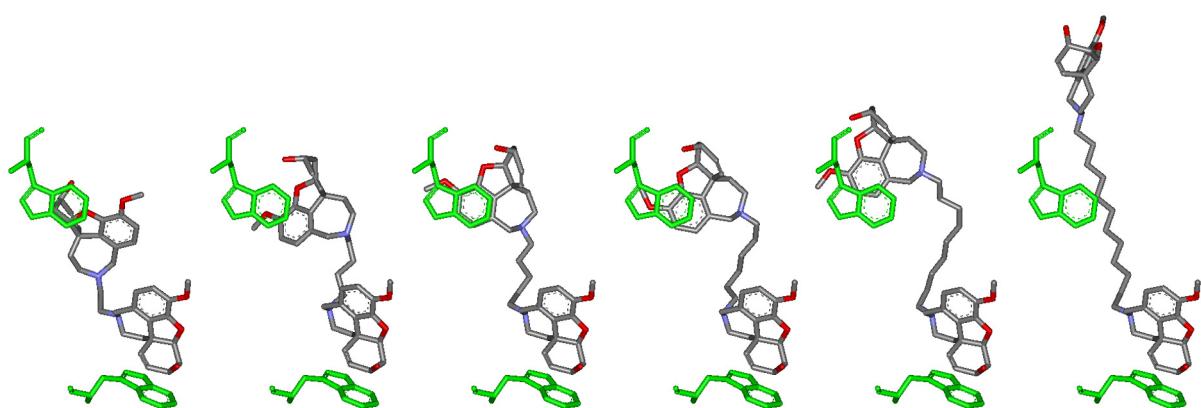


Abbildung 4.23: Ausgewählte Konformationen, wie sie beim Docken mit QXP erhalten wurden. Dargestellt sind von links nach rechts: BG2, BG4, BG5, BG6, BG9 und BG12.

Beim BG4 sorgt vermutlich die verdrehte Anordnung für den Einbruch bei der Lipophilie, BG5 dagegen zeigt eine nahezu perfekte parallel gestaffelte Orientierung der aromatischen Ringe aus Galanthamin bzw. Trp279, die bei BG6 ein wenig parallel verschoben sind. Diese beiden letzten Liganden zeichnen sich dementsprechend durch gute van der Waals-Wechselwirkungen aus, die zusätzlich noch durch eine T-förmige π - π -Wechselwirkung mit Tyr70 unterstützt wird (s. Abbildung 4.24) [71].

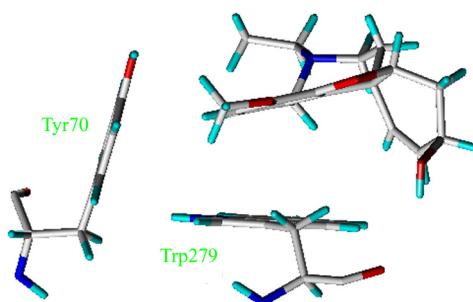


Abbildung 4.24: Wechselwirkung des aromatischen Galanthaminringes mit Tyr70 (T-förmige π - π -Wechselwirkung) und Trp279 (van der Waals-Wechselwirkungen), Tyr70 und Trp279 sind Bestandteile der PAS.

Mit Hilfe der geometrischen Parameter (vgl. Abbildung 4.20) ist es möglich, diese parallele oder T-förmige Ausrichtung zu quantifizieren. Kleine Winkel α beschreiben eine parallele Anordnung der beiden planaren Systeme. Der Winkel ω zusammen mit dem Abstand d erlaubt es, die laterale Verschiebung der beiden Ringsysteme zu bestimmen. Auf diese Weise ist es möglich, durch drei einfache Parameter zwischen der gestaffelten van der Waals- und der verschobenen π - π -Wechselwirkung zu unterscheiden.

Innerhalb der FlexX-Ergebnisse (Abbildung 4.22, rechts) erweist sich eine Methylenkette mit sieben Kohlenstoffatomen am günstigsten, da die Verbindung sowohl bezüglich der Lipophilie als auch der Energie die besten Werte liefert. Eine visuelle Inspektion der gedockten Konformationen zeigt van der Waals- bzw. π - π -Wechselwirkungen vor allem für BG3, BG6 und BG7 (s. Abbildung 4.25), was auch durch kleine Winkel α zusammen mit kurzen Distanzen d bestätigt wird (s. Abbildung 4.26).

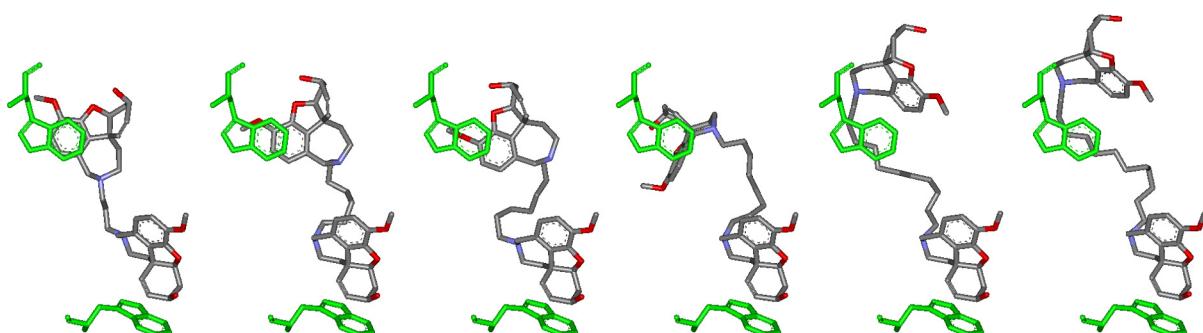


Abbildung 4.25: Ausgewählte Konformationen, wie sie beim Docken mit FlexX erhalten wurden. Dargestellt sind von links nach rechts: BG3, BG6, BG7, BG8, BG11 und BG12.

Eine gemeinsame Betrachtung der Ergebnisse zeigt, dass sowohl QXP wie auch FlexX diejenige Konformation bevorzugen, die stark mit Trp279 wechselwirkt. Der Unterschied, dass QXP ein BG5 und FlexX ein BG7 favorisiert, kann anhand der beiden verschiedenen Algorithmen der Docking-Programme erklärt werden. FlexX, welches den Liganden ausgehend von einem Basis-Fragment in der Bindungsstelle sukzessive aufbaut, tendiert generell dazu, kürzere und kompaktere Strukturen zu erzeugen. Der Monte-Carlo-Algorithmus von QXP hingegen positioniert den ganzen Liganden in der Bindungsstelle und führt dort mit ihm kurze Energieminimierungen durch, woraus langgestrecktere Konformationen resultieren. Diese Beurteilung lässt sich anhand der geometrischen Parameter überprüfen, da sowohl die Parallelität als auch die Raumerfüllung für das BG5 und das BG7 nahezu identisch sind.

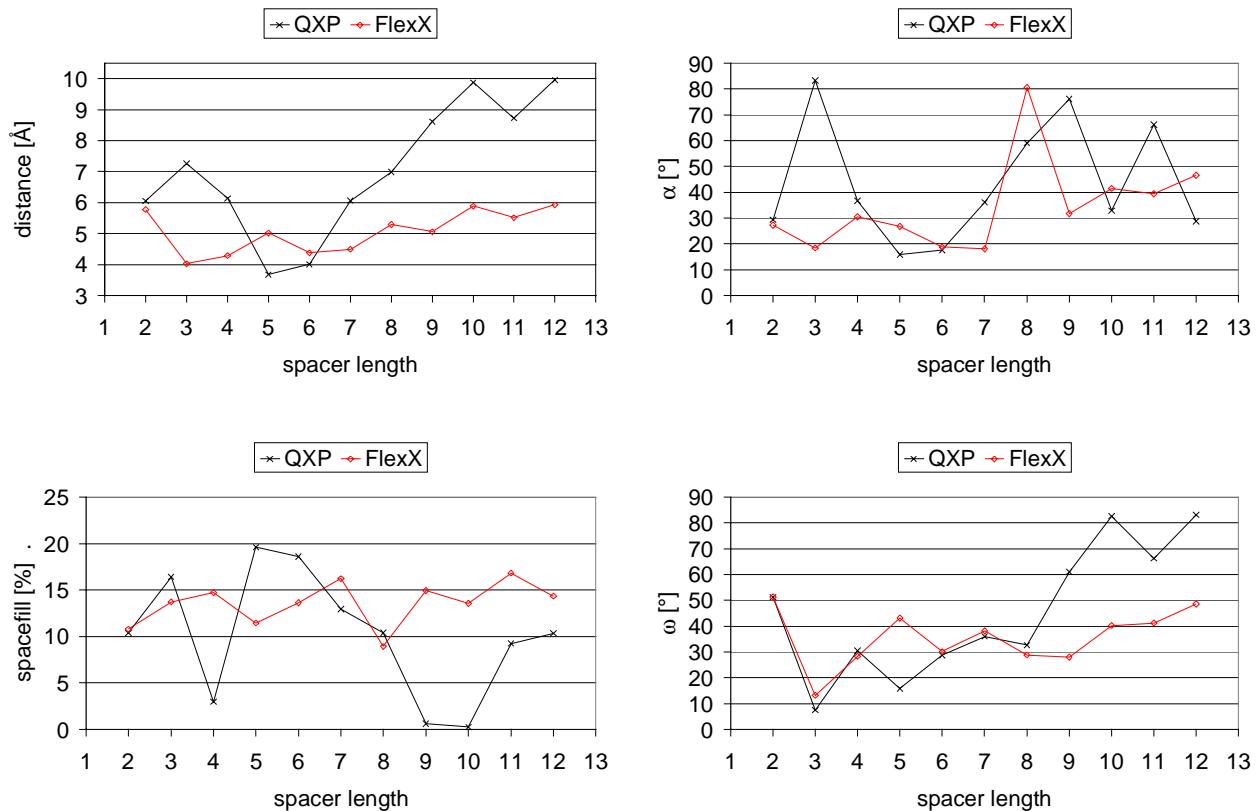


Abbildung 4.26: Geometrische Parameter der Docking-Ergebnisse der QXP- und FlexX-Berechnungen.

Besonders deutlich wird diese Abhängigkeit bei den Distanzen zwischen den aromatischen Ringen von Galanthamin und dem Trp279 in Abbildung 4.26. Diese nehmen als Funktion der Methylen-

kettenlänge zwar bei beiden Algorithmen nahezu linear zu - ab einer Methylenkettenlänge von fünf, aber die Steigung der Zunahme ist im Falle von FlexX signifikant kleiner.

Zum Vergleich der Docking-Ergebnisse mit biochemischen Daten standen IC_{50} -Werte für das BG6, BG8 und BG10 aus Messungen am elektrischen Aal - *Electrophorus electricus* - zur Verfügung [30]. Obwohl es sich dabei erneut um eine andere Spezies handelt, Aal statt Torpedo, ist der Vergleich wegen der hohen Sequenz-Homologie gerechtfertigt. Es zeigt sich, dass die experimentellen Daten den allgemeinen Trend korrekt wiedergeben.

Da ein IC_{50} -Wert die Inhibitor-Stärke beschreibt, sagen diese Messdaten nichts über den Einfluss auf die Plaque-Bildung, sondern etwas über die Komplex-Stärke aus. Diese biologischen Messdaten legen dementsprechend nahe, dass die Komplex-Bildungsenergien für die drei Derivate in der Reihenfolge BG8 < BG6 < BG10 steigen (vgl. Abbildung 4.27). Diese Reihenfolge der Energien ist bei den FlexX-Ergebnissen zu finden. QXP hingegen stuft zwar das BG10 als schlechtesten Liganden ein, sagt jedoch die Reihenfolge von BG6 und BG8 falsch voraus. Die experimentellen Daten festigen somit das Vertrauen in die FlexX-Ergebnisse.

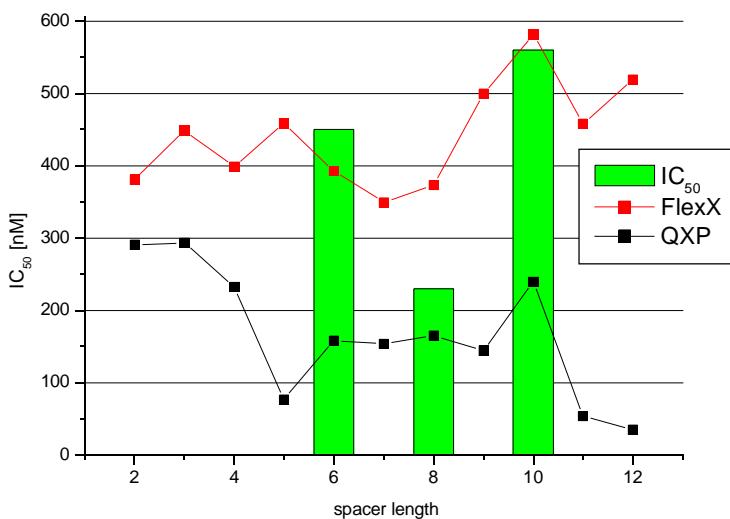


Abbildung 4.27: Auftragung der Docking-Energien der BG-AChE-Komplexe aus FlexX (rot) und QXP (schwarz) zusammen mit experimentell bekannten IC_{50} -Werten [72]. Die Energien sind zur besseren Visualisierung skaliert, verschoben und ohne Skala angegeben, da hier lediglich der relative Verlauf der Energien in Bezug auf die IC_{50} -Werte gezeigt werden soll.

Aus den obigen Ausführungen ist zu erkennen, dass die parallele, lateral verschobene Anordnung mit deutlichen π - π -Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung ist. Anhand der Literatur konnte für die obigen Parameter eine anziehende Wechselwirkung rein qualitativ bestätigt werden. Da in der Literatur diese Bewertung nur in Form von anziehend oder abstoßend existiert [73][74], ist für entscheidende Anordnungen die Wechselwirkung genauer quantifiziert worden.

Hierzu ist ein Programm entwickelt worden, das zwei Benzolringe in nahezu beliebiger Anordnung zueinander erzeugt, um anschließend die Energie eines solchen Systems zu berechnen. Für die Energieberechnung ist das Tripos-Kraftfeld genutzt worden, wie es in Sybyl [75] enthalten ist. Mit Hilfe dieser Berechnungen lassen sich z. B. die van der Waals-Wechselwirkungen für zwei parallele aromatische Systeme darstellen. In Abbildung 4.28 ist der Energieverlauf dargestellt, wie er sich für eine gestaffelte Anordnung zweier Benzolringe im Abstand von 3,4 Å ergibt. Die Koordinatenachsen x und y beschreiben die Verschiebung einer der beiden Ringe relativ zu dem zweiten. Dies zeigt, dass die Energie ihr Minimum bei der gestaffelten Anordnung hat und mit der Verschiebung zunimmt. Der Abstand von 3,4 Å lässt die beiden Systeme sich gerade berühren, was zu einer maximalen Kontaktfläche und somit zu dem besten Energieminimum führt. Analog wurde in Abbildung 4.29 ein Ausschnitt aus der Potential-Hyperfläche dargestellt, der die T-förmigen Wechselwirkungen beschreibt.

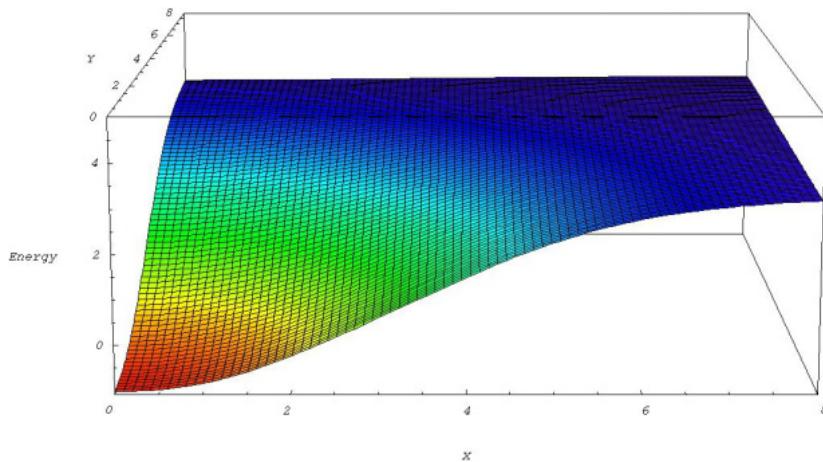


Abbildung 4.28: Ausschnitt aus der Potential-Hyperfläche. Hier ist die Wechselwirkungsenergie zweier Benzolringe in Abhängigkeit zur Position (x, y) in einer parallelen Ebene mit Abstand 3,4 Å aufgetragen. Die Koordinate (0, 0) steht dabei für die exakt gestaffelte Anordnung.

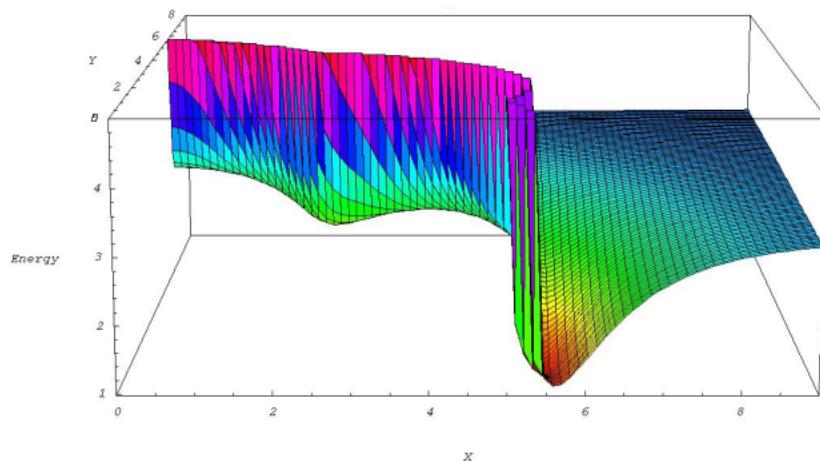


Abbildung 4.29: Ausschnitt aus der Potential-Hyperfläche. Hier ist die T-förmige π - π -Wechselwirkungsenergie zweier Benzolringe in Abhängigkeit zur Position (x, y) in einer parallelen Ebene mit Abstand 0 Å aufgetragen. Die Koordinate (0, 0) steht dabei für die um exakt 90° verdrehte Anordnung. Aus diesem Grund ist der Bereich für x bzw. $y < 4,5$ Å stark positiv, da dort die beiden Systeme überlappen, was zu starken abstoßenden Wechselwirkungen führt.

4.3 β -Amyloid-Arbeiten

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist weder eine Röntgenstrukturanalyse noch ein unter physiologischen Bedingungen erhaltener Strukturvorschlag des kompletten monomeren $\text{A}\beta_{1-40}$ oder $\text{A}\beta_{1-42}$ bekannt. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht werden, Modelle des $\text{A}\beta_{1-42}$ zu erstellen. Diese Modelle können anschließend genutzt werden, um strukturelle Eigenschaften des $\text{A}\beta$ abzuleiten, bestehende Theorien der β -Amyloid-Aggregation zu beweisen oder zu widerlegen und Fortschritte auf dem Weg zu einem strukturbasierten Wirkstoff-Design zu machen.

Überblick über den Stand der Forschung

Die existierenden strukturellen Informationen über die monomeren β -Amyloid-Peptide stammen aus einer Reihe von NMR-Untersuchungen [31][32][76]. Diese Informationen sind in Abbildung 4.30 unter Angabe des jeweiligen untersuchten Sequenzbereichs des $\text{A}\beta_{1-42}$ visualisiert. Zusätzlich sind die wichtigsten experimentellen Details (rechte Spalte) aufgeführt. In grau sind dabei die Bereiche des $\text{A}\beta_{1-42}$ angegeben, die in den jeweiligen Experimenten nicht mit einbezogen waren. Helikale Bereiche sind in gelb und β -Schlaufen (engl. „ β -turns“) in grün angegeben.

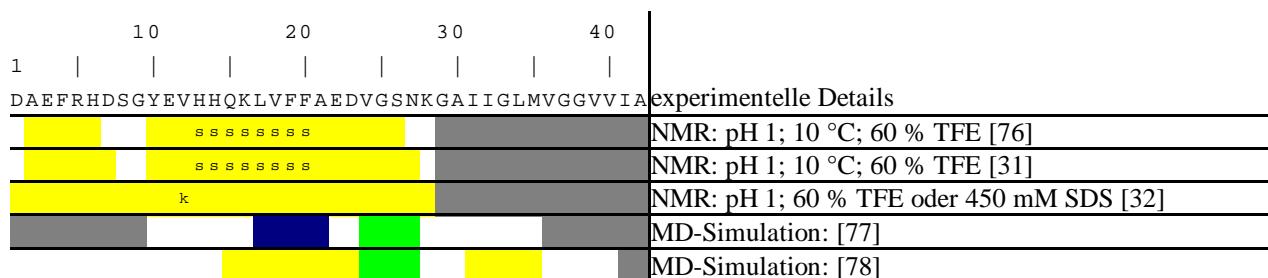


Abbildung 4.30: Identifizierte strukturelle Merkmale verschiedener β -Amyloide. Jede Zeile beschreibt das Ergebnis eines Experiments, dessen wesentliche experimentelle Parameter in der rechten Spalte abzulesen sind. Die Farbkodierung beschreibt in gelb helikale Bereiche, rot sind die β -Stränge, grün sind β -turns, blau ist der CHC und grau markiert die Aminosäuren, die in der Untersuchung fehlten. Durch „k“ ist ein Knick in der Helix beschrieben und mit „s“ sind stabile Bereiche der Helix angedeutet.

Der blaue Bereich beschreibt einen „central hydrophobic cluster“ (CHC), welcher bei MD-Simulationen als besonders stabiler Bereich aufgefallen ist. In einigen Experimenten wurden Teile der heli-

kalen Strukturen identifiziert, welche auch bei höheren pH-Werten (zwischen 1 und 4) und höheren Temperaturen (bis 35 °C) stabil bleiben (in Abbildung 4.30 mit „s“ markiert). Im direkten Vergleich lässt sich gut erkennen, dass der stabile Bereich der Helix mit dem CHC überlappt. Zusätzlich ist ein Knick in der Helix identifiziert worden (mit „k“ markiert).

Neben diesen auf spektroskopischen Untersuchungen und MD-Berechnungen basierenden Erkenntnissen wurden Mutationsexperimente durchgeführt, die zusätzliche Informationen liefern. So zeigen die Mutationen E22Q, E22K und E22A eine deutliche Beschleunigung der Aggregation, wohingegen E22D zu keiner Veränderung des Aggregationsverhaltens führt [79]. Dies scheint ein starkes Indiz für eine Abhängigkeit der Aggregation von der Ladung zu sein, weil nur bei der E22D-Mutation die Ladungszustände unverändert bleiben, d.h. wenn eine saure Aminosäure durch eine andere saure ersetzt wird. Weiterhin konnte mit Hilfe von CD- und FTIR-Spektroskopie gezeigt werden, dass das frisch gelöste Peptid für den Wild-Typ und die E22K-Mutante im Wesentlichen keinerlei strukturelle Ordnung aufweist, wohingegen die E22Q-Struktur bereits geringe Anteile an β -Strukturmerkmalen zeigt [80]. Die F19T-Mutation wie auch die V18A-Mutante liegen im CHC-Bereich und stören daher den CHC. Dies führt bei der V18A-Mutante zu einer vermehrten Bildung α -helikaler Struktur, was zu einer verlangsamten Aggregation führt [77][81]. Betrachtet man den Einfluss der AChE, so fällt auf, dass in Gegenwart der AChE die Aggregation der V18A-Mutante genauso beschleunigt wird wie beim Wild-Typ. Die E22Q-Mutante weist dagegen einen kaum wahrnehmenden beschleunigenden Effekt durch die AChE auf [27].

Zusätzlich zu der Untersuchung der statischen Eigenschaften des β -Amyloids sollten die dynamischen Faltungsvorgänge des Peptids untersucht werden; vor allem in Hinblick auf das dynamische Gleichgewicht zwischen einer helikalen und einer β -Faltblatt-Struktur, wie es in der Literatur beschrieben ist [81]. Dieses Gleichgewicht bezieht sich hauptsächlich auf den zentralen Abschnitt (Aminosäuren 10 bis 26), wodurch ein anti-paralleles β -Faltblatt entsteht, das sich mit anderen Peptiden zu cross- β -Faltblättern zusammenlagern kann, wenn die Konzentration der missgefalteten Peptide groß genug wird (vgl. Abbildung 4.31).

Die stabile β -Struktur am C-Terminus ist von größerem Interesse, weil es experimentelle Indizien dafür gibt, dass eben dieser Abschnitt des Proteins für die Oligomerisation verantwortlich ist [82] [83]. Es scheint so, dass die erste Interaktion zur Ausbildung eines Dimers oder Oligomers in diesem Bereich beginnt und die Umlagerung der übrigen Bereiche erst danach eintritt.

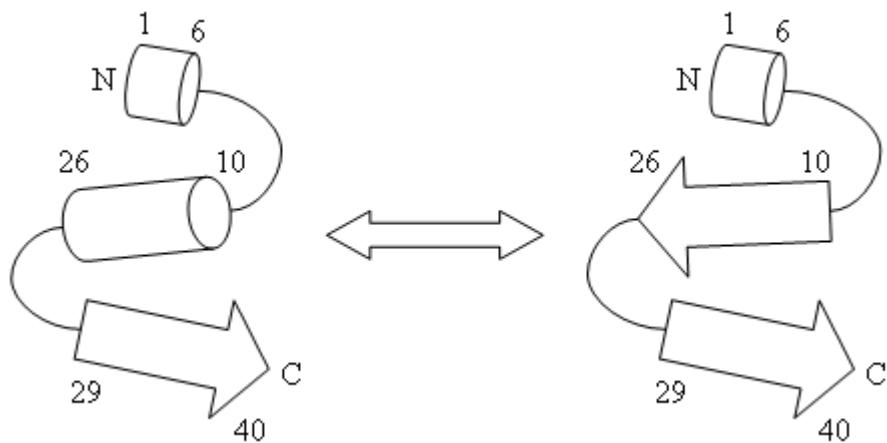


Abbildung 4.31: Schematische Darstellung des konformellen Gleichgewichts zwischen alternativen Strukturen des β -Amyloid-Proteins [81].

Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit sind neue Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau der endgültigen Fibrillen bekannt geworden. Hierbei ist bestätigt worden, dass in den Fibrillen ein cross- β -Faltblatt zu finden ist, welches sich in Richtung der Fibrillen zwischen den einzelnen Monomeren ausbildet (vgl. Abbildung 4.32). Jedes Monomer bildet dabei eine „Angelhaken“-Struktur, die β -Faltblätter von den Aminosäuren 12 bis 24 und 30 bis 40 bildet, die wiederum durch eine Schleife bei den Aminosäuren 25 bis 29 verbunden sind [84][85][86].

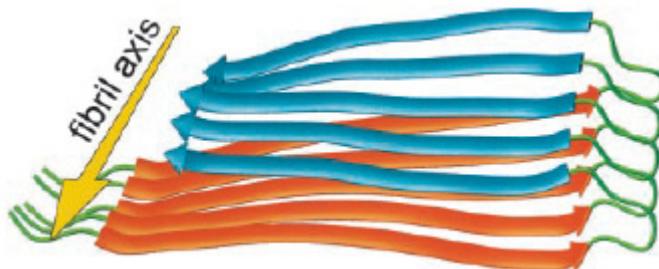


Abbildung 4.32: Monomer-Assoziation innerhalb der endgültigen Fibrillen. Jedes Monomer bildet eine „Angelhaken“-Struktur aus zwei anti-parallelen β -Strängen (orange und blau), welche über eine kurze Schleife (grün) verbunden sind. Die β -Faltblatt-Wechselwirkungen bilden sich zwischen den Monomeren und entlang der Fibrillen-Achse zu einer cross- β -Struktur aus [85].

4.3.1 Modellbildung & Validierung

Modell 1

Aufbauend auf der Hypothese der AChE-geförderten Aggregation wurde ein Modell für das β -Amyloid erstellt, das den Zustand des Peptids zum Zeitpunkt der Interaktion mit der AChE beschreibt. Ein solches Modell konnte aufgrund der publizierten Röntgenstrukturanalyse der AChE komplexiert mit Fasciculin II erstellt werden. Fasciculin II (FAS) ist ein Schlangengift der grünen Mamba und besteht aus 61 Aminosäuren. Die toxische Wirkung beruht auf der irreversiblen Blockierung der AChE.

FAS eignet sich als Templat für die Homologie-Modellierung, weil es

1. 29 % Homologie aufweist und
2. mit der PAS der AChE wechselwirkt.

Speziell die Wechselwirkung mit der PAS ist dabei von großer Bedeutung, da einerseits gezeigt worden ist, dass ein AChE-Fragment, welches die PAS enthält, die gleiche beschleunigende Wirkung auf die β -Amyloid-Aggregatbildung aufweist [29], und andererseits dieser beschleunigende Effekt in Gegenwart von PAS-Inhibitoren ausbleibt [26][28].

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde mit Hilfe des Swiss-Model-Servers [39] und dem Sequenz-Alignment in Abbildung 4.33 ein Modell für das $\text{A}\beta_{1-42}$ erstellt.

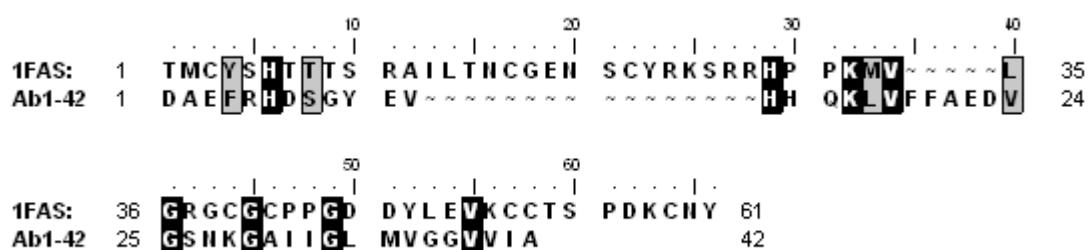


Abbildung 4.33: Sequenz-Alignment zwischen $\text{A}\beta_{1-42}$ und Fasciculin II.

Betrachtet man die Überlagerung dieses $\text{A}\beta$ -Modells mit der Struktur des FAS (links in Abbildung 4.34), so lässt sich die deutliche Ähnlichkeit erkennen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die ersten 28 Aminosäuren des FAS ausgeblendet. Rechts oben in dem linken Teilbild ist der einzige deutliche Unterschied zwischen dem initialen $\text{A}\beta$ -Modell (rot) und dem FAS-Templat (grün) zu er-

kennen. Das Modell zeigt dort eine kleine Extra-Schleife, welche durch die Aminosäuren 19 bis 23 im $\text{A}\beta_{1-42}$ gebildet wird. Diese Aminosäuren weichen vom Templat ab, da ihnen im obigen Alignment keine analogen Aminosäuren zugewiesen sind.

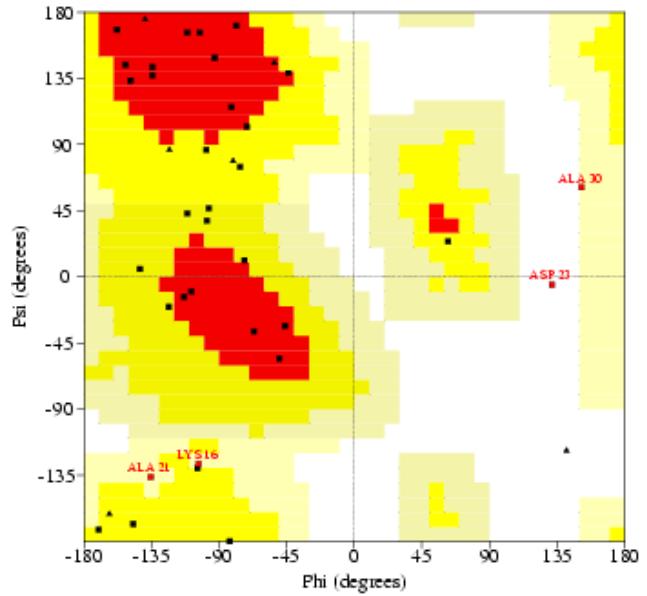
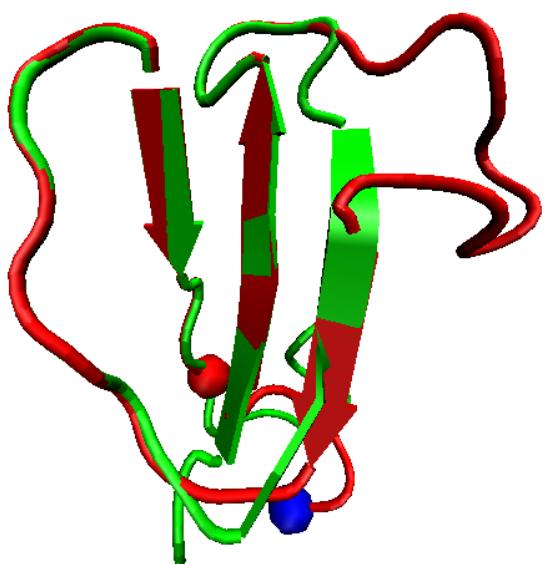


Abbildung 4.34: Links sind Überlagerungen des initialen $\text{A}\beta_{1-42}$ -Modells (rot) und des Templat (FAS, grün) gezeigt. Zur Orientierung sind die β -Faltblatt-Abschnitte durch Pfeile, der N-Terminus durch eine blaue und der C-Terminus durch eine rote Kugel angedeutet. Rechts ist der Ramachandran-Plot für das initiale Modell dargestellt. Die Aminosäure Glycin ist als Dreieck und alle anderen Aminosäuren sind als Quadrate dargestellt. In rot ist der ideale, in gelb der erweitert erlaubte Bereich und in beige der großzügig erlaubte Bereich angegeben. Aminosäuren, die in den verbotenen Bereich fallen, sind in rot mit Beschriftung zu sehen.

In einem Ramachandran-Plot werden die Aminosäuren anhand der Winkel im Peptidrückgrat aufgetragen und anhand von statistischen Erkenntnissen über bekannte Strukturen in die verschiedenen Bereiche eingeteilt [87]. Dies zeigt, dass 88,2 % der Residuen (ohne Glycin und Prolin) innerhalb des erlaubten Bereichs zu finden sind. Eine Überprüfung des initialen Modells mit Hilfe eines Ramachandran-Plots (rechts in Abbildung 4.34) zeigt vier Residuen, die nicht in den erlaubten oder erweitert erlaubten Bereich fallen. In der Literatur ist beschrieben, dass sich bei guten Proteinstrukturen mindestens 90 % der Aminosäuren - ausgenommen Glycin und Prolin - in der erlaubten Region des Ramachandran-Plots befinden [41]. Glycin und Prolin sind bei derartigen Betrachtungen ausgenommen, da sich diese beiden Aminosäuren aufgrund ihrer speziellen konformellen Freiheiten bzw. Ein-

schränkungen anders verhalten als die restlichen Aminosäuren.

Aufgrund dieses Befundes und um die konformelle Stabilität des $\text{A}\beta_{1-42}$ zu untersuchen, wurde mit dem Modell eine MD-Rechnung unter physiologischen Bedingungen durchgeführt (Details sind in Kapitel 6.1.2 zu finden). In Abbildung 4.35 sind die RMSD-Werte über die C_α -Atome der Struktur als Funktion der Zeit dargestellt, wobei als Referenzsystem die willkürlich ausgewählten Strukturen bei $t = 4,5$ ns und $t = 11$ ns benutzt worden sind. Auffällig ist, dass beide Grafen den gleichen Verlauf zeigen, was ein Zeichen dafür ist, dass die beiden Strukturen sehr ähnlich sind und dass nach einer Relaxationszeit von etwa 2 ns das System für etwa 10 ns lang stabil ist.

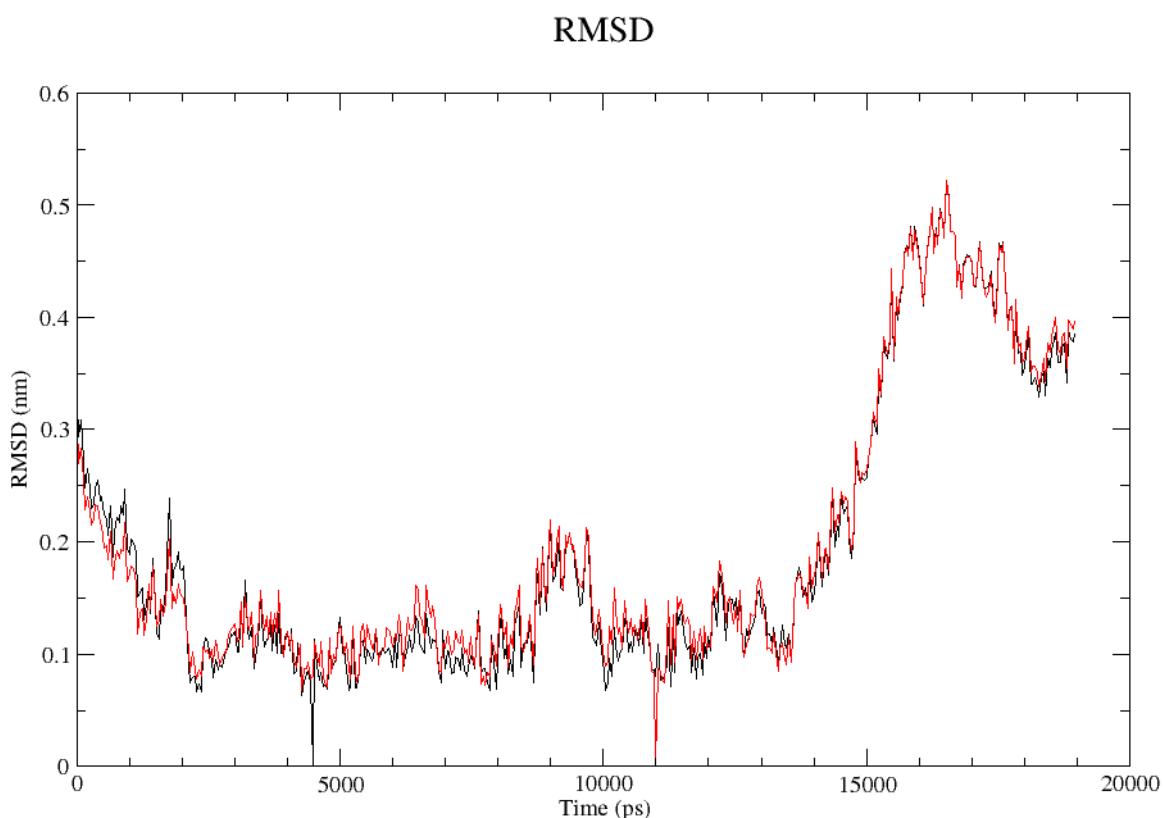


Abbildung 4.35: Verlauf des RMSD-Wertes über die Zeit für das Modell des $\text{A}\beta_{1-42}$. Berechnet wurde der RMSD-Wert jeweils relativ zu der Konformation bei 4,5 ns (schwarz) und 11 ns (rot).

Eine stabile Konformation erkennt man in derartigen RMSD-Auftragungen durch zeitlich konstante RMSD-Werte. Weiterhin sind Strukturen die RMSD-Werte von etwa 0,1 nm zeigen der benutzten Referenzstruktur sehr ähnlich. Die so erhaltene Struktur zeigt eine bessere Qualität, wie durch den

Ramachandran-Plot (s. Abbildung 4.36) und die lange Stabilität zu erkennen ist. Es fällt auf, dass nur noch eine Aminosäure im verbotenen Bereich liegt, was dazu führt, dass nun 97,1 % der Aminosäuren im erlaubten Bereich zu finden sind.

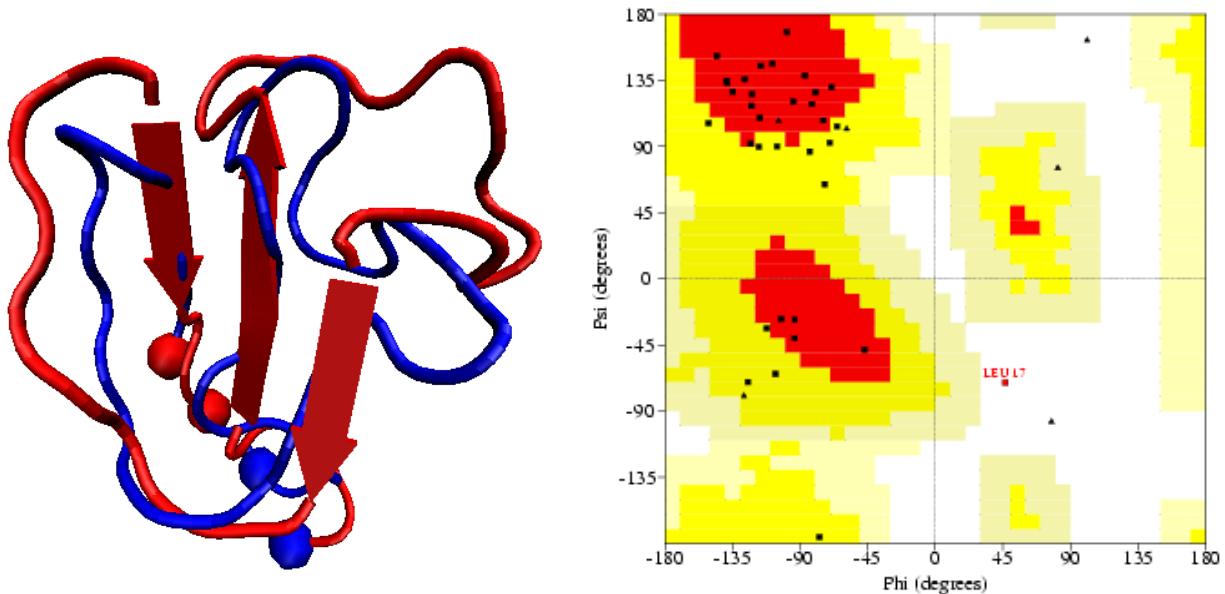


Abbildung 4.36: Links sind Überlagerungen des initialen A β ₁₋₄₂-Modells (rot) mit der Struktur nach 4,5 ns MD-Simulation (blau) dargestellt. Die Markierungen wie auch der Ramachandran-Plot rechts sind analog zu Abbildung 4.34.

Nach visueller Inspektion muss erwähnt werden, dass die Struktur von $t = 9$ ns bis 10 ns eine etwas kompaktere Konformation einnimmt. Nach dieser Kontraktion wird die stabilere Konformation wieder zurückerhalten, was anhand der beiden gleichen Kurvenverläufe zu erkennen ist. Erst nach etwa 14 ns beginnt das Peptid mit einer deutlichen Strukturänderung, jedoch ist dieser Bereich für die Analyse der A β ₁₋₄₂-Struktur zum Zeitpunkt einer Interaktion mit der AChE sicher nicht mehr relevant.

Da das MD-Experiment mit der A β -Struktur durchgeführt worden ist, die aus der Homologie-Modellierung mit dem FAS stammt, ist zumindest die Struktur zu Anfang noch von dem FAS-Templat geprägt. Die zugehörige energieminimierte Struktur wird nach kurzer Relaxation von etwa 2 ns erreicht. Mit fortschreitender Zeit können jedoch auch andere Minima auf der Energie-Hyperfläche erreicht werden, von denen sich der konformelle Faltungsweg zu anderen energetisch günstigen Struk-

turen ergibt. Ein solcher Vorgang setzt offensichtlich im MD-Experiment nach etwa 14 ns ein, wobei jedoch im beobachteten Zeitbereich bis etwa 19 ns noch kein stabiler Zustand erreicht worden ist. Hier zeigt sich eine Schwäche von MD-Berechnungen, bei denen stabile Strukturen ohne eine geeignete Beeinflussung (z. B. durch „conformational flooding“ [88]) keine signifikante Umfaltung der Ausgangsstrukturen zeigen.

Als weiteres Indiz für die Konformation des Modells wurde die Entwicklung der β -Strukturmerkmale über die ersten 12 ns der Simulation betrachtet. Der prozentuale Anteil an β -Strukturen zu jedem Zeitpunkt ist der Abbildung 4.37 zu entnehmen. Wenn dieser Anteil gemittelt wird, ergibt sich ein Wert von ca. 39 %.

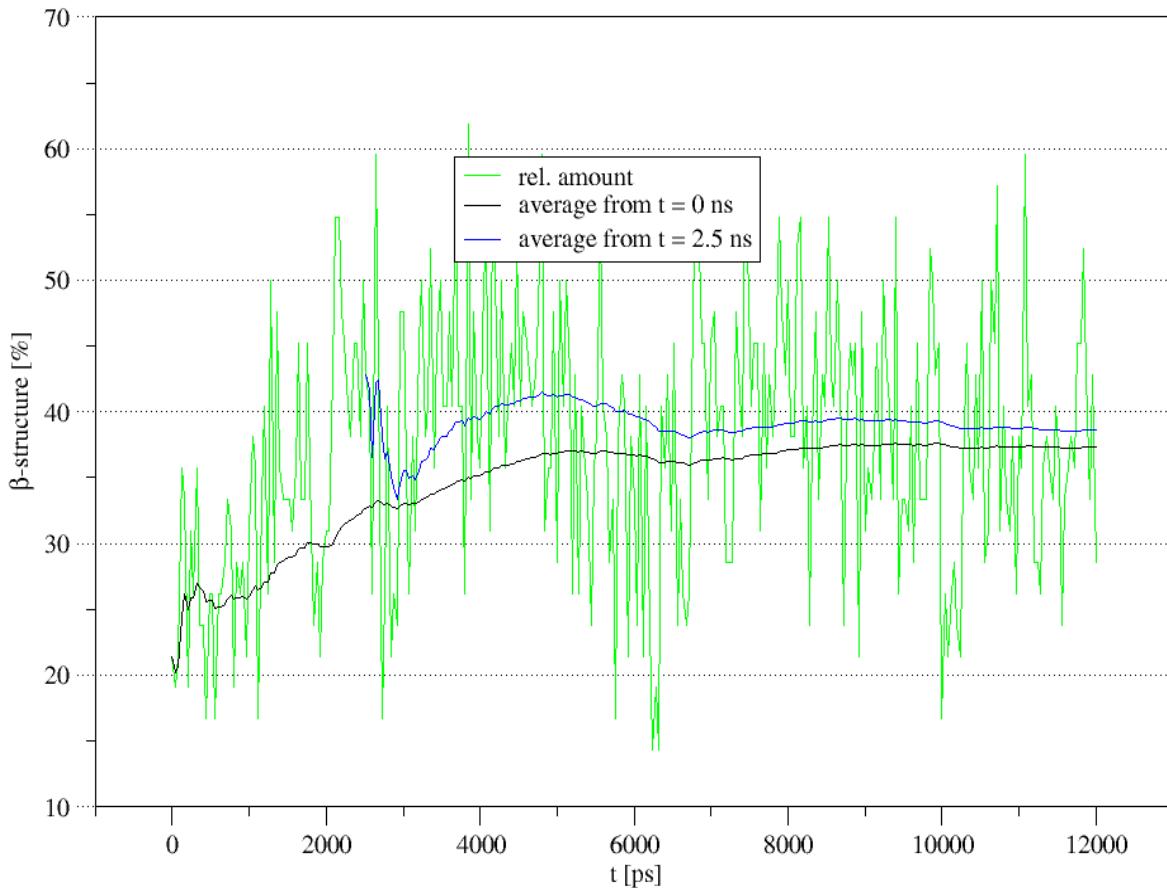


Abbildung 4.37: Verlauf des prozentualen Anteils an β -Strukturmerkmalen an der Gesamtstruktur während der ersten 12 ns. Zusätzlich zum zeitlichen Verlauf sind auch zwei Mittelwerte gegeben. Im ersten Fall wird beginnend bei $t = 0$ ns gemittelt, wohingegen beim zweiten Fall die anfängliche Relaxationsphase von der Mittelwert-Berechnung ausgenommen wird.

Dies ist nah an den experimentell identifizierten Werten, welche mit Hilfe von CD-spektroskopischen Untersuchungen zu 45 % [89] oder 46 % [33] bestimmt wurden. Obwohl kritisch angemerkt werden muss, dass der Aggregationszustand bei den CD-Experimenten unbekannt ist.

Zusätzlich stimmt der hydrodynamische Radius des relaxierten Modells von 0,96 bis 0,97 nm gut mit dem Radius so genannter Subprotofibrillen, der zu 1 bis 1,5 nm bestimmt wurde, überein [23]. Diese Subprotofibrillen stellen die erste Stufe der Aggregatbildung dar, welche anschließend über Protofibrillen zu Fibrillen aggregieren. Dieser Befund legt nahe, dass das Modell einem frühen Zustand in dem Aggregationsprozess entspricht, was aufgrund der Modellierung des Zustandes während der Interaktion mit der AChE zu erwarten gewesen ist.

Nachdem eine stabile Konformation des $\text{A}\beta_{1-42}$ identifiziert worden ist und diese gut mit experimentellen Indizien übereinstimmt, sollte diese Struktur auf die Interaktion mit der AChE und mit sich selbst untersucht werden. Für das Protein-Protein-Docking wurde das Programm GRAMM [90] genutzt, das eine sechsdimensionale Suche durchführt. Die sechs Dimensionen geben dabei die Position im dreidimensionalen Raum und die Rotation um alle drei Raumachsen an.

In Abbildung 4.38 ist das energetisch beste Docking-Ergebnis mit PAS-Wechselwirkungen des $\text{A}\beta_{1-42}$ gegen die AChE dargestellt. Neben Aminosäuren der PAS (rot) ist dort auch ein Fragment der AChE markiert (grün), das noch die PAS enthält und die gleiche beschleunigende Wirkung auf die $\text{A}\beta$ -Aggregation zeigt wie die vollständige AChE [91]. Das β -Amyloid-Modell interagiert dementsprechend mit der PAS und weiten Teilen des Fragments der AChE. Dies ist Indiz dafür, dass das Modell den Zustand der Interaktion mit der AChE gut wiedergibt.

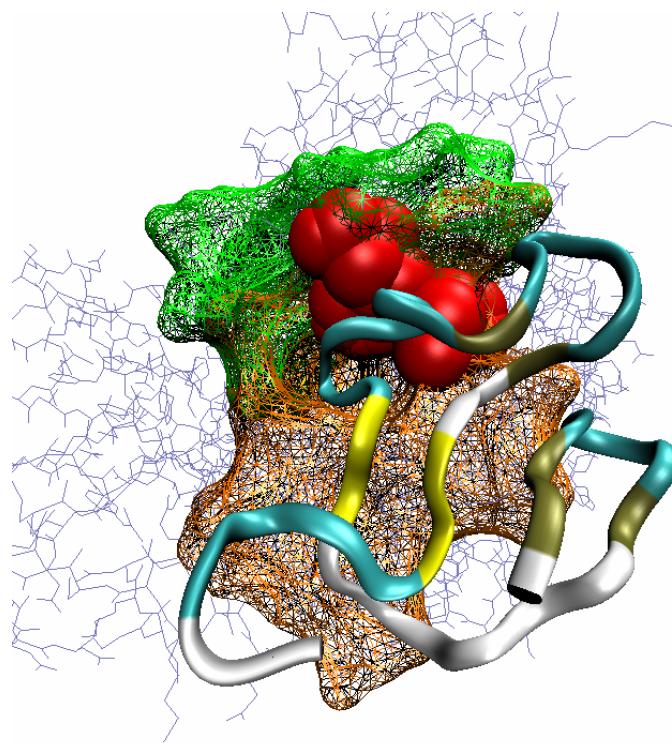


Abbildung 4.38: Docking-Ergebnis des $\text{A}\beta_{1-42}$ mit der AChE. Das β -Amyloid-Peptid ist als Strang dargestellt und die Bereiche der β -Stränge sind gelb eingefärbt. Durch das braune Gitter sind die Aminosäuren visualisiert, die mit dem Peptid wechselwirken. Zusätzlich sind entscheidende Aminosäuren der PAS in rot hervorgehoben und das grüne Gitter markiert ein Fragment der AChE (274-308 Torpedo-Nummerierung), das analog der gesamten AChE die Aggregation beschleunigt.

Die Interaktion des monomeren $\text{A}\beta_{1-42}$ mit sich selbst, d.h. eine Dimerbildung, entspricht dem ersten Schritt in dem Aggregationsprozess. Ein Dimer repräsentiert dementsprechend einen möglichen Startpunkt für die Subprotofibrill-Bildung. In Abbildung 4.39 ist ein mögliches Dimer, wie es aus einer GRAMM-Berechnung folgt, einmal von oben (links) und einmal von der Seite (rechts) dargestellt.

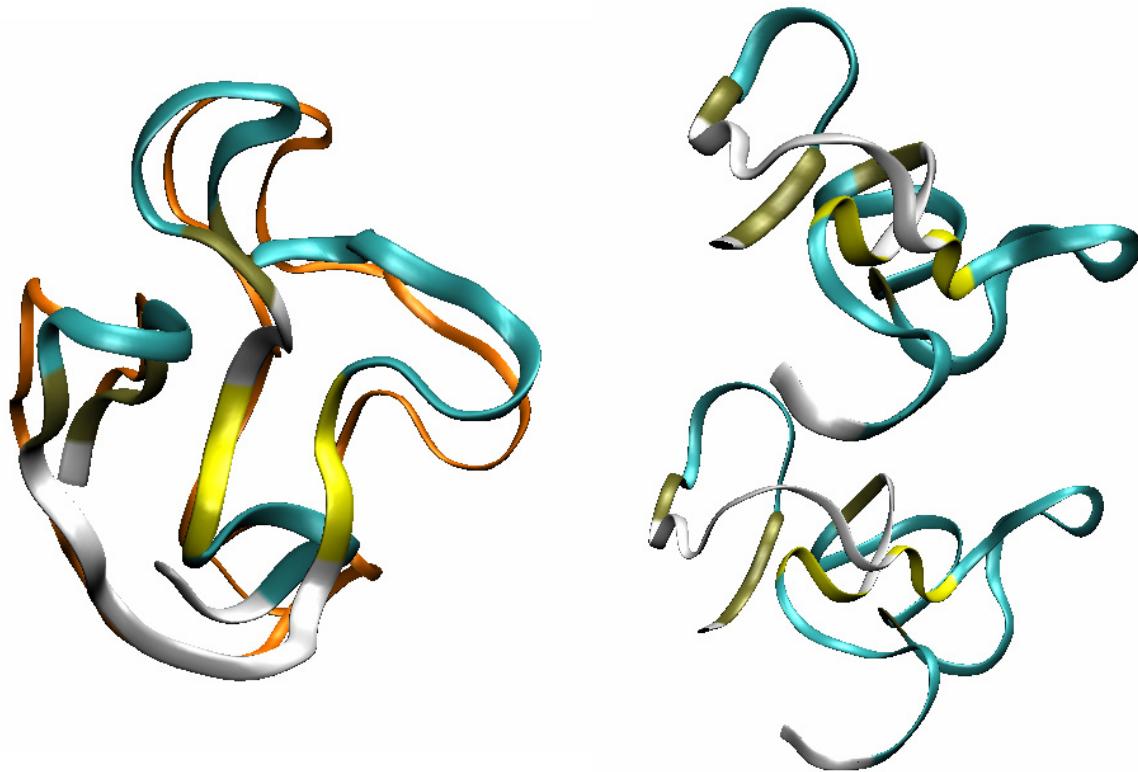


Abbildung 4.39: Docking-Ergebnisse von zwei A β ₁₋₄₂-Modellen, die eine nahezu perfekte Staffelung zeigen, sowohl von oben (links) als auch von der Seite (rechts). Die Monomere sind entsprechend der Sekundärstruktur-Merkmale eingefärbt (β -Strang in gelb, Schlaufen in türkis und ungeordnete Bereiche in weiß) und lediglich links ist das hintere Monomer aus Gründen der Übersicht orange dargestellt.

Dynamisches Verhalten von A β -Strukturen in Lösung

Als erster Schritt für die Untersuchung der dynamischen Eigenschaften des A β in Lösung bietet es sich an, die aus der Literatur bekannten Strukturen in Wasser zu simulieren. Strukturelle Informationen sind aus NMR-Experimenten erhalten worden, wobei diese in organischen Lösemitteln bzw. bei niedrigen pH-Werten erhalten worden sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass derartig vorbereitete A β -Lösungen bei Verdünnung in Wasser oder physiologischem Puffer sich umfalten und die „normale“ Aggregation zeigen [32][92].

Die PDB-Datenbank weist drei verschiedene Einträge für das A β ₁₋₄₀ bzw. A β ₁₋₄₂ auf, die wie bei NMR-Strukturlösungen üblich ein Ensemble mehrerer möglicher Konformationen enthalten. Um aus diesen Strukturen geeignete Startstrukturen auszuwählen, sind innerhalb eines jeden Ensembles alle paarweisen RMSD-Werte berechnet worden, um zwei möglichst diverse Konformationen auszuwählen.

len. Dies führt zu dreimal zwei ausgewählten Strukturen, die in einer MD-Berechnung simuliert worden sind (für die Parameter siehe Kapitel 6.1.2). In Tabelle 4.13 sind die ausgewählten Strukturen und einige Eigenschaften zu den Experimenten aufgeführt. Die Trajektorien sind über einen Zeitraum von ca. einem Jahr berechnet worden. Aufgrund unterschiedlicher Systemgrößen und technischer Details ergeben sich die unterschiedlichen Längen der Trajektorien.

Tabelle 4.13: Experimentelle Informationen zu den für MD-Berechnungen ausgewählten Amyloid-Strukturen und der jeweiligen Länge der Simulationen.

PDB-Code	Ausgewählte Struktur	A β -Fragment	Ensemble Größe	experimentelle Parameter		Quelle	Traj.-Länge [ps]
1AML	11	1-40	20	40 % TFE	Sticht et al. [93]	13692	
1AML	13	1-40	20	40 % TFE	Sticht et al. [93]	19450	
1BA4	02	1-40	10	SDS, pH 5,1	Coles et al. [94]	18274	
1BA4	07	1-40	10	SDS, pH 5,1	Coles et al. [94]	7620	
1IYT	04	1-42	10	80 % HFIP	Crescenzi et al. [95]	4000	
1IYT	10	1-42	10	80 % HFIP	Crescenzi et al. [95]	14320	

Die bei der Simulation der sechs ausgewählten Konformationen berechneten Trajektorien sind in Abbildung 4.40 dargestellt. Dazu wurde zuerst eine gemeinsame Trajektorie erstellt, indem die sechs Einzel-Trajektorien aneinander gehängt wurden, um dann im zweiten Schritt die prinzipiellen Komponenten der gesamten Bewegung zu bestimmen. Alle Konformationen der Trajektorien konnten im Anschluss daran auf die Ebene, die von den ersten beiden Hauptkomponenten aufgespannt wird, projiziert werden. Diese Analyse wurde lediglich mit den C α -Atomen der ersten 40 Aminosäuren durchgeführt, damit auch die Simulationen mit den beiden 1IYT-Strukturen verglichen werden konnten und die C α -Atome als Repräsentant für das Peptidrückgrat ausreichend sind.

Diese Auftragung zeigt, dass weite Bereiche des Konformationsraumes abgesucht worden sind. Erkennbar ist, dass drei zusammenhängende Bereiche des Konformationsraumes abgedeckt werden, ein Bereich rechts (grün), einer unten (schwarz und rot) und ein dritter oben (blau, türkis und magenta). Dies kann bedeuten, dass Konformationen der verschiedenen Trajektorien sehr ähnliche Gestalt annehmen. Allerdings muss das nicht gelten, weil nur zwei der 120 Dimensionen dargestellt sind und die Projektion alle übrigen 118 Freiheitsgrade ignoriert.

Bei der Berechnung der RMSD-Werte als Funktion der Zeit einer Trajektorie gegen eine andere ist aufgefallen, dass keine gleichen Strukturen in zwei verschiedenen Trajektorien zu finden sind. Allerdings können Ähnlichkeiten in Bezug auf die Gesamtstruktur identifiziert werden, weil in allen Strukturen helikale Bereiche gefunden werden und sich die Struktur häufig zu einer „Angelhaken“-artigen Struktur umfaltet.

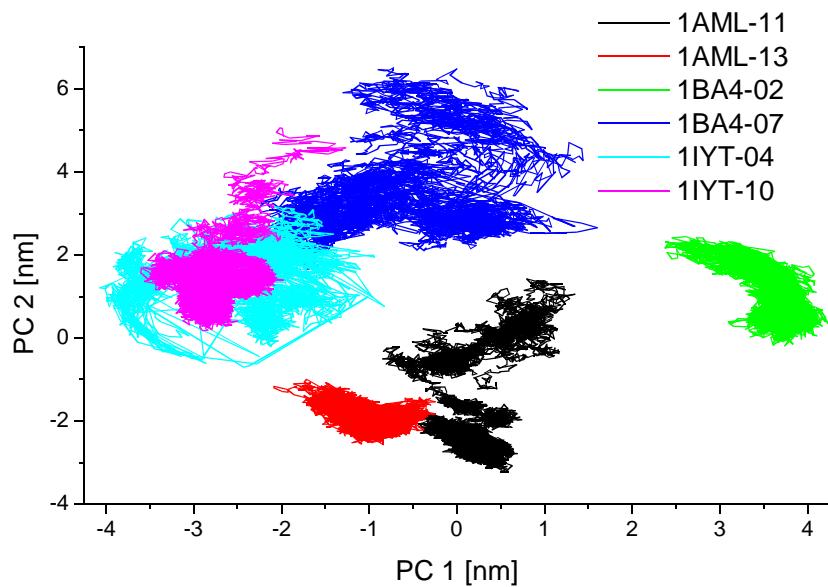


Abbildung 4.40: Projektion der sechs Trajektorien berechnet für die ausgewählten NMR-Strukturen auf die beiden ersten Eigenvektoren der kombinierten Bewegung.

An dieser Stelle soll zunächst die Helizität der MD-Simulationen intensiver untersucht werden. Die Helizität kann berechnet werden, indem das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen zu den Residuen zwei bis fünf Positionen weiter in der Sequenz betrachtet wird. Mittelt man nun über die Zeit für jede Aminosäure die Aussage, ob diese Aminosäure in einer helikalen Struktur (α -Helix, 3_{10} -Helix oder andere) vorliegt oder nicht, so ergibt sich für die NMR-Strukturen die Abbildung 4.41.

Bemerkenswert an dieser Auftragung ist die extrem stabile Helix rund um die Residuen 17-21, die über fast 80 % der Zeit vorliegt. Zusätzlich fällt auf, dass es weniger konservierte helikale Bereiche von 1 bis 8 bzw. 27 bis 40 gibt.

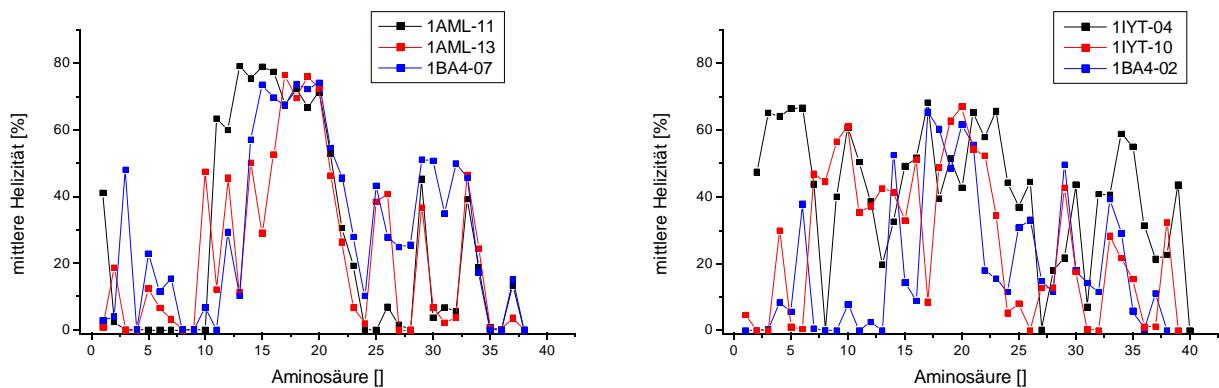


Abbildung 4.41: Helizität der sechs MD-Simulationen mit den ausgewählten NMR-Strukturen. Es ist für jede Aminosäure die Zeit gemittelt worden, während der die Aminosäure zu einer Helix gehört.

Es sei an dieser Stelle daran erinnert, dass die MD-Berechnungen in Wasser durchgeführt worden sind, während die Ausgangsstrukturen von NMR-Untersuchungen in organischen Lösemitteln stammen. Aus diesem Grund ist eine Relaxationsphase zu erwarten, wodurch Bereiche zu identifizieren sind, die durch die organischen Lösemittel stabilisiert worden sind. Dies ist beispielhaft in Abbildung 4.42 für die Simulation 1AML-11 durchgeführt. Dort ist die mittlere Helizität über verschiedene diskrete Zeitspannen aufgetragen. Bemerkenswert ist das Verschwinden der Helix rund um die Aminosäure 33, wohingegen die zentrale Helix immer bei der Aminosäure 11 beginnt und sich im Verlauf der Simulation um ein bis zwei Residuen - bis etwa Aminosäure 22 - ausdehnt.

In Anbetracht der bekannten Struktur der Monomere in den endgültigen Fibrillen - eine „Angelhaken“-Konformation (s. Abbildung 4.32) - sind vor allem die folgenden zwei Befunde erstaunlich. Zum einen werden wie zuvor angedeutet Strukturen gefunden, die bereits sehr stark einem „Angelhaken“ gleichen, und zum anderen weiten sich die helikalen Strukturen am C-Terminus im Verlauf der Simulation auf und beginnen dort β -Strukturmerkmale auszubilden. Diese Eigenschaften konnten sehr gut anhand von Filmen, die die Dynamik der Konformationen zeigen, beobachtet werden.

Vor allem dieser letzte Befund stimmt sehr gut mit den experimentellen Erkenntnissen überein, dass der C-Terminus als Domäne für die Initiierung der Oligomerisation dient. Während dieser ersten Schritte der Aggregation sollte daher die stabile Struktur der Helix am C-Terminus verschwinden und durch z. B. einen β -Strang ersetzt werden, der durch intermolekulare Wechselwirkungen die Oli-

gomer-Bildung beginnt und unterstützt.

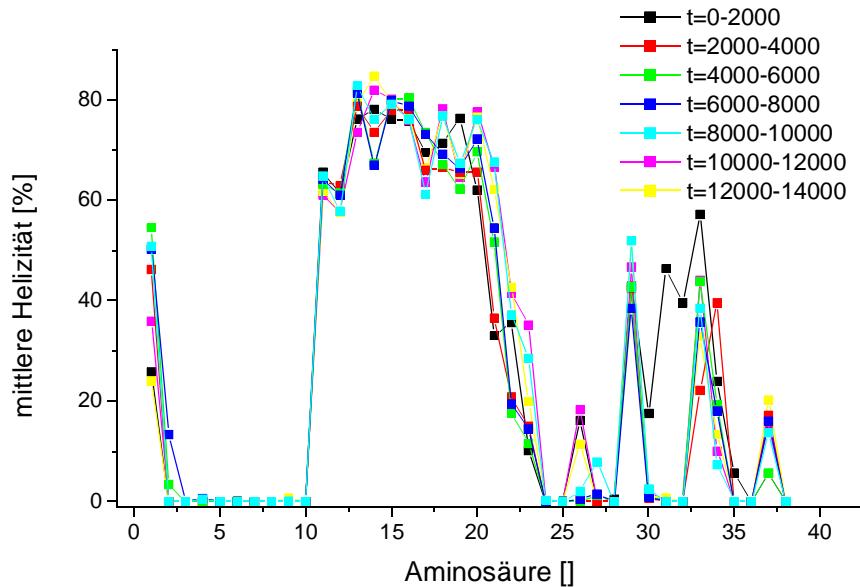


Abbildung 4.42: Mittlere Helizität über verschiedene Intervalle der MD-Simulation für 1AML-11.

Um die „Angelhaken“-Struktur einzelner Konformationen quantifizieren zu können, wurde das $\text{A}\beta_{1-42}$ in vier Bereiche eingeteilt (s. Abbildung 4.43), die als Vektoren vom N-Terminus zum C-Terminus betrachtet worden sind.

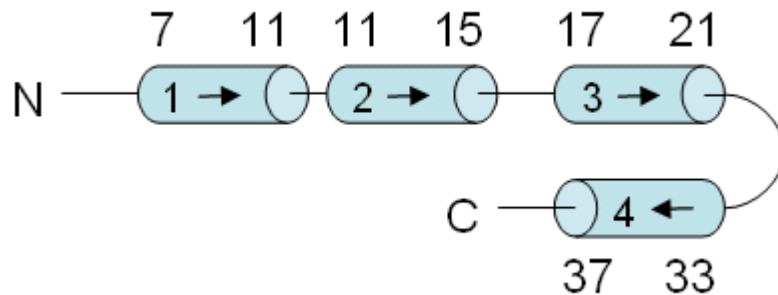


Abbildung 4.43: Einteilung der Struktur in vier Abschnitte. Diese wurden jeweils als ein Vektor betrachtet, der vom N-Terminus zum C-Terminus weist. Die vier Abschnitte reichen von den Aminosäuren 7 bis 11, 11 bis 15, 17 bis 21 und 33 bis 37.

Mit Hilfe der Distanzen der Vektor-Mittelpunkte und der Winkel zwischen den Vektoren kann die

gesamte Struktur des Peptids beurteilt werden. Die Vektoren sind über die Distanz vom C-Atom der jeweils ersten (7, 11, 17 oder 33) und dem C_α -Atom der letzten Aminosäure des jeweiligen Bereichs (11, 15, 21 oder 37) erstellt worden. Auf diese Art ist die Richtung der Vektoren nahezu unabhängig von der Sekundärstruktur, da ein derartig erzeugter Vektor sowohl bei einer Helix als auch bei einem β -Strang die Richtung gut wiedergibt.

Betrachtet man nun die Distanzen bzw. die Winkel (vgl. Abbildung 4.44) zwischen diesen vier kurzen Abschnitten des Peptids, so fällt anhand der Distanz zuerst auf, dass die Struktur kompakter wird, weil die Distanzen - bis auf 2 gegen 3 - abnehmen. Mit Hilfe der Winkel ist zu erkennen, dass die anfängliche nahezu geradlinige Ausrichtung der ersten drei Abschnitte - kleine Winkel in der Nähe von 0° - sich ein wenig verschlechtert, die Winkel also zunehmen und weniger konstant sind. Weiterhin ist zu erkennen, dass das vierte Fragment sich im Verlauf der Zeit immer mehr einem Winkel von 180° nähert, was für die „Angelhaken“-Struktur spricht.

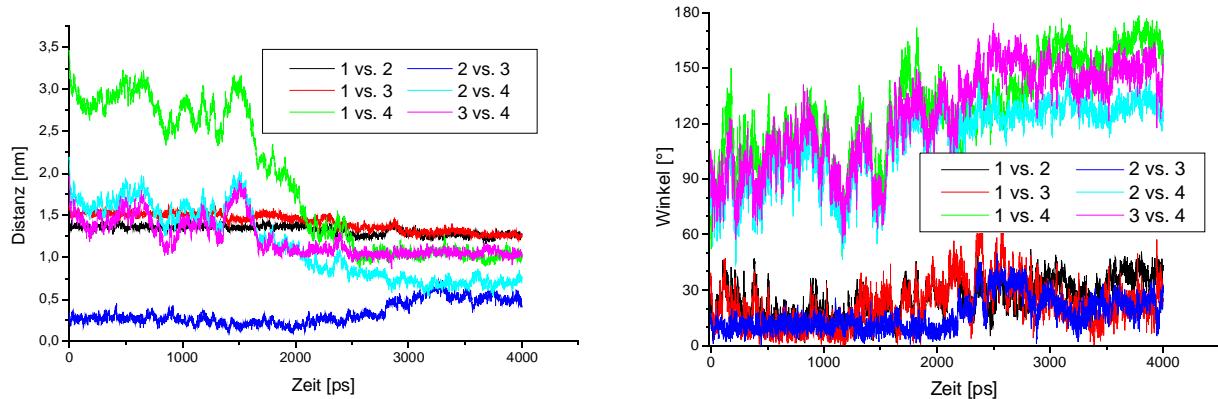


Abbildung 4.44: Distanz (links) bzw. Winkel (rechts) über die Zeit für alle vier Abschnitte der 1IYT-04 Simulation, die in Abbildung 4.43 beschrieben sind.

Die Auswertung der anderen fünf Simulationen (s. Tabelle 4.13) in Bezug auf die vier Abschnitte führt zu vergleichbaren Aussagen, auf deren Darstellung verzichtet worden ist. Erwähnt werden muss hier allerdings, dass die Struktur weiterhin im Wesentlichen helikale Eigenschaften zeigt und der Anteil an β -Strukturmerkmalen nicht über 25 % ansteigt, wohingegen der Mittelwert etwa bei 12 % zu finden ist.

Mit diesen Ausführungen lässt sich *in silico* bestätigen, dass die zentrale Helix sehr stabil ist. Daher ist nicht zu erwarten, dass ausgehend von den NMR-Strukturen die Umfaltung - speziell der helikalen Bereiche hin zu β -Strukturen - mit heutigen MD-Simulationen zu berechnen ist.

Modell 2

Da sich gezeigt hat, dass ausgehend von den bekannten NMR-Strukturen mit Hilfe von MD-Berechnungen vermutlich keine Monomerstruktur zu erreichen ist, wie sie aus den Fibrillen abzuleiten ist (s. Abbildung 4.32), ist ein weiteres Modell erstellt worden das bereits eine β -Faltblatt-Struktur am C-terminalen Ende enthält. Als Vorlage für dieses β -Faltblatt wurde das C-terminale Ende des FAS genutzt und mit den verbleibenden Residuen der 1IYT-09-Struktur kombiniert. Es handelt sich daher um ein Peptid aus 26 Residuen der 1IYT-09-Struktur und den restlichen 16 Residuen wie sie analog den letzten 16 Residuen des FAS homologie-modelliert worden sind.

Das Modell 2 ist dementsprechend eine Chimäre aus einer α -Helix und einem β -Strang. Da dieses Modell nach ersten Inspektionen die stärksten dynamischen Änderungen zeigt, ist es für die Untersuchung der dynamischen Prozesse herangezogen worden. Modell 2 ist simuliert worden:

1. bei hoher Temperatur und anschließendem „simulated annealing“, um weitere Bereiche des Konformationsraumes zu erschließen,
2. am isoelektrischen Punkt des $A\beta_{1-42}$, weil dort die Aggregation als Funktion des pH-Wertes maximal ist,
3. bei variierender Salzkonzentration, da erhöhte Salzkonzentrationen zu einer beschleunigten Aggregation führen und
4. unter Einbeziehung verschiedener Mutanten, von denen bekannt ist, dass sie schneller bzw. langsamer aggregieren.

a) „simulated annealing“

Für das „simulated annealing“ ist zuerst eine Simulation bei 1500 K durchgeführt worden, was zwar unphysiologisch ist, aber als Werkzeug für eine Erkundung des Konformationsraumes geeignet ist. Aufgrund der höheren Temperatur und somit höheren kinetischen Energie werden viele Energiebar-

rieren überwunden. Für die Hochtemperatur-Simulation musste jedoch die Druckkopplung deaktiviert werden, da sich sonst das System kontinuierlich ausdehnt (für Details siehe Kapitel 6.1.2).

Aus der so erzeugten Trajektorie sind zu drei willkürlichen Zeitpunkten Konformationen ausgewählt worden (vgl. Abbildung 4.45, links), welche anschließend getempert worden sind, indem die Temperatur kontrolliert über eine Zeitspanne von 400 ps auf 300 K gesenkt wurde. Jede der so erreichten Konformationen ist anschließend in einer separaten MD-Simulation bei 300 K einer Equilibrierung unterzogen worden.

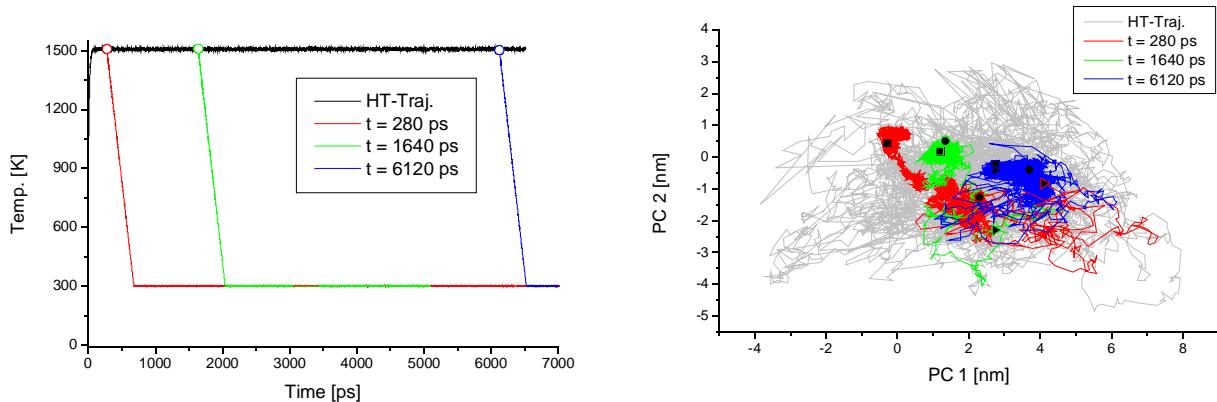


Abbildung 4.45: Links ist der Temperatur-Verlauf der Simulation bei hoher Temperatur (schwarz), dem „simulated annealing“ zu drei verschiedenen Zeitpunkten (rot, grün und blau) und der anschließenden Equilibrierung dargestellt. Rechts sind die Trajektorien auf dieselben prinzipiellen Komponenten wie in Abbildung 4.40 projiziert. Dargestellt sind die Hochtemperatur-Trajektorie (HT-Traj.) und die drei Trajektorien, die zuerst temperiert (vom Dreieck zum Kreis) und anschließend equilibriert (vom Kreis zum Quadrat) worden sind.

Die Projektion der Trajektorien aus den MD-Simulationen auf die zuvor genutzten Hauptkomponenten zeigt, dass das Abkühlen wie auch die Equilibrierungen die Trajektorien nicht in neue Bereiche der Auftragung führt (vgl. Abbildung 4.45, rechts). Bemerkenswert ist, dass die Ausdehnung des untersuchten Raumes größer ist als bei allen Simulationen mit den NMR-Strukturen, was an den größeren Ausdehnungen der Achsen im Vergleich zu Abbildung 4.40 zu erkennen ist.

Die Untersuchung der drei ausgewählten MD-Simulationen bei 300 K zeigt, dass die drei Equilibrierungen zu unterschiedlichen Inhalten an β -Strukturmerkmalen führen (s. Abbildung 4.46, links). Die MD-Simulation ausgehend von dem „Schnapschuss“ bei 1640 ps führt zu einer Struktur mit erhöhtem Anteil an β -Strukturmerkmalen von etwa 35 %. Allerdings ist bei dieser Berechnung nur ein

Zeitraum von etwa 2 ns abgedeckt worden, nachdem vermutlich noch keine stabile Konformation erreicht worden ist. Die Beurteilung der Winkel für die Analyse der „Angelhaken“-Struktur zeigt für diese Simulation keinerlei Trend. Sämtliche Winkel schwanken sehr stark zwischen 0° und 180°.

Die längste Rechnung, die Konformation, mit der ab 280 ps das „simulated annealing“ und die anschließende Equilibrierung durchgeführt worden sind, zeigt einen Trend in Richtung einer sich sehr langsam ausbildenden „Angelhaken“-Struktur (rechts in Abbildung 4.46); ausgedrückt durch die Aufspaltung der Winkel in zwei Bereiche von denen der erste (1 vs. 2, 1 vs. 3 und 2 vs. 3) zu kleinen und der zweite (1 vs. 4, 2 vs. 4 und 3 vs. 4) zu großen Winkeln strebt. Diese Konformation bildet etwa 15 % β -Strukturmerkmale aus und zeigt ab etwa 3,5 ns große Stabilität (diese Daten sind nicht dargestellt).

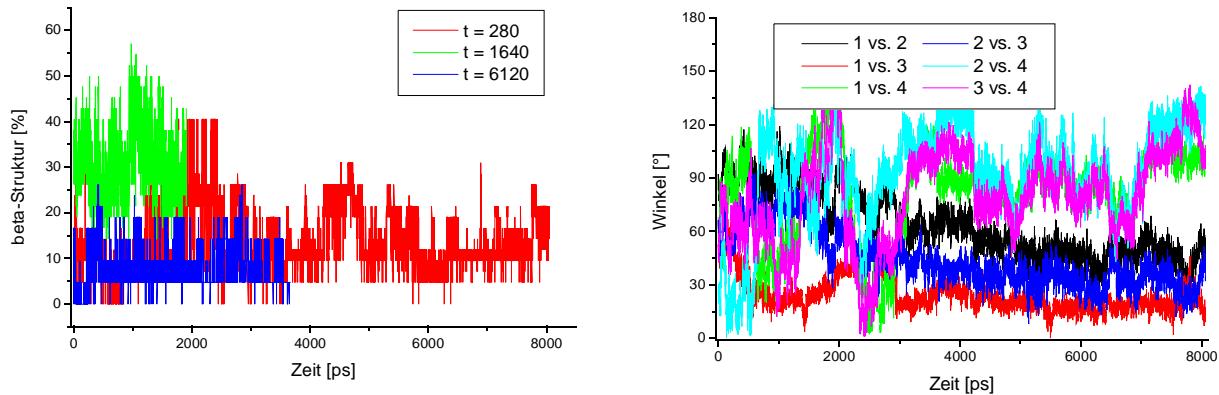


Abbildung 4.46: Auftragung der β -Strukturmerkmale gegen die Zeit (links) für alle drei Simulationen zur Equilibrierung. Zusätzlich sind die Winkel der MD-Simulation nach 280 ps gegeben, um die „Angelhaken“-Struktur zu quantifizieren (rechts).

b) Lösemittel, Salzkonzentrationen und pH-Abhängigkeit

Als Zweites ist Modell 2 unter verschiedenen Lösemittel-Bedingungen untersucht worden, indem neben der Simulation unter physiologischen Bedingungen weitere Trajektorien berechnet worden sind. Bei diesen zusätzlichen Experimenten ist eine dreifache Menge NaCl, DMSO statt Wasser bzw. der isoelektrische Punkt des Peptids genutzt worden. Aufgrund der Beschreibungen aus der Literatur ist zu erwarten, dass die Erhöhung der Salzkonzentration ebenso wie die Simulation am isoelektrischen Punkt eine beschleunigte Umfaltung verursacht. DMSO hingegen sollte denaturierende

Bedingungen bieten und somit keine sinnvolle Umfaltung, sondern eine Auflösung der geordneten Strukturen verursachen.

Der zeitliche Verlauf für die Anzahl der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen - beschränkt auf das Peptidrückgrat - ist in Abbildung 4.47 dargestellt. Ausgehend von der gleichen Startstruktur mit 22 Wasserstoffbrückenbindungen ist eine deutlich unterschiedliche Entwicklung zu sehen. Unter den denaturierenden Bedingungen der DMSO-Simulation ist gut zu erkennen, dass die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen im Verlauf der Simulation signifikant abnehmen, wodurch z. B. die helikalen Strukturen destabilisiert werden.

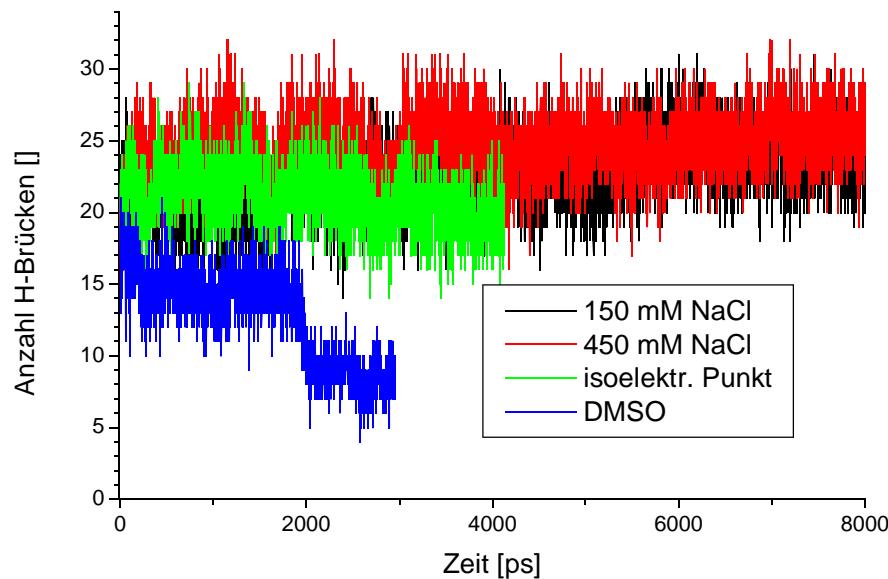


Abbildung 4.47: Auftragung der Anzahl der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Rückgrat-Atomen des gleichen Peptids unter den vier verschiedenen Bedingungen der MD-Läufe mit Modell 2.

Die beiden Simulationen in wässrigen Medien bei physiologischen pH-Werten zeigen dagegen keine signifikante Abnahme oder Zunahme der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen. Dies gilt auch für die weiteren 6 ns Simulationszeit, die aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgeblendet worden ist. Die Berechnungen am isoelektrischen Punkt führen zu einem Verhalten zwischen den beiden zuvor erwähnten Extremen.

Eine Beurteilung der relativen Anordnung der vier Teilabschnitte (siehe Abbildung 4.43) des Peptids ist links in Abbildung 4.48 gezeigt. Man erkennt, dass sich das Modell 2 am isoelektrischen Punkt in

eine „Angelhaken“-Struktur umfaltet.

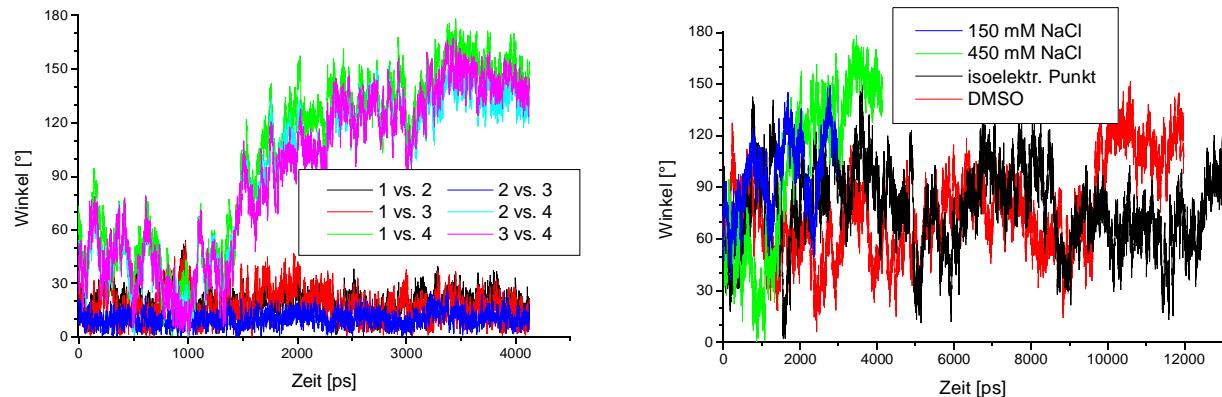


Abbildung 4.48: Links ist die Entwicklung der Winkel für die MD-Simulation am isoelektrischen Punkt in Bezug auf die „Angelhaken“-Struktur dargestellt und rechts ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur der Winkel zwischen Abschnitt 1 und 4 für die verschiedenen Bedingungen aufgetragen.

Besonders bemerkenswert ist, dass die Simulation am isoelektrischen Punkt die Umfaltung deutlich schneller als alle übrigen Simulationen vornimmt. So sind rechts in Abbildung 4.48 nur noch die Winkel zwischen den Abschnitten 1 und 4 für die Simulationen dargestellt. Die übrigen Winkel zeigen, dass die ersten drei Abschnitte wie auch links in Abbildung 4.48 kleine Werte in der Nähe von Null annehmen und somit andeuten, dass die ersten drei Abschnitte geradlinig ausgerichtet sind.

c) MD-Berechnungen mit den Mutanten

Aufgrund der publizierten Aggregationseigenschaften der verschiedenen untersuchten Peptid-Mutationen ist das Modell 2 auch in Form der E22Q- und F19T-Mutanten einer MD-Simulation unterzogen worden. Die Berechnungen sind bei 450 mM NaCl durchgeführt worden, weil die Umfaltung in Gegenwart der höheren Salzkonzentration schneller erfolgt.

Die Analyse der „Angelhaken“-Struktur zeigt, dass die natürliche Variante des Modells 1 (links in Abbildung 4.49) eine geradlinige Ausrichtung der ersten drei Abschnitte einnimmt und nur der vierte Abschnitt in verschiedenen Lagen vorkommt. Im direkten Vergleich dazu erscheint die E22Q-Mutante (rechts in Abbildung 4.49) sehr deutlich in einer „Angelhaken“-Struktur. Die Simulation der

F19T-Mutante hingegen (links in Abbildung 4.50) ist stark verrauscht und scheint erst zum Ende der Simulationszeit langsam in Richtung einer „Angelhaken“-Struktur zu verlaufen.

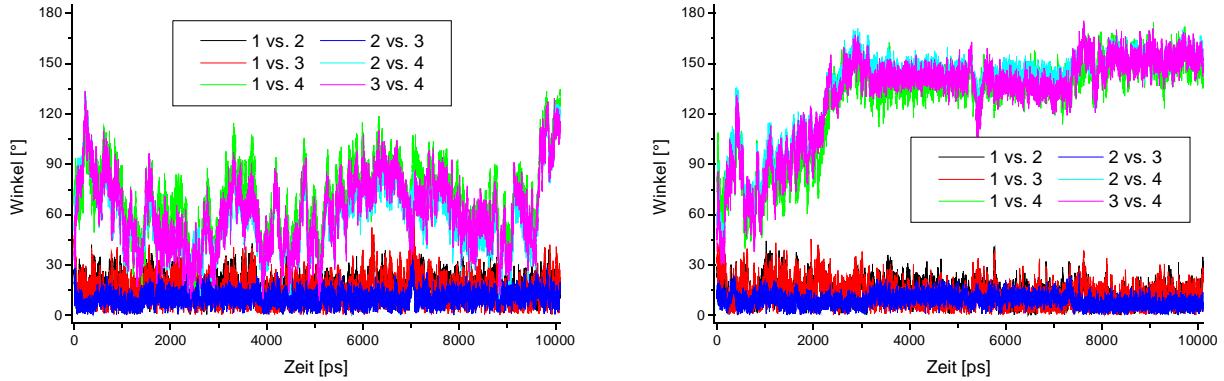


Abbildung 4.49: Auftragung der Winkel zur Analyse der „Angelhaken“-Struktur für die natürliche Variante (links) und die E22Q-Mutation (rechts) des Modells 1.

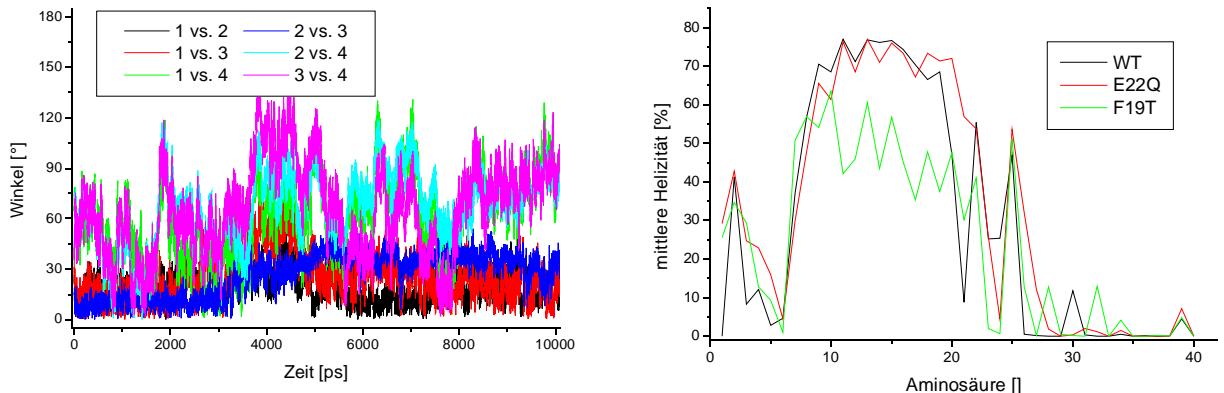


Abbildung 4.50: Auftragung der Winkel zur Analyse der „Angelhaken“-Struktur für die F19T-Mutante (links) und der gemittelten Helizität für die verschiedenen Mutationen.

Aus diesen Abbildungen ist zu erkennen, dass die E22Q-Mutante schneller als der Wild-Typ und dieser wiederum schneller als die F19T-Mutante umfaltet. Das verrauschte Signal der F19T-Mutante ist in Übereinstimmung mit der Erwartung, dass diese Mutation den CHC destabilisiert. Dies spiegelt sich in der Auftragung der Helizität wider (rechts in Abbildung 4.50), wo die F19T-Mutante deutlich geringere Stabilität zeigt, weil die Helizität signifikant um etwa 20 % absinkt. Besonders überraschend ist der Effekt der E22Q-Mutation auf die Helizität, da diese im Vergleich zum Wild-Typ

unverändert stabil zu 75 % der Zeit vorliegt, und die Helix sogar noch länger ist.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann über die MD-Simulationen der verschiedenen A β -Proteine bei den unterschiedlichen Bedingungen Folgendes gesagt werden:

1. Modell 1 zeigt eine große Stabilität und wird aufgrund der stark unterschiedlichen Gestalt nur sehr schwer im Faltungsweg der übrigen Systeme zu finden sein.
2. Modell 1 ist in guter Übereinstimmung mit bekannten experimentellen Daten, also der Interaktion mit der AChE, dem Inhalt an β -Strukturmerkmalen und dem hydrodynamischen Durchmesser.
3. Die NMR-Strukturen zeigen im mittleren Bereich der Sequenz eine hohe Stabilität und am C-Terminus eine schnelle Umfaltung.
4. Mehrere der NMR-Strukturen falten in Richtung der „Angelhaken“-Struktur.
5. Modell 2 beweist die experimentellen Einflüsse des Lösemittels, der Salzkonzentration, der Mutation und des pH-Wertes.
6. Modell 2 faltet ebenfalls in Richtung der „Angelhaken“-Struktur.
7. Die „simulated annealing“-Berechnungen zeigen eine extrem große Flexibilität und trotzdem wird auch dort der Trend in Richtung der „Angelhaken“-Struktur gefunden.

Die MD-Simulationen der monomeren β -Amyloide zeigen eine Vielzahl stabiler Konformationen, welche sich im Allgemeinen zu einer „Angelhaken“-Struktur hin falten. Im Rahmen sinnvoller Simulationszeiten ist die zentrale Helix außerordentlich stabil. Der C-Terminus, der vermutlich als Startpunkt für die Oligomerisation dient, zeigt eine große Flexibilität und es existieren Strukturen, welche dort β -Strukturen zeigen. Es sollte daher möglich sein, einzelne Strukturen auszuwählen, die am C-Terminus intramolekular wechselwirken und so als Startpunkt für oligomere Simulationssysteme dienen können.

4.3.2 Lichtstreuungsmessungen

Neben den theoretischen Arbeiten sollte ein experimentelles Verfahren zur Untersuchung der Aggregation aufgebaut werden. Ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung von Massen, Dimensionen und der Morphologie gebildeter Aggregate ist die zeitaufgelöste statische Lichtstreuung. Aufgrund der großen Erfahrung mit Lichtstreuung im Arbeitskreis von Prof. Dr. K. Huber, Universität Paderborn, und der Möglichkeit dieser Methode zur Messung verschiedener Observablen von Aggregationsprozessen ist eine Kooperation zur Etablierung dieser Methode eingegangen worden.

Bei der statischen Lichtstreuung (SLS) handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Molmassen von Makromolekülen und Kolloiden, die es zusätzlich erlaubt, Informationen über die Teilchengröße und -form zu erhalten. Die Grundlagen für die Lichtstreuung wurden von Rayleigh und Debye gelegt [96]. Hier sollen nur die wesentlichen Eigenschaften bzw. Möglichkeiten der Methode angedeutet werden.

Die Grundlage der Auswertung wird durch die Zimm-Gleichung gelegt [97]:

$$\frac{K \cdot c}{\Delta R_\Theta} = \frac{1}{M_w} + \frac{R_g^2}{3 \cdot M_w} \cdot q^2 + 2 \cdot A_2 \cdot c$$

Die gelösten Moleküle der Konzentration c und gewichtsmittlerer Molmasse M_w zeigen eine Netto-streuintensität ΔR_Θ , welche winkel- und konzentrationsabhängig ist. Der Streukontrast K ergibt sich aus der Avogadro-Zahl N_A , der Wellenlänge des Primärlichts im Vakuum λ_0 , dem Brechungsindex des Lösemittels n_0 und dem Brechungsindexinkrement der Teilchen in Lösung ($\delta n/\delta c$) zu:

$$K = \frac{4 \cdot \pi^2}{N_A \cdot \lambda_0^4} \cdot n_0^2 \cdot \left(\frac{\delta n}{\delta c} \right)^2$$

Weiterhin sind der Streuvektor q , basierend auf dem Streuwinkel Θ , der Trägheitsradius R_g und der normierte Streuvektor u entscheidende Größen:

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n_0}{\lambda_0} \cdot \sin(\Theta/2), \quad R_g^2 = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n r_i^2, \quad u = q \cdot R_g.$$

Ergebnisse

Es wurden verschiedene Lichtstreuungsexperimente mit A β_{1-40} -Konzentrationen von etwa 1 bis 50

μM durchgeführt, die jedoch alle ein schlechtes Signal zu Rausch-Verhältnis und keinen signifikanten Signalzuwachs gezeigt haben. Aufgrund dieser extrem schlecht auszuwertenden Experimente sind bislang keinerlei Aussagen oder Schlüsse aus diesen Experimenten möglich. In Abbildung 4.51 ist ein Experiment mit $24 \mu\text{M} \text{ A}\beta_{1-40}$ und 205 nM AChE aufgeführt.

In Gegenwart der AChE ist ein deutlicher und vor allem sehr schneller Zuwachs zu erkennen. Aber auch diese Experimente waren schwer zu reproduzieren. Da aus der Literatur bekannt ist, dass DMSO dieses Problem zu verursachen scheint [98], wurde eine andere Probenvorbereitung gewählt. Auf diese Weise sollte zunächst ein stabiles System für die Selbstaggregation etabliert werden, bevor das Experiment in Gegenwart der AChE ausgeführt wird.

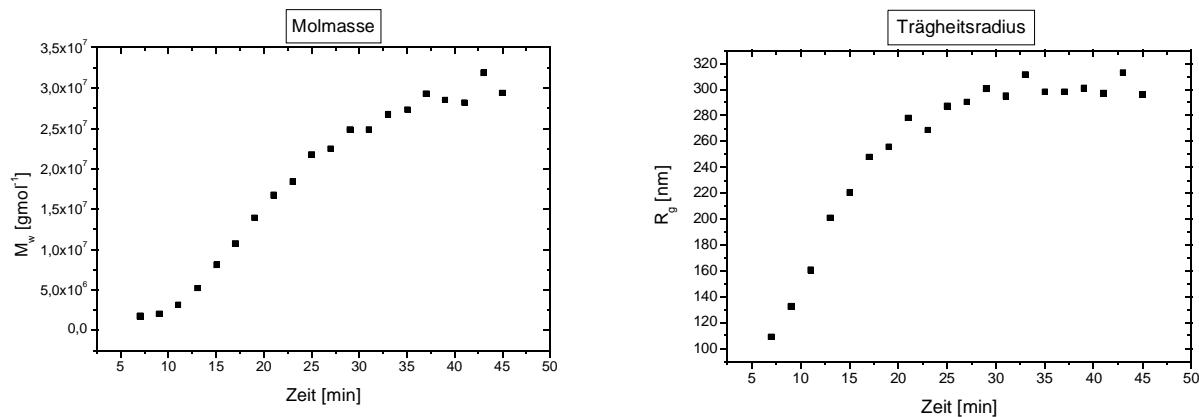


Abbildung 4.51: Auftragung der molekularen Masse (links) und des Trägheitsradius (rechts) für ein Aggregationsexperiment in Gegenwart der AChE gegen die Zeit.

Zur Untersuchung der unbeeinflussten Aggregation ist das Protein in bidest. Wasser gelöst und anschließend in Puffer zu 0,04, 0,2 und 0,4 g/L verdünnt worden. In Abbildung 4.52 sind die Entwicklungen der molekularen Massen (links) und der Trägheitsradien (rechts) über einen Zeitraum von 300 Minuten dargestellt. Das Experiment mit 0,4 g/L fällt aus dem Rahmen im Vergleich zu den anderen beiden Experimenten, da die Masse schneller zunimmt und der Trägheitsradius steigt. Ab etwa 180 min fällt die Probe aus und verhindert weitere interpretierbare Messungen. Bemerkenswert ist vor allem der zeitlich konstante Radius von etwa 200 bis 250 nm bei den Experimenten mit kleineren Konzentrationen.

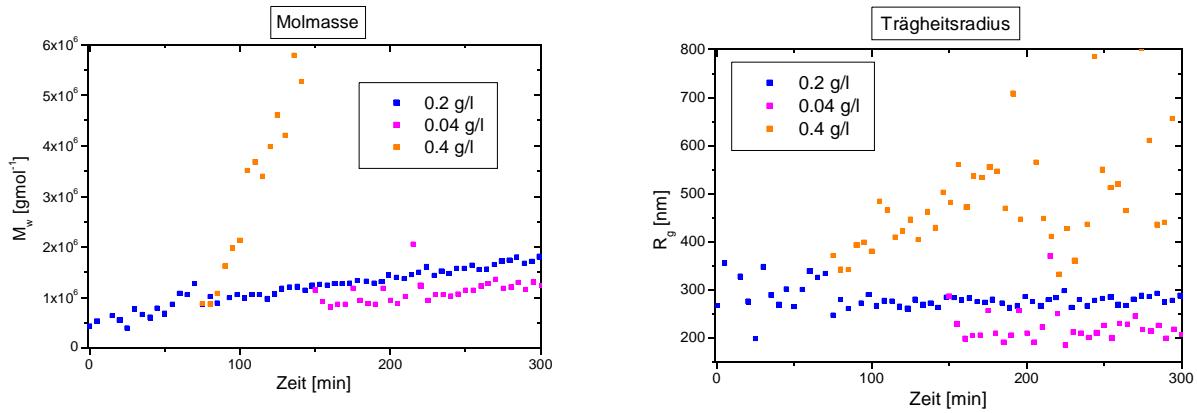


Abbildung 4.52: Auftragungen der molekularen Masse (links) und des Trägheitsradius (rechts) für drei Experimente gegen die Zeit, bei denen verschiedene $\text{A}\beta_{1-40}$ -Konzentrationen von 0,04 g/L bis 0,4 g/L eingesetzt worden sind.

Mit Hilfe der Holtzer-Plots (s. Abbildung 4.53) kann nun die Morphologie der entstehenden Teilchen untersucht werden [99]. Dies zeigt im linken Teilbild, dass sich die Morphologie der Teilchen bei dem Experiment mit 0,2 g/L über die Zeit nicht ändert und dass es sich um stäbchenförmige Teilchen handelt. Ganz im Gegensatz dazu zeigt die Untersuchung bei 0,4 g/L eine deutliche Veränderung der Morphologie von einem Stab zu einem Knäuel. Die viel längeren Stäbe können nun Krümmungen aufweisen und erscheinen Knäuel-artig.

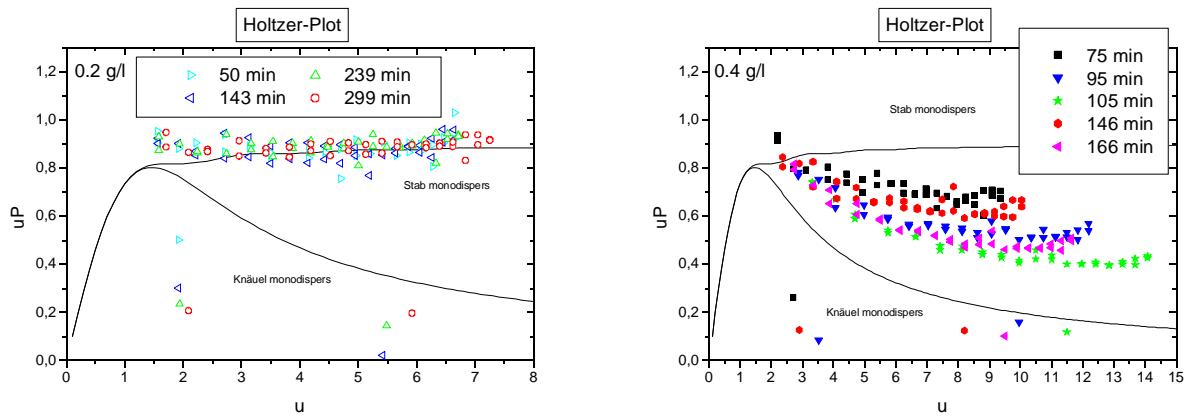


Abbildung 4.53: Holtzer-Plot für die zuvor erwähnten Messungen bei 0,2 g/L (links) und 0,4 g/L (rechts) zu verschiedenen Zeiten. Zusätzlich sind die zu erwartenden Kurvenverläufe für Strukturen, die einen Stab oder ein Knäuel bilden, eingezeichnet.

Zusammenfassend kann über die Lichtstreuungsmessungen gesagt werden, dass es anscheinend eine kritische Konzentration für das Aggregationswachstum gibt. Oberhalb dieser Konzentration ist ein Wachstum zu beobachten, wohingegen unterhalb eine stabile Lösung erhalten wird. Das Wachstum außerhalb der kritischen Konzentration führt schnell zu Teilchen von endgültigem Trägheitsradius. Die Massenzunahme dieses Systems kann somit durch eine wachsende Anzahl dieser Teilchen erklärt werden.

Erwähnt werden muss hier, dass die Messungen schwer zu reproduzieren sind. Die Probleme scheinen vor allem von unterschiedlichen Aggregationszuständen und Konzentrationen zu Beginn der Messungen zu stammen.

5 Ausblick

Die neuen Erkenntnisse über den extrazellulären Teil des nAChR können nun genutzt werden, um mit Hilfe von virtuellen Screening-Methoden oder einem rationalen Wirkstoff-Design neue Kandidaten für einen APL-Effekt zu identifizieren. Zusätzlich eröffnet sich nun die Möglichkeit die Schaltungsvorgänge des Ionen-Kanals und die Effekte der APL auf molekularer Ebene zu studieren. Hierzu müssen die dynamischen Vorgänge des extrazellulären Teils des Rezeptors mit und ohne Ligand untersucht werden.

Um den Aggregationsprozess des β -Amyloid-Peptids weiter zu untersuchen, müssen die erstellten A β -Modelle einer Dockingstudie unterzogen werden. Auf diese Weise kann die Bildung von Dimeren und auch höheren Oligomeren untersucht werden, um anschließend die Faltungsvorgänge in einer oligomeren Form zu studieren. Derartige Simulationen müssen zusätzlich in Gegenwart bekannter Kofaktoren, wie der AChE oder kleiner Liganden, die die Aggregation stören, durchgeführt werden. Für die Berechnung des Faltungswege des β -Amyloids und der Identifikation weiterer wichtiger Intermediate in diesem Faltungswege müssen Methoden erarbeitet werden, welche in der Lage sind den Konformationsraum effizienter abzusuchen. Hierfür bieten sich neben dem „simulated annealing“ Methoden wie das „conformational flooding“ oder „transition path sampling“ an.

Die Entwicklung des Plaque-Assays muss durch analytische Methoden vervollständigt werden, um die Proteinkonzentration und den Aggregationszustand des Peptids besser quantifizieren zu können. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration kann durch spektroskopische und chromatographische Methoden geschehen. Um den Aggregationszustand des Peptids routinemäßig zu bestimmen, ist es notwendig die Präparation eines nicht denaturierenden Gels vor Ort zu etablieren.

6 Experimenteller Teil

6.1 Computer-Chemie-Methoden

Alle molekularen Systeme wurden mit Sybyl [75] oder MOE [63] bearbeitet. Für die Erstellung der verschiedenen Abbildungen wurden MOLCAD [100], MOE, VMD [101] oder LigPlot [102] verwendet. Zusätzlich wurden für Dateikonvertierungen BABEL [103] und diverse selbst programmierte Werkzeuge eingesetzt [104].

6.1.1 Homologie-Modellierung

Die Modellerzeugung mit dem Swiss-Model-Server gestaltet sich denkbar einfach, da mit Hilfe des Programmes Deep-View [105] eine Projektdatei erstellt wird, welche neben dem Templat auch das Sequenz-Alignment zwischen dem Templat und der zu modellierenden Struktur enthält. Eine solche Projektdatei wird dann webbasiert über einen Browser an den SwissProt-Server [39] gesendet. Das erstellte Modell erhält man nach einiger Zeit per eMail zurück.

Im Wesentlichen verläuft die Modellbildung mit WhatIf [106] ganz analog, indem ein Templat und das Sequenz-Alignment eingeladen werden. In WhatIf muss dann manuell in dem `pirpsq`-Menü mit dem Befehl `bldpir` ein erstes Modell erzeugt werden, welches allerdings noch die Lücken entsprechend dem Alignment aufweist. Um diese Lücken zu schließen wird zuerst eine Bindung zwischen den beiden Aminosäuren durch den `paste`-Befehl erzeugt. Diese neue Bindung wird anschließend in Zyklen optimiert, indem zunächst die beiden nächsten Residuen und dann die vier angrenzenden Aminosäuren energieminiert werden. Dazu muss man alle übrigen Residuen fixieren (mit `fixrng`), bevor grob voroptimiert (`crude`) und schließlich verfeinert (`refi`) werden kann.

6.1.2 MD-Simulationen

Alle MD-Simulationen sind mit GROMACS [107][108] durchgeführt worden. Die Parameter der unterschiedlichen Simulationen sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Das Protein ist jeweils in einem Kuboktaeder zentriert worden, wobei unterschiedliche Abstände zum

Rand der Elementarzelle eingehalten worden sind, um den verschiedenen Formen des Peptids Rechnung zu tragen. Die Elementarzelle ist anschließend mit Lösemittelmolekülen gefüllt worden, wobei dies in fast allen Fällen Wasser und in zwei Ausnahmefällen DMSO war. In den wässrigen Lösungen sind anschließend zufällig ausgewählte Wassermoleküle durch Ionen ersetzt worden. Um eine physiologische Salzkonzentration zu erhalten, ist pro 366 Wassermoleküle ein Ionen-Paar eingefügt worden. Für die Simulationen bei erhöhter Ionen-Stärke ist die Anzahl der Ionen-Paare entsprechend erhöht worden. Die Ionisierung der Aminosäuren ist im Allgemeinen so gewählt worden, dass ein pH-Wert von 7,4 simuliert worden ist, wodurch sich eine Nettoladung des Proteins von minus drei ergibt. Diese negative Ladung wurde durch zusätzliche Na^+ -Ionen kompensiert.

Tabelle 6.1: Simulationsdetails der verschiedenen MD-Berechnungen.

Struktur	Abstand [nm]	Volumen [nm ³]	Wassermoleküle	Na^+/Cl^- -Ionen	Sonstige Informationen
Modell 1	0,18	245,00	7912	24/21	
1AML-11	0,22	429,41	13913	41/38	
1AML-13	0,22	367,94	11940	35/32	
1BA4-02	0,18	378,12	12256	36/33	
1BA4-07	0,16	676,86	22105	69/66	
1IYT-04	0,16	435,25	14120	41/38	
1IYT-10	0,18	434,38	14070	41/38	
Modell 2	0,15	559,22	18110	52/49	
Modell 2	0,15	559,22	17816	199/196	
Modell 2-E22Q	0,15	559,22	18113	51/49	
Modell 2-E22Q	0,15	559,22	17819	198/196	
Modell 2-F19T	0,15	559,22	18116	52/49	
Modell 2-F19T	0,15	559,22	17882	199/196	
Modell 2	0,15	559,22	18113	49/49	isoelektrischer Punkt
Modell 2	0,15	559,22	0	0/0	+4320 DMSO Moleküle

Während der Simulationen sind periodische Randbedingungen und eine Integrationsschrittweite von 2 fs gewählt worden. Das gesamte System ist mit einem Berendsen-Thermostat bei 300 K mit einer Kopplungskonstanten von 0,1 ps und zu einem Druck von 1 bar mit einer Kopplungskonstanten von 0,5 ps gekoppelt worden. Weitreichende elektrostatische Wechselwirkungen sind mit der PME-Methode - aktualisiert alle 10 Integrationsschritte - berechnet worden und die übrigen nicht bindenden Wechselwirkungen sind mit einem cut-off von 1 nm berücksichtigt worden.

Alle MD-Berechnungen sind über einen Zeitraum von etwa zwei Jahren auf verschiedenen zur Verfügung stehenden Computern berechnet worden. Neben etwa zehn PCs stand auch Rechenzeit am Zentrum für paralleles Rechnen der Universität Paderborn (PC²) zur Verfügung. Auf diese Weise standen Computer mit Leistungen von etwa 400 MFlops bis zu etwa 2 GFlops zur Verfügung, ein Flop ist die Anzahl Fließkommaoperationen pro Sekunde. Die 400 MFlops sind dabei ein AMD-Athlon-900MHz-System mit 512 MB RAM, wohingegen die 2 GFlops durch 12 850MHz-Pentium III-Prozessoren mit jeweils 512 MB RAM am PC² zu Stande kommen. Mehr Prozessoren in parallel haben sich als nicht sinnvoll erwiesen, da keine weitere Beschleunigung eintritt.

6.1.3 Clusteranalyse

Für die Auswertung der Docking-Experimente an den pentameren Rezeptoren wurde vor die eigentliche Clusteranalyse eine Koordinatentransformation geschaltet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse an den unterschiedlichen Untereinheiten zu gewährleisten. Bei der Koordinatentransformation sind alle Strukturen in einem ersten Schritt einem Dimer zugeordnet worden, was durch den euklidischen Abstand zum C_α94 geschah. Danach ist das so identifizierte Dimer samt der Struktur der Docking-Lösung auf das erste Dimer (AB) ausgerichtet worden, wodurch die jeweilige Struktur in das Bezugssystem des AB-Dimers gedreht und für spätere Berechnungen und Visualisierungen gespeichert worden ist.

Zum Vergleich der Docking-Ergebnisse - jeweils 100 pro Isomer - eines Liganden sind diese ohne Berücksichtigung der Wasserstoffatome einer Clusteranalyse unterzogen worden. Auf diese Weise ist es möglich, alle Konformationen unabhängig vom Protonierungszustand miteinander in Beziehung zu setzen. Der RMSD-Wert kann bei den transformierten Docking-Lösungen genutzt werden, um gleiche Konformationen im Rahmen der Clusteranalyse zu erkennen. Zusätzlich erlaubt dieses Vorgehen, die Abstände zwischen C_α-Atomen ausgewählter Aminosäuren und dem geometrischen Mittelpunkt des Liganden unabhängig von der ursprünglichen Dimer-Zuordnung zu bestimmen. Um diese Auswertungen zu beschleunigen, ist ein eigenes Programm „PentamerClusterer“ geschrieben worden, welches mit Hilfe des CDK (engl. „chemistry development kit“) implementiert worden ist [104].

6.2 Lichtstreuungsmessungen

6.2.1 Probenvorbereitung

Für die Messungen ist jeweils 1 mg lyophilisiertes A β ₁₋₄₀ (AnaSpec Corp., San Jose, CA, USA) in 200 μ L bidestilliertem Wasser gelöst worden. Aliquote sind anschließend direkt mit TSAE7,4-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 2,5 mL verdünnt worden, um die gewünschten Messkonzentrationen einzustellen. Um schon gebildete Aggregate aus der Messlösung zu entfernen, sind die Messlösungen direkt nach dem Verdünnen mit Hilfe von Zentrifugenfiltern (Centricon YM-10, Millipore Corp.) filtriert worden. Diese Zentrifugenfilter lassen nur Partikel mit molekularen Massen kleiner als 10 kDa durch. Auf diese Weise enthalten die Lösungen lediglich mono-, di- und kleine Mengen trimere A β ₁₋₄₀.

Alternativ dazu sind Proben in 100-200 μ L DMSO gelöst worden, bevor diese in verschiedenen Tris- oder Phosphat-Puffern bei verschiedenen pH-Werten gemessen worden sind. DMSO führt zu einer Denaturierung des Proteins, daher ist bei derartigen Messungen keine Filtrierung durchgeführt worden. Die so erstellten Messlösungen sind in einigen Fällen mit AChE versetzt worden, um den beschleunigenden Effekt der AChE zu untersuchen und ein Assay-System für die Quantifizierung neuer Liganden zur Aggregationsverhinderung aufzubauen. Diese Art der Messungen zeichnete sich jedoch durch eine sehr schlechte Reproduzierbarkeit aus, weshalb die Probenvorbereitungsbedingungen zu den zuvor genannten optimiert worden sind. Auf diese Weise sollte zuerst ein stabiles Verfahren zur Untersuchung der Aggregation des A β ₁₋₄₀ in Abwesenheit der AChE aufgebaut werden.

6.2.2 Durchführung

Die derartig vorbereiteten Proben sind in Küvetten von 2 cm Durchmesser in einer Vielwinkel-Lichtstreu anlage vermessen worden (Schema in Abbildung 6.1). Die Proben werden in dem Toluol-Bad zentriert (links in Abbildung 6.1) und bei Bestrahlung mit Laserlicht der Wellenlänge 632,8 nm wird die Streustrahlung bei 19 festen Winkeln zu beiden Seiten der Probe mit Hilfe von Lichtleitern detektiert.

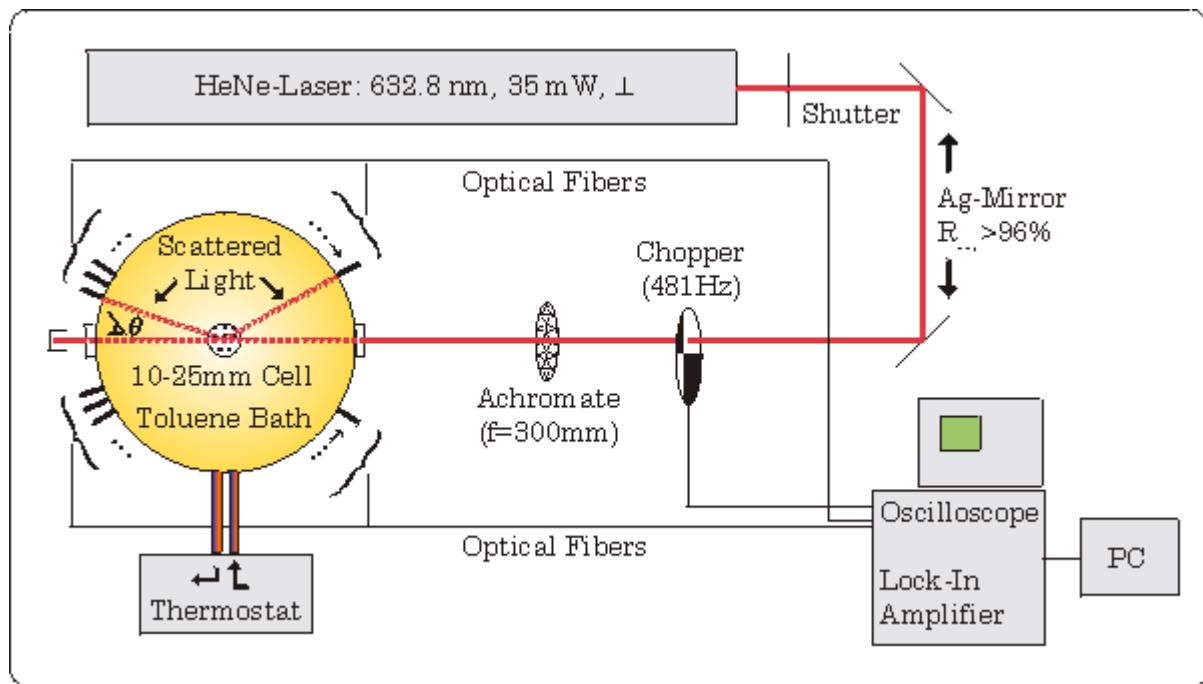


Abbildung 6.1: Schematische Abbildung der Vielwinkel-Lichtstreuungsanlage.

6.3 Esterase-Aufreinigung

Für die Aufreinigung der AChE aus dem Gewebe der elektrischen Organe sowohl des *Torpedo Californica* als auch des *Torpedo Marmorata* musste zunächst ein spezielles Affinitätsgel für die Protein-Flüssigkeitschromatographie (FPLC, engl. „fast protein liquid chromatography“) synthetisiert werden. Das eingesetzte Harz wurde dazu mit einem speziellen Liganden derivatisiert, mit dem die AChE bei der Flüssigkeitschromatographie selektiv zurück gehalten wird.

6.3.1 Präparation des Affinitätsgels

m-Carboxyphenyltrimethylammoniumiodid



m-Dimethylaminobenzoësäure (5 g, 30 mmol) wird in abs. Methanol (60 mL) gelöst und mit Methyl-iodid (20 mL, 45 mmol) versetzt. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wird für 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der erhaltene Feststoff wird mit abs. Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet. Das Produkt wird aus Ethanol umkristallisiert und dabei in 97 % Ausbeute (9,03 g, 29 mmol) erhalten.

Schmelzpunkt: 192 °C

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3,69 (s, 9H, 3CH₃), 7,76 - 7,84 (t, J = 8,05 Hz, 1H, aromat. CH), 8,12 - 8,16 (d, J = 7,72 Hz, 1H, aromat. CH), 8,28 - 8,34 (m, 1H, aromat. CH), 8,41 (s, 1H, aromat. CH)

m-Carboxyphenyltrimethylammoniumbromid

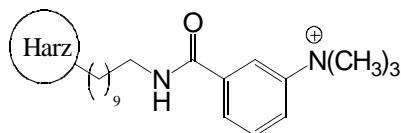


m-Carboxyphenyltrimethylammoniumiodid (9,03 g, 29 mmol) wird in 50 mL Eisessig gelöst. Zu dieser Lösung werden 60 mL 33 %ige HBr in Eisessig zugetropft und das Reaktionsgemisch wird für 6 Stunden bei Raumtemperatur (25 °C) gerührt. Im Anschluss daran wird durch Zugabe von Diethylether (300 mL) das Produkt ausgefällt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Rohprodukt wird mit abs. Diethylether gewaschen und anschließend aus Ethanol umkristallisiert. Es ergibt sich das gewünschte Produkt mit 94 % Ausbeute (7,18 g, 28 mmol).

Schmelzpunkt: 190 °C

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 3,69 (s, 9H, 3CH₃), 7,76 - 7,84 (t, J = 8,05 Hz, 1H, aromat. CH), 8,12 - 8,16 (d, J = 7,72 Hz, 1H, aromat. CH), 8,28 - 8,34 (m, 1H, aromat. CH), 8,41 (s, 1H, aromat. CH)

Anknüpfung an das Sepharose-Harz



Das EAH-Sepharose-4B-Harz (50 mL) wird zunächst mit 1 L NaCl-Lösung (0,5 M) und anschließend mit 1 L destilliertem Wasser gewaschen. Das so gereinigte Harz wird in einer Lösung aus m-Carboxyphenyltrimethylammoniumbromid (1,3 g, 5 mmol) und 1-Ethyl-3-(2-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDAC, 1 g, 6 mmol) in dest. Wasser (100 mL) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wird dann für 16 Stunden bei Raumtemperatur (25 °C) und pH 5,0 gerührt. Der pH-Wert wird, vor allem zu Beginn der Reaktion, mehrmals überprüft und mit NaOH auf pH 5,0 ± 0,5 gehalten. Die Reaktionskontrolle geschieht durch Vergleich der Absorption (bei 194 nm) des Reaktionsüberstandes und der Lösung, in der das Harz suspendiert wurde. Die Reaktionslösung sollte ca. 10 % weniger Absorption zeigen.

Um nicht reagierte Aminogruppen zu acylieren, wird das zuvor getrocknete Harz für 4 Stunden in einer wässrigen Lösung aus Essigsäure und Natriumacetat (1 M, pH 4,75) zur Reaktion gebracht. Im Anschluss daran wird das Harz immer im Wechsel mit 1.) 250 mL Tris (100 mM), NaCl (500 mM) pH 8,3 und 2.) 250 mL NaAc (100 mM), NaCl (500 mM) pH 4 gewaschen, um überschüssige Reagenzien und Nebenprodukte zu entfernen. Bevor das Harz bei 4 °C gelagert wird, wird es ausgiebig mit dest. Wasser gewaschen.

6.3.2 Durchführung

Etwa 500 g tiefgefrorenes (fl. Stickstoff, -176 °C) Gewebe des elektrischen Organs werden grob zerkleinert und anschließend in ein Becherglas gegeben. Mit Hilfe eines Pürierstabes wird das Gewebe dann im Eisbad (4 °C) unter Zugabe von 100 bis 200 mL Puffer B-I homogenisiert. Das Volumen sollte möglichst klein gehalten werden, um mehrfaches Zentrifugieren zu vermeiden.

Das so homogenisierte Material wird für eine Stunde bei 39.000 g und 4 °C zentrifugiert, um die festen Bestandteile von der Lösung zu trennen. Der so erhaltene Bodensatz ist die entscheidende Frakti-

on, da sie die Esterase in membrangebundener Form enthält. Die Pellets werden mit Puffer B-I gewaschen, vereinigt und bei Raumtemperatur (25 °C) mit Phosphatidylinositol-Phospholipidase-C (PI-PLC², 5 Einheiten) versetzt. Dieses Enzym, welches bei Raumtemperatur am besten arbeitet, hydrolysiert selektiv die Phosphodiester-Bindung, über welche die Esterase mit der Membran verbunden ist. Nach etwa 15 Stunden Schütteln ist die Esterase solubilisiert.

Die Reaktionsmischung wird bei 78.000 g und 4 °C ultrazentrifugiert, um alle festen Bestandteile abzutrennen. Bevor der Überstand chromatographiert wird, wird zunächst die FPLC-Säule konditioniert. Dazu wird die Säule mit Puffer B-I bis zu einer konstanten Grundlinie (UV-Detektion bei 280 nm) gespült. Dann wird der Überstand der Zentrifugation vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und bei einem Fluss kleiner 0,8 mL/min in die FPLC-Säule eingebracht. Ein zu großer Fluss kann zu viel Esterase wieder ausspülen und sollte daher vermieden werden. Nachdem der gesamte Überstand eingebracht ist, wird die Säule erneut mit Puffer B-I bis zur stabilen Grundlinie gespült. Diese Grundlinie muss nicht dieselbe sein wie vor dem Eintragen des Überstandes, da eine gewisse Menge Esterase immer ausgespült wird. Hierbei wird der Fluss normalerweise auf etwa 1,0 mL/min eingestellt, obwohl auch Flussgeschwindigkeiten von 1,7 mL/min vertretbar sind.

Zum Abschluss wird die Esterase mit Puffer B-II, der Decamethonium als desorbierenden Liganden enthält, bei einem Fluss von 1 mL/min von der Säule gewaschen und in Fraktionen von jeweils 6 mL aufgefangen. Zum anschließenden Reinigen der Säule wird diese mit Puffer B-III gereinigt. Bevor die Säule bei 4 °C gelagert werden kann, muss sie mit Puffer B-I equilibriert werden.

Je nach Anwendung werden die Fraktionen vereinigt und dialysiert, wobei für die Proteinkristallisation nur die hochkonzentrierten Fraktionen einsetzbar sind. Für die Nutzung der Esterase in biologischen Tests kommen auch die weniger konzentrierten Fraktionen in Frage. Die Dialyse wird dreimal mit 1,0 L Puffer B-IV über 24 Stunden mit einem Dialyseschlauch (ZelluTrans, Carl Roth GmbH), welcher molekulare Massen oberhalb von 12.000 Da zurückhält, ausgeführt. Auf diese Weise wird vor allem das Decamethonium aus der Esterase-Lösung entfernt. Die so erhaltene Esterase-Lösung wird durch Zentrifugenfilter (Centriprep, Millipore Inc.), welche molekulare Massen oberhalb 10 kDa zurückhalten, zentrifugiert, um die Lösung aufzukonzentrieren.

² PI-PLC, rekombinant aus *B. thuringiensis*, von Glyko/Europe, Upper Heyford, UK

6.4 Ellman-Test

Mit dem Ellman-Test [109] wird die enzymatische Aktivität der AChE bei 25 °C und pH 8,0 bestimmt. Es werden zu 10 µL einer AChE enthaltenden Probe 10 µL DTNB-Stammlösung und Puffer B-V gegeben, bis ein Gesamtvolumen von 900 µL erreicht ist. Nach Zugabe von 100 µL ASCh-Stammlösung wird die Probe schnell in eine Küvette (Küvettendicke 1 cm) überführt und die Absorption bei 412 nm über die Zeit gemessen. Die DTNB-Stammlösung zeigt sich über mehrere Wochen stabil, wohingegen die ASCh-Stammlösung jeden Tag frisch angesetzt werden muss. Durch die Hydrolyse des ASCh bildet sich zusammen mit dem DTNB ein gelber Farbstoff und dessen Entstehung kann über die Zeit verfolgt werden. Aus der Steigung der Zunahme der Absorption (Abs) lässt sich die Aktivität der AChE berechnen. Die Aktivität der AChE wird in Einheiten (U) angegeben, wobei 1 U die Enzymmenge ist, die 1 µmol ASCh pro Minute bei pH 8,0 und 25 °C hydrolysiert.

Die Aktivität lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{\text{Steigung} [\text{Abs} \cdot \text{s}^{-1}] \cdot 60 [\text{s} \cdot \text{min}^{-1}] \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{1,36 \cdot 10^4 [\text{Abs} \cdot \text{L}^{-1}] \cdot \text{Volumen} [\text{L}] \cdot \text{Signalfaktor}} [\text{U} \cdot \text{min}]$$

Die Steigung ist durch lineare Regression zu bestimmen, für die nur der anfängliche lineare Teil zur Auswertung herangezogen werden darf. Der Verdünnungsfaktor und das Volumen dienen zur Rückrechnung der gemessenen Werte auf die Aktivität der zu untersuchenden Probe. Der Signalfaktor ergibt sich bei dem verwendeten UV/VIS-Meter und einer Spaltbreite von 1 nm zu 1/3.

6.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden durch eine Abwandlung der Methode nach Bradford [110] mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Roti-Quant-Kits der Firma Roth, Karlsruhe durchgeführt. Das Roti-Quant-Kit besteht aus einer 5-fach konzentrierten Färbelösung, die für eine Empfindlichkeit im Bereich von 1 - 20 µg direkt eingesetzt werden kann. Dazu werden 800 µL der Probe in dem jeweiligen Probenpuffer mit 200 µL der 5-fach konzentrierten Färbelösung versetzt. Die Messlösung wird anschließend in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem UV/VIS-Meter bei 595 nm und einer Spaltbreite von 1 nm vermessen. Die absolute Absorption wird mit Hilfe einer

Kalibriergeraden in eine Konzentration umgerechnet. Die Proben sollten 5 bis 30 Minuten nach der Zugabe der Färbelösung vermessen werden, und zwar immer zur gleichen Zeit, da die Absorption im Laufe der Zeit abnimmt. Aus mehreren Experimenten hat sich gezeigt, dass die Absorption pro 5 Minuten um etwa 1 % abnimmt.

In Abbildung 6.2 sind Kalibriergeraden dargestellt, welche mit Rinder-Serum-Albumin (BSA, engl. „bovine serum albumin“) und der AChE erstellt wurden. Die Messpunkte für die Geraden wurden 5 Minuten nach der Farbstoff-Zugabe gemessen und als Mittel aus drei Messpunkten aufgetragen. Die Varianz der Bestimmung ist als Fehlerbalken angegeben. Zu jedem Protein ist auch eine Ausgleichsgerade mit Bestimmungsmaß dargestellt.

An dem Unterschied der beiden Kalibriergeraden in Abbildung 6.2 erkennt man, dass unterschiedliche Proteine den Farbstoff unterschiedlich binden, da der Farbstoff hauptsächlich an basische Aminosäuren bindet. Weiterhin stehen dem Farbstoff nur Aminosäuren für eine Bindung zur Verfügung, die an der Oberfläche des jeweiligen Proteins liegen. Aus diesem Grund kann eine Proteinbestimmung anderer Proteine nicht exakt mit Hilfe der Kalibriergeraden der BSA-Daten durchgeführt werden. Dies hat zur Folge, dass die ermittelte Proteinkonzentration noch mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden muss. Diese substanzspezifischen Konstanten γ sind in Tabelle 6.2 für die entsprechenden Proteine, welche in dieser Arbeit benutzt wurden, aufgeführt. Die Konstanten sind dort als Quotient der Steigung der Ausgleichsgeraden aufgelistet.

$$\text{Somit ergibt sich die Masse an Protein in einer Probe zu: } m_{\text{Protein}} [\mu\text{g}] = \gamma \cdot \frac{(A + 0,0202)}{0,0662}$$

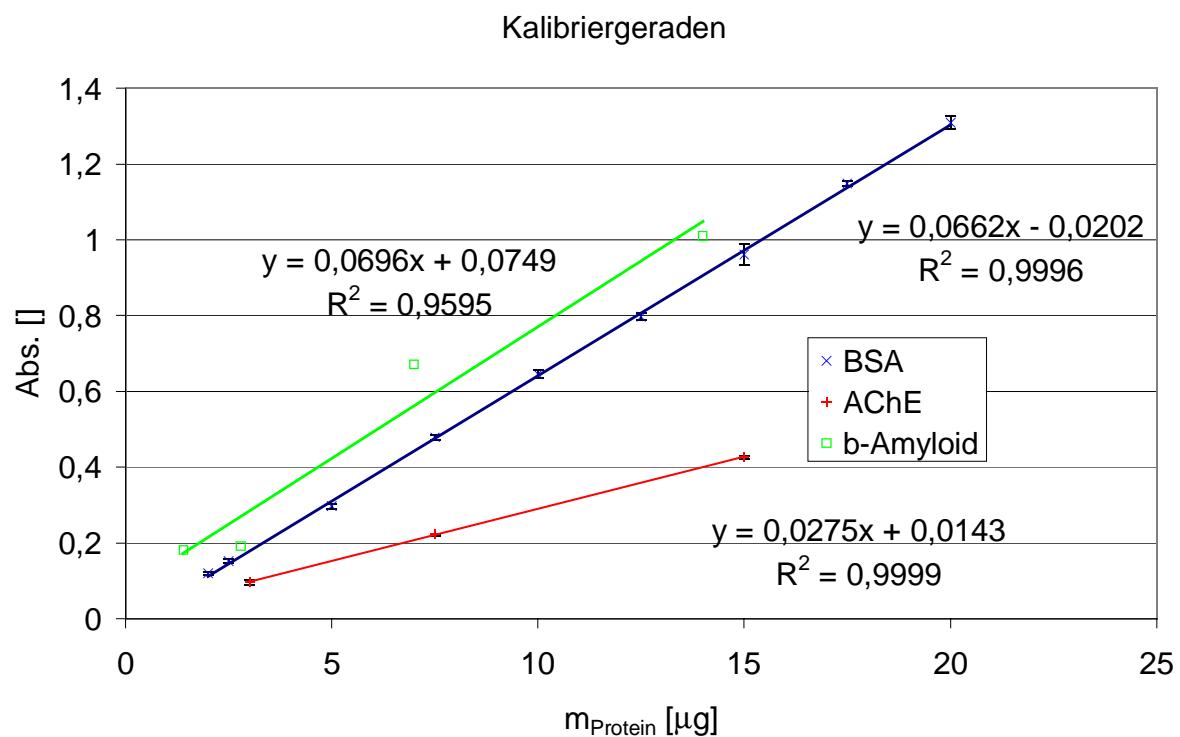


Abbildung 6.2: Kalibriergeraden zur Proteinkonzentrationsbestimmung. Für die Geraden wurden verschiedene Konzentrationen zweier Proteine (BSA und AChE) benutzt.

Tabelle 6.2: Proteinspezifische Korrekturfaktoren für die Konzentrationsbestimmung.

Protein	Masse [kDa]	γ (exp.)
BSA	67	1,000
$\text{A}\beta_{1-40}$	4,5	1,051
AChE	270	2,407

6.6 Verwendete Substanzen, Puffer, Lösungen und Geräte

6.6.1 Substanzen

Die Trocknung der verwendeten Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Methoden [111].

Die verwendeten Chemikalien wurden aus dem Fachhandel bezogen (Fluka, Sigma-Aldrich, Roth, Invitrogen). Ebenso wurden die verschiedenen Enzyme und Proteine aus dem Fachhandel bezogen (Bachem, Biomol, Anaspec, Glyko).

Das EAH-Sepharose-4B-Harz für die Affinitätschromatographie wurde von der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg erworben.

6.6.2 Pufferlösungen

B-I: 10 mM Tris, 40 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 8,0

B-II: 10 mM Tris, 40 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 5 mM Decamethonium, pH 8,0

B-III: 10 mM Tris, 40 mM MgCl₂, 1 M NaCl, pH 8,0

B-IV: 1 mM MES, 100 mM NaCl, 0,01 % (w/v) NaN₃

B-V: 100 mM Phosphatpuffer, pH 8,0

TSAE7,4: 0,1 M Tris, 150 mM NaCl, 0,01 % (w/v) NaN₃, 5 mM Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), pH 7,4

6.6.3 Stammlösungen

ASCh Stammlösung: 5 mM Acetylthiocholin (ASCh) in Puffer B-V

DTNB Stammlösung: 30 mM 5-Dithiobis-2-nitrobenzoat (DTNB) in Puffer B-V

tcAChE I (März 2001): 0,1 mL, 1,3 mg/mL, 560 U, CNR, Monterotondo, Italien

tcAChE II (Nov. 2001): 0,15 mL, 1 mg/mL, 240 U, CNR, Monterotondo, Italien

tmAChE I: 1. Fraktion, 0,568 mg/mL, 540 U/mL

tmAChE II: 2. Fraktion, 0,163 mg/mL, 155 U/mL

tmAChE III:	3. Fraktion, 0,075 mg/mL, 60 U/mL
eeAChE I:	1,1 mL, 1 mg/mL, 930 U/mg (Sigma)
eeAChE II:	0,8 mL, 1,2 mg/mL, 1100 U/mg (Sigma)
eeAChE III:	0,8 mL, 1,2 mg/mL, 1100 U/mg (Sigma)
eeAChE IV:	0,8 mL, 1,2 mg/mL, 1100 U/mg (Sigma)
SDS Laupuffer:	NuPAGE MES Laupuffer (Invitrogen GmbH)
SDS Probenpuffer:	NuPAGE Probenpuffer (Invitrogen GmbH)
Molekularer Standard:	SeeBlue Pre-Stained Marker (Invitrogen GmbH)

6.6.4 Verwendete Geräte

NMR-Spektroskopie:	Bruker ARX 200 (200/50 MHz)
Dialyseschlauch:	ZelluTrans, Carl Roth GmbH
Elektrophorese:	Novex XCell II, Mini Cell
SDS-PAGE Gele:	NuPAGE 10% Bis-Tris, 1,0 mm, 12 wells (Invitrogen GmbH)
UV/VIS-Spektrometer:	Shimadzu UV-2101PC, UV-VIS Scanning Spectrometer
Zentrifugenfilter:	Centriprep YM-10, Millipore Corp. Centricon YM-10, Millipore Corp.

7 Literaturverzeichnis

- [1] H. Linder, "Biologie", **1989**, Schroeder Schulbuchverlag GmbH
- [2] D. Voet, J. G. Voet, "Biochemistry", **1995**, John Wiley & Sons, Inc.
- [3] T. Grutter, J. P. Changeux, "Nicotinic receptors in wonderland", *Trends Biochem. Sci.*, **(2001)**, 26, 459-463
- [4] A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, M. Stowell, N. Unwin, "Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall", *J. Mol. Biol.*, **(1999)**, 288, 765-786
- [5] D. Paterson, A. Nordberg, "Neuronal nicotinic receptors in the human brain", *Prog. Neurobiol.*, **(2000)**, 61, 75-111
- [6] H. R. Arias, "Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. A new method to detect related function among proteins independent of sequence and fold homology", *Neurochem. Int.*, **(2000)**, 36, 595-645
- [7] A. Maelicke, A. Schrattenholz, M. Samochocki, M. Radina, E. X. Albuquerque, "Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease", *Behav. Brain. Res.*, **(2000)**, 113, 199-206
- [8] A. Schrattenholz, J. Godovac-Zimmermann, H. J. Schafer, E. X. Albuquerque, A. Maelicke, "Photoaffinity labeling of Torpedo acetylcholine receptor by physostigmine", *Eur. J. Biochem.*, **(1993)**, 216, 671-677
- [9] B. Schroder, S. Reinhardt-Maelicke, A. Schrattenholz, K. E. McLane, A. Kretschmer, B. M. Conti-Tronconi, A. Maelicke, "Monoclonal antibodies FK1 and WF6 define two neighboring ligand binding sites on Torpedo acetylcholine receptor alpha-polypeptide", *J. Biol. Chem.*, **(1994)**, 269, 10407-10416
- [10] A. Alzheimer, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde", *Allgemeine Zeitschrift*, **(1907)**, 64, 146-147
- [11] D. J. Selkoe, "Alzheimer's disease is a synaptic failure", *Science*, **(2002)**, 298, 789-791
- [12] D. A. Evans, H. H. Funkenstein, M. S. Albert, e. al., "Prevalence of Alzheimer's Disease in a Community Population of Older Persons: Higher than Previously Reported", *JAMA*, **(1989)**, 262, 2551-2556
- [13] T. D. Bird, S. M. Sumi, E. J. Nemens, D. Nochlin, G. Schellenberg, e. al., "Phenotypic Heterogeneity in Familial Alzheimer's Disease: A Study of 24 Kindreds", *Annals of Neurology*,

- (1989), 25, 12-25
- [14] A. L. Harvey, "The pharmacology of galanthamine and its analogues", *Pharmacol. Ther.*, (1995), 68, 113-128
- [15] M. Farlow, R. Anand, J. Messina, Jr., R. Hartman, J. Veach, "A 52-week study of the efficacy of rivastigmine in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease", *Eur. Neurol.*, (2000), 44, 236-241
- [16] S. L. Rogers, L. T. Friedhoff, "Long-term efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: an interim analysis of the results of a US multicentre open label extension study", *Eur. Neuropsych.*, (1998), 8, 67-75
- [17] M. A. Smith, K. L. Drew, A. Nunomura, A. Takeda, K. Hirai, X. Zhu, C. S. Atwood, A. K. Raina, C. A. Rottkamp, L. M. Sayre, R. P. Friedland, G. Perry, "Amyloid-beta, tau alterations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease: the chickens or the eggs?", *Neurochem. Int.*, (2002), 40, 527-531
- [18] J. Hardy, D. J. Selkoe, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics", *Science*, (2002), 297, 353-356
- [19] "The Alzheimer Association homepage", <http://www.alz.org>, (visited 2004)
- [20] D. J. Selkoe, "Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (2000), 924, 17-25
- [21] D. J. Selkoe, "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease", *Nature*, (1999), 399, A23-31
- [22] A. Aguzzi, C. Haass, "Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease", *Science*, (2003), 302, 814-818
- [23] D. B. Teplow, "Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis", *Amyloid*, (1998), 5, 121-142
- [24] E. Arias, E. Ales, N. H. Gabilan, M. F. Cano-Abad, M. Villarroya, A. G. Garcia, M. G. Lopez, "Galantamine prevents apoptosis induced by b-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic aceylcholine receptors", *Neuropharmacology*, (2004), 46, 103-114
- [25] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, D. B. Teplow, "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate", *J. Biol. Chem.*, (1997), 272, 22364-22372

- [26] G. Johnson, S. W. Moore, "The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1999), 258, 758-762
- [27] N. C. Inestrosa, A. Alvarez, C. A. Perez, R. D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O. I. Casanueva, C. Soto, J. Garrido, "Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme", *Neuron*, (1996), 16, 881-891
- [28] F. J. Munoz, R. Aldunate, N. C. Inestrosa, "Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase", *Neuroreport*, (1999), 10, 3621-3625
- [29] G. V. De Ferrari, M. A. Canales, I. Shin, L. M. Weiner, I. Silman, N. C. Inestrosa, "A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation", *Biochemistry*, (2001), 40, 10447-10457
- [30] C. Adessi, C. Soto, "Beta-sheet breaker strategy for the treatment of Alzheimer's disease", *Drug Development Research*, (2002), 56, 184-193
- [31] M. G. Zagorski, C. J. Barrow, "NMR studies of amyloid beta-peptides: proton assignments, secondary structure, and mechanism of an alpha-helix----beta-sheet conversion for a homologous, 28-residue, N-terminal fragment", *Biochemistry*, (1992), 31, 5621-5631
- [32] J. Talafous, K. J. Marcinowski, G. Klopman, M. G. Zagorski, "Solution structure of residues 1-28 of the amyloid beta-peptide", *Biochemistry*, (1994), 33, 7788-7796
- [33] Y. Fezoui, D. M. Hartley, J. D. Harper, R. Khurana, D. M. Walsh, M. M. Condron, D. J. Selkoe, P. T. Lansbury, Jr., A. L. Fink, D. B. Teplow, "An improved method of preparing the amyloid beta-protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments", *Amyloid*, (2000), 7, 166-178
- [34] C. F. Contreras, M. A. Canales, A. Alvarez, G. V. De Ferrari, N. C. Inestrosa, "Molecular modeling of the amyloid-beta-peptide using the homology to a fragment of triosephosphate isomerase that forms amyloid in vitro", *Protein Eng.*, (1999), 12, 959-966
- [35] P. Sikorski, E. D. Atkins, L. C. Serpell, "Structure and texture of fibrous crystals formed by Alzheimer's abeta(11-25) peptide fragment", *Structure (Camb)*, (2003), 11, 915-926
- [36] E. Krieger, S. B. Nabuurs, G. Vriend, "Homology modeling", *Methods Biochem. Anal.*, (2003), 44, 509-523
- [37] M. O. Dayhoff, "A model of evolutionary change.", *Proteins in Atlas of Protein Sequence and Structure*, (1978), 5, 345-358

- [38] C. Notredame, D. G. Higgins, J. Heringa, "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment", *J. Mol. Biol.*, (2000), 302, 205-217
- [39] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server", *Nucleic Acids Res.*, (2003), 31, 3381-3385
- [40] R. W. W. Hooft, G. Vriend, C. Sander, E. E. Abola, "Errors in protein structures", *Nature*, (1996), 381, 272-272
- [41] R. A. Laskowski, M. W. Macarthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures", *J. Appl. Cryst.*, (1993), 26, 283-291
- [42] W. F. Van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, "Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in chemistry.", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (1990), 29, 992-1023
- [43] M. C. Payne, M. P. Teter, D. C. Allan, T. A. Arias, J. D. Joannopoulos, "Iterave minimization techniques for ab-inio total-energy calculations - molecular-dynamics and conjugate gradients.", *Rev. Mod. Phys.*, (1992), 64, 1045-1097
- [44] B. R. Brooks, R. E. Brussolieri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations", *J. Comp. Chem.*, (1983), 4, 187-217
- [45] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, Jr., D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollmann, "A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules", *J. Am. Chem. Soc.*, (1995), 117, 5179-5197
- [46] A. R. Leach, "Molecular Modelling", 2001, Prentice Hall
- [47] D. Van Der Spoel, A. R. Van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, B. Hess, R. Van Drunen, H. J. Berendsen, "Gromacs User Manual 3.1", 2001, Dept. of Biophysical Chemistry, University of Groningen, The Netherlands
- [48] S. M. Thompson, "Use of Neighbour Lists in Molecular Dynamics", *CCP5 Quarterly*, (1983), 8, 20-28
- [49] T. A. Darden, D. York, L. Pedersen, "Particle-mesh Ewald: An N log (N) method for Ewald sums in large systems", *Journal of Chemical Physics*, (1993), 98, 10089-10092
- [50] D. M. York, A. Wlodawer, L. G. Pedersen, T. A. Darden, "Atomic-level accuracy in simulations of large protein crystals", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1994), 91, 8715-8718

- [51] J. Gasteiger, T. Engel, "Chemoinformatics", **2003**, Wiley-VCH
- [52] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, "Wirkstoffdesign", **2002**, Spektrum Akademischer Verlag
- [53] C. McMartin, R. S. Bohacek, "QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design", *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **(1997)**, 11, 333-344
- [54] D. S. Goodsell, A. J. Olson, "Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing", *Proteins: Str. Func. Genet.*, **(1990)**, 8, 195-202
- [55] D. Hoffmann, B. Kramer, T. Washio, T. Steinmetzer, M. Rarey, T. Lengauer, "Two-stage method for protein-ligand docking", *J. Med. Chem.*, **(1999)**, 42, 4422-4433
- [56] H. J. Bohm, "The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors", *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **(1992)**, 6, 61-78
- [57] J. Xu, "GMA: A generic matching algorithm for structural homomorphism, isomorphism, and maximal common substructure match and its applications", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **(1996)**, 36, 25-34
- [58] K. Brejc, W. J. Van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. Van Der Oost, A. B. Smit, T. K. Sixma, "Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors", *Nature*, **(2001)**, 411, 269-276
- [59] A. B. Smit, N. I. Syed, D. Schaap, J. Van Minnen, J. Klumperman, K. S. Kits, H. Lodder, R. C. Van Der Schors, R. Van Elk, B. Sorgedrager, K. Brejc, T. K. Sixma, W. P. Geraerts, "A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission", *Nature*, **(2001)**, 411, 261-268
- [60] R. E. Middleton, J. B. Cohen, S. M. Dunn, B. M. Conti-Tronconi, M. A. Raftery, A. Marutle, U. Warpman, N. Bogdanovic, A. Nordberg, M. J. Parker, A. Beck, C. W. Luetje, "Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as an agonist photoaffinity label.", *Biochemistry*, **(1991)**, 30, 6987-6997
- [61] H. M. Berman, T. Battistuz, T. N. Bhat, W. F. Bluhm, P. E. Bourne, K. Burkhardt, Z. Feng, G. L. Gilliland, L. Iype, S. Jain, P. Fagan, J. Marvin, D. Padilla, V. Ravichandran, B. Schneider, N. Thanki, H. Weissig, J. D. Westbrook, C. Zardecki, "The Protein Data Bank", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **(2002)**, 58, 899-907
- [62] S. M. Dunn, M. A. Raftery, A. Marutle, U. Warpman, N. Bogdanovic, A. Nordberg, M. J. Parker, A. Beck, C. W. Luetje, "Agonist binding to the Torpedo acetylcholine receptor. 1. Complexities revealed by dissociation kinetics", *Biochemistry*, **(1997)**, 36, 3846-3853

- [63] "MOE", Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada, <http://www.chemcomp.com>, (1997-2004)
- [64] E. Linnemann, "Galanthamin als Leitstruktur - Weiterentwicklung von Therapeutika gegen die Alzheimer'sche Demenz", 2002, Universität Paderborn
- [65] J. Krüger, "Untersuchung der allosterischen Bindungsstelle des Galanthamins am Acetylcholinerezeptor", 2002, Universität Paderborn
- [66] E. M. L. A. A. G. A. Saad, "Wechselwirkung von nichkompetitiven nikotinischen Agonisten mit der Acetylcholinesterase und dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor", 1997, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- [67] A. Alvarez, C. Opazo, R. Alarcon, J. Garrido, N. C. Inestrosa, "Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils", *J. Mol. Biol.*, (1997), 272, 348-361
- [68] E. Luttmann, "Vergleichende Dockingstudien am Acetylcholinesterase-Galanthamin-Komplex", 2000, Universität Paderborn
- [69] C. Pilger, "Galanthamin als AChE-Inhibitor – Beiträge zum rationalen Wirkstoffdesign", 2000, Universität Paderborn
- [70] C. Bartolucci, E. Perola, C. Pilger, G. Fels, D. Lamba, "Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: implications for the design of new anti-Alzheimer drugs", *Proteins*, (2001), 42, 182-191
- [71] U. Samanta, D. Pal, P. Chakrabarti, "Packing of aromatic rings against tryptophan residues in proteins", *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, (1999), 55, 1421-1427
- [72] C. Guillou, A. Mary, D. Z. Renko, E. Gras, C. Thal, "Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts*1", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2000), 10, 637-639
- [73] C. A. Hunter, J. K. M. Sanders, "The Nature of pi-pi Interactions", *J. Am. Chem. Soc.*, (1990), 112, 5525-5534
- [74] G. B. Mcgaughey, M. Gagne, A. K. Rappe, "pi-Stacking Interactions. Alive and well in proteins", *J. Biol. Chem.*, (1998), 273, 15458-15463
- [75] "Sybyl", Tripos Inc., St. Louis, Missouri, USA, <http://www.tripos.com/>, (2004)
- [76] C. J. Barrow, M. G. Zagorski, "Solution structures of beta peptide and its constituent

- fragments: relation to amyloid deposition", *Science*, (1991), 253, 179-182
- [77] F. Massi, J. W. Peng, J. P. Lee, J. E. Straub, "Simulation study of the structure and dynamics of the Alzheimer's amyloid peptide congener in solution", *Biophys. J.*, (2001), 80, 31-44
- [78] J. E. Straub, J. Guevara, S. Huo, J. P. Lee, "Long time dynamic simulations: exploring the folding pathways of an Alzheimer's amyloid Abeta-Peptide", *Acc. Chem. Res.*, (2002), 35, 473-481
- [79] J. P. Melchor, L. Mcvoy, W. E. Van Nostrand, "Charge Alterations of E22 Enhance the Pathogenic Properties of the Amyloid beta-Protein", *J. Neurochem.*, (2000), 74, 2209-2212
- [80] L. Miravalle, T. Tokuda, R. Chiarle, G. Giaccone, O. Bugiani, F. Tagliavini, B. Frangione, J. Ghiso, "Substitutions at Codon 22 of Alzheimer's Abeta Peptide Induce Diverse Conformational Changes and Apoptotic Effects in Human Cerebral Endothelial Cells", *J. Biol. Chem.*, (2000), 275, 27110-27116
- [81] C. Soto, E. M. Castano, B. Frangione, N. C. Inestrosa, "The alpha-helical to beta-strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation", *J. Biol. Chem.*, (1995), 270, 3063-3067
- [82] G. Bitan, S. S. Vollers, D. B. Teplow, "Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization", *J. Biol. Chem.*, (2003), 278, 34882-34889
- [83] B. Ma, R. Nussinov, "Stabilities and conformations of Alzheimer's beta -amyloid peptide oligomers (Abeta 16-22, Abeta 16-35, and Abeta 10-35): Sequence effects", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2002), 99, 14126-14131
- [84] O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, J. J. Balbach, R. Tycko, "Supramolecular structural constraints on Alzheimer's beta-amyloid fibrils from electron microscopy and solid-state nuclear magnetic resonance", *Biochemistry*, (2002), 41, 15436-15450
- [85] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, "A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2002), 99, 16742-16747
- [86] R. Tycko, "Insights into the amyloid folding problem from solid-state NMR", *Biochemistry*, (2003), 42, 3151-3159
- [87] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, "Conformation of polypeptides and proteins", *Adv. Protein Chem.*, (1968), 23, 283-437
- [88] H. Grubmüller, "Predicting slow structural transitions in macromolecular systems:

- Conformational Flooding", *Phys. Rev. E*, (1995), 52, 2893-2906
- [89] D. M. Walsh, D. M. Hartley, Y. Kusumoto, Y. Fezoui, M. M. Condron, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. J. Selkoe, D. B. Teplow, "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates", *J. Biol. Chem.*, (1999), 274, 25945-25952
- [90] I. A. Vakser, O. G. Matar, C. F. Lam, "A systematic study of low-resolution recognition in protein-protein complexes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1999), 96, 8477-8482
- [91] G. V. De Ferrari, W. D. Mallender, N. C. Inestrosa, T. L. Rosenberry, "Thioflavin T is a fluorescent probe of the acetylcholinesterase peripheral site that reveals conformational interactions between the peripheral and acylation sites", *J. Biol. Chem.*, (2001), 276, 23282-23287
- [92] R. Sabate, M. Gallardo, J. Estelrich, "An autocatalytic reaction as a model for the kinetics of the aggregation of beta-amyloid", *Biopolymers*, (2003), 71, 190-195
- [93] H. Sticht, P. Bayer, D. Willbold, S. Dames, C. Hilbich, K. Beyreuther, R. W. Frank, P. Rosch, "Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease", *Eur. J. Biochem.*, (1995), 233, 293-298
- [94] M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik, "Solution structure of amyloid beta-peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is?", *Biochemistry*, (1998), 37, 11064-11077
- [95] O. Crescenzi, S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'ursi, P. A. Temussi, D. Picone, "Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain", *Eur. J. Biochem.*, (2002), 269, 5642-5648
- [96] W. Brown, "Light Scattering: Principles and Development", 1996, Calderon Press
- [97] B. H. Zimm, "The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions", *J. Chem. Phys.*, (1948), 16, 1093-1099
- [98] C. L. Shen, R. M. Murphy, "Solvent effects on self-assembly of beta-amyloid peptide", *Biophys. J.*, (1995), 69, 640-651
- [99] A. Holtzer, "Interpretation of the angular distribution of the light scattered by a polydisperse system of rods", *Journal of Polymer Science*, (1955), 17, 432-434
- [100] J. Brinckmann, H. Bertling, B. M. Bussian, M. Knoblauch, M. Waldherr-Teschner, T. Goetze, "MOLCAD - Interaktive Molekulare Computergrafik auf High- Performance-Computern",

GDCh-Fachgruppe Chemie-Information, Würzburg, Tagungsbericht, 17.03.1986, (1987), 1, 93-111

- [101] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, "VMD: visual molecular dynamics", *J. Mol. Graph.*, (1996), 14, 33-38, 27-38
- [102] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, "LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions", *Protein Eng.*, (1995), 8, 127-134
- [103] "BABEL - A Molecular Structure Information Interchange Hub", <http://smog.com/chem/babel/>, (visited 2004)
- [104] C. Steinbeck, Y. Han, S. Kuhn, O. Horlacher, E. Luttmann, E. Willighagen, "The Chemistry Development Kit (CDK): an open-source Java library for Chemo- and Bioinformatics", *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, (2003), 43, 493-500
- [105] N. Guex, M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.", *Electrophoresis*, (1997), 18, 2714-2723
- [106] G. Vriend, "WHAT IF: A molecular modeling and drug design program", *J. Mol. Graph.*, (1990), 8, 52-56
- [107] H. J. C. Berendsen, D. Van Der Spoel, R. Van Drunen, "GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation", *Computer Physics Communications*, (1995), 91, 43-56
- [108] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, "GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis", *Journal of Molecular Modeling*, (2001), 7, 306-317
- [109] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr., R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical Pharmacology*, (1961), 7, 88-95
- [110] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, (1976), 72, 248-254
- [111] Autorenkollektiv, "Organikum", 1990, Deutscher Verlag der Wissenschaften

Anhang A - Abkürzungen

A β	β -Amyloid-Peptid - Oberbegriff für die verschiedenen Peptide
A β_{x-y}	Fragment des β -Amyloid-Peptids, bestehend aus den Aminosäuren x bis y
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholinrezeptor
AD	Alzheimer'sche Krankheit oder Demenz
APL	allosterisch potenzierender Ligand
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (engl. „amyloid precursor protein“)
ASCh	Acetylthiocholin
DTNB	5-Dithiobis-2-nitrobenzoat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eeAChE	Acetylcholinesterase der Spezies <i>Electrophorus electricus</i> - elektr. Aal
HFIP	Hexafluoroisopropanol
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MD	Molekular-Dynamik
nAChR	nikotischer Acetylcholinrezeptor
PAS	periphere anionische Bindungsstelle (engl. „peripheral anionic site“)
PDB	Protein Data Base - www.pdb.org
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. „sodiumdodecylsulfate“)
tcAChE	Acetylcholinesterase der Spezies <i>torpedo californica</i> - kalifornischer Zitterrochen
tmAChE	Acetylcholinesterase der Spezies <i>torpedo marmorata</i> - marmorierter Zitterrochen
TFE	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)ammoniummethan Hydrochlorid

Anhang B - Sequenzabbildungen

Mit Hilfe der folgenden Tabellen, welche Sequenzabbildungen enthalten, lässt sich für ein spezielles Alignment einfach die zu einer speziellen Aminosäure gehörige Aminosäure einer anderen Sequenz bestimmen. Dazu wird ausgehend von einer Sequenz auf eine andere abgebildet, indem der Index der Aminosäure aus der Quellsequenz um den Offset in der Spalte für die Zielsequenz modifiziert wird. So wird z. B. für die Aminosäure Tyr192 aus der α -Untereinheit des AChBP eine +6 abgelesen, wenn die entsprechende Aminosäure aus der α_1 -Untereinheit von *Torpedo Californica* gesucht wird. Zu finden ist diese +6 in der letzten Zeile der folgenden Tabelle, da 192 in das Intervall 191 bis 205 fällt, und dann in der zweiten grauen Spalte, da diese für eine Abbildung auf *Torpedo Californica* zuständig ist. Also entspricht der Aminosäure 192 aus dem AChBP die Aminosäure Nummer 198 aus dem Rochen.

In den Tabellen steht weiterhin „gap“ für eine Lücke, das bedeutet, dass einer Aminosäure keine entsprechende Aminosäure in der Zielsequenz zugeordnet wurde.

von AChBP_α	<i>h_α₇/gg_α₇</i>	<i>h_α₄</i>	<i>tc_α₁</i>	<i>h_β₂</i>	<i>h_δ / tc_δ</i>	<i>h_γ / tc_γ</i>
1 - 10	+ 0	+ 0	+ 2	+ 2	+ 1	+ 1
11 - 14	+ 0	+ 0	+ 2	+ 4	+ 3	+ 1
15 - 15	gap	gap	gap	gap	gap	gap
16 - 24	- 1	- 1	+ 1	+ 3	+ 2	+ 0
25 - 71	+ 0	+ 0	+ 2	+ 4	+ 3	+ 1
72 - 90	+ 2	+ 2	+ 4	+ 6	+ 5	+ 3
91 - 134	+ 3	+ 3	+ 5	+ 7	+ 6	+ 4
135 - 156	+ 4	+ 4	+ 6	+ 8	+ 7	+ 5
157 - 157	gap	+ 4	+ 6	+ 8	+ 7	+ 5
158 - 158	gap	+ 4	+ 6	+ 8	+ 19	+ 13
159 - 167	+ 2	+ 4	+ 6	+ 8	+ 19	+ 13
168 - 168	gap	gap	gap	gap	gap	gap
169 - 185	+ 1	+ 3	+ 5	+ 7	+ 18	+ 12
186 - 189	+ 1	+ 3	+ 5	gap	+ 18	+ 12
190 - 190	+ 1	+ 3	+ 5	+ 3	+ 18	+ 12
191 - 205	+ 1	+ 3	+ 6	+ 4	+ 19	+ 13

von tc_α₁	AChBP_α	h_α ₇ /gg_α ₇	h_α ₄	h_β ₂	h_δ / tc_δ	h_γ / tc_γ
1 - 2	gap	gap	gap	+ 0	+ 0	+ 8
3 - 12	- 2	- 2	- 2	+ 0	+ 0	+ 8
13 - 16	- 2	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
17 - 25	- 1	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
26 - 26	gap	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
27 - 73	- 2	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
74 - 75	gap	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
76 - 94	- 4	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
95 - 95	gap	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
96 - 139	- 5	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
140 - 140	gap	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
141 - 162	- 6	- 2	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
163 - 163	- 6	gap	- 2	+ 2	+ 2	+ 8
164 - 164	- 6	gap	- 2	+ 2	+ 14	+ 8
165 - 173	- 6	- 4	- 2	+ 2	+ 14	+ 8
174 - 190	- 5	- 4	- 2	+ 2	+ 14	+ 8
191 - 194	- 5	- 4	- 2	gap	+ 14	+ 8
195 - 195	- 5	- 4	- 2	- 2	+ 14	+ 8
196 - 196	gap	gap	gap	- 2	+ 14	+ 8
197 - 211	- 6	- 5	- 3	- 2	+ 14	+ 8

von h_α₇ / gg_α₇	AChBP_α	h_α ₄	tc_α ₁	h_β ₂	h_δ / tc_δ	h_γ / tc_γ
1 - 10	+ 0	+ 0	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2
11 - 14	+ 0	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
15 - 23	+1	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
24 - 24	gap	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
25 - 71	+0	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
72 - 73	gap	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
74 - 92	-2	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
93 - 93	gap	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
94 - 137	-3	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
138 - 138	gap	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
139 - 160	- 4	+ 0	+ 2	+ 4	+ 4	+ 2
161 - 169	- 2	+ 2	+ 4	+ 6	+ 18	+ 12
170 - 186	- 1	+ 2	+ 4	+ 6	+ 18	+ 12
187 - 190	- 1	+ 2	+ 4	gap	+ 18	+ 12
191 - 192	- 1	+ 2	+ 5	+ 3	+ 19	+ 13
193 - 206	- 1	+ 2	+ 5	+ 3	+ 19	+ 13

Aus der vorliegenden Dissertation sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

- Linnemann, E., Luttmann, E. und Fels, G.; „Exploring the Binding-Site Gorge of Acetylcholinesterase“, *Poster bei: 15. Molecular Modelling Workshop (2001)*, Darmstadt
- Linnemann, E., Luttmann, E. und Fels, G., "Molecular Modelling Study of b-Amyloid-Inhibition at the Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase", *Proc. 10th German-Japanese Workshop on Chem. Information, 11.-12. Oktober 2001, FIZ Karlsruhe Online Center, Germany (2001)*, 87-90
- Luttmann, E., Linnemann, E. und Fels, G., "Exploring the Binding-Site Gorge of Acetylcholinesterase", *Poster bei: 15. CIC-Workshop - Software-Entwicklung in der Chemie, Leipzig, Germany, 1.-3. April (2001)*
- Luttmann, E., Linnemann, E. und Fels, G.; „Galanthamine as Bis-Functional Ligand for the Acetylcholinesterase“, *Journal of Molecular Modeling, (2002)*, 8 (6), 208-216
- Fels, G., Linnemann, E., Luttmann, E. und Pilger, C., "Exploring the AChE gorge with Galanthamine", *Poster bei: XIth Symp. on Cholinergic Mechanisms-Function and Dysfunction, St. Moritz, Schweiz, 5.-9. Mai, (2002)*
- Luttmann, E., "Exploring the AChE gorge with Galanthamine", *Vortrag bei: Euroregionale, Aachen, Germany, 13.-15. März (2002)*
- Steinbeck, C., Han, Y., Kuhn, S., Horlacher, O., Luttmann, E. und Willighagen, E., "The Chemistry Development Kit (CDK): An Open-Source Java Library for Structural Chemo- and Bioinformatics", *J. Chem. Inf. Comp. Sc., (2003)*, 43, 493-500
- Luttmann, E., "Chemiesoftware leichtgemacht", *Nachrichten aus der Chemie (2003)*, 1, 40-41
- Alisaraie, L., Luttmann, E. und Fels, G., "Revisiting the AChE-E2020-Structure by Molecular Docking", *Poster bei: 17. Darmstädter Molecular Modelling Workshop, Erlangen, 27.-28. Mai, (2003)*
- Luttmann, E., "Galanthamin - a multifunctional lead for the therapy of Alzheimer's dementia", *Vortrag bei: "1. Computational Chemistry Workshop and Award", Bayer AG, Wuppertal, Germany, 11.-12. November, (2003)*
- Luttmann, E., Linnemann, E. und Fels, G., "Exploring the AChE gorge with Bis-Galanthamine-Derivatives", *Proc. 11th Int. Symp. on Cholinergic Mechanisms, May 5-9, 2002, St. Moritz, Schweiz (2004), im Druck*
- Luttmann, E. und Fels, G., „A new model of the β -Amyloid-peptide - structural features of a ready to aggregate intermediate?“, *eingereicht*

Auszeichnung mit dem „Forschungspreis der Universität Paderborn“, **2003**

