

Struktur und Funktion Acetylcholin bindender Proteine

Von der Fakultät Naturwissenschaften

Department Chemie

der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von

Jens Krüger

Paderborn 2006

Eingereicht am: 24.04.2006

Mündliche Prüfung am: 12.05.2006

Referent: Prof. Dr. G. Fels

Koreferent: Prof. Dr. G. Henkel

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2002 bis März 2006 im Fach Organische Chemie des Departments Chemie der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Paderborn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Fels angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Fels danke ich für die interessante Themenstellung, die großen Freiräume, die freundliche Unterstützung dieser Arbeit und die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Henkel danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Boripont Manmontri gilt besonderer Dank für die Unterstützung bei den Iridiumkatalysearbeiten und Sajeedha Reshmi Ahmed für die Mitarbeit bei den LIE-Simulationen.

Dem Team des PC² mit Axel Keller, Holger Nitsche, Andreas Krawinkel und Dr. Jens Simon danke ich für die zur Verfügungstellung von Rechenzeiten und den großartigen Support.

Dr. Marek Samochocki, Dr. Jürgen Ludwig und Prof. Dr. Alfred Maelicke möchte ich für die Unterstützung bei der Elektrophysiologie danken.

Dirk Welsch und Prof. Dr. Horst Weber danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Pharmacophorsuche.

Michael Küpper und Dr. Kurt Hoffmann gilt mein Dank für die massenspektroskopischen Untersuchungen von markierten Proteinen.

Ferner möchte ich mich bei Lars Haller, Michael Kröger und Oliver Stüker, die mich durch das außergewöhnliche Arbeitsklima, die zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen unterstützt haben, bedanken.

für

Jülide & Ayten

INHALTSVERZEICHNIS

1. <i>Einleitung</i>	1
1.1 Aufbau der cholinergen Synapse	1
1.2 Alzheimer'sche Demenz	2
1.3 Therapieansätze	4
1.4 AChE	7
1.5 AChBP	7
1.6 nAChR	8
1.7 allosterisch potenzierender Effekt	12
1.8 β -Amyloid	13
2. <i>Aufgabenstellung</i>	16
3. <i>Synthese und Isotopenmarkierung photolabiler Liganden</i>	18
3.1 Photoaffinitätslabeling	18
3.1.1 Synthese von Photogalanthamin	18
3.1.2 chemische Eigenschaften	21
3.2 Isotopenaustauschmethoden	23
3.2.1 Iridium katalysierter H/D Austausch	23
3.2.2 Isotopenmarkierung durch Carbamatreduktion	35
4. <i>Acetylcholinesterase</i>	39
4.1 Inhibierung AChE	39

4.2	Docking	41
4.2.1	Positionierung	41
4.2.2	Score	42
4.2.3	RMSD	43
4.2.4	Bindungsenergie	44
4.2.5	Predictive Index	44
4.2.6	Galanthamin in 1DX6 und 1QTI	46
4.3	Docking AChE	47
4.4	LIE AChE	49
4.5	LIE Trypsin	54
5.	<i>Acetylcholin bindendes Protein</i>	56
5.1	essentielle Dynamik AChBP	56
5.1.1	PCA	56
5.1.2	Konformationsgeneration	57
5.1.3	Eigenwerte und -vektoren	57
5.1.4	Bewegungsmuster	58
6.	<i>nikotinischer Acetylcholinrezeptor</i>	62
6.1	allosterisch potenzierende Wirkung	62
6.2	Markierung nAChR	64
6.3	Lokalisierung von Markierungen	66
6.4	MD nAChR	69
6.4.1	Agonist Bindung	71
6.4.2	APL Bindung	73
6.4.3	Dichteprofile	75
6.5	Permeation	77
6.5.1	Homologie Modell	78

6.5.2	gesteuerte Bewegung	80
6.5.3	Vergleichssysteme	80
6.5.4	Kraft- und Energieprofile	81
6.5.5	Porendurchmesser	85
6.6	essentielle Dynamik nAChR	86
7.	<i>Pharmacophor</i>	89
7.1	Aktivitätsbewertung	89
7.2	Alignment	92
7.3	Pharmacophor	92
7.4	Datenbanksuche	94
7.5	APL-Aktivität	97
8.	<i>Amyloid</i>	99
8.1	MD Simulationen	99
8.2	Solvenzoberfläche	101
9.	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	103
10.	<i>Durchführung und Experimente</i>	105
10.1	Synthese von Photogalanthamin	106
10.2	Iridium katalysierter H/D-Austausch	112
10.3	Carbamatreduktion	118
10.4	Proteinmarkierung	121
10.5	Elektrophorese	121
10.6	Ellman-Test	123
10.7	Peptidanalyse	123
10.8	APL-Aktivität	125

<i>11. Simulationen</i>	127
11.1 Docking	128
11.2 Homologie Modelling	128
11.3 Molekular Dynamik	129
11.4 CONCOORD - PCA	130
11.5 HOLE	130
11.6 GRIDCOUNT	130
11.7 Pharmacophor	131

1. EINLEITUNG

Acetylcholin bindende Proteine besitzen eine herausragende Stellung, wenn es um das Verständnis der komplexen Vorgänge im Gehirn geht. Je genauer das Wissen über diese und andere am Denk- und Erinnerungsvorgang beteiligten Elemente ist, desto eher ist es möglich Medikamente und Therapien gegen damit verbundenen Erkrankungen zu entwickeln.

1.1 Aufbau der cholinergen Synapse

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Kontaktstellen zwischen Nervenzellen, die Synapsen. An ihnen wird der Informationsimpuls von einer Zelle auf die andere übertragen. Man unterscheidet erregende und hemmende Synapsen, bei denen der Impuls mit Hilfe eines chemischen Botenstoffes, dem Neurotransmitter übertragen wird. Des Weiteren gibt es noch elektrische Synapsen, wo das Signal direkt übertragen werden kann. Die meisten Nervenzellen sind mit verschiedenen Synapsen versehen, deren Potentiale und Ströme sich summieren und gegenseitig beeinflussen können.

Die cholinerge Synapse trägt ihren Namen nach dem Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) der hier für die Signalübermittlung zwischen prä- und postsynaptischer Seite sorgt. Kommt auf der präsynaptischen Seite ein Nervenimpuls, ein sogenanntes Aktionspotential an, so wird die Zellmembran depolarisiert, indem Calciumionen in die Zelle einströmen. Hierdurch kommt es zur Verschmelzung von ACh gefüllten Vesikeln mit der Membran [1].

Der ausgeschüttete Neurotransmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) [2, 3]. Es ist die Bindung von zwei Neurotransmittermolekülen an zwei α -Untereinheiten des Rezeptors notwendig, damit es zur Öffnung des Ionenkanals kommt [4]. Die in die Zelle einfließenden Ionen sorgen für eine Depolarisierung, aus der ein neues Aktionspotential entsteht.

Damit sich die Synapse regenerieren kann, muss das chemische Signal terminiert werden. Die Acetylcholinesterase (AChE) bindet im synaptischen Spalt befindliches Acetylcholin und spaltet es in Acetat und Cholin. Diese Bestandteile werden von der präsynaptischen Seite wieder aufgenommen und für eine erneute Synthese von ACh verwendet.

1.2 Alzheimer'sche Demenz

Die Alzheimer'sche Demenz wurde nach dem deutschen Neurologen Alois Alzheimer (1864 - 1915) benannt, von dem die Erkrankung erstmals 1906 wissenschaftlich beschrieben wurde [5]. Die Alzheimer'sche Demenz ist eine neurologische Erkrankung, die durch den langsam fortschreitenden Verfall von Nervenzellen und den Verlust an Nervenzellkontakten gekennzeichnet ist. Folge hiervon ist die Schrumpfung des Gehirns um bis zu 20%, einhergehend mit einer Vertiefung der Windungsfurchen an der Hirnoberfläche und einer Erweiterung der Hirnkammern. Bei einer fortgeschrittenen Erkrankung kann diese makroskopische Veränderung mit Computertomographie oder Magnetresonanztomographie sichtbar gemacht werden. Die ist oft die einzige Methode um Alzheimer von verwandten Erkrankungen wie der Lewy-Körperchen-Krankheit oder Parkinson abzugrenzen. Eine endgültige Diagnose ist nur nach dem Tod durch eine Untersuchung des Gehirns möglich [6].

Eine tief liegende Hirnstruktur, die schon sehr früh Schädigungen auf-

weist, ist der Meynert-Basalkern, deren Zellen den Neurotransmitter Acetylcholin erzeugen. Durch das Absterben kommt es zu einer deutlichen Verminderung der Acetylcholinkonzentration in der Hirnrinde. Dies führt zu Störungen der Informationsverarbeitung und ist ursächlich für den Gedächtnisverlust.

Daneben kommt es zur Bildung von abnorm veränderten Eiweißen, die sich als Fasern im Gehirn ablagern. Die schon von Alois Alzheimer beschriebenen Neurofibrillenbündel, bestehen aus Tau-Protein einem normalen Bestandteil des Zellskeletts von Nervenzellen. Bei der Erkrankung kommt es zur übermäßigen Beladung dieses Proteins mit Phosphatgruppen, was zur Störung von Stabilisierungs- und Transportprozessen der Zelle, und damit zu ihrem Absterben führt.

Zusätzlich gibt es noch eine zweite Sorte von Proteinablagerungen, die eher zwischen den Nervenzellen zu findenden Amyloid-Plaques. Dadurch dass ihre Aggregate von Stützzellen umgeben werden und sie sich sogar in die Wand von Blutgefäßen einlagern können, kommt es zu einer schlechteren Sauerstoff- und Energieversorgung des Gehirns, was das Zellsterben begünstigt.

Alzheimer kann schon vor dem 50. Lebensjahr auftreten, die Häufigkeit steigt aber deutlich mit dem Lebensalter. Neben einigen genetischen Faktoren bleibt das Alter der größte Risikofaktor um an der Alzheimer'schen Demenz zu erkranken. So beträgt das Risiko für 65 - 74 jährige Personen etwa 1.7%, für 75 - 84 jährige Personen etwa 11% und für Personen über 84 Jahre etwa 30% [6].

Die Krankheit ist durch Störung des Orientierungsvermögens, der Gedächtnisleistung, sowie des Denk- und Urteilsvermögens gekennzeichnet. Diese Störungen gestalten die Bewältigung des Alltags für die Betroffenen und deren

Angehörige als sehr schwierig. Mit dem Fortschreiten der Krankheit sind die Betroffenen zunehmend auf Hilfe und Unterstützung angewiesen. Da es sich bei den Erkrankten um keine einheitliche Gruppe, sondern um individuelle Persönlichkeiten aus allen sozialen Gruppen und Schichten handelt, ist der Betreuungs- und Therapiebedarf ebenso vielschichtig. Mit der steigenden Lebenserwartung in allen Industrieländern, wird gerade die Betreuung und Pflege von Alzheimerkranken eine immer größere Bedeutung bekommen [7].

1.3 Therapieansätze

Die Verminderung der kognitiven Fähigkeiten bei der Alzheimer'schen Demenz ist eine Folge des fortschreitenden Untergangs von Nervenzellen. Alle derzeit zugelassenen Medikamente setzen an Folge- und Begleiterscheinungen dieses Abbaus an. Von daher ist ihre Wirkung begrenzt und sie können das Fortschreiten der Symptome nur vorübergehend verzögern.

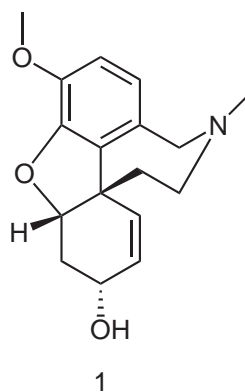


Fig. 1.1: (-)-Galanthamin (1)

Die direkteste Strategie um der Verminderung an Rezeptoren und Neurotransmitter zu begegnen ist die Terminierung durch die AChE zu unter-

binden. Geeignete Substrate blockieren die Bindungsstelle für ACh und verzögern somit seine Hydrolyse. Leider wirken derartige Substanzen nicht nur spezifisch bei der AChE, sondern greifen auch in andere neurochemische Systeme ein.

Ein Vertreter der Esterasehemmer, (-)-Galanthamin (**1**), verfügt zusätzlich über die Fähigkeit das Antwortsignal des Rezeptors auf ACh positiv zu modulieren (siehe Fig. 1.1). Hiermit können trotz vermindertem Neurotransmitterniveau genug Ionen in die Zelle strömen und ein neues Aktionspotential auslösen. Man spricht hier von allosterisch potenzierenden Liganden (siehe Fig. 1.6) [8]. (-)-Galanthamin (**1**) ist ein natürlich vorkommendes Alkaloid und wurde erstmals 1947 aus den Zwiebeln des kaukasischen Schneeglöckchens *Galanthus woronowii* isoliert [9]. Durch seinen dualen Wirkmechanismus ist es eines der interessantesten und vielversprechendsten Substrate zur Behandlung von Alzheimer [10, 11].



Fig. 1.2: Schneeglöckchen, ursprüngliche Quelle für das allosterisch potenzierende (-)-Galanthamin (**1**).

Folgende Präparate sind derzeit auf dem Markt und werden regelmäßig zur symptomatischen Behandlung der Alzheimer'schen Demenz eingesetzt:

Wirkstoff	Handelsname	Wirkmechanismus
Donepezil	Aricept	Esterasehemmer
Rivastigmin	Exelon	Esterasehemmer
Galanthamin	Reminyl	Esterasehemmer, verbesserte ACh Signalübertragung
Memantine	Axura, Ebixa	verbesserte Glutamat Signalüber- tragung

Tab. 1.1: Medikamente zur Behandlung von Alzheimer

Leider ist allen diesen Medikamenten ein mehr oder weniger weites Spektrum von Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Unruhe, Schlafstörungen und Kopfschmerz gemein [12, 13]. Weiterhin werden andere Symptome die im Verlauf der Krankheit auftreten können, wie Unruhe, depressive Verstimmung oder Erregung und Aggressivität mit Hilfe von Psychopharmaka behandelt, die ebenfalls Nebenwirkungen erzeugen.

Die moderne Arzneimittelentwicklung verfolgt von daher zwei Ziele. Zunächst gilt es, bekannte Medikamente zu modifizieren, um sie in ihrer Wirkung zu verstärken. Dies führt dazu, dass schon geringere Konzentrationen ausreichen um den therapeutischen Effekt zu erzielen und gleichzeitig, das Auftreten von Nebenwirkungen deutlich zu verringern. Der zweite Ansatz beschäftigt sich mit der Verhinderung der Aggregation von Amyloid-Plaques, die für die größten neurologischen Schäden verantwortlich gemacht werden. Ein Medikament, das die Bildung von Plaques spezifisch unterdrückt oder gar ihre Auflösung fördert, würde die erste kausale Therapie gegen die Alzheimer'sche Demenz darstellen.

1.4 AChE

AChE ist eine Serinhydrolase und spaltet Acetylcholin zu Acetat und Cholin. Das Enzym ist sehr effizient ($k_{cat}/K_M = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und hat eine hohe Wechselzahl ($25\,000 \text{ s}^{-1}$), von daher erfolgt die Umsetzung von Acetylcholin außerordentlich schnell und ist weitgehend diffusionskontrolliert. Die katalytischen Fähigkeiten der AChE führen zu einer schnellen Terminierung des neurochemischen Signals und ermöglichen so eine effiziente Weiterleitung der Aktionspotentiale der Nervenzelle [1].

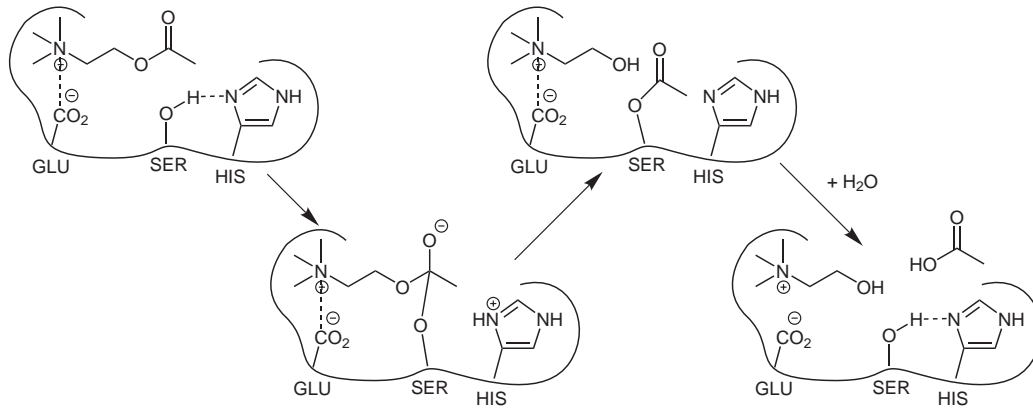


Fig. 1.3: Vereinfachtes Schema der Acetylcholinspaltung durch AChE.

Alle Isoformen der AChE zeigen eine große Homologie zueinander, was besonders auf den konservierten Bereich des aktiven Zentrums um die katalytische Triade (Ser200, His440 und Glu327) zutrifft (siehe Fig. 1.3) [14, 15, 16]. Bei der Spezies *Torpedo marmorata* verfügt das Protein über 543 Aminosäuren und hat eine Masse von 61.5 kDa.

1.5 AChBP

Das Acetylcholin bindende Protein (AChBP) ist ein Schlüsselement für das Verständnis der Funktionsweise des nAChR. Aufgrund seiner hohen Homolo-

gie und sehr ähnlicher Tertiärstruktur ist es die ideale Vorlage zum Studium der Beweglichkeit von Acetylcholinrezeptoren [17, 18]. Die veröffentlichten Kristallstrukturen weisen eine Auflösung von 2.2 - 2.7 Å auf [19]. Die bisher genauesten Strukturinformationen über den nAChR basieren auf Elektronenmikroskopie und haben eine Auflösung von lediglich 4.0 Å [20]. Diese höhere Genauigkeit beim AChBP erlaubt die zuverlässige Bestimmung von Seitenkettenpositionen, deren Wechselwirkungen ausschlaggebend für Art und Umfang der Beweglichkeit eines Proteins sind.

Das AChBP ist ein Protein, das der Regulierung der synaptischen Funktion dient und überschüssiges Acetylcholin abfängt. Es kommt in der Süßwasserteichschnecke *Lymnaea stagnalis* vor [21]. Das Protein besteht aus fünf identischen Untereinheiten und zeigt eine pseudo Fünffachsymmetrie entlang der zentralen Porenaxe. Da es eine hohe Ähnlichkeit zum extrazellulären Teil aller neuronalen und muskulären Acetylcholinrezeptoren aufweist, wurden auf seiner Basis eine Reihe von Homologiemodellen erstellt [22, 23, 24, 25, 26]. Diese Rezeptorfamilie ist ein integraler Bestandteil bei Lern- und Erinnerungsvorgängen und deshalb ein Ziel der Medikamentenentwicklung gegen die Alzheimer'sche Demenz [27]. Das Hauptinteresse liegt hierbei auf dem Mechanismus der Signalweiterleitung, bei dem die Bindung von Agonisten im extrazellulären Teil, zu einer Kanalöffnungsbewegung im über 20 Å entfernten transmembranen Teil führt. Es wird angenommen, dass diese essentielle Bewegung sowohl im AChBP, wie auch in den darauf basierenden Homologiemodellen zu beobachten sein muss.

1.6 nAChR

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor verdankt seinen Namen frühen Untersuchungen von John Newport Langley um 1906, der ihn mit Nikotin stimu-

lierte [2]. Man unterscheidet ihn von den muscarinischen Rezeptoren, die für das Gift des Fliegenpilzes empfänglich sind. Beide gehören zur Gruppe der cholinergen Rezeptoren.

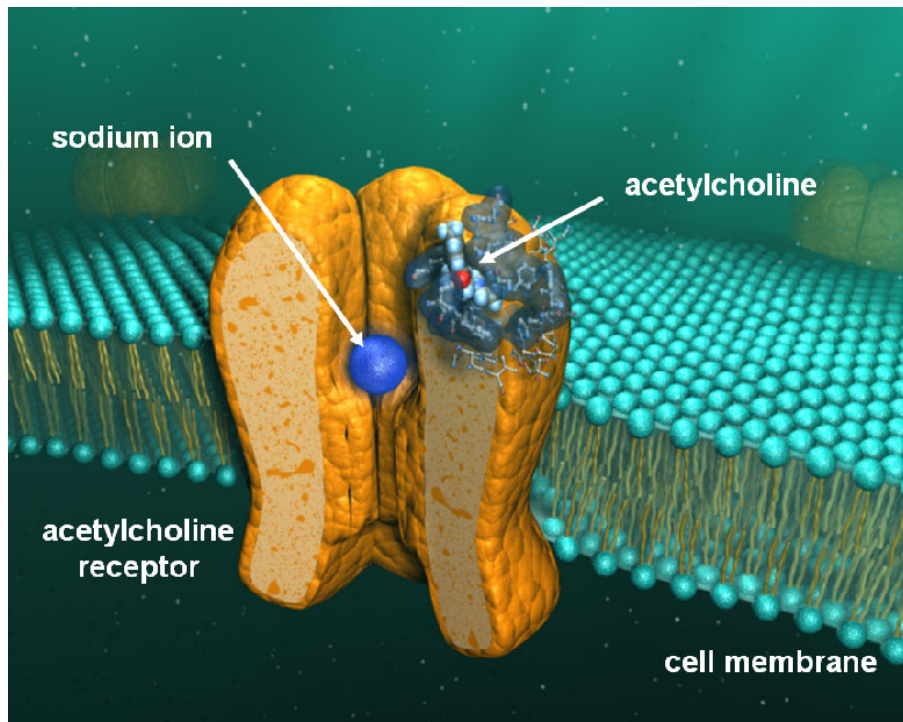


Fig. 1.4: Nikotinischer Acetylcholinrezeptor. Die Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin ermöglicht den Fluss von Ionen durch die zentrale Pore.

Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen geht hervor, dass der Rezeptor eine Gesamtlänge von 14 nm und einen Durchmesser von 8 nm besitzt (siehe Fig. 1.4). Er ragt etwa 5.5 nm in den synaptischen Spalt und 1.5 nm in das Cytoplasma [20, 28, 29, 30, 31, 32, 33]. Die fünf Untereinheiten sind in einer pseudo fünfzähligen Symmetrie um die zentrale Pore angeordnet, die als Ionenkanal fungiert [34]. Man unterscheidet eine Reihe von neuronalen vom muskulären Typ, die aber alle in Aufbau und Funktion sehr ähnlich sind [35, 36, 37].

Die Bindung von zwei Agonisten im extrazellulären Teil sorgt für eine konformelle Änderung des Rezeptors, die dazu führt, dass die Engstelle der Pore in transmembranen Teil geweitet wird und Ionen hindurchströmen können [38, 39, 40].

Die Agonistenbindungsstelle, deren Aufbau sich vor allen Dingen aus den Kristallstrukturen des AChBP ableiten lässt [19], befindet sich im extrazellulären Teil an der Schnittstelle zwischen einer α -Untereinheit und einer benachbarten anderen Untereinheit. Sie wird vom sogenannten CYS-Loop abgedeckt, einer beweglichen Schleife an deren Spitze sich zwei Cysteine befinden. Die Rückseite bildet ein Tryptophan über dessen Carbonylgruppe der positiv geladene Stickstoff von Agonisten wie Carbamylcholin oder Nikotin koordiniert wird. Die aromatische Seitenkette scheint dies über ein Kation- π -Stacking zu stabilisieren (siehe Fig. 6.7).

Jede der fünf Untereinheiten durchzieht viermal die Membran, wobei das M2 Segment die Innenseite der Pore bildet und das M4 Segment nach außen in die Membran eingebettet ist. Aus einer Reihe von Mutations- und Markierungsexperimenten lässt sich entnehmen, dass ein über alle Subtypen konservierter Ring aus Leucinen die Engstelle der Pore (α -nAChR LEU248) das Gate bildet [41, 42].

Über den Aufbau des intrazellulären Teils ist wenig bekannt. Lediglich die Bindung von Rapysn, einem 43 kDa Protein, in diesem Bereich gilt als sicher [3]. Es ist für das Clustern von Rezeptoren an der Stelle des Nerv-Muskelkontakts relevant. Die Kumulation an diesen Stelle ist essentiell für eine schnelle Signalübertragung.

Paarweise Mutationsstudien zeigen die große Bedeutung eines Arginin-Glutamin Ionenpaares für die Kopplung von ACh-Bindungsstelle und Gate (siehe Fig. 1.5) [43, 44]. Das Paar stellt einen Kontakt zwischen einem Loop

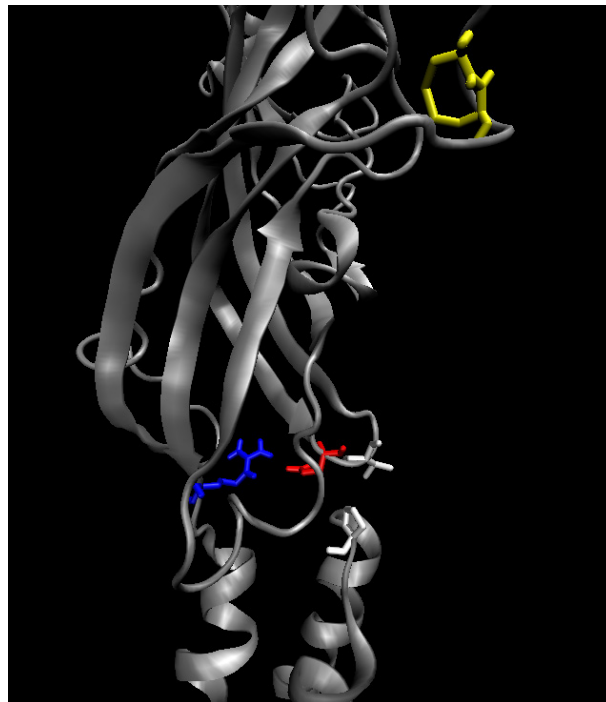


Fig. 1.5: Seitenansicht auf eine α -Untereinheit des nAChR. Kopplung der Agonistenbindungsstelle (CYS192, CYS193 - gelb), über ein Ionenpaar (ARG209 - blau, GLU45 - rot) und eine hydrophobe Wechselwirkung (VAL46, PRO272 - weiß), mit dem helikalen Transmembranbereich.

des extrazellulären Teils zum M1 Segment beziehungsweise über ein benachbartes Prolin zum M2 Segment her. Der relativ starre β -Sheet Körper des extrazellulären Teils ist somit an zwei Stellen mit der transmembranen Pore verknüpft. Dieser Aspekt hat entscheidende Bedeutung für das Bewegungsmuster des Rezeptors. Wären extrazellulärer und transmembraner Teil nur an einer Stelle verbunden, könnte vermutlich nur eine sehr große Zugbewegung senkrecht zur Membranfläche für ein Öffnen und Schließen des Gates sorgen. Da die Verbindung aber über zwei Punkte geht, könnte eine wesentlich kleinere Kippbewegung ausreichen, um die Membranhelices so stark zu deformieren, dass es zu einer Öffnung kommt.

1.7 allosterisch potenzierender Effekt

Wie schon geschildert, zeigt der nAChR in Gegenwart von Agonisten wie Acetylcholin oder Nikotin eine Öffnung seines zentralen Ionenkanals und damit einhergehend einen Ionenfluss. Dies führt zur Depolarisierung der postsynaptischen Membran und dem Aufbau eines neuen Aktionspotentials.

Dieser elektrochemische Prozess kann über so genannte *patch-clamp* Messungen verfolgt werden [45]. Hierbei wird eine intakte Nervenzelle mit einer Sonde punktiert, die es ermöglicht die Potentialdifferenz zwischen Zellinneren und -äußeren zu messen. Wird nun die Nervenzelle von Agonisten umspült, binden diese an die aus der Zellmembran ragenden nAChR und öffnen ihren Ionenkanal. Der auftretende Strom lässt sich als charakteristisches Antwortsignal aufzeichnen (siehe Fig. 1.6).

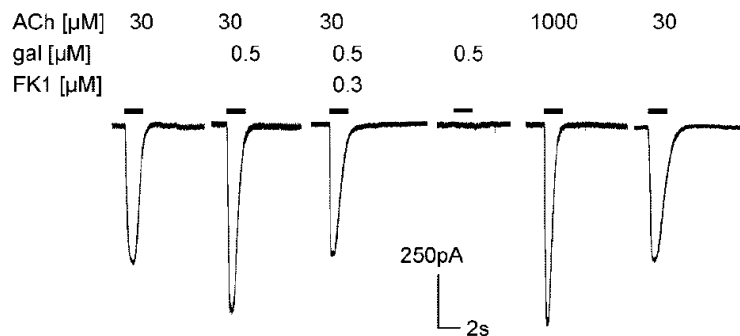


Fig. 1.6: Spur 1: Antwortsignal auf ACh. Spur 2: potenziertes ACh-Signal in Gegenwart von (-)-Galanthamin (**1**). Spur 3: der Antikörper FK1 blockiert selektiv die Potenzierung. Spur 4: nur **1** zeigt keinerlei Signal. Spur 5: Kontrolle mit hoher ACh-Konzentration. Spur 6: Kontrolle mit normaler ACh-Konzentration.

Neben den beiden Bindungsstellen für Agonisten an jedem nAChR, gibt es noch weitere Bindungsstellen für sogenannte allosterisch potenzierende Liganden (APL), die selektiv vom monoklonalen Antikörper FK1 blockiert

werden können [46]. Diese Substrate binden nicht kompetitiv zu den Agonisten und sorgen für eine Verstärkung des regulären Antwortsignals, um bis zu 65% [45]. Aus therapeutischer Sicht stellt dies eine Möglichkeit dar, trotz verminderter Anzahl an Rezeptoren und geringen Neurotransmitterkonzentrationen eine ausreichende Depolarisierung des Axons zu erreichen.

Über die Bindungsstelle von allosterisch potenzierenden Liganden am nAChR ist bisher wenig gesichertes bekannt [22, 47]. Es kann aufgrund von Photoaffinitätslabelling-Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass sich die Bindungsstelle an der α -Untereinheit des Rezeptors befindet [48, 49, 50]. Es konnte mit radioaktivem Physostigmin LYS125 markiert werden [50], welches sich im unteren Drittel des extrazellulären Teils an der Innenseite befindet. Durch Konkurrenzexperimente mit radioaktivem Galanthamin konnte gezeigt werden, dass Galanthamin, Physostigmin und Codein an der gleichen Stelle binden [49].

Mutationen des Rezeptors, bei denen das Lysin gegen Glycin ausgetauscht wurde, zeigen aber kaum eine Veränderung des APL-Effekts. Dies lässt nur den Schluss zu, dass LYS125 nicht unmittelbar in die strukturellen Veränderungen involviert ist, die zu einer Verstärkung des Signals führen. In der gleichen Studie konnte das THR202 als für die Potenzierung relevant identifiziert werden. Wenn es gegen Alanin ausgetauscht wird, bleibt das normale Antwortsignal des Agonisten erhalten, der APL-Effekt wird aber komplett unterdrückt [22].

1.8 β -Amyloid

Von allem am Verlauf der Alzheimer'schen Demenz beteiligten Faktoren, ist die Bildung von neurotoxischen β -Amyloidfibrillen die zerstörerischste. Es ist weiterhin unklar, ob diese Fibrillen Folge oder Auslöser der Erkrankung sind.

Für eine erfolgreiche Therapie ist jedoch ihre Auflösung, oder zumindest eine Hemmung der Aggregation ein wünschenswertes Ziel [51].

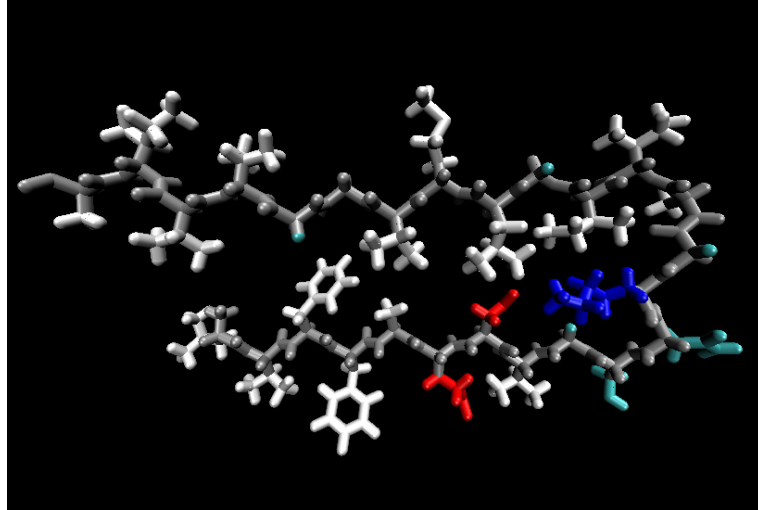


Fig. 1.7: "Riek" β -Amyloidmonomer aus Sicht der Fibrillenachse (Backbone-grau, Säure-rot, Base-blau, polar-cyan, unpolar-weiß; unten: $\beta 1 \approx 18 - 26$, oben: $\beta 2 \approx 31 - 42$).

Bislang ist nur wenig über die Topologie und das Aggregationsverhalten von β -Amyloiden bekannt. Die genauesten Daten stammen aus Festkörper-NMR Untersuchungen an amorphen Fibrillen [52]. Mit den aus den Kopplungsmustern abgeleiteten Entfernungsbeschränkungen gelang es, erste strukturelle Modelle zu erstellen [53]. Aus ihnen geht ein schichtweiser Aufbau der an einen Angelhaken erinnernden Monomere hervor. Die Schichten sind in der Art von β -Sheets über Backbone-Wasserstoffbrücken verknüpft [54]. Die zentrale Rolle bei der Stabilisierung der Fibrillen wird einem Ionenpaar zwischen ASP23 und LYS28 zugeschrieben [55]. Das, auf diesen Informationen basierende, sogenannte "Tycko"-Modell reflektiert schon sehr gut die tatsächliche Topologie der Amyloide. Bei seiner Erstellung lagen aber keine Informationen

zur Seitenkettenwechselwirkungen im Kern der Fibrille vor.

Durch geschickte Kombination von paarweisen Mutationsexperimenten, Isotopenaustausch und Festkörper-NMR gelang es Riek und Mitarbeitern [56], die Paare PHE19/GLY38 und ALA21/VAL36 zu identifizieren, die den hydrophoben Kern bilden. Des weiteren wurde klar gezeigt, dass MET35 nach außen stehen muss. Außerdem konnte ein Versatz zwischen den verschiedenen β -Strängen nachgewiesen werden. Hiermit ist die konformelle Freiheit soweit eingeschränkt, dass ein zuverlässiges Modell des β -Amyloids erstellt werden konnte (2BEG, siehe Fig. 1.7) [56].

2. AUFGABENSTELLUNG

Die hier vorgelegte Arbeit zielt auf eine Verbesserung des Verständnisses der Vorgänge an der cholinergen Synapse vor dem Hintergrund der Alzheimer'schen Demenz. Mit einer Kombination von chemischen und Molecular-Modelling Ansätzen sollten für die Signalübertragung zwischen Nervenzellen relevante Aspekte untersucht werden.

Im Zentrum der Untersuchungen steht das Phänomen des allosterisch potenzierenden Effekts, bei dem bestimmte Liganden eine Signalverstärkung am nikotinischen Acetylcholinrezeptor hervorrufen. Da bisher weder der Wirkort eindeutig bestimmt, noch der Wirkmechanismus aufgeklärt wurde, sollte eine Strategie entwickelt werden, um mit Hilfe von Photoaffinitätslabelling diese Bindungsstelle zu charakterisieren. Dafür sollte ein geeigneter photosensitiver Ligand auf Basis von Galanthamin synthetisiert werden, der am Rezeptor, aber auch an der Acetylcholinesterase eine gute biochemische Aktivität zeigt. Für die spätere Lokalisierung des Labels sollten zum einen Isotopenmarkierung und zum anderen Massenspektroskopie als Nachweismethoden evaluiert werden.

Parallel sollten Modelle des nikotinischen Rezeptors auf Basis von Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturen homologer Proteine verbessert werden. Hiermit sollte das Bindungsverhalten der verschiedenen Ligandentypen bestimmt und mit experimentellen Befunden verglichen werden. Ergänzend sollte das dynamische Verhalten des Rezeptors, wie auch des homologen

Acetylcholin bindenden Proteins, mit Molekulardynamik und darauf aufbauender Essential-Dynamics-Analyse untersucht werden. Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Kopplung der Ligandenbindung im extrazellulären Teil mit der 20 Å entfernten transmembranen Pore.

Bisher bekannte allosterisch potenzierende Liganden sollten nach ihrer Aktivität und Konzentrationsabhängigkeit beurteilt werden und auf ihrer Basis ein allgemein gültiger Pharmacophor erstellt werden. Hiermit sollten Datenbanken erhältlicher Substrate verdichtet werden, um ein Set von potentiell neuen Leitstrukturen zu identifizieren.

3. SYNTHESE UND ISOTOPENMARKIERUNG PHOTOLABILER LIGANDEN

3.1 *Photoaffinitätslabeling*

Über eine lichtinduzierte Reaktion soll ein geeigneter Ligand so angeregt werden, dass er kovalent in seiner Bindungstasche fixiert wird. Nach Entwicklung und Synthese des Liganden, soll so die Bindungsstelle für APL am nAChR lokalisiert werden.

3.1.1 *Synthese von Photogalanthamin*

Ausgehend von früheren Arbeiten bestand der Wunsch die Markierungseffizienz beim Photoaffinitätslabeling des nAChR mit (-)-Galanthamin (**1**) erheblich zu steigern und die Methode auch auf die AChE zu erweitern [49, 50, 57]. Bei dieser Technik zur Identifizierung von Bindungsstellen benötigt der Ligand auf der einen Seite eine hinreichend hohe Bindungsaffinität und auf der anderen Seite eine gute Photosensitivität [58, 59, 60]. Hierzu wurde als photolabile Gruppe 5-Diazo-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure (**4**) ausgewählt, welche sich durch eine Reihe von günstigen Eigenschaften auszeichnet [61, 62, 63, 64].

Die photolabile Gruppe ist über eine dreistufige Synthese in akzeptablen Ausbeuten und in hoher Reinheit erhältlich. Sie zeigt eine starke Absorptionsbande bei 310 nm, was sich sehr günstig auf Bestrahlung mit UV-Licht auswirkt. Bei geeigneter Lichteinwirkung bildet sich nach Abspaltung von N₂

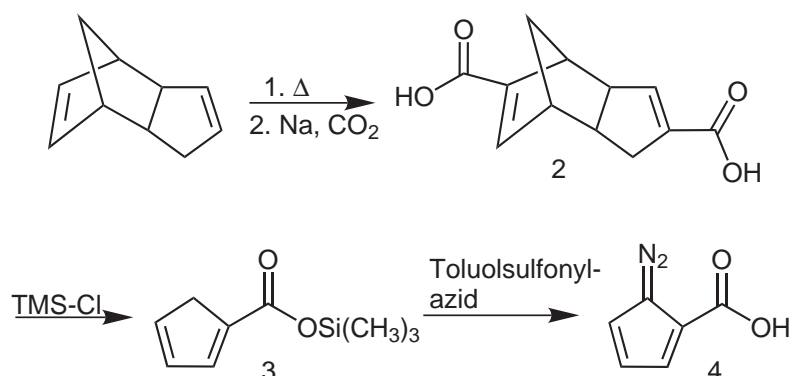


Fig. 3.1: Synthese von 5-Diazo-cyclopenta-1,3-dienecarbonsäure (4).

ein Carben (siehe Fig. 3.3), welches dann eine kovalente Bindung zu jeder benachbarten Gruppe einer Bindungstasche ausbilden kann [65, 61].

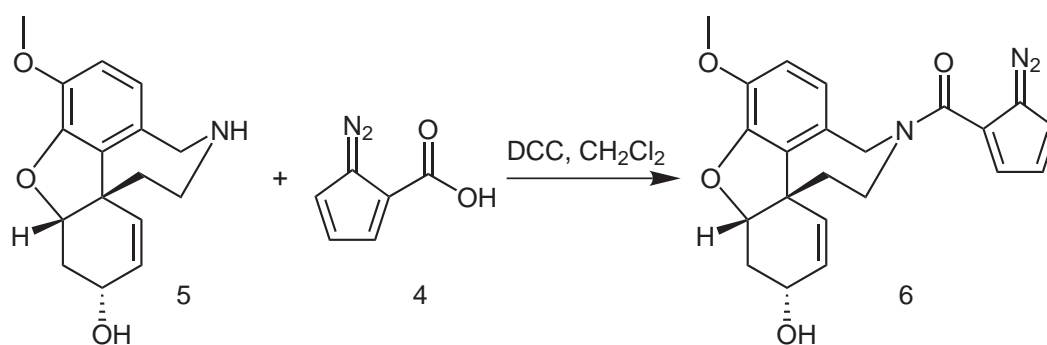


Fig. 3.2: Synthese von Photogalanthamin (6) durch Kupplung von (-)-11-De-methylgalanthamin (5) mit 5-Diazo-cyclopenta-1,3-dienecarbonsäure (4).

Man kann unter Verwendung von entsprechenden Filtern mit einem längerwelligeren und schmaleren Lichtspektrum bestrahlen und so spezifisch die photolabile Gruppe anregen. Bei den Arbeiten mit unmodifiziertem (-)-Galanthamin (1) mussten längere Bestrahlungszeiten und ein kurzwelligeres Spektrum in Kauf genommen werden, da das Absorptionsmaximum bei 288 nm liegt [48]. Mit einer photolabilen Gruppe kann man ein Label anbringen, ohne dass es zu deutlichen Schädigungen des Proteins kommt. Darüber hinaus

verfügt die photolabile Gruppe über eine ausgezeichnete Stabilität gegenüber Oxidation und Wärme.

Als Substitutionspunkt wurde der Stickstoff des (-)-Galanthamins (**1**) gewählt, da ausgehend von bisher bekannten APL-Liganden hier die größte Toleranz gegenüber Substituenten zu erwarten war [66]. Nach der literaturbekannten Demethylierung des Stickstoffs erfolgte [49, 67, 68], mit Hilfe des in der Peptidsynthese bewährten DCC, die Kupplung zum Amid. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung lässt sich eine Ausbeute von 45% Photogalanthamin (**6**) erzielen. Das Produkt zeigt, wie schon die photolabile Gruppe, eine ausgezeichnete Stabilität gegenüber Oxidation und Wärme. Bei lichtgeschützter Lagerung kann selbst nach zwei Jahren kein Abbau nachgewiesen werden.

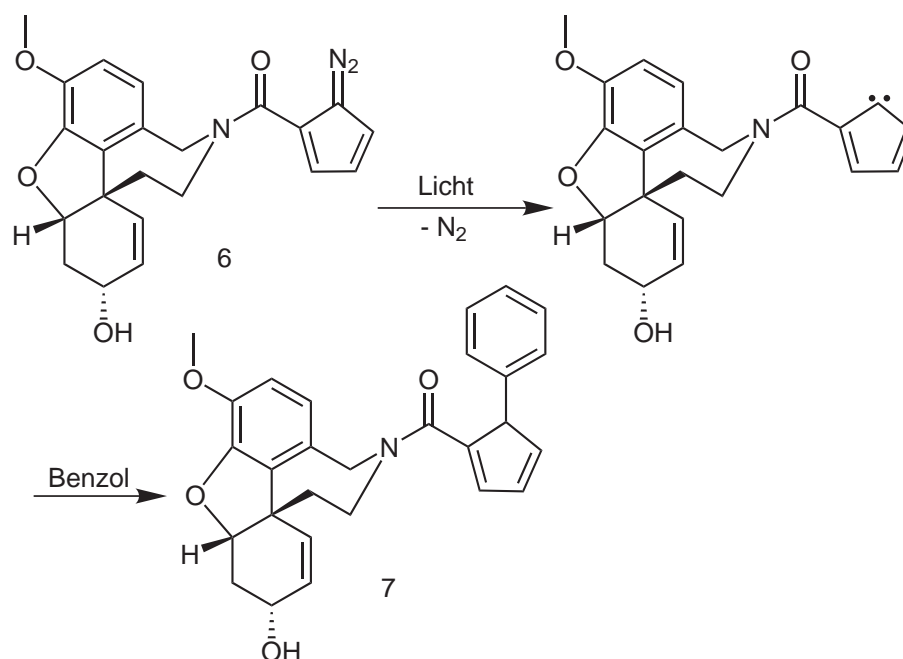


Fig. 3.3: Reaktion von Photogalanthamin(**6**) mit Benzol über eine photoinduzierte Carbenzwischenstufe.

3.1.2 chemische Eigenschaften

Photogalanthamin (**6**) löst sich hervorragend in allen polaren und den meisten unpolaren organischen Lösungsmitteln. In Wasser scheint keine Abhängigkeit der Löslichkeit vom pH-Wert vorzuliegen, womit es vermutlich in neutraler Form vorliegt. Es lassen sich wässrige Lösungen mit einer Konzentration von bis zu 2 mM erstellen.

Zur Überprüfung der Photosensitivität wurde Photogalanthamin (**6**) in Benzol gelöst und unterschiedlich lange mit UV-Licht von 265-360 nm bestrahlt (siehe Fig. 3.3) [69].

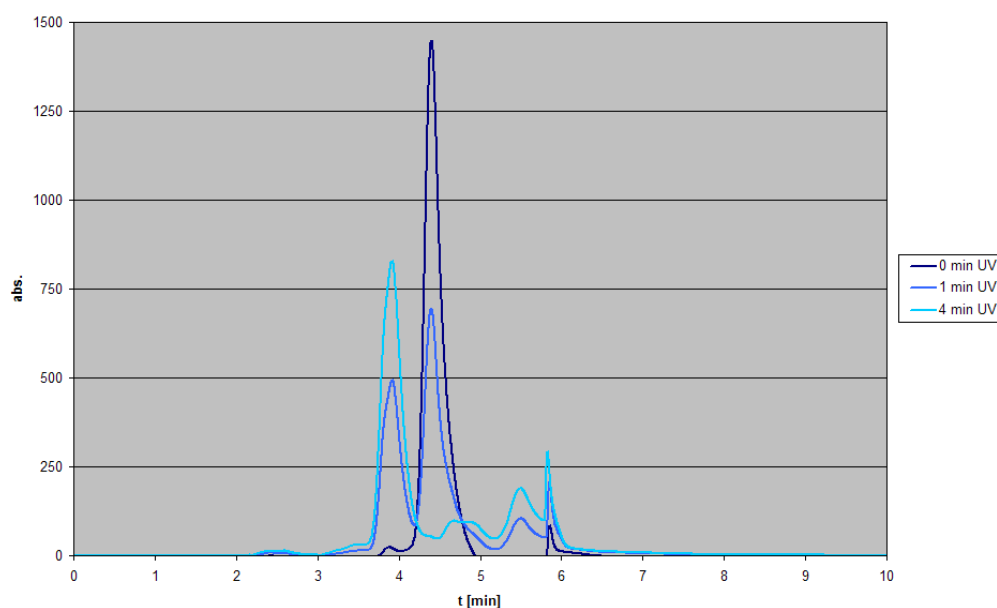


Fig. 3.4: Überlagerte Chromatogramme der Photoreaktion von Photogalanthamin (**6**) mit Benzol. Der Peak bei 4.5 min Retentionszeit entspricht **6**, der bei 3.8 min dem Reaktionsprodukt, 5-Phenyl-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure-11-demethylgalanthamin-amid (**7**).

Chromatogramme der entsprechenden Reaktionslösungen zeigen die ge-

wünschte Umsetzung (siehe Fig. 3.4), wo sich schon nach 1 min rund die Hälfte des photolabilen Substrats umgesetzt hat. Führt man ein analoges Experiment mit (-)-Galanthamin (**1**) durch, so kann nach 4 min eine Abnahme um rund 20% beobachtet werden, wobei sich aber kein spezifisches Produkt beobachten oder isolieren lässt. Bestrahlungszeiten, die über 3 min hinaus gehen führen jedoch schon zu massiven Schädigungen des Rezeptorproteins was weiterführende Analysen erschwert.

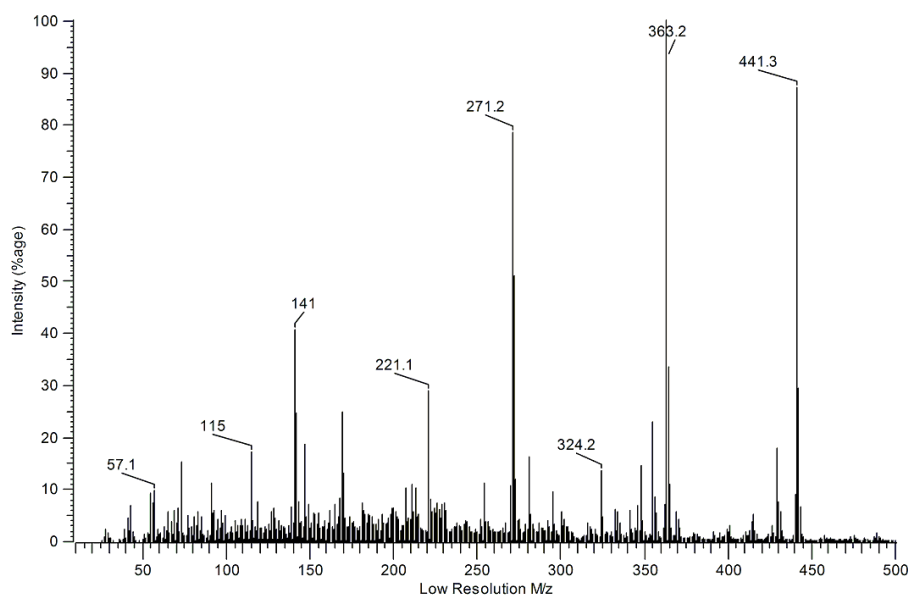


Fig. 3.5: Massenspektrum der Reaktion von Photogalanthamin (**6**) mit Benzol. Der Molpeak 441 M/z identifiziert eindeutig 5-Phenyl-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure-11-demethylgalanthamin-amid (**7**), das Produkt der Photoreaktion. Der Peak bei 363 M/z entspricht dem Carben, der reaktiven Zwischenstufe.

Die massenspektroskopische Untersuchung der jeweiligen Reaktionslösungen führte beim (-)-Galanthamin (**1**) zu keinem identifizierbaren Fragment, welches Rückschlüsse auf ein definiertes Reaktionsprodukt zulassen würde. Bei der Reaktion mit Photogalanthamin (**6**) hingegen konnte ein Fragment

mit 363 M/z dem Carben zugeordnet werden und der Molpeak bei 441 M/z identifiziert klar das erwartete Produkt, 5-Phenyl-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure-11-demethylgalanthamin-amid (**7**).

3.2 Isotopenaustauschmethoden

Selbst bei einer hohen Markierungseffizienz, wie bei Photogalanthamin (**6**), bleibt die Frage, wie man dieses Label im gebundenen Zustand nachweist. Ziel ist es, möglichst den spezifischen Bindungsort an eine einzige, oder zumindest wenige, Aminosäure nachzuweisen. Man benötigt somit eine spezielle Nachweisteknik für den Liganden. Hier bietet sich die Markierung mit radioaktiven Isotopen wie Tritium an, die einen Nachweis in subfemtomolaren Konzentrationen ermöglicht [70, 49].

3.2.1 Iridium katalysierter H/D Austausch

Die Möglichkeiten und Grenzen einer iridiumkatalysierten H/D Austauschreaktion wurden untersucht, um eine mögliche Isotopenmarkierung von Photogalanthamin (**6**) mit Tritium zu prüfen [71, 72]. Theoretisch ist ein Austausch am Aromaten, wie auch an der Cyclopentadienylgruppe von **6** denkbar.

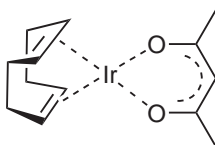


Fig. 3.6: Cyclooctadieniridium(I)acetylacetonat (**8**)

Die Möglichkeit mit Hilfe von Cyclooctadieniridium(I)acetylacetonat (**8**) Wasserstoffe an aromatischen und nicht aromatischen Doppelbindungen gegen Deuterium auszutauschen, wurde schon zuvor publiziert (siehe Fig. 3.6)

[73]. Der isotopische Wasserstoff wird in 1,4-Position zu einem dirigierenden Atom in das Molekül eingebracht, wo er normalerweise nicht mehr metabolisiert oder durch unkatalytischen Austausch verloren gehen kann.

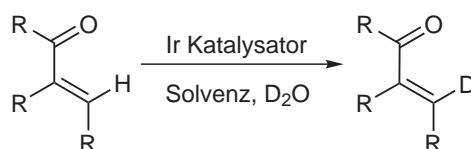


Fig. 3.7: Generelles Austauschmuster bei einem typischen Substrat

Neben verschiedenen Carbonylverbindungen ist es auch möglich, Säuren, Oxime und Amine, mit ausgesprochen guten Austauschraten, zu markieren. Auch wenn höhere Deuterierungsraten für spezifische Systeme mit anderen Katalysatoren publiziert wurden, stellt **8** einen guten universellen Katalysator dar [74, 75, 76, 77, 78, 79, 80].

Säuren. In aromatischen Systemen besitzen Carbonsäuregruppen die Möglichkeit den H/D-Austausch in *ortho*-Position zu dirigieren. 2-Methoxybenzoesäure (**9**) wurde als Hauptmodellsubstanz ausgewählt (siehe Tabelle 3.1), da an ihr ein hoher Deuterierungsgrad von 97.5% erzielt werden kann und sie sehr gut zu handhaben ist. Der Austausch findet in der nicht blockierten *ortho*-Position statt. Zum Vergleich, 4-Nitrobenzoesäure (**10**) unterläuft an beiden *ortho*-Positionen einen H/D-Austausch (2×99%), wohingegen bei 3-(Dimethylamino)benzoesäure (**11**) nur ein Austausch an der ungehinderten C-6 Position zu beobachten ist.

Carbonyle. Benzophenon (**12**) zeigt wie erwartet einen Austausch in allen vier *ortho*-Positionen. 2-Hydroxy-4-methoxyacetophenon (**13**) kann tautomerisieren und besitzt somit eine Keto- und eine Enolform. Deshalb findet ausschließlich ein Austausch in der Methylgruppe statt und nicht wie sonst

üblich in *ortho* zur Carbonylgruppe. Acetophenonoxim (**14**) kann nicht tautomerisieren und wird folglich ausschließlich in den beiden *ortho*-Positionen deuteriert. Es war nicht möglich 2-Methoxybenzaldehyd (**15**) zu labeln, da sich ein schwarzer Niederschlag bildete, der vermutlich auf eine Reduktion des Katalysators zu Ir⁰ zurückzuführen ist.

Amine und Alkohole. Benzylamine können durch Katalyse von **8** deuteriert werden, wohin gegen es bei Benzylalkoholen nicht gelingt. Ausgehend von 2-Methoxybenzylamin (**16**) als Testverbindung wurde ein Deuterierungsgrad von über 50% erzielt. Auf der anderen Seite war keine Deuterierung von 2-Methoxybenzylalkohol (**17**) möglich. Nach dem HSAB-Konzept ist zu vermuten, dass Amine wesentlich besser beim ersten Koordinationsschritt mit dem Iridium wechselwirken können als Alkohole, da sie deutlich weichere Basen sind (siehe Fig. 3.8).

nicht-aromatische Systeme. Unter der Annahme das eine Doppelbindung eines konjugierten Carbonylsystems in der gleichen Weise deuteriert werden kann wie der aromatische Ring in **9** [81], wurden eine Reihe von geeigneten Verbindungen untersucht. Zwei von ihnen waren *trans*-Crotonsäure (**18**) und Sorbinsäure (**19**). Bei Verbindung **18** kann ein Deuterierungsgrad von mehr als 60% erzielt werden, wohin gegen bei **19** überhaupt kein Austausch stattfindet. Es scheint als ob **19** Iridium in einer anderen Weise koordiniert und somit den normaler katalytischen Zyklus unterbindet. Weiter Untersuchungen wurden an Systemen ausgeführt, in denen die Doppelbindung zusätzlich in Konjugation zu einem aromatischen System steht, wie etwa bei *trans*-Zimtsäure **20** und *trans*-2,3-Dimethoxyzimtsäure **21**. In diesen Fällen werden die Doppelbindungen der Substrate ausschließlich in β -Position zur dirigierenden Gruppe deuteriert. Der Deuterierungsgrad betrug 17% bezie-

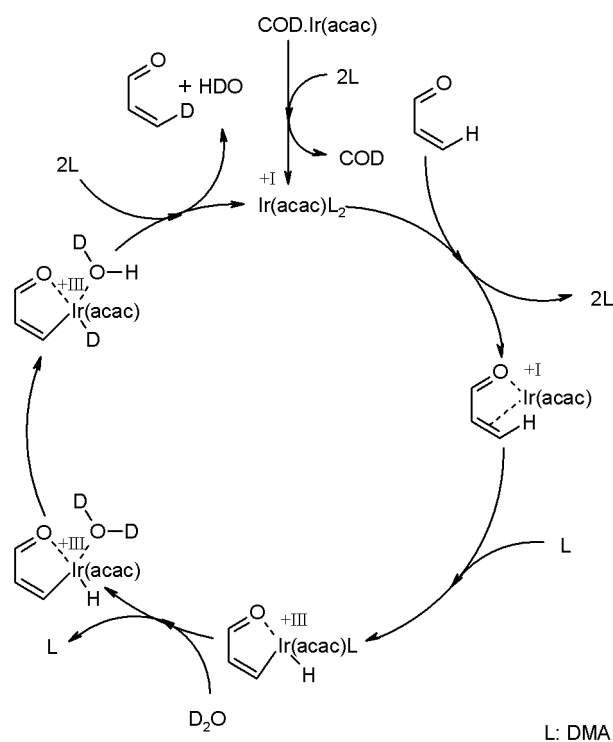


Fig. 3.8: Vereinfachter Mechanismus mit D_2O als Isotopenquelle

ungsweise 87%, was den elektronischen Einfluss der Methoxysubstituenten widerspiegelt.

Da sich α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen als günstige Gruppen für den H/D-Austausch herausstellten wurden weitere Verbindungen dieser Substanzklasse untersucht. Beispiele dieser Substrate beinhalten *trans*-1,2-Dibenzoylthylen (**22**) welches an multiplen Stellen deuteriert werden kann, während im Gegensatz 3-Benzoylacrylsäure (**23**) mehr als 75% Deuterierung zeigt, aber ausschließlich in β -Position zur Säuregruppe. Das Ergebnis im letzten Fall, deutet auf eine Dominanz von Säure- über Carbonylgruppen in Bezug auf die dirigierende Wirkung bei der Deuterierung hin.

Chelatringgröße. Unter der Annahme das **9** bei der Reaktion mit **8** einen fünfgliedrigen zyklischen Übergangszustand einnimmt [82, 83], wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, um zu sehen ob bei sechs- und siebengliedrigen Intermediaten auch eine Deuterierung möglich ist. 2-Methoxyphenyl-essigsäure (**24**) und 3,4-Dimethoxyphenylessigsäure (**25**) wurden verwendet um das sechsgliedrige Intermediat zu untersuchen, während 3-(2-Methoxyphenyl)-propionsäure (**26**) Verwendung fand, um den siebengliedrigen Übergangszustand näher zu betrachten. Die Ergebnisse zeigen keinerlei nachweisbare Deuterierung, weder beim sechs- noch siebengliedrigen System.

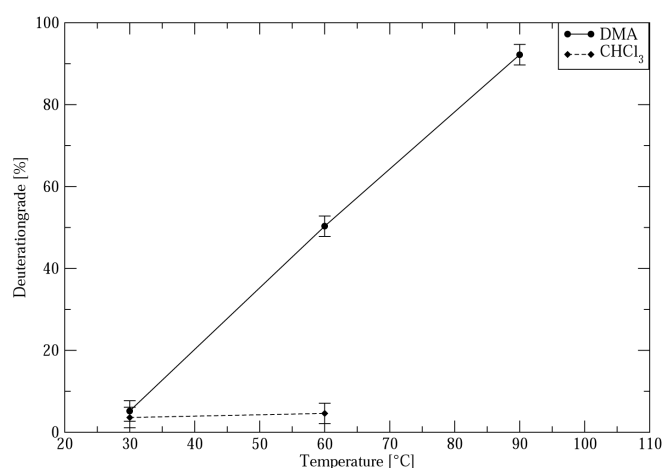


Fig. 3.9: Einfluss von Temperatur und Lösungsmittel auf den Deuterierungsgrad von 2-Methoxybenzoesäure (**9**)

Temperatur und Lösungsmittel. Fig. 3.9 zeigt den Deuterierungsgrad von **9** bei verschiedenen Temperaturen in DMA und CHCl₃. Unter ansonsten gleichen Bedingungen ist die Deuterierungsrate direkt proportional zur Tem-

peratur. Dieser Effekt ist besonders deutlich wenn DMA als Lösungsmittel verwendet wird. Der Deuterierungsgrad in CHCl_3 bleibt bei sonst gleichen Bedingungen bei etwa 5%, auch wenn hier ebenfalls eine leichte Temperaturabhängigkeit festzustellen ist. Diese Werte zeigen, dass das Lösungsmittel eine wichtige Rolle im Mechanismus des Austauschs spielt und daher bestimmte, einem Liganden ähnliche Eigenschaften besitzen sollte, neben der Tatsache das es polar und nicht protisch sein muss.

Ein Austausch eines Lösungsmittelwasserstoffs durch D_2O kann im Fall von DMA ausgeschlossen werden, da sich in den entsprechenden Experimenten hohe Deuterierungsraten zeigen. Beim CHCl_3 kann dies jedoch die Ursache für die niedrige Rate von weniger als 5% sein, auch wenn anzunehmen ist, das eher die geringe Koordinationsfähigkeit des CHCl_3 der Grund ist.

DMA ist das Lösungsmittel der Wahl, da seine günstige Struktur ermöglicht, als Ligand zu fungieren und mit dem Iridiumatom zu wechselwirken. Dieses erzeugt die richtige elektronische Umgebung, was eine Austauschreaktion erst möglich macht.

DMF ist aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum DMA ein weiteres geeignetes Lösungsmittel und kann sich auf die gleiche Art und Weise an der Reaktion beteiligen. Vom praktischen Standpunkt her ist aber DMA zu bevorzugen, da die aromatische Region in seinem NMR Spektrum frei von Resonanzen ist, die mit dem Produktspektrum überlagern könnten [74].

Reaktionszeit. Der Deuterierungsgrad steigt kontinuierlich mit wachsender Reaktionsdauer an. Für **9** ist das Gleichgewicht nach rund zwei Stunden erreicht bei einem Deuterierungsgrad von $97 \pm 1\%$ (siehe Fig. 3.10). Es zeigt sich, dass der Deuterierungsgrad lediglich eine Funktion der Zeit und des angebotenen isotopischen Verhältnisses ist. In einigen exemplarischen Versu-

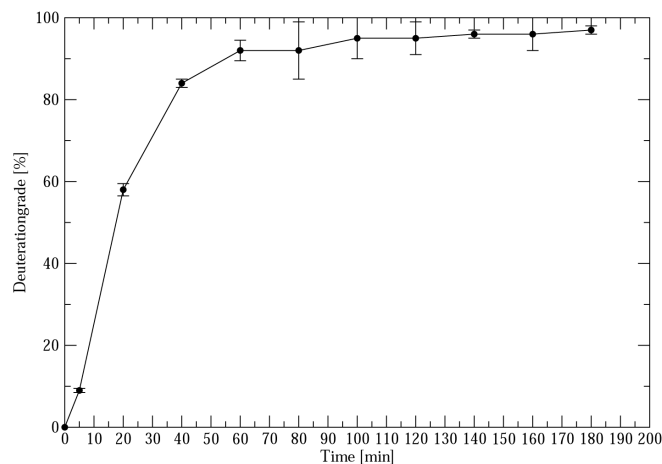


Fig. 3.10: Einfluss der Reaktionsdauer auf die Deuterierung von 2-Methoxybenzoesäure (**9**)

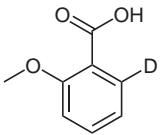
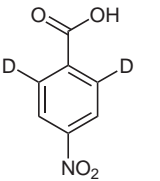
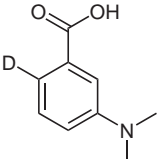
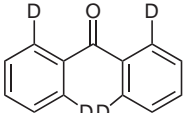
chen, auch mit weniger aktiven Verbindungen, konnte durch Erhöhung der Reaktionsdauer ein praktisch quantitativer H/D-Austausch erreicht werden. Zum Beispiel zeigt **14** nach drei Stunden lediglich $2 \times 12.5\%$ Austausch in *ortho*-Position zum Oxim, während nach 48 h $2 \times 82 \pm 5\%$ erreicht werden.

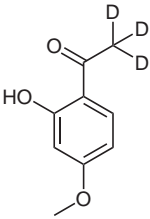
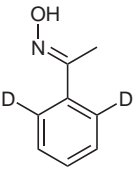
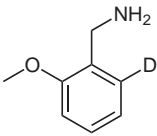
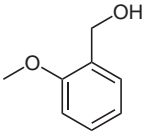
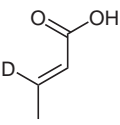
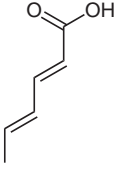
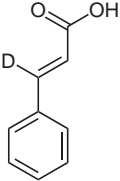
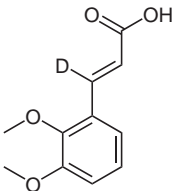
Mechanismus. Der Lösungsmiteleinfluss auf die gesamte Austauschreaktion gibt einen starken Hinweis, dass das Cyclopentadien durch ein Solvenzmolekül, wie DMA, ersetzt wird, um die tatsächlich katalytisch aktive Verbindung zu bilden. Auch sind aktive Ir^I -DMA-Komplexe aus der Literatur bekannt und werden *in situ* als katalytische Intermediate erzeugt [84]. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Berichten über partiell deuteriertes Cyclooctadien, wenn Deuteriumgas als Isotopenquelle eingesetzt wird [75].

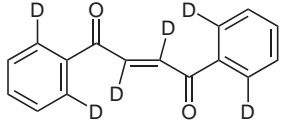
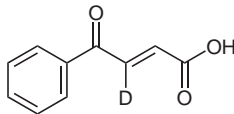
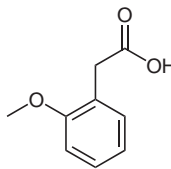
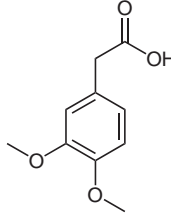
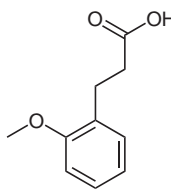
Wie in Fig. 3.8 dargestellt wird, schiebt sich, nach der ersten Koordinie-

rung des Substrats, Iridium in die C-H Bindung ein. Dies kann formell als oxidative Addition beschrieben werden. Nachfolgend, mit der Koordination des D₂O findet der eigentliche Austausch statt. Mit der reduktiven Eliminierung werden die Substrate freigesetzt. Dieser hier vorgeschlagene Mechanismus berücksichtigt die bevorzugt quadratisch-planare Koordinationssphäre von Ir^I und die bevorzugt oktaedrische Koordination von Ir^{III}.

Analytik. Der Ausdruck Deuterierungsgrad wird benutzt um die Menge des eingebrachten Deuteriums pro möglicher Position anzugeben. Wenn ein Wert von 0% angegeben wird, hat gar kein Austausch stattgefunden, und bei 100% ist sämtlicher Wasserstoff in dieser Position durch Deuterium ersetzt worden. Wenn mehrere Austauschpositionen möglich sind werden separate Werte für jede Position angegeben.

Eintrag	Produkt	Deuterierung	Daten
9		97.5%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 4.06 \text{ (s, 3 H)}, 7.10 \text{ (m, 2 H)}, 7.56 \text{ (t, 1 H)}; m/z \text{ (EI)} = 153 \text{ (M}^{+\cdot}\text{)}$
10		2×99%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 8.35 \text{ (s, 2 H)}; m/z \text{ (EI)} = 169 \text{ (M}^{+\cdot}\text{)}$
11		45% nur in Position 6, Position 2 ist durch die Dimethylaminogruppe gehindert	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 3.05 \text{ (s, 6 H)}, 7.02 \text{ (d, 1 H)}, 7.36 \text{ (m, 1 H)}, 7.52 \text{ (m, 1.55 H)}; \delta_{igd}(\text{CD}_3\text{COCD}_3) = 117.25 \text{ (t, 0.47)}, 117.86 \text{ (s, 1.00)}, 129.24 \text{ (s, 0.65)}, 129.36 \text{ (s, 0.82)}, 131.51 \text{ (s, 0.62)}, 131.58 \text{ (s, 0.80)}$
12		4×5%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 7.52 \text{ (m, 6 H)}, 7.81 \text{ (m, 3.8 H)}$

Eintrag	Produkt	Deuterierung	Daten
13		3×99% an der Methylgruppe, kein Austausch am Ring	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 3.86$ (s, 3 H), 6.34 (m, 2 H), 7.57 (d, 1 H), 12.69 (s, 1 H)
14		2×12.5% am Ring nach 3 h, die Methylgruppe bleibt unmarkiert	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 2.25$ (s, 3 H), 7.37 (m, 3 H), 7.68 (m, 1.75 H)
16		61%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 2.68$ (br, 2 H), 3.87 (s, 3 H), 4.41 (d, 2 H), 6.96 (m, 2 H), 7.22 (t, 1 H), 7.39 (m, 0.39 H)
17		0%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 3.84$ (s, 3 H), 4.70 (s, 2 H), 6.95 (m, 2 H), 7.25 (t, 1 H), 7.46 (d, 1 H)
18		69% nach 4 h	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 2.10$ (br, 3 H), 5.86 (br, 1 H), 6.96 (m, 0.31 H); $\delta_{igd}(\text{CD}_3\text{COCD}_3) = 16.9$ (s, 1.27), 17.1 (s, 0.98), 122.8 (s, 1.22), 122.9 (s, 0.98), 144.0 (t, 1.14), 144.3 (s, 1.00)
19		0% nach 4 h	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 1.92$ (s, 3 H), 5.82 (d, 1 H), 6.27 (m, 2 H), 7.53 (m, 1 H)
20		17%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 6.58$ (d, 1 H), 7.45 (m, 3 H), 7.69 (m, 2.83 H)
21		75%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 3.91$ (s, 6 H), 6.53 (m, 1 H), 7.14 (m, 3 H), 8.09 (d, 0.25 H); $\delta_{igd}(\text{CD}_3\text{COCD}_3) = 118.88$ (s, 3.48), 118.99 (s, 1.00), 128.31 (s, 3.16), 128.39 (s, 1.00), 140.85 (t, 3.17), 141.15 (s, 1.00)

Eintrag	Produkt	Deuterierung	Daten
22		2×7.5% an der Doppelbindung und weitere 15% an Ringkohlenstoffen ohne klares Muster	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 7.71 \text{ (m, 6 H)}, 8.02 \text{ (s, 1.85 H)}, 8.15 \text{ (m, 4 H)}$; m/z (EI) = 236 (C ₁₆ H ₁₂ O ₂ 70%), 238 (C ₁₆ H ₁₀ D ₂ 15%)
23		75% ausschließlich an der Doppelbindung	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 6.93 \text{ (m, 1 H)}, 7.62 \text{ (m, 3 H)}, 8.04 \text{ (m, 2.25 H)}$
24		0%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 3.63 \text{ (s, 2 H)}, 3.84 \text{ (s, 3 H)}, 6.96 \text{ (m, 2 H)}, 7.27 \text{ (m, 2 H)}$
25		0%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 3.33 \text{ (s, 2 H)}, 3.64 \text{ (m, 6 H)}, 6.64 \text{ (m, 3 H)}$
26		0%	$\delta_H(\text{CDCl}_3) = 2.59 \text{ (t, 2 H)}, 2.93 \text{ (t, 2 H)}, 3.87 \text{ (s, 3 H)}, 6.94 \text{ (m, 2 H)}, 7.23 \text{ (m, 2 H)}$

Tab. 3.1: Deuterierte Verbindungen und zugehörige Messdaten. Die Reaktionen wurden bei 90 °C für 2 h in DMA und D₂O ausgeführt, mit einem Katalysator-Substrat Verhältnis von 1:25. Abweichungen von diesem Standard sind in der Tabelle vermerkt

Für einfache Systeme reichten normale ¹H-NMR Techniken aus, um die Austauschpositionen und Deuterierungsgrade aus den entsprechenden Integralen zu bestimmen. Es erwies sich als außerordentlich vorteilhaft, Verbindungen zu verwenden, die zum Beispiel über eine Methyl- oder Methoxy-

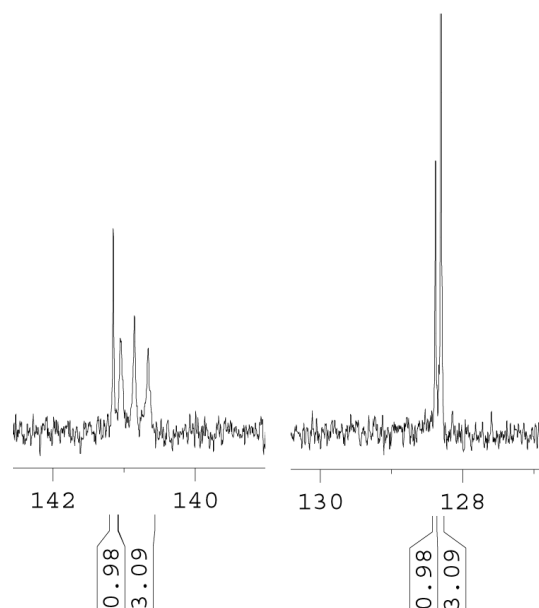


Fig. 3.11: Repräsentatives C-D (links) und C-H (rechts) Kupplungsmuster im *igd*-Spektrum der partiell deuterierten *trans*-2,3-Dimethoxyzimtsäure (**21**) mit entsprechenden Integralen.

gruppe verfügen, die man als interne Standards verwenden kann [76]. Die Ergebnisse wurden zum größtem Teil massenspektroskopisch verifiziert, was immer eine sehr gute Übereinstimmung zeigte.

Für komplexere Systeme wurden *inverse gated decoupled* ^{13}C -NMR Spektren aufgenommen. Diese integrierbaren Carbonspektren erlauben durch das charakteristische Kupplungsmuster eine klare Zuordnung der Deuterierungsposition. Eine normale C-D Kopplung zeigt sich als Triplet, C-H Kopplung hingegen bleibt ein Singulet (siehe Fig. 3.11). Ihre Integrale reflektieren den Deuterierungsgrad sehr genau. Die Resultate können sogar noch verbessert werden, da die Signale benachbarte Kohlenstoffe ebenfalls aufsplitten, und somit für die Auswertung herangezogen werden können.

Isotopenquelle. Auf Grund der aufwendigeren praktischen Handhabung von D_2 -Gas wurden fast alle Experimente mit D_2O als Isotopenquelle ausgeführt. Um diese Technik jedoch für das Tritiumlabelling von APL zu adaptieren muss eine geeignete Radioaktivitätsquelle verwendet werden. Das extrem hohe Risiko beim Umgang mit tritiiertem Wasser macht seine Anwendung in Standardverfahren fast unmöglich [82, 85]. Folglich war es notwendig das Katalysatorsystem mit Deuteriumgas und Verbindung **9** zu testen. Es konnte ein Deuterierungsgrad von 45% erzielt werden, aber überraschenderweise in Position C-4, *para* zur Säure- und *meta* zur Methoxygruppe (siehe Fig. 3.12).

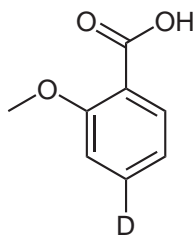


Fig. 3.12: Mit D_2 -Gas, anstatt von D_2O als Isotopenquelle, zeigt 2-Methoxybenzoesäure (**9**) einen Austausch in *para* zur Säure- und *meta* zur Methoxygruppe und keinerlei Austausch in *ortho* zur Carbonsäuregruppe.

Im Gegensatz zur Austauschreaktion mit D_2O , konnte ein Niederschlag von metallischem Iridium beobachtet werden. Dies stimmt mit Beobachtungen von Hickey et. al. überein [86], der ebenfalls von einem Niederschlag berichtet, als er 4-Aminobenzoesäure mit D_2 markierte, in *meta*, anstatt wie erwartet in *ortho*. Andere kürzlich erschienene Publikationen beschreiben ein vergleichbares Austauschmuster bei Naphthyl- und Phenylverbindungen in der Gegenwart von Ir^{III} -Katalysatoren und Deuteriumgas [87, 88]. Es ist anzunehmen, dass Deuteriumgas Acetylaceton reduzieren kann und so eine aktive Ir^{III} -Spezies gebildet wird, welche Austauschreaktionen in anderen

Positionen, als denen mit D₂O, ermöglicht. Es scheint als ob nur elektronische Effekte im aromatischen Ring relevant für diesen Typ der Austauschreaktion sind. So gibt es auch keine Hinweise darauf, dass dirigierende Gruppen in den Substraten irgendeinen Einfluss haben.

APL. Das Screening einer Reihe von Verbindungen hat eindeutig gezeigt, dass der verwendete Iridiumkatalysator die Fähigkeit besitzt den H/D-Austausch in diversen Substanzklassen zu katalysieren. Dies beinhaltet ungesättigte Carbonsäuren, Ketone und Amine deren an benachbarten Doppelbindungen befindliche Wasserstoffe ausgetauscht werden können. Komplex **8** katalysiert die Deuterierung in einer 1,4-Relation zu einer dirigierenden Gruppe über einen fünfgliedrigen Übergangszustand, vorausgesetzt es gibt keine sterische Behinderung durch andere Gruppen.

Leider ist diese Methode für einen spezifischen Austausch von Aromatenwasserstoffen an (-)-Galanthamin (**1**), (-)-Codein (**27**) oder ihren Derivaten nicht anwendbar, da keine dirigierende Gruppe in 1,4-Relation zu einer Doppelbindung vorhanden ist. Eine Markierung von 5-Diazo-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure (**4**) sollte möglich sein, auch wenn keine Erfahrungen mit einem Cyclopentadiensystem vorliegen.

3.2.2 Isotopenmarkierung durch Carbamatreduktion

Die Verwendung von photolabilen Gruppen ist für die Identifizierung von Bindungsstellen von großem Vorteil, aber es kann, gerade in Bezug auf die Nachweisempfindlichkeit, notwendig sein, eine Isotopenmarkierung an einem Molekül anzubringen [89]. Für die Evaluierung einer geeigneten Synthesestrategie wurde (-)-Codein (**27**) als Basis ausgewählt [90]. Zum einen zeigt es selbst gute APL-Aktivität (siehe Fig. 6.2), besitzt aber auch eine gewis-

se strukturelle Ähnlichkeit zu (-)-Galanthamin (**1**), so dass die Resultate in einem gewissen Rahmen übertragbar sind.

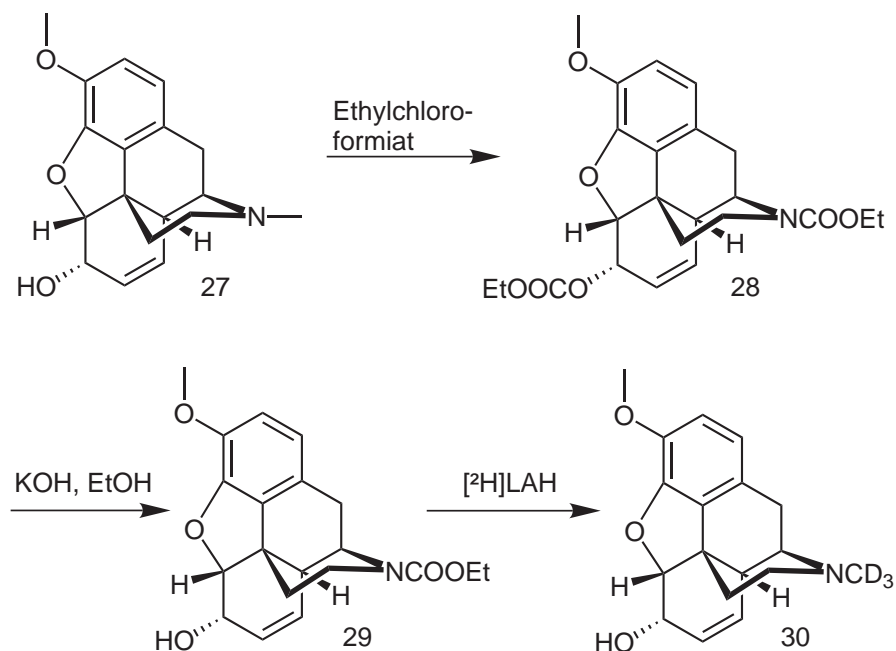


Fig. 3.13: Synthese von (-)-11-[²H]-Codein (**30**)

Bei der Entwicklung jeder Radiosynthese gilt es zwei Ziele zu verfolgen: 1. Erzielung hoher spezifischer Aktivität. 2. Möglichst späte und einfache Einbringung des Isotops. Es wurde die N-Methylgruppe als Markierungspunkt anvisiert, da sie über einfache Syntheseschritte ausgetauscht werden kann, aber eine gute Stabilität gegen Metabolisierung und Hydrolyse erwarten lässt [91]. Eine Reaktion des demethylierten Substrates mit isotopenmarkierten Methyljodid würde alle Anforderungen erfüllen und wäre darüber hinaus kosteneffizient. Bei den Vorversuchen stellte sich heraus, dass die Demethylierung über die Hydrolyse von Codeincarbat (**29**) keine akzeptable Lösung darstellt, da nur niedrige Ausbeuten erzielt werden können [92]. Statt dessen ist es möglich, das einfacher zugängliche Carbamat, unter Verwendung von LAH, vollständig zu reduzieren (siehe Fig. 3.13). Da entsprechende Hy-

dride auch als Deuterid und Tritid erhältlich sind, die gut zu handhaben sind, ergibt sich eine einfache und direkte Synthese (siehe Fig. 3.13).

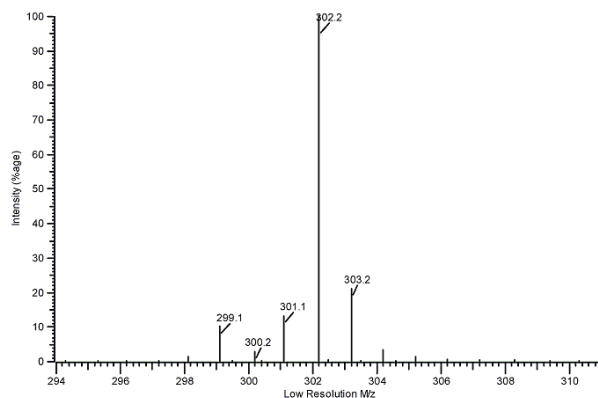


Fig. 3.14: Molpeakregion des Massenspektrums von (-)-11- ^{13}C -Codein (**30**)

Da an der N-Methylgruppe prinzipiell drei Wasserstoffe austauschbar sind, musste massenspektroskopisch die relative Isotopenverteilung ermittelt werden (siehe Fig. 3.14). Bei der Synthese von (-)-11- ^{13}C -Codein (**30**) ließ sich die in Tabelle 3.2 aufgeführte Isotopenverteilung erreichen.

	relative Häufigkeit
undeutert	8.07%
monodeutert	0.61%
dideutert	10.38%
trideutert	80.93%

Tab. 3.2: Deuterierungsgrad von (-)-11- ^{13}C -Codein (**30**)

Bei mit Tritium markierten Radioliganden sind spezifische Aktivitäten in der Größenordnung von 25 Ci/mmol wünschenswert. Das erzielte Isotopenverhältnis würde bei einer Markierung mit Tritium einer spezifischen Radioaktivität von 76.34 Ci/mmol entsprechen. Bei derartig hohen Aktivitäten

müsste man jedoch eine Isotopenverdünnung bei der Tritiierung anstreben, damit das Syntheseprodukt nicht vorzeitig durch Radiolyse geschädigt wird.

Aufgrund der Risiken beim Umgang mit radioaktiven Material und der damit verbundenen Kosten, wurde die Isotopenmarkierung von APL's zurückgestellt. Es besteht Grund zur Annahme, dass es möglich ist, über einen ausschließlich massenspektroskopischen Ansatz, die Bindungsstelle der APL am nAChR zu identifizieren.

4. ACETYLCHOLINESTERASE

4.1 *Inhibierung AChE*

Um sicherzustellen, dass Photogalanthamin (**6**) nicht nur im Modellsystem die gewünschten Eigenschaften besitzt (siehe Fig. 3.3), sondern auch im tatsächlichen biochemischen Experiment, wurden eine Reihe von Inhibierungstests an der AChE durchgeführt [1].

Zunächst wurde überprüft, ob überhaupt eine Inhibierung der AChE gegeben ist. Hierzu wurde ein sogenannter Ellmantest durchgeführt, bei dem die Spaltung von Acetylthiocholin (ASCh) durch die AChE photometrisch über eine Farbreaktion verfolgt werden kann [93]. In Gegenwart eines Inhibitors wie **6** ist die Spaltungsgeschwindigkeit deutlich herabgesetzt.

Anschließend wurde qualitativ die Konkurrenz mit bekannten Esteraseinhibitoren wie Galanthamin (**1**) und Physostigmine (**31**) überprüft. Dies gelang schon bei weniger als equimolaren Verhältnis von Kompetitor zu Inhibitor. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Photogalanthamin (**6**) die gleiche Bindungsstelle besetzt wie bisher bekannte Inhibitoren und die Affinität zur AChE als ähnlich bis etwas schwächer als die von (-)-Galanthamin (**1**) eingeschätzt werden kann.

Um die Affinität genauer zu bestimmen wurden Inhibierungen in einem Konzentrationsbereich von drei Dekaden durchgeführt. Aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf lässt sich der IC_{50} -Wert von $12.5 \pm 5.7 \mu M$ ermitteln. In ent-

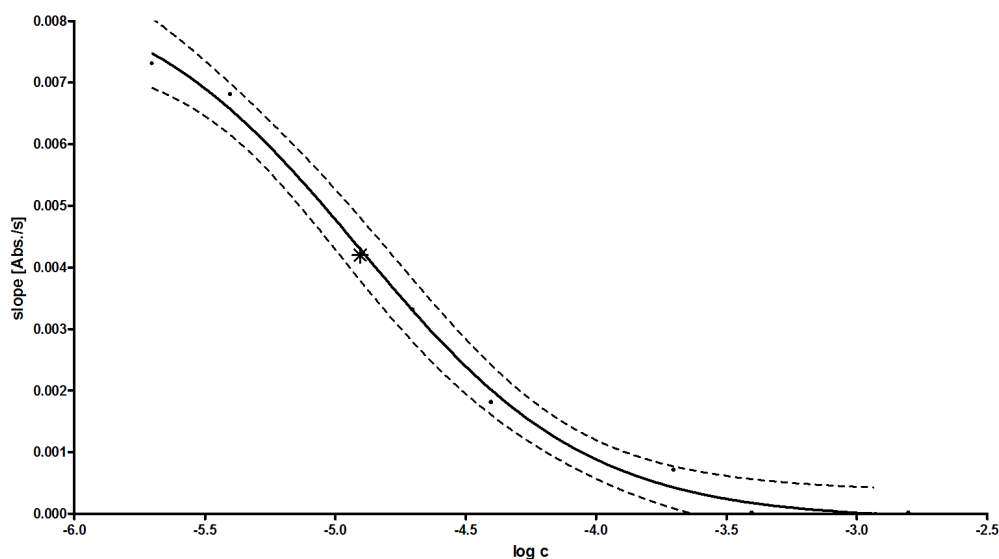


Fig. 4.1: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibierung von AChE mit Photogalanthamin (**6**). Es ergibt sich ein IC_{50} von $12.5 \pm 5.7 \mu M$ (siehe *). Die gestrichelten Linien geben das 95%-Konfidenzintervall an.

sprechenden Hill-Plots konnte keinerlei Abweichung von der Linearität festgestellt werden, so dass erwartungsgemäß von einer einzigen Bindungsstelle ausgegangen werden kann.

Ein weiterer Ansatz wurde verfolgt, um die erzielbare Markierungseffizienz zu bestimmen. Hierzu wurde eine Esteraseprobe mit Photogalanthamin (**6**) inkubiert und 2 Minuten mit UV-Licht (265-360 nm) bestrahlt. Als Vergleich diente eine Kontrollprobe, die bestrahlt wurde aber keinen Inhibitor enthielt und eine weitere Probe, die **6** enthielt aber nicht bestrahlt wurde. Alle Ansätze wurde völlig identisch behandelt und jeweils unter Verwendung eines Mikrozentrifugenfilters fünfmal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Esteraseaktivitäten ermittelt und miteinander verglichen. Die beiden Negativproben zeigten fast identische Aktivitäten, die sich nur unmerklich von völlig unbehandelten Referenzproben gleicher Konzentration unterscheiden.

Die markierte Probe hingegen zeigte eine um 72.7% verminderte Aktivität. Diese Abnahme ist direkt auf kovalent gebundenes Photogalanthamin (**6**) zurückzuführen.

4.2 Docking

Ziel einer Dockinguntersuchung ist es, einen korrekten Rezeptor-Liganden-Komplex vorherzusagen. Dies bezieht sich zum einen auf die geometrisch optimale Anordnung der beiden zueinander, wie auch der Berechnung einer Bindungsenergie, die die tatsächliche Affinität widerspiegelt [94]. Hier soll das Bindungsverhalten von Inhibitoren der AChE studiert werden.

4.2.1 Positionierung

Es gibt so zahlreiche Positionierungsalgorithmen wie Dockingprogramme, die sich alle in Geschwindigkeit und Güte der Ergebnisse unterscheiden. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde das MOE Docking Tool¹ mit der Alpha PMI Methode verwendet. Sie gliedert sich in zwei Teile: Zunächst wird der zu dockende Ligand einer Konformationsanalyse unterzogen. Die erzeugten Strukturen werden minimiert und die ungünstigen verworfen. Als zweiter Schritt schließt sich die Positionierung der Konformere an. Bei der Alpha PMI Methode werden Positionierungen erzeugt, indem das Hauptträgheitsmoment der Ligandenkonformation an zufällig in der Bindungstasche erzeugten Alphasphären ausgerichtet wird. Eine Alphasphäre ist ein virtueller Bereich, in dem ein Teil eines Liganden zu liegen kommen kann, relativ zu einer funktionellen Gruppe des Rezeptors, die einen Beitrag zur Bindung leisten kann. Zum Beispiel kann eine Hydroxygruppe im Liganden mit einer

¹ MOE - Molecular Operating Environment <http://www.chemcomp.com>

Carbonylgruppe im Rezeptor eine Wasserstoffbrücke ausbilden. Die Bereiche in denen sich die Hydroxygruppe befinden muss, damit es zu einer Bindung kommt, werden durch die Alphaspähre beschrieben. Diese Methode ist besonders für enge Bindungstaschen geeignet. Sie ist relativ schnell und der zu durchsuchende Konformationsraum deutlich verkleinert [95].

4.2.2 Score

Die erzeugten Ligand-Rezeptor-Komplexe müssen anhand ihrer Wechselwirkungsenergie bewertet werden [96]. Hierbei wird der Enthalpieanteil an der freien Bindungsenergie anhand einer linearen Funktion abgeschätzt.

$$G = C_{hb}f_{hb} + C_{ion}f_{ion} + C_{hh}f_{hh} + C_{hp}f_{hp} + C_{aa}f_{aa} \quad (4.1)$$

Die f -Terme berücksichtigen den Bruchteil der Atomkontakte des spezifischen Typs und die C -Koeffizienten gewichten den Beitrag der einzelnen Terme zur Abschätzung der Affinität.

Term	Beschreibung
hb	Wechselwirkung zwischen Wasserstoffbrücken-Donor-Akzeptor-Paaren. Grundsätzlich günstig.
ion	Ionische Wechselwirkung. Ein Coulomb-ähnlicher Term wird verwendet um die Wechselwirkung zwischen geladenen Gruppen zu evaluieren. Dieser Term kann die Bindungsaffinität begünstigen oder vermindern.
hh	Hydrophobe Wechselwirkungen. Grundsätzlich günstig.
hp	Wechselwirkungen zwischen hydrophoben und polaren Atomen. Grundsätzlich ungünstig.
aa	Eine Wechselwirkungen zwischen zwei beliebigen Atomen. Eher schwach und grundsätzlich günstig.

Die Bindungsaffinität in den einzelnen Ligand-Rezeptor-Konformeren wird berechnet und hiernach bewertet. Komplexe mit guter Energie werden behalten, diejenigen mit geringen Werten, verworfen [95].

Da, wie im Prinzip bei allen Dockingmethoden, kein explizites Wasser berücksichtigt wird, bleibt der Entropieanteil unberücksichtigt (siehe Gleichung 4.3).

4.2.3 RMSD

Damit die Übereinstimmung einer durch Docking erzielten Positionierung eines Liganden in seine Bindungstasche mit einer Referenz, wie einer Kristallstruktur, vorgenommen werden kann, bedarf es eines numerischen Maßes. Die *Root Mean Square Deviation* ist die Wurzel über die Summe der mittleren quadratischen Abweichungen.

$$RMSD = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(r_i - r'_i)^2}{N}} \quad (4.2)$$

Die Differenz zwischen den Koordinaten r_i der Atome beider zu vergleichenden Konformationen wird auf ihre Anzahl N bezogen. Gemeinhin gilt ein Wert von kleiner 1.0 als gute Übereinstimmung [14, 22, 96]. Dieser Wert ist jedoch relativ zu sehen, da gerade beim Vergleich sehr große Systeme signifikante Unterschiede einzelner Gruppen in der Gesamtmasse untergehen können. Eine weitere Schwierigkeit stellt der Vergleich chemischer Derivate miteinander dar. So kann es zum Beispiel sinnvoll sein die Position einer Aminogruppen in dem einen, mit einer Hydroxygruppe in einem anderen Molekül zu vergleichen. Die Zuordnung zusammengehöriger Paare ist dann aber nicht immer eindeutig. Von daher wurden lediglich die natürlichen Liganden in ihrer Position aus Dockingsimulationen, mit der entsprechenden Position aus Kristallstrukturen verglichen.

4.2.4 Bindungsenergie

Ob eine Dockingmethode eine zuverlässige Aussage liefert, misst sich neben der korrekten Positionierung an der vorhergesagten Bindungsenergie. Bei allen derzeitig verwendeten Methoden werden semiempirische Bewertungsfunktionen verwendet, die an experimentellen Daten kalibriert werden müssen [47, 97].

$$\begin{aligned}\Delta G &= \Delta H - T\Delta S \\ \Delta G &= -RT \ln K\end{aligned}\tag{4.3}$$

Hierzu muss aus einer experimentell bestimmte Bindungs- oder Inhibierungskonstante nach Gleichung 4.3 und 4.4 eine Bindungsenergie berechnet werden. Der mathematische Anteil hieran ist trivial, aber es stellt sich als quasi unmöglich heraus ein homogenes Set von experimentellen Affinitätskonstanten zusammen zu stellen.

$$K_i = IC_{50}/(1 + L/K_D)\tag{4.4}$$

Es zeigte sich leider, dass entweder die zu vergleichenden Liganden strukturell sehr verschieden sind oder nicht klar charakterisierte Bindungsstellen haben, beziehungsweise dass Genauigkeit und Art der Bestimmung der Affinitätskonstanten sehr uneinheitlich sind. So ist es durchaus möglich für den selben Rezeptor-Ligand-Komplex Werte zu finden, die sich um den Faktor 100 unterscheiden.

4.2.5 Predictive Index

Beim Docking ist die Frage der absoluten Bindungsenergie, der Frage der relativen Rangfolge nachgeordnet. Im Allgemeinen ist es von Interesse ob Ligand A eine höhere oder niedrigere Affinität als Ligand B oder C hat. Die

Genauigkeit der einzelnen Bindungsenergien spielt eine untergeordnete Rolle, da eine gewisse Streuung oder systematische Abweichung normalerweise akzeptiert werden kann, solange die Kernaussage nicht verfälscht wird.

Um diesen Aspekt zu quantifizieren wird der Predictive Index (PI) verwendet [98]. Für ein Set von experimentellen K_i oder IC_{50} Werten, den daraus resultierenden Bindungsenergien E_i und den ermittelten Dockingergebnissen P_i , gilt:

$$PI = \sum_{j>i} \sum_i w_{ij} \cdot C_{ij} / \sum_{j>i} \sum_i w_{ij} \quad (4.5)$$

mit

$$w_{ij} = |E_j - E_i| \quad (4.6)$$

und

$$C_{ij} = \begin{cases} 1 & \text{wenn } [E_j - E_i] / [P_j - P_i] < 0 \\ -1 & \text{wenn } [E_j - E_i] / [P_j - P_i] > 0 \\ 0 & \text{wenn } [P_j - P_i] = 0 \end{cases} \quad (4.7)$$

E_i und P_i sind die experimentellen und simulierten Bindungsenergien des Liganden i . Der Index bewegt sich zwischen -1 und +1, abhängig davon wie gut die Simulation die relative Rangfolge der experimentellen Daten wiedergibt. +1 bedeutet eine perfekte Vorhersage, -1 ergibt sich bei Prognosen die immer falsch sind und 0 bei komplett zufälligen Ergebnissen. Es ist zu beachten, dass die Funktion einen Gewichtungsfaktor w_{ij} beinhaltet, der nur von den Differenzen der experimentellen Werte abhängt. Dies reflektiert die Tatsache, dass eine gute Methode auch bei großen Unterschieden in der experimentellen Bindungsenergie eine zuverlässige Prognose machen sollte. Auf

der anderen Seite ergeben Änderungen, die kaum Unterschiede in den experimentellen Werten zeigen, nur einen kleinen Einfluss.

Hier gilt ganz allgemein, dass eine gewisse Streubreite im Referenzset sehr begrüßenswert ist, extreme Ausreißer, die sich in Struktur und Affinität deutlich unterscheiden, jedoch wenig hilfreich sind.

4.2.6 *Galanthamin in 1DX6 und 1QTI*

Für die Dockinguntersuchungen wurde das entsprechende Tool aus dem MOE Programmpaket verwendet. Zunächst musste seine Güte und Zuverlässigkeit verifiziert werden. Hierzu wurde als Testset die Bindung von (-)-Galanthamin (**1**) in ihre beiden nativen AChE Kristallstrukturen 1DX6 und 1QTI betrachtet. Da sich aus den Kristallstrukturen der Protonierungszustand am Stickstoff nicht eindeutig ablesen lässt, wurden die protonierte und unprotonierte Variante betrachtet. Da viele Programme Probleme damit haben eine gegebene Konformation am Stickstoff zu invertieren, in diesem Fall ob die N-Methylgruppe äquatorial oder axial steht, ist es nötig insgesamt vier Konformere zu docken [14, 47, 99].

Die Ergebnisse in Tabelle 4.1 zeigen, dass die äquatoriale und axiale Konformation beibehalten werden, die der Kristallstruktur entsprechende äquatoriale Konformation aber die besseren Energien und niedrigeren RMSD-Werte erhält. Es war nicht möglich ein Resultat im korrekten Bindungsmodus der äquatorialen ungeladenen Variante für 1DX6 zu erzielen, was die stochastischen Aspekte beim Docking widerspiegelt. Bei einem K_i -Wert von $0.23 \mu\text{M}$ ergibt sich nach Gleichung 4.3 für Galanthamin eine Bindungsenergie von -38.127 kJ/mol . Die Dockingresultate mit der unmodifizierten Scoringfunktion liegen somit tendenziell in der richtigen Größenordnung.

Galanthamin in 1DX6			
Konformer	E[kJ/mol]	RMSD [Å]	Platz
äq.	-	> 4	-
ax.	-26.31	0.9080	1
äq. (geladen)	-30.22	0.5399	1
ax. (geladen)	-27.12	0.8891	1

Galanthamin in 1QTI			
Konformer	E[kJ/mol]	RMSD [Å]	Platz
äq.	-27.57	0.5938	1
ax.	-22.15	1.0691	1
äq. (geladen)	-27.78	0.7903	1
ax. (geladen)	-23.23	1.0406	1

Tab. 4.1: Dockingresultate von Galanthamin in die AChE

4.3 Docking AChE

Um ein breiteres Set für Vergleiche zu haben, wurden 5 weitere Kristallstrukturen der AChE mit entsprechenden Inhibitoren ausgewählt. Sie zeichnen sich vor allen Dingen dadurch aus, dass für sie zuverlässige K_i bekannt sind [100, 15, 101]. Bei fast allen gelang es, teilweise mit überragender Genauigkeit, die native Kristallstruktur zu reproduzieren. In der folgenden Tabelle sind die Werte für den jeweils ersten Platz des jeweiligen Dockinglaufs angegeben. Bei 1VOT war der Komplex, der dem natürlichen entspricht auf Rang 3 platziert worden. Leider zeigen die Bindungsenergien ein weniger einheitliches Bild. Hier sind zum Teil deutliche Abweichungen von den experimentellen Werten festzustellen. Da die Scoring-Funktion des Docking-Tools

System	K_i [μM]	$E_{exp.}$ [kJ/mol]	$E_{est.}$ [kJ/mol]	RMSD [\AA]
1AX9	0.05	-41.933	-20.572	1.2740
1DX6	0.23	-38.127	-29.586	0.5577
1GPK	4.30	-30.822	-24.859	0.1615
1GPN	0.33	-37.226	-24.926	0.2819
1QTI	0.23	-38.127	-28.163	0.3418
1VOT	0.18	-38.738	-26.846	4.5169
2ACK	0.05	-41.933	-36.448	0.9299

Tab. 4.2: Dockingresultate verschiedener Inhibitoren in ihre nativen AChE Kristallstrukturen

von MOE nicht explizit auf das AChE-System kalibriert ist, wurden die Ergebnisse in einem Scatterplot aufgetragen (siehe Fig. 4.2), um eine etwaige systematische Verschiebung zu identifizieren. Es lässt sich aber kein Muster in dieser Auftragung der Bindungsenergien erkennen.

Bei der Berechnung des Predictive Index wird lediglich ein Wert von 0.36 erzielt. Da ein Wert von 0 einem völlig zufälligen Ergebnis und ein Wert von 1 einer absolut exakten Prognose entspricht, kann hier eine gewisse Tendenz bestätigt werden. Diese reicht aber nicht aus, um die Rangfolge der Inhibitoren in Bezug auf ihre Affinität zur AChE zu reproduzieren. Beim Docking eines unbekannten Inhibitors müssten bei der Energie ein Abweichung von bis zu 20 kJ/mol in Betracht gezogen werden. Dieser Fehler entspricht bei der Inhibierungskonstante dem Faktor 10000.

Dockingverfahren sind hervorragend geeignet um die korrekte Geometrie eines Rezeptor-Ligand-Komplexes vorherzusagen. Die Verfahren zur Berechnung der Bindungsaffinität sind aber aufgrund einer Reihe von Faktoren recht ungenau. Zu den wichtigsten zählt die unzureichende Berücksichtigung von

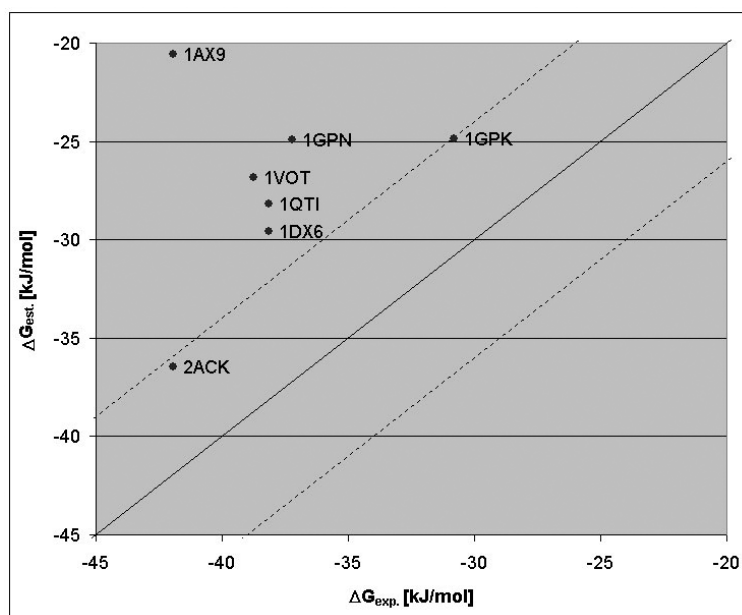


Fig. 4.2: Scatterplot der Dockingergebnisse von Inhibitoren in die AChE. Die berechneten Werte sind gegen die experimentellen Werte aufgetragen. Je dichter ein Wert an der Diagonalen ist, desto besser ist die Vorhersage.

Wasser bei der Stabilisierung des Komplexes, beziehungsweise seine Verdrängung aus der Bindungstasche durch den Liganden. Es wird somit eine ganze Reihe von Wechselwirkungen vernachlässigt und die Entropie des Bindevorgangs vollkommen außer acht gelassen. Des Weiteren wird bei der Positionierung des Liganden der Rezeptor starr gehalten, was massive Probleme aufwirft, wenn ein unbekannter Ligand in eine Kristallstruktur gedockt wird.

4.4 LIE AChE

Die Probleme bei der Bestimmung der freien Bindungsenergie für eine Serie von verschiedenen Liganden mit Dockingverfahren, ergab die Frage nach einer geeigneteren Methode [97, 102]. Bei der Ermittlung von Affinitäten nach der

Linear Interaction Energy (LIE) wird versucht sinnvolle Informationen über die Bindungsenergie aus Simulationen der physikalisch relevanten Zustände (frei und gebunden) des Liganden abzuleiten [103]. Die Idee hierbei ist, dass die absolute freie Bindungsenergie des Liganden als Änderung in seiner freien Energie betrachtet wird, wenn er aus der wässrigen Lösung (freier Zustand) in seine solvatisierte Bindungstasche (gebundener Zustand) überführt wird [104, 105].

$$\Delta G_{bind}(l) = \Delta G_{sol}^p(l) - \Delta G_{sol}^w(l) \quad (4.8)$$

Die Indizes 'p' und 'w' beziehen sich auf Protein (Rezeptor) beziehungsweise Wasser.

Die Solvatisierungsenergie des Liganden in einer gegebenen Umgebung kann als Transfer von der Gasphase in eben diese Umgebung angesehen werden. Solch ein Prozess gliedert sich formal in zwei Schritte: 1. Erzeugung einer Kavität 2. Berücksichtigung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Ligand und Umgebung. Die lineare Annäherung für die elektrostatische Komponente der Solvatisierungsenergie ΔG_{el}^i ($i = p$ oder w) kann somit wie folgt beschrieben werden.

$$\Delta G_{el}^i = \frac{1}{2} \{ \langle V_{l-s}^{el} \rangle_{on} + \langle V_{l-s}^{el} \rangle_{off} \} \quad (4.9)$$

Für die Berechnung der Mittelwerte werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Umgebung (l-s) virtuell an- oder ausgeschaltet (on oder off). Eine Vereinfachung der LIE-Methode ist die Vernachlässigung von $\langle V_{l-s}^{el} \rangle_{off}$, was sich bei wässrigen Systemen als sehr gute Annäherung herausstellt.

Es konnte in MD-Simulationen gezeigt werden, dass die mittlere van der Waals (Lennard-Jones) Wechselwirkung näherungsweise linear von der Größe

des Liganden, beziehungsweise seiner für Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche abhängt [103].

Werden beide Ansätze kombiniert, lässt sich folgende allgemeine Näherung für die Bestimmung der freien Bindungsenergie aufstellen.

$$\Delta G_{bind} = \alpha \Delta \langle V_{l-s}^{vdw} \rangle + \beta \Delta \langle V_{l-s}^{el} \rangle \quad (4.10)$$

Hier repräsentieren $\langle \rangle$ die Mittelwerte für die van der Waals (vdw) und elektrostatischen (el) Wechselwirkungen zwischen Ligand und Umgebung (l-s) aus MD-Simulationen, im entweder gebundenem oder freien Zustand. Mit den Δ wird die Differenz zwischen den Mittelwerten der beiden Zustände erfasst. Von daher werden zwei MD-Simulationen benötigt. Zum einen der Ligand in Lösung und zum anderen der Ligand gebunden an den voll solvatisierten Rezeptor.

Für die Qualität der Ergebnisse bei der Simulation mit GROMACS² spielt das Setup und die Güte der Kraftfeldparameter für Ligand, Solvent und Rezeptor eine entscheidende Rolle [106, 107]. Als Basis-Kraftfeld wurde das ffG43a1 verwendet und für das Wasser ein entsprechendes flexibles SPC-Modell [108, 109]. Die Liganden-Topologien wurden mit Hilfe des Dundee-PRODRG2-Servers³ erstellt und stimmen mit dem ffG43a1 überein. Die Protonierungszustände der Liganden entsprechen denen in freiem Wasser bei pH 7. Für alle Simulationen wurde derselbe Rezeptor verwendet, der im Wesentlichen auf der minimal modifizierten Kristallstruktur 1QTI basiert. In der Bindungstasche wurde das sogenannte *swinging gate* (PHE327) etwas beiseite geschoben, damit auch sperrigere Liganden Platz finden.

Die Gewichtungsfaktoren α und β werden anhand experimenteller Werte angepasst [110, 16, 111, 112, 15, 113, 114]. Es zeigt sich, ausgehend von

² <http://www.gromacs.org>

³ <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg>

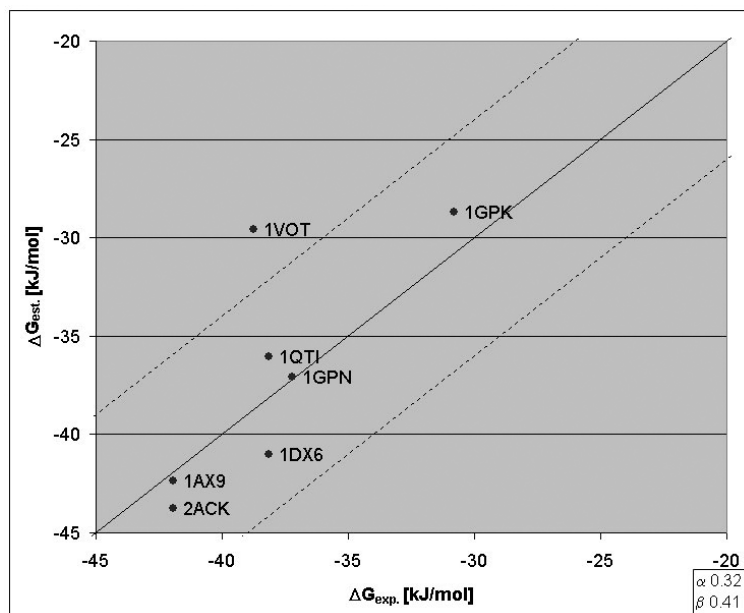


Fig. 4.3: Scatterplot der Simulationsergebnisse von Inhibitoren in der AChE mit der LIE-Methode. Fast alle Ergebnisse liegen in dem ± 6 kJ Toleranzintervall, was etwas einer Dekade bei den Affinitätskonstanten entspricht (gestrichelte Linien). Zur besseren Orientierung wurde die Bezeichnung der ursprünglichen Kristallstruktur verwendet.

Gleichung 4.9, dass $\beta = 0.5$ eine gute erste Annäherung darstellt. Mit einer multiplen linearen Regression werden die Parameter angepasst, bis eine optimale Übereinstimmung erzielt wird. Für die AChE ergeben sich $\alpha = 0.32$ und $\beta = 0.41$ (siehe Fig. 4.3). Die leichte Abweichung der Elektrostatik von der vereinfachten Theorie lässt sich vor allen Dingen auf die Topologie der Bindungstasche zurückführen (siehe Gleichung 4.9), da es sich um eine recht tiefe schmale Tasche handelt, die von hydrophoben Seitenketten flankiert ist [104].

Ein sehr wichtiger Aspekt, der sich gut am zeitlichen Verlauf der Bindungsenergie von Galanthamin zur AChE ablesen lässt (siehe Fig. 4.4), ist,

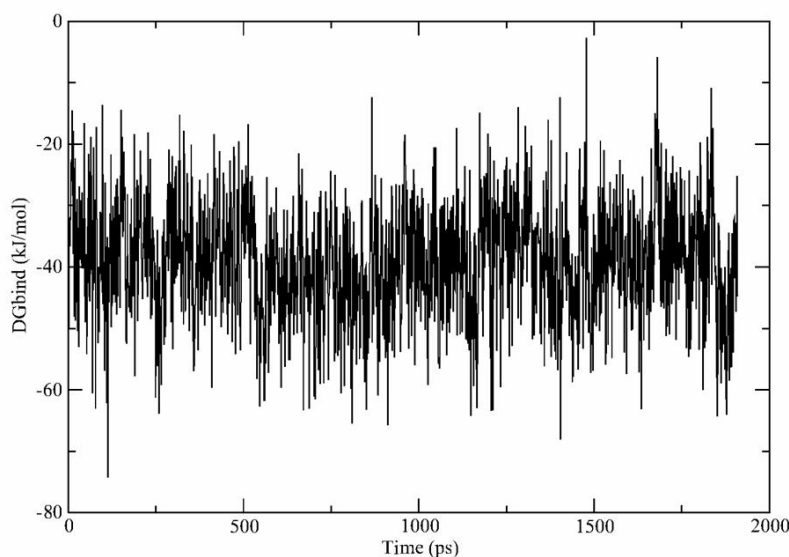


Fig. 4.4: Fluktuation der Bindungsenergie um ihren Mittelwert von 41 kJ/mol am Beispiel von Galanthamin in der AChE. Der Ligand kann sich in der Bindungstasche bewegen und verschiedene Bindungsmodi einnehmen.

dass es nicht nur einen Bindungsmodus gibt. Ein natürlicher Ligand fluktuiert in seiner Bindungstasche und nimmt hoch- und niedrigaffine Posen ein. Hierbei verhält sich die Bindungstasche nicht starr, sondern schmiegt sich an den Liganden an. Dies stellt gegenüber dem Docking einen immensen Vorteil dar, wenn Liganden, wie hier, nicht in ihrer nativen Kristallstruktur betrachtet werden. Nach einer kurzen Equilibrierungsphase kommt es zum so genannten *induced fit*, Ligand und Rezeptor haben sich aneinander angepasst.

Ermittelt man den PI für dieses Set von AChE Inhibitoren, auf die gleiche Weise wie beim Dockingexperiment, ergibt sich ein Wert von 0.92. Dies entspricht einer fast perfekten Voraussage der Bindungsaffinität.

Eine LIE-Simulation wurde auch mit Photogalanthamin (**6**) durchgeführt. Hierbei zeigte sich leider ein grundsätzliches Problem von auf Kraftfeldparametern basierten MD-Simulationen. Hochkonjugierte Systeme, die in verschiedenen Mesomerieformen dargestellt werden können, sind schwer mit statischen Parametern zu erfassen. In diesem Fall handelt es sich um die Diazocyclopentadiengruppe. Mit dem ffG43a1 Kraftfeld war es nicht möglich ein stabiles System aufzusetzen. Nur mit dem älteren ffgmx gelang es, eine leider nicht exakt vergleichbare, Simulation auszuführen. Es ergibt sich eine Bindungsenergie von -27.8 kJ/mol, die nur minimal von dem, aus dem IC₅₀-Wert von $12.5 \pm 5.7 \mu\text{M}$, resultierenden Erwartungswert von -28.16 μM abweicht.

4.5 LIE Trypsin

Um sicherzustellen, dass mit der LIE-Methode auch bei anderen Systemen die Bindungsaffinität korrekt prognostiziert werden kann, wurde ein weiteres Testset ausgewählt [103]. Bei Trypsin handelt es sich um eine Protease, also ein Enzym, das andere Proteine spezifisch zwischen bestimmten Aminosäuren zerschneidet. Die Inhibitoren, die diesen Vorgang blockieren, sind relativ klein und vom Benzylamintyp [115]. Das Setup wurde analog zu dem der AChE gewählt und als Basisrezeptor die Kristallstruktur 1TNG mit einer Auflösung von 1.8 Å verwendet.

Nach der Regression ergeben sich für $\alpha = 0.037$ und $\beta = 0.263$. Hieraus ist zu folgern, dass bei diesem System die van der Waals Wechselwirkungen nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen. Die Vorhersagequalität der Bindungsaffinitäten ist ähnlich der bei der AChE. Mit einem PI von 0.93 hat man ebenfalls eine fast perfekte Übereinstimmung.

Die LIE-Methode ist die Methode der Wahl wenn es um eine akkurate Prognose von Bindungsaffinitäten geht. Es muss aber hervorgehoben werden,

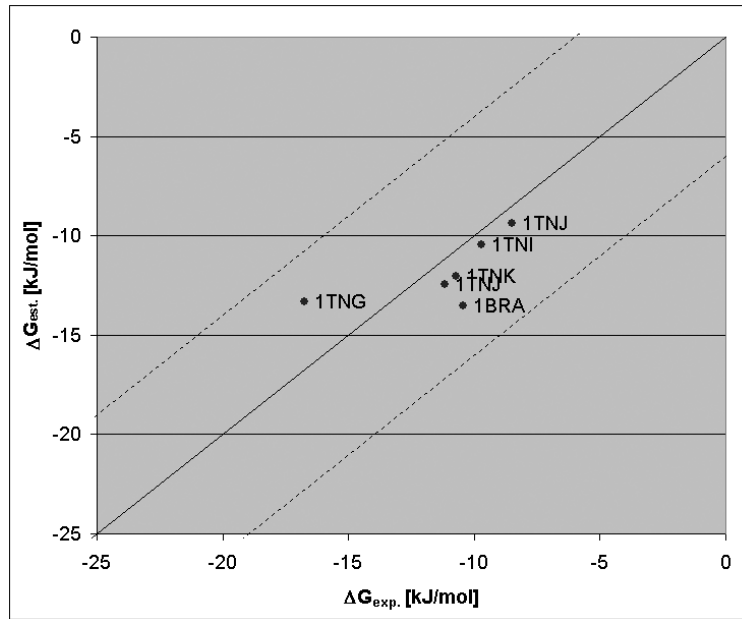


Fig. 4.5: Die Validierung der LIE-Methode auf Basis von GROMACS mit Trypsin als weiterem Testset zeigt ebenfalls eine hervorragende Übereinstimmung.

dass der Aufwand, im Vergleich zu einem klassischen Dockingexperiment, um ein vielfaches höher ist. Die Systemvorbereitung ist um einiges aufwendiger und die reine Simulationsdauer um mindestens den Faktor 1000 größer. Darüber hinaus müssen die einzelnen Simulationen mehrfach wiederholt werden, da es aufgrund der Komplexität der Systeme immer wieder zu Ausreißern kommen kann. Zuletzt benötigt man noch ein zuverlässiges Kalibrationsset an experimentellen Daten damit die systemabhängigen Koeffizienten in Gleichung 4.10 angepasst werden können.

5. ACETYLCHOLIN BINDENDES PROTEIN

Anhand des AChBP soll die dynamische Bewegung der Untereinheiten gegeneinander in Analogie zum extrazellulären Teil des nAChR studiert werden.

5.1 *essentielle Dynamik AChBP*

5.1.1 *PCA*

Das Ziel einer Principal Component Analysis (PCA) ist es die Dimensionalität eines komplexen Problems durch Transformation der Daten zu reduzieren [116]. Ein solches hochdimensionales Problem stellt die Bewegungen der Atome eines Proteins dar. Einige dieser atomaren Fluktuationen sind völlig zufällig und unabhängig voneinander, andere stehen in direkter Beziehung zueinander, da sie Teil einer globalen Bewegung sind. Jedes der N Atome eines Proteins wird für gewöhnlich in den klassischen drei Dimensionen xyz beschrieben. So ergeben sich $3N$ Koordinaten, die eine einzelne Konformation charakterisieren. Diese Konformation kann aber auch in einer einzigen Koordinate beschrieben werden, wenn man sich in einem $3N$ -dimensionalen Raum bewegt. Diese Transformation erlaubt es, eine Kovarianzmatrix für die atomaren Fluktuationen zu erstellen. Wird diese diagonalisiert, lassen sich Eigenvektoren mit entsprechenden Eigenwerten ermitteln. Die Eigenvektoren, die orthogonal zueinander stehen, spannen den hochdimensionalen Konformationsraum auf, in dem sich ein Protein bewegt [117]. Hierbei werden die

dominanten globalen Bewegungen durch wenige Eigenvektoren beschrieben. Ihre Eigenwerte sind Maß für die Amplitude der Bewegung.

5.1.2 Konformationsgeneration

Für jede der neun verschiedenen Kristallstrukturen des AChBP [19, 118], wobei teilweise mehr als ein Protein in der Einheitszelle abgebildet ist (1I9B mit HEPES (1×), 1UV6 mit Carbamylcholin (2×), 1UW6 mit Nicotin (4×) und 1UX2 mit HEPES (2×)), wurden mit Hilfe von CONCOORD¹ jeweils 1000 Konformere generiert, wobei auf die Berücksichtigung von Liganden und Kristallwasser verzichtet wurde [119]. Für jedes Ensemble wurde die Kovarianzmatrix der atomaren Fluktuationen separat erstellt. Ihre Diagonalisierung führt zu einem Set von Eigenvektoren, welche die essentiellen Bewegungen des AChBP beschreiben [120].

5.1.3 Eigenwerte und -vektoren

Aus dem Eigenwertplot lässt sich ableiten (siehe Fig. 5.1), das lediglich die ersten beiden Eigenvektoren eine signifikante Bewegung repräsentieren, die groß genug sein kann um den Kanal zu öffnen. Überraschenderweise zeigen beide ein fast identisches Bewegungsmuster, bei dem sich mit einer asymmetrischen Twistbewegung zwei der Untereinheiten gegen die anderen drei bewegen. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen, bei denen ebenfalls eine derartige Verdrillung erfasst wurde [28].

Bildet man das innere Produkt von Eigenvektoren verschiedener Ensemble, so bewegt es sich zwischen 0 und 1. Dies bedeutet, das die betreffenden Vektoren orthogonal beziehungsweise parallel sind; oder anders ausgedrückt,

¹ http://www.mpibpc.gwdg.de/groups/de_groot/concoord

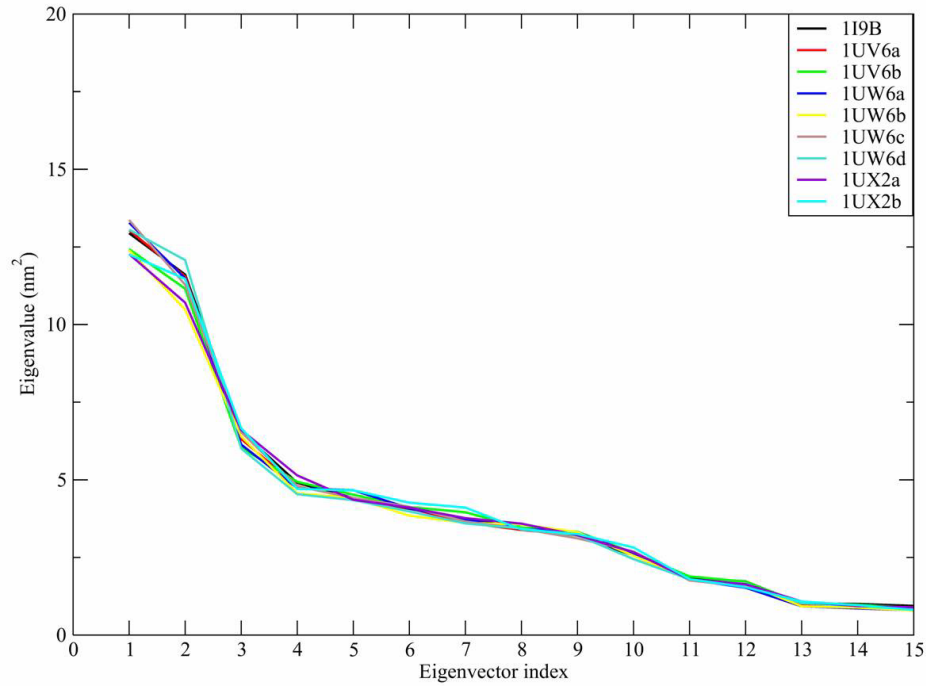


Fig. 5.1: Eigenwerte zu den neun verschiedenen Ensembles. Die Amplitude der Bewegung entlang der Eigenvektoren ist für alle Systeme sehr ähnlich.

die Vektoren sind völlig unabhängig voneinander oder beschreiben exakt die gleiche Bewegung. Werden so die inneren Produkte aller neun Ensembles verglichen, zeigt sich (siehe Fig. 5.2), dass der erste und zweite Eigenvektor austauschbar ist. Wie zum Beispiel besonders deutlich am Feld 1UW6d gegen 1UX2b erkennbar ist.

5.1.4 Bewegungsmuster

Um sicherzustellen dass der Großteil des essentiellen Subraums des AChBP abgedeckt ist, wurden sechs 10 ns MD-Simulationen mit GROMACS ausgeführt [106, 107]. Es wurde das ffgmx Kraftfeld verwendet und das Protein war voll in SPC-Wasser mit physiologischer Salzkonzentration solvatisiert.

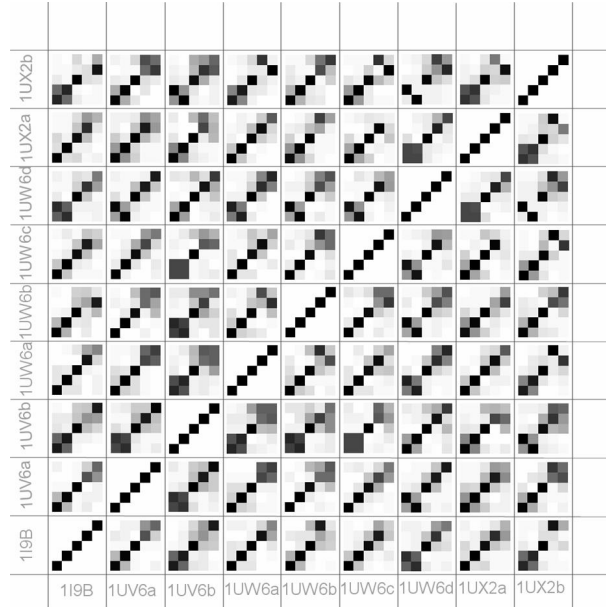


Fig. 5.2: Vergleich der inneren Produkte aller Ensemble. Es sind jeweils die ersten fünf Eigenvektoren gegeneinander dargestellt. Ein schwarzes Kästchen zeigt identische, ein weißes orthogonale Vektoren an. Links unten entspricht immer dem Index 1/1.

Die Simulationen starten jeweils mit den extremen Konformationen der ersten drei Eigenvektoren. Wie in der Projektion auf die von den ersten beiden Eigenvektoren aufgespannte Ebene zu sehen ist (siehe Fig. 5.3), konvergieren alle Simulationen in Richtung der Durchschnittskonformation. Aufgrund der schnellen Konvergenz lässt sich schlussfolgern, dass CONCOORD ein gewisses Oversampling zeigt, der Konformationsraum aber gründlich abgedeckt ist.

Die Bewegung der C-Termini jeder Untereinheit entlang der austauschbaren ersten beiden Eigenvektoren ist in Fig. 5.4 dargestellt. Im nAChR sind dies die Verbindungen zum transmembranen Teil, in dem sich die engste Stelle des Ionenkanals, das Gate, befindet. Es ist anzunehmen, dass die durch die

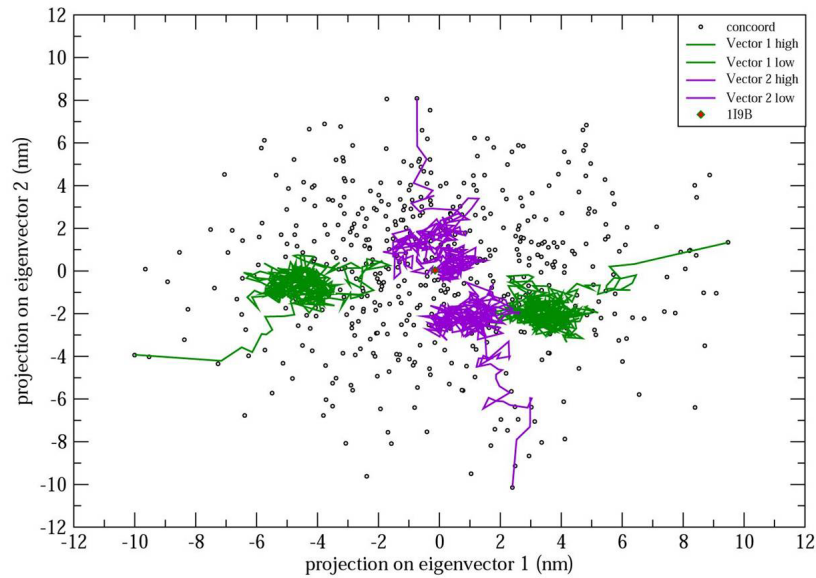


Fig. 5.3: Projektion der Trajektorien von MD-Simulationen, die von den Extrema der ersten drei Eigenvektoren ausgehen. Es wird auf die Ebene der ersten beiden Eigenvektoren abgebildet (die dritte Dimension ist aufgrund der Übersichtlichkeit nicht dargestellt). Es zeigt sich eine gewisse Konvergenz in Richtung der Durchschnittskonformation. Der Konformationsraum scheint gut abgedeckt zu sein.

Ligandenbindung induzierte asymmetrische Bewegung zu einer Deformation der α -Helices im Kanalteil führt. Es ist hervorzuheben, dass es sich um Bewegungen handelt, die nur leicht gegen die Membranebene geneigt sind und es sich nicht um Zug- oder Schubbewegung entlang der Helix handelt.

Der sogenannte CYS-Loop schiebt sich im Rahmen der globalen Konformationsänderung in einer Auf- und Abbewegung über die jeweils angrenzende Untereinheit. Hierbei wird die darunterliegende Agonistenbindungsstelle

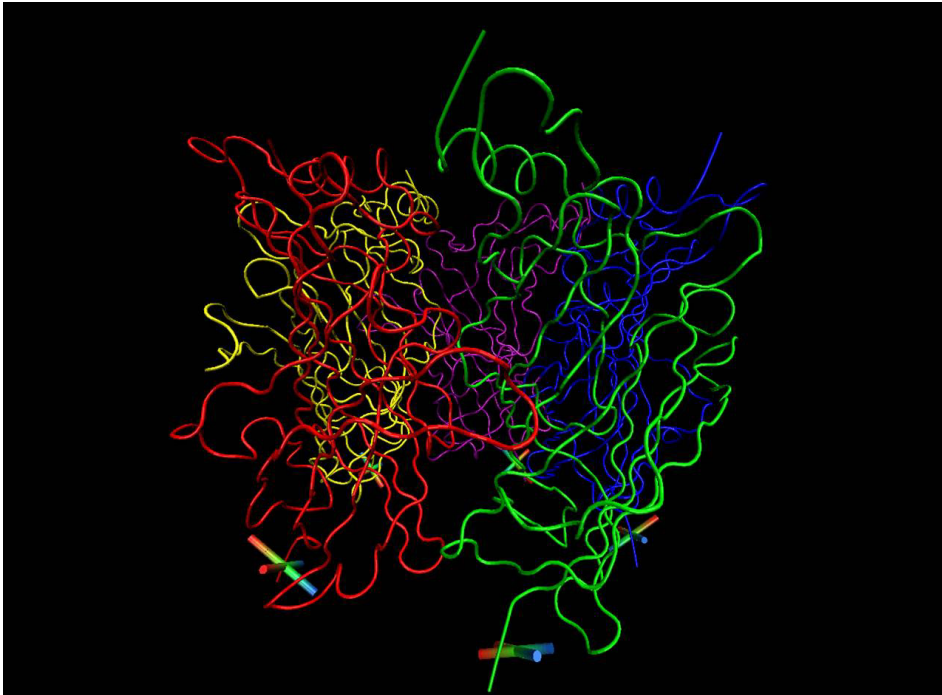


Fig. 5.4: Der Farbverlauf an den C-Termini der fünf Untereinheiten, deutet Bewegungsrichtung und Amplitude der essentiellen Bewegung entlang der ersten beiden Eigenvektoren an.

partiell geöffnet und geschlossen, was gut mit einem Bindungsvorgang in Einklang zu bringen ist.

6. NIKOTINISCHER ACETYLCHOLINREZEPTOR

Die Bindungsstelle für APL am nAChR soll über Photoaffinitätsmarkierungen und dynamische Simulationstechniken charakterisiert werden.

6.1 *allosterisch potenzierende Wirkung*

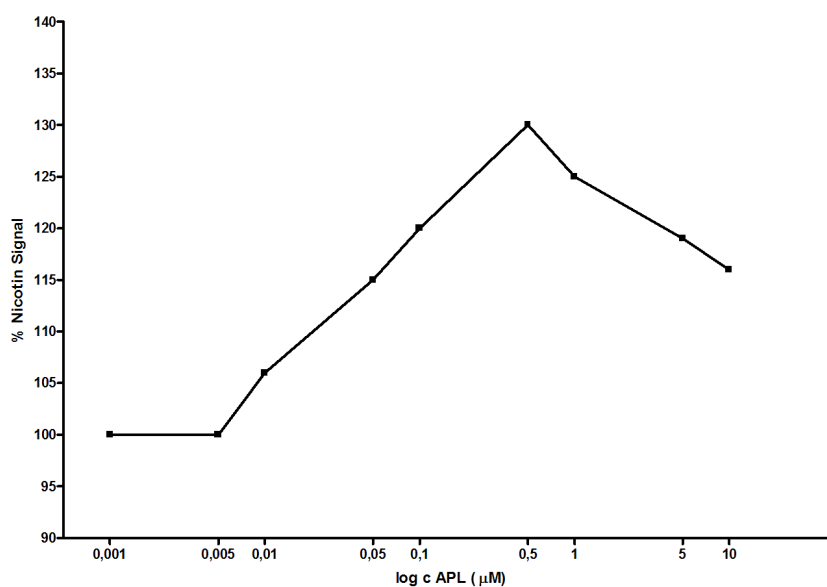


Fig. 6.1: Konzentrationsverlauf der durch Photogalanthamin (**6**) hervorgerufenen Potenzierung des Antwortsignals einer Nervenzelle auf Nikotin.

Zur Überprüfung der allosterisch potenzierenden Wirkung von Photogalanthamin (**6**) wurde bei verschiedenen Konzentrationen die Verstärkung des

Antwortsignals auf Nikotin ermittelt. Die Messungen wurden von Dr. Marek Samochocki bei der Galantos Pharma AG in Mainz durchgeführt (siehe Fig. 6.1). Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus unabhängigen Messreihen an drei bis fünf verschiedenen Nervenzellen dar. Diese Verfahrensweise ist notwendig, um eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Aufgrund der zahlreichen Faktoren, die hier Einfluss nehmen können, kann jeder Messpunkt mit einem Fehler von bis zu 10% behaftet sein.

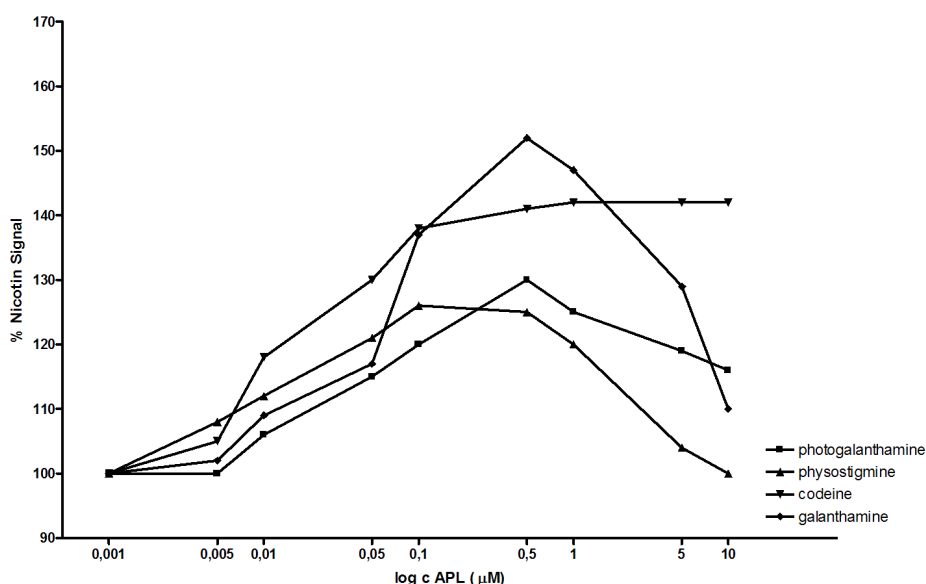


Fig. 6.2: Vergleich von Photogalanthamin (**6**) mit bekannten APL-Liganden.

Der typische Kurvenverlauf zeigt bei allen APL-Liganden einen ähnlichen Verlauf [121, 122]. Bei sehr niedrigen Konzentrationen ist kein Effekt zu beobachten. Ab etwa $0.005 \mu\text{M}$ ist ein leichter Einfluss zu erkennen. Dieser nimmt dann mit steigenden Konzentrationen an APL-Ligand weiter zu, bis eine Peakkonzentration von üblicherweise 0.01 bis $0.5 \mu\text{M}$ erreicht ist. Besonders potente APL-Liganden zeigen bei einer Konzentration von $0.01 \mu\text{M}$

eine Potenzierung von 50%, schwache Liganden nur einen einstelligen Effekt, trotz hundertfach höherer Konzentrationen. Viele der bisher getesteten Verbindungen zeigen ab Konzentrationen von 1 μ M einen Abfall der verstärkten Wirkung [123]. Es ist zu vermuten, dass bei höheren Konzentrationen APL die Innenseite des Ionenkanals belegen und ihn so partiell blockieren [124]. In diesem Zusammenhang ist der Kurvenverlauf von (-)-Codein (**27**) zu beachten, der kaum eine Abnahme bei höheren Konzentrationen zeigt. Beim Photogalanthamin (**6**) ist zwar eine leichte Abnahme zu erkennen, die aber wesentlich weniger stark ausgeprägt ist als die von (-)-Galanthamin (**1**). Somit scheint die Größe eines Liganden keinen direkten Einfluss auf die Blockierung des Kanals zu haben, da **1** und **27** etwa gleich groß sind, **6** aber ein fast doppelt so großes Volumen einnimmt.

Besonders erfreulich ist jedoch die Tatsache, dass die Modifikation mit einer photolabilen Gruppe nur zu einer leichten Verminderung des APL-Effekts geführt hat. Photogalanthamin (**6**) ist nicht nur eine hervorragende Sonde zur Identifizierung von Bindungsstellen, es ist auch das erste bekannte Galanthaminderivat, welches einen derart voluminösen Substituenten am Stickstoff trägt und seine allosterisch potenzierende Wirkung behält. Die ausgewählte Syntheseroute könnte sich bei der Entwicklung von besseren APL-Liganden als nützlich erweisen.

6.2 Markierung nAChR

Die eigentliche Markierung des nAChR mit Photogalanthamin (**6**), wie auch zum Vergleich die der AChE, erfolgt nach einem einfachen und direkten Prinzip. Das zu markierende Protein wird in einem geeigneten Puffer, wobei sich bereits bidestilliertes Wasser als günstigste Variante erwiesen hat, suspendiert. Hierzu wird eine Lösung von Photogalanthamin (**6**) gegeben und dann

für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Das Gemisch wird dann für bis zu vier Minuten mit UV-Licht (265-360 nm) bestrahlt, wobei es immer wieder sorgfältig durchmischt wird. Hierbei fluoresziert die anfangs gelbliche Suspension hellblau und entfärbt sich mit der Bestrahlung.

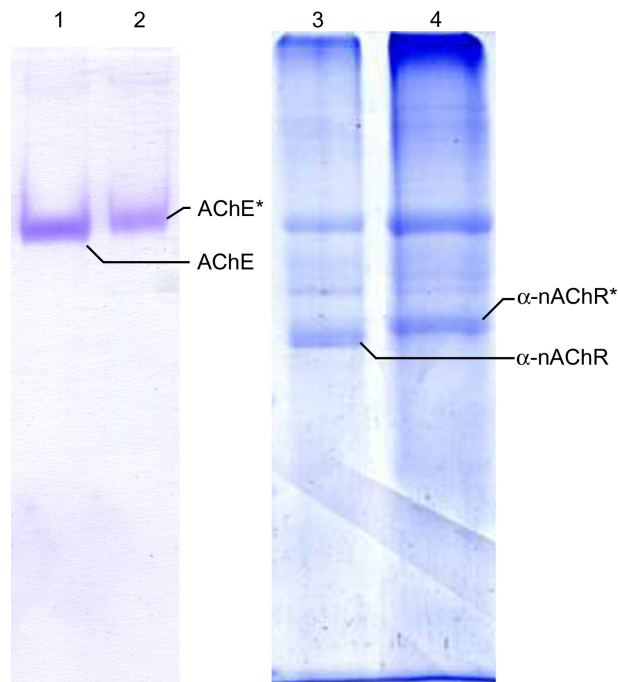


Fig. 6.3: Native und mit Photogalanthamin (**6**) behandelte und bestrahlte AChE (Spur 1 und 2) und nAChR (Spur 3 und 4). Die markierten Peptide sind jeweils mit einem Stern gekennzeichnet. Der durch die Massenzunahme des Photolabels bedingte Unterschied in der Laufweite ist deutlich erkennbar.

Unabhängig davon, welche Methode verwendet wird, bedarf es der Aufreinigung, beziehungsweise Auftrennung der Suspension, um das Label am Protein nachzuweisen. Hierfür wurden, wie in Fig. 6.3 zu sehen ist, klassische Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei trennen sich alle Peptide nach ihrer spezifischen Masse, so dass schwerere weniger weit laufen als leichtere. Die durch Photogalanthamin (**6**) eingebrachte Massendifferenz, lässt sich bei der

AChE schon mit bloßem Auge erkennen. Beim nAChR sind aufgrund der Präparation die Banden etwas diffuser, aber die Bande der α -Untereinheit zeigt ebenfalls eine kleine Massenzunahme. Da mit einem Überschuss an (6) gearbeitet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass mehr als ein Ligand an das jeweilige Protein gebunden hat.

6.3 Lokalisierung von Markierungen

Aus der Literatur sind einige Fallbeispiele bekannt, bei denen es gelang mit einer geschickten Kombination von Photoaffinitätsmarkierung, Massenspektroskopie und Verwendung von radioaktiv markierten Liganden, spezifische Bindungsstellen zu lokalisieren [125, 126]. Hier wurde mit einem massenspektroskopischen Ansatz versucht, über den in Fig. 6.3 erkennbaren Massenzuwachs, die an der Bindung von APL-Liganden beteiligten Aminosäuren zu identifizieren. Hierfür wurden die Proteine mit Trypsin beziehungsweise GluC verdaut. Die Proteasen schneiden die Aminosäuresequenz an spezifischen Stellen, so dass man definierte Peptidfragmente von etwa 5 bis 30 Einheiten Länge erhält.

Problematisch hierbei ist, dass die Proteasen nicht immer an optimalen Stellen schneiden und keine vollständige Sequenzabdeckung erzielbar ist. Zum Beispiel schneidet Trypsin nach LYS125, welches in früheren Untersuchungen durch radioaktives Physostigmin markiert wurde [50]. Die Proben enthielten, obwohl die Banden scharf ausgeschnitten wurden, nicht nur die α -Untereinheit des nAChR, sondern auch noch Rapsyn, die entsprechende Protease und kleine Mengen anderer Proteine. Somit zeigen die Massenspektren nicht nur knapp 20 Signale sondern bis zu 200, die teilweise überlagern. Um einen positiven Nachweis zu erzielen muss ein Peptidsignal identifiziert wer-

SEHETRL**VAN** **LLENY**NKVIR PVEHHTHFVD ITVGLQLIQL INVDEVNQIV
ETNVRLR**QQW** **IDVRLRWNPA** **DYGGIK**KIRL **PSDDVWLPDL** **VLYNNADGDF**
AIVHMTKLLL **DYTGKIMWTP** **PAIFK**SYCEI IVTHFPFDQQ NCTMKLGIWT
YDGTKVSISP **ESDRPDLSTF** **MESGEWVMKD** YRGWKHWVYY TCCPDTPYLD
ITYHFIMQRI *PLYFVVNVII* *PCLLFSFLTV* *LVFYLPTDSG* *EKMTLSISVL*
LSLTVFLLVI *VELIPSTSSA* *VPLIGKYMLF* *TMIFVISSII* *VTVVVINTHH*
RSPSTHTMPQ *WVRKIFINTI* *PNVMFFSTMK* *RASKEKQENK* **IFADDIDISD**
ISGKQVTGEV **IFQTPLIKNP** DVKSAIEGVK YIAEHMK**SDE** **ESSNAAEEWK**
YVAMVIDHIL *LCVFMLICII* *GTVSVFAGRL* *IELSQEG*

Fig. 6.4: Sequenzabdeckung der α -Untereinheit des nAChR. An den hervorgehobenen Peptiden ist eine Bindung von Photogalanthamin (**6**) aufgrund der massenspektroskopischen Untersuchungen unwahrscheinlich. Eine Markierung des transmembranen oder intrazellulären Teils (kursiv) ab PRO211 ist mangels Zugänglichkeit auszuschließen.

den, welches sich von der unbehandelten zur markierten Probe um 363.3 Da verschoben hat.

Der Nachweis gelang leider nicht eindeutig, da in Frage kommende Peptidsignale Unterschiede in der massenspektroskopischen Fragmentation aufwiesen. Ein modifiziertes Peptid sollte mit Markierung immer noch eine ähnliche Fragmentierung wie in nativer Form zeigen.

In früheren Studien konnte die Suche durch die Verwendung eines radioaktiven Labels, was das relevante Fragment klar kennzeichnete, deutlich eingeschränkt werden [42].

Es wurden jedoch einige Peptidfragmente klar identifiziert, an die mit

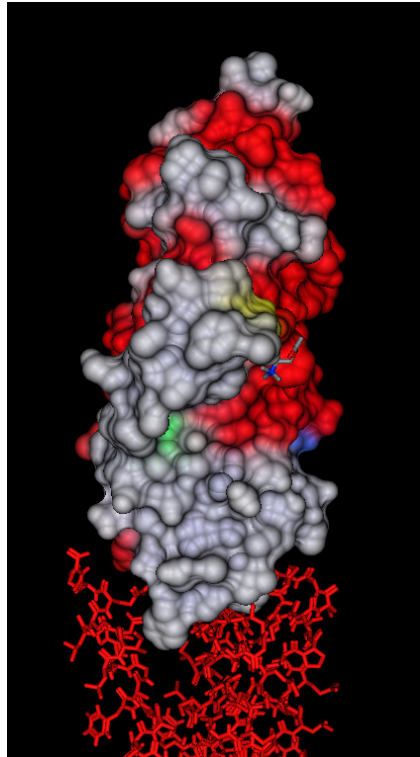


Fig. 6.5: Blick auf die Kontaktfläche der α - zur γ - beziehungsweise δ -Untereinheit.

An roten Bereichen ist eine APL-Bindungsstelle unwahrscheinlich. Im Zentrum ist gebundenes Acetylcholin dargestellt. (extrazellulärer Teil - GaussConnolly Surface, LYS125 - blau, THR202 - grün und CYS-Loop - gelb, transmembraner Teil - Strich).

hoher Wahrscheinlichkeit kein Photolabel gebunden hat (siehe Fig. 6.4). Es kann noch weiter eingeschränkt werden, in dem eine Bindung an den transmembranen oder intrazellulären Teil ab PRO211 ausgeschlossen wird, da dieser für APL nicht erreichbar ist. Wie in Fig. 6.5 anhand eines dreidimensionalen Modells des nAChR verdeutlicht wird, verbleibt ein großer Bereich unterhalb von LYS125 und THR202, die beide mit dem APL-Effekt in Verbindung gebracht werden [22], an denen eine Bindung von Photogalanthamin

(6) möglich ist.

Aus Vergleichsgründen wurde die Markierung der AChE auf die gleiche Art und Weise durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl von Signalen ist ebenfalls kein klares Resultat erzielt worden. Im Bereich der Gorge verbleiben nach dem Ausschlussverfahren noch große Bereiche an denen Photogalanthamin (6) gebunden haben könnte.

6.4 MD nAChR

Ausgehend von dem Modell des muskulären nAChR 2BG9 [20], welches auf Elektronenmikroskopie basiert und eine Auflösung von 4 Å aufweist, wurde ein verfeinertes Modell erstellt, mit dem eine Reihe von Docking- und MD-Simulationen durchgeführt wurde. Die gegebene Auflösung der Vorlage reicht für gewöhnlich aus, um die Sekundärstruktur klar zu charakterisieren, eine zuverlässige Bestimmung von Seitenkettenpositionen muss dabei ungenau bleiben. Bei allen Untereinheiten ist im Ausgangsmodell ein Großteil der intrazellulären Domäne nicht aufgelöst und bei der β -, γ - und δ -Untereinheit fehlt jeweils ein Teil im Bereich von Aminosäure 166 - 177. Die Bereiche wurden mit Hilfe der Homologiemodell-Funktion von MOE rekonstruiert [95]. Hierzu wurden die Rotamere der fehlenden Aminosäuren ermittelt und jeweils hundert Intermediate erzeugt. Das mit der besten Packungsdichte wurde optimiert und in das finale Modell übernommen. Der betroffene Bereich liegt jeweils an der Außenseite des extrazellulären Teils und ist nicht mit einer essentiellen Funktion des Rezeptors verknüpft. Da der intrazelluläre Teil nach bisherigem Kenntnisstand keinen direkten Anteil an den dynamischen Prozessen hat, wurde auf eine Modellierung dieses Bereichs verzichtet. Lediglich die "losen Enden" in Verlängerung des M3-Segments wurden mit einem Constraint belegt, um ein Abwickeln oder atypische Bewegungen zu

vermeiden.

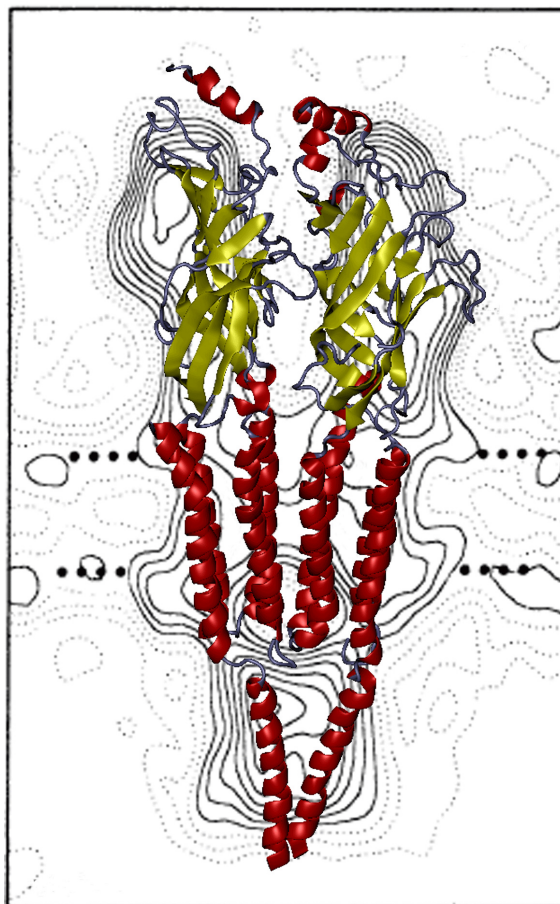


Fig. 6.6: Vereinfachte Abbildung der Sekundärstruktur des nAChR auf den Querschnitt seiner Elektronendichtekarte [30].

Das verfeinerte Modell des nAChR (siehe Fig. 6.6) wurde viermal für 25 ns mit GROMACS simuliert [106, 107]. Bei drei dieser Simulationen waren die beiden Bindungstaschen mit ACh belegt, für das mit Hilfe des Dundee-PRODRG2-Servers eine Topologie erstellt wurde. Es wurde das ffG43a1 Kraftfeld verwendet und das System war voll mit flexiblem SPC-Wasser solvatisiert. Der Rezeptor wurde in eine DPPC-Membran eingelassen und schrittweise equilibriert [127, 128, 129]. Hierbei wurde der Rezeptor zunächst starr

gehalten, bis sich die Membran ausreichend an das Protein angeschmiegt hatte. Hiernach wurde die XY-Ebene beschränkt, damit eine Kontraktion der Membran sich nicht auf die eingebettete Pore auswirken kann. Unter physiologischer Salzkonzentration wurde das System in mehreren Simulationen über insgesamt 5 ns equilibriert.

Dieses Simulationssystem stellt das bisher genaueste, mit mehr als 150000 Atomen aber auch das umfangreichste Modell des nAChR dar. Alle für die Ligandenbindung und Ionenleitung essentiellen Elemente sind akkurat modelliert und entsprechen in ihrem Aufbau dem derzeitigen Kenntnisstand. Die einzelnen Funktionen des Rezeptors sind in den folgenden Kapiteln behandelt.

6.4.1 Agonist Bindung

Das Bindungsverhalten des Agonisten Acetylcholin wurde detailliert untersucht. Zunächst lässt sich eine grobe Orientierung des ACh aus der Kristallstruktur des AChBP mit Carbamylcholin (1UV6) ableiten [118]. Es ist anzunehmen, dass die Carbonylgruppe des TRP149 mit dem positiv geladenen Stickstoff wechselwirkt und die Acetatgruppe relativ gesehen linear nach oben rechts steht [130, 131, 132, 133]. Für die entsprechenden MD-Simulationen wurde der Ligand in entsprechender Art und Weise platziert. Bei jeder der drei 25 ns Simulationen mit Agonisten verblieben jeweils beide ACh in ihrer Bindungstasche. Obwohl es zu deutlichen Fluktuationen kam, scheint der geschilderte Bindungsmodus der eindeutig Dominante zu sein.

Um das Agonistenbindungsverhalten zu bestätigen, wurden eine Reihe von Dockingläufen durchgeführt. Als Grundlage dienten jeweils Momentaufnahmen aus den 4 MD-Trajektorien, nach 5, 10, 15, 20 und 25 ns. Durch die Flexibilität der Seitenketten während der MD-Simulationen ist die Bindungs-

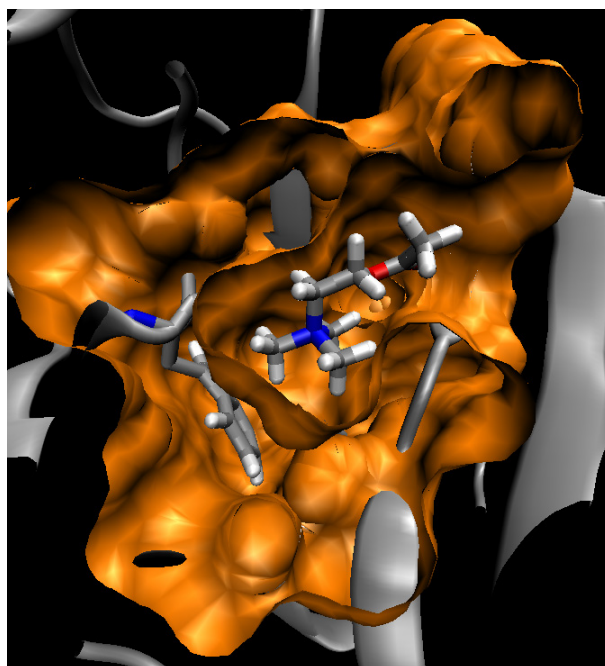


Fig. 6.7: Acetylcholin wechselwirkt mit TRP149 in seiner Bindungstasche (vereinfachte Darstellung). Aufnahme nach 5 ns MD-Simulation.

tasche jedesmal leicht verändert. Beim Docking wurde dem ACh jeweils der gesamte Rezeptor als Bindungsregion angeboten. Es zeigte sich, dass bei allen der 20 Läufe ACh an beiden Bindungsstellen mit guten Platzierungen wiederzufinden war. Resultate bei denen ACh an anderen Bereichen des Rezeptors zu finden war, fanden sich nur auf hinteren Plätzen mit schlechten Energien. Aus den Mittelwerten der Dockingenergien lässt sich ein leichter Unterschied in der Affinität zu den beiden Bindungsstellen von 1.3 kJ/mol erkennen, so dass die α/γ Bindungsstelle eine etwas höhere Affinität zeigt als die α/δ , was in Einklang mit experimentellen Ergebnissen steht [38]. Hintergrund ist die positive allosterische Kooperation zwischen den ACh-Bindungsstellen, die sich auf die Reihenfolge der Besetzung, wie auch auf die Dissoziation auswirkt [134].

6.4.2 APL Bindung

In einer früheren Dockingstudie an einem auf dem AChBP beruhenden Modell konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass es möglicherweise eine innere (LYS125) und eine äußere Bindungsstelle (THR202) gibt [22]. Dabei wurde eine energieunabhängige Häufungsbetrachtung durchgeführt, um Aminosäuren zu identifizieren, die an der APL-Bindung beteiligt sind.

Zum Vergleich hiermit wurde eine Reihe von Dockingläufen mit Physostigmin, Codein und Galanthamin am 2BG9 vorgenommen. Alle der jeweils hundert Resultate die an sinnvollen Stellen liegen, wurden auf ihre relative Entfernung zu LYS125 (potentielle Bindungsstelle innen), THR202 (potentielle Bindungsstelle aussen) und LEU248 (Gate des Ionenkanals) überprüft ($< 10 \text{ \AA}$).

APL	Aminosäure	Zahl gebundener Liganden
Physostigmin	LYS125	6
	THR202	0
	LEU248	0
Codein	LYS125	8
	THR202	0
	LEU248	1
Galanthamin	LYS125	13
	THR202	0
	LEU248	3

Tab. 6.1: Häufung von Dockingergebnissen in der Nähe ($< 10 \text{ \AA}$) funktionell relevanter Aminosäuren

Nicht sinnvolle Resultate, die zum Beispiel in der Membran liegen würden,

oder die Agonistenbindungsstelle belegen, wurden verworfen. Bei allen Liganden lagen die besten Bindungsenergien an einer Stelle zwischen M4-Segment und Membran, zu der definitiv kein APL-Ligand Zugang hat. Aufgrund der hohen Zahl an Positionierungen in derartigen Regionen ist ein solches unbound Docking mit Häufungsbetrachtung mit Vorsicht zu beurteilen. In der Nähe der möglichen äußeren Bindungsstelle wurde keine Treffer gefunden (siehe Tabelle 6.1). Im Bereich der möglichen inneren Bindungsstelle gab es eine moderate Häufung. Eine Belegung des Kanals (LEU248) trat kaum auf.

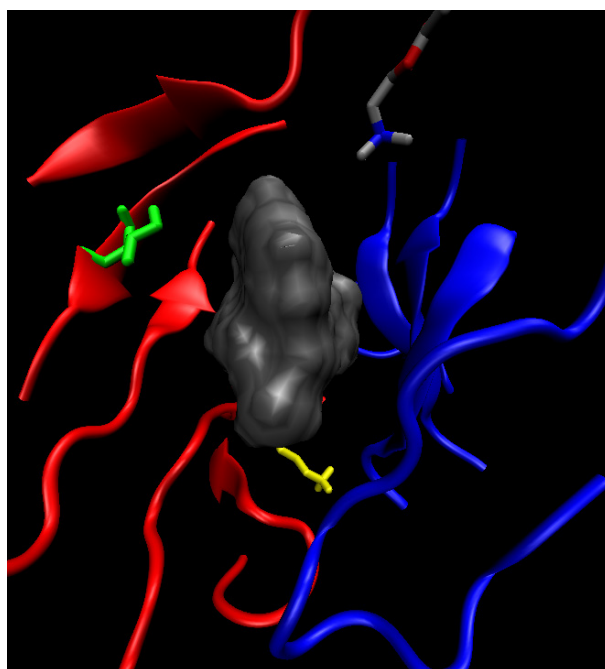


Fig. 6.8: Mögliche Bindungsregion von APL-Liganden (grau) zwischen den Untereinheiten (α/γ beziehungsweise α/δ , vereinfachte Darstellung). Im oberen Bereich ist gebundenes ACh dargestellt. Die an den beiden potentiellen Bindungsstellen beteiligten Aminosäuren LYS125 (gelb) und THR202 (grün) sind hervorgehoben.

Nach dem gleichen Verfahren, wie bei dem Agonisten, wurden die drei APL an verschiedene Rezeptorkonformationen aus MD-Simulationen gedockt.

Da hier nicht nur die Positionierung an einem Rezeptormodell, sondern an 20 sorgsam equilibrierte Konformeren berücksichtigt wurde, kann den Häufungspunkten an sinnvollen Bereichen eine deutliche Signifikanz zugeschrieben werden. Hier verschob sich das Bild deutlich in Richtung "Channel-Blocker" [135]. In unmittelbarer Nähe der beiden potentiellen Bindungsstellen gab es nur wenige Treffer.

Eine leichte Häufung der getesteten APL lag zwischen der α - und γ - beziehungsweise α - und δ -Untereinheit. Dieser Bereich unterhalb der Agonistenbindungsstelle, ist der gleiche der nach den massenspektroskopischen Untersuchungen (siehe Fig. 6.5) als mögliche Bindungsregion verblieben ist. Es ist anzumerken, dass der Platz zwischen den Untereinheiten im 2BG9 wesentlich größer ist als bei allen Strukturen des AChBP und den darauf basierenden Modellen [23, 136]. Die fragliche Region liegt auf halbem Weg zwischen LYS125 und THR202 und würde den Einfluss der beiden Aminosäuren beim APL-Effekt plausibel machen.

6.4.3 Dichteprofile

Da bei den MD-Simulationen ACh in den Bindungstaschen des muskulären nAChR platziert worden war, sollte sich im Mittel der Kanal weiter öffnen, als bei den Simulationen ohne Agonisten. Die Seitenketten der Pore zeigen jedoch eine erhebliche Fluktuation, so dass ein exaktes Bestimmen des Porendurchmessers über die Zeit nicht möglich ist.

Um die Möglichkeit einer Ionenleitfähigkeit zumindest teilweise zu quantifizieren, wurden Dichteprofile der Simulation erstellt [137]. Mit Hilfe des Programms GRIDCOUNT¹ wurde die Simulationsbox mit einem Raster versehen. Für jede der damit erstellten Zellen, wurde die An- oder Abwesenheit

¹ <http://sbc.bioch.ox.ac.uk/oliver/software>

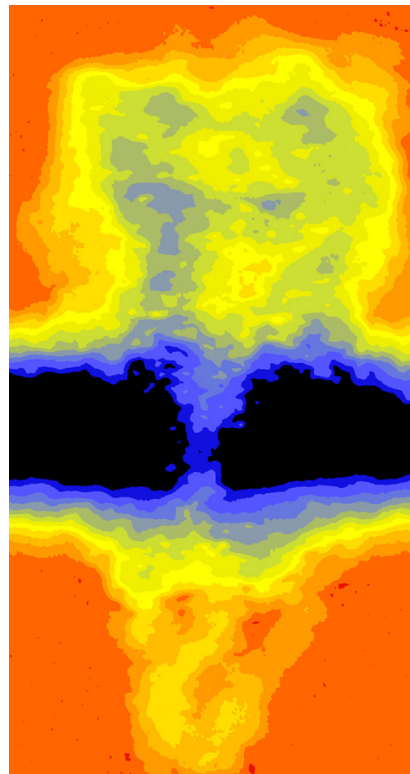


Fig. 6.9: Dichteprofil über die MD-Simulation des nAChR. Orange Bereiche entsprechen einer Dichte des Wassers von 1.0 g/mL, schwarze Bereiche zeigen die Abwesenheit von Wasser.

von Wassermolekülen bestimmt. Im zeitlichen Mittel sollten sich in jeder der Zellen von 0.05 nm Kantenlänge theoretisch ein fünftel Wassermolekül aufhalten. Befinden sich in einer Zelle, wie es im Bereich des Proteins der Fall ist, andere Elemente, wie zum Beispiel hydrophobe Leucinseitenketten in der Pore, verringert sich die Anzahl der Wassermoleküle.

Dies beruht zum Teil direkt auf dem Raumbedarf anderer Moleküle, es ist aber auch das Wechselspiel von hydrophoben und hydrophilen Gruppen mit dem Wasser von entscheidender Bedeutung.

Unterschreitet die Dichte des Wassers einen kritischen Wert, so verhält es sich nicht mehr wie eine Flüssigkeit, sondern wie Wasserdampf. Der Ionen-

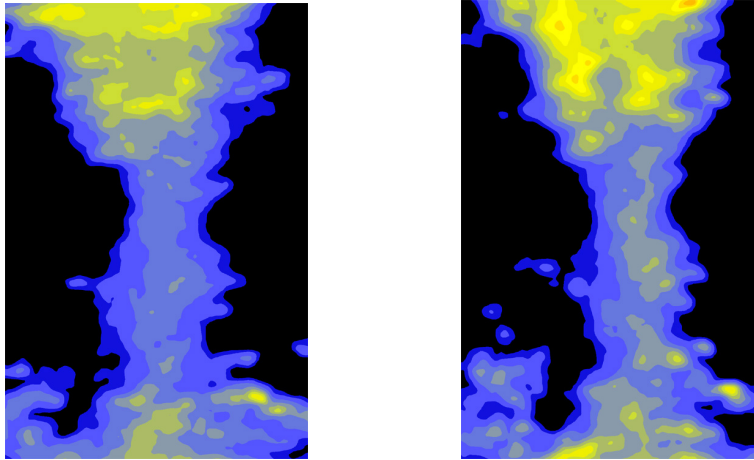


Fig. 6.10: Porenausschnitt der Simulation ohne Agonisten (links) und mit Acetylcholin (rechts). Im Bereich der Engstelle überschreitet die Dichte gerade die Schwelle, ab der eine Ionenleitfähigkeit eintritt (Übergang von blau nach gelb).

transport durch so einen Bereich ist nicht mehr möglich und es bildet sich ein "vapour-lock" [24, 137]. In den graphischen Darstellungen entspricht dieses dem Übergang von gelb zu blau (siehe Fig. 6.9).

Werden die Dichteplots aus den Simulationen mit und ohne Agonist verglichen, so ist der Übergang gerade zu erkennen (siehe Fig. 6.10). Wie der zwei Abstufungen höhere Gelbanteil auf Höhe der Engstelle verdeutlicht, gibt es hier eine höhere Aufenthaltsdichte von Wassermolekülen, was eine Ionenleitfähigkeit ermöglicht.

6.5 Permeation

Um zu verstehen, wie die Wirkung eines Agonisten oder eines APL auf molekularen Niveau aussieht, ist es unerlässlich das Herzstück des nAChR, den Ionenkanal, genauer zu betrachten. Bisher ist wenig über die Kopplung des

extrazellulären Teils und dem transmembranen Teils bekannt. Damit hier ein Einblick gelingen kann, müssen die Proteinbewegungen beim Durchtritt eines Ions durch den Kanal mit Hilfe geeigneter Simulationen visualisiert werden [138, 139, 140, 141, 142].

6.5.1 Homologie Modell

Die bislang genauesten Informationen über die Topologie des Ionenkanals beruhen auf Elektronenmikroskopieaufnahmen des nAChR (*Torpedo marmorata*, 1OED) [29]. Um bei der Simulation die Asymmetrie dieses Rezeptor-subtyps nicht berücksichtigen zu müssen, wurde ein $\alpha 7$ Homologiemodell erstellt [143]. Ein wichtiger Vorteil hierbei ist die Möglichkeit, die identischen 5 Untereinheiten in ihrem Bewegungsmuster miteinander zu vergleichen [41, 144, 145]. Man hat somit im Gegensatz zum Heteropentamer, quasi einen internen Standard. Bezogen auf das relevante Innere des Kanals, die M1-M3 Bereiche der α -Untereinheiten, gibt es zwischen beiden Sequenzen eine Identität von 0.53 und eine Ähnlichkeit von 0.74 (Austauschmatrix: BLOSUM62). Es wurde selbstverständlich auch der M4-Teil mitmodelliert. Hier zeigt sich eine Identität von 0.25 und eine Ähnlichkeit von 0.44. Diese Übereinstimmung ist mehr als zufriedenstellend, besonders wenn bedacht wird, wie wenig exakt die Orientierung von Seitenketten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestimmt werden kann. Bei der Modellerstellung wird der Backbone starr gehalten und bei identische Aminosäuren die Seitenkettenstellung direkt übernommen. Bei den anderen Aminosäuren werden diverse Seitenkettenpositionen simuliert und die jeweils günstigste in ein vorläufiges Modell übernommen. Das mit der besten Packungsdichte wird sorgfältig in mehreren Schritten minimiert und stellt schlussendlich das finale Modell dar. Die Kontaktstellen zum extra- und intrazellulären Teil wurden

nicht beschränkt und können sich frei bewegen.

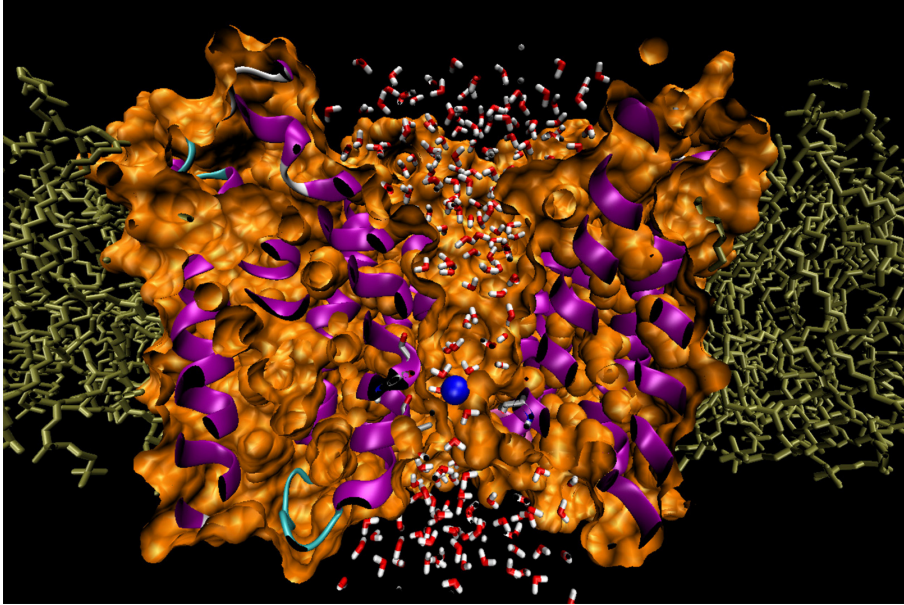


Fig. 6.11: Vereinfachter Querschnitt durch die transmembrane Pore des Rezeptors.

Um mit den Simulationsbedingungen so nah wie möglich an der Realität zu bleiben, wurde der Ionenkanal in eine DPPC Membrandoppelschicht eingebettet. Auch hier waren eine Reihe von sukzessiven Minimierungs- und Optimierungsschritten notwendig. Nach der Equilibrierung der Membran wurde die durch sie aufgespannte Ebene in ihrer Fläche beschränkt, damit eine etwaige Kontraktion oder Entspannung nicht den in ihr befindlichen Kanal auseinanderzieht oder zusammendrückt. Des Weiteren wurde orthogonal zur Membranebene ein elektrisches Feld von $0.028 \text{ V} \cdot \text{nm}^{-1}$ angelegt, was der Potentialdifferenz zu Beginn einer Neurotransmission entspricht [1]. Die volle Solvatisierung unter Berücksichtigung physiologischer Ionenkonzentrationen vervollständigt das Simulationssystem. Ein vereinfachter Querschnitt durch den Kanal ist in Figure 6.11 zu sehen.

Nach der Equilibrierung des Systems über mehrere Nanosekunden, wur-

de ein Natriumion, welches sich oberhalb des Kanals befand, mit einer virtuellen Feder verbunden. Diese zieht das Kation mit einer Federkonstante von $100 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ innerhalb einer Nanosekunde über die Strecke von 3.75 nm, die Start- und Zielpunkt trennen [138]. Nach Fick's Gesetz ist die Distanz, die das Ion zurücklegt knapp zweimal so groß wie die, die es in freiem Wasser zurücklegen würde (1.63 nm) [146]. Die erhöhte Geschwindigkeit soll den großen Ionengradienten über die Membran (145 vs. 12 mM Na^+) und das daraus resultierende immense elektrische Feld (110 mV) widerspiegeln.

6.5.2 gesteuerte Bewegung

Die totale Energie (E) der vollen gesteuerten Bewegung des Natriumions durch den Kanal entspricht der irreversiblen Arbeit gegen die Reibungskräfte. Der mittlere Reibungskoeffizient (γ) wurde für alle Simulationen als konstant angenommen [147]. Die Reibungskraft ist proportional zur mittleren Geschwindigkeit ($\Delta z_n / \Delta t_n$) der gesteuerten Bewegung.

$$E(z) = \sum_{n=1}^{N_z} (\langle F_n \rangle - \gamma \langle \frac{\Delta z_n}{\Delta t_n} \rangle) \Delta z_n \quad (6.1)$$

mit

$$E(z_\alpha) = E(z_\omega) = 0 \quad (6.2)$$

Da das Ion zwischen zwei Positionen bewegt wurde, für die es im Gleichgewicht die selben Aufenthaltswahrscheinlichkeit gibt, wurde die Energie des Ions für den Startpunkt (z_α) und Zielpunkt (z_ω) als gleich angenommen [138].

6.5.3 Vergleichssysteme

Zum Vergleich wurden zwei weitere Systeme simuliert [148]. Zum einen die gesteuerte Bewegung in freiem Wasser, bei sonst gleichen Parametern. Hier

gibt es kein Hindernis für das Natriumion, so dass lediglich Arbeit gegen das Wasser verrichtet wird. Das andere System enthält eine sehr stark vereinfachte Pore aus Dummy-Atomen [137]. Lediglich in der Engstelle der Pore sind einige polare Partikel eingebettet. Diese Pore verhält sich völlig starr und wechselwirkt praktisch nicht mit dem Wasser oder Ionen. Ein derartiges System wurde bei der Erstellung der Vapour-Lock-Theorie verwendet. Sie besagt im wesentlichen, dass wenn der Porendurchmesser einen kritischen Wert unterschreitet (≈ 0.55 nm), der Wasserfaden durch die Pore abreißt. An der Engstelle der Pore verhält sich das Wasser nicht mehr wie eine Flüssigkeit, sondern eher wie Dampf. Somit ist die Wasserphase unterbrochen und Ionen können nicht mehr durch die Pore diffundieren.

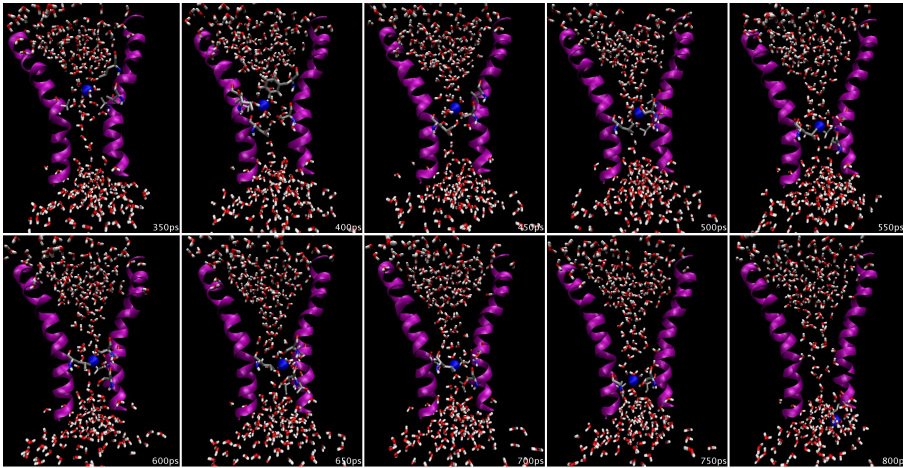


Fig. 6.12: Momentaufnahmen, die den Weg des Natriumions (blau) durch die solvatisierte Pore (stark vereinfacht violett) zeigen.

6.5.4 Kraft- und Energieprofile

Bei der wiederholten Durchführung der Simulation mit zufällig gewählten Startgeschwindigkeiten zeigt sich, dass das Ion auf vielfältigen Wegen die Pore durchqueren kann. Gerade im oberen Bereich oberhalb der Engstelle

gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten. Aufgrund dessen wurde jede Simulation je 12 mal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

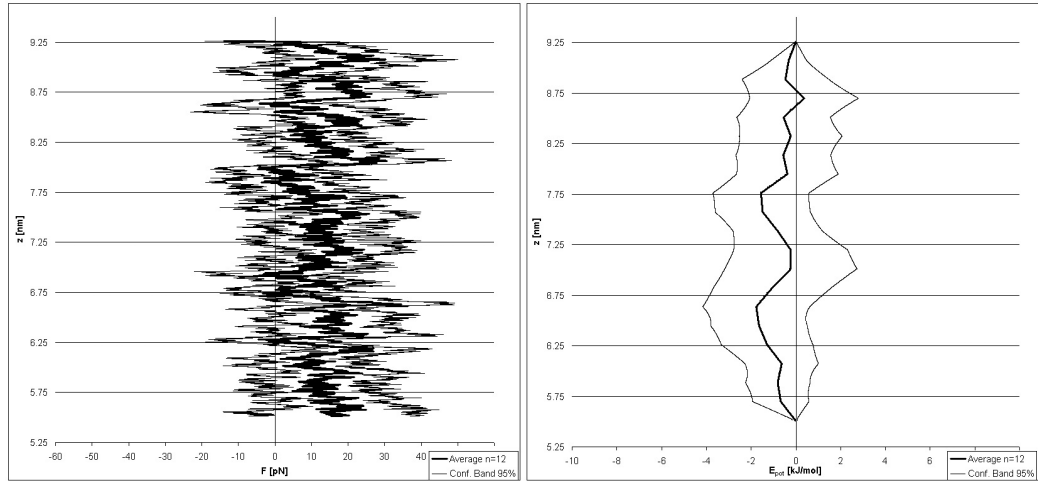


Fig. 6.13: Kraft- und Energieprofil der gesteuerten Bewegung eines Ions in freiem Wasser. Die dünnen Linien geben das 95% Konfidenzintervall an.

Erwartungsgemäß ergibt sich bei der Simulation in freiem Wasser keinerlei Energiebarriere, die der Bewegung des Ions entgegengestellt ist. Die leichte Schwankung der Energiekurve um null (siehe Fig. 6.13) deutet auf zufällige Häufungen von spezifischen Ereignissen in allen Simulationen hin. Makroskopisch gesehen müsste die Kurve exakt null sein, mikroskopisch gesehen kann es zum Beispiel zu einer direkten Kollision des Natriumions mit einem Wassermolekül kommen. Tritt so ein Ereignis bei mehreren Simulationen etwa zur gleichen Zeit am gleichen Ort auf, so kommt es zur Häufung, die sich im Kurvenverlauf abbildet.

Bei der Erstellung des Dummy-Channel-Modells zeigte sich, dass für die Entstehung eines Vapour-Locks nicht nur ein kritische Porendurchmesser unterschritten werden muss, sondern dass es sehr stark auf die Beschaffenheit der Pore ankommt. Besteht diese aus überwiegend polaren Gruppen bleibt

auch bei sehr kleinen Durchmessern die Wassersäule intakt. Handelt es sich aber um hydrophobe Gruppen, so bildet sich schon sehr früh ein Bereich sehr geringer Dichte aus, der eine Ionenleitfähigkeit unmöglich macht. Somit ist es sehr schwierig einen allgemein gültigen Wert für den Durchmesser anzugeben, da dieser bei jeder spezifischen Pore verschieden ist.

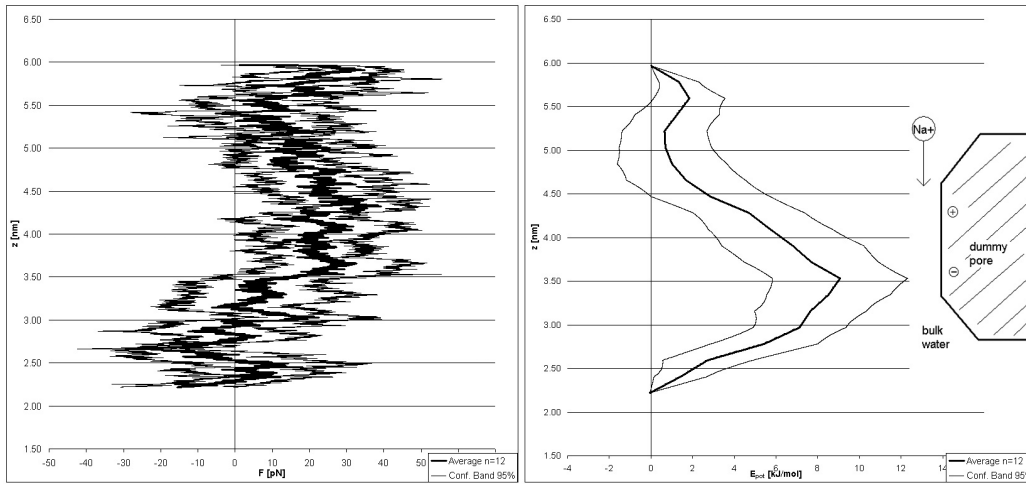


Fig. 6.14: Die Pore aus inerten Dummypartikeln führt zu einer Energiebarriere von etwa 10 kJ/mol.

Die Simulation des Dummysystems mit vier polaren Gruppen zeigt eine Energiebarriere von etwa 10 kJ/mol die das Natriumion überwinden muss. Dieser Wert ergibt sich allein aus dem Umstand, dass vom Ion verdrängte Wassermoleküle nicht beliebig ausweichen können, sondern gegen die Wand der Pore gedrückt werden. Hierbei ist eine größere Kraft notwendig als dies in freiem Wasser der Fall ist (siehe Fig. 6.14).

Bei den Simulationen am nAChR-System stellt sich heraus, dass das die Engstelle der Pore, das sogenannte Gate, durch einen Ring aus überwiegend hydrophoben Seitenketten rund um LEU248 gebildet wird [149]. Bei der Permeation wird das Ion zwischen den Ebenen, die die Seitenketten aufspannen,

quasi festgehalten und an der Weiterbewegung gehindert [150]. Visuell lässt sich die Beteiligung von hauptsächlich folgenden Aminosäuren an insgesamt drei Ringebenen identifizieren:

oben	LEU250, THR251
mitte	LEU248
unten	ILE244, THR245

Tab. 6.2: Ringebenen um die Engstelle der Pore des nAChR

Beim Durchtritt wird die Solvathülle aus Wassermolekülen nur partiell abgestreift [151]. Es verbleiben immer wenigstens vier Wassermoleküle direkt am Natrium. Die Beteiligung der Threonine wirkt sich scheinbar stabilisierend aus, da deren Hydroxygruppen die Position abgestreifter Wassermoleküle einnehmen.

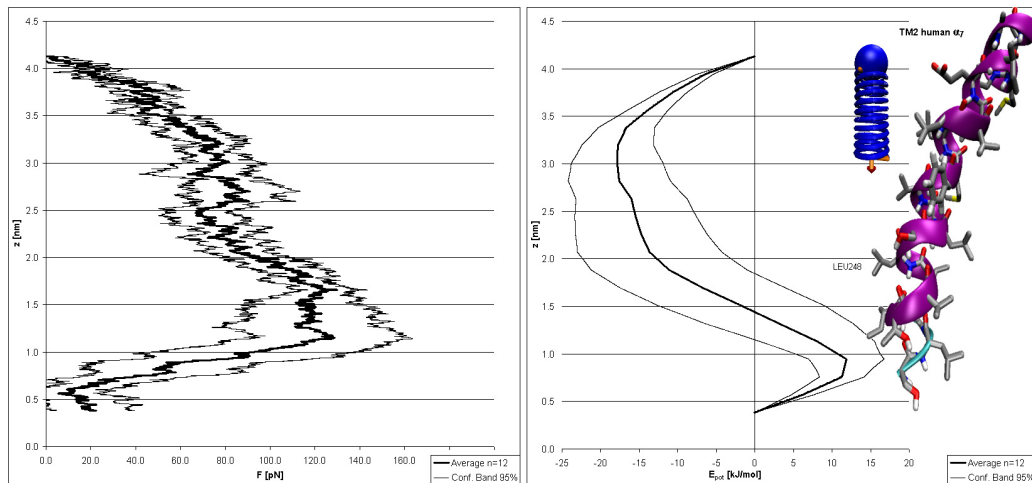


Fig. 6.15: Ein Leucin-Ring bildet die Engstelle der nAChR-Pore. Das Natriumion muss eine Energiebarriere von rund 30 kJ/mol überwinden.

Das Natriumion muss eine Energiebarriere von rund 30 kJ/mol überwinden, um den Kanal zu passieren (siehe Fig. 6.15). Dieser Betrag liegt in der

gleichen Größenordnung wie die Bindungsenergie von Agonisten wie ACh [38].

6.5.5 Porendurchmesser

Die Kanalöffnung und Permeation ist insgesamt ein sehr dynamischer Prozess mit wechselnder Beteiligung der fünf Untereinheiten. Der geschlossene Zustand der Pore ist genau genommen ein Ensemble von asymmetrischen Konformationen, bei denen sich gegenüberliegende hydrophobe Seitenketten zueinander bewegen und das gesamte Pentamer ein schmales Oval aufspannt. Dieses ist zu eng, als das ein Ion hindurchtreten könnte. Beim geöffneten Zustand zeigt sich eine höhere Symmetrie, da sich die Seitenketten mehr oder weniger kreisförmig um das Ion anordnen.

Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Porenöffnung mit dem Programm HOLE ², zeigt sich, dass jeder der drei Ringe nacheinander durch das Ion aufgeweitet wird (siehe Fig. 6.16). Das Ensemble der geschlossenen Zustände hat einen Durchmesser von 3.2 - 3.4 Å. Geöffnet ergibt sich ein Wert von rund 4.0 Å.

Die Bindung von zwei Agonisten im extrazellulären Teil begünstigt scheinbar die Häufigkeit von offenen Konformationen. Wie die Porendurchmesser illustrieren, ist der Unterschied zwischen geöffneten und einem geschlossenen Kanal nur minimal [152]. Wenn nun durch die Bindung des Agonisten eher offene Konformationen begünstigt werden, kann es zum Ionenfluss kommen. Hervorzuheben ist, dass es keinen durchgängig offenen Zustand gibt. Immer zeigen Seitenketten in das Innere des Kanals und blockieren ihn teilweise. Der Ionentransport durch die transmembrane Pore des nAChR, kann somit wohl am ehesten als peristaltisch, denn als Fluss beschrieben werden.

² <http://hole.biop.ox.ac.uk/hole>

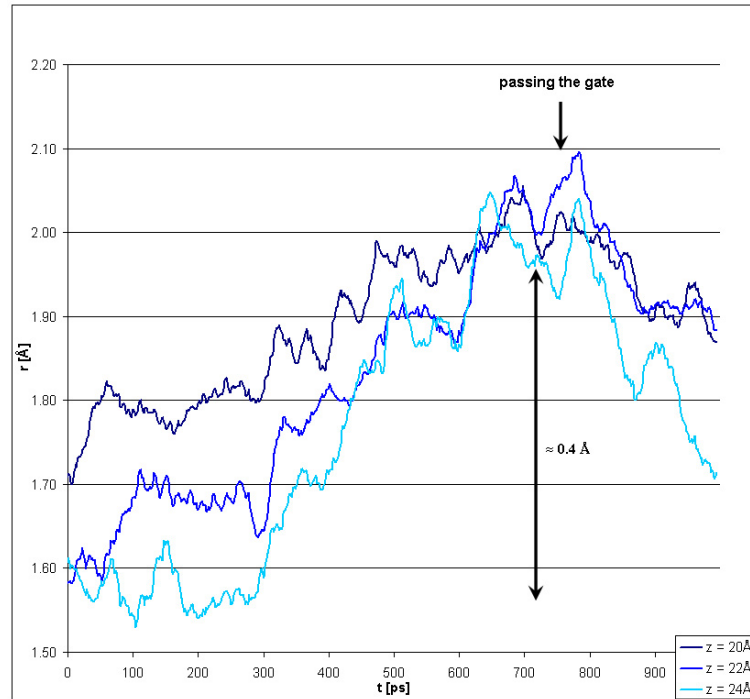


Fig. 6.16: Zeitlicher Verlauf des Porendurchmessers auf Höhe der hydrophoben Ringe. Die Veränderung wurde auf drei verschiedenen Höhengniveaus verfolgt (ILE244, THR245 - hellblau (24 Å), LEU248 - blau (22 Å), LEU250, THR251 - dunkelblau (20 Å)). Nach etwa 700 ps öffnet sich die Pore beim Durchtritt des Ions von 3.2 auf 4.0 Å.

6.6 essentielle Dynamik nAChR

Die vier Trajektorien der MD-Simulationen des muskulären nAChR wurden auf charakteristische Bewegungsmuster hin untersucht und ebenfalls einer PCA unterzogen [153].

Abgesehen vom nur unvollständig modellierten intrazellulären Teil, ergeben sich Bereiche hoher Beweglichkeit am CYS-Loop und an der Kupplungsstelle GLU45/ARG209 beziehungsweise VAL46/PRO272 zwischen extrazellulären und transmembranen Teil (siehe 6.17).

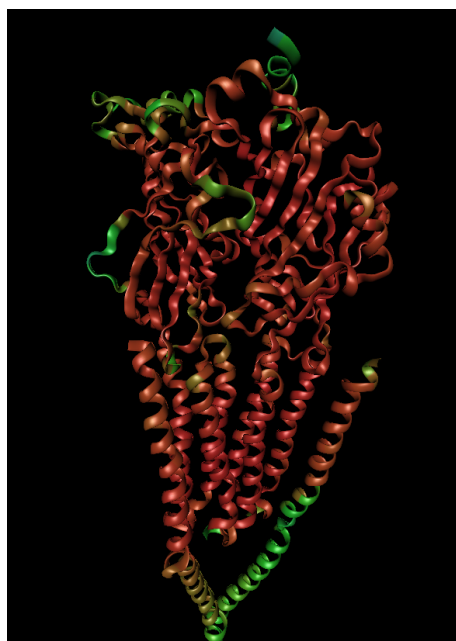


Fig. 6.17: Aus den positionellen Fluktuationen während der MD-Simulation abgeleitete Beweglichkeit des nAChR. Rote Bereiche sind relativ starr, grüne zeigen eine höhere Dynamik. Aufgrund der Übersichtlichkeit sind nur die α - und δ -Untereinheit dargestellt.

Auch wenn hier nicht davon ausgegangen werden kann, dass der Konformationsraum ähnlich gründlich durchmustert wurde wie beim AChBP, so ist doch besonders der Vergleich der Simulationen ohne Agonist, mit denen in Gegenwart von Acetylcholin interessant.

Bei beiden Typen ist die charakteristische Twistbewegung von zwei Untereinheiten gegen die anderen drei zu beobachten, die schon beim AChBP festgestellt wurde und sich deutlich von einer vergleichbaren Studie unterscheidet [154].

Bei der Simulation ohne Agonisten fällt die Amplitude der Bewegung deutlich kleiner aus, als bei den anderen drei Simulationen mit ACh. Hier-

mit wird die Überlegung gestützt, dass es keinen offenen oder geschlossenen Zustand gibt, sondern eher ein Ensemble von durchlässigen und undurchlässigen Konformationen. Dies steht in Einklang mit experimentellen Beobachtungen, bei denen auch Kanalöffnungen in Abwesenheit von Agonisten beobachtet wurden [155, 156, 157]. Die Bindung von Acetylcholin scheint nun Konformationen zu begünstigen, bei denen die Untereinheiten des extrazellulären Teils gegeneinander gekippt sind und somit die transmembranen Helices verdrillt werden. Diese kleine Änderung des Porenquerschnitts reicht offensichtlich aus, um Ionen hindurchzulassen. Die Bindung von APL an den extrazellulären Teil der α -Untereinheiten scheint dieses offene Konformationsensemble noch mehr zu begünstigen, womit es zu einer höheren Ionenleitfähigkeit kommt.

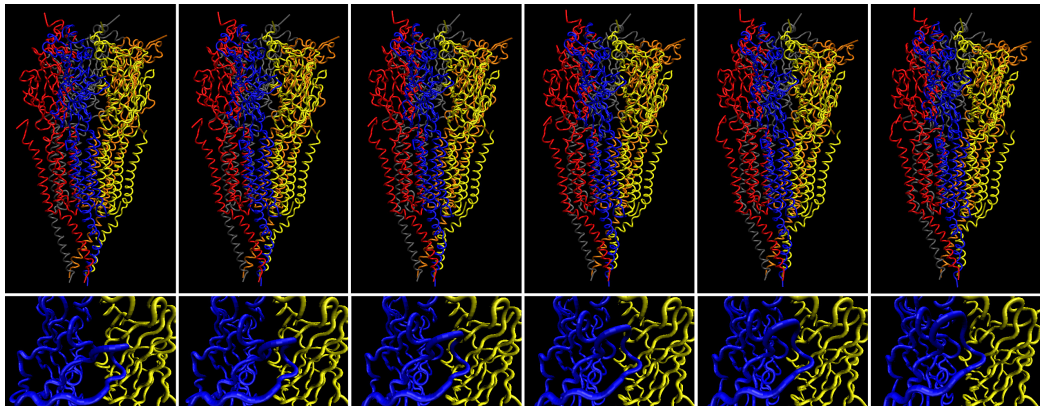


Fig. 6.18: Twistbewegung der Untereinheiten gegeneinander (oben) und Auschnittvergrößerung des CYS-Loops (unten) entlang des ersten Eigenvektors.

Die Visualisierung der vierdimensionalen Bewegungsmuster entlang der Eigenvektoren ist ein komplexes Unterfangen. Die typische Twistbewegung soll an entsprechenden Momentaufnahmen verdeutlicht werden (siehe Fig. 6.18).

7. PHARMACOPHOR

Ein Pharmacophor ist ein Set von strukturellen Eigenschaften in einem Liganden, die direkt in Beziehung stehen zur Erkennung durch eine Bindungsstelle an einem Rezeptor und der damit verbundenen biologischen Aktivität. Hiermit ist es möglich auf Grund von bekannten aktiven Substanzen, Prognosen über die Eigenschaften von neuen Verbindungen zu stellen [158]. Es ist dafür nicht erforderlich, Kenntnis vom Aufbau der Bindungsstelle auf molekularem Niveau zu haben. Der Pharmacophor für APL's des nAChR wurde mit Hilfe der in MOE implementierten Funktionen erstellt.

7.1 Aktivitätsbewertung

Wichtigster Punkt bei der Erstellung eines Pharmacophors ist die Auswahl und Bewertung von aktiven und inaktiven Liganden. Ein Set von 38 APL-Verbindungen war im Whole Cell Patch clamp Verfahren vermessen worden [45]. Für jede Verbindung war dabei für verschiedene Konzentrationen der APL-Effekt relativ zum Antwortsignal von Nicotin bestimmt worden. Somit steht das Wertepaar maximaler APL-Effekt und die entsprechende Konzentration für die Beurteilung zur Verfügung. Als gute, vielversprechende Liganden werden im allgemeinen Verbindungen angesehen, die bei niedrigen Konzentrationen einen großen Effekt zeigen. Darüber hinaus ist es wünschenswert, dass sich bei hohen Konzentrationen kein Channel Block Effekt einstellt.

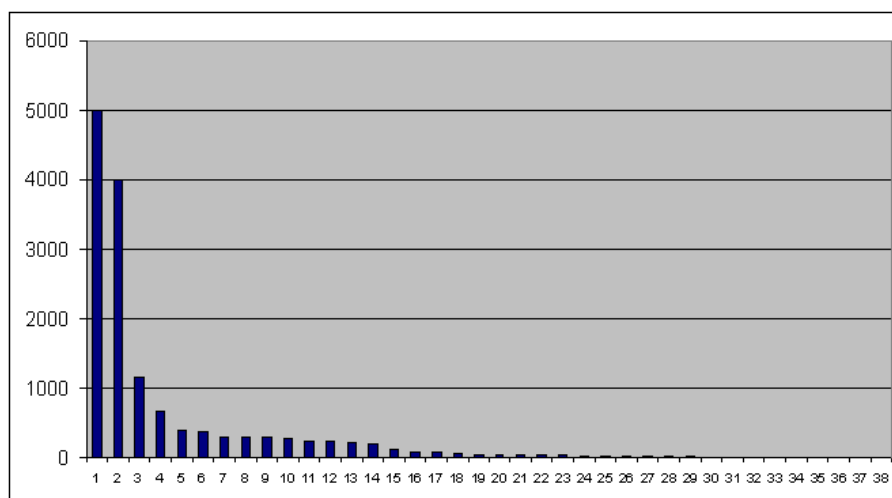


Fig. 7.1: APL/c zeigt eine ungleichmäßige Bewertung

Es wurden zwei Bewertungsmethoden evaluiert, mit dem Ziel ein ausgewogenes Verhältnis der beiden Parameter zu finden. Zunächst das einfache Verhältnis aus APL-Effekt [%] und Konzentration [μM], welches aber eine deutliche Überbewertung des Konzentrationsanteils zeigt (siehe Fig. 7.1).

Substrate die bei niedrigen Konzentrationen einen mäßigen APL-Effekt zeigten erhielten eine um Größenordnungen bessere Bewertung, als diejenigen mit starkem APL-Effekt bei mittleren Konzentrationen.

Um eine bessere Beurteilung zu erzielen, wurde das Produkt aus dem negativen dekadischen Logarithmus der Konzentration [M] mit dem APL-Effekt [%] herangezogen ($-\log(c) \cdot \text{APL}$).

Die Bewertung der Liste nach $-\log(c) \cdot \text{APL}$ liefert im Gegensatz zu APL/c in der linearen Regression eine wesentlich bessere Korrelation zwischen Score und APL ($R=0.9883$ vorher 0.4242) beziehungsweise c ($R=0.5700$ vorher 0.4169)).

Die Einteilung in gute und schlechte Liganden ergibt sich nach folgendem

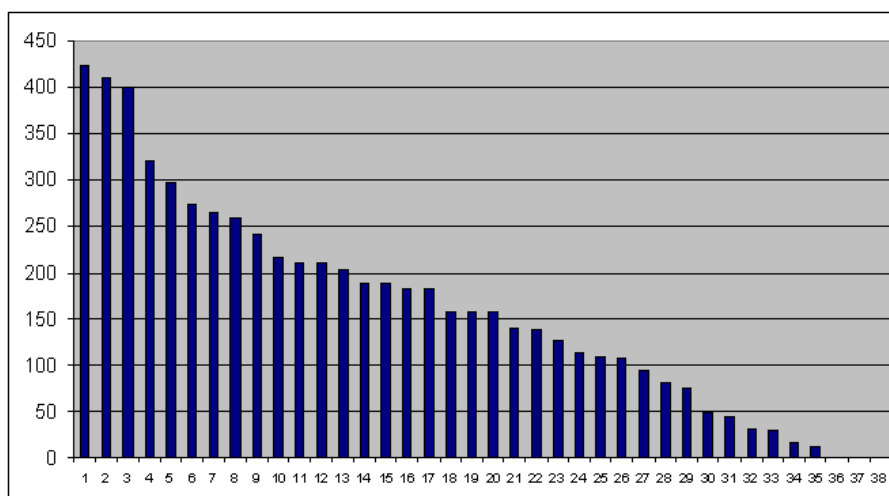


Fig. 7.2: $-\log(c) \cdot \text{APL}$ zeigt eine gute Verteilung

einfachen Schema:

	$-\log(c) \cdot \text{APL}$	> 400	sehr gut
$400 >$	$-\log(c) \cdot \text{APL}$	> 250	gut
$250 >$	$-\log(c) \cdot \text{APL}$	> 125	mittel
$125 >$	$-\log(c) \cdot \text{APL}$		schlecht

Für die Erstellung des Grundpharmacophors wurden die 8 besten Verbindungen mit einer Score größer 250 ausgewählt. Gegenionen wie HBr oder Oxalat werden nicht berücksichtigt, auch wenn bisher noch nicht abschließend geklärt werden konnte inwiefern sie einen Einfluss auf die Messung des APL-Effektes haben. Mit Hilfe des *Stochastic Conformation Search* wurde für jede Verbindung die energetisch günstigste nicht protonierte Konformation bestimmt und in einer Datenbank gespeichert. Dies entspricht im allgemeinen der global günstigsten Konformation.

7.2 Alignment

Die 8 Verbindungen wurden superposed, wobei bezogen auf (-)-Galanthamin (**1**) der Spirokohlenstoff, der Aromatenkohlenstoff an der Methoxygruppe und der Aromatenkohlenstoff zum Fünfringsauerstoff, beziehungsweise deren Entsprechungen als Überlappungspunkte dienten (siehe Fig. 1.1). Anschließend wurde mit dem Set ein *Flexible Alignment* durchgeführt, um eine optimale Überlappung aller Funktionalitäten zu erreichen. Hierbei werden die Substrate kleinen konformellen Deformationen unterworfen, die sich zwar ungünstig auf die Energie der einzelnen Verbindungen auswirken, aber ein wesentlich besseres Alignment liefern [95].

7.3 Pharmacophor

Durch den *Pharmacophore Consensus* wurden gemeinsame Merkmale, der aktiven Verbindungen bestimmt.

Es zeigte sich eine Übereinstimmung in sieben Punkten, was die Einteilung in gute und schlechte Liganden untermauert. Üblicherweise wird bei Pharmacophorsuchen lediglich mit vier oder fünf Punkten gearbeitet, so dass dieses Modell eine sehr scharfe Vorhersage liefern sollte. Ein aromatischer Sechsring ist bei allen bisher bekannten APL-Liganden vorhanden. Des Weiteren gibt es zwei dominante Donor und Akzeptor Bereiche, bezogen auf (-)-Galanthamin (**1**) am Stickstoff und der Hydroxygruppe. Dazu kommen noch der Sauerstoff des Furans und der Methoxygruppe die als mäßig starke Akzeptoren fungieren. Der Alkylsiebenring und die Doppelbindung liefern einen Beitrag für hydrophobe Wechselwirkungen. An jedem dieser Punkte wurde eine Sphäre definiert, deren Position und Größe so gewählt wurde, dass sie gerade die funktionellen Gruppen aller sieben Verbindungen umfasst.

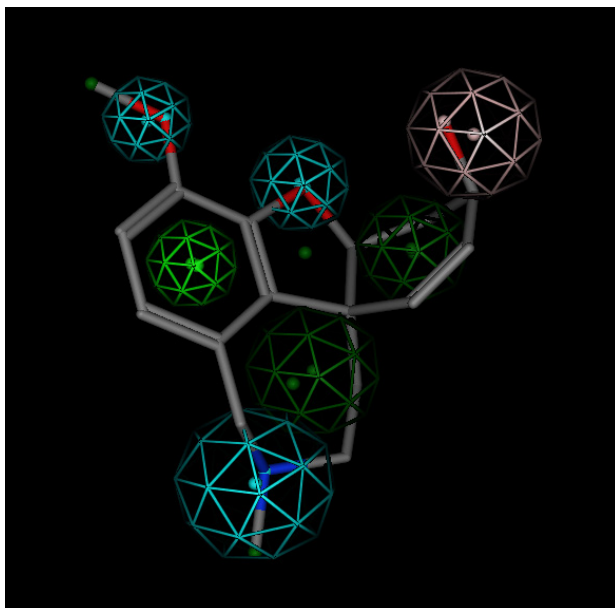


Fig. 7.3: Sieben Punkt Pharmacophor mit (-)-Galanthamin(1) (cyan Akzeptor; pink Donator; grün Aromat; dunkelgrün hydrophob).

Drei der Merkmale wurden als essentiell markiert, der Aromat und die beiden Donor/Akzeptor Bereiche an der Hydroxy- beziehungsweise N-Methylgruppe. Bei einer Datenbanksuche nach neuen Verbindungen, die in den Pharmacophor passen, müssen diese drei Punkte in jedem Fall erfüllt sein, während bei den anderen Merkmalen gegebenenfalls eine partielle Erfüllung toleriert werden kann.

Wendet man dieses Pharmacophorschema zunächst auf die oben erwähnten 38 Verbindungen an, so werden 28 von ihnen wiedergefunden (siehe Fig. 7.4). Wobei alle aus der Gruppe der *sehr guten* und *guten* wiedergefunden werden. Bei der Gruppe *mittel* werden 11 von 15 Verbindungen identifiziert, bei den *schlechten* nur noch 9 von 15. Dieser einfache Test zeigt, dass der erstellte Pharmacophor in der Lage ist, innerhalb akzeptabler Grenzen, zwischen aktiven und nicht aktiven Verbindungen zu unterscheiden. Man muss

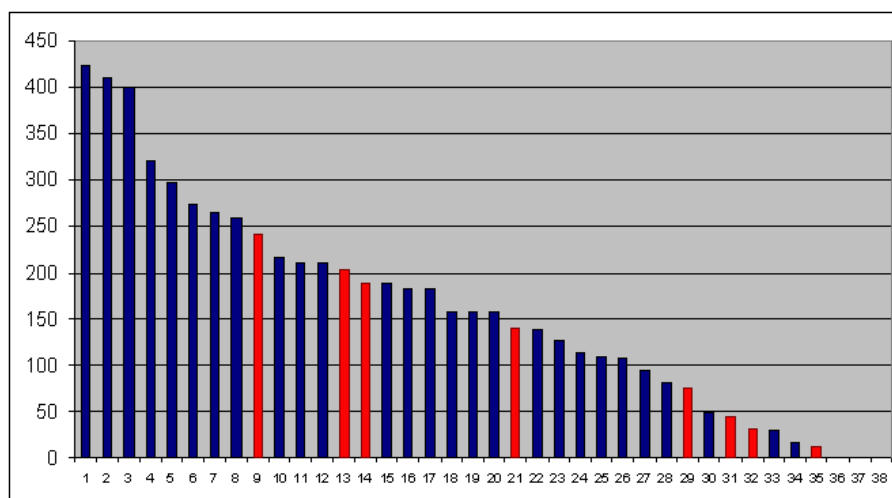


Fig. 7.4: Der Pharmacophor identifiziert überwiegend aktive Verbindungen. Die rot markierten Verbindungen werden nicht gefunden.

jedoch anmerken, dass das Testset von 38 Verbindungen fast ausschließlich Verbindungen vom Galanthamintyp enthält und eine etwas größere strukturelle Divergenz wünschenswert wäre.

7.4 Datenbanksuche

Um neue Leitstrukturen für potentere APL-Liganden zu ermitteln, wurde die ZINC-Datenbank¹ durchsucht [159]. Hierbei handelt es sich um eine freie Datenbank, in der 3D-Strukturen kommerziell erhältlicher Verbindungen hinterlegt sind. Gegenwärtig enthält sie rund 3.3 Millionen Einträge. Zu jeder Struktur finden sich weitere Angaben, wie die Zahl der Akzeptoren im Molekül, logP-Werte oder Molekülmassen. Für die Suche wurde ein Subset von 676544 Verbindungen generiert, die die folgenden Bedingungen erfüllen:

¹ <http://blaster.docking.org/zinc>

$$\begin{array}{rcl} 150 < & \text{Molekulargewicht} & < 350 \\ -2 < & \log P & < 4 \\ & \text{Donatoren} & \leq 3 \\ & \text{Akzeptoren} & \leq 6 \end{array}$$

Mit diesen Kriterien verbleiben Verbindungen die potentiell als Medikament eingesetzt werden können und man reduziert die Zahl der zu prüfenden Verbindungen erheblich. Um die Anzahl noch weiter zu verringern, wurde anhand des MACCS Structural Key jeder Verbindung ein so genannter Fingerprint zugewiesen [95].

Ein Fingerprint repräsentiert ein Set von Eigenschaften, die sich von der Struktur eines Moleküls ableiten lassen. Die fundamentale Idee bei dieser Vorgehensweise ist, bestimmte Eigenschaften direkt oder indirekt in den Fingerprint zu integrieren und ihn dann als Stellvertreter für die chemische Struktur zu verwenden. Der Vergleich verschiedener Moleküle wird somit auf das Vergleichen von Sets der Eigenschaften reduziert, deren Grad an Überlappung man bestimmen kann.

Als einfaches Beispiel sei angenommen, dass das Universum der strukturellen Eigenschaften sich aus folgenden Elementen zusammensetzt:

$$U = [\textit{aromatisch}, \textit{Ring}, C, N, O, S, P, \textit{Halogen}] \quad (7.1)$$

Basierend auf dieser Definition der Eigenschaften, können alle Moleküle als Teilmenge von U beschrieben werden. Es ist zu beachten, dass bei diesem eher kleinen Universum mit 8 Eigenschaften, es nur 2^8 , also 256 mögliche Fingerprints gibt. Bei dem verwendeten 166 MACCS Strukturelementen ergeben sich somit 2^{166} , also $9.35 \cdot 10^{49}$ unterscheidbare Fingerprints. Wenn nun ein Fingerprint von einer chemischen Struktur abgeleitet wurde, ist ein Maß notwendig, um Fingerprints und damit die Moleküle zu vergleichen. Ein gängiges Maß hierfür ist der Tanimoto Koeffizient, eine Zahl zwischen 0 und 1,

wobei 0 vollkommen verschieden bedeutet und 1 völlig identisch [95]. Er wird definiert mit:

$$\text{Tanimoto Koeffizient} = \frac{AB}{A + B - AB}$$

(7.2)

AB : Zahl der gemeinsamen Eigenschaften

A : Zahl der Eigenschaften in Fingerprint A

B : Zahl der Eigenschaften in Fingerprint B

Es wurden Verbindungen aussortiert, die einen Tanimoto Koeffizient von weniger als 0.5 in Bezug auf (-)-Galanthamin(**1**) aufweisen. Dadurch verbleiben noch 32146 Verbindungen, die zum einen die Grundvoraussetzung eines Medikamentes erfüllen und das Potential für APL-Eigenschaften aufweisen.

Um zu gewährleisten, dass alle sinnvollen Konformere jeder Verbindung geprüft werden, wurde das Set mit der *Conformational Import* Funktion in eine MOE Datenbank überführt. Hierbei wird jede Verbindung einer stochastischen Konformationssuche unterzogen, bei der Bindungs- und Torsionswinkel variiert werden. Jedes der hierbei erzeugten Konformere wird energieminiert, und diejenigen, die um nicht mehr als 5 kcal/mol von der energetisch günstigsten Konformation abweichen, werden übernommen. Man erhält so eine Datenbank mit 447749 Einträgen, beziehungsweise rund 14 Konformere pro Verbindung. Dieser Vorgang ist der mit Abstand zeitaufwendigste bei der gesamten Pharmacophorsuche. Es wurden knapp 900 CPU-Stunden benötigt, um alle Konformere zu generieren und zu minimieren.

Die generierten Konformere wurden abschließend auf ihre Übereinstimmung mit dem Pharmacophor überprüft. Hierbei müssen die Funktionalitäten einer Verbindung innerhalb der definierten Sphären zu liegen kommen. Je mehr Sphären gleichzeitig belegt werden können, desto größer ist die Chance, dass die betreffende Verbindung APL-Eigenschaften besitzt. Alle Verbindungen, die die drei essentiellen Merkmale, sowie insgesamt 6 der 7 Merk-

male gleichzeitig erfüllen, wurden in die engere Auswahl übernommen. Die resultierenden 92 Substrate wurden visuell inspiziert und manuell nach Substanzklassen sortiert. Es zeigte sich ein häufiges auftreten von Opiaten vom Morphintyp, von denen sich auch die bekannte APL-Verbindung (-)-Codein (**27**) ableitet. Insgesamt wurden die Verbindungen in 6 Gruppen aufgeteilt, wobei einige Substrate aussortiert wurden, da es sich zum Teil um sehr flexible Verbindungen, mit schwer zu synthetisierenden Gruppen handelte. Aus jeder dieser Gruppen sollte eine Verbindung auf ihre APL-Aktivität bei der Galantos Pharma AG vermessen werden.

7.5 APL-Aktivität

Nach Prüfung von Lieferbarkeit und Betäubungsmittelbeschränkungen verblieben drei Substrate aus jeweils verschiedenen Gruppen, deren Messergebnisse in Tabelle 7.1 angegeben sind.

Substrat	APL-Aktivität	Konzentration
Verbindung 1	49%	0.01 μM
Verbindung 2	19%	1.0 μM
Verbindung 3	0%	- μM

Tab. 7.1: Auf Basis des Pharmacophors identifizierte und vermessene Verbindungen

Verbindung 1 ist je nach Bewertungsmethode die zweit- beziehungsweise viertbeste bekannte APL-Verbindung. Da sie an zahlreichen Positionen derivatisiert werden kann, ist die Aktivität unter Umständen noch steigerbar.

Aufgrund eines laufenden Patentverfahrens können leider keine weiteren Angaben zu den getesteten Verbindungen gemacht werden.

Die verwendeten Auswahlkriterien sind sehr eng gesetzt und führen mit Sicherheit dazu, dass eine ganze Reihe von Verbindungen aussortiert werden, die hervorragende allosterisch potenzierende Liganden sind. Ziel war es jedoch eine neue Leitstruktur zu finden, die sich hinreichend von den galanthaminartigen unterscheidet.

8. AMYLOID

Mit dem Ziel die Aggregation von β -Amyloiden zu verstehen und langfristig bestehende Plaques wieder aufzulösen, wurden molekulardynamische Simulationen an Amyloidmodellen durchgeführt.

8.1 MD Simulationen

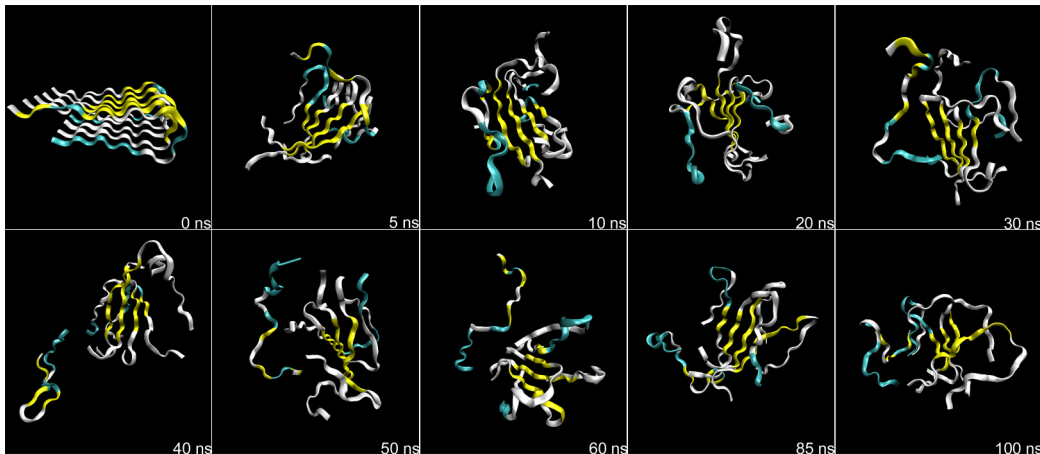


Fig. 8.1: Momentaufnahmen aus der molekulardynamischen Simulation des "Riek" β -Amyloidpentamers in 25% TFE bei 368 K.

Es wurden einige Systeme auf Basis des "Tycko"-Modells erstellt und mit publizierten Arbeiten verglichen, auch wenn bei ihnen, im Vergleich zum "Riek"-Modell, der β 2-Strang um 180° verdreht ist [56, 160, 161]. Von daher ist die Qualität der Simulationen zweifelhaft, liefert aber schon einige

Einblicke in das dynamische Verhalten bei unterschiedlichen Temperaturen.

Als Basis für möglichst akkurate Simulationen des Verhaltens in Wasser und Ethanol, sowie des Auflösungsprozesses in TFE oder HFIP [162], wurde das "Riek"-Modell verwendet [56]. Zunächst mussten jedoch Topologien für die fluorierten Lösungsmittel erstellt werden, da diese in üblichen Kraftfeldern nicht erfasst sind [163, 164]. Die Topologien wurden an physikochemischen Daten verifiziert, indem das molare Volumen der reinen Stoffe, wie auch in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit H₂O, bei unterschiedlichen Temperaturen simuliert wurde (siehe Anhang (Topologien)).

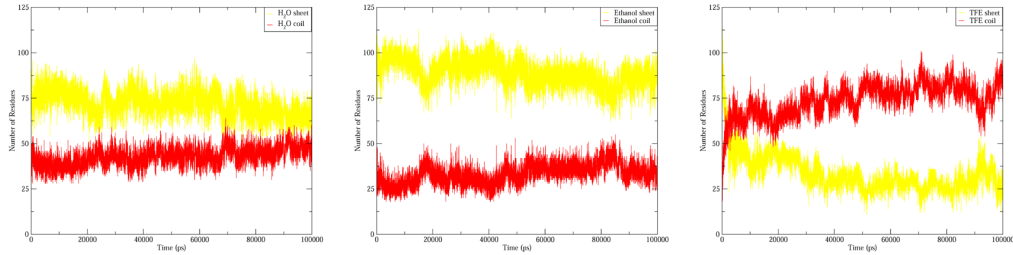


Fig. 8.2: Entwicklung der Sekundärstruktur des Amyloids mit der Zeit bei 368 K in H₂O, 10% Ethanol und 25% TFE (β -Sheet Anteil - gelb, helikaler Anteil - rot).

Es zeigte sich, dass das Amyloidpentamer eine ausgezeichnete Stabilität in H₂O und 10% Ethanol aufweist. Es kommt zu diversen Fluktuationen, gerade im Anfangs- und Endbereich des Proteins, die Gesamtstruktur bleibt aber über die volle Simulationsdauer von 100 ns stabil. In TFE ist, begünstigt durch die Temperatur von 368 K, schon nach wenigen Nanosekunden ein Zusammenbruch der Sekundärstruktur zu erkennen (siehe 8.1 und 8.2). Nach rund 20 ns kommt es zum Bruch des ASP23/LYS28-Ionenpaares und bei etwa 40 ns löst sich ein Monomer vollständig ab. Am stabilsten erweist sich der erste Teil des β 2-Strangs $\approx 31 - 36$, dessen β -Struktur zumindest teilweise

erhalten bleibt.

8.2 Solvenzoberfläche

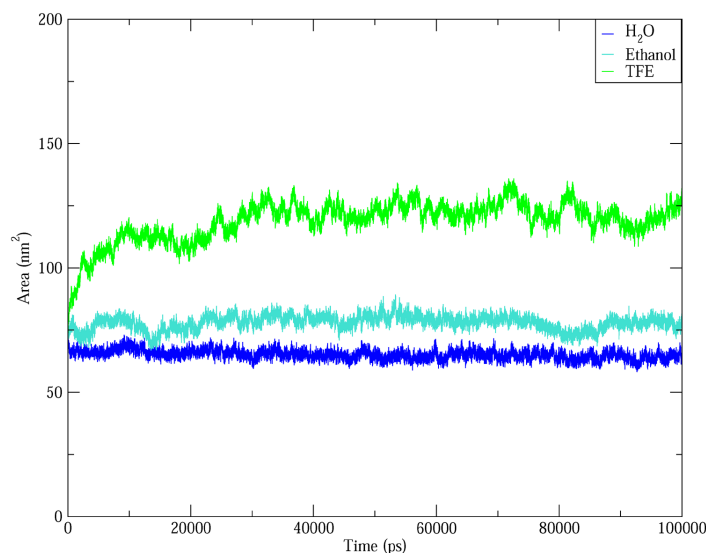


Fig. 8.3: Verlauf der dem Solvenz zugänglichen Oberfläche über die Zeit. Bei der TFE Simulation löst sich die geordnete Pentamerstruktur partiell auf, was mit einer Zunahme der Oberfläche verbunden ist.

Die Beurteilung des Auflösungsverhaltens nach der Sekundärstruktur birgt einige Risiken, da normalerweise nur die Dihedralwinkel des Backbones bewertet werden und dies bei partiell ungeordneten Strukturen ungenaue Ergebnisse liefern kann. Ein genaueres Maß für den Auflösungsprozess bietet die dem Solvenz zugängliche Oberfläche (siehe 8.3). Bei geordneten intakten Strukturen bleibt diese klein und vergrößert sich sukzessiv beim Auflösungsprozess.

Die beim Auflösen gebrochenen Wechselwirkungen sind genau diejenigen, die ein sogenannter Plaquebuster möglichst spezifisch unterbrechen muss

[165]. Bisherige Versuche Plaques virtuell durch geeignete Liganden aufzulösen [166], waren, aufgrund der beschränkten Zeitskala von einigen Nanosekunden, noch nicht erfolgreich. Eine mögliche Alternative bieten Replica-Exchange-Molecular-Dynamics (REMD) mit denen der Konformationsraum wesentlich schneller durchsucht werden kann [167].

9. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Dissertation wurden durch Kombination von Synthese, Biochemie, Docking, Molekulardynamik und Pharmacophorsuche Beiträge zum Verständnis der Vorgänge an der cholinergen Synapse geleistet. Die Einblicke in Aufbau und Funktion von AChE, nAChR und Amyloid ermöglichen wichtige Schritte auf dem Weg zur Therapie der Alzheimer'schen Demenz.

Mit der Synthese von Photogalanthamin (**6**) gelang die Entwicklung einer spezifischen Sonde zur Identifizierung der APL-Bindungsstelle. Die Verbindung zeigt gute APL-Aktivität und ist darüber hinaus noch ein Inhibitor der AChE. Es konnten mit dem iridiumkatalysierten H/D-Austausch und der spezifischen Carbamatreduktion verschiedene Techniken evaluiert werden, die die Isotopenmarkierung von APL-Liganden ermöglichen. Die direkte Lokalisierung der APL-Bindungsstelle mit massenspektroskopischen Methoden gelang leider nicht. Eine zukünftige Verwendung von isotopenmarkierten APL, in Kombination mit geeigneteren Proteasen, würde dieses Ziel mit hoher Wahrscheinlichkeit erreichbar machen. Es war jedoch trotzdem möglich, weite Bereiche des extrazellulären Teils als Bindungsregion auszuschließen. Es verbleibt ein relativ kleiner Bereich an der α -Untereinheit des nAChR unterhalb von LYS125 und THR202, an dem eine Bindung von APL-Liganden wahrscheinlich ist.

Es wurde ein detailliertes, membrangebundenes und voll solvatisiertes Modell des nAChR erstellt. Sein dynamisches Verhalten in MD-Simulationen

bei An- und Abwesenheit von ACh ermöglicht Einblicke in die Funktionsweise des Rezeptors. Die Verwendung verschiedener Rezeptorkonformere aus den dynamischen Simulationen für das Docking von ACh und verschiedenen APL steigert erheblich die Qualität der vorhergesagten Bindungsmodi. Es konnte eine Häufung der Bindung von APL in dem selben Bereich, der schon über die Massenspektroskopie identifiziert wurde, festgestellt werden. Ergänzt werden die Erkenntnisse über das Öffnungsverhalten des nAChR durch Analyse von Dichteprofilen des Wassers in der Pore und gesteuerte Molekulardynamik bei der ein Natriumion durch den Kanal bewegt wird. Hierbei konnten wichtige Aspekte der Funktionsweise des Gates (LEU248) und die für die Ionen beim Kanaldurchtritt zu überwindende Energiebarriere aufgeklärt werden.

Auf Basis von bekannten APL's konnte ein Pharmacophor erstellt werden, mit dessen Hilfe es gelang zwei neue Leitstrukturen zu identifizieren. Eine der gefundenen Verbindungen zeigt eine derart gute Aktivität, dass es das Potential zu einem neuen Medikament hat.

Anhand der Inhibitoren der AChE wurde die dynamische "Linear Interaction Energy" Methode zur präzisen Vorhersage von Bindungsaffinitäten implementiert und mit Dockingresultaten verglichen. Die Qualität der Prognosen besticht durch ihre Genauigkeit, wodurch eine effiziente Unterstützung bei der Überprüfung von neuen Leitstrukturen auf ihre Inhibitionsfähigkeit der AChE gegeben ist.

Das Dissoziationsverhalten von β -Amyloiden wurde unter verschiedenen Bedingungen molekulardynamisch untersucht. Es konnten Bereiche (β 2-Strang \approx 31 - 36) lokalisiert werden, die besonders starken Anteil an der Stabilität der Aggregate haben. Eine Belegung dieser Bereiche mit geeigneten Substraten würde die Bildung von Amyloidfibrillen unterbinden und den Weg für eine kausale Alzheimertherapie öffnen.

10. DURCHFÜHRUNG UND EXPERIMENTE

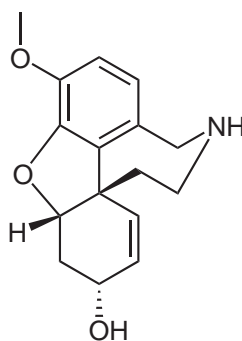
Bei allen praktischen Arbeiten wurden Chemikalien, Zubereitungen und Lösungsmittel von bekannten üblichen Lieferanten (Sigma-Aldrich, Invitrogen, Lancaster, Acros, Fluka) bezogen. Sofern nötig wurden diese in herkömmlicher Art vor Gebrauch umkristallisiert beziehungsweise getrocknet und destilliert [168]. Sollte eine spezielle Zubereitung verwendet worden sein, so ist dies im entsprechenden Kapitel explizit vermerkt.

NMR Spektren wurden mit einem Bruker ARX 200 und einem Bruker AV 500 aufgenommen. Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT 8230, IR-Spektren mit einem FT-IR Spektrometer NICOLET 510 P und UV-VIS-Spektren mit einem Shimadzu UV-2101PC gemessen.

Bestrahlungen mit UV-Licht wurden mit einer Xenon Kurzbogen-UV-Lampe des Typs Osram XBO 150W/1, in einem Lampengehäuse (Typ LAX) der Firma Müller Elektronik Optik mit entsprechender Stromversorgung (Typ SVX 1450) ausgeführt.

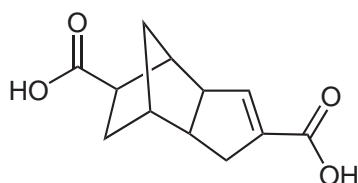
HPLC-Chromatogramme wurden mit einer Hewlett-Packard 1090 Series II auf einer Phenomex Säule (Synergi 4 μ Fusion RP 80 250 \times 4.60 mm 4 micron) gemessen. Galanthamin, Codein und ihre Derivate wurden bei einer Wellenlänge von 285 nm detektiert und ein konstantes Eluentenverhältnis (25/75 H₂O/MeOH) verwendet.

10.1 Synthese von Photogalanthamin

(-)-11-Demethylgalanthamin (**5**) $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3$

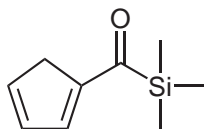
mw 273.33

Zu einer Lösung von 190 mg (-)-Galanthamin (**1**, 0.66 mmol) in 3.5 ml CH_2Cl_2 werden 230 mg *m*-CPBA (50%, 0.66 mmol) gegeben und für 40 min gerührt. Nach Zugabe von 92 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.33 mmol) in 1 ml MeOH wird für 20 min weitergerührt. Es werden 2.5 ml 5%iger HCl zugetropft und anschließend die organischen Lösungsmittel abgezogen. Es wird dreimal mit je 1 ml Diethylether gewaschen und der organische Teil verworfen. Nach der Zugabe von 1 ml 25%iger NH_3 -Lösung wird dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Eine chromatographische Aufreinigung zur Abtrennung von nicht umgesetzten **1** ist für die folgenden Syntheseschritte nicht notwendig. Es ergibt sich eine Ausbeute von 171 mg (0.63 mmol, 95%). Die Reinheit wurde mit Hilfe analytischer HPLC überprüft [48, 67].

Dicyclopentadiendicarbonsäure (**2**) $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$

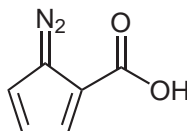
mw 220.23

Es werden 60 ml Dicyclopentadien (0.450 mol) bei 190 °C gecrackt und auf eine Suspension von 10 g Natrium (0.435 mol) in 300 ml THF überdestilliert. Die sich dunkelrot verfärbende Suspension wird für wenigstens 12 h gerührt, bis sich sämtliches Natrium gelöst hat. Man leitet für 30 min CO_2 -Gas ein, wobei sich die Lösung zu einem hellen Brei verdickt. Dieser wird vorsichtig mit 200 ml Wasser gequenchet. Die flüchtigen Bestandteile werden am Rotationsverdampfer abgezogen. Im Eisbad wird zu der verbliebenen wässrigen Phase unter Rühren 6 N Schwefelsäure getropft, wodurch (**2**) ausfällt. Nach Filtration und Trocknung erhält man 27.2 g (124 mol) eines weißen Pulvers mit einem Schmelzpunkt von 203.9 °C (Lit. 197 - 201 °C [62]), was einer Ausbeute von 28% entspricht.

Trimethylsilylcyclopentadiencarbonsäureester (**3**) $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2\text{Si}$

mw 182.30

2.5 g frisch destilliertes Trimethylchlorsilan (23 mmol) werden unter Stickstoff zu einer Suspension von 2.5 g Dicyclopentadiendicarbonsäure (**2**, 11 mmol) in 50 mL getrocknetem Benzol getropft. Hierzu werden langsam 1.9 mL Pyridin getropft, wobei Pyridinhydrochlorid ausfällt. Es wird für 6 h gerührt und anschließend abfiltriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels, wird der als Dimer vorliegende Ester bei 170 °C gecrackt. Das Monomer siedet bei 72-76 °C (1.2 mbar) und wird überdestilliert. Man erhält 3.1 g (17 mmol, 77.3%) einer klaren sehr hydrolyseempfindlichen Flüssigkeit [63].

5-Diazo-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure (**4**) $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$

mw 136.11

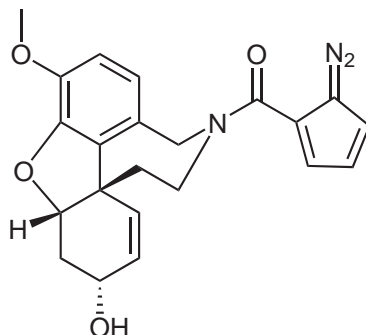
1.4 g Trimethylsilylcyclopentadiencarbonsäureester (**3**, 7.68 mmol) und 1.4 g

(7.81 mmol) *p*-Toluolsulfonylazid werden in 13.2 mL trockenem Diethylether suspendiert. Mit flüssigem Stickstoff wird die Reaktionslösung eingefroren. Zum gerade auftauenden Gemisch werden tropfenweise 0.8 mL frisch destilliertes Piperidin gegeben. Man lässt dieses langsam erwärmen und rührt für 18 h, wobei die Apparatur abgedeckt wird, um sie gegen Lichteinfall zu schützen. Es wird abdekantiert und dreimal mit 7.5 mL wässriger NaHCO₃ (5%) extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 2.5 mL 1 *N* HCl angesäuert und dreimal mit 10 mL Diethylether extrahiert. Der orange Rückstand wird über 60 g Kieselgel (Diethylether/Cyclohexan (25/75)) chromatographiert. Man erhält 0.426 g (3.38 mmol, 44.0%) hellgelber Nadeln [63].

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 6.14 (t, *J* = 3.3 Hz, 1 H), 6.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.11 (d, *J* = 4.6 Hz, 1 H), 10.81 (s, 1 H).-

Photogalanthamin (6)

(5-Diazo-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure-11-demethylgalanthamin-amid)



C₂₂H₂₁N₃O₄

mw 391.43

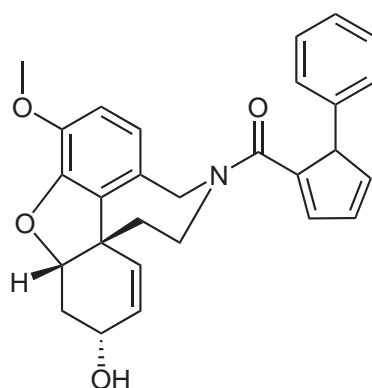
0.965 g 5-Diazo-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure (**4**, 7.096 mmol), (-)-11-De-methylgalanthamin (**5**, 1.86 g, 6.813 mmol) und 0.103 g DMAP (0.844 mmol) werden in 25 mL CH₂Cl₂ gelöst. Die Apparatur wird gegen Lichteinfall geschützt und abgedeckt. 1.533 g DCC (7.442 mmol) werden in 5 mL CH₂Cl₂ aufgenommen und bei Raumtemperatur langsam zugetropft. Aus der dunklen Lösung fällt ein weißer Feststoff aus. Es wird über Nacht gerührt und der Reaktionsfortschritt mit Dünnschichtchromatogrammen (Laufmittel: Ethylacetat) verfolgt. Die Reaktionslösung wird über Kieselgel filtriert und mit Ethylacetat ausgewaschen. Es wird einmal mit 10 mL gesättigter NaHCO₃ und zweimal mit 10 mL 1 N HCl ausgeschüttelt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum verbleibt ein gelb-brauner Rückstand, der über 100 g Kieselgel (Ethylacetat) chromatographiert wird. Es ergibt sich eine Auswaage von 0.938 g an lichtempfindlichen hellgelben Nadeln (2.512 mmol, 36.8%), deren Reinheit mit analytischer HPLC überprüft wurde.

R_f: 0.45 (LM: Ethylacetat)

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 6.97 (d, J = 4.6 Hz, 1 H), 6.79 (m, 2 H), 6.44 (b, 1 H), 6.03 (m, 3 H), 4.67 (b, 1 H), 4.18 (m, 2 H), 3.85 (s, 3 H), 3.52 (m, 1 H), 2.78 (d, J = 15.6 Hz, 1 H), 2.1 - 1.2 (m, 5 H).-

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 152.3 (C), 147.2 (C), 144.9 (C), 133.0 (CH), 129.1 (C), 128.7 (CH), 127.1 (CH), 125.7 (C), 125.3 (C), 122.6 (CH), 122.1 (CH), 119.4 (C), 117.8 (CH), 111.2 (CH), 88.2 (CH), 61.7 (CH), 55.7 (CH₃), 48.9 (C), 33.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 25.4 (CH₂), 24.7 (CH₂).-

m/z (ESI): 391.1 (M⁺, C₂₂H₂₁N₃O₄), 363.1 (100%, M⁺ - N₂).

5-Phenyl-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure-11-demethylgalanthamin-amid (**7**) $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_4$

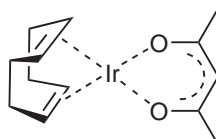
mw 441.19

25 mg Photogalanthamin (**6**, 0.064 mmol) werden in 250 μL frisch destilliertem Benzol gelöst. Die Lösung wird in eine 1 mm starke Quarzglasküvette überführt und mit UV-Licht bestrahlt. Dabei wird ein Cut-Off-Filter verwendet, der nur den Wellenlängenbereich auf 265-360 nm passieren lässt. Nach 0, 1 und 4 min werden Proben entnommen und mit der HPLC vermessen (H_2O /Methanol 25/75, konstant, 1.0 mL/min). Das Massenspektrum wird direkt aus der Reaktionslösung gemessen.

m/z (ESI): 441.3 (M^+ , $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_4$), 363.1 (100%, $\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_6$).-

10.2 Iridium katalysierter H/D-Austausch

Cyclooctadieniridium(I)acetylacetonat (**8**)



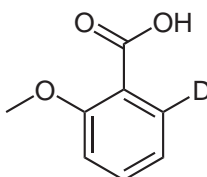
$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{IrO}_2$

mw 401.11

Zur Herstellung von Cyclooctadieniridium(I)acetylacetonat (**8**) werden $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2$ (250 mg, 0.372 mmol) in 2 mL entgasten Diethylether für 20 min unter Argon bei Raumtemperatur gerührt, bis es sich vollständig gelöst hat. Acetylaceton ($80\ \mu\text{L}$, 0.773 mmol) wird tropfenweise mit Hilfe einer Spritze zur Reaktionslösung getropft. Die Lösung wird für weitere 10 min gerührt und dann mit 2.0 mL destilliertem Wasser versetzt. Dabei verfärbt sich die Lösung, bis sie eine dunkelbraune Farbe angenommen hat. Es bildet sich der Niederschlag eines gelben Feststoffs. Für eine weitere Stunde wird weiter gerührt, bevor der Diethylether am Vakuum abgezogen wird. Der gelbe Feststoff wird abfiltriert und dreimal mit kleinen Portionen destillierten Wassers gewaschen (3 mL). Die Kristalle werden über Nacht getrocknet, um eine Ausbeute von 215 mg (0.538 mmol, 73%) an feinen gelben Nadeln von **8** zu erhalten. ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1.66$ (d, $J = 7.6$ Hz, 4 H), 2.04 (s, 6 H), 2.28 (m, 4 H), 4.02 (s, 4 H), 5.55 (s, 1 H) ppm [73, 74].

Reaktionsführung. Die Reaktionen wurden im wesentlichen alle unter gleichen Bedingungen ausgeführt. Dies beinhaltet im Kern, eine Mischung aus dem zu markierenden Substrat und **8** bei 90 °C für 2 h in DMA zu rühren. In einigen Fällen war es jedoch nötig die Reaktionsführung leicht zu variieren. Die Modifikationen waren unter anderem, die Anpassung des Lösungsmittelvolumens, Änderungen der Menge an eingesetztem D₂O, die alternative Verwendung von D₂ als Isotopenquelle, Variationen des Substanz zu Katalysator Verhältnisses, der Verzicht auf Rückflusskühlung, wenn die Reaktion in einem Minireaktor ausgeführt wurde und die Anpassung von Temperatur und Reaktionsdauer. Klare Unterschiede gab es jedoch nur bei der Aufarbeitung, die sich aus den Notwendigkeiten bei der Isolierung von sauren und basischen Verbindungen ergeben. Die folgenden Abschnitte zeigen anhand von repräsentativen Verbindungen jeder Substanzklasse, wie die Deuterierungsreaktionen durchgeführt wurden.

Säuren: 2-Methoxybenzoesäure (**9**)



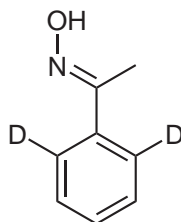
C₈H₇DO₃

mw 153.05

2-Methoxybenzoesäure (**9**; 102 mg, 0.67 mmol) und **8** (10.2 mg, 0.026 mmol) werden in einem 1 mL Minireaktor unter Argon in DMA (0.65 mL) gelöst.

0.1 mL D₂O werden mit Hilfe einer Spritze tropfenweise unter Rühren zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 2 h bei 90 °C gehalten und dann langsam abgekühlt. Bevor man dreimal mit je 15 mL Ether extrahiert, wird die Reaktionslösung mit 20 mL Wasser versetzt und mit 5 mL 1 N HCl angesäuert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum, erhält man das deuterierte Produkt. Zur Identifizierung werden ¹H-NMR, ¹³C-NMR und Massenspektren aufgenommen [72].

Neutrale Verbindungen: Acetophenonoxim (**14**)



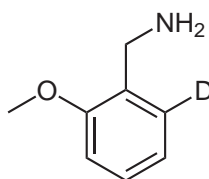
C₈H₇D₂NO

mw 137.08

Acetophenonoxim (**14**; 100 mg, 0.74 mmol) und **8** (11.6 mg, 0.029 mmol) werden in einem 50 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler in DMA (7.6 mL) gerührt, bis sich alles gelöst hat. Unter Argon werden 2.4 mL D₂O tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 2 h bei 90 °C gehalten und dann langsam abgekühlt. Bevor man dreimal mit je 15 mL Ether extrahiert, wird die Reaktionslösung mit 20 mL Wasser versetzt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Nach dem Abziehen des Lösungs-

mittel im Vakuum, erhält man das deuterierte Produkt. Zur Identifizierung werden ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Spektren aufgenommen [72].

Amine und Alkohole: 2-Methoxybenzylamin (**16**)

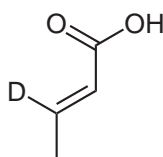


$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{DNO}$

mw 138.19

Komplex **8** (10.1 mg, 0.025 mmol) wird in einem 1 mL Minireaktor unter Argon vorgelegt. 0.4 mL DMA werden zugegeben und solange gerührt bis sich alles gelöst hat. Hierzu wird zunächst 2-Methoxybenzylamin (**16**; 80 μL , 0.65 mmol) mit Hilfe einer Spritze zugetropft, und anschließend 0.1 mL D_2O auf die gleiche Weise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 2 h bei 90 °C gehalten und dann langsam abgekühlt. Die Lösung wird mit 20 mL 12.5% NH_3 versetzt und der pH-Wert kontrolliert, bevor man dreimal mit je 20 mL Ether extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum, wird das deuterierte Produkt im Hochvakuum nachgetrocknet und von Lösungsmittelresten befreit. Zur Identifizierung wird ein ^1H -NMR Spektrum aufgenommen [72].

Allylische Systeme: *trans*-Crotonsäure (**18**)

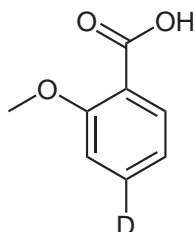


$\text{C}_4\text{H}_5\text{DO}_2$

mw 87.04

trans-Crotonsäure (**18**; 74.0 mg, 1.16 mmol) und **8** (13.5 mg, 0.034 mmol) werden in einem 10 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler unter Argon in DMA (2.0 mL) gerührt, bis sich alles gelöst hatte. Dann wird 1.0 mL D_2O tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 4 h bei 90 °C gehalten und dann langsam abgekühlt. Die Mischung wird mit 10 mL 1 N HCl versetzt, bevor man dreimal mit je 5 mL Butanol extrahiert. Die organische Phase wird gefiltert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und dann im Hochvakuum für 2 h getrocknet. Vom deuterierten Produkt wird ein ^1H -NMR Spektrum aufgenommen [72].

Deuteriumgas: 2-Methoxybenzoesäure (**9**)



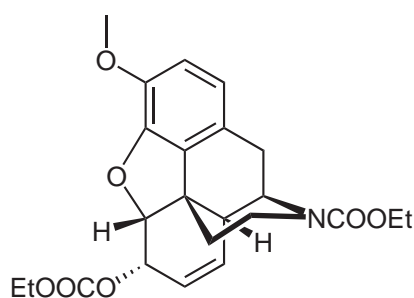
$\text{C}_8\text{H}_7\text{DO}_3$

mw 153.05

2-Methoxybenzoesäure (**9**; 102 mg, 0.67 mmol) und **8** (10.2 mg, 0.026 mmol) werden in einem 50 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler gegeben. Das Reaktionsgefäß wird evakuiert und mit Argon gespült, um allen Sauerstoff zu entfernen. Es werden 7.6 mL DMA zugegeben und solange gerührt, bis sich alles gelöst hat. Dann wird ein Ballon mit etwas 50 mL D_2 an die Apparatur angeschlossen. Somit hat die Gasphase eine Zusammensetzung von einem Teil Argon und zwei Teilen Deuterium. Die Reaktionsmischung wird für 2 h bei 90 °C gehalten, wobei sich die zunächst gelbe Lösung dunkelbraun verfärbt und sich ein schwarzer Niederschlag bildet. Dann wird die Mischung mit 20 mL Wasser versetzt und mit 5 mL 1 N HCl angesäuert, bevor man dreimal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum, wird das deuterierte Produkt im Hochvakuum nachgetrocknet und von Lösungsmittelresten befreit. Zur Identifizierung werden ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Spektren aufgenommen [72].

10.3 Carbamatreduktion

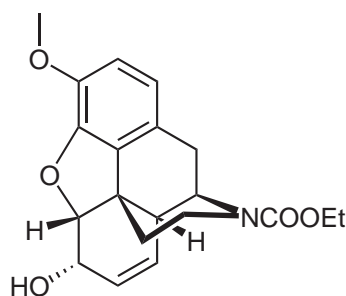
Codeindicarbamat (**28**)



$C_{23}H_{27}NO_7$

mw 429.18

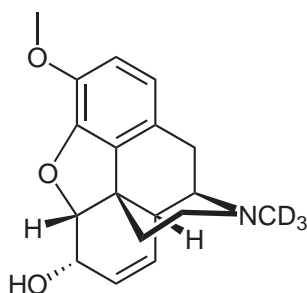
250 mg (-)-Codein (**27**, 0.8 mmol) werden zusammen mit 1 g KOH in 5 mL $CHCl_3$ zusammengegeben. Hierzu wird bei 0 °C langsam 1 mL Ethylchloroformiat getropft. Die Lösung wird mit 1.0 mL H_2O versetzt und für 18 h gerührt. Anschließend werden 10 mL H_2O zur Reaktionslösung gegeben und dreimal mit je 10 mL $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 10 mL 1 N HCl gewaschen. Dann wird die saure wässrige Phase noch dreimal mit je 10 mL $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Es wird über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum verbleiben 320 mg Produkt (0.75 mmol, 93%) [92].

Codeincarbamat (**29**) $C_{20}H_{23}NO_5$

mw 357.16

Ohne weitere Aufreinigung wird das rohe Codeindcarbamat (**28**, 320 mg, 0.75 mmol) in 8 mL Ethanol gelöst und mit 2 mL 1 N KOH versetzt. Es wird für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in wenig Methanol aufgenommen und auf eine präparative Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Nach der Auftrennung (90/9/1 $CHCl_3/MeOH/NH_3$) wird das Produkt mit $CHCl_3$ vom Kieselgel gewaschen. Es wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Es ergibt sich eine Ausbeute von 120 mg Codeincarbamat (**29**, 0.34 mmol, 45%) [92].

(-)-11- $^{[2]}\text{H}$]-Codein (**30**)



10.4 Proteinmarkierung

Das zu markierende Protein wird mit einer 2 mM Lösung Photogalanthamin (**6**) versetzt und gründlich durchmischt. Die Konzentrationen und das Verhältnis von Protein zu Label sind von der entsprechenden Messreihe abhängig und unterscheiden sich bei nAChR und AChE. Es wird für 30 min bei 4 °C inkubiert und zwischendurch immer wieder durchmischt. Die Probe wird dann für 2-4 min mit UV-Licht bestrahlt. Dieses ist durch einen Cut-Off-Filter (265-360 nm) begrenzt, um Schädigungen des Protein zu vermeiden. Auch hier wird die Probe immer wieder durchmischt. Die bei normalem Tageslicht gelbe Lösung fluoresziert bei der Bestrahlung bläulich. Die Probe wird anschließend direkt weiterverarbeitet (Elektrophorese, Ellman-Test) oder bei -18 °C gelagert.

10.5 Elektrophorese

Trenngelkonzentration [%]	8	9	10	12
30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid	4.00	4.50	5.00	6.00
4× Laufpuffer	3.75	3.75	3.75	3.75
H ₂ O	7.25	6.75	6.25	5.25
10% APS	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01

Reagenzien

Probenpuffer: NuPage LDS Sample Buffer (4×); Glycerol 40%, Tris Base 564 mM, Tris HCl 424 mM, LDS 8%, EDTA 2.04 mM, Serva Blue G250 0.88 mM, Phenol Red 0.70 mM, H₂O, pH 8.5

Laufpuffer: NuPage Tris-Acetate SDS Running Buffer (20×); Tricine 1 M, Tris Base 1 M, SDS 2%, H₂O, pH 8.25

Färbelösung: 1 g R250 Coomassie, 10% Methanol, 5% Essigsäure, H₂O

Entfärbelösung: 10% Methanol, 5% Essigsäure, H₂O

Molekularer Standard: SeeBlue Pre-Stained Marker (Invitrogen)

Trenngel

In einem 10 mL Kunststoffgefäß werden 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid und der auf 4× verdünnte Laufpuffer mit H₂O gemischt (siehe Tabelle). Die Lösung wird für 5 min im Vakuum entgast. Es werden 10% APS und TEMED zugegeben und vorsichtig umgeschwenkt. Die Lösung wird, bis 1 cm unter den Rand, zwischen entsprechende Glasplatten gegossen und mit Ethanol überschichtet. Die Polymerisation ist nach 10 bis 20 min abgeschlossen.

Sammelgel

In einem 10 mL Kunststoffgefäß werden 0.65 mL 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid und 1.25 mL des auf 4× verdünnten Laufpuffers mit 3.05 mL H₂O gemischt. Der pH-Wert wird mit 1 N HCl auf 6.8 eingestellt. Die Lösung wird für 5 min im Vakuum entgast. Es werden 25 µL 10% APS und 5 µL TEMED zugegeben und vorsichtig umgeschwenkt. Das Ethanol wird abgegossen und die Sammelgellösung eingefüllt. Nach einsetzen eines Kammes dauert es 10 bis 20 min, bis die Polymerisation abgeschlossen ist.

Probenvorbereitung/Elektrophorese

Die gewünschte Menge Protein wird mit 5 µL Probenpuffer und 1 µL β-Mercaptoethanol versetzt und mit H₂O auf 20 µL aufgefüllt. Die Probe wird für 5 min bei 95 °C inkubiert und dabei mehrfach durchmischt.

Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Laufpuffer eingefüllt. Nachdem alle Taschen befüllt sind, wird für 60 min eine Spannung von 150 V angelegt. Die Laufdauer muss abhängig von der Gelkonzentration jeweils um einige Minuten angepasst werden.

Färbung

Das Gel wird für 30 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend mit Wasser gründlich abgespült. Anschließend verbleibt das Gel für wenigstens 12 h in der Entfärbelösung, bis ein ausreichender Kontrast erreicht ist.

10.6 Ellman-Test

Die Enzymaktivität der AChE und ihre Inhibierung mit geeigneten Liganden, kann mit Hilfe des Ellman-Tests bestimmt werden [93]. Die Messungen werden bei 25 °C und mit einer totalen Proteinkonzentration von 0.012 mg/mL durchgeführt. Die Esterase stammt aus einer früheren Präparation und wurde bei -18 °C gelagert [22]. Hierzu wird zu 880 μL Na_2HPO_4 -Puffer (100 mM, pH 8.0) 10 μL DTNB-Lösung (30 mM) und 10 μL AChE-Lösung (1.2 mg/mL) gegeben. Wenn ein Inhibitor vermessen werden soll, werden noch weitere 10 μL der entsprechenden Lösung geeigneter Konzentration zugegeben. Es wird alles in einer Küvette durchmischt und mit 100 μL ASCh (5 mM) versetzt. Da die Farbreaktion sofort einsetzt, wird die Probe direkt vermessen. Es wird die Veränderung der Absorption über die Zeit aufgenommen. Die Steigung des linearen Verlaufs ist direkt proportional zur (inhibierten) Aktivität der AChE.

10.7 Peptidanalyse

Die Messungen wurden zusammen mit Michael Küpper im Institut für Molekulare Biotechnologie der RWTH Aachen beziehungsweise am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie durchgeführt.

Enzymatischer Verdau

Das Elektrophoresegel wird gründlich mit Wasser gewaschen und die gewünschte Bande möglichst scharf ausgeschnitten. Das Gelfragment wird grob zerkleinert und in 1.5 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Gelpartikel werden mit 100 - 150 μ L Wasser gewaschen. Anschließend wird abzentrifugiert und die Flüssigkeit entfernt. Es werden 200 μ L Acetonitril zugegeben und etwa 15 min gewartet, bis das Gel geschrumpft ist. Es wird wieder abzentrifugiert und die Flüssigkeit entfernt. Die Gelpartikel werden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend mit einer 10 mM Dithiotreitol / 0.1 M NH_4HCO_3 Lösung überschichtet. Es wird für 30 min bei 56 °C inkubiert. Es wird abzentrifugiert, die Flüssigkeit entfernt und wieder mit Acetonitril das Gel zum schrumpfen gebracht. Das Acetonitril wird durch eine 55 mM Iodoacetamid / 0.1 M NH_4HCO_3 Lösung ersetzt und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Iodoacetamidlösung wird entfernt und die Gelpartikel für 15 min mit 150 - 200 μ L 0.1 M NH_4HCO_3 gewaschen. Es wird abzentrifugiert, die Flüssigkeit entfernt und wieder mit Acetonitril das Gel geschrumpft. Nach Entfernung des Acetonitrils werden die Partikel in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die Gelpartikel werden im Verdauungspuffer (50 mM NH_4HCO_3 , 5 mM CaCl_2 und 12.5 ng/ μ L Protease [Trypsin oder GluC]) für 30 - 45 min bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wird entfernt und 5 - 25 μ L des selben Puffers, aber ohne Protease, verwendet, um die Gelpartikel zu überschichten. Es wird über Nacht bei 37 °C inkubiert, wobei die Fragmente feucht gehalten werden sollen.

Es werden 10 - 15 μ L 25 mM NH_4HCO_3 zugegeben und für 15 min unter schütteln bei 37 °C inkubiert. Es wird abzentrifugiert und mit Acetonitril versetzt, um anschließend wieder für 15 min unter schütteln bei 37 °C zu

inkubieren. Nach dem Zentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit gesammelt. Es werden 40 - 50 μL 5%-iger Ameisensäure zugegeben und 15 min bei 37 °C gevortext. Die Gelpartikel werden erneut mit Acetonitril versetzt, um anschließend wieder für 15 min unter schütteln bei 37 °C zu inkubieren. Die beiden Extrakte werden vereinigt und mit einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Entsalzung

Die getrocknete Probe wird mit 10 μL 5%-iger Ameisensäure versetzt. Die ZipTip $_{\mu-C18}$ wird fünfmal mit einer Lösung aus 1.25% Ameisensäure, 23.75% Wasser und 75.00% Acetonitril gespült. Der Tip wird mit einer Lösung aus 5% Ameisensäure und 95% Wasser equilibriert. Die Peptide werden an das ZipTip $_{\mu-C18}$ gebunden, indem zehnmal sorgfältig mit der Probenlösung gespült wird. Anschließend wird fünfmal mit einer Lösung aus 5% Ameisensäure und 95% Wasser gewaschen. Die Peptide werden eluiert, indem zehnmal sorgfältig mit 4 μL einer Lösung aus 1.25% Ameisensäure, 23.75% Wasser und 75.00% Acetonitril gespült wird.

Massenspektroskopie

Es werden etwa 2 μL des Peptideluats in eine Nanospray-Glaskapillare überführt. Die Probe wird bei einem geeigneten Gasstrom in das Micromass Electrospray Q-ToF-2 eingesprüht und vermessen. Die Signale werden mit der entsprechenden Gerätesoftware umgewandelt und ausgewertet. Die Peptidentifikation wird durch Suche in der MASCOT-Datenbank unterstützt.

10.8 APL-Aktivität

Die Messungen wurden von Dr. Marek Samochocki bei der Galantos Pharma AG in Mainz nach folgendem Protokoll ausgeführt.

Whole-Cell Leitfähigkeitsmessungen werden mit einem LM-EPC-7 Patch-

Clamp System (List, Darmstadt) an nAChR exprimierenden 3 Tage alten HEK-293 Zellen durchgeführt. Die Badlösung besteht aus 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM *D*-Glukose und 10 mM HEPES (pH 7.3; 300 mOsM) und die Pipettenlösung enthält 140 mM CsCl (equilibriert mit CsOH), 11 mM EGTA, 10 mM HEPES und 1 mM MgCl₂ (pH 7.3; 300 mOsM). Die Patchmikroelektroden bestehen aus Borosilikat, haben einen externen Durchmesser von 1.6 mm und zeigen einen Widerstand von 5 bis 7 M Ω , wenn sie mit der internen Lösung befüllt sind. Nach der Bildung eines hochwiderstandsfähigen Siegels mit der Zellmembran, wird der Kapazitätstransient mit der, im System integrierten C-Fast Funktion minimiert. Es werden keine weiteren Kapazitäts- oder Widerstandsanpassungen vorgenommen. Alle Experimente werden bei Raumtemperatur mit einem Haltepotential von -70 mV durchgeführt. Whole-Cell Leitfähigkeiten werden durch die schnelle Applikation der Substanzen von Interesse induziert, indem die Zellen mit ihnen über ein U-förmiges Röhrchen mit einer Flussrate von 0.5 bis 1.0 mL/min angespült werden. Um eine Akkumulation des Testverbindungen im Bad zu vermeiden, werden die Zellen mit der Badlösung bei gleicher Flussrate umspült. Bei den meisten Experimenten wird, um intrinsische muskarinische Antwortsignale zu unterdrücken, den entsprechenden Lösungen 1 μ M Atropine zugesetzt. Die Signale werden bei 3.15 kHz (Bessel) gefiltert, auf 10 kHz digitalisiert und mit dem pClamp Softwarepaket (Version 6.03, Axon Instruments, Inc., Foster City, CA).

11. SIMULATIONEN

Alle virtuellen Experimente und Simulationen wurden auf gängigen PC-Systemen mit handelsüblichen Intel oder AMD Chipsätzen vorbereitet, beziehungsweise auch durchgeführt. Bei großen und langwierigen Problemstellungen wurde auf den Arminius-Cluster des PC² der Universität Paderborn gerechnet. Dieses System besteht aus 200 dual CPU (Xeon 3.2 GHz) Knoten mit je 4 Gb Speicher. Verbunden sind sie mit einem extrem schnellen Scali-Netzwerk mit Infiniband Netzwerkkarten.

Folgende Software wurde zur Lösung der verschiedenen Problemstellungen verwendet.

concoord	Konformergenerierung
gridcount	Dichteanalyse
GROMACS	MD-Simulationen, PCA und Auswertung
HOLE	Porendurchmesser
Microsoft Excel	Kalkulationen und Graphen
MOE	Systemvorbereitung, Simulationen und Visualisierung
rasmol	Analyse
VMD	Analyse und Visualisierung
xfarbe	Dichteplots
xmgrace	Graphen

11.1 Docking

Für Dockinguntersuchungen wurde das Tool aus dem MOE-Paket verwendet [95]. Rezeptor und Ligand wurden jeweils auf korrekte Protonierung, Atomtypen und Bindungszustände überprüft und bei Bedarf angepasst. Der Suchraum wurde teilweise durch die Verwendung von Alpha-Spheres, die mit dem MOE-Site-Finder erstellt wurden, limitiert. Als Placementmethode wurde Alpha-PMI mit 1000 Samples per Conformation und 25000 Maximum Poses benutzt. Die Resultate wurden nach der Standardscorefunktion bewertet. Zusätzlich wurden die, mit Hilfe des Scripts dock-rmsd.svl berechneten, RMSD-Werte zur Beurteilung herangezogen.

11.2 Homologie Modelling

Zur Erstellung von Homologie Modellen wurden die in dem MOE-Paket integrierten Funktionen verwendet [95]. Zunächst wurde der gewünschte Sequenzabschnitt mit dem Templat align (Austauschmatrix: BLOSUM62). Anschließend wurde der zu modellierende Bereich und die unveränderliche Umgebung, wie benachbarte Untereinheiten, Kristallwasser oder Liganden, definiert. Sofern vorhanden wurden die Backbonekoordinaten übernommen und über eine Rotamersuche günstige Seitenkettenpositionen ermittelt. Wenn sich aus dieser Kombination eine energetisch günstige Struktur ergibt, wurde diese gespeichert. Aus hundert dieser Rohmodelle wurde das mit der besten Packungsdichte ausgewählt und minimiert.

11.3 Molekular Dynamik

Für molekulardynamische Simulationen wurde das Programmpaket GRO-MACS (3.2.1 und 3.3-beta) verwendet [109]. Alle Simulationen wurden unter periodischen Randbedingungen, meist in einer partiell flexiblen tetragonalen Box ausgeführt. Für die voll solvatisierten Systeme wurde ein flexibles SPC-Wassermodell verwendet. Die Simulationssysteme wurden als NPT Ensemble behandelt. Die Temperatur wurde mit einem Berendsenthermostat bei 300 K und der Druck mit einem Berendsenbarostat bei 1 bar gehalten. Die elektrostatischen Wechselwirkungen wurden im allgemeinen mit der Particle-Mesh-Ewald Methode berechnet. Für die LIE-Untersuchungen wurde hierfür mit einer Shiftmethode gerechnet, wobei das Potential bis 1.0 nm akkurat bestimmt wird und dann bis 1.2 nm kontinuierlich bis auf null abfällt. Die Integrationsschrittweite betrug 2 fs.

Es wurden das ffgmx- und das ffG43a1-Kraftfeld verwendet. Topologieparameter für diverse Liganden wurden mit dem Dundee-PRODRG2-Server erstellt und, wenn nötig, angepasst und optimiert. Für DPPC wurden die von Peter Tieleman erstellten Topologien und Strukturen verwendet (<http://moose.bio.ualgary.ca>).

Die verschiedenen Systeme wurden alle schrittweise equilibriert, wobei das Protein und andere relevanten Bestandteile zunächst mit einem Constraint von 1000 kJ/mol fixiert wurden. Die Beschränkungen wurden nacheinander abgebaut. Je nach Systemgröße wurden hierfür von einigen Piko- bis zu mehreren Nanosekunden aufgewendet.

11.4 CONCOORD - PCA

Auf Basis von Kristallstrukturen oder gründlich minimierten Modellen wurden mit CONCOORD 500 bis 10000 Konformere der betreffenden Struktur generiert. Diese wurden dann mit dem im GROMACS-Paket enthaltenen Funktionen in eine Covarianzmatrix überführt, diagonalisiert und Eigenwerte und -vektoren bestimmt. Überlappungsberechnungen und Projektionen wurden mit xmgrace und VMD visualisiert.

11.5 HOLE

Für die Bestimmung des Durchmessers von Poren mit dem Programm HOLE (<http://hole.biop.ox.ac.uk/hole>) wurden aus der GROMACS-Trajektorie zu bestimmten Zeiten entsprechende PDB-Files extrahiert. Auf jedes dieser Strukturfiles wurde das Programm HOLE mit seinen Standardeinstellungen angewendet. Das Programm bewegt sich auf einer Ebene senkrecht zur Porenachse und ermittelt eine maximale Sphere, die gerade so groß ist, dass sie nicht mit der van der Waals Oberfläche eines Porenatoms überlappt. Nun wird die Ebene in Richtung der Porenachse verschoben und erneut eine Sphere bestimmt. Dieser Vorgang wird über die gesamte Länge der Pore wiederholt, so dass man auf jeder Höhe den Durchmesser erhält.

Der Radius auf einer bestimmten relativen Höhe (LEU248), deren Absolutwert sich aus dem Strukturfile ergibt, wurde gegen die Zeit aufgetragen.

11.6 GRIDCOUNT

Mit dem Tool GRIDCOUNT (<http://sbc.bioch.ox.ac.uk/oliver/software>) wurde die Wasserverteilung in der transmembranen Pore bei molekuldynamischen Simulationen bestimmt.

namischen Simulationen untersucht. Der Abstand der Gridpunkte betrug 0.05 nm. Es wurde auf die zentrale Achse der Pore zentriert und mit variablem Radius die An- oder Abwesenheit von Wassermolekülen zeitabhängig ausgewertet. Die seitliche Ansicht der Simulationsbox, was der XZ- beziehungsweise YZ-Ebene entspricht, wurde mit Hilfe von xfarbe (<http://www.fhi-berlin.mpg.de/gnz/pub/xfarbe>) visualisiert. Der Farbverlauf wurde mit 16 gleichbleibenden Niveaus für eine Dichte von 0 bis 1 g/mL angepasst.

11.7 Pharmacophor

Für die Erstellung des Pharmacophors wurden Microsoft Excel und MOE verwendet [95]. Die Liste der vermessenen APL wurde in Excel anhand der Messwerte für den maximalen Effekt und der entsprechenden Konzentration sortiert und bewertet. Das abschließende Ranking wurde nach $-\log(c) \cdot \text{APL}$ bewertet. Die besten 8 Verbindungen wurden mit Hilfe der MOE-Funktion *Superpose* übereinander gelegt, wobei der Spirokohlenstoff, der Aromatenkohlenstoff an der Methoxygruppe und der Aromatenkohlenstoff zum Fünfringsauerstoff, beziehungsweise deren Entsprechungen in anderen Molekülen als Überlappungspunkte dienten. Mit der Funktion *Flexible Alignment*, unter Verwendung der default Parameter, wurde die Überlagerung der Moleküle optimiert. Mit dem *Pharmacophore Consensus* wurden gemeinsame Funktionalitäten identifiziert und Pharmacophorsphären an den entsprechenden Stellen definiert. Ihre Größe wurde in mehreren Schritten angepasst, so dass alle guten APL den Pharmacophor erfüllen. Drei Merkmale wurden als essentiell gekennzeichnet (Aromat, OH-Donor/Akzeptor, N-Methyl-Donor/Akzeptor). Für die Suche in der ZINC Datenbank wurde das Set *drug – like* verwendet. Um dieses weiter zu verdichten wurden die Verbindungen mit einem Fingerprint (BIT-MACCS) versehen und nur übernom-

men, wenn der entsprechende Tanimoto Koeffizient größer 0.5 war. Bei der Generierung der Konformere fand die Funktion *Conformation Import* Anwendung. Es wurde zusätzlich zu den Grundeinstellungen die Unterfunktion *Refine Output Conformation* verwendet. Bei der eigentlichen Pharmacophorsuche wurde ein *Partial Match* mit 6 von 7 Merkmalen angewendet. Die Ergebnisse wurden visuell mit dem *Database Browser* inspiziert.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. VOET UND J.G. VOET: *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994.
- [2] J.P. CHANGEUX: *Der Acetylcholin-Rezeptor*. Spektrum der Wissenschaft, Januar:84–91, 1994.
- [3] F. HUCHO: *Der nikotinische Azetylcholinrezeptor (Ein Modellrezeptor in 3D)*. Neuroforum, 1:5–10, 1999.
- [4] D.A. DOUGHERTY UND H.A. LESTER: *Snails, synapses and smokers*. Nature, 411:252–255, 2001.
- [5] A. ALZHEIMER: *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. Allgemeine Zeitschrift, 64:146–147, 1907.
- [6] DEUTSCHE ALZHEIMER GESELLSCHAFT: *Das Wichtigste über die Alzheimer-Krankheit*. <http://www.deutsche-alzheimer.de>, März 2006.
- [7] BUNDESREGIERUNG: *Situation der Demenzkranken in der Bundesrepublik Deutschland*. Bundestagsdrucksache, Bundestag, Juli 1996.
- [8] M. PERUTZ: *Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins*. Cambridge University Press, 1989.
- [9] P. CARROL, G.T. FURST, S.Y. HAN UND M. JOULLIÉ: *Spectroscopic studies of galanthamine and galanthamine methiodide*. Bulletin de la Societe Chimique de France, 127:769–780, 1990.
- [10] A. MAELICKE, A. SCHRATTENHOLZ UND H. SCHRÖDER: *Modulatory control by non-competitive agonists of nicotinic cholinergic neurotransmission in the central nervous system*. The Neurosciences, 7:103–114, 1995.
- [11] A. MAELICKE UND E.X. ALBUQUERQUE: *New approach to drug therapy in Alzheimer's dementia*. Drug Discovery Today, 1(2):53–56, 1996.

- [12] D. WILKINSON UND J. MURRAY: *Galantamine: a randomized, double blind, dose comparison in patients with Alzheimer's disease*. International Journal of Geriatric Psychiatry, 16:852–857, 2001.
- [13] G.S.J. MANNENS, C.A.W. SNEL, J. HENDRICKX, T. VERHAEGHE, L. LE JEUNE, W. BODE, L. VAN BEIJSTERVELDT, K. LAVRIJSEN, J. LEEMPOELS, N. VAN OSSELAER, A. VAN PEER UND W. MEULDERMANS: *The Metabolism and Excretion of Galanthamine in Rats, Dogs and Humans*. Drug Metabolism and Disposition, 30(5):553–563, 2002.
- [14] C. PILGER: *Galanthamin als AChE-Inhibitor - Beiträge zum rationalen Wirkstoffdesign*. Dissertation, Universität Paderborn, 2000.
- [15] M. HAREL, I. SCHALK, L. EHRET-SABATIER, F. BOUET, M. GOELDNER, C. HIRTH, P.H. AXELSEN, I. SILMAN, J.L. SUSSMAN: *Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase*. Proceedings of the National Academy of Science, 90:9031–9035, 1993.
- [16] H.M. GREENBLATT, G. KRYGER, T. LEWIS, I. SILMAN UND J.L. SUSSMAN: *Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution*. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters, 463:321–326, 1999.
- [17] S.B. HANSEN, Z. RADIC, T.T. TALLEY, B.E. MOLLES, T. DEERINCK, I. TSIGELNY UND P. TAYLOR: *Tryptophan Fluorescence Reveals Conformational Changes in the Acetylcholine Binding Protein*. The Journal of Biological Chemistry, 277:41299–41302, 2002.
- [18] R.J. LAW, R.H. HENCHMAN UND J.A. MCCAMMON: *A gating mechanism proposed from a simulation of a human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor*. Proceedings of the National Academy of Science, 102(19):6813–6818, 2005.
- [19] K. BREJC, W. VAN DIJK, R. KLAASSEN, M. SCHUURMANS, J. VAN DER OOST, A. SMIT UND T. SIXMA: *Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors*. Nature, 411:269–276, 2001.
- [20] N. UNWIN: *Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4 Å Resolution*. Journal of Molecular Biology, 346:967–989, 2005.
- [21] A.B. SMIT, N.I. SYED, D. SCHAAP, J. VAN MINNEN, J. KLUMPERMANN, K.S. KITS, H. LODDER, R.C. VAN DER SCHORS, R. VAN ELK,

- B. SORGEDRAGER, K. BREJC, T.K. SIXMA UND W.P.M. GERAERTS: *A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission*. Nature, 411:261–268, 2001.
- [22] E. LUTTMANN: *Molecular-Modelling Untersuchungen auf dem Weg zum Verständnis der Alzheimer'schen Krankheit*. Dissertation, Universität Paderborn, 2004.
- [23] R. HENCHMAN, H. WANG, S. SINE, P. TAYLOR UND J. MCCAMMON: *Asymmetric Structural Motions of the Homomeric $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Ligand Binding Domain Revealed by Molecular Dynamics Simulation*. Biophysical Journal, 85:3007–3018, 2003.
- [24] S. AMIRI, K. TAI, O. BECKSTEIN, P.C. BIGGIN UND M.S. SANSON: *The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor: molecular modeling, electrostatics, and energetics*. Molecular and Membrane Biology, 22(3):151–62, 2005. 0968-7688 Journal Article.
- [25] N. LE NOVÈRE, T. GRUTTER UND J.P. CHANGEUX: *Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca^{2+} -binding sites*. Proceedings of the National Academy of Science, 99(5):3210–3215, 2002.
- [26] A.C. SALADINO, Y. XU UND P. TANG: *Homology modeling and molecular dynamics simulations of transmembrane domain structure of human neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. Biophysical Journal, 88(2):1009–17, 2005.
- [27] A. MAELICKE, A. SCHRATTENHOLZ, M. SAMOCHOCKI, M. RADINA UND E. ALBUQUERQUE: *Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as treatment strategy for Alzheimer's disease*. Behavioural Brain Research, 113:199–206, 2000.
- [28] A. MIYAZAWA, Y. FUJIYOSHI, M. STOWELL UND N. UNWIN: *Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4.6 Å Resolution: Transverse Tunnels in the Channel Wall*. Journal of Molecular Biology, 288:765–786, 1999.
- [29] A. MIYAZAWA, Y. FUJIYOSHI UND N. UNWIN: *Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore*. Nature, 423:949–955, 2003.
- [30] N. UNWIN: *The Nicotinic Acetylcholine Receptor of the Torpedo Electric Ray*. Journal of Structural Biology, 121:181–190, 1998.

- [31] N. UNWIN: *The Croonian Lecture 2000. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of fast synaptic transmission*. Philosophical Transaction of the Royal Society: Biological Sciences, 355:1813–1829, 2000.
- [32] M.L. TIERNY UND N. UNWIN: *Electron Microscopic Evidence for the Assembly of Soluble Pentameric Extracellular Domains of the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Journal of Molecular Biology, 303:185–196, 2000.
- [33] N. UNWIN, A. MIYAZAWA, J. LI UND Y. FUJIYOSHI: *Activation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Involves a Switch in Conformation of the α Subunits*. Journal of Molecular Biology, 319:1165–1176, 2002.
- [34] F. HUCHO UND C. WEISE: *Ligandengesteuerte Ionenkanäle*. Angewandte Chemie, 113:3194–3211, 2001.
- [35] H.R. ARIAS: *Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors*. Neurochemistry International, 36:595–645, 2000.
- [36] P.J. CORRINGER, N. LE NOVÈRE UND J.P. CHANGEUX: *Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 40:431–458, 2000.
- [37] N. LE NOVÈRE, P.J. CORRINGER UND J.P. CHANGEUX: *Improved Secondary Structure Predictions for a Nicotinic Receptor Subunit: Incorporation of Solvent Accessibility and Experimental Data into a Two-Dimensional Representation*. Biophysical Journal, 76:2329–2345, 1999.
- [38] G. FELS, E.K. WOLF UND A. MAELICKE: *Equilibrium binding of acetylcholine to the membrane-bound acetylcholine receptor*. European Journal of Biochemistry, 127:31–38, 1982.
- [39] T. GRUTTER UND J.P. CHANGEUX: *Nicotinic receptors in wonderland*. TRENDS in Biochemical Science, 26(8):459–463, 2001.
- [40] A. PHAN-CHAN-DU, C. HEMMERLIN, D. KRIKORIAN, M. SAKARELLOS-DAITSIOTIS, V. TSIKARIS, C. SAKARELLOS, M. MARINO, A. THUREAU, M.T. CUNG UND S.J. TZARTOS: *Solution Conformation of the Antibody-Bound Tyrosine Phosphorylation Site of the Nicotinic Acetylcholine receptor β -Subunit in Its Phosphorylated and Nonphosphorylated States*. Biochemistry, 42:7371–7380, 2003.

-
- [41] G.R. GUZMÁN, J. SANTIAGO, A. RICARDO, R. MARTI-ARBONA, L.V. ROJAS UND J.A. LASALDE-DOMINICCI: *Tryptophan Scanning Mutagenesis in the $\alpha M3$ Transmembrane Domain of *Torpedo californica* Acetylcholin Receptor: Functional and Structural Implications*. Biochemistry, 42:12243–12250, 2003.
- [42] J. MACHOLD, Y. UTKIN, D. KIRSCH, R. KAUFMANN, V. TSETLIN, H. HUCHO: *Photolabeling reveals the proximity of the α -neurotoxin binding site to the M2 helix of the ion channel in the nicotinic acetylcholine receptor*. Proceedings of the National Academy of Science, 92:7282–7286, 1995.
- [43] S.C.R. LUMMIS, D.L. BEENE, L.W. LEE, H.A. LESTER, R.W. BROADHURST UND D.A. DOUGHERTY: *Cis-trans isomerization at a proline opens the pore of a neurotransmitter-gated ion channel*. Nature, 438:248–251, 2005.
- [44] W.Y. LEE UND S.M. SINE: *Principal pathway coupling agonist binding to channel gating in nicotinic receptors*. Nature, 438:243–247, 2005.
- [45] M. SAMOCHOCKI, A. HÖFFLE, A. FEHRENBACHER, R. JOSTOCK, J. LUDWIG, C. CHRISTNER, M. RADINA, M. ZERLIN, C. ULLMER, E. PEREIRA, H. LÜBBERT, E. ALBUQUERQUE UND A. MAELICKE: *Galanthamine Is an Allosterically Potentiating Ligand of Neuronal Nicotinic but Not of Muscarinic Acetylcholine Receptors*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 305:1024–1036, 2003.
- [46] B. SCHRÖDER, S. REINHARDT-MAELICKE, A. SCHRATTENHOLZ, K. MCLANE, A. KRETSCHMER, B.M. CONTI-TRONCONI UND A. MAELICKE: *Monoclonal Antibodies FK1 and WF6 Define Two Neighboring Ligand Binding Sites on *Torpedo* Acetylcholine Receptor*. The Journal of Biological Chemistry, 269(14):10407–10416, 1994.
- [47] L. HALLER: *Molecular Modelling Untersuchung der APL Bindungsstelle des Acetylcholinrezeptors*. Diplomarbeit, Universität Paderborn, 2005.
- [48] E. LINNEMANN: *Galanthamin als Leitstruktur - Weiterentwicklung von Therapeutika gegen die Alzheimer'sche Demenz*. Dissertation, Universität Paderborn, 2002.
- [49] J. KRÜGER: *Untersuchung der allosterischen Bindungsstelle des Galanthamins am Acetylcholinrezeptor*. Diplomarbeit, Universität Paderborn, 2002.

- [50] A. SCHRATTENHOLZ, J. GODOVAC-ZIMMERMANN, H.J. SCHÄFER, E.X. ALBUQUERQUE UND A. MAELICKE: *Photoaffinity labeling of Torpedo acetylcholine receptor by physostigmine*. European Journal of Biochemistry, 216:671–677, 1993.
- [51] P. TALAGA: *β -Amyloid Aggregation Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease: Dream or Reality?* Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 1:175–186, 2001.
- [52] A.T. PETKOVA, R.D. LEAPMAN, Z. GUO, W.M. YAU, M.P. MATTSON UND R. TYCKO: *Self-Propagating, Molecular-Level Polymorphism in Alzheimer's β -Amyloid Fibrils*. Science, 307:262–265, 2005.
- [53] N.A. OYLER UND R. TYCKO: *Absolute Structural Constraints on Amyloid Fibrils from Solid-State NMR Spectroscopy of Partially Oriented Samples*. Journal of the American Chemical Society, Communications, 126:4478–4479, 2004.
- [54] B. MA UND R. NUSSINOV: *Stabilities and conformations of Alzheimer's β -amyloid peptide oligomers ($A\beta_{16-22}$, $A\beta_{16-35}$, and $A\beta_{10-35}$): Sequence effects*. Proceedings of the National Academy of Science, 99(22):14126–14131, 2002.
- [55] K.L. SCIARRETTA, D.J. GORDON, A.T. PETKOVA, R. TYCKO UND S.C. MEREDITH: *$A\beta_{40}$ -Lactam(D23/K28) Models a Conformation Highly Favorable for Nucleation of Amyloid*. Biochemistry, 44:6003, 6014 2005.
- [56] T. LÜHRS, C. RITTER, M. ADRIAN, D. RIEK-LOHER, B. BOHRMANN, H. DÖBELI, D. SCHUBERT UND R. RIEK: *3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils*. Proceedings of the National Academy of Science, 102(48):17342–17347, 2005.
- [57] J. KRÜGER UND G. FELS: *(-)-[3H]-Galanthamine - Application as Photoaffinity Probe*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 47:258–260, 2003.
- [58] G.M. BIXEL, C. WEISE, M.L. BOLOGNESI, M. ROSINI, M.J. BIERLY, I.R. MELLOR, P.N.R. USHERWOOD, C. MELCHIORRE UND F. HUCHO: *Location of the Polyamine Binding Site in the Vestibule of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Ion Channel*. Journal of Biological Chemistry, 276(9):6151–6160, 2001.

-
- [59] M.P. BLANTON, L.J. DANGOTT, S.K. RAJA, A.K. LALA UND J.B. COHEN: *Probing the Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Ion Channel with the Uncharged Photoactivable Compound [^3H]Diazofluorene*. Journal of Biological Chemistry, 273(15):8659–8668, 1998.
- [60] F. KOTZYBA-HIBERT, A. JAGANATHEN, J. LANGENBUCH-CACHAT, M. GOELDNER, C. HIRTH, M. DENNIS, J. GIRAUDAT, J.L. GALZI, C. MULLE, J.P. CHANGEUX, C. BON, J.Y. CHANG, C. LAZURE UND M. CHRÉTIEN: *Topographical Analysis of the Torpedo Marmorata Acetylcholine Receptor by Energy Transfer Photoaffinity Labeling using aryl diazonium Derivates*. In: *Photochemical Probes in Biochemistry*. Kluwer Academic Publishers, 1989.
- [61] O. BUCHARDT, U. HENRIKSEN, T. KOCH UND P. NIELSEN: *Photolabeling Reagent Design*. In: *Photochemical Probes in Biochemistry*. Kluwer Academic Publishers, 1989.
- [62] A.P. MARCHAND, I.N.N. NAMBOOTHIRI UND S.B. LEWIS: *Thiele's Acid Revisited: Isolation and Characterization of Two Minor Products Formed by Carbonation of Cyclopentadienide Anion*. Tetrahedron, 54:12691–12698, 1998.
- [63] J.C. MARTIN UND D.R. BLOCH: *The Dehydrocyclopentadienyl Anion. A New Aryne*. Journal of the American Chemical Society, 93(2):451–459, 1971.
- [64] PETERS, D.: *Simple Derivates of Cyclopentadiene. Part IV. The Dimerisation of Methyl Cyclopentadiene-1-carboxylate*. Journal of the Chemical Society, Seiten 1042–1048, 1960.
- [65] P. NIELSEN, J. HANSEN, T. THOMSEN UND O. BUCHARDT: *Reagents for photoaffinity labeling. Photobinding efficiency of aryl azido-, diazocyclopentadienyl- and ethyl diazomalonyl-derivates of 9-aminoacridine*. Experientia, 39:1063–1072, 1983.
- [66] J. MARCO-CONTELLAS, M. DO CARMO CARREIRAS, C. RODRIGUEZ, M. VILLAROYA UND A.G. GARCIA: *Synthesis and Pharmacology of Galanthamine*. Chemical Reviews, 106(1):116–133, 2006.
- [67] A. MARY, D. RENKO, C. GUILLOU UND C. THAL: *Selective N-demethylation of galanthamine to norgalanthamine via a non classical Polonovski reaction*. Tetrahedron Letters, 38(29):5151–5152, 1997.

- [68] K. MCCAMLEY, J.A. RIPPER, R.D. SINGER UND P.J. SCAMMELLS: *Efficient N-Deethylation of Opiate Alkaloids Using a Modified Nonclassical Polonovski Reaction*. Journal of Organic Chemistry, 68:9847–9850, 2003.
- [69] E. VODOVOZOVA, E. TSIBIZOVA UND J. MOLOTKOVSKY: *One-step iodination of the diazocyclopentadien-2-ylcarbonyl group - a new and convenient preparation of effective radiolabelled photoaffinity probes*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1:2221–2228, 2001.
- [70] E. LINNEMANN UND G. FELS: *Synthesis of ^3H -(-)-Galanthamine*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 44:661–669, 2001.
- [71] J. KRÜGER, B. MANMONTRI UND G. FELS: *H/D-Exchange in aromatic systems using transition metal catalysis*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 47:1050, 2004.
- [72] J. KRÜGER, B. MANMONTRI, UND G. FELS: *Iridium catalyzed H/D-exchange*. European Journal of Organic Chemistry, 7:1402–1408, 2005.
- [73] G. PANNETIER, R. BONNAIRE, P. FOUGEROUX, L. DAVIGNON UND N. PLATZER: *Complexes de l'Iridium avec le Cyclooctadiène-1,5*. Journal of Organometallic Chemistry, 54:313–324, 1973.
- [74] B. MCAULEY, M. HICKEY, L. KINGSTON, J. JONES, W. LOCKLEY, A. MATHER, E. SPINK, S. THOMPSON UND D. WILKINSON: *Convenient and efficient deuteration of functionalized aromatics with deuterium oxide: catalysis by cycloocta-1,5-dienyliridium(I)-1,3-diones*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 46:1191–1204, 2003.
- [75] G. ELLAMES, J. GIBSON, J. HERBERT UND A. MCNEILL: *The scope and limitations of deuteration mediated by Crabtree's catalyst*. Tetrahedron, 57:9487–9497, 2001.
- [76] R. SALTER, M. CHAPPELLE, A. MORGAN, T. MOENIUS, P. ACKERMANN, M. STUDER UND F. SPINDLER: *Advances in homogeneous Metal catalysed H/D exchange*, Band 7, Seiten 63–67. John Wiley and Sons: New York, 2001.
- [77] S. KLEI, J. GOLDEN, T. TILLEY UND R. BERGMAN: *Iridium-Catalyzed H/D Exchange into Organic Compounds in Water*. Journal of the American Chemical Society, 124:2092–2093, 2002.

-
- [78] L. SANTOS, K. MEREITER, M. PANEQUE, C. SLUGOVIC UND E. CARMONA: *C-H bond activation reactions by $TP^{Me_2}Ir(III)$ centres. Generation of Fischer-type carbenes and development of a catalytic system for H/D exchange*. New Journal of Chemistry, 27:107–113, 2003.
- [79] C. SLUGOVIC UND B. PERNER: *Deuterium labeling of norbornene derivatives by iridium catalyzed H/D-exchange*. Inorganica Chimica Acta, 357:3104–3108, 2004.
- [80] C. YUNG, M. SKADDAN UND R. BERGMAN: *Stoichiometric and Catalytic H/D Incorporation by Cationic Iridium Complexes: A Common Monohydrido-Iridium Intermediate*. Journal of the American Chemical Society, 126:13033–13043, 2004.
- [81] J. GIBSON UND J. HERBERT: *Iridium-mediated β -deuteration of enones*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 46:531–537, 2003.
- [82] A. SHU, D. SAUNDERS, S. LEVINSON, S. LANDVATTER, A. MAHONEY, S. SENDEROFF, J. MACK UND J. HEYS: *Direct Tritium Labeling of Multifunctional Compounds using Organoiridium Catalysis. 2*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 42:792–807, 1999.
- [83] P. KINGSTON, W. LOCKLEY, A. MATHER, E. SPINK, S. THOMPSON UND D. WILKINSON: *Parallel chemistry investigations of ortho-directed hydrogen isotope exchange between substituted aromatics and isotopic water: a novel catalysis by cyclooctadienyliridium(I)penta-1,3-dionates*. Tetrahedron Letters, 41:2705–2708, 2000.
- [84] M. ATLAY, M. PREECE, G. STRUKUL UND B. JAMES: *Selective Homogeneous Catalytic Oxidation of Olefins using Oxygen/Hydrogen Mixtures: Oxygen Atom Transfer from an Iridium Hydroperoxide*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 7:406–407, 1982.
- [85] W. CHEN, K. GARNES, S. LEVINSON, D. SAUNDERS, S. SENDEROFF, A. SHU, A. VILLANI UND J. HEYS: *Direct Tritium Labeling of Multifunctional Compounds using Organoiridium Catalysis*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 39:291–298, 1997.
- [86] M. HICKEY, J. JONES, L. KINGSTON, W. LOCKLEY, A. MATHER, B. MCAULEY UND D. WILKINSON: *Iridium-catalysed labelling of anilines, benzylamines and nitrogen heterocycles using deuterium*

- gas and cycloocta-1,5-dienyliridium(I)-1,1,1,5,5,5-hexafluoropentane-2,4-dionate. *Tetrahedron Letters*, 44:3959–3961, 2003.
- [87] R. SALTER, T. MOENIUS, P. ACKERMANN, M. STUDER, A. MORGAN UND M. CHAPPELLE: *A new homogeneous complex for H/D/T exchange labelling*. *Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 44:956–957, 2001.
- [88] M. SKADDAN, C. YUNG UND R. BERGMAN: *Stoichiometric and Catalytic Deuterium and Tritium Labeling of Unactivated Organic Substrates with Cationic Ir(III) Complexes*. *Organic Letters*, 6:11–13, 2004.
- [89] C.G.M. JANSSEN, J.B.A. THIJSEN UND W.L.M. VERLUYTEN: *Synthesis of ^3H -, ^{14}C - and stable-isotope-labelled galanthamine*. *Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 45:841–855, 2002.
- [90] H.H. SELTZMAN, M.J. ROCHE, C.P. LAUDEMAN, C.D. WYRICK AND F.I. CARROLL: *Protection of the Allylic Alcohol Double Bond from Catalytic Reduction in the Preparation of $[1\text{-}^3\text{H}]$ Morphine and $[1\text{-}^3\text{H}]$ Codeine*. *Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, XLI:811–821, 1998.
- [91] H. KAMIMORI UND M. KONISHI: *Evaluation and Application of Liquid Chromatographic Columns Coated with "Intelligent" Ligands. (III) Immobilized Enzyme Phospholipid Column*. *Analytical Sciences*, 17:1085–1089, 2001.
- [92] M.M. ABDEL-MONEM UND P.S. PORTOGHESE: *N-Deimethylation of Morphine and Structurally Related Compounds with Chloroformate Esters*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15(2):208–210, 1972.
- [93] G. ELLMAN, K. COURTNEY, V. ANDRES UND R. FEATHERSTONE: *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. *Biochemical Pharmacology*, 7:88–95, 1961.
- [94] H. GOHLKE UND G. KLEBE: *Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors*. *Angewandte Chemie International Edition*, 41:2644–2676, 2002.
- [95] CHEMICAL COMPUTING GROUP INC.: *Molecular Operating Environment (MOE) Manual 2005.06*, 1997–2005.

-
- [96] L. ALISARAIE: *Improvement of a Molecular Docking Approach and Its Applications Using QXP+*. Dissertation, Universität Paderborn, 2005.
- [97] M. KRÖGER: *DFTB-Ansätze zur Vorhersage von Bindungsenergien bei Acetylcholinesterase Inhibitoren*. Diplomarbeit, Universität Paderborn, 2005.
- [98] D. PEARLMANN UND P. CHARIFSON: *Are Free Energy Calculations Useful in Practice? A Comparison with Rapid Scoring Functions for the p38 MAP Kinase Protein System*. Journal of Medicinal Chemistry, 44(21):3417–3423, 2001.
- [99] E. LUTTMANN, E. LINNEMANN UND G. FELS: *Galanthamine as bis-functional ligand for the acetylcholinesterase*. Journal of Molecular Modelling, 8:208–216, 2002.
- [100] D.L. BAI, X.C. TANG UND X.C. HE: *Huperzine A, A Potential Therapeutic Agent for Treatment of Alzheimer's Disease*. Current Medicinal Chemistry, 7:355–374, 2000.
- [101] J. GUO, M.M. HURLEY, J. B. WRIGHT UND G.H. LUSHINGTON: *A Docking Score Function for Estimating Ligand-Protein Interactions: Application to Acetylcholinesterase Inhibition*. Journal of Medicinal Chemistry, 47:5492–5500, 2004.
- [102] H.J. WOO UND B. ROUX: *Calculation of absolute protein-ligand binding free energy from computer simulations*. Proceedings of the National Academy of Science, 102(19):6825–6830, 2005.
- [103] J. ÅQVIST, V.B. LUZHKOV UND B.O. BRANDSDAL: *Ligand Binding Affinities from MD Simulations*. Accounts of Chemical Research, 35(6):358–365, 2002.
- [104] J. ÅQVIST UND J. MARELIUS: *The Linear Interaction Energy Method for Predicting Ligand Binding Free Energies*. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 4:613–626, 2001.
- [105] M. ALMLÖF, B.O. BRANDSDAL UND J. ÅQVIST: *Binding Affinity Prediction with Different Force Fields: Examination of the Linear Interaction Energy Method*. Journal of Computational Chemistry, 25(10):1242–1254, 2003.
- [106] H.J.C. BERENDSEN, D. VAN DER SPOEL UND R. VAN DRUNEN: *GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation*. Computer Physics Communication, 91:43–56, 1995.

- [107] E. LINDAHL, B. HESS UND D. VAN DER SPOEL: *GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis*. Journal of Molecular Modelling, 7:306–317, 2001.
- [108] H. BERENDSEN, J. POSTMA, W. VAN GUNSTEREN UND J. HERMANS: *Intermolecular Forces*. Dordrecht: D. Reidel Publishing Company Dordrecht, 1981.
- [109] D. VAN DER SPOEL, E. LINDAHL, B. HESS ET. AL.: *GROMACS User Manual Version 3.3*. The GROMACS development team, 2001-2006.
- [110] C. BARTOLUCCI, E. PEROLA, C. PILGER, G. FELS UND 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: Structure, Functions, and Genetics, 42:182–191, 2001.
- [111] H. DVIR, D.M. WONG, M. HAREL, X. BARRIL, M. OROZCO, F.J. LUQUE, D. MUÑOZ-TORRERO, P. CAMPS, T.L. ROSENBERRY, I. SILMAN UND J.L. SUSSMAN: *3D Strucutre of Torpedo californica Acetylcholinesterase Complexed with Huprine X at 2.1 Å Resolution: Kinetic and Molecular Dynamic Correlates*. Biochemistry, 41:2970–2981, 2002.
- [112] H. DVIR, H.L. JIANG, D.M. WONG, M. HAREL, M. CHETRIT, X.C. HE, G.Y. JIN, G.L. YU, X.C. TANG, I. SILMAN, D.L. BAI UND J.L. SUSSMAN: *X-ray Structures of Torpedo californica Acetylcholinesterase Complexed with (+)-Huperzine A and (-)-Huperzine B: Structural Evidence for an Active Site Rearrangement*. Biochemistry, 41:10810–10818, 2002.
- [113] C. COSTAGLI UND A. GALLI: *Inhibition of Cholinesterase-associated Aryl Acylamidase Activity by Anticholinesterase Agents: Focus on Drugs Potentially Effective in Alzheimer's Disease*. Biochemical Pharmacology, 55:1733–1737, 1998.
- [114] P. BAR-ON, C. MILLARD, M. HAREL, H. DVIR, A. ENZ, J.L. SUSSMAN UND I. SILMAN: *Kinetic and Structural Studies on the Interaction oh Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine*. Biochemistry, 41:3555–3564, 2002.
- [115] D. PUVANENDRAMPILLAI UND J.B.O. MITCHELL: *Protein Ligand Database (PLD): additional understanding of the nature and specificity of protein-ligand complexes*. Bioinformatics, 19(14):1856–1857, 2003.

-
- [116] M.A. BALSERA, W. WRIGGERS, Y. OONO UND K. SCHULTEN: *Principal Component Analysis and Long Time Protein Dynamics*. Journal of Physical Chemistry, 100:2567–2572, 1996.
- [117] D.M.F. VAN AALTEN, B.L. DE GROOT, J.B.C. FINDLAY, H.J.C. BERENDSEN UND A. AMADEI: *A Comparison of Techniques for Calculating Protein Essential Dynamics*. Journal of Computational Chemistry, 18(2):169–181, 1996.
- [118] P. CELIE, S. VAN ROSSUM-FIKKERT, W. VAN DIJK, K. BREJC, A. SMIT UND T. SIXMA: *Nicotine and Carbamylcholine Binding to the Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures*. Neuron, 41:907–914, 2004.
- [119] B. DE GROOT, D. VAN AALTEN, R. SCHEEK, A. AMADEI, G. VRIEND UND H.J. BERENDSEN: *Prediction of Protein Conformational Freedom From Distance Constraints*. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics, 29(240-251), 1997.
- [120] B. DE GROOT, G. VRIEND UND H. BERENDSEN: *Conformational Changes in the Chaperonin GroEL: New Insights Into the Allosteric Mechanism*. Journal of Molecular Biology, 286:1241–1249, 1999.
- [121] E.F.R. PEREIRA, C. HILMAS, M.D. SANTOS, M. ALKONDON, A. MAELICKE UND E.X. ALBUQUERQUE: *Unconventional Ligands and Modulators of Nicotinic Receptors*. Journal of Neurobiology, 53(4):479–500, 2002.
- [122] R. ZWART, R.G.D.M. VAN KLEEF, C. GOTTI, C.J.G.M. SMULDERS UND H.P.M. VIJVERBERG: *Competitive Potentiation of Acetylcholine Effects on Neuronal Nicotinic Receptors by Acetylcholineesterase-Inhibiting Drugs*. Journal of Neurochemistry, 75:2492–2500, 2000.
- [123] A. STORCH, A. SCHRATTENHOLZ, J.C. COOPER, A. GHANI, O. GUTBROD, K.H. WEBER, S. REINHARDT, C. LOBRON, B. HERMSEN, V. SOSKIC, E.F.R. PEREIRA, E.X. ALBUQUERQUE, C. METHFESSEL UND A. MAELICKE: *Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells*. European Journal of Pharmacology, 290:207–219, 1995.
- [124] H.R. ARIAS, J.R. TRUDELL, E.Z. BAYER, B. HESTER, E.A. MCCARDY UND M.P. BLANTON: *Noncompetitive Antagonist Binding Si-*

- tes in the Torpedo Nicotinic Acetylcholine Receptor Ion Channel. Structure - Activity Relationship Studies Using Adamante Derivates.* Biochemistry, 2003.
- [125] J. ANDERS, M. BLÜGGEL, H.E. MEYER, R. KÜHNE, A.M. TER LAAK, E. KOJRO UND F. FAHRENHOLZ: *Direct Identification of the Agonist Binding Site in the Human Brain Cholecystokinin Receptor.* Biochemistry, 38:6043–6055, 1999.
- [126] J.P. VAN DER WOLK, A. BOORSMA, M. KNOCHÉ, H.J. SCHÄFER, A.J.M. DRIESSEN: *The Low-Affinity ATP Binding Site of the Escherichia coli SecA Dimer Is Localized at the Subunit Interface.* Biochemistry, 36:14924–14929, 1997.
- [127] M.P. ALISTE UND D.P. TIELEMAN: *Computer simulation of partitioning of ten pentapeptides Ace-WLXLL at the cyclohexane/water and phospholipid/water interfaces.* BMC Biochemistry, 6(30):1–15, 2005.
- [128] B.L. DE GROOT UND H. GRUBMÜLLER: *A refined structure of human aquaporin-1.* Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters, 504:206–211, 2001.
- [129] M. PATRA, M. KARTTUNEN, M.T. HYVÖNEN, E. FALCK UND I. VATTULAINEN: *Lipid Bilayers Driven to a Wrong Lane in Molecular Dynamics Simulations by Subtle Changes in Long-Range Electrostatic Interactions.* The Journal of Physical Chemistry B, 108(14):4485–4494, 2004.
- [130] A. SCHIBIG: *Bindungsstudie am α_7 -Rezeptor des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors mittels kompetitiver Verdrängungsanalyse.* Diplomarbeit, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, 2002.
- [131] C. MARGHERITIS UND G. CORONGIU: *Acetylcholine in Water: Ab-Initio Potential and Monte Carlo Simulation.* Journal of Computational Chemistry, 9(1):1–10, 1988.
- [132] R.R. NEUBIG, N.D. BOYD UND J.B. COHEN: *Conformations of Torpedo Acetylcholine Receptor associated with Ion Transport and Desensitization.* Biochemistry, 21:3460–3467, 1982.
- [133] A. SCHRATTENHOLZ, S. PFEIFFER, V. PEJOVIC, R. RUDOLPH, J. GODOVAC-ZIMMERMANN UND A. MAELICKE: *Expression and Renaturation of the N-terminal Extracellular Domain of Torpedo Nicotinic*

- Acetylcholine Receptor α -Subunit*. The Journal of Biological Chemistry, 269:32393–32399, 1998.
- [134] M. COVARRUBIAS, H. PRINZ, H.W. MEYERS UND A. MAELICKE: *Equilibrium binding of cholinergic ligands to the membrane-bound acetylcholine receptor*. Journal of Biological Chemistry, 261:14955–14964, 1986.
- [135] C. HILMAS, E.F.R. PEREIRA, M. ALKONDON, A. RASSOULPOUR, R. SCHWARCZ UND E.X. ALBUQUERQUE: *The Brain Metabolite Kynurenic Acid Inhibits $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Activity and Increases Non- $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Expression: Physiopathological Implications*. The Journal of Neuroscience, 21(19):7463–7473, 2001.
- [136] R.H. HENCHMAN, H.L. WANG, S.M. SINE, P. TAYLOR UND J.A. MCCAMMON: *Ligand-induced conformational change in the $\alpha 7$ nicotinic receptor ligand binding domain*. Biophysical Journal, 88(4):2564–76, 2005.
- [137] O. BECKSTEIN UND M.S. SANSOM: *The influence of geometry, surface character, and flexibility on the permeation of ions and water through biological pores*. Physical Biology, 1:42–52, 2004.
- [138] A. ANISHKIN UND S. SUKHAREV: *Water Dynamics and Dewetting Transitions in the Small Mechanosensitive Channel MscS*. Biophysical Journal, 86:2883–2895, 2004.
- [139] S. CHUNG, T. ALLEN, M. HOYLES UND S. KUYUCAK: *Permeation of Ions Across the Potassium Channel: Brownian Dynamics Studies*. Biophysical Journal, 77:2517–2533, 1999.
- [140] M. GRABE, H. LECAR, Y.N. JAN UND L.Y. JAN: *A quantitative assessment of models for voltage-dependent gating of ion channels*. Proceedings of the National Academy of Science, 101(51):17640–17645, 2004.
- [141] S. BERNÈCHE UND B. ROUX: *A microscopic view of ion conducting through the K^+ Channel*. Proceedings of the National Academy of Science, 100(15):8644–8648, 2003.
- [142] T.W. ALLEN, O.S. ANDERSEN, B. ROUX: *Energetics of ion conduction through the gramicidin channel*. Proceedings of the National Academy of Science, 101(1):117–122, 2004.

- [143] Y.XU, F.J. BARRANTES, X. LUO, K. CHEN, J. SHEN UND H. JI-ANG: *Conformational Dynamics of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Channel: A 35-ns Molecular Dynamics Simulation*. Journal of the American Chemical Society, 127(4):1291–1299, 2005.
- [144] M. NAVEDO, M. NIEVES, L. TROJAS UND J. LASALDE-DOMINICCI: *Tryptophan Substitutions Reveal the Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor α -TM3 Domain in Channel Gating: Differences between Torpedo and Muscle-Type AChR*. Biochemistry, 73(1):78–84, 2004.
- [145] M.S.P. SANSOM, C. ADCOCK UND G.R. SMITH: *Modelling and Simulation of Ion Channels: Application to the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Journal of Structural Biology, 121:246–262, 1998.
- [146] P.W. ATKINS: *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim, 2 Auflage, 1994.
- [147] J.R. GULLINGSRUD, R. BRAUN UND K. SCHULTEN: *Reconstructing Potentials of Mean Force through Time Series Analysis of Steered Molecular Dynamics Simulations*. Journal of Computational Physics, 151:190–211, 1999.
- [148] G.R. SMITH UND M.S.P. SANSOM: *Effective diffusion coefficients of K^+ and Cl^- ions in ion channel models*. Biophysical Chemistry, 79:129–151, 1999.
- [149] G.D. CYMES, C. GROSMAN, UND A. AUERBACH: *Structure of the transition state of gating in the acetylcholine receptor channel pore: a phi-value analysis*. Biochemistry, 41(17):5548–5555, 2002.
- [150] K. JOZWIAK, S. RAVICHANDRAN, J. COLLINS, UND I. WAINER: *Interaction of Noncompetitive Inhibitors with an Immobilized $\alpha 3\beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Investigated by Affinity Chromatography, Quantitative-Structure Activity Relationship Analysis, and Molecular Docking*. Journal of Medical Chemistry, 47:4008–4021, 2004.
- [151] A. HUNG, K. TAI UND M.S. SANSOM: *Molecular dynamics simulation of the M2 helices within the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain: structure and collective motions*. Biophysical Journal, 88(5):3321–33, 2005.
- [152] B. CORRY: *Theoretical conformation of the closed and open states of the acetylcholine receptor channel*. Biochimica et Biophysica Acta, 1663(1-2):2–5, 2004.

-
- [153] B.L. DE GROOT, X. DAURA, A.E. MARK UND H. GRUBMÜLLER: *Essential Dynamics of Reversible Peptide Folding: Memory-free Conformational Dynamics Governed by Internal Hydrogen Bonds*. Journal of Molecular Biology, 309:299–313, 2001.
- [154] A. TALY, M. DELARUE, T. GRUTTER, M. NILGES, N. LE NOVE-RE, P.J. CORRINGER UND J.P. CHANGEUX: *Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism*. Biophysical Journal, 88(6):3954–65, 2005.
- [155] E.X. ALBUQUERQUE, E.F.R. PEREIRA, N.G. CASTRO, NEWTON G. UND M. ALKONDON: *Neuronal nicotinic receptors: function, modulation and structure*. The Neuroscience, 7(1995):91–101, 1995.
- [156] E.X. ALBUQUERQUE, M. ALKONDON, E.F.R. PEREIRA, N.G. CASTRO, A. SCHRATTENHOLZ, C.T.F. BARBOSA, R. BONFANTE-CABARCAS, Y. ARACAVA, H.M. EISENBERG UND A. MAELICKE: *Properties of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Pharmacological Characterization and Modulation of Synaptic Function*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 280(1117–1136), 1997.
- [157] C. GROSMAN: *Free-Energy Landscapes of Ion-Channel Gating Are Malleable: Changes in the Number of Bound Ligands Are Accompanied by Changes in the Location of the Transition State in Acetylcholine Receptor Channels*. Biochemistry, 42(50):14977–14987, 2003.
- [158] J.M. ROLLINGER, A. HORNICK, T. LANGER, H. STUPPNER UND H. PRAST: *Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Scopolin and Scopolin Discovered by Virtual Screening of Natural Products*. Journal of Medicinal Chemistry, 47:6248–6254, 2004.
- [159] J. IRWIN UND B. SHOICHET: *ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening*. Journal of Chemical Information and Modeling, 45:177–182, 2005.
- [160] I. DAIDINE, F. SIMONA, D. ROCCATANO, R.A. BROGLIA, G. TIANA, G. COLOMBO UND A. DI NOLA: *β -Hairpin Conformation of Fibrillogenic Peptides: Structure and α - β Transition Mechanism Revealed by Molecular Dynamics Simulations*. PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics, 57:198–204, 2004.

- [161] N.V. BUCHETE, R. TYCKO UND G. HUMMER: *Molecular Dynamics Simulations of Alzheimer's β -Amyloid Protofilaments*. Journal of Molecular Biology, 353:804–821, 2005.
- [162] S. KANJILAL, N. TAULIER, J.Y. LE HUÉROU, M. GINDRE, W. URBACH UND M. WAKS: *Ultrasonic Studies of Alcohol-Induced Transconformation in β -Lactoglobulin: The Intermediate State*. Biophysical Journal, 85:3928–2934, 2003.
- [163] M. FIORONI UND K. BURGER: *A New 2,2,2-Trifluorethanol Model for Molecular Dynamics Simulations*. Journal of Physical Chemistry B, 104:12347–12354, 2000.
- [164] A. KUNDU UND N. KISHORE: *Apparent Molar Heat Capacities and Apparent Molar Volumes of Aqueous 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol at Different Temperatures*. Journal of Solution Chemistry, 33(9):1085–1095, 2004.
- [165] J.M. MASON, N. KOKKONI, K. STOTT UND A.J. DOIG: *Design strategies for anti-amyloid agents*. Current Opinion in Structural Biology, 13:526–532, 2003.
- [166] E.D. AGDEPPA, V. KEPE, A. PETRIC, N. SATYAMURTHY, J. LIU, S.C. HUANG, G.W. SMALL, G.M. COLE UND J.R. BARRIO: *In Vitro Detection of (S)-Naproxen and Ibuprofen Binding to Plaques in the Alzheimer's Brain using the Positron Emission Tomography Molecular Imaging Probe 2-(1-{6-[(2-[18 F]Fluorethyl)(methyl)amino]-2-Naphthyl}ethylidene)malononitrile*. Neuroscience, 117:723–730, 2003.
- [167] S. JANG UND S. SHIN: *Amyloid β -Peptide Oligomerization in Silico: Dimer and Trimer*. The Journal of Physical Chemistry B, Letters, 110:1955–1958, 2006.
- [168] AUTORENKOLLEKTIV: *Organikum*. Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 18 Auflage, 1990.

ABKÜRZUNGEN

ACh	Acetylcholin
AChBP	Acetylcholin Bindendes Protein
AChE	Acetylcholin Esterase
APS	Ammoniumpersulfat
ASCh	Acetylthiocholin
APL	Allosterisch Potenzierender Ligand
äq.	äquatorial
ax.	axial
COD	Cyclooctadien
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMA	Dimethylessigsäureamid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
DTNB	Dithiobisnitrobenzoesäure
GluC	Endoprotease
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure
HFIP	Hexafluorpropanol
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
igd	inverse gated decoupled

LAH	Lithiumaluminiumhydrid
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeOH	Methanol
MD	Molekular Dynamik
MOE	Molecular Operating Enviroment
mw	Molekulargewicht
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NMR	nuclear magnetic resonance
PCA	Principal Component Analysis
PMI	Principal Moment of Inertia
REMD	Replica Exchange Molecular Dynamic
RMSD	Root Mean Square Deviation
SPC	Simple-Point-Charge water model
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran

LISTE DER VERBINDUNGEN

- 1 (-)-Galanthamin
- 2 Dicyclopentadiendicarbonsäure
- 3 Trimethylsilylcyclopentadiencarbonsäureester
- 4 5-Diazo-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure
- 5 (-)-11-Demethylgalanthamin
- 6 Photogalanthamin
- 7 5-Phenyl-cyclopenta-1,3-dien-carbonsäure-11-demethylgalanthamin-amid
- 8 Cyclooctadieniridium(I)acetylacetonat
- 9 2-Methoxybenzoesäure
- 10 4-Nitrobenzoesäure
- 11 3-(Dimethylamino)benzoesäure
- 12 Benzophenon
- 13 2-Hydroxy-4-methoxyacetophenon
- 14 Acetophenonoxim
- 15 2-Methoxybenzaldehyd
- 16 2-Methoxybenzylamin
- 17 2-Methoxybenzylalkohol
- 18 *trans*-Crotonsäure
- 19 Sorbinsäure

- 20** *trans*-Zimtsäure
- 21** *trans*-2,3-Dimethoxyzimtsäure
- 22** *trans*-1,2-Dibenzoylthylen
- 23** 3-Benzoylacrylsäure
- 24** 2-Methoxyphenyllessigsäure
- 25** 3,4-Dimethoxyphenyllessigsäure
- 26** 3-(2-Methoxyphenyl)propionsäure
- 27** (-)-Codein
- 28** Codeindicarbat
- 29** Codeincarbat
- 30** (-)-11-[²H]-Codein
- 31** Physostigmine

TOPOLOGIEN

Die folgenden Topologien entsprechen dem GROMACS-Format und sind an physikochemischen Daten verifiziert worden (siehe Kapitel 8).

TFE

```
[ atomtypes ]
; type      mass      charge  ptype      V              W
  CX         12.011    0.452    A         2.340624E-3   3.374569E-6
  FX         18.9984  -0.170    A         1.177862E-3   1.000000E-6
  CHX        14.027    0.273    A         12.496000E-3  71.747000E-6
  OAX        15.9994  -0.625    A         2.261954E-3   1.505529E-6
  HOX         1.008    0.410    A         0.000000E-3   0.000000E-6

[ moleculetype ]
; name      nrexcl
  TFE        1

[ atoms ]
; nr      type  resnr  residu  atom  cgnr  charge
  1       CX    1     TFE     C     1     0.452
  2       FX    1     TFE     F     1     -0.17
  3       FX    1     TFE     F     1     -0.17
  4       FX    1     TFE     F     1     -0.17
  5       CHX   1     TFE    CH2    1     0.273
  6       OAX   1     TFE     OA     1    -0.625
  7       HOX   1     TFE     HO     1     0.410

[ bonds ]
; ai      aj      funct
  6       7       1      1.000000e-01  3.138000e+05
  1       2       1      1.360000e-01  4.184000e+05
  1       3       1      1.360000e-01  4.184000e+05
  1       4       1      1.360000e-01  4.184000e+05
  1       5       1      1.530000e-01  3.347000e+05
  5       6       1      1.430000e-01  3.347000e+05
```

```

[ angles ]
; ai      aj      ak      funct
  5        6        7        1      1.095000e+02  3.975000e+02
  2        1        3        1      1.076000e+02  4.602000e+02
  2        1        4        1      1.076000e+02  4.602000e+02
  3        1        4        1      1.076000e+02  4.602000e+02
  2        1        5        1      1.114000e+02  4.602000e+02
  3        1        5        1      1.114000e+02  4.602000e+02
  4        1        5        1      1.114000e+02  4.602000e+02
  1        5        6        1      1.103000e+02  4.602000e+02

[ dihedrals ]
; ai      aj      ak      al      funct
  1        5        6        7        1      3      1.255200e+00  3

[ exclusions ]
; i      excluded from i
  1      2 3 4 5 6
  2      1 3 4 5
  3      1 2 4 5
  4      1 2 3 5
  5      1 2 3 4 6 7
  6      1 5 7
  7      5 6

```

HFIP

```

[ atomtypes ]
; type      mass      charge      ptype      V      W
  CF3      12.011      0.759      A      2.340624E-3  3.374569E-6
  FCT      18.9984     -0.248      A      1.177862E-3  1.000000E-6
  CHM      13.019      0.060      A      12.496000E-3  71.747000E-6
  OAC      15.9994     -0.565      A      2.261954E-3  1.505529E-6
  HAO      1.008      0.475      A      0.000000E-3  0.000000E-6

[ moleculetype ]
; Name      nrexcl
  HFP      3

[ atoms ]
; nr      type      resnr      resid      atom      cgnr      charge      mass
  1      CF3      1      HFP      CF3      1      0.759      12.0110
  2      FCT      1      HFP      FCT      1      -0.248      18.9984
  3      FCT      1      HFP      FCT      1      -0.248      18.9984
  4      FCT      1      HFP      FCT      1      -0.248      18.9984
  5      CF3      1      HFP      CF3      1      0.759      12.0110
  6      FCT      1      HFP      FCT      1      -0.248      18.9984
  7      FCT      1      HFP      FCT      1      -0.248      18.9984
  8      FCT      1      HFP      FCT      1      -0.248      18.9984
  9      CHM      1      HFP      CHM      1      0.060      13.0190
  10     OAC      1      HFP      OAC      1      -0.565      15.9994
  11     HAO      1      HFP      HAO      1      0.475      1.0080

```


[bonds]

; ai	aj	fu		
1	2	1	0.1318	338262.1
1	3	1	0.1318	338262.1
1	4	1	0.1318	338262.1
1	9	1	0.1525	334720.0
5	6	1	0.1318	338262.1
5	7	1	0.1318	338262.1
5	8	1	0.1318	338262.1
9	5	1	0.1525	334720.0
9	10	1	0.1382	334720.0
10	11	1	0.0950	313800.0

[pairs]

; ai	aj	fu		
1	6	1	0.0016604016	1.6022314e-6
1	7	1	0.0016604016	1.6022314e-6
1	8	1	0.0016604016	1.6022314e-6
1	11	1	0.0000000000	0.0000000e-6
2	5	1	0.0016604016	1.6022314e-6
2	10	1	0.0016322592	9.8122500e-7
3	5	1	0.0016604016	1.6022314e-6
3	10	1	0.0016322592	9.8122500e-7
4	5	1	0.0016604016	1.6022314e-6
4	10	1	0.0016322592	9.8122500e-7
5	11	1	0.0000000000	0.0000000e-6
7	10	1	0.0016322592	9.8122500e-7
6	10	1	0.0016322592	9.8122500e-7
8	10	1	0.0016322592	9.8122500e-7

[angles]

; ai	aj	ak	fu		
1	9	7	1	113.26	460.2
1	9	10	1	110.26	460.2
2	1	3	1	108.04	397.5
2	1	4	1	108.04	397.5
2	1	9	1	110.86	397.5
3	1	4	1	108.04	397.5
3	1	9	1	110.86	397.5
4	1	9	1	110.86	397.5
5	9	10	1	110.26	460.2
6	5	7	1	108.04	397.5
6	5	8	1	108.04	397.5
6	5	9	1	110.86	397.5
7	5	8	1	108.04	397.5
7	5	9	1	110.86	397.5
8	5	9	1	110.86	397.5
9	10	11	1	108.14	397.5

[dihedrals]

; ai	aj	ak	al	fu						
9	1	10	5	2	32.5	836.8	0			
9	5	10	1	2	327.5	836.8	0			
10	9	1	2	1	60.0	5.9	3	60.0	5.9	3
10	9	1	3	1	300.0	5.9	3	300.0	5.9	3
10	9	1	4	1	180.0	5.9	3	180.0	5.9	3
10	9	1	7	1	60.0	5.9	3	60.0	5.9	3
10	9	1	6	1	300.0	5.9	3	300.0	5.9	3
10	9	1	8	1	180.0	5.9	3	180.0	5.9	3
6	5	9	1	1	300.0	5.9	3	300.0	5.9	3
7	5	9	1	1	180.0	5.9	3	180.0	5.9	3
8	5	9	1	1	60.0	5.9	3	60.0	5.9	3
2	1	9	5	1	300.0	5.9	3	300.0	5.9	3
3	1	9	5	1	180.0	5.9	3	180.0	5.9	3
4	1	9	5	1	60.0	5.9	3	60.0	5.9	3
1	9	10	11	1	300.0	1.3	3	300.0	1.3	3
5	9	10	11	1	60.0	1.3	3	60.0	1.3	3

[exclusions]

; i	excluded from i
2	1 3 4 9
3	1 2 4 9
4	1 2 3 9
6	9 5 6 8
7	9 5 7 8
8	9 5 7 6
1	2 3 4 9 5 7 6 8 10
5	2 1 3 4 9 7 6 8 10
9	2 1 3 4 5 6 7 8 10 11
10	1 9 5 11
11	9 10

Aus dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

- Vortrag: *(-)-[β H]-Galanthamine - Labelling, derivatization and application as photoaffinity probe*. IIS-CED-Workshop, Bad Soden, 26. September 2003.
- J. KRÜGER UND G. FELS: *(-)-[β H]-Galanthamine - Application as Photoaffinity Probe*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 47:258-260, 2003.
- Vortrag: *H/D-Exchange in aromatic systems using transition metal catalysis*. IIS-CED-Workshop, Bad Soden, 18. Juni 2004.
- J. KRÜGER, B. MANMONTRI UND G. FELS: *H/D-Exchange in aromatic systems using transition metal catalysis*. Journal of labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 47: 1050, 2004.
- J. KRÜGER, B. MANMONTRI UND G. FELS: *Iridium catalyzed H/D-exchange*. European Journal of Organic Chemistry, 7:1402-1408, 2005.
- Poster: *Conformational changes of AChBP*. Computer Simulation and Theory of Macromolecules, Hünfeld, 22-23. Mai 2005
- Vortrag: *Molecular Dynamics - GROMACS on Supercomputers*. (<http://wwwcs.uni-paderborn.de/pc2/einweihung/main.htm>)
Eröffnungsfeier des Arminius-Cluster, Paderborn, 21. Juni 2005.
- Vorlesung: *Introduction to Computational Chemistry*. Universität Mersin, Türkei, 6 - 24. Oktober 2005
- J. KRÜGER, J. SIMON UND G. FELS: *Kontra Vergesslichkeit - mit Hochleistungsrechner des PC² gegen Alzheimer*. PUZ 1/2006 (<http://www.uni-paderborn.de/puz>)
- J. KRÜGER UND G. FELS: *Parallel Molecular Dynamics using Gromacs in Alzheimer research*. PC² Annual Report 2005 (<http://wwwcs.uni-paderborn.de/pc2>)