

Optische Kontrolle der Acetylcholinesterase mit einem schaltbaren Tacrin**

Johannes Broichhagen, Innokentij Jurastow, Katharina Iwan, Wolfgang Kummer und
Dirk Trauner*

Abstract: Photochrome Liganden lassen sich dazu verwenden, um diverse biologische Funktionen, insbesondere in neuronalen Systemen, zu steuern. In letzter Zeit wurde die Photokontrolle von Ionenkanälen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die in der Synapse zu finden sind, intensiv beforscht. Nun beschreiben wir die Erweiterung unseres photopharmakologischen Ansatzes zur Lichtsteuerung eines Enzyms. Unsere Untersuchungen zu photochromen Inhibitoren eines der wichtigsten Enzyme in der synaptischen Übertragung, der Acetylcholinesterase (AChE), führten zum strukturbasierten Design mehrerer Azobenzol-Analoga des bekannten AChE-Hemmers Tacrin (THA). Eine unserer Verbindungen, AzoTHA, ist ein reversibler photochromer Blocker, der AChE *in vitro* und *ex vivo* mit hoher Affinität und schneller Kinetik hemmt. Daher kann AzoTHA über den lichtabhängigen Abbau eines Neurotransmitters dazu verwendet werden, die synaptische Übertragung an der neuromuskulären Endplatte zu steuern.

Synaptischen Kommunikation basiert weitgehend auf kleinen, diffusionsfähigen Molekülen, die elektrische in chemische Signale übersetzen.^[1] Sobald Neurotransmitter von synaptischen Vesikeln freigesetzt werden, überqueren sie den synaptischen Spalt und stimulieren ligandengesteuerte Ionenkanäle und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) auf der postsynaptischen Seite. Eine dritte wesentliche Komponente der synaptischen Übertragung besteht aus Transportern oder Enzymen, die die Neurotransmitter entweder entfernen oder inaktivieren, um tonische Stimulation zu verhindern, und damit die Integration von Signalen zu ermöglichen.

Unter den vielen Neurotransmittern, die die chemische Kommunikation beim Menschen vermitteln, ist Acetylcholin (ACh) von besonderer Bedeutung. Nach seiner Freisetzung stimuliert ACh nikotinische und muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren und moduliert damit die zelluläre Erregbarkeit. Seine schnelle Inaktivierung geschieht durch die Acetylcholinesterase (AChE), die ACh diffusionskontrolliert zu Acetat und Cholin hydrolysiert (Abbildung 1a).^[2] Eine große Zahl von AChE-Inhibitoren ist bekannt, die von Medikamenten wie Tacrin (THA) über wissenschaftliche Modellverbindungen wie Decamethonium bis hin zu Nervengasen wie Sarin reicht (Abbildung 1b). Viele von diesen Liganden wurden mit AChE cokristallisiert, um detaillierte Einblicke in die Wirkungsweise dieses Enzyms und seiner Inhibitoren zu erhalten.^[3] Einige Inhibitoren sind klinisch relevant, da sie den ACh-Spiegel erhöhen, was wiederum vorteilhafte Auswirkungen auf Patienten hat, die an der Alzheimer-Krankheit, Myasthenia gravis oder an Glaukomen leiden.^[4]

In den letzten Jahren wurde die Kontrolle von neuronalen Systemen mit Licht zu einem wichtigen Forschungsgebiet, denn Licht ist nichtinvasiv und kann mit sehr hoher zeitlicher und räumlicher Präzision appliziert werden. Dies geschieht entweder mit genetisch kodierten Photorezeptoren („Optogenetik“)^[5] oder mit photoschaltbaren Wirkstoffen, deren Effizienz am nativen Rezeptoren sich bei Photoisomerisierung ändert (Abbildung 1c). Den letzteren Ansatz nennen wir „Photopharmakologie“.^[6] Sie wurde zur optischen Kontrolle von Ionenkanälen^[7] und GPCRs^[8] genutzt, um damit z. B. visuelle Prozesse in blinden Mäusen wiederherzustellen^[9] oder die von DRG-Neuronen vermittelte Schmerzempfindung zu steuern.^[10]

Enzyme wie die AChE, die eine schnelle Kinetik und einen großen Einfluss auf die Aktivität von neuronalen Netzen haben, sind ebenfalls gut geeignet für die Photopharmakologie. Tatsächlich ist die AChE in dieser Hinsicht schon sehr früh untersucht worden. Bahnbrechende Studien aus den späten 1960er und frühen 1970er Jahren von Erlanger und Kollegen zeigen, dass die Photoregulation der AChE mit Azobenzol-basierten quartären Ammoniumionen (die ACh imitieren) wie etwa *p*-Phenylazophenyltrimethylammonium und *N-p*-Phenylazophenylcarbamylcholin (Abbildung 1d) erreicht werden kann.^[11] Die Photokontrolle wurde hierbei an der aus dem Skorpion *Heterometus fulvipes* isolierten AChE durch Sonneneinstrahlung erzielt.^[11b] Die Aktivität wurde durch eine Reaktion zwischen dem nichthydrolysierten ACh und Hydroxylamin, gefolgt von photometrischer Quantifizierung eines Eisenkomplexes gemessen.^[12] Somit konnte das Prinzip des photoschaltbaren Enzyminhibitors etabliert werden.

[*] Dipl.-Chem. J. Broichhagen, K. Iwan, Prof. Dr. D. Trauner
Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München
und Center of Integrated Protein Science Munich
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: dirk.trauner@lmu.de

I. Jurastow, Prof. Dr. W. Kummer
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Deutsches Zentrum für Lungenforschung
Aulweg 123, 35392 Gießen (Deutschland)

[**] J.B. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium. Wir danken M. Schönberger und D. H. Woodmansee für hilfreiche Diskussionen und exzellenten Dialog.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details einschließlich Synthese, chemische Charakterisierung und Assay-Bedingungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201403666> zu finden.

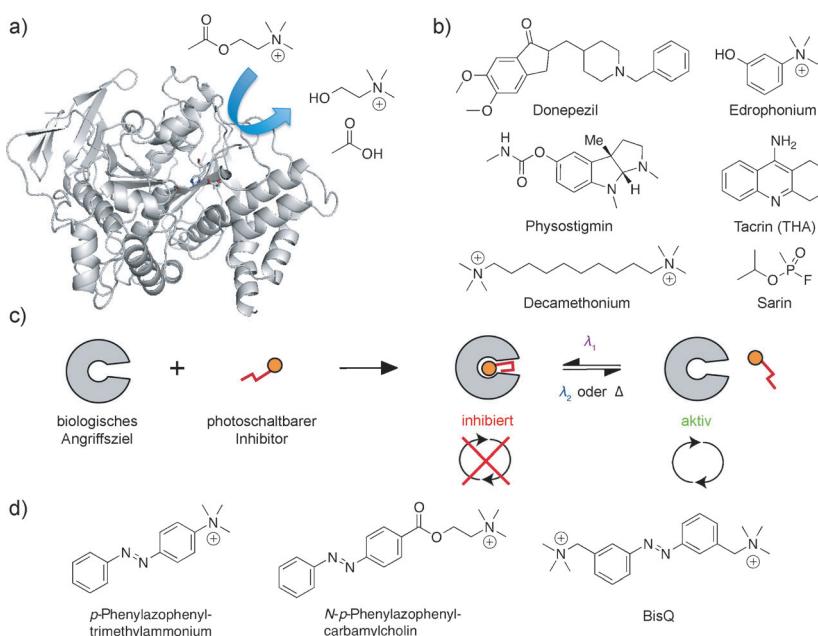


Abbildung 1. AChE-Funktion und -Inhibition. a) AChE (PDB: 1AC)^[13] katalysiert die Hydrolyse von Acetylcholin (ACh) zu Acetat und Cholin. b) Nichtkovalente und kovalente Inhibitoren der AChE. c) Photopharmakologische Kontrolle eines Enzyms mit einem photochromen Inhibitor. d) Photochrome Moleküle zur Steuerung von cholinergen Systemen.

Seit Erlangers bahnbrechenden Studien hat sich die Möglichkeit eröffnet, Enzyme heterolog zu exprimieren, und unsere Fähigkeit, diese zuverlässig zu testen und mit Röntgenkristallographie zu untersuchen und damit Liganden rational zu entwerfen, stark verbessert. Darauf hinaus ist die exakte Applikation von Licht mit einer gegebenen Wellenlänge und Intensität, von der rasanten Entwicklung der Optogenetik angetrieben, praktikabel geworden. Angesichts unseres langjährigen Interesses an der optischen Kontrolle von neuronalen Systemen haben wir daher beschlossen, photochrome Blocker einer Säugetier-AChE, namentlich der humanen AChE, neu zu untersuchen. Unser Ziel war es dabei, neue Chemotypen zu entwickeln, die sich als nützlich für die Neurowissenschaft erweisen könnten.

Um die Aktivität von humaner AChE in Gegenwart eines Photoinhibitors rasch messen zu können, modifizierten wir ein kommerziell erhältliches Analysesystem. Dieser wird dafür angeboten, den AChE-Gehalt in einer Vielzahl von biologischen Proben zu vermessen.^[14] Er nutzt die intrinsische Fähigkeit der AChE aus, Acetylthiocholin zu hydrolysieren, dessen Spaltprodukt anschließend mit dem Ellman-Reagens zu einem farbigen Thiolat weiterreagiert (Abbildung 2a). Mithilfe eines UV/Vis-Spektrometers konnten wir die Bildung des Thiolats bei $\lambda = 410$ nm verfolgen, während mit einem orthogonalen Monochromator-Lichtstrahl Licht verschiedener Wellenlängen einge-

strahlt werden konnte, um damit reversibel zu schalten (Abbildung 2b).

Unsere anfänglichen Bemühungen fokussierten sich auf das zweifach geladenen ACh-Mimetikum BisQ (Abbildung 1d), das von Erlanger und Lester als Photoagognist des nikotinischen Acetylcholinrezeptors, jedoch nicht als AChE-Photoinhibitor entwickelt und beschrieben wurde.^[15] Aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Decamethonium stellte sich uns die Frage, ob BisQ auch als photochromer Inhibitor der AChE wirken kann. BisQ ist in der Tat ein Blocker der humanen AChE im Dunkeln ($K_i = 3.13 \mu\text{M}$, Tabelle 1), der die AChE-Aktivität nach Photoisomerisierung allerdings nicht ändert. Dieses Ergebnis und eine zusätzliche Konsultation der Röntgenstruktur von an AChE gebundenes Decamethonium (PDB: 1ACL)^[13] legen nahe, dass BisQ beim Blocken des Enzyms nicht gleichzeitig beide Kationen-Bindungsstellen besetzt. Daraus folgerten wir, dass die beiden isomeren Formen von BisQ vergleichbare Inhibitionseigenschaften besitzen.

Eine systematische Sichtung von AChE-Röntgenstrukturen ergab, dass die

Inhibitoren Tacrin (THA) (PDB: 1ACJ)^[13] und 9-Benzyl-THA (PDB: 1DX4)^[16] das katalytische Zentrum des Enzyms binden, während sie teilweise der wässrigen Umgebung ausgesetzt sind. Die Tatsache, dass die Substitution in der 9-Position von THA toleriert wird, ermöglichte uns das Design von mehreren Azobenzolderivaten, die wir als AzoTHAs (Schema 1a) bezeichnen. Unsere kleine Serie umfasst ein

Tabelle 1: Inhibitiorische Konstanten (K_i) von AChE-Blockern ($N=3$, Mittelwert \pm Standardabweichung).

	THA	AzoTHA	Decamethonium	BisQ
$K_i [\text{nM}]$	6.40 ± 3.20	95.35 ± 12.39	457.8 ± 52.0	3129.3 ± 1181.4

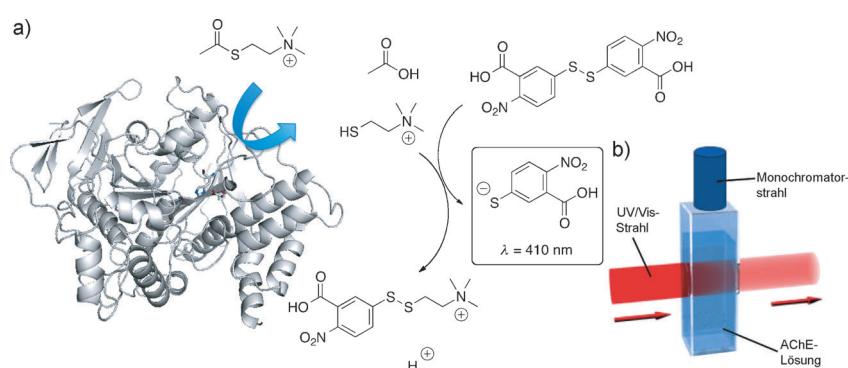
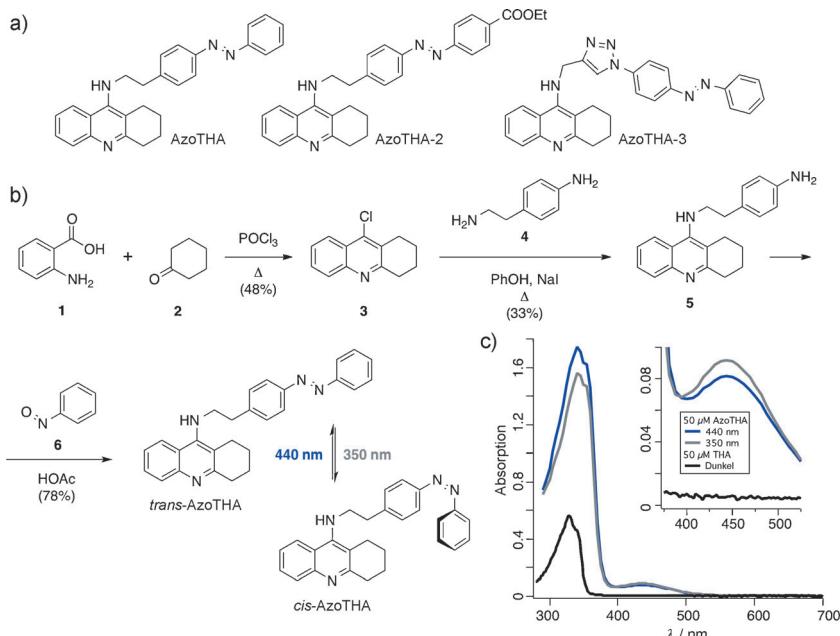


Abbildung 2. Colorimetrischer Assay zur Messung der AChE-Aktivität in Anwesenheit eines photoschaltbaren Blockers. a) Hydrolyse von Acetylthiocholin zu Thiocholin, welches mit dem Ellman-Reagens zu einem farbigen ($\lambda_{\text{max}} = 410$ nm) Thiolat reagiert. b) Schematische Darstellung der experimentellen Konfiguration.



Schema 1. Design, Synthese und Spektroskopie der AzoTHAs. a) Eine kleine Bibliothek von aus Tacrin abgeleiteten Photoschaltern. b) Dreistufensynthese für den photochromen AChE-Blocker AzoTHA, dessen reversible *cis-trans*-Isomerisierung mit UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$) und blauem Licht ($\lambda = 440 \text{ nm}$) gesteuert werden kann. c) UV/Vis-Spektrum des *cis*- (grau) und *trans*-Isomers (blau) von AzoTHA (Einschub: vergrößerter Bereich der $\pi-\pi^*$ -Bande) und THA (schwarz).

minimalsubstituiertes Azobenzol (AzoTHA), ein Esterderivat hiervon (AzoTHA-2) und ein Triazol (AzoTHA-3), das mithilfe von Klick-Chemie synthetisiert wurde, was auch den Weg für eine rasche Diversifizierung ebnen sollte. Die Synthese von AzoTHA begann mit einer Kondensationsreaktion von Anthranilsäure (**1**) und Cyclohexanon (**2**) in siedendem Phosphoroxychlorid was 9-Chlor-THA (**3**)^[17] ergab. Die Substitution des Chlorids mit 4-(2-Aminoethyl)anilin (**4**) in siedendem Phenol mit katalytischen Mengen Natriumiodid führte dann zu Phenethylaminderivat **5**. Schließlich wurde die Azobenzoleinheit über eine Mills-Reaktion mit Nitrosobenzol (**6**) installiert (Schema 1b). Als ein „nacktes“ Azobenzol konnte AzoTHA mit UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$, graue Linie) in seine *cis*-Form und mit blauem Licht ($\lambda = 440 \text{ nm}$, blaue Linie) wieder in seine *trans*-Form isomerisiert werden. Die kleine Änderung der $\pi-\pi^*$ -Bande bei Bestrahlung kann zum Teil auf die darunterliegende Absorption des Chinolin-Chromophors von THA (schwarze Linie) zurückgeführt werden (Schema 1c). Details zur Photokinematik der AzoTHAs und zur Synthese von AzoTHA-2 und AzoTHA-3 können den Hintergrundinformationen entnommen werden.

AzoTHA hemmt in seiner dunkeladaptierten Form die AChE mit einem K_i von ca. 100 nm (Tabelle 1), während AzoTHA-2 und AzoTHA-3 signifikant niedrigere Affinitäten zeigten (siehe die Hintergrundinformationen). Als solches ist *trans*-AzoTHA etwa zehnfach weniger aktiv als THA, aber nichtsdestotrotz aktiver als Decamethonium und BisQ.

Nach der Bestimmung der K_i der AzoTHAs verfolgten wir die lichtabhängige Aktivität unserer Inhibitoren bei den jeweils optimalen Konzentrationen. In der Photopharmako-

logie ist es generell ratsam, Konzentrationen in der Nähe des K_i (oder EC_{50}) des dunkeladaptierten Zustands einzusetzen, da die größte dynamische Veränderung durch Photoisomerisierung in dieser Region erwartet werden kann. Bei Inkubation von 0.05 U mL^{-1} AChE zusammen mit 1.0 μM AzoTHA war es uns möglich, lichtabhängige Aktivität zu induzieren (Abbildung 3a). Dagegen zeigten AzoTHA-2 und AzoTHA-3 keine Lichtabhängigkeit und zudem geringere Inhibitionseigenschaften. Unsere Untersuchungen konzentrierten sich daher auf AzoTHA (Abbildung 3). Verglichen mit freier AChE wurde die Aktivität auf 17% reduziert, wenn die Lösung mit blauem Licht ($\lambda = 440 \text{ nm}$) bestrahlt wurde, während die Aktivität fast völlig verschwand (4%), wenn auf UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$) umgeschaltet wurde. Demnach ist AzoTHA ein stärkerer Inhibitor in der *cis*-Form und verliert in der im Dunkeln adaptierten *trans*-Form an Affinität. Dieser Effekt konnte über viele Zyklen ohne Aktivitätsverlust wiederholt werden (Abbildung 3b,c). Wenn die Off- und On-Ki-

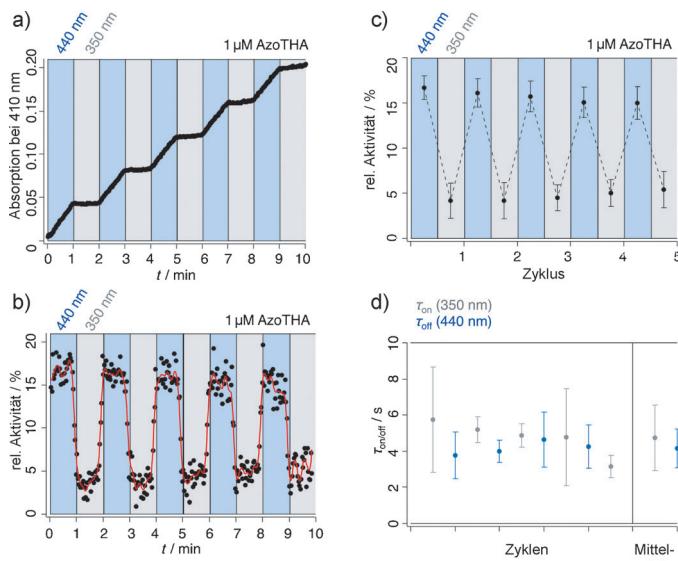


Abbildung 3. In-vitro-Photokontrolle von AChE mit AzoTHA. a) Hydrolyse von Acetylthiocholin durch AChE (0.05 U mL^{-1}), AzoTHA (1 μM) und unter Bestrahlung mit blauem ($\lambda = 440 \text{ nm}$, blau hinterlegt) oder UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$, grau hinterlegt). b) Reversible Photokontrolle von AChE (0.05 U mL^{-1}) mit 1 μM AzoTHA unter blauem Licht ($\lambda = 440 \text{ nm}$, blau hinterlegt) und UV-Licht ($\lambda = 350 \text{ nm}$, grau hinterlegt). Schwarze Punkte repräsentieren numerisch abgeleitete Werte der katalytischen Aktivität (siehe a), die rote Linie zeigt die binomiale Anpassung. c) Durchschnittliche lichtabhängige Aktivität errechnet aus b über 5 Zyklen. d) τ_{on} (blau) und τ_{off} (blau) Werte für die wiederholte Desaktivierung und Aktivierung über 5 Zyklen (links) und deren Mittelwerte (rechts). Fehlerbalken beschreiben Standardabweichung; $N=3$ in allen Experimenten.

netik der Photoschaltbarkeit mit einer Exponentialfunktion angepasst wird, bleiben die τ_{on} -Werte über die gemessenen Zyklen stabil (Abbildung 3d). Deren Mittelwert wurden als $\tau_{off} = (4.74 \pm 1.81)$ s und $\tau_{on} = (4.17 \pm 1.09)$ s bestimmt.

Um zu zeigen, dass AzoTHA zur Beeinflussung physiologischer Prozesse mit Licht verwendet werden kann, testeten wir AzoTHA an der Mauslufttröhre. Die glatte Muskulatur der Atemwege verengt sich als Reaktion auf die Ausschüttung von ACh, was durch einen Kraftmesser verfolgt werden kann. Dieser Assay ist als tracheale Tensometrie bekannt.^[18] Elektrische Feldstimulation (EFS) führt zur Freisetzung von ACh an der neuromuskulären Endplatte, in Analogie zum klassischen Loewi-Experiment.^[19] Wird die elektrische Stimulation abgeschaltet, so wird auch die ACh-Freisetzung von den Nervenfasern beendet und die Kinetik der Relaxation der Luftröhre reflektiert den ACh-Abbau durch AChE. Der hochaffine AChE-Blocker Physostigmin wurde als Referenz in unseren Experimenten verwendet. Physostigmin (10 μM) induziert eine Kontraktion des Präparats auch ohne weitere EFS (Abbildung 4a), was auf eine direkte Aktivierung von Acetylcholin-Rezeptoren zusätzlich zur AChE-Hemmung zurückgeführt werden kann.^[20] Dagegen führten 50 μM AzoTHA in Abwesenheit von Licht nicht zu einer Erhöhung des basalen Tonus (Abbildung 4a). Daher ist AzoTHA besser geeignet, um cholinerge Systeme sauber zu studieren. Mit AzoTHA (50 μM) behandelte Tracheen wurden durch EFS angeregt (100 Hz, 10 V, 2 ms) und verschiedene Relaxationskinetiken wurden unter Bestrahlung mit UV- und blauem Licht beobachtet (Abbildung 4b). Die gemessenen Kinetiken sind in Übereinstimmung mit den vorangegangenen In-vitro-Experimenten: in Anwesenheit von *cis*-AzoTHA (UV-Bestrahlung) wird die AChE in einem größeren Umfang gehemmt und die ACh-Hydrolyse verläuft deutlich langsamer ($\tau_{off,cis} = (15.25 \pm 1.48)$ s) als in Gegenwart von *trans*-AzoTHA (blaues Licht, $\tau_{off,trans} = (11.29 \pm 0.77)$ s). In Abwesenheit eines Inhibitors wird ACh noch schneller abgebaut ($\tau_{off} = (4.81 \pm 0.95)$ s) (Abbildung 4c). Unsere Ergebnisse zeigen eine Zunahme der lichtinduzierten Hemmung um 61 % unter UV-Licht (Hintergrund subtrahiert). Es sei darauf hingewiesen, dass eine Amplitudenabnahme in Kontrollexperimenten bei EFS ohne Anwesenheit eines AChE-Blockers beobachtet wurde. Dennoch zeigt die Kinetik unter UV- und blauem Licht die gleiche Tendenz, unabhängig von der Reihenfolge der Bestrahlung (siehe die Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend haben wir, basierend auf rationalem Design, mehrere neue photochrome AChE-Hemmer synthetisiert und damit eines der wichtigsten Enzyme, das an synaptischen Übertragungen von Signalen beteiligt ist, lichtempfindlich gemacht. Auf der Basis eines kommerziell erhältlichen AChE-Analysesystems entwickelten wir eine allgemein anwendbare Methode zur lichtabhängigen Messung der AchE-Aktivität durch photochrome AChE-Inhibitoren. Mithilfe dieses In-vitro-Assays identifizierten wir eines un-

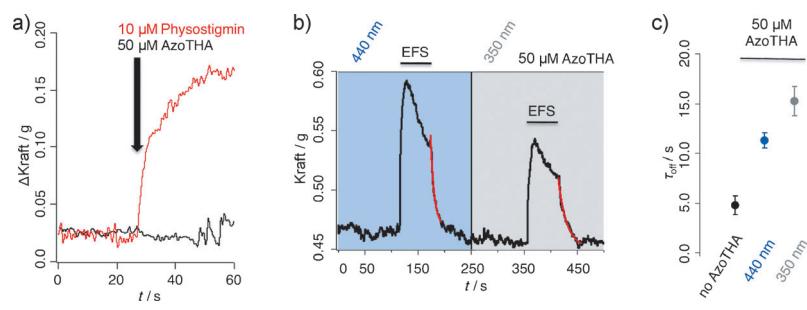


Abbildung 4. Ex-vivo-Photokontrolle von AChE mit AzoTHA. a) Der basale Tonus wird in Mastrachea-Präparationen von AzoTHA (50 μM , schwarz) im Gegensatz zu Physostigmin (10 μM , rot) nicht beeinflusst. b) Die Relaxationskinetik in Mastrachea-Präparationen ist langsamer unter Bestrahlung mit UV-Licht (350 nm) als mit blauem Licht (440 nm) (50 μM AzoTHA, EFS, 100 Hz, 10 V, 2 ms). c) τ_{off} -Werte exponentiell angepasst aus (b) ohne Blocker (schwarz) und mit AzoTHA (50 μM) unter blauem ($\lambda = 440$ nm, blau) und UV-Licht ($\lambda = 350$ nm, grau); ($N = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung, t-Test: $p = 0.02$).

serer Moleküle, AzoTHA, als reversiblen und schnellen Photoschalter der enzymatischen Aktivität. Weiterhin haben wir festgestellt, dass BisQ, ein bekannter photochromer Acetylcholin-Rezeptoragonist keinen lichtabhängigen Einfluss auf die AChE-Aktivität ausübt. Weitere biologische Untersuchungen ergaben, dass AzoTHA eine lichtabhängige Wirkung auf die AChE-Kinetik in Mastrachea-Präparaten hat und bessere Eigenschaften als Physostigmin besitzt. In Übereinstimmung mit unseren In-vitro-Ergebnissen kann die AChE-Aktivität mit UV-Licht stärker reduziert werden als mit blauem Licht.

Während sich unser Manuscript in der Revision befand erschien eine Arbeit von Decker und Kollegen, die die optische Kontrolle der AChE-Aktivität durch ein Dithienylethen beschreibt, was mithilfe eines einen β -Amyloid-Aggregationsassays nachgewiesen wurde.^[21] Aufgrund der langen Beleuchtungszeiten, die für das Schalten nötig sind, und der unterschiedlichen biologischen Ziele, unterscheidet sich diese Verbindung von AzoTHA, das auf einer Zeitskala im Sekundenbereich funktioniert und biologische Effekte an der neuromuskulären Endplatte zeigt. Unsere Studie ist daher das erste Beispiel der Manipulation von neuronaler Kommunikation durch die optische Kontrolle eines Enzyms, welches einen Neurotransmitter von der aktiven Zone entfernt.

Eingegangen am 24. März 2014
Online veröffentlicht am 4. Juni 2014

Stichwörter: Acetylcholinesterase · Photochrome Blocker · Photopharmakologie · Tacrin · Tracheale Tensometrie

- [1] M. F. Bear, B. W. Connors, M. A. Paradiso, *Neuroscience*, 2. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, **2001**.
- [2] P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4025–4028.
- [3] H. Soreq, S. Seidman, *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, 2, 294–302.
- [4] C. B. Millard, C. A. Broomfield, *J. Neurochem.* **1995**, 64, 1909–1918.
- [5] *Nat. Methods* **2011**, 8, 1.

- [6] T. Fehrentz, M. Schonberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12362–12390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12156–12182.
- [7] a) M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381–1386; b) M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 47–52.
- [8] J. Levitz, C. Pantoja, B. Gaub, H. Janovjak, A. Reiner, A. Hoagland, D. Schoppik, B. Kane, P. Stawski, A. F. Schier, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Nat. Neurosci.* **2013**, *16*, 507–516.
- [9] A. Polosukhina, J. Litt, I. Tochitsky, J. Nemargut, Y. Sychev, I. De Kouchkovsky, T. Huang, K. Borges, D. Trauner, R. N. Van Gelder, R. H. Kramer, *Neuron* **2012**, *75*, 271–282.
- [10] A. Mourot, T. Fehrentz, Y. Le Feuvre, C. M. Smith, C. Herold, D. Dalkara, F. Nagy, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 396–402.
- [11] a) J. Bieth, S. M. Vratsanos, N. Wassermann, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *64*, 1103–1106; b) J. Bieth, N. Wassermann, S. M. Vratsanos, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *66*, 850–854; c) J. Bieth, S. M. Vratsanos, N. H. Wassermann, A. G. Cooper, B. F. Erlanger, *Biochemistry* **1973**, *12*, 3023–3027.
- [12] S. Hestrin, *J. Biol. Chem.* **1949**, *180*, 249–261.
- [13] M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. H. Axelsen, I. Silman, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9031–9035.
- [14] abcam Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric) (ab138871).
- [15] E. Bartels, N. H. Wassermann, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1820–1823.
- [16] M. Harel, G. Kryger, T. L. Rosenberry, W. D. Mallender, T. Lewis, R. J. Fletcher, J. M. Guss, I. Silman, J. L. Sussman, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1063–1072.
- [17] M. K. Hu, L. J. Wu, G. Hsiao, M. H. Yen, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2277–2282.
- [18] R. F. Carlyle, *Br. J. Pharmacol. Chemoth.* **1964**, *22*, 126–136.
- [19] M. F. Bear, B. W. Connors, M. A. Paradiso, *Neuroscience*, 3. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, **2007**.
- [20] R. F. Carlyle, *Br. J. Pharmacol. Chemoth.* **1963**, *21*, 137–149.
- [21] X. Chen, S. Wehle, N. Kuzmanovic, B. Merget, U. Holzgrabe, B. Konig, C. A. Sottriffer, M. Decker, *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 377–389.