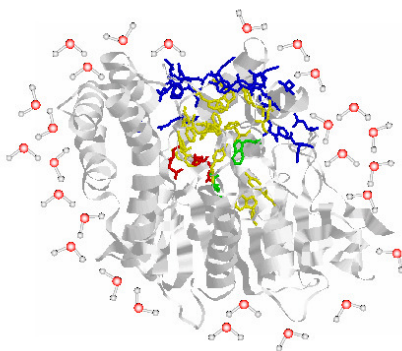




Angela Souza da Fonseca Ramos (Autor)
**Einfluss der Wasserstruktur auf
diffusionskontrollierte Enzymreaktionen:
Spektroskopische und kinetische Untersuchungen**

Angela Souza da Fonseca Ramos

Einfluss der Wasserstruktur
auf diffusionskontrollierte Enzymreaktionen:
Spektroskopische und kinetische
Untersuchungen



Max-Planck-Institut
für biophysikalische Chemie
Universität Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2681>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

i.	Abkürzungen	5
ii.	Naturkonstanten	6
iii.	Verwendete Programme und Datenbanken.....	7
iv.	Substanzen und Lösungsmittel.....	7
iv.1	Acetylcholinesterase – Aufreinigung.....	8
1	Einleitung	9
1.1	Motivation	9
1.2	Gliederung der vorliegenden Arbeit.....	10
2	Apparativer Aufbau.....	11
2.1	UV/Vis/NIR Absorptionsspektrometer	11
2.2	UV/Vis Emissionsspektrometer	12
2.3	Einzelphotonenzählapparatur	14
2.4	Röntgenkleinwinkelstreuapparatur	16
2.5	Zirkulardichroismusapparatur	18
3	Enzymkinetik von AChE	20
3.1	Modelle diffusionskontrollierter Enzymreaktionen	20
3.1.1	Diffusionsabhängigkeit der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante k_f	21
3.1.1.1	Theorie nach Smoluchowski	22
3.1.1.2	Bergsche Theorie	25
3.1.1.3	Theorie nach Barzykin und Shushin	28
3.1.2	Diffusionskontrollierte Reaktionen geladener Teilchen	33
3.1.2.1	Debye-Hückel-Theorie.....	33
3.1.2.2	Theorie nach Hammes und Alberty	36
3.2	Enzymkinetik	37
3.2.1	Enzymkinetik diffusionskontrollierter Reaktionen.....	43
3.3	Acetylcholinesterase als Enzym-Modell (Wissenschaftlicher Kontext).....	45
3.3.1	AChE-Funktion	45
3.3.1.1	Enzymmechanismus.....	46
3.3.1.2	Kinetik.....	47

3.3.2	AChE-Struktur	49
3.3.2.1	Tertiärstruktur	49
3.3.2.2	Quartärstruktur	50
3.3.3	AChE-Struktur-Funktion	54
3.3.3.1	Aktives Zentrum.....	54
3.3.3.1.1	Reaktionssubzentrum (esteratic subsite)	55
3.3.3.1.2	Wechselwirkendes Subzentrum (anionic subsite).....	55
3.3.3.2	Gorge (Schlund).....	56
3.3.3.3	PAS (randständiges anionisches Zentrum)	57
3.4	Methoden zur experimentellen Bestimmung von Reaktionsgeschwindigkeiten	60
3.4.1	Charakterisierung des Enzyms.....	60
3.4.2	Ellman-Essay.....	62
3.5	Einfluss der Temperatur auf die AChE Kinetik (Messergebnisse).....	65
3.5.1	Aktivierungsenergie	66
3.5.2	Auswirkung der Temperatur auf k_{cat}/K_m	68
3.6	Einfluss des Lösungsmittels auf die AChE-Kinetik (Messergebnisse).....	68
3.6.1	Einfluss des Ethanol auf die AChE-Kinetik	69
3.6.2	Einfluss der Ionen auf die AChE-Kinetik	73
3.7	Analyse der kinetischen Ergebnisse.....	102
3.7.1	Anwendung der Modelle für diffusionskontrollierte Enzymreaktionen	102
3.7.2	Debye-Hückel-Theorie.....	110
4	Bestimmung der lokalen dielektrischen Konstante des aktiven Zentrums von AChE. ..	115
4.1	PyDMA als Inhibitor.....	116
4.2	PyDMA-AChE Komplex - Bildung.....	120
4.3	Struktur des PyDMA-AChE-Komplexes.....	122
4.4	Bathochromische Verschiebung der PyDMA-Fluoreszenz	124
4.5	Dielektrische Eigenschaften des AChE-Schlundes und des aktiven Zentrums	127
5	AChE- Konformation in ionischen Lösungen	130
5.1	AChE-Fluoreszenz	130
5.1.1	Tryptophan-Fluoreszenz	132
5.1.2	Beziehung zwischen AChE-Fluoreszenz und Konformationsänderung	132

5.1.3	Messergebnisse	135
5.2	Zirkulardichroismus	136
5.2.1	Prinzip des Zirkulardichroismus (CD)	136
5.2.2	Messergebnisse	139
6	Wasserstruktur	141
6.1	Wasserstruktur-Modelle	142
6.2	Intramolekulare Schwingungen des Wassers	144
6.3	Beziehung zwischen intramolekularer Schwingungen und der Wasserstruktur	145
6.4	Messergebnisse	147
6.4.1	Auswirkung der Temperatur auf die Wasserstruktur	149
6.4.2	Einfluss der Ionen auf die Wasserstruktur	151
7	Untersuchung zur strukturellen Beweglichkeit von AChE	160
7.1	Grundlagen der Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie	160
7.1.1	Photoselektion	161
7.1.2	Fluoreszenzpolarisation	162
7.1.3	Fluoreszenzdepolarisation	165
7.2	AChE-Dynamik (wissenschaftlicher Kontext)	167
7.3	Strukturelle Beweglichkeit von AChE (Messergebnisse)	168
8	Untersuchung zur AChE-Solvatation	173
8.1	AChE-Hydratation (Einführung)	173
8.2	Absorption der Hydratationshülle von AChE im IR-Bereich	174
8.3	Kleinwinkelröntgenstreuung	182
8.3.1	Messprinzip	183
8.3.2	Messergebnisse	185
8.4	AChE-Hydratation	193
8.4.1	Volumenbestimmung	193
8.4.2	Volumen der Hydratationshülle	195
9	Zusammenhang zwischen Messergebnissen	197
9.1	Abhängigkeit der Kinetik von der Wasserstruktur	197
9.2	Beziehung zwischen AChE-Solvatation und Wasserstruktur der Lösung	200

9.3	Strukturelle Beweglichkeit von AChE und AChE-Solvatation	201
10	Zusammenfassung.....	205
11	Referenz	206
	ANHANG	219
i.	Modulation der Intensität (I) mit der Zeit (t) in CD-Apparatur.....	219
ii.	Viskosität von Wasser.....	219
iii.	Lösungsmittelparameter.....	220
iv.	Wasserkonzentrationen in 300 mM ionische Lösungen	221
v.	Fehlerberechnung.....	222
vi.	Dielektrische Konstanten von Wasser	222
vii.	Gleichungen zur Ernergienivaus von anharmonischen Schwingungen.....	223
viii.	Konferenzbeiträge und Veröffentlichungen.....	224