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_1 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 (estereatic 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 Ethanols 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