

## **1 Einleitung**

### **1.1 Motivation**

Enzyme zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Wirksamkeit aus. Diese Spezifität beruht auf der komplexen Struktur des Enzyms, dessen chemische Gruppen sich um das Substrat arrangieren müssen („aktives Zentrum“), um die Reaktion effektiv zu katalysieren. Dadurch können Enzyme einerseits die Reaktionsaktivierungsenergie stark vermindern; andererseits wird die Einlagerung des Reagens in das aktive Zentrum schwieriger, was wiederum die Reaktion verlangsamen kann. Da die Reaktion ohne die richtige Positionierung des Reagens nicht katalysiert wird, ist der Prozess, bei dem das Reagens aus der Lösung den richtigen reaktiven Ort findet, von bedeutender Wichtigkeit. Dies ist das Thema dieser Doktorarbeit.

Im Folgenden werden die physiko-chemischen Parameter, die diese Prozesse beeinflussen, untersucht. Wegen seiner hohen katalytischen Wirksamkeit (Nolte *et al.*, 1980) und seiner besonderen Struktur (Sussman *et al.*, 1991) wurde das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) als System gewählt. Obwohl viele Arbeiten in der Literatur der Charakterisierung der Diffusion und der Einlagerung des Substrats in AChE gewidmet sind, ist bisher noch nicht klar, wie das Substrat in so kurzer Zeit das aktive Zentrum erreichen kann und wie die Produkte so schnell dem Enzym entkommen können.

Von besonderem Interesse sind hierbei die Untersuchung des Einflusses der Struktur des wässrigen Lösungsmittels auf die AChE-Kinetik sowie der Zusammenhang zwischen der Wasserstruktur, dem Begegnungsprozess, der strukturellen Beweglichkeit von AChE und der Solvation des Enzyms.

## 1.2 Gliederung der vorliegenden Arbeit

Für die Untersuchung dieser verschiedenen Aspekte wurden verschiedene experimentelle Methoden angewendet, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

Der Untersuchung der Diffusion und der Einlagerung des Substrats in AChE ist das dritte Kapitel gewidmet. Dieses beginnt mit einer Darstellung der Theorie diffusionskontrollierter Reaktionen. Der Theorie schließt sich ein Abschnitt an, der die Eigenschaften von AChE beschreibt. Von diesen Grundlagen ausgehend werden die gemessenen und auch die durch die Lösungsmittel beeinflussten, kinetischen Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

Für eine genauere Analyse des Begegnungsprozesses wurde die dielektrische Konstante in der Region des aktiven Zentrums bestimmt. Im vierten Kapitel wird das hierzu entwickelte Verfahren beschrieben. Der Methode liegen die solvatochromen Eigenschaften des Laserfarbstoffes (*N,N*-dimethyl(4-pyren-1-ylphenyl)-amin) zugrunde und seine Fähigkeit, sich spezifisch in das aktive Zentrum von AChE zu binden.

Im fünften Kapitel wird die Struktur von AChE in verschiedene Lösungen untersucht und geklärt, ob die AChE-Struktur durch die Lösungsmittel zerstört wird.

Im sechsten Kapitel wird das Wasserstoffbrückennetzwerk in verschiedenen AChE-Lösungen durch Infrarotspektroskopie charakterisiert. Durch die Bestimmung der Anteile der freien, nicht durch Wasserstoffbrücken gebundenen OH-Gruppen und der schwachen Wasserstoffbrücken im flüssigen Wasser erhält man eine genauere Beschreibung der Wasserstruktur.

Die Untersuchung der strukturellen Beweglichkeit von AChE in den verschiedenen Lösungen ist im siebten Kapitel dargestellt. Nach einer Einführung in die Grundlagen der Fluoreszenzdepolarisationspektroskopie werden die Messergebnisse dargestellt und diskutiert. Den Einfluss der wässrigen Lösungen auf die Solvation von AChE wurde mittels Infrarotspektroskopie und Kleinwinkelstreuung charakterisiert. Die Ergebnisse sind im achten Kapitel zusammengefasst.

Im neunten Kapitel werden die verschiedenen experimentellen Ergebnisse und deren Zusammenhang diskutiert.

Die Arbeit schließt mit einer Zusammenfassung.

## 2 Apparativer Aufbau

In dieser Arbeit wurden verschiedene spektroskopische und Röntgenstreu-Techniken angewandt:

Stationäre UV-, VIS- und NIR-Absorptionsspektroskopie, stationäre Emissionsspektroskopie, die durch die Polarisationspektroskopie ergänzt wurde. Die Lebensdauern im ns-Bereich wurden durch Einzelphotonenzähl-Messungen bestimmt. Für die Röntgenkleinwinkelstreuungen wurde ein Krakty-Kamera-System benutzt.

### 2.1 UV/Vis/NIR Absorptionsspektrometer

Die Absorptionsmessungen wurden mit dem Cary-5E Zweistrahl-Spektrophotometer (©Varian Australia Pty Ltd.) durchgeführt. Dieser Apparat misst die optische Transmission der Probe im UV-, sichtbaren (VIS) und Nahen Infrarot (NIR)-Bereich. Für den UV-Bereich wird eine Deuterium-Lampe und für den VIS/IR-Bereich eine QI-Lampe eingesetzt.

Die Auflösung der Messungen betrug  $\pm 1$  nm. Alle Spektren wurden durch Subtraktion eines Untergrundspektrums korrigiert. Für alle Messungen wurden die Proben temperiert und unter  $N_2$ -Atmosphäre aufgenommen. Für die Absorption des Wassers in den ionischen Lösungen im NIR-Bereich wurde die Spektren gegen die reelle Wasserkonzentration (**Anhang iv**) normiert. Die Auflösung der Messungen betrug hier 0,5 nm. Der Aufbau des Spektrometers ist in der **Abbildung 2.1** dargestellt.

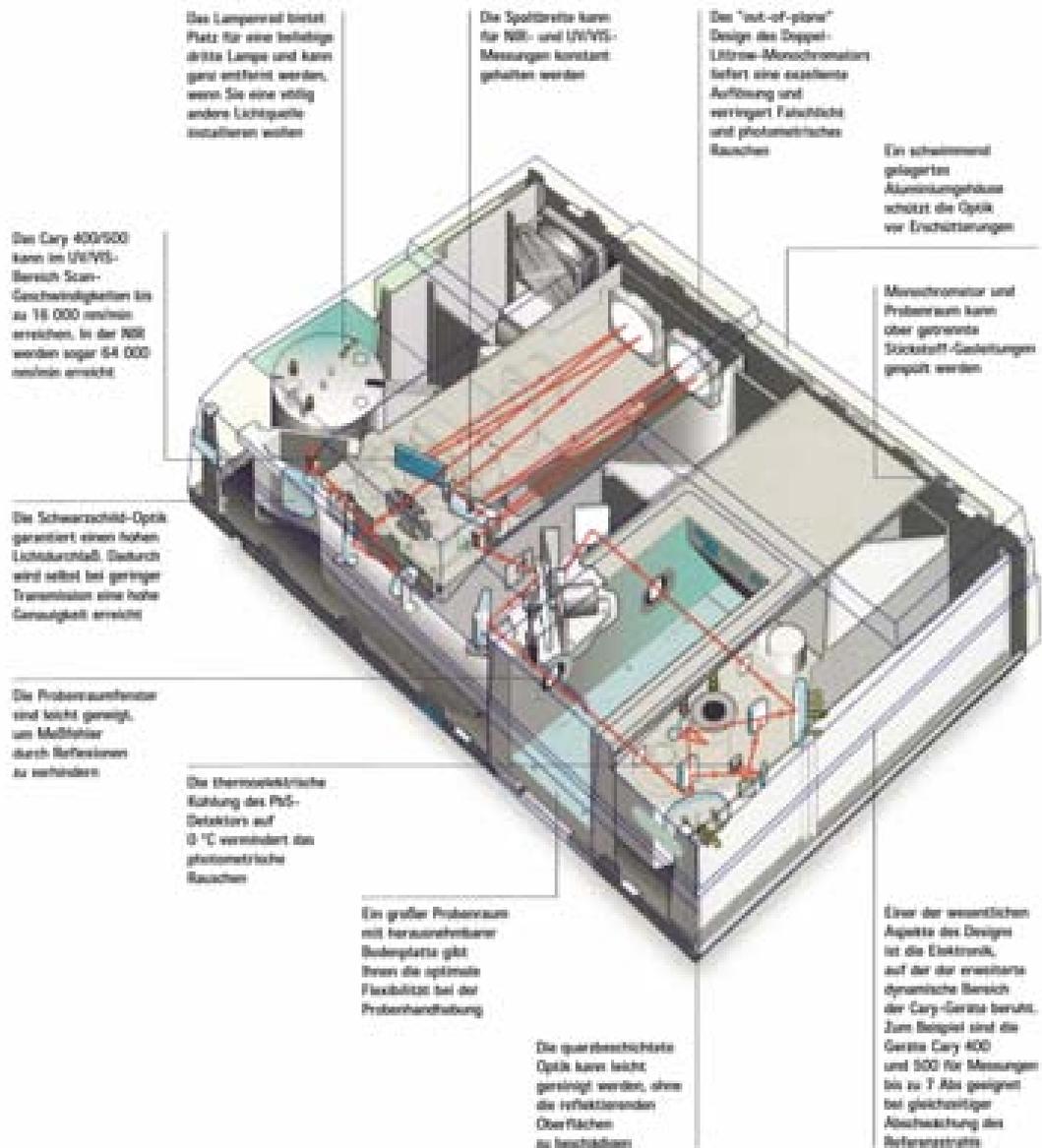
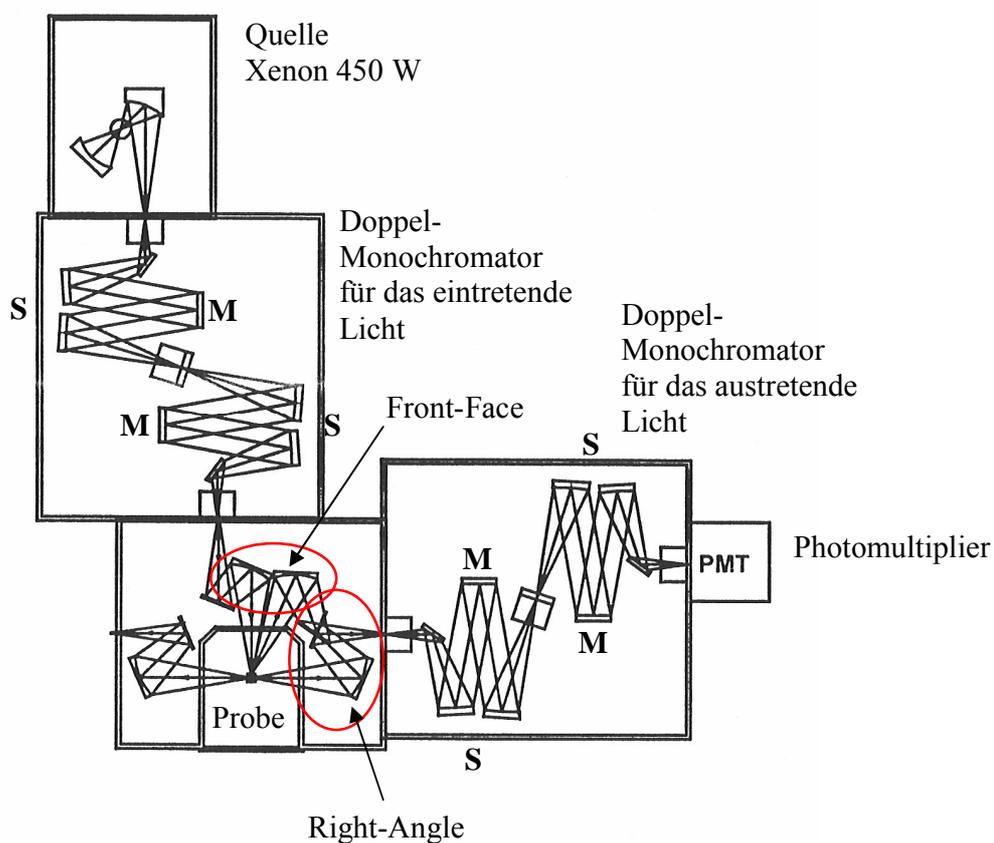


Abbildung 2.1 – Aufbau des Cary-5E Spektrometers (aus dem Varian Handbuch).

## 2.2 UV/Vis Emissionsspektrometer

Die Messungen der stationären Emissionsspektren erfolgten mit einem Emissionsspektrometer der Firma JOBIN YVON-SPEX (Fluorolog 3-22). Die Auflösung für

die gemessenen Spektren lag bei  $\pm 0,5$  nm. Der Messbereich erstreckte sich von 300 nm ( $33333$   $\text{cm}^{-1}$ ) bis 700 nm ( $14200$   $\text{cm}^{-1}$ ), empfindlichkeitskorrigiert. Der Aufbau des Spektrometers ist in der **Abbildung 2.2** gezeigt. Die Spektren wurden bezüglich der wellenlängenabhängigen Detektorempfindlichkeit und der spektralen Kennkurve der Monochromatoren korrigiert. Die AChE Konzentration in allen ionischen Lösungen betrug  $1 \mu\text{M}$  in  $2\text{mM}$  Kaliumphosphat Puffer pH 8,0. Die Anregungswellenlänge war  $297$  nm für die Polarisationsmessungen, um die Anregung von Tyrosin und die Anregung in das  $L_b$ -Dipolmoment von Tryptophan (**Abb 5.3**) zu vermeiden. Alle Messungen wurden bei  $5^\circ\text{C}$  (Termbad) und unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre durchgeführt.

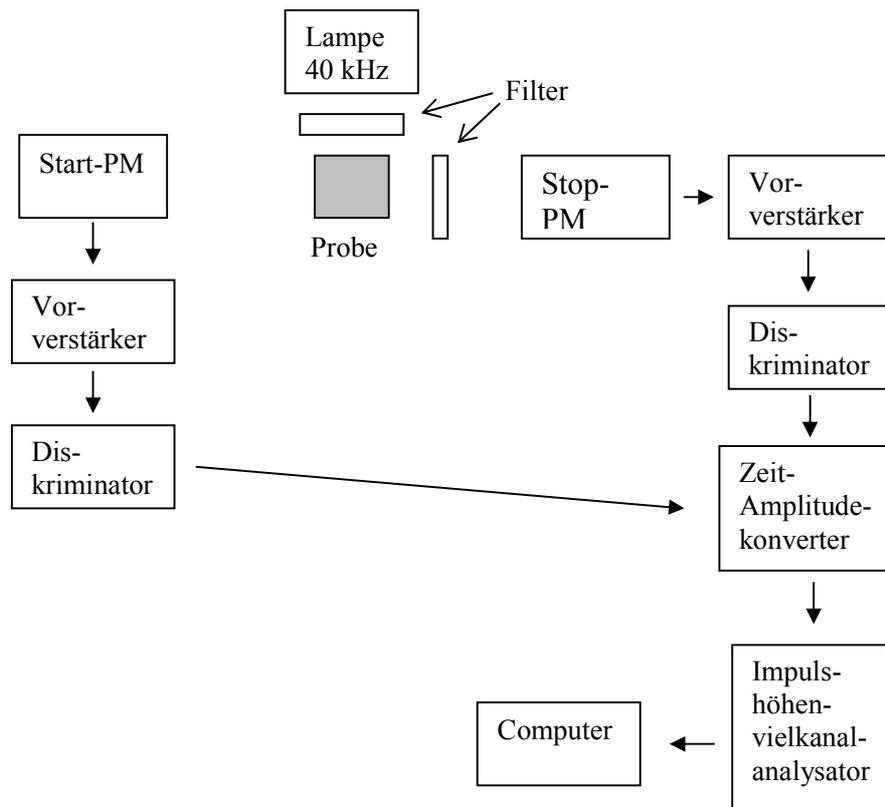


**Abbildung 2.2** – Aufbau des Fluorolog 3-22 Spektrometers der Firma Jobin-Yvon. M= Monochromator. S = Spiegel.

### 2.3 Einzelphotonenzählapparatur

Die Lebensdauern wurden mittels der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählapparatur (TCSPC) bestimmt. Mit der TCSPC misst man nach Anregung einer fluoreszierenden Probe die Wahrscheinlichkeit, in dem Zeitintervall  $(t, t+\Delta t)$ , ein Emissionsereignis zu beobachten. Die Spektren werden mit dem Levenburg-Marquardt-Algorithmus ausgewertet und liefern die Abklingkonstanten für die Fluoreszenz. Die Bogenlampe kommt von Edinburgh Instruments die Elektronik von Ortec.

Die Probe wird mit der Wellenlänge 298 nm angeregt, die durch Filter aus den diskreten Spektrum der N<sub>2</sub>-Bogenlampe oder den kontinuierliche Spektrum der Deuterium-Bogenlampe ausselektiert wird. Die Zeitmarken, die die Zeitdifferenz  $t$  definiert, werden durch den Start- und den Stop-Photomultiplier festgelegt. Der Start-Photomultiplier liefert im Takt der Bogenlampe einen Impuls, der hochempfindliche Stop-Photomultiplier immer dann einen, wenn ein Photon des Fluoreszenzlichtes auf seine Kathode trifft. Beide Signale werden über Diskriminatoren dem Zeit-Amplituden-Konverter zugeleitet, der die Zeitdifferenz  $t$  in ein Signal mit zu  $t$  proportionaler Amplitude umwandelt. Dieser Impuls wird dem Vielkanal-Impulshöhenanalysator zugeführt, in dessen Speicher im Laufe der Messung das Zeitspektrum der Emissionswahrscheinlichkeit entsteht. Das Schema der Apparatur ist in der **Abbildung 2.3** dargestellt. Die zeitliche Auflösungsvermögen betrug 0,5 ns und das zeitliche Messfenster erstreckte sich von 1 ns bis 2  $\mu$ s. Die ausgewerteten  $\chi^2$  lagen bei ca. 1.8.

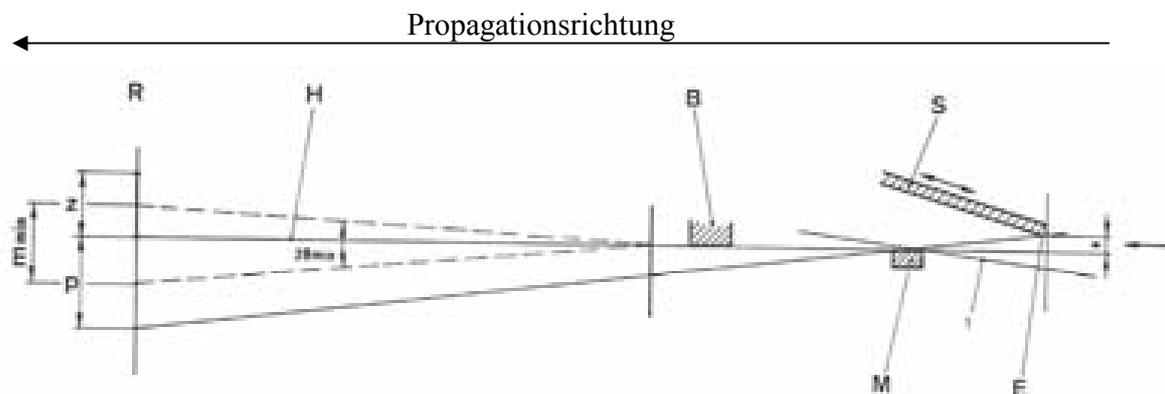


**Abbildung 2.3** – Die Einzelphotonenzählapparatur.

## 2.4 Röntgenkleinwinkelstreuapparatur

Die Röntgenkleinwinkelstremessungen wurden mit einem Kratky-Kamera (Fa. Anton Paar Germany, GmbH – **Abb. 2.4**) durchgeführt. Durch einen Röntgenlicht-Generator (Cu-K $\alpha$ -Kathode) wird das Licht mit 1.54 Å Wellenlänge erzeugt. Das Licht wird in der Kratky-Kamera kollimiert und das von der Probe gestreute Röntgenlicht wird von einem ortempfindlichen Zeilendetektor registriert, der mit einem Argon-Methan-Gemisch gespült wird.

Das Kollimationssystem blendet den bandförmigen Primärstrahl aus (**Abb. 2.4 und 2.5**). Die Bündelung erfolgt an drei Flächen – der Eintrittsfläche **E**, der Mittelkante **M** und der Brücken **B**. Die Flächen **B** und **M** sind feststehend und bilden die Hauptschnittfläche **H**, oberhalb der aus geometrischen Gründen praktisch keine Blendenstreuung auftreten kann. Die Breite **p** des Primärstrahles und damit auch seine Intensität sind durch die Lage der Eintrittsfläche **E** bestimmt. Der Abstand **e** zwischen der Eintrittsfläche und dem Hauptschnitt wird als Eintrittspalt bezeichnet, obwohl kein echter Spalt vorhanden ist. Die Längsausdehnung des Fokus und der zwei Schneiden wird über die Längsbegrenzung **LB** definiert.



**Abbildung 2.4** – Kollimationssystem der Kratky-Kamera. R= Registrierebene, S = Schieber (sieh auch Text).