

---

# **3D-Fluoreszenzspektroskopie mit Tryptophan und Tryptophan-Analoga: von Lösungsmiteleinflüssen zu Proteinkonformationen**

Dissertation  
zum Erlangen des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
der Universität Bielefeld



vorgelegt von  
Kirsten Lotte

Bielefeld, im April 2004

---



---

**3D-Fluoreszenzspektroskopie  
mit Tryptophan und Tryptophan-Analoga:  
von Lösungsmiteleinflüssen  
zu Proteinkonformationen**

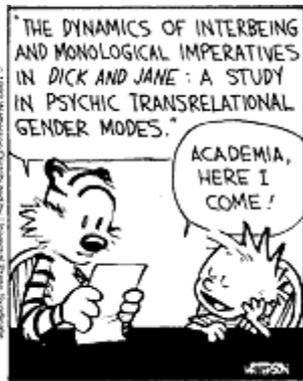
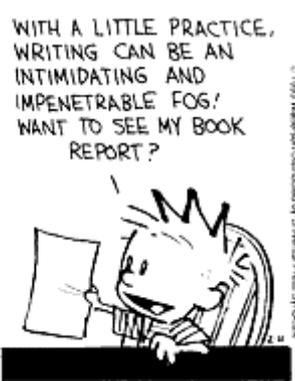
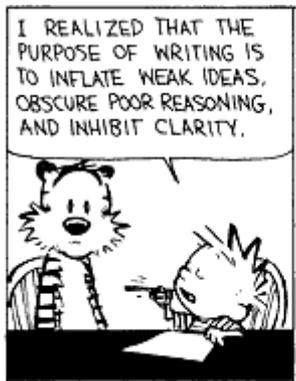
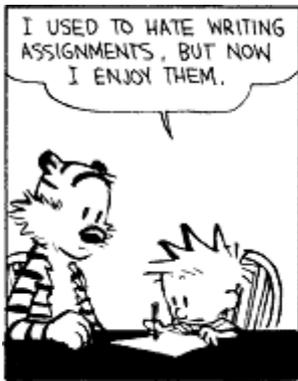
Dissertation  
zum Erlangen des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Kirsten Lotte

Bielefeld, im April 2004

---







Diese Arbeit entstand während der Zeit von November 2000 bis April 2004 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Katharina Kohse-Höinghaus an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld. Ihr danke ich herzlich für das Überlassen des spannenden Themas, die guten Arbeitsbedingungen und ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Karl-Josef Dietz danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Forschergruppe 387 und die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ebenfalls bedanke ich mich bei PD Dr. Andreas Brockhinke für die umfassende Betreuung sowie die Diskussionen und Hilfestellungen. Ein Dank gebührt auch Dr. Regina Plessow für die gute Zusammenarbeit und die stete Diskussionsbereitschaft.

Für die Synthese der in dieser Arbeit untersuchten 2-Cystein Peroxiredoxine möchte ich mich bei Dr. Janine König aus der Arbeitsgruppe „Stoffwechselphysiologie und Biochemie der Pflanzen“ der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld unter der Leitung von Prof. Dr. Karl-Josef Dietz bedanken. Auch danke ich Prof. Dr. Kvetoslava Burda vom Henryk Niewodniszański Institut für Kernphysik in Krakau für Proben des Manganstabilisierenden Proteins.

Meiner Blockpraktikantin Steffi Rinne danke ich für ihre engagierte Mitarbeit und das Durchführen vieler Quenching-Untersuchungen.

Für die Programmierung von Steuer- und Auswertprogrammen sowie rasche Hilfe bei Computerproblemen möchte ich mich bei Dr. Andreas Bülter, Ulrich Rahmann und Michael Letzgus bedanken.

Der DFG danke ich für die Unterstützung im Rahmen der Forschergruppe 387 „Redox-Steuerung als zentrales Regulativ der Anpassung von Organismen mit oxygener Photosynthese“.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und die kulinarischen Entdeckungsreisen.

Schließlich möchte ich mich bei Ulf für sein Verständnis und seine Unterstützung, speziell in der Abschlussphase dieser Arbeit, bedanken.



Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden bisher in folgender Form veröffentlicht:

**Artikel:**

- “Static and time-resolved fluorescence investigations of tryptophan analogues - a solvent study”  
K. Lotte, R. Plessow und A. Brockhinke  
*Photochemical and Photobiological Sciences*, 2004, **3**, 348-359.
- „Affinity-based tagging of protein families with reversible inhibitors: A concept for functional proteomics”  
M. Hagenstein, J. Mussnug, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, O. Kruse und N. Sewald  
*Angewandte Chemie - International Edition*, 2003, **42**, 5635-5638.
- “Reaction Mechanism of Plant 2-Cys Peroxiredoxin: Role of the C terminus and the quaternary structure “  
J. König, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, M. Baier und K.-J. Dietz  
*Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 24409-24420.

**Für die Veröffentlichung vorbereitet und eingereicht ist:**

- „Identification of cells using FRET mapping“  
A. Brockhinke, R. Plessow, K. Lotte, T. Schmitt-John, R. Palmisano  
Manuskript eingereicht bei *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2004

**Tagungs- und Messebeiträge:**

- Minerva-Gentner Symposium on Optical Spectroscopy of Biomolecular Dynamics, 21.-25. März 2004, Kloster Banz  
„Study of conformational changes in peptides by combined time-resolved anisotropy, excitation-emission and FRET measurements” (*Poster*)  
A. Brockhinke, K. Lotte, R. Plessow
- LACEA 2004 (Laser Applications to Chemical and Environmental Analysis)  
9.-11. Februar 2004, Annapolis, MD, USA  
„Conformational changes in peptides revealed by time-resolved anisotropy and FRET measurements” (*Vortrag*)  
A. Brockhinke, K. Lotte, R. Plessow
- Graduate School of Chemistry and Biochemistry  
21.-22. Juli 2003, ZiF, Universität Bielefeld  
„Redox-abhängige Konformationsänderungen und ihr fluoreszenzspektroskopischer Nachweis am Beispiel des 2-Cystein Peroxiredoxins“ (*Vortrag*)  
K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke

- 102. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie  
29.-31. Mai 2003, Kiel  
„Fluoreszenzspektroskopische Detektion redox-abhängiger Konformationsänderungen in Proteinen“ (*Vortrag*)  
K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke
- 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society  
1.-5. März 2003, San Antonio, TX, USA  
„Detection of conformational changes in redox-state sensitive proteins and their mutants using fluorescence spectroscopy” (*Poster*)  
K. Lotte, R. Plessow, J. König, M. Baier, K.-J. Dietz, A. Brockhinke, K. Kohse-Höinghaus
- 2<sup>nd</sup> International Workshop of the SFB 549: On Signalling from the ECM to the Nucleus in Animals and Plants  
20.-21. Februar 2003, ZiF, Universität Bielefeld  
„Spectroscopic characterization of structural changes in redox-active proteins: 2-CP and MSP” (*Poster*)  
K. Lotte, R. Plessow, J. König, K.-J. Dietz, M. Baier, A. Brockhinke
- International Workshop on Redox Regulation: From molecular responses to environmental adaptation  
17.-19. Juli 2002, ZiF, Universität Bielefeld  
„Study of conformational changes in proteins using time- and wavelength-resolved fluorescence spectroscopy“ (*Vortrag*)  
A. Brockhinke, K. Lotte, R. Plessow, K. Kohse-Höinghaus
- 101. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie  
9.-11. Mai 2002, Potsdam  
„Spektroskopische *in vitro*-Untersuchungen von Proteinen“ (*Vortrag*)  
R. Plessow, K. Lotte, A. Brockhinke
- LACEA 2002 (Laser Applications to Chemical and Environmental Analysis)  
7.-10. Februar 2004, Boulder, CO, USA  
„Detection of conformational changes in proteins with FRET” (*Poster*)  
R. Plessow, K. Lotte, A. Brockhinke
- 100. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie  
24.-26. Mai 2001, Stuttgart  
„Strukturuntersuchungen von biologischen Molekülen mittels Förster-Resonanz-Energietransfer“ (*Poster*)  
R. Plessow, K. Lotte, A. Brockhinke
- Hannover-Industrie-Messe  
22.-29. April 2001, Hannover  
„AES-Spektrometer zur Untersuchung biologischer Makromoleküle” (*Exponat*)  
A. Brockhinke, R. Plessow, K. Lotte





---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
I.	Gegenwärtiger Forschungsstand .....	5
II.	Fragestellung dieser Arbeit .....	8
<b>II.</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>11</b>
I.	Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie .....	11
a)	<i>Absorption von Strahlung im Grundzustand</i> .....	11
b)	<i>Lumineszenz aus dem angeregten Zustand</i> .....	12
c)	<i>Fluoreszenzlöschung (Quenching)</i> .....	13
d)	<i>Fluoreszenzlebenszeiten</i> .....	14
e)	<i>Quantenausbeuten</i> .....	16
II.	Lösungsmiteleinfluss auf die Fluoreszenz .....	17
a)	<i>Lösungsmittelrelaxation</i> .....	17
b)	<i>Die Lippert-Gleichung</i> .....	18
c)	<i>Lösungsmittelpolaritäten</i> .....	19
d)	<i>Einfluss des Lösungsmittels auf Fluoreszenzeigenschaften</i> .....	22
e)	<i>Bestimmung von Quantenausbeuten in Lösungsmitteln mit unterschiedlichem Brechungsindex</i> .....	22
III.	Proteinfluoreszenz und Proteinstruktur .....	23
a)	<i>Intrinsische Fluorophore</i> .....	24
b)	<i>Merkmale der Proteinstruktur</i> .....	26
c)	<i>Vorhersage der Proteinstruktur</i> .....	27
d)	<i>Einfluss der Proteinstruktur auf die Fluoreszenz</i> .....	28
e)	<i>Tryptophan-Analoga</i> .....	28
f)	<i>Beschreibung der spektralen Form</i> .....	29
IV.	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungsmethoden .....	30
a)	<i>Bestimmung der Fluorophorexposition über Quenching</i> .....	30
b)	<i>Abstandsbestimmungen über FRET</i> .....	36
c)	<i>Bestimmung von Entfaltungsenthalpien</i> .....	38
d)	<i>Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von Dissoziationskonstanten</i> .....	39
<b>III.</b>	<b>EXPERIMENTELLER AUFBAU UND DATENANALYSE</b>	<b>41</b>
I.	Aufbau für Anregungs-Emissions-Spektroskopie .....	41
a)	<i>Anregung</i> .....	41
b)	<i>Probenhalterung</i> .....	41
c)	<i>Detektion</i> .....	43

d) Spektrenaufnahme .....	45
e) Spektrenbearbeitung.....	45
II. Aufbau für zeitaufgelöste Laserinduzierte Fluoreszenz.....	46
a) Der Titan:Saphir-Laser .....	47
b) Verstärkung und Frequenzverdreifachung.....	48
c) Detektion.....	48
d) Datenbearbeitung und -auswertung.....	49
III. Kalibration .....	51
a) Die spektrale Auflösung .....	51
b) Kalibration der Detektionseffizienz.....	52
c) Kalibration der Anregungsintensität der AES.....	53
IV. Absorption.....	54
V. Probenpräparation .....	55
a) Tryptophan und Tryptophan-Analoga.....	55
b) 2-Cystein Peroxiredoxin.....	56
c) Das Manganstabilisierende Protein (MSP) .....	57
<b>IV. TRYPTOPHANFLUORESZENZ IN WÄSSRIGER LÖSUNG</b> .....	<b>59</b>
I. Fragestellung.....	59
II. Charakteristika des statischen Spektrums .....	59
a) Anregungsmaximum .....	60
b) Emissionsmaximum .....	61
c) Beschreibung des Spektrums als Lognormal-Verteilung .....	61
d) Quantenausbeute.....	62
e) Halbwertsbreite des Emissionsspektrums .....	62
f) Stokes Shift.....	63
III. Fluoreszenzlebenszeiten.....	64
IV. Quenching von Tryptophan in wässriger Lösung.....	65
<b>V. LÖSUNGSMITTELABHÄNGIGE FLUORESZENZ AUSGEWÄHLTER</b>	
<b>TRYPTOPHAN-ANALOGA</b> .....	<b>67</b>
I. Fragestellung.....	67
II. Spektroskopische Separation der Tryptophan-Analoga.....	68
III. Spektren der Tryptophan-Analoga in wässriger Lösung .....	69
IV. Anregungsmaxima .....	71
V. Emissionsmaxima .....	72
VI. Quantenausbeuten .....	76
VII. Fluoreszenz-Lebenszeiten in Wasser .....	78

---

VIII. Korrelation von Quantenausbeuten und Lebenszeiten.....	79
IX. Emissions-Halbwertsbreiten .....	82
X. Stokes Shifts.....	83
XI. Zusammenfassung.....	85
<b>VI. QUENCHINGUNTERSUCHUNGEN AN TRYPTOPHAN-ANALOGA _____</b>	<b>87</b>
I. Fragestellung.....	87
II. Quenching der Tryptophan-Analoga .....	87
a) <i>Veränderung der Fluoreszenzintensitäten</i> .....	87
b) <i>Aktionssphärenabweichungen</i> .....	89
III. Ermittlung von Stern-Volmer-Konstanten.....	91
IV. Ermittlung von bimolekularen Quenchkonstanten .....	93
V. Zusammenfassung.....	95
<b>VII. DAS REDOXABHÄNGIGE PROTEIN 2-CYSTEIN PEROXIREDOXIN _____</b>	<b>97</b>
I. Biologische Relevanz.....	97
II. Strukturelle Vorüberlegungen.....	100
III. Fragestellung.....	105
IV. Fluoreszenzanalyse der 2-CP-Mutanten W99L und W189L.....	105
a) <i>Anregungs-Emissionsspektren von 2-CP</i> .....	105
b) <i>Emissionsspektren des 2-Cystein Peroxiredoxins</i> .....	108
c) <i>Fluoreszenzlebenszeit-Untersuchungen</i> .....	111
V. Untersuchung der redoxabhängigen Oligomerisierung .....	113
a) <i>Emissionsspektren</i> .....	113
b) <i>Fluoreszenzlebenszeiten der Proteine im reduzierten Zustand</i> .....	113
c) <i>Quenching-Untersuchungen am 2-Cystein Peroxiredoxin</i> .....	115
VI. Umgebungsanalyse von Trp189 mit Mutanten .....	119
a) <i>Betrachtung der Emissionsspektren</i> .....	120
b) <i>Fluoreszenzlebenszeiten</i> .....	121
VII. Zusammenfassung.....	123
<b>VIII. DAS MANGANSTABILISIERENDE PROTEIN _____</b>	<b>125</b>
I. Biologische Relevanz und Fragestellung.....	125
II. Generelle Fluoreszenzeigenschaften.....	130
a) <i>AES: Apo-MSP im nativen und denaturierten Zustand</i> .....	130
b) <i>Anregungsspektren für natives bzw. denaturiertes MSP</i> .....	130
c) <i>Vergleich der Emissionsspektren bei 280 und 295 nm</i> .....	130
III. Quenching-Untersuchungen am MSP-Tryptophan.....	134
IV. Stabilität des MSP - Entfaltungsstudien.....	135

---

a)	<i>Chemische Denaturierung mit Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid</i> .....	136
b)	<i>Veränderung der Emissionsspektren bei Denaturierung</i> .....	136
c)	<i>Entfaltung von oxidiertem Apo-MSP – Betrachtung der Emissionsmaxima</i> .....	137
d)	<i>Entfaltung von oxidiertem Apo-MSP - Veränderung der Intensitäten</i> .....	138
V.	Ionenbindung des MSP .....	141
a)	<i>Anregungs- und Emissionsspektren für Ionenbindung des MSP</i> .....	141
b)	<i>Fluoreszenz-Lebenszeiten von Apo- und Holo-Formen des MSP</i> .....	145
c)	<i>Entfaltungsstudien an verschiedenen Holo-MSP</i> .....	147
d)	<i>Bindungsstudien mit Hilfe von statischen Fluoreszenzuntersuchungen</i> .....	152
VI.	Zusammenfassung .....	160
<b>IX.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>163</b>
<b>X.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>169</b>
I.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	169
II.	Die Kurzschreibweise der Aminosäuren .....	171
III.	Abkürzungen für verwendete Tryptophan-Analoga .....	172
IV.	Lösungsmittelparameter der verwendeten Alkohole .....	172
<b>XI.</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>173</b>

# I. EINLEITUNG

## I. *Gegenwärtiger Forschungsstand*

Proteine sind die häufigsten und vielfältigsten Makromoleküle in lebenden Zellen. [1] Sie tragen zu mehr als 50 % zum Trockengewicht der meisten Zellen bei und dienen als Werkzeuge für fast alle Aktivitäten des Organismus. Der menschliche Körper enthält z.B. mehr als zehntausend verschiedene Proteine, die unterschiedlichste Funktionen übernehmen. Die molekularen Untereinheiten der Proteine bilden 20 Aminosäuren, die aufgrund ihrer Unterschiede in Größe, Gestalt, Ladung und Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, für die dreidimensionale Struktur der Proteine verantwortlich sind. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Proteine bei den verschiedensten Prozessen ist die intensive Erforschung der Proteine von zentralem Interesse: So dienen Proteine als enzymatische Katalysatoren und übernehmen Funktionen bei vielen Transport- und Speicherprozessen. Sie besitzen mechanische Stützfunktionen, spielen eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr und erzeugen sowie übertragen Nervenimpulse. Außerdem sind sie für die Koordination der Bewegung verantwortlich und kontrollieren Wachstum und Differenzierung. [1-3]

Die Funktion der Proteine resultiert unmittelbar aus ihrer dreidimensionalen Struktur. [3] Aus diesem Grund ist seit der Aufklärung des menschlichen Genoms die Proteomik in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt und mit ihr die Analyse der dynamischen Wechselwirkungen von Proteinen mit ihren Substraten und die Aufklärung von Proteinstrukturen. Zur Untersuchung der strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Proteinen steht eine Vielzahl physikalisch-chemischer Methoden zur Verfügung.

Trennmethode wie die Elektrophorese, [4-6] die Chromatographie [7] und die Ultrazentrifugation [8] erlauben neben einer Reinigung der Substanzen aufgrund ihrer Größe, Ladung oder Bindungsaffinität eine Bestimmung der Molekülgröße. Informationen über die dreidimensionale Struktur des Proteins auf molekularer Ebene und über dynamische Vorgänge können jedoch über sie nicht erhalten werden.

Mit Hilfe von Röntgenstruktur-Untersuchungen können Bilder von der im Kristall gegebenen dreidimensionalen Struktur eines Proteins auf atomarer Ebene erhalten werden. [9,10] Die Röntgenkristallographie erlaubt jedoch keine Aussagen über zeitliche Veränderungen und nur in Ausnahmefällen über Enzymaktivitäten. [11] Des Weiteren entsprechen die erhaltenen Kristallstrukturen nur näherungsweise den nativen Strukturen, da die intermolekularen Kräfte innerhalb des Kristalls normalerweise nicht den physiologischen entsprechen. Schließlich kristallisieren speziell makromolekulare Komplexe oft schlecht, so dass sich Röntgenstruktur-Untersuchungen, wenn überhaupt Kristalle erhalten werden können, häufig auf Subkomplexe oder einzelne Untereinheiten beschränken müssen.

Ein Großteil der Informationen über Proteine wird deswegen über spektroskopische Techniken gewonnen. So beruhen Messungen des Circular dichroismus [12,13] auf der optischen Aktivität der Proteine bzw. ihrer Aminosäuren und helfen bei der Bestimmung der Sekundärstrukturanteile. Elektronenspinresonanz-Untersuchungen [14] unterstützen die Analyse von Proteinen mit paramagnetischen Cofaktoren. Über ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ -,  $^{19}\text{F}$ -,  $^{31}\text{P}$ -) Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR) kann außerdem Informationen über die räumliche Anordnung der Atome im Protein erhalten werden. [15-17] Über zweidimensionale NMR-Techniken können dabei Strukturen von Proteinen mit bis zu 100 Aminosäuren (entsprechend einer Masse von ca. 10 kDa) aufgeklärt werden. [18] Drei- und vierdimensionale NMR-Techniken ermöglichen darüber hinaus die Bestimmung der Konformation von Proteinen mit bis zu 30 kDa Masse in Lösung. [19,20] Die für NMR-Experimente verwendeten Proteinkonzentrationen und Lösungsmittel sind jedoch nicht physiologisch und deswegen oft kritisch zu bewerten. Außerdem erfordert die Auswertung der multidimensionalen NMR-Experimente einen hohen zeitlichen Aufwand.

Die Fluoreszenzspektroskopie, die darauf beruht, dass absorbiertes Licht wellenlängenverschoben wieder emittiert werden kann, [21] ist eine spektroskopische Technik, mit der im Gegensatz zu den bereits vorgestellten Methoden unter physiologischen Bedingungen umfassende Informationen über biologische Makromoleküle geliefert werden. Sie hat sich seit der Formulierung ihres theoretischen Hintergrundes in der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts [22] mittlerweile zu einer der vorherrschenden Analysetechniken in der Biotechnologie und der Medizintechnik entwickelt. [23] Sie ist außerdem ein Standardverfahren in der Umwelttechnik, der klinischen Chemie und in der molekularen Genetik, [24] und es ist absehbar, dass sich ihre Anwendung in naher Zukunft auch auf andere Gebiete wie z.B. die Ernährungswissenschaften ausweiten wird. [25] Ihre Vorteile liegen vor allem in hoher Sensitivität und Selektivität, mit denen Untersuchungen zerstörungsfrei und unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden können.

Aufgrund der Wechselwirkungen von Fluorophor und Lösungsmittelmolekülen oder benachbarten Gruppen im Makromolekül liefert das emittierte Licht Informationen über die Fluorophorumgebung. Diese lassen sich bei statisch durchgeführten Messungen z.B. aus Form und Lage des Fluoreszenzspektrums und Fluoreszenzintensität bzw. Quantenausbeute ermitteln. Das zeitliche Abklingen der Emission wird in der dynamischen Fluoreszenzspektroskopie untersucht und lässt so ebenfalls Rückschlüsse auf die Umgebung zu. Wenn der angeregte Fluorophor während der Aussendung von Fluoreszenzstrahlung seine relative Lage ändert, können über polarisationsabhängige dynamische Messungen zusätzlich Informationen über die Beweglichkeit des Fluorophors und die Größe von Molekülen erhalten werden. Schließlich können Wechselwirkungen von Fluorophoren miteinander untersucht werden: Bei gezielten Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zwischen zwei Fluorophoren wird die Übertragung von Anregungsenergie eines Donor-Fluorophors auf einen Akzeptor-Fluorophor untersucht. Der Transfer erfolgt strahlungslos über Dipol-Dipol-

Wechselwirkungen und ist stark abstandsabhängig, so dass über FRET-Messungen Abstände zwischen Fluorophoren gemessen werden können.

Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl an Fluoreszenztechniken entwickelt, die mehr noch als die bereits besprochenen allgemeinen Phänomene Informationen bereitstellen. Dabei konnte nach der Anwendung von fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen auf *in vitro*-Systeme vor allem ein Trend hin zu kleineren Untersuchungsobjekten wie Zellen und sogar einzelnen Molekülen beobachtet werden. Speziell die Kombination von Fluoreszenzuntersuchungen mit anderen Techniken liefert dabei eine Fülle von Informationen: Einzelne Zellen können quantitativ unter Verwendung von Multi-Parameter-Ansätzen mit Hilfe von FACS-Geräten (FACS - *fluorescence activated cell sorting*) sortiert und analysiert werden. [26] Die Kombination von Fluoreszenzspektroskopie und Mikroskopie gestattet mittlerweile nicht nur die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung einzelner Zellen, sondern sogar die gezielte Anregung ausgewählter Bereiche der Zelle, wie z.B. der Zelloberfläche bei der TIRF-Mikroskopie (TIRF - *total internal reflection fluorescence*). Dabei beschränken sich die mikroskopischen Untersuchungsverfahren nicht nur auf präparierte Zellen: Handelt es sich z.B. bei den verwendeten Fluorophoren um Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequoria victoria* [27], können fluorophormarkierte Proteine reproduzierbar in der lebenden Zelle kloniert und transfiziert werden. An ihnen können dann z.B. lokalisierte Protein-Wechselwirkungen, kovalente Modifizierungen, proteolytische Vorgänge und Konformationsänderungen mit bildgebenden Verfahren untersucht werden. [28,29]

Bildgebende Verfahren haben in den letzten Jahren einen immer stärkeren Einfluss gewonnen, weil sie auf sehr anschaulichem Weg Informationen bereitstellen. Aus diesem Grund wurden auch fluoreszenzspektroskopische Techniken in jüngster Zeit sehr erfolgreich mit sogenannten *Imaging*-Techniken kombiniert: Über FRET-Imaging werden molekulare Wechselwirkungen und Konformationsänderungen mit einer weit besseren Ortsauflösung als bei der optischen Mikroskopie zugänglich [30] und lassen sich ebenfalls in lebenden Zellen untersuchen. [31,32] Bildgebende Verfahren, die Fluoreszenzlebenszeiten wiedergeben (FLIM - *fluorescence lifetime imaging*), werden z.B. bei Fluoreszenzmikroskopie, Tumorerkennung, Studien zur Photosynthese, Kapillar-Elektrophorese, DNA-Sequenzierung und DNA-Chip-Analyse eingesetzt. [33,34]

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung einzelner Moleküle wird mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ermöglicht, bei der die aus einem sehr geringen Volumen emittierte Fluoreszenzintensität zeitlich korreliert wird, um Prozesse zu analysieren, die zeitliche Fluktuationen der Fluoreszenz bedingen. [35-37]

Zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Proteinen können verschiedene Fluorophore verwendet werden, die sich in zwei Gruppen klassifizieren lassen: *Extrinsische* Fluorophore wie z.B. Rhodamin und Fluorescein werden über eine kovalente Modifizierung künstlich in das Protein eingebracht. Werden dagegen *intrinsische* Fluorophore verwendet, wird auf die autofluoreszenten aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und

Tryptophan zurückgegriffen. Vorteilhaft bei der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Proteinen mittels intrinsischer Fluorophore ist dabei, dass eine Markierung der Proteine entfällt und somit auf jeden Fall native Systeme untersucht werden. Bei zu vielen identischen Fluorophoren in einem Protein wird die Aussagekraft jedoch vermindert.

Die meisten Proteinfluoreszenzuntersuchungen auf Basis intrinsischer Fluorophore beruhen auf der Aminosäure Tryptophan, da sie die seltenste der drei aromatischen Aminosäuren ist. Außerdem zeigt ihre Fluoreszenz eine starke Abhängigkeit von der Umgebungspolarität. [38] Deswegen ist eine spektroskopische Separation auch mehrerer Tryptophanbeiträge im Protein möglich und seit kurzem auch für dynamische Fluoreszenzuntersuchungen etabliert. [39] Über die Untersuchung der Tryptophanfluoreszenz eines Proteins können vielfältige Informationen gewonnen werden: Untersuchungen zum Quenching der Tryptophanfluoreszenz lassen Rückschlüsse auf die intramolekulare Dynamik innerhalb des Proteins zu, [40] und kombinierte Tryptophanfluoreszenz- und Entfaltungsstudien liefern Informationen bezüglich der Proteinstabilität. [41] Über polarisationsabhängige Untersuchungen der Tryptophanfluoreszenz können Informationen über die Beweglichkeit einzelner Untereinheiten gewonnen werden. [42] Tryptophan wird auch bei FRET-Untersuchungen in Proteinen verwendet und dient dann als Donor für Energietransfer auf einen extrinsischen Akzeptor [43] oder als Akzeptor für intrinsische Tyrosinfluoreszenz. [44] Viel versprechend ist auch ein neues Gebiet, in dem aufbauend auf Proteinen, die bei Bindung ihrer Substrate eine veränderte Fluoreszenz zeigen, fluoreszenzspektroskopische Biosensoren entwickelt werden. [23] Schließlich lassen sich die über die Fluoreszenz von Tryptophan im Protein erhaltenen Informationen noch verbessern, wenn anstelle von Tryptophan strukturell sehr ähnliche, aber fluoreszenzspektroskopisch unterschiedliche Tryptophan-Analoga eingebaut werden. [45,46] Die substituierten Tryptophan-Analoga besitzen von Tryptophan unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften und können ohne eine Veränderung der Struktur in das Protein eingebracht werden. Dies ermöglicht die selektive spektroskopische Analyse einzelner Reste unter Umgehung einer aufwändigen spektroskopischen Separation.

## ***II. Fragestellung dieser Arbeit***

In dieser Arbeit sollen mit Hilfe verschiedener moderner Techniken Fluoreszenzuntersuchungen an Proteinen unter Verwendung des intrinsischen Fluorophors Tryptophan durchgeführt werden. Die Abhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz von der Polarität der Umgebung soll dabei Rückschlüsse über die Umgebung der analysierten Tryptophanreste und somit strukturelle Informationen über das untersuchte Protein zulassen. Auch soll eine fluoreszenzspektroskopische Lösungsmittelstudie mit verschiedenen Tryptophan-Analoga durchgeführt werden, bei der unterschiedliche Fluorophor-Umgebungen durch die verwendeten Lösungsmittel simuliert werden.

Dazu werden zwei experimentelle Aufbauten verwendet: Mit Hilfe eines Kurzpulslasers und der dazu gehörenden Detektionseinheit werden Messungen der simultan zeit- und wellen-

längenaufgelösten Fluoreszenz durchgeführt. Die Analyse des zeitlichen Abklingens der Fluoreszenz auf einer Pikosekunden-Zeitskala liefert als primäres Ergebnis Fluoreszenzlebenszeiten, die Aussagen über photophysikalische Prozesse nach der Anregung ermöglichen.

Außerdem werden mit Hilfe eines innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelten Anregungs-Emissions-Spektrometers die statischen Spektren der Proben untersucht: Bei der Anregungs-Emissions-Spektroskopie werden nahezu simultan alle Anregungs- und Emissionsspektren der untersuchten Substanzen aufgenommen, über die ein fluoreszenzspektroskopischer „Fingerabdruck“ der Probe erhalten wird.

Über die Kombination der Ergebnisse aus beiden Aufbauten werden umfangreiche Aussagen über die untersuchten Systeme ermöglicht. Das hohe Anwendungspotential von kombinierten dynamischen und statischen Fluoreszenzuntersuchungen zur Umgebungsanalyse von Fluorophoren soll in dieser Arbeit an mehreren Systemen demonstriert werden.

In einer Lösungsmittelstudie soll die Fluoreszenz von verschiedenen Tryptophan-Analoga im Vergleich zu Tryptophan in Abhängigkeit der Umgebungspolarität analysiert werden. Diese Untersuchungen werden mit dem Ziel durchgeführt, Tryptophan-Analoga zu identifizieren, die von Tryptophan stark unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften zeigen und sich somit als Substituenten für Tryptophan bei Proteinfluoreszenz-Untersuchungen anbieten. Tryptophan-Analoga werden zwar schon teilweise als Fluoreszenzsonden in Proteine inkorporiert, eine systematische und umfassende Untersuchung ihrer statischen und dynamischen Fluoreszenzeigenschaften steht bislang jedoch noch aus.

Die Eignung fluoreszenzspektroskopischer Methoden zur Umgebungsanalyse von Fluorophoren in Proteinen soll dann an zwei Proteinsystemen vorgeführt werden: Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. K.-J. Dietz (Lehrstuhl für Stoffwechselphysiologie und Biochemie der Pflanzen, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld) soll das redox-abhängige Protein 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste fluoreszenzspektroskopisch untersucht werden. Mit Hilfe von Einzeltryptophan-Mutanten soll dabei gezielt die Umgebung der beiden intrinsischen Tryptophanreste an den Positionen 99 und 189 untersucht werden. Spezielles Interesse wird dabei auf das Aggregationsverhalten des Proteins gelegt, da es im oxidierten Zustand über zwei Disulfidbrückenbindungen verknüpft dimer vorliegt, bei Reduktion jedoch in einigen Organismen nicht Monomere, sondern Multimere gebildet werden.

In Kooperation mit Prof. K. Burda (Henryk Niewodniszański Institut für Kernphysik, Krakau, Polen) soll das Manganstabilisierende Protein aus Spinat fluoreszenzspektroskopisch analysiert werden. Dieses Protein nimmt eine essentielle Rolle im Photosystem II ein und ist dort vermutlich an der Koordination des katalytisch aktiven  $Mn_4$ -Clusters beteiligt. Da seine Struktur bislang nicht aufgeklärt werden konnte, soll mit fluoreszenzspektroskopischen Techniken die Umgebung des einen vorhandenen Tryptophanrestes untersucht werden, um so Rückschlüsse auf die Struktur des Proteins zu ermöglichen. Da als eine der möglichen Funktionen des Manganstabilisierenden Proteins die Bindung von Ionen diskutiert wird, wird

des Weiteren die Interaktionsfähigkeit des Proteins mit verschiedenen zwei- und dreiwertigen Ionen überprüft.

Zur Untersuchung der Proteinsysteme werden verschiedene Fluoreszenztechniken eingesetzt, die eine Quantifizierung der Ergebnisse ermöglichen: So werden systematische Untersuchungen zur Fluoreszenzlöschung (*Quenching*) von Tryptophan eingesetzt, um die Zugänglichkeit des jeweiligen Fluorophors im Protein zu bestimmen. Über fluoreszenzspektroskopische Entfaltungsstudien werden Proteinstabilitäten bestimmt, die indirekt Rückschlüsse auf die Proteinstruktur zulassen. Zur Untersuchung der Ionenbindung werden fluoreszenzspektroskopische Bindungsstudien durchgeführt, um die Dissoziationskonstanten der Protein-Ion-Komplexe zu bestimmen.

## II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In diesem Kapitel wird zunächst auf die allgemeinen Aspekte der Fluoreszenzspektroskopie eingegangen. Nach einer Erläuterung von Lösungsmittelleffekten und ihrem Einfluss auf die Fluoreszenz werden dann die Grundlagen der Proteinfluoreszenz beschrieben. Schließlich werden Methoden zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Proteinen vorgestellt.

### I. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

#### a) Absorption von Strahlung im Grundzustand

Durch Absorption von Strahlung können Moleküle innerhalb von Femtosekunden ( $1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$ ) von einem elektronischen Zustand  $E$  niedriger Energie in einen Zustand  $E^*$  höherer Energie übergehen. Da für den Übergang die Spinnmultiplizität erhalten bleiben muss, ist bei Anregung aus einem Singulettzustand  $S_0$  der angeregte Zustand ebenfalls ein Singulettzustand  $S_n$ . Die Differenz zwischen den beiden Energieniveaus ist bei Resonanz der Frequenz der eingestrahnten Photonen proportional (Gleichung (II.1)) und wird für Elektronenübergänge und Änderungen des Schwingungs- und Rotationszustands verwendet. [47]

$$E^* - E = h \cdot \nu \quad (\text{II.1})$$

Für die Abnahme der Intensität  $I$  monochromatischer Strahlung bzw. die Absorption  $A$  bei dem Durchtritt durch eine verdünnte Lösung eines völlig durchlässigen Lösungsmittels ohne Sättigung des angeregten Zustandes gilt das *Lambert-Beersche Gesetz*

$$-dI = k \cdot I \cdot dx \quad (\text{II.2})$$

$$\text{bzw.} \quad A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{II.3})$$

wobei  $\varepsilon$  der molare Absorptionskoeffizient,  $c$  die Konzentration der Lösung,  $d$  die Schichtdicke der Probe und  $k$  eine Konstante mit dem Wert  $k = 2,302 \cdot \varepsilon \cdot c$  ist. Aus dem angeregten Zustand kann das Molekül über mehrere Wege, die anschaulich in einem *Jabłoński-Termschema* (Abbildung II.1) dargestellt werden können, in den Grundzustand  $S_0$  zurückgelangen.

Große Moleküle geben dabei zunächst innerhalb einiger Pikosekunden ( $1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$ ) ihre Schwingungsenergie durch Stöße an die Umgebung ab und gelangen in einem als *internal conversion* bezeichneten Prozess in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands  $S_1$ . In Lösung kann durch Umordnung des Lösungsmittels (*Lösungsmittelrelaxation*, vergleiche Abschnitt II.II.a) eine weitere Absenkung der Energie-

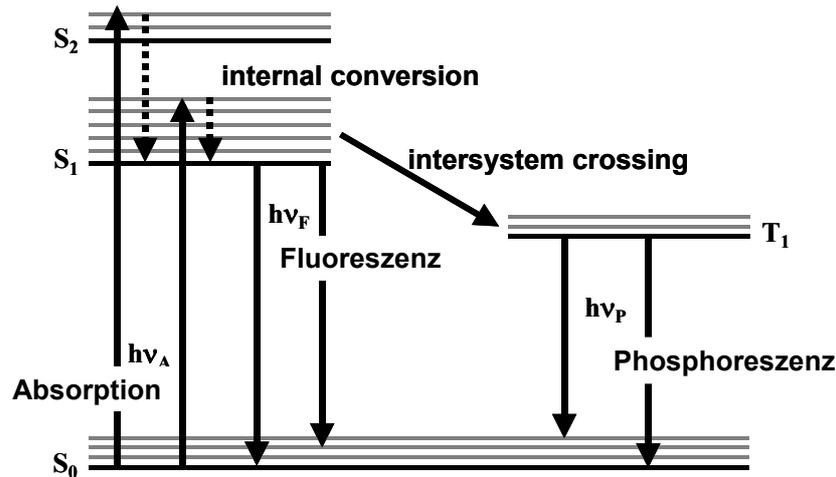


Abbildung II.1 - Jabłoński-Termschema zur Veranschaulichung von Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

niveaus erfolgen. Von dort aus kann das elektronisch angeregte Molekül durch Übertragung seiner restlichen Energie auf die Umgebung (*strahlungslose Deaktivierung, Quenching*) oder durch Aussenden eines Photons in den Grundzustand zurückfallen (*Lumineszenz*).

#### b) *Lumineszenz aus dem angeregten Zustand*

In Abhängigkeit von den Vorgängen während der *internal conversion* werden elektronische Zustände erreicht, deren Spinmultiplizität die auftretende Lumineszenz charakterisiert: Bleibt die Spinmultiplizität bei der Emission erhalten, ist der Übergang spinerlaubt und man spricht bei der in einem Zeitbereich von  $10^{-8}$  s auftretenden Strahlung von *Fluoreszenz*. Langsamer als die Fluoreszenz, im Zeitbereich von  $10^{-4}$  s, erfolgt die *Phosphoreszenz*. Ihre Strahlung wird nach einem spinverbotenen, als *intersystem crossing* bezeichneten Übergang und folgender strahlungsloser Deaktivierung in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Tripletzustands  $T_1$  beim Übergang in den Grundzustand des Singulettzustands  $S_0$  ausgesandt. [24]

Da durch Lumineszenz verschiedene schwingungsangeregte Zustände des Grundzustands erreicht werden (vgl. Abbildung II.1), weisen sowohl Fluoreszenz- als auch Phosphoreszenzspektren eine Feinstruktur auf, die Informationen über die Energieniveaus des Grundzustands liefert. Häufig gleichen sich Absorptions- und Emissionsspektren einer Substanz wie Bild und Spiegelbild, wobei das Lumineszenzspektrum stets rotverschoben ist und die 0-0-Übergänge, die von den jeweiligen Schwingungsgrundzuständen ausgehen, zusammenfallen. Die energetische Verschiebung zwischen den jeweiligen Absorptions- und Emissionsbanden wird als *Stokes Shift* bezeichnet und ist abhängig von dem Fluorophor, seiner Umgebung bzw. seinem Lösungsmittel und der Temperatur. Somit lassen Fluoreszenzspektren z.B. über die Betrachtung ihrer Symmetrie und ihres Stokes Shifts Rückschlüsse auf die Umgebung des jeweiligen Fluorophors zu.

c) *Fluoreszenzlöschung (Quenching)*

Oft wird die Fluoreszenz einer Probe durch strahlungslose Deaktivierung des angeregten Zustandes (*Quenching*) vermindert. Das Quenching kann dabei durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen, die auf intermolekularen Wechselwirkungen zwischen dem angeregten Fluorophor und dem Quencher beruhen. Der häufigste Fall ist dabei Quenching der Fluoreszenz durch Stöße bei einem diffusiven Kontakt mit dem Quenchemolekül, das auch als *dynamisches* oder *Stoß-Quenching* bezeichnet wird. Durch den Kontakt zwischen Fluorophor und Quencher werden dabei alternative Wege zur Dissipation der Anregungsenergie zugänglich.

Für dynamisches Quenching lässt sich die Verringerung der Fluoreszenzintensitäten bzw. der Fluoreszenzlebenszeiten über die *Stern-Volmer-Gleichung* gemäß

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (\text{II.4})$$

ausdrücken, nach der das Verhältnis der Fluoreszenzintensität  $I_0$  bzw. Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_0$  in Abwesenheit des Quenchers zur Fluoreszenzintensität  $I$  bzw. –lebenszeit  $\tau$  in Anwesenheit des Quenchers proportional zur Stern-Volmer-Konstante  $K_D$  und der Quencherkonzentration  $[Q]$  ist.  $K_D$  ist dabei das Produkt aus der intrinsischen Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_0$  des Fluorophors in Abwesenheit von Quench-Prozessen und der bimolekularen Quenchkonstante  $k_q$ . Die bimolekulare Quenchkonstante  $k_q$  ist durch die Quencheffizienz  $f_Q$  mit Werten zwischen 0 und 1 und die diffusionskontrollierte Stoßkonstante  $k_0$  gegeben:

$$k_q = f_Q \cdot k_0 \quad (\text{II.5})$$

Außer Stößen mit Quenchern, die zu einer strahlungslosen Rückkehr des Fluorophors in den Grundzustand führen, können auch andere Prozesse eine Deaktivierung des Fluorophors im angeregten Zustand bewirken. Zu ihnen zählen Reaktionen aus dem angeregten Zustand.

Es sollte erwähnt werden, dass als *Quenching* oft sämtliche Prozesse bezeichnet werden, die die Fluoreszenzintensität einer Probe verringern. So kann z.B. die Fluoreszenzlöschung einer Probe auch durch Komplexbildung zwischen Fluorophor und Quencher im Grundzustand erfolgen. Dies wird als *statisches Quenching* bezeichnet. Statisches Quenching ist von dem Ausmaß der Komplexbildung (gemessen über die Komplexbildungskonstante  $K_S$ ) und der Konzentration des Quenchers abhängig, so dass man für die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors aufgrund der Komplexbildung erhält:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S \cdot [Q] \quad (\text{II.6})$$

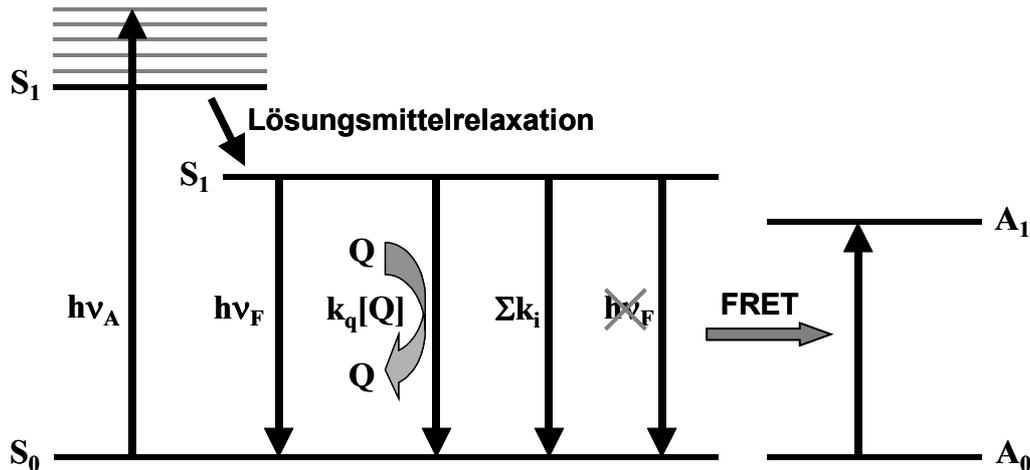


Abbildung II.2 – Konkurrenz von Fluoreszenz und quencheden Prozessen bei Abwesenheit von Phosphoreszenz. Die dargestellten Wege zur Deaktivierung des angeregten Zustandes sind Fluoreszenz (emittierte Strahlung hat die Energie  $E = h \cdot \nu_F$ ), dynamisches Quenching (proportional zur Quenchkonstante  $k_q$  und der Quencherkonzentration  $[Q]$ ) und FRET. Weitere nicht genauer spezifizierte strahlungslose Wege zur Deaktivierung des angeregten Fluorophors werden über die Summe ihrer Geschwindigkeitskonstanten  $\Sigma k_i$  dargestellt.

Eine Abnahme der Fluoreszenzlebenszeit ist bei statischem Quenching nicht zu verzeichnen, da die Komplexbildung im Grundzustand erfolgt und die Deaktivierung des angeregten Zustandes nicht beeinflusst wird.

In vielen Fällen wirken Quencher sowohl über Stöße als auch über Komplexbildung. Quantitativ lässt sich dies über eine Multiplikation der beiden Quenchformen beschreiben, die zu einer Abweichung vom linearen Verhalten führt (vergleiche Abschnitt II.IV.a):

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = 1 + K_{App} \cdot [Q] \quad (\text{II.7})$$

Als Spezialfall des Quenchings kann des Weiteren auch der in Kapitel II.IV.b) erläuterte Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) aufgefasst werden, da sich bei Anwesenheit geeigneter Partner die Fluoreszenzintensität eines Donor-Fluorophors erniedrigt, wenn Energietransfer auf einen Akzeptor-Fluorophor erfolgt.

Somit ist, wie in Abbildung II.2 veranschaulicht, das Verhältnis von Fluoreszenz und Quenching ein empfindliches Wechselspiel verschiedener Prozesse, das die Umgebungseinflüsse des Fluorophors widerspiegelt.

#### d) Fluoreszenzlebenszeiten

Die Fluoreszenzlebenszeit  $\tau$  ist für ein monoexponentielles Abklingen der Fluoreszenz definiert als die durchschnittliche Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verbringt,

bevor es in den Grundzustand zurückkehrt. [24] Sie hängt direkt von der zeitlichen Konkurrenz der Emission mit Prozessen, die zu einer strahlungslosen Deaktivierung führen, ab. Für einen nicht phosphoreszierenden Fluorophor ist die Fluoreszenzlebenszeit durch die Emissionsrate  $\Gamma$  des Fluorophors und die Summe der Geschwindigkeitskonstanten  $k_i$  für die strahlungslosen Zerfälle gegeben:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + \sum k_i} \quad (\text{II.8})$$

In Abwesenheit von Prozessen, die zu einer strahlungslosen Deaktivierung führen, erhält man die sogenannte *intrinsische* Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_0$ :

$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma} \quad (\text{II.9})$$

Aufgrund der in Abbildung II.2 dargestellten Zusammenhänge hängt die Fluoreszenzlebenszeit stark von der Umgebung des Fluorophors ab. Somit kann die genaue Natur des Fluoreszenzabfalls Hinweise auf die Wechselwirkung des Fluorophors mit seiner Umgebung geben. In unpolaren Lösungsmitteln zeigen einige Fluorophore einen monoexponentiellen Fluoreszenzabfall. Die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität  $I(t)$  bei komplexeren Molekülen folgt häufig einem multiexponentiellen Verlauf:

$$I(t) = I_0 \sum_i a_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{II.10})$$

Die Amplitude  $a_i$  ist dabei ein Maß für die Gewichtung der einzelnen Lebenszeiten  $\tau_i$ . Der multiexponentielle Fluoreszenzabfall kann einerseits aus der Existenz mehrerer Fluorophore mit verschiedenen Lebenszeiten resultieren, andererseits kann auch ein einzelner in verschiedener Umgebung befindlicher Fluorophor zu einem multiexponentiellen Fluoreszenzabfall führen.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, Fluoreszenzlebenszeiten zu ermitteln: Bei der auch in dieser Arbeit verwendeten *Pulsmethode* wird die Probe mit einem kurzen Lichtpuls angeregt und der zeitliche Abfall der Fluoreszenz detektiert. Die *Phasenmodulationsmethode* verwendet zur Anregung der Fluorophore eine kontinuierlich strahlende Lichtquelle mit sinusförmig moduliertem Licht. Aus Phasenunterschied und Amplitudenveränderung kann die Lebenszeit bestimmt werden.

Im Gegensatz zu nicht zeitauflösenden Fluoreszenzuntersuchungen („statische“ Messungen) werden Fluoreszenzlebenszeiten liefernde Methoden häufig als *dynamisch* bezeichnet.

### e) Quantenausbeuten

Als Quantenausbeute  $\phi$  der Fluoreszenz bezeichnet man das Verhältnis der emittierten zu den absorbierten Photonen. [24] Folglich erhält man als Ausdruck für die Quantenausbeute in Abhängigkeit der emittierten und absorbierten Lichtintensität  $I$ :

$$\phi = \frac{I_E}{I_A} = \frac{\sum k_i}{\sum k_i + \Gamma} \quad (\text{II.11})$$

Die Werte für  $\phi$  bewegen sich somit zwischen null und eins und sind umso größer, je geringer der Anteil der strahlungslosen Deaktivierung ist. Da die direkte Messung der emittierten und absorbierten Intensitäten genauso wie die Ermittlung der strahlungslosen Zerfallskonstanten  $k_i$  problematisch ist, werden oft Standards zur Ermittlung der Quantenausbeuten verwendet.

Quantenausbeuten lassen sich z.B. über feste Standards wie Magnesiumoxid und Anthracen, mit flüssigen Standards wie optisch verdünnten Kolloidlösungen und über Vergleich mit Stoffen bekannter Quantenausbeute bestimmen. Des Weiteren gibt es kalorimetrische Methoden und die *Integrating-Sphere*-Technik. [48] In dieser Arbeit werden Quantenausbeuten über den Vergleich mit Verbindungen bekannter Quantenausbeute ermittelt.

Die Bestimmung von Quantenausbeuten basiert dabei auf der Definition, dass die Intensität des Fluoreszenzlichtes  $I_E$  proportional zum absorbierten Teil des Anregungslichtes (bestimmbar über das Lambert-Beersche Gesetz) ist. Die Proportionalitätskonstante ist die Quantenausbeute  $\phi$  (vgl. Gl. (II.11)). [48]

$$I_E = I_0 \left(1 - 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d}\right) \cdot \phi \quad (\text{II.12})$$

Wenn die gelöste Substanz in so geringen Konzentrationen vorliegt, dass die prozentuale Transmission hoch ist, lässt sich Gl. (II.12) über eine Reihenentwicklung vereinfachen: [49]

$$I_E = I_0 \cdot \left(1 - \left(1 - 2,303 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d + \frac{(2,303 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d)^2}{2} - \dots\right)\right) \cdot \phi \quad (\text{II.13})$$

$$\Rightarrow I_E \approx I_0 \cdot 2,303 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \cdot \phi = 2,303 \cdot I_0 \cdot A \cdot \phi \quad (\text{II.14})$$

Somit lassen sich Quantenausbeuten  $\phi_A$  von Verbindungen, deren Fluoreszenzintensitäten  $I_A$  und Absorptionen  $A_A$  bekannt sind, mit Hilfe der Daten ( $A_R, I_R$ ) von Verbindungen bekannter Quantenausbeute  $\phi_R$  im gleichen Lösungsmittel bestimmen über:

$$\frac{I_A}{I_R} = \frac{I_0 \cdot A_A \cdot \phi_A}{I_0 \cdot A_R \cdot \phi_R} \Leftrightarrow \phi_A = \frac{A_R \cdot I_A}{A_A \cdot I_R} \cdot \phi_R \quad (\text{II.15})$$

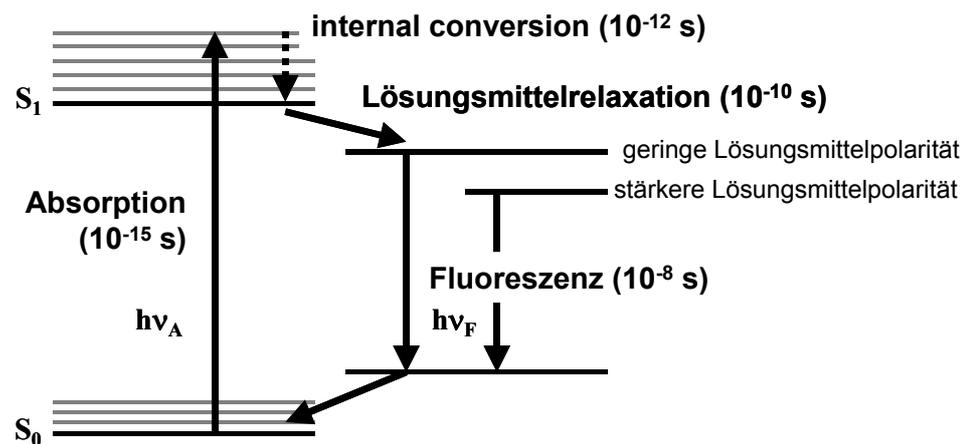


Abbildung II.3 – Rotverschiebung der Fluoreszenz durch Lösungsmittelrelaxation in Abhängigkeit der Polarität des Lösungsmittels.

## II. Lösungsmiteleinfluss auf die Fluoreszenz

Die Emissionsspektren vieler Fluorophore sind abhängig von der Polarität ihrer Umgebung. Veränderungen der Umgebungspolarität eines Fluorophors innerhalb eines Proteins sind jedoch quantitativ nicht zu erfassen. Deswegen werden oft Lösungsmittelstudien zur Simulation unterschiedlicher Fluorophorumgebungen als Vergleich hinzugezogen. Die Auswirkung eines Lösungsmittels auf die Emission eines Fluorophors lässt sich dabei auf generelle und spezielle Lösungsmittelleffekte zurückführen. [24]

*Generelle Lösungsmittelleffekte* sind unabhängig von den chemischen Eigenschaften von Fluorophor und Lösungsmittel und lassen sich über eine Beschreibung des Lösungsmittels als dielektrisches Medium formulieren. *Spezielle Lösungsmittelleffekte* beruhen auf zwischenmolekularen Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Lösungsmittel, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen und Komplexbildung. Für eine systematische Betrachtung von lösungsmittelabhängigen Fluoreszenzeigenschaften ist es deswegen wünschenswert, sich durch die Wahl der Lösungsmittel auf eine Veränderung der generellen Lösungsmittelleffekte bei einer geringen Variabilität der speziellen Lösungsmittelleffekte zu beschränken.

### a) Lösungsmittelrelaxation

Der generelle Einfluss eines Lösungsmittels auf die Fluoreszenz eines Fluorophors lässt sich mit Hilfe der Lösungsmittelrelaxation beschreiben (vgl. Abbildung II.3). Nach der Anregung eines Fluorophors und nachfolgender sehr schneller *internal conversion* kann prinzipiell Fluoreszenz aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands  $S_1$  erfolgen. In den meisten Lösungsmitteln erfolgt jedoch noch vor der Emission eine weitere Stabilisierung des angeregten Zustandes, die *Lösungsmittelrelaxation*. Sie beruht darauf, dass

der Fluorophor im angeregten Zustand meist ein größeres Dipolmoment  $\mu_E$  als im Grundzustand ( $\mu_G$ ) aufweist. Daraus resultierend ordnen sich polare Lösungsmittelmoleküle in einem Zeitintervall von  $10^{-11}$ - $10^{-10}$  s nach Anregung um und senken so den angeregten Zustand energetisch ab. Mit steigender Lösungsmittelpolarität nimmt die Absenkung des angeregten Zustandes zu, so dass die Emission des Fluorophors in Lösungsmitteln zunehmender Polarität stärker rot verschoben wird. Diesen Effekt beschreibt die im nächsten Abschnitt behandelte *Lippert-Gleichung*.

Es sollte jedoch erwähnt werden, dass nicht nur die Polarität des umgebenden Lösungsmittels einen Einfluss auf den Fluorophor zeigt. In Proteinen ist der Fluorophor oft weitgehend vom Lösungsmittel abgeschirmt und zeigt z.B. deswegen nur eine geringere Rotverschiebung seiner Emission. Ein zusätzlicher, langsamerer Relaxationsprozess kann jedoch oft trotzdem beobachtet werden. Dieser ist durch eine Relaxierung der Proteinmatrix um den angeregten Fluorophordipol (*spektrale Relaxation*) zu erklären, die eine Absenkung des emittierenden Niveaus bewirkt. Im Gegensatz zur Lösungsmittelrelaxation, bei der die sich reorientierenden Moleküle klein sind, ist die spektrale Relaxation mit Zeiten in der Größenordnung von  $10^{-9}$  s wesentlich langsamer: Sie ist häufig nicht mit Beginn der Emission abgeschlossen und führt somit zu einer uneinheitlichen Emission aus unterschiedlichen, relaxierten und nicht relaxierten Niveaus. Daraus resultiert oft ein Abklingen der Fluoreszenz, das sich auch bei nur einem Tryptophanrest im Protein nicht über die Anpassung einer einzelnen Lebenszeit beschreiben lässt. [24,50]

### b) Die Lippert-Gleichung

Aufgrund der Lösungsmittelrelaxation wird häufig gefunden, dass sich das Fluoreszenzmaximum einer gegebenen Substanz mit steigender Lösungsmittelpolarität bathochrom, d.h. zu längeren Wellenlängen verschiebt, so dass der Stokes Shift größer wird. Dieser Effekt geht häufig mit einer Abnahme der Quantenausbeute einher. Eine Beschreibung des lösungsmittelabhängigen Stokes Shifts liefert die *Lippert-Gleichung*, der zufolge der Stokes Shift  $\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F$  eine von dem Brechungsindex  $n$  und der dielektrischen Konstante  $\varepsilon$  abhängige Eigenschaft ist:

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F = \frac{2}{hc} \underbrace{\left( \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right)}_{\text{Orientierungspolarisierbarkeit, } \Delta f} \cdot \frac{(\mu^* - \mu)^2}{a^3} + const. \quad (\text{II.16})$$

Als weitere Größen geht außerdem die Differenz der Dipolmomente des angeregten und des Grundzustandes in Form von  $(\mu^* - \mu)^2$  sowie der Radius der Kavität, in der sich der Fluorophor befindet, ein. In der Gleichung enthaltene Konstanten sind das Planck'sche Wirkungsquantum  $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$  Js und die Lichtgeschwindigkeit  $c = 2,998 \cdot 10^8$  m/s.

Der den Brechungsindex  $n$  und die dielektrische Konstante  $\varepsilon$  beinhaltende Term wird als *Orientierungspolarisierbarkeit*  $\Delta f$  bezeichnet. Er beschreibt die auf einer reinen Reorientierung der Lösungsmittelmoleküle beruhenden spektralen Verschiebungen über die Differenz zweier Beiträge, von denen der eine,  $(\varepsilon-1)/(2\varepsilon+1)$ , die Reorientierung der Lösungsmitteldipole inklusive der Elektronenumordnung in Abhängigkeit der Dielektrizitätszahl  $\varepsilon$  beschreibt. Durch Subtraktion eines zweiten Beitrags, der nur die Umverteilung der Elektronen im Molekül über den Brechungsindex  $n$  beschreibt,  $(n^2-1)/(2n^2+1)$ , wird von der Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  nur die Veränderung in der Reorientierungsfähigkeit der Lösungsmittelmoleküle beschrieben. Die Lippert-Gleichung erklärt also den Stokes Shift als ein ausschließlich auf generellen Lösungsmittelleffekten beruhendes Phänomen.

### c) Lösungsmittelpolaritäten

Die in Abschnitt II.II.b) beschriebene Lippert-Gleichung formuliert die lösungsmittelabhängige Veränderung des Stokes Shifts zufrieden stellend über die Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  als ein Maß für die Lösungsmittelpolarität. Die Orientierungspolarisierbarkeit beschreibt die Lösungsmittelabhängigkeit anderer Fluoreszenzparameter nur unzureichend. Da für diese bislang keine theoretischen Modelle zur Beschreibung lösungsmittelabhängiger Effekte existieren, werden sie oft mit einem anderen Maß für die Lösungsmittelpolarität korreliert. Dies ist damit zu rechtfertigen, dass andere Fluoreszenzparameter nicht nur auf generellen Lösungsmittelleigenschaften, sondern auch auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Lösungsmittel beruhen können.

Es gibt eine Vielzahl von Lösungsmittelpolaritätsskalen, die auf unterschiedlichen Definitionen der Lösungsmittelpolarität beruhen und die versuchen, die Polarität über die generellen und spezifischen Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelöstem Stoff mit Ausnahme derer, die zu einer chemischen Veränderung des gelösten Stoffes führen, zu definieren. [51] Einige von ihnen sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Abgesehen von Polaritätsskalen wie z.B. der Y-Polaritätsskala, die auf der Solvolysengeschwindigkeit von *t*-Butylchlorid in verschiedenen Lösungsmitteln basiert und die für die Erklärung von Lösungsmittelleffekten bei organischen Reaktionen verwendet wird, gibt es viele auf optischen Indikatoren beruhende Polaritätsskalen. Diese bieten sich gerade wegen der großen Zahl an Lösungsmitteln, die über sie erfasst werden können, für lösungsmittelabhängige Studien an. Aufgrund der stark unterschiedlichen chemischen Struktur vieler solvatochromer Stoffe können mit ihnen intermolekulare spezifische Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Lösungsmitteln und dem gelöstem Stoff von sehr gezielt bis sehr umfassend beschrieben werden. Deswegen existieren viele verschiedene auf solvatochromen Effekten beruhende Polaritätsskalen.

### *Polaritätsskalen auf Basis optischer Indikatoren*

1994 gab es 18 allein über UV / VIS / nah-IR-spektroskopische Messungen abgeleitete Lösungsmittelpolaritätsskalen, die auf systematischen Untersuchungen mit bis zu 78 solvatochromen Stoffen beruhten. [51] Die meisten dieser Skalen basieren auf den spektralen Daten einer einzigen Verbindung. Die Veränderungen in den spektralen Eigenschaften einer einzigen Probe wurden lange Zeit nur bedingt als geeignet für die Erklärung lösungsmittelabhängiger Prozesse angesehen, da die generellen und spezifischen Wechselwirkungen dieser einen Verbindung mit dem Lösungsmittel ähnlich zu denen der zu untersuchenden Stoffe sein sollten. Durch die Wahl von mehreren optischen Indikatoren, deren solvatochrome Eigenschaften gemittelt wurden, sollten z.B. auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhenden Effekte und spektrale Anomalien (Veränderungen in der Bandenstruktur oder der Vibrationsfeinstruktur) ausgeschlossen werden. Beispiele für solche Lösungsmittelpolaritätsskalen sind die  $\phi$ -Skala nach Dubois *et al.*, [52] die  $\pi^*$ -Skala nach Kamlet, Abboud und Taft [53] und die  $\pi^*_{Azo}$ -Skala nach Buncl *et al.* [54]

Die  $\phi$ -Skala basiert auf der Position der lösungsmittelabhängigen  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge acht gesättigter aliphatischer Ketone, bezogen auf den Wert in *n*-Hexan als Referenz. Seit ihrer Formulierung im Jahre 1964 wurde sie jedoch nicht weiterentwickelt und liefert nur für 14 Lösungsmittel Polaritätswerte. [52]

Die  $\pi^*$ -Skala beruht auf der lösungsmittelinduzierten Frequenzmaxima-Verschiebung der  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge von sieben nitroaromatischen Indikatoren und wurde im Laufe der Zeit durch Einbeziehung weiterer solvatochromer Indikatoren verbessert. Zur Definition der  $\pi^*$ -Skala wurden diese optimierten Werte für *c*-Hexan und DMSO auf 0,00 bzw. 1,00 normiert. [53] Mittlerweile existieren in der  $\pi^*$ -Skala Einträge für 229 Lösungsmittel. [55]

Die  $\pi^*_{Azo}$ -Skala basiert auf ähnlichen Überlegungen wie die  $\pi^*$ -Skala, verwendet jedoch sechs unterschiedliche Azomerocyaninfarbstoffe<sup>1</sup> als primäre Indikatoren. [54] Diese Skala wurde aufgrund der Lage der Absorptionsbanden im Wellenlängenbereich von 440-550 nm (also weit entfernt von den *cutoff*-Bereichen der meisten Lösungsmittel) entwickelt, da die lösungsmittelleigene Absorption bei der  $\pi^*$ -Skala ein starkes Problem darstellt. Sie steht allerdings nur für 29 Lösungsmittel zur Verfügung.

Die auf nur einem solvatochromen Stoff und die auf vielen solvatochromen Stoffen beruhenden Polaritätsskalen sind oft linear miteinander verknüpft. [51,57] Also sind die Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und dem gelösten Stoff oft gleich geartet. Aus diesem Grund wurde bei Entwicklung neuerer Lösungsmittelskalen darauf geachtet, bei der Wahl der solvatochromen Probe stärkeres Gewicht auf universelle Löslichkeit zu legen.

---

<sup>1</sup> Merocyanine: von griech.: *μέρος* = Teil und Cyaninfarbstoffen abgeleitete Polymethinfarbstoffe, also Polyene mit einer ungeraden Anzahl von Methingruppen, die von zwei Auxochromen flankiert sind und als *push-pull*-System wirken. [56] Merocyanine können zwitterionisch vorliegen und sind deswegen aufgrund des daraus resultierenden hohen Dipols für Lösungsmittelstudien von Interesse. Die Azomerocyanine leiten sich demzufolge von den Merocyaninen durch Substitution zweier Methingruppen durch eine Azogruppe ab.

Eine dieser auf verbesserten Löslichkeiten beruhenden Lösungsmittelpolaritätsskalen ist die  $E_T(30)$ -Skala. Sie verwendet einen Merocyanin-Farbstoff<sup>l</sup> (ein Pyridinium-N-Phenolat-Betain) als solvatochrome Probe und definiert die Lösungsmittelpolarität über das Maximum der lösungsmittelabhängigen intramolekularen *charge transfer*  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorptionsbande. [58]

$$E_T(30) / \text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} = hc \cdot \tilde{\nu}_{\text{max}} \cdot N_A = 28951 / \lambda_{\text{max}} (\text{nm}) \quad (\text{II.17})$$

Die  $E_T^N$ -Skala leitet sich von der  $E_T(30)$ -Skala über eine Normierung auf die Werte für Tetramethylsilan und Wasser ab und ist deswegen einheitenfrei:

$$E_T^N = \frac{E_T(\text{solvent}) - E_T(\text{TMS})}{E_T(\text{H}_2\text{O}) - E_T(\text{TMS})} \quad (\text{II.18})$$

Der große Vorteil der  $E_T(30)$ - bzw.  $E_T^N$ -Skala liegt in der guten Löslichkeit des untersuchten Betainfarbstoffs in vielen Lösungsmitteln, so dass in ihr 360 Einträge zu finden sind. Deswegen ist sie mittlerweile eine der am häufigsten gebrauchten Polaritätsskalen. [24]

#### *Multiparameter-Ansätze*

Lösungsmittelabhängige Effekte sind oft sehr komplex und benötigen für eine Beschreibung deswegen oft mehr als einen Parameter. Deshalb gibt es Ansätze, die die Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelöstem Stoff über mehrere Parameter zu erfassen versuchen.

Ein Beispiel dafür sind lineare Solvationsenergie-Beziehungen (*linear solvation energy relationships* - LSERs) mit denen z.B. solvatochrome Lösungsmittelleffekte über eine Linearkombination mehrerer Lösungsmittelparameter beschreiben werden. [59] Die lineare Solvationsenergie-Beziehung nach Kamlet und Taft [60] beschreibt Lösungsmittelleffekte in Abhängigkeit dreier Parameter, der Lösungsmittelpolarität / Polarisierbarkeit  $\pi^*$ , der Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Azidität  $\alpha$  und der Wasserstoffbrücken-Donor-Basizität  $\beta$ .

Die Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Azidität  $\alpha$  gibt dabei an, inwiefern ein Lösungsmittel in der Lage ist [60] Wasserstoffbrückenbindungen als formaler Protonenakzeptor auszubilden, wohingegen die Wasserstoffbrücken-Donor-Basizität  $\beta$  beschreibt, wie stark das Lösungsmittel selbst in der Lage ist, durch seine Hydroxygruppen Wasserstoffbrücken zu bilden. [61] Die  $\pi^*$ -Polaritätsskala wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt vorgestellt.

Über eine multilineare Anpassung der gemessenen solvatochromen Eigenschaften an die folgende Gleichung (II.19)

$$XYZ = XYZ_0 + a \cdot \alpha + b \cdot \beta + c \cdot \pi^* \quad (\text{II.19})$$

können somit die jeweiligen Anteile der allgemeinen Lösungsmittelpolarität und der speziellen Lösungsmittelleigenschaften wie Wasserstoffbrückenbindungen an den beobach-

teten solvatochromen Phänomenen ermittelt werden. Aufgrund der großen Zahl an Variablen in Gleichung (II.19) ist dies aber nur für eine große Zahl an Lösungsmitteln möglich.

**d) Einfluss des Lösungsmittels auf Fluoreszenzeigenschaften**

Abgesehen von der über die Lippert-Gleichung erklärten Veränderung des Stokes Shifts mit der Lösungsmittelpolarität gibt es eine Vielzahl von Beobachtungen, die Veränderungen von Fluoreszenzparametern in Abhängigkeit der Lösungsmittelpolarität beschreiben. Diese Studien liefern jedoch meist keine quantitative Beschreibung der Ergebnisse für Parameter mit Ausnahme des Stokes Shifts. [62-64] Wenn doch, sind die Resultate aufgrund einer fehlenden theoretischen Erklärungsmöglichkeit rein empirisch. Beispielsweise berichten Maroncelli *et al.* [65] von einer Korrelation zwischen der Lösungsmittelpolarität und der Emissionsfrequenz bzw. der Halbwertsbreite der Emission des Laserfarbstoffs Coumarin 153 für 19 Lösungsmittel. Eine lösungsmittelabhängige Veränderung der Emissions-Halbwertsbreiten von Paraterphenyl wird auch von Sander *et al.* beobachtet und als ein Maß für die Interaktionsfähigkeit des Fluorophors mit dem Lösungsmittel interpretiert. [66]

Systematische Untersuchungen zur Quantifizierung der lösungsmittelabhängigen Quantenausbeute gibt es bislang nicht. Die Veränderung von Indol-Fluoreszenzlebenszeit-Verteilungen in unterschiedlichen Lösungsmitteln ist zwar untersucht, die erhaltenen Daten wurden aber nicht mit der Lösungsmittelpolarität korreliert. [67] Das gleiche gilt für die Untersuchung von lösungsmittelabhängigen Fluoreszenzlebenszeiten verschiedener Xanthenfarbstoffe. [68]

**e) Bestimmung von Quantenausbeuten in Lösungsmitteln mit unterschiedlichem Brechungsindex**

Quantenausbeuten von Fluorophoren, die im gleichen Lösungsmittel wie die Referenzsubstanz vorliegen, können mit Hilfe von Gleichung (II.15) bestimmt werden. Ist der zu betrachtende Fluorophor jedoch in einem anderen Lösungsmittel als die Referenzsubstanz gelöst, sind Abweichungen zu berücksichtigen, die auf die unterschiedliche Brechung des Lichtes an der Lösungsmittel-Luft-Grenzfläche zurückzuführen sind.

Fluoreszenzstrahlung, die in einem Winkel  $\theta$  von der Normalen innerhalb der Küvette emittiert wird, wird in einem größeren Winkel  $\phi$  außerhalb der Küvette detektiert, da bei dem Übergang von einem optisch dichteren (Lösungsmittel) in ein optisch dünneres Medium (Luft) das Licht von der Normalen fort gebrochen wird. [69] Da der Brechungsindex der Luft eins ist, gilt für den Zusammenhang zwischen  $\phi$  und  $\theta$  in Abhängigkeit des Brechungsindex der Lösung  $n_D$ :

$$\sin \phi = n_D \cdot \sin \theta \quad (\text{II.20})$$

Analog nimmt der Raumwinkel für die gleiche Intensität an betrachtetem Fluoreszenzlicht beim Übergang vom Lösungsmittel in Luft zu. Das Verhältnis der Raumwinkel ist gegeben durch: [69]

$$\frac{d\phi}{d\theta} = \frac{n_D \cdot \cos \theta}{\cos \phi} \quad (\text{II.21})$$

Die in Luft detektierten Fluoreszenzintensität muss deswegen auf ihre unterschiedliche Brechung an der Phasengrenze korrigiert werden. Für die lösungsmittelabhängige in Luft detektierte Intensität gilt in Abhängigkeit des Brechungsindex der Lösung und des Winkels in Luft: [70]

$$I_{Luft}(\phi, n) = I_{LöMi} \cdot \frac{\cos \phi}{n \cdot \sqrt{n^2 - \sin^2 \phi}} \quad (\text{II.22})$$

Für Winkel nahe  $0^\circ$  vereinfacht sich dieser Ausdruck zu

$$I_{Luft} = I_{LöMi} \cdot \frac{1}{n^2} \Leftrightarrow I_{LöMi} = I_{Luft} \cdot n^2 \quad (\text{II.23})$$

Aus diesem Grund lassen sich Quantenausbeuten von Fluorophoren in verschiedenen Lösungsmitteln über einen Vergleich mit einer Referenzsubstanz über Gleichung (II.15) und (II.23) ermitteln:

$$\phi_A = \frac{A_R \cdot I_A \cdot n_A^2}{A_A \cdot I_R \cdot n_R^2} \cdot \phi_R \quad (\text{II.24})$$

### III. **Proteinfluoreszenz und Proteinstruktur**

Proteine sind die häufigsten und vielfältigsten Makromoleküle in lebenden Zellen und übernehmen dort die unterschiedlichsten Funktionen. Da sich die Funktion eines Proteins direkt aus seiner Struktur ableitet, [3] ist die Erforschung der Struktur eines Proteins von zentralem Interesse. Für diese Untersuchungen bieten sich speziell Fluoreszenztechniken an, da mit ihrer Hilfe auch unter physiologischen Bedingungen Informationen über die Umgebung eines im Protein befindlichen Fluorophors erhalten werden können. Als Fluorophore können allgemein *extrinsische Fluorophore* verwendet werden, solange diese nicht die Struktur des Proteins verändern. Viele Proteine enthalten jedoch bereits *intrinsische Fluorophore*, also bereits vorhandene, fluoreszente Proteinbestandteile, die für Fluoreszenzuntersuchungen verwendet werden können. Durch die Verwendung der intrinsischen im Gegensatz zu den extrinsischen Fluorophoren wird gewährleistet, dass das Protein bei der Untersuchung tatsächlich in der gleichen Struktur wie im Organismus vorliegt.

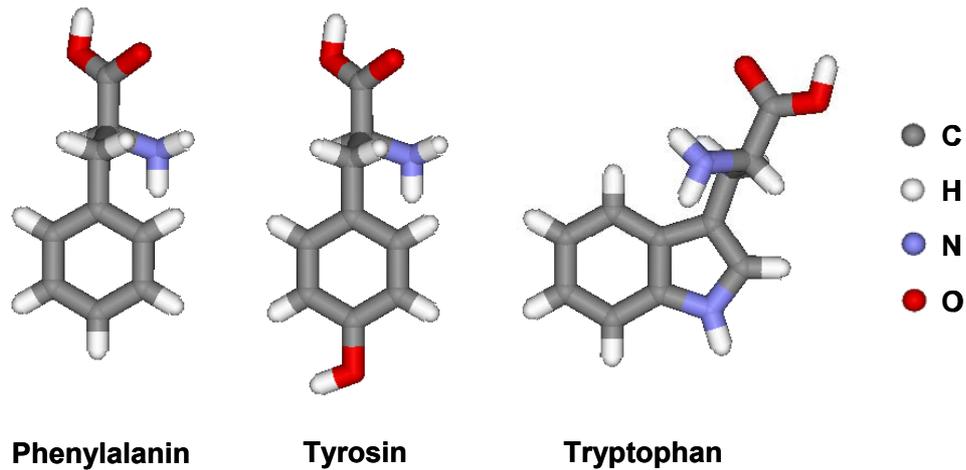


Abbildung II.4 – Die drei intrinsischen autofluoreszenten Aminosäuren in Proteinen.

#### a) *Intrinsische Fluorophore*

Proteine enthalten bis zu zwanzig verschiedene proteinogene Aminosäuren, von denen drei in der Lage sind, Fluoreszenzstrahlung im UV-Bereich zu emittieren. Bei diesen drei intrinsischen Fluorophoren handelt es sich um die drei aromatischen Aminosäuren *Tryptophan*, *Tyrosin* und *Phenylalanin* (vgl. Abbildung II.4). Da nur diese drei der zwanzig Aminosäuren fluoreszieren und sie außerdem relativ selten in Proteinen vorkommen, ist es möglich, aus Proteinfluoreszenzspektren Informationen zu gewinnen.

Tryptophan und Phenylalanin sind für den Menschen essentiell, Tyrosin kann hingegen im Körper durch Oxidation von Phenylalanin hergestellt werden. Neben ihrer Beteiligung bei strukturellen und katalytischen Funktionen von Proteinen sind die drei aromatischen Aminosäuren Vorstufen für Hormone und andere wichtige Verbindungen. Sie sind wegen ihrer aromatischen Ringsysteme relativ unpolar und deshalb an hydrophoben Wechselwirkungen, oft im Innern der Proteine, beteiligt. Die Hydroxygruppe des Tyrosins ist außerdem in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen.

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und zu einem geringen Teil auch Phenylalanin absorbieren im UV-Bereich des Spektrums. Ihre Absorptionsmaxima liegen bei 280 nm (Tryptophan), 277 nm (Tyrosin) bzw. 258 nm (Phenylalanin), wobei sich die Absorptionskoeffizienten wie 27 : 7 : 1 verhalten, so dass Tryptophan am stärksten und Phenylalanin am schwächsten absorbiert. [71] In den meisten Proteinen dominiert somit der Einfluss von Tryptophan und ihr Absorptionsmaximum liegt in der Nähe von 280 nm.

Um eine selektive Anregung von nur einem Fluorophor (Tryptophan) zu erreichen, werden Proteine häufig mit Licht, das zu ihrem Absorptionsmaximum rotverschoben ist, angeregt. Da sich das Emissionsmaximum von Phenylalanin bei 282 nm befindet, liefert diese Aminosäure dann keinen Beitrag zu Proteinfluoreszenz. Tyrosin weist ein Emissionsmaximum bei 303 nm, Tryptophan bei 353 nm auf. Somit kann die Tryptophanfluoreszenz in Proteinen

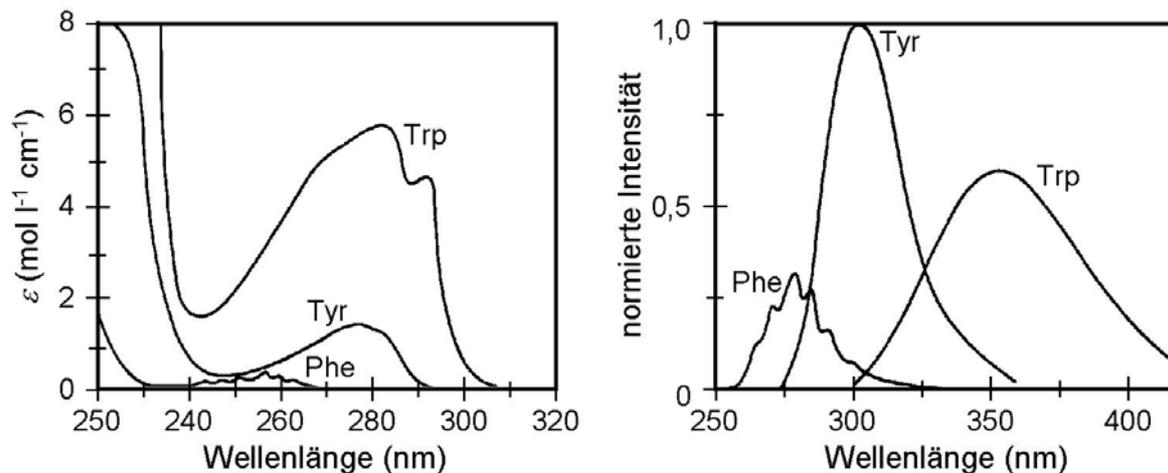


Abbildung II.5 – Absorptions- und Emissionsspektren der drei aromatischen Aminosäuren. Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. [24]

gezielt durch Anregungswellenlängen ab 295 nm untersucht werden. Die Quantenausbeuten in Wasser (pH 7) von 0,14 (Tryptophan), 0,13 (Tyrosin) und 0,02 (Phenylalanin) zeigen wie auch schon die Absorptionskoeffizienten, dass der Beitrag von Phenylalanin zur Proteinfluoreszenz zu vernachlässigen ist. [72]

Das Fluoreszenzverhalten von Tryptophan dient oft zur Charakterisierung von Proteinstrukturen, da die Quantenausbeute der Tryptophanreste um so geringer und das Fluoreszenzmaximum um so stärker rot verschoben ist, je stärker sie zum Lösungsmittel exponiert sind. [38,73,74] Dieser Effekt lässt sich zurückführen auf die große Änderung des Dipolmomentes bei der Anregung von Tryptophan, so dass die Lösungsmittelrelaxation eine sehr wichtige Rolle einnimmt. [38]

Tyrosin reagiert im Vergleich dazu wesentlich weniger stark auf eine Veränderung seiner Umgebung. Außerdem ist die Tyrosinfluoreszenz von Proteinen häufig nur sehr gering, da einerseits die Bildung von nur schwach fluoreszierendem Tyrosinat durch Wasserstoffbrücken stattfinden kann. [75] Andererseits ist Energietransfer (vgl. Kapitel II.IV.b) von Tyrosin auf Tryptophan [76] bzw. Tyrosinat [72] möglich, durch den die Tyrosinfluoreszenz weiter verringert werden kann. Schließlich wird die Emission von Tyrosin häufig gequenchet: Effektive Quencher sind Tyrosinatreste, [77] Phosphationen, [78] Peptidbindungen [79] oder nahe gelegene, protonierbare bzw. geladene Seitengruppen anderer Aminosäuren. [80]

Tryptophanfluoreszenz im Protein kann unter gewissen Bedingungen auch intrinsisch gequenchet werden: Abgesehen von der Abnahme der Fluoreszenzintensität eines Tryptophanrestes durch Lösungsmittel-Quenching können auch räumlich nahe gelegene Aminosäuren die Fluoreszenz von Tryptophan löschen. Dies sind, in der Reihenfolge ihrer Quencheffizienzen aufgeführt, Cystin [81], Cystein [82], Prolin [83], Methionin [82], Glutamat [84], Aspartat [82], Arginin [83], Histidin, Serin und Threonin [82], Glycin und

	Phenylalanin	Tyrosin	Tryptophan
Abkürzung / Buchstabencode	Phe / F	Tyr / Y	Trp / W
Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{ex, max.}}$ (nm)	260	275	280
Absorptionskoeffizient $\varepsilon_{\text{max}}$ ( $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	200	1400	5600
Emissionsmaximum $\lambda_{\text{em, max.}}$ (nm)	282	304	353
Quantenausbeute $\phi$	0,02	0,13	0,14
Fluoreszenzlebenszeit $\tau$ (ns)	6,8	3,6	3,1
relative Häufigkeit im Protein (%)	3,5	3,5	1,1
Hydrophathie-Index <sup>2</sup> (von -4,5 bis 4,5)	2,8	-1,3	-0,9

Tabelle II.1 – Fluoreszenzspektroskopische [24] und biologische [2] Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.

Lysin [83] sowie Valin und Alanin [82]. Erwähnenswert ist in diesem Kontext, dass die bimolekularen Quenchkonstanten der Aminosäuren (ermittelt über Quenching-Untersuchungen mit N-Acetyltryptophanamid als Modell für proteingebundenes Tryptophan und den entsprechenden Aminosäuren [83]) um mindestens den Faktor drei niedriger sind als bei Quenchern, die zur Bestimmung der Lösungsmittlexposition eines Fluorophors im Protein (vgl. Abschnitt II.IV.a) verwendet werden. Somit ist ihr quencher Einfluss auf Tryptophan im Protein nur dann relevant, wenn sie sich in starker räumlicher Nähe zu Tryptophan befinden.

#### b) Merkmale der Proteinstruktur

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins ist in komplexer Weise von seiner Aminosäuresequenz abhängig und für seine Funktion verantwortlich. [3] Zur Diskussion der Proteinstruktur verwendet man in der Regel vier Strukturebenen, die in Abbildung II.6 dargestellt sind und die im Folgenden beschrieben werden: Die *Primärstruktur* entspricht einer Sequenz von Aminosäuren, die durch kovalente Peptidbindungen miteinander verbunden sind und schließt alle Disulfidbrücken mit ein. Polypeptidketten können nicht jede beliebige Anordnung im Raum einnehmen: Aufgrund sterischer Zwänge und vieler schwacher Wechselwirkungen gibt es Anordnungen, die stabiler sind als andere. Unter der *Sekundärstruktur* versteht man in diesem Zusammenhang regelmäßige, periodisch wiederkehrende räumliche Anordnungen benachbarter Aminosäurereste. Als häufigste

<sup>2</sup> Der Hydrophathie-Index fasst die hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften der Aminosäuren im Protein zusammen. So lässt sich vorhersagen, welche Aminosäuren in wässriger Umgebung (negative Werte) oder in hydrophober Umgebung (positive Werte) vorkommen. Hydrophathie-Werte für einzelne Aminosäuren liefern natürlich nur Informationen über ihr tendenzielles Verhalten, da für Strukturvorhersagen die gesamte Aminosäuresequenz mit einbezogen werden muss.

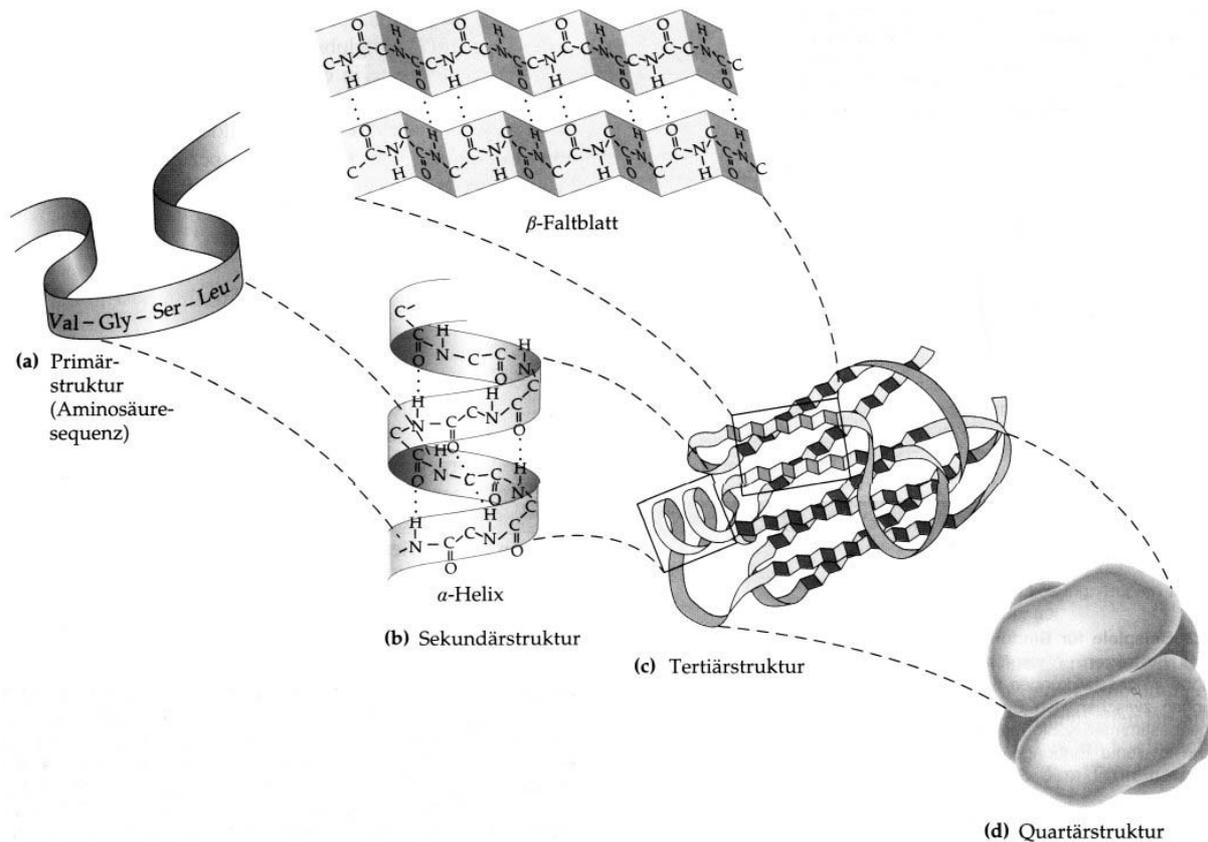


Abbildung II.6 – Die vier Ebenen der Proteinstruktur (entnommen aus [1]).

Beispiele hierfür sind die  $\alpha$ -Helix und die  $\beta$ -Faltblattstruktur zu nennen. Als *Tertiärstruktur* bezeichnet man die räumliche Beziehung zwischen allen Aminosäuren einer Polypeptidkette bzw. die vollständige dreidimensionale Struktur eines Polypeptids. Schließlich ist bei Proteinen aus mehreren Polypeptidketten die *Quartärstruktur*, die räumliche Anordnung der Untereinheiten, die letzte Strukturebene.

### c) Vorhersage der Proteinstruktur

Bislang ist es nicht möglich, aus einer gegebenen Aminosäuresequenz die dreidimensionale Proteinstruktur des entsprechenden Proteins vorherzusagen. Aus der Primärstruktur kann zwar oft mit Hilfe von Berechnungsmethoden in Kombination mit z.B. Circular dichroismusmessungen die Sekundärstruktur erhalten werden, es fehlen jedoch Algorithmen zur Berechnung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Zum Teil können diese Informationen aus einem Vergleich des Proteins unbekannter Struktur mit den Daten von Proteinen mit bekannter 3D-Struktur erhalten werden (*Threading*). Sekundärstrukturberechnungen können dagegen bereits zufriedenstellend durchgeführt werden. Z.B. kann mit der 1994 entwickelten Vorhersagemethode PHD unter Anwendung neuronaler Netze die Sekundärstruktur eines Proteins mit einer Genauigkeit von bis zu 88 % erhalten werden. [85]

#### d) *Einfluss der Proteinstruktur auf die Fluoreszenz*

Aufgrund der in Abschnitt II.III.a) dargelegten Überlegungen hat die Proteinstruktur einen starken Einfluss auf die Fluoreszenz eines Proteins. Speziell die stark umgebungsabhängige Fluoreszenz von Tryptophan ist dabei ein Charakteristikum, das Informationen über die Umgebung des Fluorophors und somit indirekt über die Proteinstruktur liefert. Ein Faktor, der dabei die Interpretation erschwert, ist die Gegenwart mehrerer Fluorophore im Protein. Selbst bei einer ausschließlichen Anregung von Tryptophan durch Anregungswellenlängen größer als 295 nm kann bei mehreren Tryptophanresten im Protein die Separation ihrer einzelnen Beiträge aufgrund der spektralen Überlappung erschwert sein. Aus diesem Grund werden oft *Einzeltryptophanmutanten* oder *Tryptophan-Analoga* enthaltende Mutanten der jeweiligen Proteine zusätzlich zu der nativen Form untersucht.

Das Emissionsmaximum von Tyrosin im Protein liegt wie auch das Emissionsmaximum von nicht-proteingebundenem Tyrosin bei 305 nm. Im Protein kann jedoch das Tyrosin auch durch Wasserstoffbrückenbindungen formal als Tyrosinat vorliegen. In diesem Fall liefert dieser Fluorophor einen Fluoreszenzbeitrag mit einem Emissionsmaximum von 345 nm. Aufgrund der stark umgebungsabhängigen Fluoreszenz von Tryptophan liegt das Emissionsmaximum der Tryptophanfluoreszenz im Protein erfahrungsgemäß zwischen 353 nm (entspricht vollständiger Lösungsmittlexposition) und 308 nm. Die stärkste Blauverschiebung der Tryptophanfluoreszenz wurde bislang für das Protein Azurin ( $\lambda_{em., max} = 308 \text{ nm}$ ) beobachtet. [86] Die starke Umgebungsabhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz wird z.B. dafür verwendet, Proteine in „spektrale Klassen“ einzuordnen. Beispielsweise klassifiziert Burstein [87] Proteine über ihr Emissionsmaximum zusammen mit der Halbwertsbreite FWHM in drei Klassen: Klasse I ( $\lambda_{em.} = 330\text{-}332 \text{ nm}$ ; FWHM = 48-49 nm) zeigt einen Tryptophanrest, der stark vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt, Klasse II ( $\lambda_{em.} = 340\text{-}342 \text{ nm}$ ; FWHM = 53-55 nm) zeigt einen eher an der Oberfläche angesiedelten Fluorophor, und Klasse III ( $\lambda_{em.} = 350\text{-}353 \text{ nm}$ , FWHM = 59-61 nm) zeigt einen komplett lösungsmittelzugänglichen Fluorophor. Zu 330 nm blau verschobene Tryptophanfluoreszenz wird jedoch nicht erfasst.

#### e) *Tryptophan-Analoga*

Bei der Untersuchung von Multi-Tryptophanproteinen ist die spektrale Separation der Beiträge der einzelnen Tryptophanreste oft unmöglich. Für diesen Fall ist es wünschenswert, den Tryptophanrest durch einen Fluorophor mit unterschiedlichen spektroskopischen Eigenschaften (Quantenausbeute, Anregungs- und Emissionsmaximum, etc.) zu ersetzen. Chemisch modifizierte Tryptophan-Analoga bieten sich für diese Aufgabe an, da sie von allen möglichen Substituenten aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Tryptophan die Proteinstruktur am wenigsten verändern. Einige Tryptophan-Analoga sind in dieser Rolle seit mehr als 30 Jahren untersucht [88] und bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.

Eines der am gründlichsten untersuchten Analoga ist 7-Azatriptophan, das einen deutlichen Unterschied in seiner Fluoreszenz im Vergleich zu Tryptophan zeigt, da seine Absorptions- und Emissionsmaxima in Wasser verschoben sind. Außerdem unterscheidet sich das Abklingen der Fluoreszenz, und 7-Azatriptophan reagiert noch sensitiver als Tryptophan auf Veränderungen seiner Umgebung. [89-91] 5-Hydroxytryptophan reagiert im Vergleich dazu wesentlich weniger auf eine Veränderung seiner Umgebung [92] und besitzt eine wesentlich höhere Quantenausbeute. [93] 7-Aza- und 5-Hydroxytryptophan sind die beiden nicht-biogenen Aminosäuren, die am häufigsten für Proteinfluoreszenzstudien verwendet werden. [94-97] Aber auch das nicht-fluoreszierende 4-Fluorotryptophan bietet sich als „stummes Analogon“ für Proteinfluoreszenzuntersuchungen an. [98]

Tryptophan-Analoga können zusätzlich zur aufwendigen Totalsynthese über unterschiedliche biochemische Methoden in Proteine eingebracht werden. Die einfachste Methode zur Inkorporation von Tryptophan-Analoga in Proteine ist, die jeweiligen Analoga bei einer bakteriellen Expression den verwendeten Medien zuzusetzen. Voraussetzung dafür ist, dass die verwendeten Bakterien keine eigene Tryptophanbiosynthese betreiben und dass das jeweilige Analogon nicht als von Tryptophan unterschiedlich erkannt wird. Des Weiteren können Tryptophan-Analoga aber auch nach geeigneter Modifizierung der entsprechenden DNA nach der Transkription über eine Translation mit chemisch modifizierten, das Tryptophan-Analogon bindenden „nonsense suppressor“ tRNAs in die entsprechenden Proteine eingeführt werden. [99]

#### f) *Beschreibung der spektralen Form*

Für die Diskussion der Form eines Emissionsspektrums ist es oft wünschenswert, präzise Fluoreszenzparameter wie das Emissionsmaximum oder die Halbwertsbreite angeben zu können. Für die Beschreibung der spektralen Form der Fluoreszenz eines in Wasser gelösten oder im Protein befindlichen Tryptophanrestes kann eine Lognormal-Verteilung gemäß Burstein *et al.* verwendet werden, [100,101] die die Fluoreszenzintensität  $I$  in Abhängigkeit der Wellenzahl  $\tilde{\nu}$  und der maximalen Emissionswellenzahl  $\tilde{\nu}_m$  wiedergibt:

$$I(\tilde{\nu}) = I_m \cdot \exp\left\{-\frac{\ln 2}{\ln^2 \rho} \cdot \ln^2\left(\frac{a - \tilde{\nu}}{a - \tilde{\nu}_m}\right)\right\} \quad (\text{II.25})$$

Weitere in Gleichung (II.25) enthaltenen Parameter sind die Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum  $I_m$ , der Bandensymmetrieparameter  $\rho$  (wobei  $\rho = (\tilde{\nu}_m - \tilde{\nu}_-)/(\tilde{\nu}_+ - \tilde{\nu}_m)$ ), und  $a$  der funktionslimitierende Punkt ( $a = \tilde{\nu}_m + \rho \cdot (\tilde{\nu}_+ - \tilde{\nu}_-)/(\rho^2 - 1)$ ), ab dem  $I(\tilde{\nu}) = 0$  ist. Bei  $\tilde{\nu}_+$  und  $\tilde{\nu}_-$  handelt es sich um die Wellenzahlen der Wertepaare mit halbmaximaler Fluoreszenzintensität.

## IV. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungsmethoden

### a) Bestimmung der Fluorophorexposition über Quenching

Die in Kapitel II.I.c) beschriebene strahlungslose Deaktivierung eines Fluorophors durch Quenching kann bei gezielten Quenching-Untersuchungen dazu verwendet werden, Informationen über die Lösungsmittelzugänglichkeit eines Fluorophors im Protein zu gewinnen. Dazu wird das Protein mit verschiedenen Konzentrationen an Quencher inkubiert und das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bzw. Lebenszeiten betrachtet. Bei geringen Proteinnengen bietet sich dabei die Veränderung der Fluoreszenzlebenszeiten als Untersuchungskriterium an, da diese in der Regel von der Proteinkonzentration unabhängig sind und somit eine stark fehleranfällige Konzentrationsnormierung der Spektren vermieden wird. Die Untersuchung des gezielten Quenchings über die Abnahme der Fluoreszenzintensität bietet sich jedoch im Gegenzug bei größeren Mengen an vorhandenem Protein wegen des geringeren experimentellen Aufwandes der statischen Messungen an.

#### *Dynamisches Quenching & Stern-Volmer-Auftragungen*

Für den Fall des *dynamischen Quenchings* eines Fluorophors gilt die Stern-Volmer-Gleichung

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_D \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (\text{II.4})$$

der zufolge ein linearer Zusammenhang zwischen der relativen Fluoreszenzveränderung des Fluorophors im Protein und der Quencherkonzentration besteht. Über die Steigung einer Stern-Volmer-Auftragung, bei der die Quencherkonzentration  $[Q]$  gegen das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $I_0/I$  bzw. der Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_0/\tau$  in Ab- und Anwesenheit des Quenchers aufgetragen wird, kann somit die relative Zugänglichkeit des Fluorophors im Protein über den Vergleich mit Quenching-Untersuchungen anderer Proteine unter identischen Bedingungen erhalten werden. Der entsprechende Fluorophor ist dabei umso zugänglicher, je steiler die Stern-Volmer-Auftragung verläuft. Abbildung II.7 zeigt eine Stern-Volmer-Auftragung für die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten bei Acrylamid-Quenching von nicht-proteingebundenem Tryptophan in Wasser. Da für Stern-Volmer-Auftragungen Fluoreszenzintensitäten und Fluoreszenzlebenszeiten verwendet werden können, ist die Auswertung unabhängig von der *statischen* bzw. *dynamischen* Versuchsdurchführung.

Oft befindet sich in einem Protein mehr als ein Fluorophor. Diese liegen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in unterschiedlichen Umgebungen vor und sind somit für Fluoreszenzlöscher unterschiedlich zugänglich. Daraus resultieren für die korrespondierenden Stern-Volmer-Auftragungen für die Fluoreszenzintensitäten<sup>3</sup> Abweichungen vom linearen

<sup>3</sup> Für mehrere Fluorophore im Protein in unterschiedlichen Umgebungen ist eine komplementäre Betrachtung der Fluoreszenzlebenszeiten bei Quenching-Untersuchungen hinfällig, da sich diese anders als die gemessenen

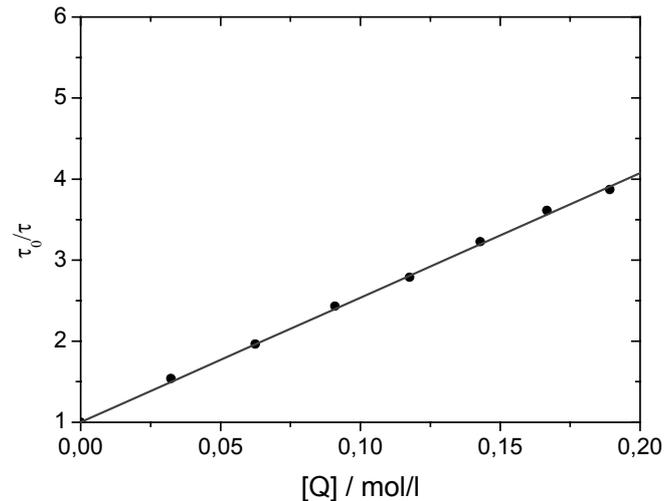


Abbildung II.7 – Stern-Volmer-Auftragung für die Lebenszeitveränderungen bei Acrylamidquenching von Tryptophan in wässriger Lösung. Die aus der Auftragung ermittelte Stern-Volmer-Konstante beträgt  $K_D = 15,36$  l/mol. Für eine Stern-Volmer-Auftragung für die Fluoreszenzintensitätsveränderungen unter identischen Bedingungen vgl. Abbildung II.9.

Verhalten. Abbildung II.8a) zeigt die relative Veränderung der Fluoreszenzintensität für zwei Fluorophore, von denen der eine für Quencher gut zugänglich, der andere aber nicht bzw. nur schlecht zugänglich ist.

Die Gesamtfluoreszenzintensität der Probe in Abwesenheit des Quenchers  $I_0$  ist bei Vorliegen eines für Quencher zugänglichen Fluorophors „a“ sowie eines unzugänglichen Fluorophors „b“ durch die Summe der beiden einzelnen Fluoreszenzbeiträge gegeben:

$$I_0 = I_{0a} + I_{0b} \quad (\text{II.26})$$

Infolge des selektiven Quenchings des Fluorophors „a“ erhält man in Gegenwart des Quenchers für die Gesamtfluoreszenzintensität

$$I = \frac{I_{0a}}{1 + K_a \cdot [Q]} + I_{0b} \quad (\text{II.27})$$

Durch Subtraktion von Gleichung (II.27) von (II.26) erhält man für die Differenz zwischen Ausgangsfluoreszenzintensität und Fluoreszenzintensität in Anwesenheit des Quenchers  $\Delta I$ :

$$\Delta I = I_0 - I = I_{0a} \cdot \left( \frac{K_a \cdot [Q]}{1 + K_a \cdot [Q]} \right) \quad (\text{II.28})$$

---

Intensitäten bei Abwesenheit von Energietransfer nicht additiv verhalten, sondern in Form einer „gemittelten“ Lebenszeit detektiert werden, für die die folgenden Betrachtungen nicht gelten.

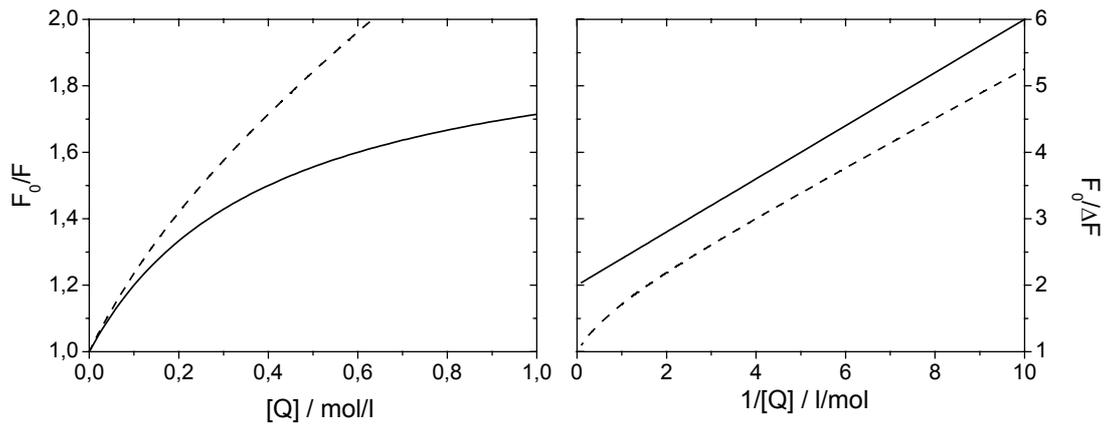


Abbildung II.8 – a) Abweichungen vom linearen Stern-Volmer-Plot und b) modifizierte Stern-Volmer-Auftragungen bei unterschiedlich zugänglichen Fluorophoren – Simulation für zwei Fluorophore in unterschiedlichen Umgebungen: (—)  $K_{Da} = 5$  l/mol und  $K_{Db} = 0$  l/mol; (---)  $K_{Da} = 5$  l/mol und  $K_{Db} = 0,5$  l/mol.

Durch Division von Gleichung (II.27) durch Gleichung (II.28) erhält man einen von  $1/[Q]$  abhängigen Ausdruck, der eine graphische Bestimmung von  $K_a$  und dem für den Quencher zugänglichen Bruchteil der Fluoreszenz  $f_a$  zulässt.

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{f_a \cdot K_a \cdot [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (\text{II.29})$$

$$\text{mit } f_a = \frac{I_{0a}}{I_{0a} + I_{0b}} \quad (\text{II.30})$$

Abbildung II.8b) zeigt eine derartige simulierte modifizierte Stern-Volmer-Auftragung für zwei Fluorophore in unterschiedlicher Umgebung. Für den Fall eines zugänglichen und eines nicht zugänglichen Fluorophors resultiert in der modifizierten Stern-Volmer-Auftragung ein linearer Zusammenhang zwischen dem aufgetragenen Fluoreszenzparameter  $I_0/\Delta I$  und dem Kehrwert der Quencherkonzentration  $1/[Q]$ , so dass die Bestimmung der Stern-Volmer-Konstanten  $K_{Da}$  und der Bruchteil der quencherzugänglichen Fluoreszenzintensität  $f_a$  sehr gut ermöglicht wird. Für zwei unterschiedlich zugängliche Fluorophore ist dies nur eingeschränkt möglich, da in diesem Fall auch in der modifizierten Stern-Volmer-Auftragung Abweichungen von der Linearität zu erkennen sind. Außerdem führt die Parallelverschiebung der Auftragungen (vgl. Abbildung II.8b) auch bei einer ausschließlichen Betrachtung von  $I_0/\Delta I$  bei großen Werten von  $1/[Q]$  (also kleinen Quencherkonzentrationen) zu einer Verfälschung bei der Bestimmung des Achsenabschnitts  $1/f_a$ , so dass daraus folgend

ungenauere Werte für die Stern-Volmer-Konstante  $K_{Da}$  erhalten werden. Somit ist auch die modifizierte Stern-Volmer-Auftragung nur eingeschränkt für eine Auswertung von Quenchingexperimenten bei Proteinen mit unterschiedlich zugänglichen Fluorophoren geeignet.

*„Quenching Sphere of Action“ – die Aktionssphärenabweichung*

Bei hohen Quencherkonzentrationen und guten Fluorophorzugänglichkeiten werden oft Abweichungen von der Linearität festgestellt, die auf einer starken Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Quencher bereits bei der Anregung beruhen.

Zurückzuführen ist dies auf eine Deaktivierung des Fluorophors direkt bei Anregung, die bei hohen Quencherkonzentrationen in einer Abweichung der Stern-Volmer-Auftragung nach oben resultiert (Abbildung II.9). Somit können nur Fluorophore zur Gesamtfluoreszenz der Probe beitragen, in deren direkter Umgebung („*quenching sphere of action*“ – „Aktionssphäre“) bei der Anregung kein Quencher existiert. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich kein Quencher bei der Anregung in der Aktionssphäre des Fluorophor-Quencher-Paars mit dem Volumen  $V$  befindet, ist bei einer Konzentration  $[Q]$  gegeben durch:

$$P(0) = \exp(-[Q] \cdot V \cdot N_A) \quad (\text{II.31})$$

Folglich wird die Zahl an Fluorophoren, die bei Anwesenheit des Quenchers fluoreszieren, um den Faktor  $\exp(-[Q] \cdot V \cdot N_A)$  verringert, wobei  $[Q] \cdot N_A$  die durchschnittliche Quencherkonzentration im Volumen  $V$  angibt. Daraus resultiert für die Stern-Volmer-Gleichung bei dynamischem Quenching eines Fluorophors unter Berücksichtigung der Aktionssphärenabweichung:

$$\frac{I_0}{I \cdot \exp([Q] \cdot V \cdot N_A)} = 1 + K_D \cdot [Q] \quad (\text{II.32})$$

bzw. 
$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot \exp([Q] \cdot V \cdot N_A) \quad (\text{II.33})$$

Die durch das Vorhandensein einer Aktionssphäre zustande kommenden Abweichungen von der Linearität können somit durch Division mit einem Term der Form  $\exp(-[Q] \cdot V \cdot N_A)$  korrigiert werden. Abbildung II.9 zeigt für das Acrylamid-Quenching von Tryptophan in wässriger Lösung die Abweichung von der Linearität durch die Deaktivierung des Tryptophans durch Acrylamid innerhalb der Aktionssphäre des Tryptophans direkt bei der Anregung. Die Abweichungen können gut durch Division eines entsprechenden Exponentialterms kompensiert werden.

Erwähnenswert ist, dass Abweichungen durch das Vorhandensein einer Aktionssphäre nur in statischen Fluoreszenzmessungen beobachtet werden können. Bei zeitauflösenden

Fluoreszenzmessungen führt die sehr schnelle Deaktivierung des Fluorophors direkt nach der Anregung nicht zu einer Veränderung der angepassten Fluoreszenzlebenszeiten. Deswegen treten Abweichungen von der Linearität der Stern-Volmer-Auftragung aufgrund einer Aktionssphärenabweichung bei Lebenszeit-Messungen nicht auf.

Die Bedeutung des Volumens  $V$  der Aktionssphäre lässt sich einfach veranschaulichen: Für die in Abbildung II.9 dargestellte Messung wurde bei der Korrektur der Aktionssphärenabweichung ein Aktionssphärenvolumen von  $2,85 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^3$  ermittelt. Bei Annahme einer kugelförmigen Aktionssphäre entspricht dies einem Sphärenradius von  $8,80 \text{ \AA}$ . Somit ist die zu der Abweichung führende Aktionssphäre nur wenig größer als der Fluorophor selbst, da der Durchmesser des Indol-Rings ca.  $5 \text{ \AA}$  beträgt.

### *Statisches Quenching*

Wie in Abschnitt II.I.c) angesprochen, kann die Verringerung der Fluoreszenz nicht nur durch eine Deaktivierung des Fluorophors im angeregten Zustand, sondern auch durch Komplexbildung im Grundzustand erfolgen.

Dieses statische Quenching ist von dem Ausmaß der Komplexbildung und der Konzentration des Quenchers abhängig, so dass man für die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors aufgrund der Komplexbildung mit der Komplexbildungskonstante  $K_S$  erhält:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S \cdot [Q] \quad (\text{II.6})$$

Statisches Quenching ist wie bereits die Aktionssphärenabweichung nur über statische Meßmethoden zu identifizieren, da die Komplexbildung nur den Grundzustand des Fluorophors und damit die zu detektierende Gesamtfluoreszenzintensität, nicht aber den angeregten Zustand und somit auch nicht die Lebenszeit des Fluorophors beeinflusst.

### *Unterscheidung zwischen statischem und dynamischen Quenching*

Da sich sowohl dynamisches als auch statisches Quenching vergleichbar auf die von der Quencherkonzentration abhängige Fluoreszenzintensitäts-Veränderung auswirkt, ist es wichtig, zwischen beiden unterscheiden zu können. Ein wichtiges Indiz liefern temperaturabhängige Quenching-Untersuchungen, da diese für beide Phänomene unterschiedliche Auswirkungen zeigen sollten: Bei statischem Quenching ist davon auszugehen, dass eine Temperaturerhöhung eine Dissoziation der auf schwachen Wechselwirkungen beruhenden Komplexe bewirkt, die Komplexbildungskonstante verringert ist und deswegen die Steigung der Stern-Volmer-Auftragung bei höheren Temperaturen abnimmt. Bei dynamischem Quenching ist dagegen bei einer erhöhten Temperatur davon auszugehen, dass durch schnellere Diffusion Kollisionen zwischen Quencher und Fluorophor verstärkt auftreten. Demzufolge nimmt bei höheren Temperaturen das dynamische Quenching zu und die Stern-Volmer-Auftragung hat eine größere Steigung. Stehen Aufbauten zur

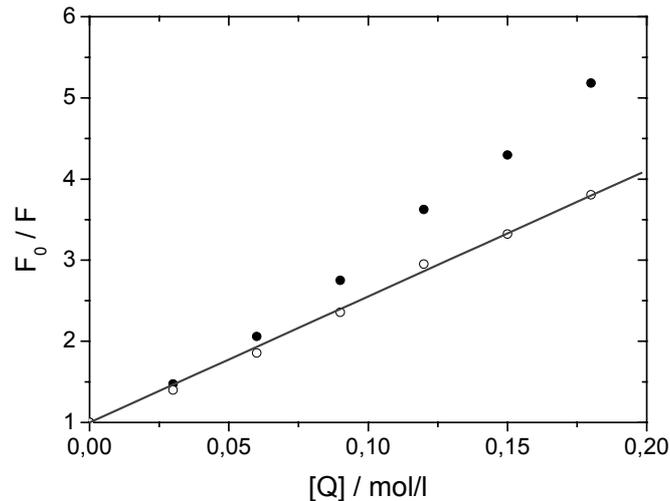


Abbildung II.9 – Stern-Volmer-Auftragung für die Veränderung in der Fluoreszenzintensität ohne (●) / mit (○) Korrektur der Aktionssphärenabweichung bei Acrylamidquenching von Tryptophan in wässriger Lösung. Die aus der Auftragung ermittelte Stern-Volmer-Konstante nach der Korrektur beträgt  $K_D = 16,86$  l/mol.

Messung von Fluoreszenzlebenszeiten bereit, kann die Natur des Quenchings über einen Vergleich aus statischen und dynamischen Meßmethoden geklärt werden.

### *Kombiniertes Quenching*

Viele Quencher können sowohl über dynamisches als auch statisches Quenching die Fluoreszenzintensität einer Probe beeinflussen. Das kombinierte Quenching lässt sich gemäß Gleichung (II.7) über eine Multiplikation der beiden mathematischen Beschreibungen der Effekte beschreiben:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = 1 + K_{App} \cdot [Q] \quad (\text{II.7})$$

$$\text{wobei} \quad K_{App} = \left( \frac{I_0}{I} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D \cdot K_S \cdot [Q] \quad (\text{II.34})$$

Aus einer Auftragung von  $K_{App} = (I_0/I - 1) \cdot 1/[Q]$  gegen  $[Q]$  können somit die Stern-Volmer-Konstante  $K_D$  und die Komplexbildungskonstante  $K_S$  aus der resultierenden Gerade über den Achsenabschnitt ( $K_D + K_S$ ) und die Steigung  $K_D \cdot K_S$  in Abwesenheit von Abweichungen aufgrund einer starken Aktionssphäre zwischen Fluorophor und Quencher ermittelt werden.

### *Quencher*

Der am häufigsten untersuchte Fluorophor bei Quenching-Untersuchungen der Proteinfluoreszenz ist die Aminosäure Tryptophan. Eine Vielzahl von Quenchern löscht die

Tryptophanfluoreszenz, wie z.B. die geladenen Spezies der Halogene und verschiedene Metallionen. Aber auch ungeladene Spezies wie Sauerstoff, Trifluoracetamid, Wasserstoffperoxid und Acrylamid beeinflussen die Tryptophanemission.

Der am häufigsten verwendete Quencher für Tryptophanfluoreszenz ist Acrylamid, das über einen Elektronentransfer vom Indolring den angeregten Zustand depopuliert. Da Acrylamid ungeladen ist, kann es fast ungehindert in die Proteinmatrix hinein diffundieren, und löscht somit die Tryptophanfluoreszenz in Abhängigkeit von der Lösungsmittelzugänglichkeit des Fluorophors. Die erhaltenen Daten müssen jedoch aufgrund der großen Einflussphäre des Acrylamids nach Gleichung (II.33) korrigiert werden. Ein wesentlich besserer Quencher für stark lösungsmittelabgeschirmte Tryptophanreste ist Sauerstoff. Für Quenching der Tryptophanfluoreszenz mit Sauerstoff muss jedoch unter Hochdruck (ca. 100 bar [102]) gearbeitet werden, da die Löslichkeit von Sauerstoff in wässriger Lösung sehr gering ist. Zusätzlich zu Acrylamidquenching werden oft Untersuchungen mit geladenen Quenchern einer vergleichbaren Größe durchgeführt. So kann die Ladung der Tryptophanumgebung untersucht werden, da geladene Quencher aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung verstärkt in eine Umgebung mit der entsprechenden Gegenladung gelangen können. Für diese Untersuchungen werden am häufigsten die positiv geladenen ionischen Quencher Cäsium und Thallium ( $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ ) und negativ geladenes Iodid ( $\text{I}^-$ ) verwendet. Cäsium zeigt dabei eine geringere Quencheffizienz als Thallium, wird aber wegen der Toxizität des Thalliumsalzes deutlich bevorzugt.

### b) *Abstandsbestimmungen über FRET*

Als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer wird die resonante Übertragung von Anregungsenergie eines Fluoreszenz-Donors  $D$  auf einen Fluoreszenz-Akzeptor  $A$  bezeichnet. Der Energietransfer erfolgt strahlungslos über eine Entfernung von vielen Moleküldurchmessern hinweg und ist primär das Resultat einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor. Die Effizienz des Energietransfers hängt einerseits von der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors  $D$  mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors  $A$  und andererseits von dem Donor-Akzeptor-Abstand  $R$  ab. Letzteres führt dazu, dass mit Hilfe von gezielten FRET-Experimenten Abstände zwischen Fluorophoren bestimmt werden können.

#### *Mathematische Beschreibung*

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_T$  für den Energietransfer ist gegeben durch die Fluoreszenzlebenszeit des Donors  $\tau_D$ , den Abstand der beiden Fluorophore  $R$  und den Förster-Radius  $R_0$ , bei dem 50 % Energietransfer auftritt:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (\text{II.35})$$

Die Größe des Förster-Abstands  $R_0$  wird dabei von mehreren Faktoren beeinflusst, wie z.B. der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor (beschrieben durch den Faktor  $\kappa^2$ ), dem Brechungsindex  $n$  der Fluorophorumgebung, der Quantenausbeute des Donors  $\phi_D$  in Abwesenheit des Akzeptors und vor allem dem Überlappungsintegral  $J_{DA}$ , das die Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum beschreibt:

$$R_0[\text{\AA}] = 9,79 \cdot 10^3 \cdot \sqrt[6]{\frac{\kappa^2 \cdot \phi_D \cdot J_{DA}}{n^4}} \quad (\text{II.36})$$

Häufig wird die Effizienz  $E$  des Energietransfers, also das Verhältnis der vom Donor absorbierten zu den auf den Akzeptor strahlungslos übergehenden Photonen, bestimmt:

$$E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} = \frac{k_T}{\Gamma_D + k_T} \quad (\text{II.37})$$

Wie man mit Hilfe der Gleichungen (II.8), (II.9) und (II.11) ableiten kann, gilt somit für die Transfereffizienz  $E$ :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (\text{II.38})$$

Der Zusammenhang zwischen der Transfereffizienz  $E$  und dem Abstand  $r$  lässt sich mit Gleichung (II.36), (II.35) und  $\Gamma_D = \tau_D^{-1}$  ausdrücken über:

$$E = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} \quad (\text{II.39})$$

Abbildung II.10 zeigt die Abstandsabhängigkeit der Energietransfereffizienz  $E$  in Abhängigkeit des Förster-Abstandes  $R_0$ . Somit kann prinzipiell bei bekanntem Förster-Abstand mit Hilfe von Gleichung (II.39) der Abstand zwischen beiden Fluorophoren aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (für statische Messungen) bzw. aus dem Verhältnis der Lebenszeiten (für dynamische Messungen) bestimmt werden. Quantitativ auswertbar ist diese Methode jedoch nur für Donor-Akzeptor-Abstände zwischen  $0,5 \cdot R_0$  und  $1,5 \cdot R_0$ , weil sonst die Veränderungen des Energietransfers mit dem Abstand zu gering werden.

### *Relevanz bei Proteinfluoreszenzuntersuchungen*

Abgesehen von der gezielten Bestimmung von Abständen in Proteinen z.B. durch gezieltes Einbringen von extrinsischen Fluorophoren mit geeigneten Überlappungsintegralen spielt der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer eine wichtige Rolle bei der Untersuchung der intrinsischen Proteinfluoreszenz: Die drei aromatischen autofluoreszenten Aminosäuren

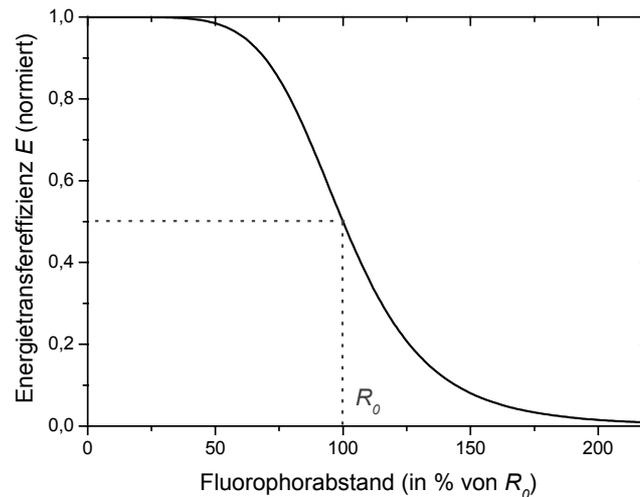


Abbildung II.10 – Energietransferereffizienz  $E$  des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers in Abhängigkeit des Förster-Abstandes  $R_0$ .

Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan besitzen z.T. Überlappungsintegrale, die bei geeigneter Orientierung und passendem Abstand im Protein Energietransfer zulassen. Dabei ist prinzipiell Energietransfer von Phenylalanin auf Tyrosin ( $R_0 = 11,5-13,5 \text{ \AA}$ ) und von Tyrosin auf Tryptophan ( $R_0 = 9-18 \text{ \AA}$ ) und auf Tyrosinat (kein Wert für  $R_0$  veröffentlicht) möglich. Es sollte jedoch auch erwähnt werden, dass Homo-Energietransfer zwischen identischen Aminosäuren für Tyrosin und für Tryptophan auftreten kann. Dabei betragen die Förster-Abstände für Tyrosin-Homo-Energietransfer  $R_0 = 9-16 \text{ \AA}$  und für den Energietransfer von Tryptophan auf Tryptophan  $R_0 = 4-16 \text{ \AA}$ . Die große Spanne an Förster-Abständen für Homo-Energietransfer für Tryptophan ist dabei auf die stark umgebungsabhängige Emission des jeweiligen Donor-Tryptophans zurückzuführen, die eine sehr starke Variabilität des Überlappungsintegrals bedingt. [24,72]

### c) *Bestimmung von Entfaltungsenthalpien*

Die Veränderungen in den Fluoreszenzintensitäten während der chemischen Denaturierung eines Proteins können dazu verwandt werden, die Freie Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_{H_2O}$  eines Proteins und somit seine Stabilität zu bestimmen.

Die Gleichgewichtskonstante  $K$  für die Entfaltungsreaktion der Proteins kann gemäß Pace *et al.* [103] durch den jeweiligen Fluoreszenzbeitrag  $I$  bei einer bestimmten Denaturantenkonzentration sowie den der reinen nativen bzw. entfalteten Komponente  $I_N$  und  $I_E$  ausgedrückt werden:

$$K = \frac{I_N - I}{I - I_E} \quad (\text{II.40})$$

Über die von der Konzentration am Denaturierungsmittel abhängige Gleichgewichtskonstante lässt sich die Freie Entfaltungs-Enthalpie  $\Delta G$  gemäß

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K \quad (\text{II.41})$$

bei der jeweiligen Temperatur  $T$  bestimmen. Somit können Werte für die Entfaltungsenthalpie für verschiedene Denaturantenkonzentrationen erhalten werden.

Informationen über die tatsächliche Stabilität des Proteins liefert die Entfaltungsenthalpie ohne chemische Hilfsmittel. Um diese zu bestimmen, wird eine Linearität zwischen den erhaltenen  $\Delta G$ -Werten und den jeweiligen korrespondierenden Denaturantenkonzentrationen angenommen und auf eine Konzentration von 0 M über

$$\Delta G = \Delta G_{H_2O} - m \cdot [\text{Denaturant}] \quad (\text{II.42})$$

extrapoliert, um die Freie Entfaltungs-Enthalpie  $\Delta G_{H_2O}$  in Abwesenheit des Denaturanten als y-Achsenabschnitt zu ermitteln. [103] Die Steigung  $m$  ist dabei ein Maß für die Wechselwirkung des jeweiligen Agens mit dem zu denaturierenden Protein und umso negativer, je besser die Denaturierung mit diesem Stoff erfolgt.

#### d) *Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von Dissoziationskonstanten*

Die Bildung eines Protein-Substrat-Komplexes kann mit Hilfe von fluoreszenzspektroskopischen Bindungsstudien beobachtet werden, wenn sich die Fluoreszenzintensität des Proteins während der Bindungsreaktion ändert.

Im Folgenden wird beschrieben, wie für eine einfache Bindung eines nicht-fluoreszierenden Substrates die Dissoziationskonstante  $K_d$  ermittelt werden kann. Die Gleichgewichtskonstante der Protein-Substratkomplexbildung ist durch die jeweiligen Konzentrationen im Gleichgewicht gegeben:

$$K_d = \frac{[\text{Protein}][\text{Substrat}]}{[\text{Protein} - \text{Substrat}]} = \frac{[P][S]}{[PS]} \quad (\text{II.43})$$

Da die Gesamtkonzentration an Protein und Substrat bei der Bindungskonzentration konstant ist, gilt  $[PS] + [P] = [P]_0$  und  $[PS] + [S] = [S]_0$ .

Somit lässt sich die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes formulieren als

$$K_d = \frac{([P]_0 - [PS]) \cdot ([S]_0 - [PS])}{[PS]} \quad (\text{II.44})$$

Löst man dies nach  $[PS]$  auf, erhält man eine physikalisch sinnvolle Lösung:

$$[PS] = \frac{[P]_0 + [S]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\frac{([P]_0 + [S]_0 + K_d)^2}{4} - [P]_0 \cdot [S]_0} \quad (\text{II.45})$$

Die Gesamt-Fluoreszenzintensität der Probe ist über zwei von der Apparatur und der Substanz abhängige Konstanten  $\alpha$  und  $\beta$  proportional zu den Konzentrationen des Proteins und des Protein-Substrat-Komplexes. Folglich lässt sich die Gesamtfluoreszenzintensität beschreiben als:

$$\begin{aligned} I &= \alpha \cdot [P] + \beta \cdot [PS] \\ &= \alpha \cdot ([P]_0 - [PS]) + \beta \cdot [PS] \\ &= \alpha \cdot [P]_0 + (\beta - \alpha) \cdot \left\{ \frac{[P]_0 + [S]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\frac{([P]_0 + [S]_0 + K_d)^2}{4} - [P]_0 \cdot [S]_0} \right\} \end{aligned} \quad (\text{II.46})$$

Für eine Messreihe mit verschiedenen Substratkonzentrationen können somit die Fluoreszenzparameter  $\alpha$  und  $\beta$  und die Dissoziationskonstante  $K_d$  über eine Anpassung der erhaltenen Veränderung der Fluoreszenzintensität an (II.46) bestimmt werden. Erforderlich dafür ist, dass die Ausgangskonzentrationen an Protein und Substrat ( $[P]_0$ ,  $[S]_0$ ) präzise bekannt sind.

### III. EXPERIMENTELLER AUFBAU UND DATENANALYSE

In diesem Kapitel werden die verwendeten Messapparaturen zur statischen und dynamischen Fluoreszenzanalytik und ihre einzelnen Komponenten vorgestellt. Des Weiteren werden die Bearbeitung der erhaltenen Rohdaten, die Auswertungsprogramme, die Kalibrierung der Daten und die Probenpräparation erläutert.

#### I. *Aufbau für Anregungs-Emissions-Spektroskopie*

Die Apparatur zur Aufnahme von Anregungs-Emissions-Spektren besteht aus einer Xenon-Lampe mit nachgeschaltetem Monochromator, einem Probenhalter und einer Detektionseinheit, die aus einem zweiten Monochromator mit Bildverstärker und CCD-Kamera besteht. Einen Überblick über die einzelnen Komponenten geben die Abbildung III.1 und Abbildung III.2. Auf die Funktion der einzelnen Geräte wird im Folgenden näher eingegangen.

##### a) *Anregung*

Als Lichtquelle wird eine kommerziell erhältliche, ozonfreie 75W-Xenon-Bogenlampe der Firma L.O.T Oriel (Modell 6263) verwendet, die im Bereich von 200 – 650 nm ein vorwiegend kontinuierliches Spektrum liefert. Die Lichtausbeute wird durch einen im Lampengehäuse angebrachten Rückreflektor erhöht und mit einem aus zwei Sammellinsen bestehenden Linsen Kondensator auf den Eintrittsspalt des rechnergesteuerten Anregungs-monochromators (SpectraPro-150 der Firma *Acton Research*) abgebildet. Die Dispersion des Lichtes erfolgt mit Hilfe eines Plangitters (2400 Linien/mm, Blazewellenlänge 240 nm). Das spektral zerlegte Licht wird daraufhin auf den Austrittsspalt des Monochromators fokussiert. An dieser Stelle beträgt die spektrale Dispersion des verwendeten Gitters laut Herstellerangaben 2,7 nm/mm. Durch die Wahl unterschiedlicher Spaltöffnungen (0-3 mm) können die spektrale Auflösung und die Intensität des Anregungslichtes variiert werden.

Die Fokussierung auf die Probe erfolgt mit Hilfe von zwei Hohlspiegeln. Im Gegensatz zu einer Fokussierung mittels einer Linse wird so eine auf chromatischen Aberrationen beruhende Verschiebung des Fokus bei verschiedenen Anregungswellenlängen vermieden.

##### b) *Probenhalterung*

Die Proben werden je nach Substanzmenge in  $5 \times 5 \text{ mm}^2$ - bzw.  $10 \times 10 \text{ mm}^2$ -Präzisionsküvetten der Firma Hellma (111.057-QS bzw. 111-QS) vermessen. Die speziell für beide Küvettengrößen gefertigten, austauschbaren Probenhalter befinden sich auf einem in drei Raumrichtungen verschiebbaren Tisch, um das effektive Probenvolumen in die zum

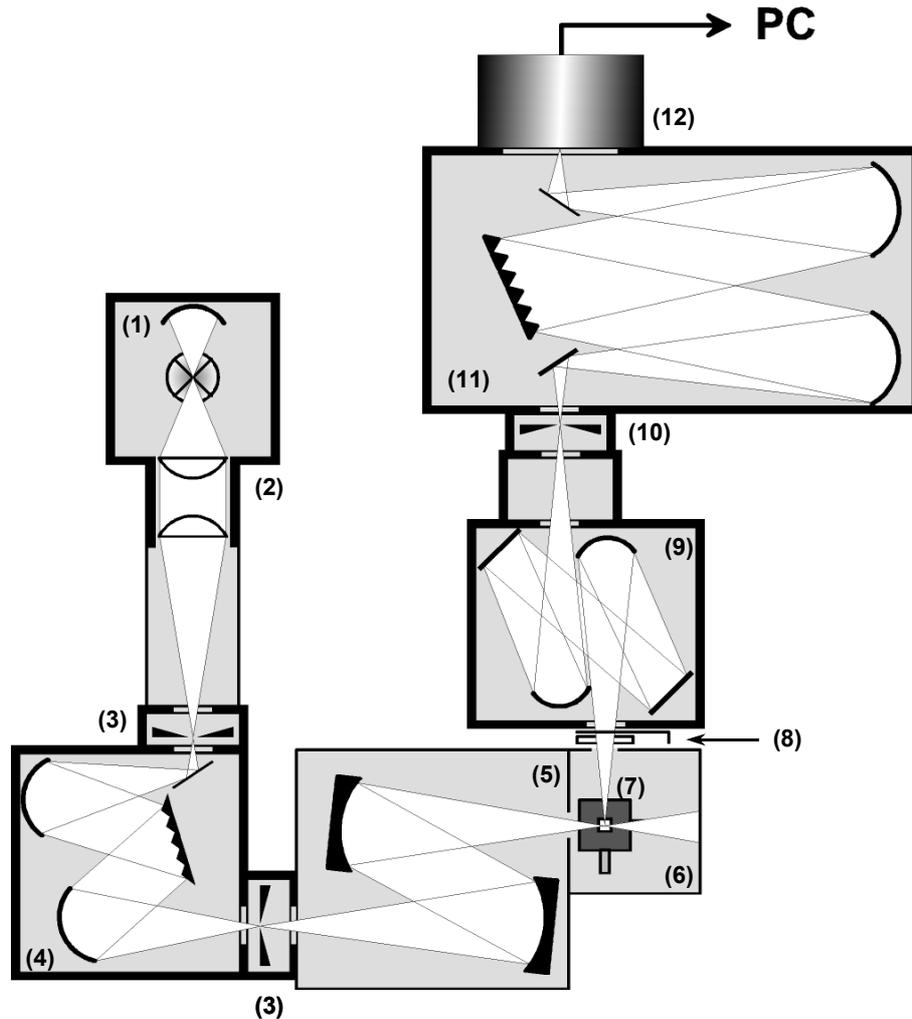


Abbildung III.1 – Schematischer Aufbau des Anregungs-Emissions-Spektrometers: Das Licht der Xenon-Lampe (1) wird mit Hilfe zweier Linsen (2) auf einen der Spalte (3) des Anregungsmonochromators (4) fokussiert, spektral dispergiert und dann mit einer Hohlspiegeloptik (5) in den im Probengehäuse (6) befindlichen Probenhalter mit Küvette (7) fokussiert. Bei geöffnetem Shutter (8) wird die emittierte Fluoreszenzstrahlung mit einer Spiegeloptik (9) auf den Eingangsspalt (10) des Detektionsmonochromators (11) fokussiert, der für die spektrale Aufspaltung des von der Kamera (12) detektierten Lichtes eingesetzt wird.

Detektionsmonochromator gewandte Ecke der Küvette zu legen. Auf diese Weise werden Absorptionsverluste für Anregungs- und Fluoreszenzlicht weitgehend vermieden.

Weiterhin kann durch Verschieben der Küvette in vertikaler Richtung der Einfluss durch unerwünschtes Streulicht durch den Meniskus der Probenlösung vermieden werden. Optional können die Probelösungen in den Küvetten thermostatisiert (Haake Thermostat DC50-K40) und im Fall der  $10 \times 10 \text{ mm}^2$ -Küvetten auch gerührt (VARIOMAG Magnetrührer,  $12 \times 12 \times 5 \text{ mm}^3$ ) werden.

Die Probe wird während der Messung von Streu- und Umgebungslicht abgeschirmt. Das dafür verwendete Gehäuse ist innen vollständig geschwärzt und besitzt nur die Öffnungen für anregendes und emittiertes Licht.

### c) Detektion

Die Detektion erfolgt im rechten Winkel zum eintretenden Lichtstrahl. Die chromatische Aufspaltung des emittierten Lichtes wird mit Hilfe eines Monochromators (SpectraPro-275 der Firma *Acton Research*) durchgeführt, der durch seine größeren Abmessungen im Vergleich zum Anregungsmonochromator genügend Raum für bis zu drei Gitter bietet, die je nach gewünschter Auflösung ausgewählt werden können. Das in dieser Arbeit ausschließlich verwendete Gitter ist ein für 300 nm geblatztes Gitter mit 300 Linien/mm (Dispersion 12 nm/mm), das zu einem Sichtbereich von 293 nm führt. Eine ergänzende, aus mehreren Spiegeln bestehende Eingangsoptik der Firma Sopra sorgt für eine stigmatische Korrektur des Bildes in der Austrittsebene des Monochromators, d.h. Orts- und Wellenlängenachse sind gleichzeitig scharf.

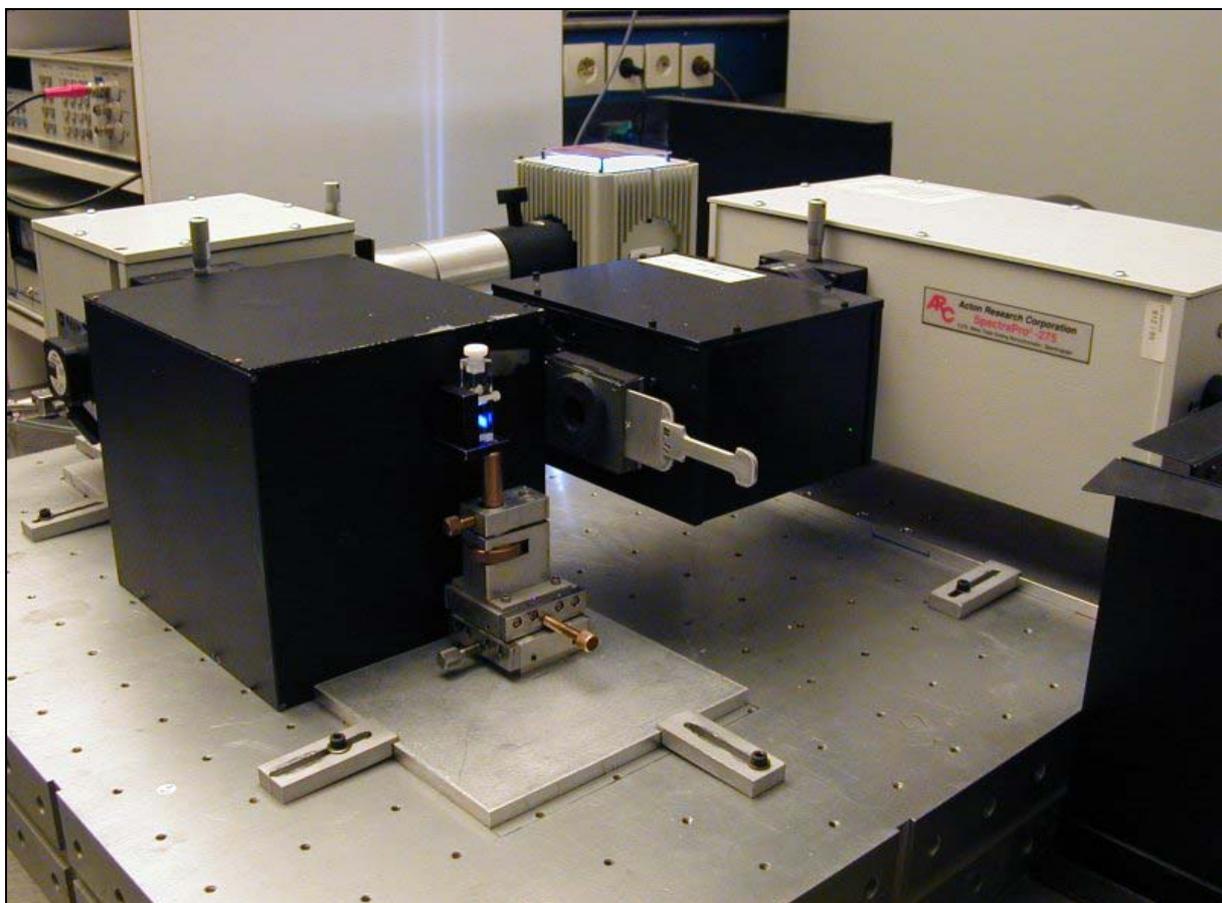


Abbildung III.2 – Foto des Anregungs-Emissions-Spektrometers ohne Probengehäuse.

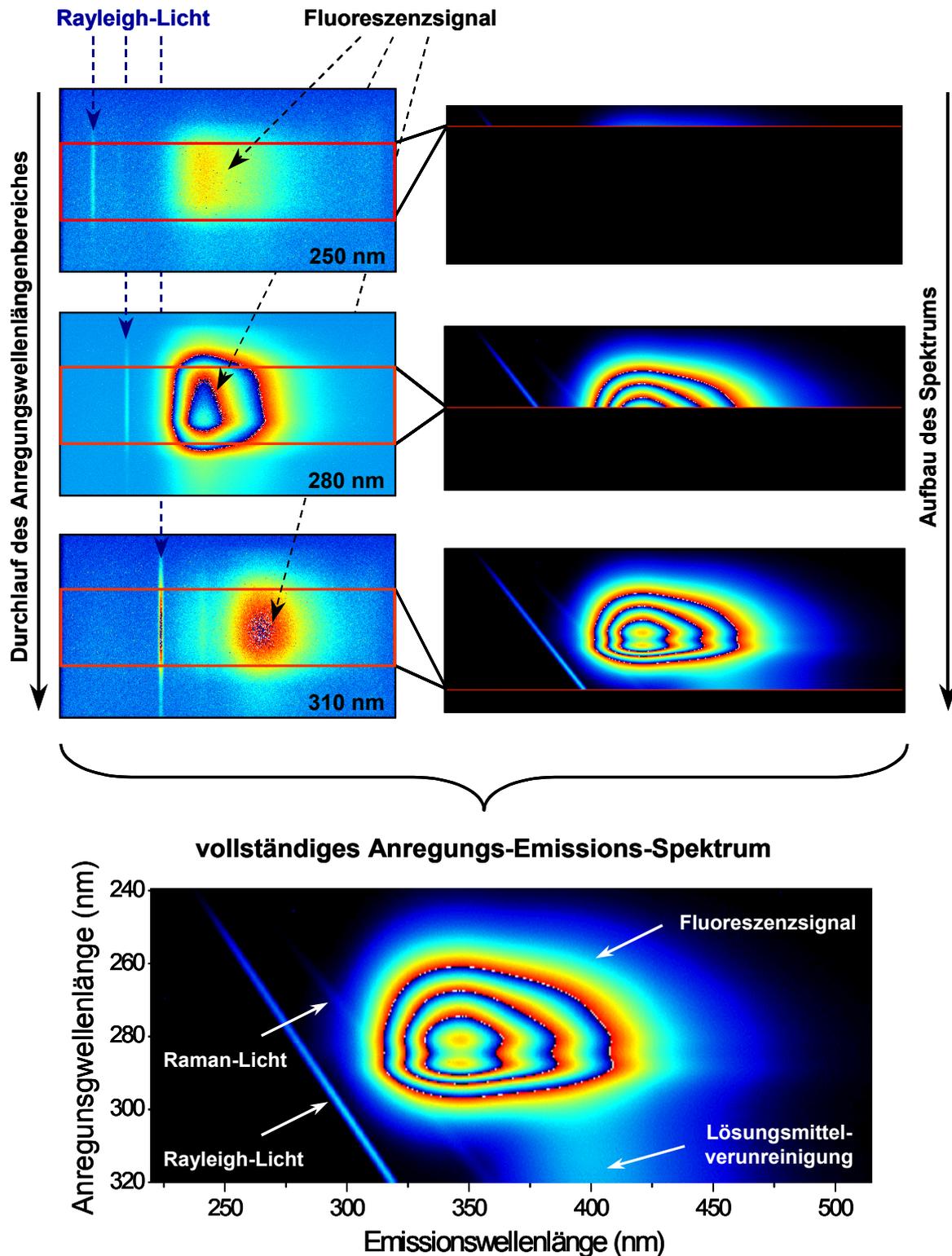


Abbildung III.3 – Erstellung eines Anregungs-Emissions-Spektrums von Tryptophan in wässriger Lösung aus vielen orts- und wellenlängenaufgelösten Emissionsspektren unterschiedlicher Anregungswellenlänge. In den erhaltenen Anregungs-Emissions-Spektren sind Streulichtanteile (Rayleigh- und Raman-Licht) aufgrund der linearen Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge deutlich von der Fluoreszenz zu unterscheiden. Ebenfalls aufgelöst wird die Fluoreszenz von zu sehr geringen Teilen im Lösungsmittel vorhandenen Verunreinigungen.

#### d) *Spektrenaufnahme*

Die rechnergesteuerte Spektrenaufnahme erfolgt mit Hilfe des Programms WinSpec32 der Firma Roper Scientific<sup>®</sup>, das für verschiedene Anregungswellenlängen orts- und wellenlängenaufgelöste Rohdatenbilder (in Abbildung III.3 links dargestellt) aufnimmt. Das Sichtfenster auf der Ortsachse beträgt dabei 6 mm und der von ihm erfasste Bereich in der Flüssigkeit lässt sich durch die vertikale Positionierung der Küvette variieren. Auf der Wellenlängenchse ist der Sichtbereich bei der Verwendung des 300 Linien/mm-Gitters 293 nm groß. Die in den Rohdatenbildern vorhandene Ortsauflösung ist üblicherweise unnötig. Somit kann, wie in Abbildung IV.1 gezeigt, über den Fluoreszenz zeigenden Ortsbereich integriert werden.

Anregungs-Emissions-Spektren sind dreidimensionale Spektren, die Lumineszenz- und Streulichtintensitäten in Abhängigkeit von sowohl der Anregungs- als auch der Emissionswellenlänge zeigen. Diese können aus den integrierten Emissionsspektren unterschiedlicher Anregungswellenlänge, wie in Abbildung III.3 rechts schematisch gezeigt, in WinSpec32 erzeugt werden: Während der rechnergesteuerte Anregungs-Monochromator den gewünschten Wellenlängenbereich abfährt, nimmt das Programm aus dem Rohdatenbild, das in y-Achsenrichtung keine wellenlängenaufgelöste Information enthält, horizontale Profile, mittelt diese und fügt sie in jeweils eine Bildzeile des während der Messung simultan aufgebauten Anregungs-Emissions-Spektrums ein.

Rohdatenbildaufnahme und Selektion der jeweiligen Anregungswellenlänge wird dabei mit dem Steuerprogramm AES-Control [104], das auf WinSpec32 und die Software der Monochromator-Steuerung zugreift, koordiniert. Typischerweise wird die Wellenlänge im relevanten Anregungsbereich in Inkrementen von 0,5 nm bzw. 1 nm variiert.

Im Gegensatz zu herkömmlichen reinen Anregungs- oder Emissionsspektren bieten Anregungs-Emissions-Spektren viele Vorzüge: Durch die dreidimensionale Darstellung der Daten lassen sich Streulichtphänomene aufgrund ihrer linearen Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge leicht von den *fingerprint*-artigen Lumineszenzbeiträgen der gelösten Stoffe separieren. Auch lassen sich strahlende Verunreinigungen leicht identifizieren. Des Weiteren können aus einem Anregungs-Emissions-Spektrum alle Anregungs- und alle Emissionsspektren in den betrachteten Wellenlängenbereichen extrahiert werden: Die Emissionsspektren bei einer bestimmten Anregungswellenlänge lassen sich durch einen an entsprechender Stelle gesetzten horizontalen Schnitt erhalten, wohingegen die Anregungsspektren aus vertikalen Profilen bei einer bestimmten Emissionswellenlänge zugänglich werden. Abbildung III.4 veranschaulicht dies.

#### e) *Spektrenbearbeitung*

Vor der Auswertung müssen die erhaltenen Spektren bearbeitet werden. Dies kann entweder direkt in WinSpec32 oder in dem benutzerfreundlicheren, speziell dafür erzeugten Programm AES-Eval [105] durchgeführt werden.

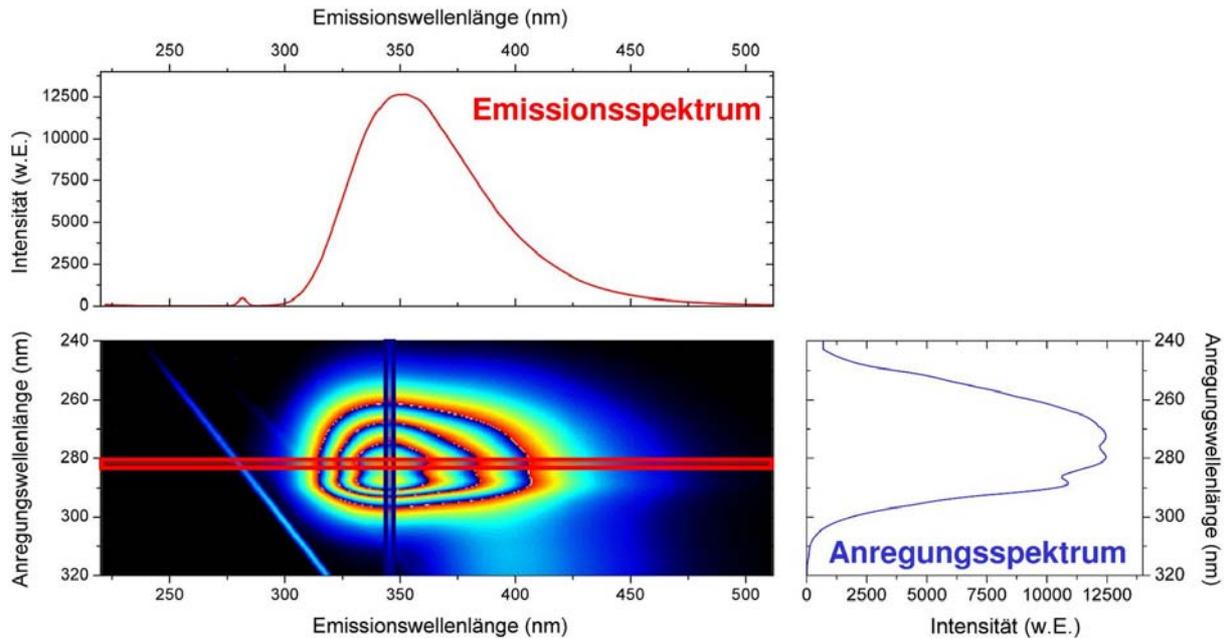


Abbildung III.4 – Aus den Anregungs-Emissions-Spektren können durch entsprechende Schnitte alle Anregungs- und alle Emissionsspektren in den betrachteten Wellenlängenintervallen erhalten werden.

Durch den Abzug eines unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Dunkelbildes werden zunächst der Dunkelstrom der Kamera und etwaiges Umgebungslicht eliminiert. Dann wird jeweils an die horizontale und die vertikale Achse des Anregungs-Emissions-Spektrums eine Skalierung angepasst, die den durchlaufenen Anregungswellenlängen-Bereich und in Abhängigkeit des verwendeten Gitters und dessen Einstellung den sichtbaren Emissionswellenlängen-Bereich wiedergibt. Schließlich muss die Wellenlängenabhängigkeit der verwendeten optischen Komponenten (wie z.B. der Xenon-Lampe, der Linsen im Lampengehäuse, der Gitter, der Kamera) berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wird sowohl das Anregungslicht als auch die Detektionseffizienz intensitätskalibriert. Die Erstellung der verwendeten Kalibrationsdatensätze wird in Kapitel III.III beschrieben.

## II. Aufbau für zeitaufgelöste Laserinduzierte Fluoreszenz

Der experimentelle Aufbau des Meßsystems ist in Abbildung III.5 schematisch dargestellt. Ein als Lichtquelle dienender Ti:Saphir-Laser erzeugt Pulse mit einer Pulsbreite von 80 ps, die energetisch nachverstärkt und frequenzverdreifacht werden, bevor sie in die Probe fokussiert werden. Das Emissionslicht wird um  $90^\circ$  zur Anregung versetzt mit Hilfe eines Systems aus Spektrometer, Streak-Kamera und CCD-Kamera gleichzeitig zeit- und wellenlängenaufgelöst detektiert.

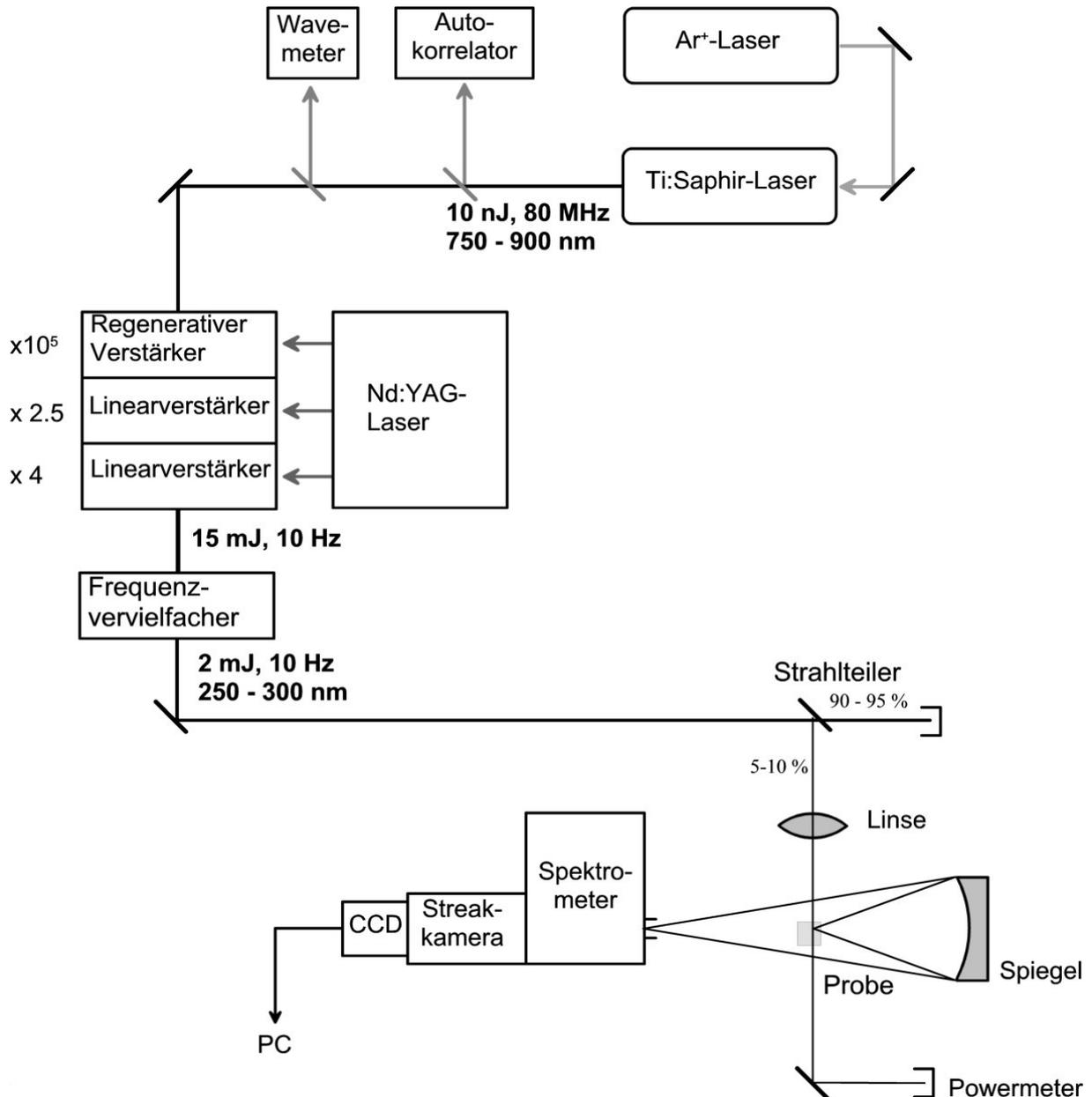


Abbildung III.5 – Schematischer Überblick über den Aufbau zur Untersuchung der zeitaufgelösten Laserinduzierten Fluoreszenz.

#### a) Der Titan:Saphir-Laser

Der verwendete Ti:Saphir-Laser (SpectraPhysics, Modell Tsunami) wird durch einen Argon-Ionen-Laser mit ca. 6 W Leistung gepumpt und erzeugt wahlweise ultrakurze Pulse von 3 oder 80 ps Pulsbreite.

Die Wellenlängenabstimmung und die Einstellung der zeitlichen Breite des Pulses erfolgt mit einem doppelbrechenden (*birefringent*) Filter und einem Gires-Tournois-Interferometer (GTI). Ersterer besteht aus drei planparallel angeordneten Quarzplatten, die im Brewster-

Winkel in der Laserkavität angeordnet sind. Nur ein kleiner Frequenzbereich der ursprünglich linear polarisierten Laseremission wird in seiner Polarisation um  $180^\circ$  gedreht und weiterverstärkt, während das restliche, elliptisch polarisierte Licht bei jeder Reflexion an den im Brewster-Winkel angeordneten Spiegeln an Intensität verliert. Die Wellenlängenselektion erfolgt also durch die Drehung der Quarzplatten. Das GTI ist ein modifiziertes Fabry-Perot-Etalon mit einem teildurchlässigen und einem hochreflektierenden Spiegel, dem Endspiegel der Laserkavität. Die longitudinale Modenselektion wird durch die Variation des Abstandes des Spiegels möglich. Der zeitliche Abstand der Pulse zueinander wird durch einen akustooptischen Mode-Locker definiert, mit dessen Hilfe eine Repetitionsrate der Laserpulse von 80 MHz erreicht wird.

Das zeitliche Pulsprofil wird mit einem Autokorrelator analysiert. Außerdem wird die Einstellung der Wellenlänge mit einem Zwei-Bereichs-*Wavemeter* der Firma Burleigh kontrolliert.

#### **b) Verstärkung und Frequenzverdreifachung**

Die durch den Ti:Saphir-Laser generierten Pulse haben eine Energie von einigen Nano-Joule und werden in einem dreistufigen Prozess nachverstärkt. Der regenerative Verstärker TSA-50 mit einer Verstärkung um den Faktor  $10^5$  und die beiden nachfolgenden Linearverstärker mit den Faktoren 2,5 und 4 sorgen für eine Verstärkung der Energie des Pulses auf 15-25 mJ. Die Verstärkung erfolgt in Ti:Saphir-Kristallen, die durch zwei gütegeschaltete und frequenzverdoppelte Nd:YAG-Laser mit einer Repetitionsrate von 10 Hz gepumpt werden.

Zur Anregung der Aminosäuren in Peptiden und Proteinen wird UV-Strahlung benötigt (vergleiche Abschnitt II.III.a). Diese wird mittels zweier Kaliumdihydrogenphosphatkristalle erzeugt. Im ersten Kristall erfolgt eine Frequenzverdopplung und im zweiten wird dann durch Mischung mit der Fundamentalen mit einer Effizienz von ca. 2% die dritte Harmonische erzeugt. Die so entstehende ultraviolette Strahlung hat eine Energie von 1,5 – 2 mJ pro Puls. Um die Proben nicht zu schädigen, wird nur ein Bruchteil von 5 – 10% über eine Quarzplatte als Strahlteiler direkt auf die Probe geleitet.

#### **c) Detektion**

Die Proben werden, ähnlich wie in Abschnitt III.I.b) beschrieben, in Küvetten vermessen. Der Unterschied bei der Detektion im Vergleich zum Anregungs-Emissions-Spektrometer ist, dass das Emissionslicht durch einen einzigen sphärischen Hohlspiegel ( $f = 250$  mm,  $d = 250$  mm) auf den Eintrittsspalt des Monochromators abgebildet wird. Ein Kantenfilter (WG320, 3 mm Stärke) verhindert das Eintreten von Streustrahlung in die Detektionseinheit. Die Wellenlängendispersion im Monochromator (baugleich zu dem Detektionsmonochromator der AES) erfolgt mit einem 150 Linien/mm-Gitter, das für 300 nm geblazt ist.

Die zeitliche Auflösung (Zeitbereiche von 0,5 bis 10 ns, verwendet wurde jedoch nur der längste Zeitbereich) der Emissionsstrahlung übernimmt eine *Streak*-Einheit (C2830, Hamamatsu), mit der sich das Signal in einem fünfstufigen Bereich verstärken lässt. Die

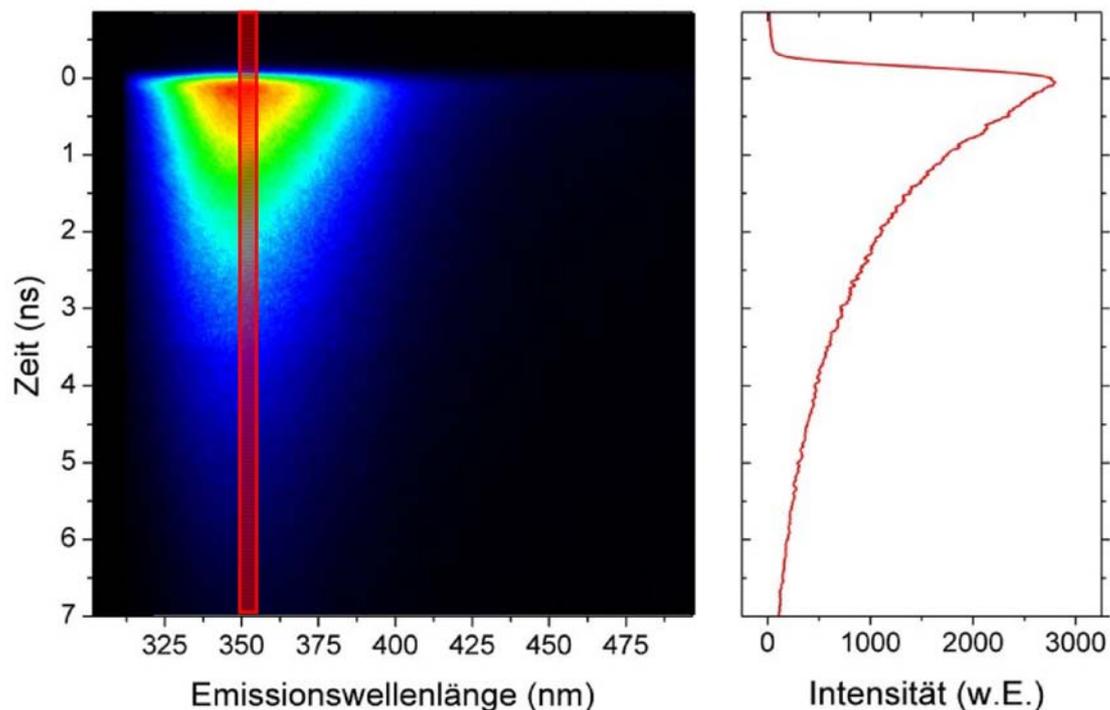


Abbildung III.6 – Zeit- und wellenlängenaufgelöstes Fluoreszenzspektrum von Tryptophan in wässriger Lösung. Ebenfalls dargestellt ist die Fluoreszenzabklingkurve von Tryptophan am Emissionsmaximum, entsprechend einem vertikalen Schnitt im zeit- und wellenlängenaufgelöstem Spektrum.

nachgeschaltete CCD-Kamera (C4880, Hamamatsu) nimmt dann ein gleichzeitig zeit- und wellenlängenauflösendes Bild auf, das auf einen Computer übertragen und mit dem Programm HPD-TA der Firma Hamamatsu ausgewertet wird. Man erhält ein Bild, das aus  $1000 \times 1018$  Einzelpunkten besteht und die Intensität in Abhängigkeit von Emissionswellenlänge und zeitlichem Versatz nach dem anregenden Puls farblich wiedergibt (vergleiche Abbildung III.6).

#### d) Datenbearbeitung und -auswertung

Auch die zeitaufgelösten Spektren müssen vor der Auswertung bearbeitet werden. Dies kann mit der dafür erstellten Auswertungs-Software WinImgeval [106] geschehen.

Wie bereits bei den Anregungs-Emissions-Spektren wird zunächst ein Dunkelbildabzug durchgeführt, um Einflüsse durch das Umgebungslicht und den Dunkelstrom der Kamera zu eliminieren. Nach Zuweisung der Zeit- und Wellenlängenskala wird dann eine Intensitätskalibration der Wellenlängenchse durchgeführt, da das verwendete Gitter im Monochromator und die Kamera selbst eine von der Wellenlänge abhängige Effizienz zeigen. Schließlich können Profile erstellt werden, die den zeitlichen Verlauf der Intensität bei einer Emissionswellenlänge als vertikale Schnitte durch das Spektrum wiedergeben („Fluoreszenzabklingkurven“, vgl. Abbildung III.6). Aus diesen zeitlichen Profilen kann mit

Hilfe des Programms WinImgeval [106] die Fluoreszenzlebenszeit ermittelt werden. In WinImgeval wird dabei eine numerische Rückfaltung des detektierten Fluoreszenzsignals, das das Faltungsprodukt aus dem Laserpuls und der Abklingkurve ist, durchgeführt. In dem Programm können dann an die entfalteten Daten je nach Vorgabe die Lebenszeiten für einen mono- bzw. biexponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität angepasst werden:

$$I(t) = I_0 \sum_i a_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (i = 1,2) \quad (\text{II.10})$$

Außerdem können die Fehlergrenzen über eine Fehleranalyse bestimmt werden. Bei einer Anpassung eines biexponentiellen Abfalls der Fluoreszenzintensität ist es oft von Interesse, statt zweier separater Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_i$  und ihrer jeweiligen Amplituden  $a_i$  eine gemittelte Lebenszeit anzugeben. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten, die Mittelung durchzuführen: gemittelte Lebenszeiten können einerseits über eine Mittelung der Intensitäten des jeweiligen Prozesses und andererseits über eine Mittelung der jeweiligen Amplituden berechnet werden. Die Amplituden-gemittelte Lebenszeit lässt sich über

$$\tau_{m-a} = \frac{\sum a_i \cdot \tau_i}{\sum a_i} \quad (\text{III.1})$$

bestimmen. Sie entspricht der Lebenszeit, die ein Fluorophor mit der gleichen statischen Fluoreszenzintensität, aber einem monoexponentiellen Abklingen der Fluoreszenz hätte. [107] Die Intensitäts-gemittelte Fluoreszenzlebenszeit, die sich über

$$\tau_{m-i} = \frac{\sum a_i \cdot \tau_i^2}{\sum a_i \cdot \tau_i} \quad (\text{III.2})$$

berechnen lässt, gibt dagegen die durchschnittliche Zeit an, die ein Fluorophor im angeregten Zustand verbringt. [24] Beide gemittelte Lebenszeiten liefern somit unterschiedliche Informationen. Es lässt sich zeigen, dass die Amplituden-gemittelte Lebenszeit für alle dynamischen Fluoreszenzuntersuchungen mit Ausnahme der Bestimmung der bimolekularen Quenchkonstante  $k_q$  aus der Stern-Volmer-Konstante  $K_D$  (vgl. Abschnitt II.I.c) am besten geeignet ist. [107] Für die Bestimmung von  $k_q$  sollte dagegen die Intensitäts-gemittelte Lebenszeit verwendet werden.

Neben der zeitlichen Fluoreszenzveränderungen können natürlich auch die spektralen Profile zu einem Zeitpunkt als horizontale Schnitte aus den zeit- und wellenlängenaufgelösten Spektren ermittelt werden. Für ein horizontales Profil über den gesamten zeitlichen Bereich erhält man dabei das statische Emissionsspektrum des jeweiligen Fluorophors bei der selektierten Anregungswellenlänge (vgl. Abbildung III.4).

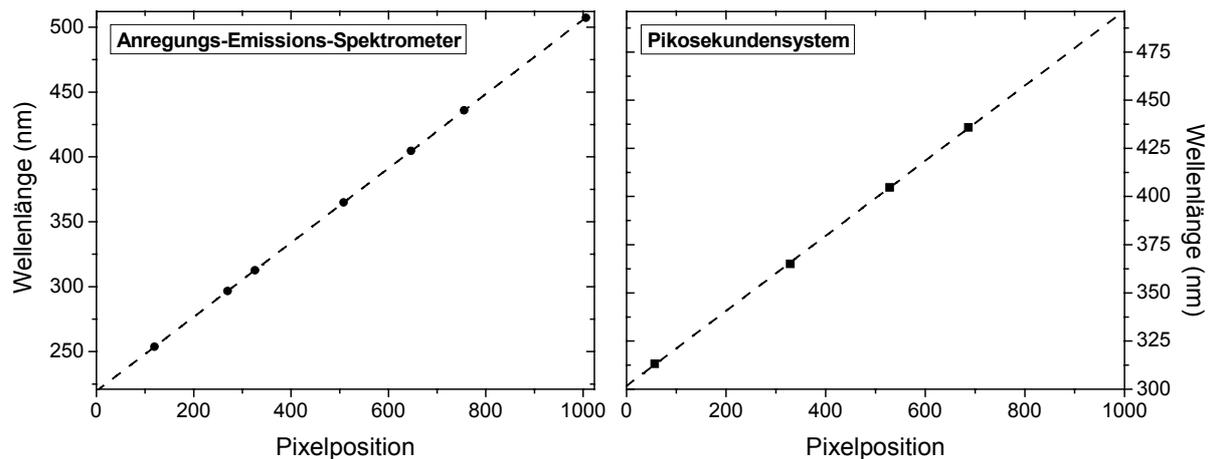


Abbildung III.7 – Pixel-Wellenlängen-Zuordnung der Quecksilberlinien für das 300 Linien/mm-Gitter bei einer Einstellung von 350 nm (Anregungs-Emissions-Spektrometer) bzw. für das 150 Linien/mm-Gitter bei einer Einstellung von 419 nm (Pikosekundensystem). [108] Die Korrelationskoeffizienten  $R$  für die lineare Anpassungen betragen 1,0000 bzw. 0,9995.

### III. Kalibration

In diesem Abschnitt werden die durchgeführten Kalibrationen an den Anregungs-Emissions-Spektren und den zeit- und wellenlängenaufgelösten Fluoreszenzspektren beschrieben, mit denen erst eine quantitative Auswertung der Daten ermöglicht wird. Es handelt sich dabei um die Bestimmung des spektralen Sichtfensters sowie dessen Wellenlängenauflösung, die Eichung der Detektionseffizienzen und (nur für die Anregungs-Emissions-Spektren) die Kalibration der Anregungslichtintensität.

#### a) Die spektrale Auflösung

Für die Bestimmung des Auflösungsvermögens der beiden Kameras wurde eine Quecksilberlampe verwendet, die an der Stelle des jeweiligen Probenhalters positioniert wurde. Ihr Linienspektrum wurde bei der gleichen Emissionswellenlängeneinstellungen wie bei den durchgeführten Experimenten als Datenbild aufgenommen. An die erhaltenen Quecksilberlinien wurden zu einer genauen Bestimmung ihrer Maxima Gaußfunktionen angepasst und über die Literaturwerte [108] Wellenlängen zugeordnet. Eine lineare Regression (vgl. Abbildung III.7) ergab dann die Wellenlänge in Abhängigkeit von der horizontalen Pixelposition auf dem Kamerachip.

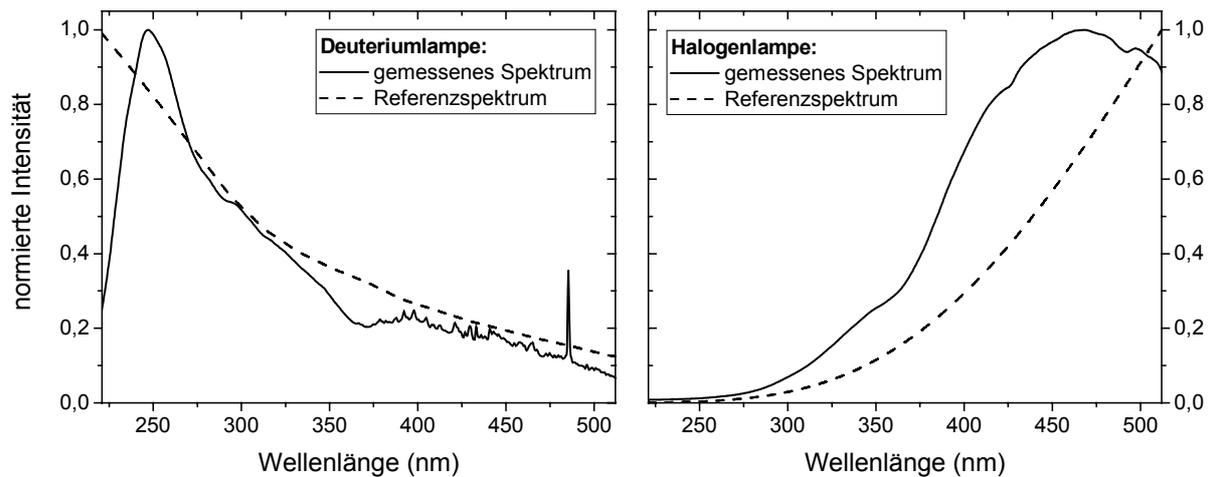


Abbildung III.8 – Vergleich der mit dem Anregungs-Emissions-Spektrometer gemessenen Spektren der Deuterium- und der Halogenlampe im Vergleich mit ihren Referenzspektren.

Für das 300 Linien/mm-Gitter im Monochromator des Anregungs-Emissions-Spektrometers erhält man somit für eine Einstellung von 350 nm für die Konversion der Pixelposition auf dem Kamerachip in die Wellenlänge:

$$\text{Wellenlänge (nm)} = 219,44 + 0,286 \cdot \text{Pixelposition} \quad (\text{III.3})$$

Für die spektrale Aufspaltung durch das 150-Linien/mm-Gitter im Monochromator vor der Streak-Kamera erhält man für die Konversion von Pixelposition in Emissionswellenlänge für die zeit- und wellenlängenaufgelösten Spektren bei einer Einstellung von 419 nm:

$$\text{Wellenlänge (nm)} = 301,66 + 0,195 \cdot \text{Pixelposition} \quad (\text{III.4})$$

#### b) Kalibration der Detektionseffizienz

Die Detektionseffizienzen der beiden verwendeten Systeme hängen ab von den jeweiligen Effizienzen der CCD-Chips der detektierenden Kameras sowie von den Wellenlängenabhängigkeiten der verwendeten optischen Bauteile, wie z.B. der Linsen und Gitter. Aus diesem Grund müssen die detektierten Intensitäten kalibriert werden. Dazu werden zwei Lampen verwendet, eine Halogen- und eine Deuteriumlampe. Einander ergänzend zeigen diese beiden Lampen über einen großen Wellenlängenbereich eine kontinuierliche Emission: Die Deuteriumlampe zeigt im UV-Bereich ein kontinuierliches Spektrum, geht jedoch bei größeren Wellenlängen (ab 375 nm) in ein nicht brauchbares Bandenspektrum über (vgl. Abbildung III.8). Das Spektrum der Halogenlampe lässt sich dagegen durch die Schwarzkörperstrahlung bei einer Temperatur von 3200 K beschreiben und zeigt somit ein durchgängig kontinuierliches Spektrum, das bei kleinen Wellenlängen zunächst eine sehr geringe Intensität aufweist, die dann aber für größere Wellenlängen zunimmt.

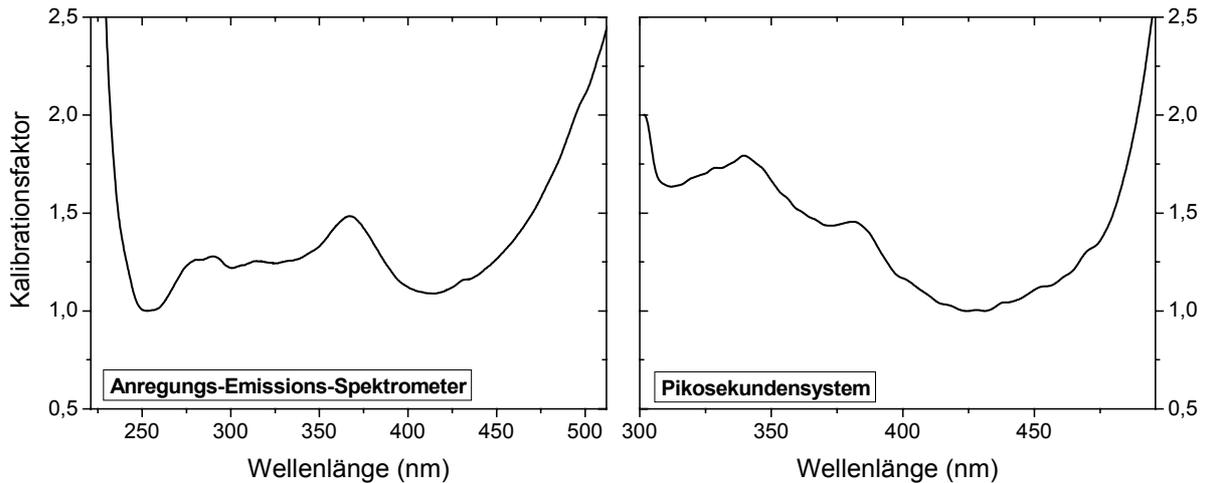


Abbildung III.9 – Vergleich der Kalibrationsdatensätze für die in Abbildung III.7 angegebenen Gittereinstellungen der Detektionsmonochromatoren des Anregungs-Emissions-Spektrometers und des Pikosekundensystems.

Über den Vergleich der Referenzspektren der beiden Lampen mit den detektierten Spektren können somit Kalibrationsdatensätze (Abbildung III.9) für beide Messaufbauten erhalten werden, mit denen die erhaltenen Spektren zur Korrektur der Detektionseffizienz multipliziert werden müssen.

### c) Kalibration der Anregungsintensität der AES

Die Intensität des Anregungslichtes des Anregungs-Emissions-Spektrometers ist nicht konstant und wird durch das Spektrum der Xenon-Lampe, die wellenlängenabhängige Fokusverschiebung im Linsen Kondensator und das Gitter im Anregungsmonochromator bestimmt. Die deswegen erforderliche Kalibration der Anregungslicht-Intensität  $I_0$  erfolgt mit Hilfe der bekannten  $\lambda^{-4}$ -Abhängigkeit für die Rayleigh-Streulichtintensität  $I$ :

$$I = I_0 \cdot \frac{8\pi^4 N\alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (\text{III.5})$$

Als Konstanten geht neben der Polarisierbarkeit  $\alpha$ , der Entfernung von dem Streuer  $R$  und dem Streuwinkel  $\theta$  auch die Teilchenzahl  $N$  der streuenden Teilchen ein. Um letztere und daraus resultierend auch die Intensität der detektierten Streustrahlung zu erhöhen, wurde als Streuer nicht Luft, sondern (flüssiges) Wasser verwendet. Dazu wurden für den gesamten betrachteten Anregungsbereich Streulichtspektren von filtriertem Wasser aufgenommen und auf Wellenlänge und Detektionseffizienz kalibriert. An die erhaltenen Streulichtsignale wurden Gaußfunktionen angepasst, deren Integrale proportional zur Intensität des gemessenen Streulichtes sind. Über den in Gleichung (III.5) gegebenen Zusammenhang lässt sich die

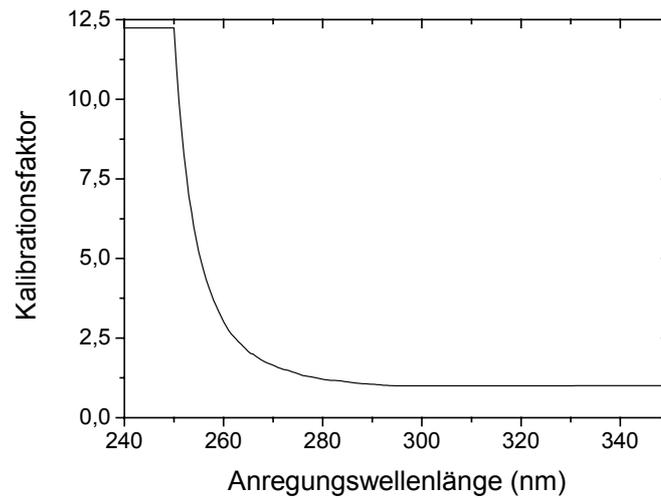


Abbildung III.10 – Kalibrationsdatensatz für das Anregungslicht des Anregungs-Emissions-Spektrometers.

Anregungslichtintensität aus den jeweiligen Streulichtspektren bestimmen und das Anregungslicht auf einen konstanten Wert kalibrieren.

Einen beispielhaft ausgewählten Kalibrationsdatensatz für das Anregungslicht zeigt Abbildung III.10. Alle Datensätze wurden auf einen Minimalwert von eins normiert. Überschritt der jeweilige bestimmte Kalibrationsfaktor einen Wert von ungefähr 12, wurden alle höheren Werte auf den letzten zulässigen Wert gesetzt. Somit wird ein unnötiges Verstärken des Kamerarauschens unterbunden. Die Spektren können in diesem Bereich jedoch nicht mehr quantitativ ausgewertet werden.

#### **IV. Absorption**

Absorptionsspektren der untersuchten Substanzen werden mit einem UV/VIS-Doppelstrahlspektrometer der Firma Kontron Analytik (Uvikon 860) aufgezeichnet. Die durchgeführten Messungen werden mit einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 100 nm/Minute mit Messintervallen von 0,25 bzw. 0,50 nm durchgeführt. Als Lichtquellen dienen zwei Lampen: Im Wellenlängenbereich von 200 bis 340 nm wird eine Deuteriumlampe verwendet. Von 340 bis 700 nm wird mit einer Quarz-Halogenlampe angeregt. Alle Messungen werden im Zweistrahlmodus mit Baselinekorrektur durchgeführt. Als Referenz dient dabei das jeweilige Lösungsmittel bzw. der jeweilige Puffer. Als Küvetten werden verschiedene Hellma-Präzisions-Küvetten aus Suprasil<sup>®</sup> verwendet.

Zur Bestimmung der Konzentrationen der Lösungen von Tryptophan und den Analoga dienen die in Tabelle III.1 angegebenen Extinktionskoeffizienten. Mögliche Änderungen des Extinktionskoeffizienten mit dem Lösungsmittel werden dabei vernachlässigt.

Zur Überprüfung der Konzentrationen der Proteinlösungen werden die Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm

( $\epsilon_{280}(\text{Trp}) = 5500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{280}(\text{Tyr}) = 1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) mit ihrem Vorkommen ( $N_{\text{Trp}}$ ,  $N_{\text{Tyr}}$ ) im Protein gewichtet und daraus der Extinktionskoeffizient des Proteins berechnet. Kommen des Weiteren auch Disulfidbrücken im Protein vor, ist deren Absorption nach Pace *et al.* [109] ( $\epsilon_{280}(\text{S-S}) = 125 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) bei der Berechnung des Extinktionskoeffizienten ebenfalls zu berücksichtigen:

$$\epsilon_{280}(\text{Protein}) = N_{\text{Trp}} \cdot \epsilon_{280}(\text{Trp}) + N_{\text{Tyr}} \cdot \epsilon_{280}(\text{Tyr}) + N_{\text{S-S}} \cdot \epsilon_{280}(\text{S-S}) \quad (\text{III.6})$$

## V. Probenpräparation

In diesem Kapitel wird die Probenpräparation und die Zusammensetzungen der Puffersubstanzen beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle kommerziell erhältlichen Substanzen in *p.A.*-Qualität verwendet. Alle wässrigen Lösungen wurden in tridest. H<sub>2</sub>O angesetzt.

### a) Tryptophan und Tryptophan-Analoga

Um geringe Mengen an Lösungen einheitlicher Konzentration ohne starke Wiegefehler herzustellen, wurden für Tryptophan und die Tryptophan-Analoga jeweils 10 ml 1 mM ethanolischer Stammlösungen hergestellt. Von den Stammlösungen wurden 75  $\mu\text{l}$  abgenommen und in ein 2 ml-Eppendorfgefäß gegeben, das zum Abdampfen des Lösungsmittels in einen temperierbaren Schüttler (maximal 55°C; Eppendorf, Thermomixer comfort) gestellt wurde. Der Rückstand wurde in 1,5 ml des jeweiligen Lösungsmittels aufgenommen, so dass die Lösungen unter Annahme vollständiger Löslichkeit eine Fluorophor-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  hatten. Bei den verwendeten Lösungsmitteln handelte es sich um Wasser und die Alkohole Methanol, Ethanol, *n*-Propanol, *iso*-Propanol, *n*-Butanol, *n*-Hexanol, *n*-Heptanol, *n*-Octanol, *n*-Nonanol und *n*-Decanol.

### Quenching-Untersuchungen

Zur gezielten Untersuchung des Quenchings der Tryptophan-Analoga durch Acrylamid, Cäsium (Cs<sup>+</sup>) und Iodid (I<sup>-</sup>) wurden wässrige Lösungen präpariert, die jeweils eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  des Fluorophors besaßen. Durch Verdünnen entsprechender Fluorophorlösungen mit und ohne 200 mM Quencherzusatz konnten so 50  $\mu\text{M}$  Fluorophorlösungen mit Quencherkonzentration zwischen 0 und 200 mM hergestellt werden. Bei den ionischen Quenchern wurde eine konstante Gesamtsalzkonzentration von 200 mM durch Verwendung entsprechender Kaliumchlorid-haltiger Fluorophorstammlösungen aufrecht erhalten. Um eine Oxidation des Iodids zu verhindern, wurden die Iodid-haltigen Lösungen mit 0,005 M Natriumthiosulfat versetzt.

<b>Analogon</b>	$\lambda / nm$	$\varepsilon / M^{-1} cm^{-1}$	<b>Literaturnachweis</b>
Tryptophan	280	5500	[109]
5-Hydroxytryptophan	280	4800	[110]
5-Methoxytryptophan	280	5140	[94]
5-Methyltryptophan	276	6120	[111]
5-Fluorotryptophan	280	5400	[110]
5-Bromotryptophan	280	5400	-
6-Fluorotryptophan	280	4900	[110]
7-Azatriptophan	290	6720	[111]

Tabelle III.1 – Verwendete Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  bei der jeweiligen Anregungswellenlänge  $\lambda$  für Tryptophan und die Tryptophan-Analoga.

#### *b) 2-Cystein Peroxiredoxin*

Die 2-Cystein Peroxiredoxin-Proben und die entsprechenden Mutanten lagen in Konzentrationen zwischen 18,2  $\mu M$  und 40,5  $\mu M$  (entsprechend 0,45 - 1,00 mg/ml) vor. Fluoreszenzspektroskopisch untersucht wurden Proben mit Konzentrationen zwischen 10  $\mu M$  und 20  $\mu M$ , die entsprechend mit einem 40 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,0) verdünnt wurden. Zur Reduktion der Proteinproben wurde eine Konzentration von 10 mM Dithiothreitol (DTT) verwendet.

#### *Quenching-Untersuchungen*

Die gezielten Fluoreszenz-Quenching-Untersuchungen an 2-Cystein Peroxiredoxin und seinen Mutanten wurden in Titrationsreihen durchgeführt. Bei diesen wurde zu den Proteinlösungen mit einer Ausgangskonzentration von 18,2 - 20  $\mu M$  und 300  $\mu l$  Ausgangsvolumen schrittweise zwischen 10 und 150  $\mu l$  einer 1 M Quencherlösung gegeben und gut durchmischt. Im Zuge der Titration verringerte sich die Proteinkonzentration auf bis zu 7,3  $\mu M$  und die maximale Quencherkonzentration betrug 0,83 M. Nach jeder Quencherzugabe wurde einige Minuten gewartet, um ein im Gleichgewicht befindliches System zu untersuchen.

Um bei Zugabe von Lösungen ionischer Quencher eine konstante Ionenstärke aufrecht zu erhalten, wurden Ausgangslösungen des Proteins mit einer entsprechenden Menge an Kaliumchlorid versetzt, so dass die Gesamt-Salzkonzentration bei der Messung immer 1 M betrug. Die Iodid-Quencherlösung wurde außerdem mit 0,005 M Natriumthiosulfat versetzt, um eine Oxidation des Iodids zu verhindern.

### c) *Das Manganstabilisierende Protein (MSP)*

Die erhaltenen MSP-Stammlösungen hatten eine Konzentration von 135  $\mu\text{M}$ . Fluoreszenzspektroskopisch untersucht wurden Proben mit Proteinkonzentrationen zwischen 15 und 25  $\mu\text{M}$ . Die entsprechenden Konzentration wurden über Verdünnen mit einem MES-Puffer (25 mM MES, 10 mM NaCl, pH-Wert 6,5) erhalten. Für die Reduktion von MSP wurde eine Konzentration von 10 mM Dithiothreitol verwendet.

#### *Quenching-Untersuchungen*

Gezielte Fluoreszenz-Quenching-Untersuchungen wurden in Titrationsreihen durchgeführt. Bei diesen wurde zu den Proteinlösungen mit einer Ausgangskonzentration von 15  $\mu\text{M}$  und einem Ausgangsvolumen von 1 ml (in den  $1 \times 1 \text{ cm}^2$ -Küvetten kann so gerührt werden) schrittweise zwischen 20 und 300  $\mu\text{l}$  einer 2 M Quencherlösung gegeben. Im Zuge der Titration verringerte sich die Proteinkonzentration auf bis zu 7,3  $\mu\text{M}$  und die maximale Quencherkonzentration betrug 1 M.

Wie bereits bei den Quenching-Untersuchungen am 2-Cystein Peroxiredoxin und an den Tryptophan-Analoga wurden die Messungen bei einer konstanten Gesamt-Salzkonzentration durchgeführt. Die Iodidlösung enthielt ebenfalls 0,005 M Natriumthiosulfat.

#### *Denaturierungsstudien*

Die Denaturierungsstudien wurden ebenfalls als Titrationsreihe durchgeführt. Für diese wurden 9 M Harnstoff- bzw. Guanidinium-Hydrochlorid-Lösungen schrittweise zu 750  $\mu\text{l}$  einer 10  $\mu\text{M}$  MSP-Lösung gegeben, bis eine finale Denaturantenkonzentration von 7 M erreicht wurde. Die Proteinkonzentration betrug dann noch 2,2  $\mu\text{M}$ .

#### *Ionenbindungsstudien*

Statische und dynamische Fluoreszenzuntersuchungen zur Ionenbindung des MSP wurde mit 10  $\mu\text{M}$  MSP-Lösungen, die mit 2 mM Salz des entsprechenden Ions inkubiert wurden, durchgeführt. Die Studien zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Ion-MSP-Komplexe wurden mit 50 mM Salzlösungen in Titrationsreihen durchgeführt. Die Konzentration von MSP verdünnte sich im Zuge der Messung von 15  $\mu\text{M}$  auf 12  $\mu\text{M}$ . Es wurden maximale Salzkonzentrationen von 10 mM erreicht. Wurde kein Effekt beobachtet, wurde die Konzentration des Salzes auf bis zu 60 mM erhöht (MSP: 7,9  $\mu\text{M}$ ), um eine Bindung bei höheren Salzkonzentrationen auszuschließen.

Für die Untersuchung der zeitlichen Fluoreszenzänderung von MSP (15  $\mu\text{M}$ ) bei der Inkubation mit verschiedenen Salzen wurden Proben präpariert, die nach Zugabe eine Salzkonzentration von 50 mM besaßen.



## IV. TRYPTOPHANFLUORESCENZ IN WÄSSRIGER LÖSUNG

### I. Fragestellung

Als Referenzstandard für die Untersuchungen der lösungsmittelabhängigen Fluoreszenz von Tryptophan bzw. seinen Analoga und für Studien der Tryptophanfluoreszenz in Proteinen wird die reine Aminosäure Tryptophan in wässriger Lösung verwendet. Tryptophan wird in den meisten Veröffentlichungen (vgl. z.B. bei Untersuchungen des Fluoreszenz-Quenchings [24,112,113]) und seit langer Zeit [114,115] als Referenz für Fluoreszenzuntersuchungen angewandt. Ein alternativer Standard wäre das Tryptophanderivat N-Acetyl-Tryptophanamid (NATA). Vorteile für die Verwendung von NATA sind, dass es im Gegensatz zu Tryptophan bei neutralem pH-Wert nicht zwitterionisch vorliegen kann, da die Acetyl- bzw. Aminogruppe von NATA acetyliert bzw. amidiert ist. Deswegen wird die elektronische Struktur des Indolrings im angeregten Zustand und somit die Fluoreszenz aus selbigem durch geladene Seitenketten bei NATA nicht beeinflusst. Die Fluoreszenz von NATA sollte deswegen besser als die von Tryptophan in wässriger Lösung geeignet sein, um Tryptophanfluoreszenz in Proteinen zu verstehen. Für die Untersuchung der lösungsmittelabhängigen Fluoreszenz der Tryptophan-Analoga, die nicht amidiert und acetyliert erworben werden können, ist NATA als Referenz jedoch nicht von Nutzen. Aus diesem Grund wurde Tryptophan als einheitlicher Standard gewählt.

In diesem Kapitel sind die Fluoreszenzeigenschaften von Tryptophan in wässriger Lösung (tridestilliertes Wasser, pH 7) zusammengestellt. Diese sollen als Basis für die Interpretation der in den folgenden Kapiteln vorgestellten Daten dienen. Zunächst werden die über statische Methoden ermittelten Fluoreszenzparameter von Tryptophan in wässriger Lösung vorgestellt. Dann wird das Abklingen der Fluoreszenz von Tryptophan in wässriger Lösung und die daraus ermittelten Fluoreszenzlebenszeiten erläutert. Schließlich wird auf Quenching-Untersuchungen an Tryptophan in wässriger Lösung mit den Fluoreszenzlöschern Acrylamid, Iodid und Cäsium eingegangen.

### II. Charakteristika des statischen Spektrums

Im Folgenden werden zunächst die statischen Fluoreszenzparameter von Tryptophan in wässriger Lösung betrachtet, die aus dem in Abbildung III.4 dargestellten Anregungs-Emissions-Spektrum von Tryptophan erhalten wurden. Dabei wird auf die Lage des Anregungs- und Emissionsmaximums, die Beschreibung des Spektrums als eine Lognormal-Verteilung, die Quantenausbeute, die Halbwertsbreite der Emission (FWHM, *full width at half maximum*) und den Stokes Shift eingegangen.

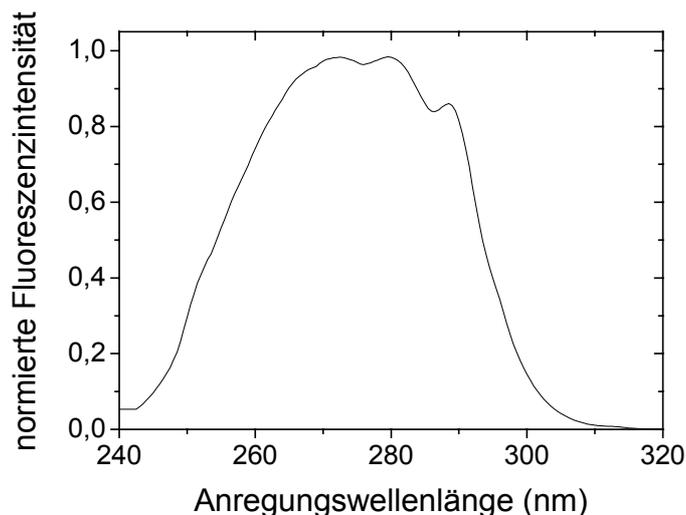


Abbildung IV.1 – normiertes Anregungsspektrum von Tryptophan für einen Emissionswellenlängenbereich von 340-360 nm.

#### a) Anregungsmaximum

Abbildung IV.1 zeigt das Anregungsspektrum von Tryptophan in wässriger Lösung. Dieses zeigt im Einklang mit dem Absorptionsspektrum von Tryptophan (hier nicht dargestellt) und weiteren Veröffentlichungen eine strukturierte Form mit einem Anregungsmaximum bei 280 nm und zwei dazu rot bzw. blau verschobenen Schultern bei 272 und 288 nm. [72,114]

Die strukturierte Form des Absorptionsspektrums und daraus resultierend auch die des Anregungsspektrums ist dabei unter anderem auf die Anregung von Tryptophan in zwei Zustände zurückzuführen. [38] Diese werden gemäß der Platt'schen Nomenklatur in Analogie zu ähnlichen Zuständen in substituierten Benzolen und kondensierten Aromaten als  $^1L_a$  und  $^1L_b$  bezeichnet. [116] Der  $^1L_a$ -Zustand weist dabei im Gegensatz zu  $^1L_b$  ein wesentlich größeres Dipolmoment auf und bedingt dadurch die hohe Umgebungssensitivität der Tryptophanfluoreszenz: Durch Lösungsmittel-Relaxation nach direkter Anregung in  $^1L_a$  oder nach *internal conversion* bei Anregung in  $^1L_b$  wird der  $^1L_a$ -Zustand in Abhängigkeit der Umgebungspolarität energetisch abgesenkt und verringert so die energetische Differenz zum Grundzustand. [38] Die nach der Relaxation emittierte Fluoreszenzstrahlung ist deswegen stark von der Umgebungspolarität abhängig (vergleiche Abschnitt II.II.a).

In Proteinen ist  $^1L_a$  aufgrund der energetischen Absenkung durch Relaxationsvorgänge meist auch der emittierende Zustand. Fluoreszenz aus dem  $^1L_b$ -Zustand wird nur für Proteine mit einer sehr stark blau verschobenen Emission von Tryptophan wie z.B. Azurin diskutiert. [117]

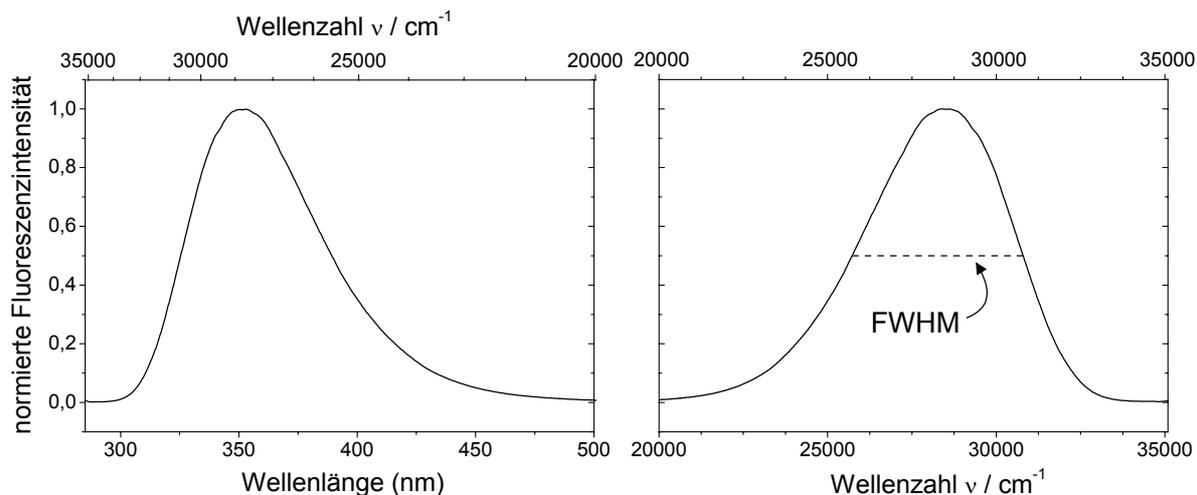


Abbildung IV.2 – Emissionsspektren von Tryptophan bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm. Um die Nicht-Linearität zwischen Wellenlänge- und Wellenzahl-Skalen zu verdeutlichen, wird das Emissionsspektrum für beide Skalen dargestellt. Ebenfalls dargestellt ist die Halbwertsbreite der Emission (FWHM), die aus den Spektren für die Wellenzahl-Skala ermittelt wird.

### b) Emissionsmaximum

Das Emissionsspektrum von Tryptophan in wässriger Lösung in Wellenlängen- und Wellenzahl-Darstellung ist in Abbildung IV.2 gezeigt. Im Gegensatz zu dem Anregungsspektrum ist in dem Emissionsspektrum keine Strukturierung der Emission zu beobachten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Emission der Fluorophore in Lösung aufgrund der Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel inhomogener Verbreiterung unterliegt. [24] Das Emissionsmaximum des dargestellten Fluoreszenzspektrums befindet sich im Einklang mit der Literatur bei  $\lambda_{em., max} = 353 \text{ nm}$ . [72] Auf eine Darstellung von zu unterschiedlichen Anregungswellenlängen korrespondierenden Emissionsspektren wurde verzichtet, da diese aufgrund des in Abschnitt II.I.a) beschriebenen Prozesses der *internal conversion* vor Emission weitgehend unabhängig von der Anregungswellenlänge sind.

### c) Beschreibung des Spektrums als Lognormal-Verteilung

Die Form des Emissionsspektrums lässt sich, wie in Abschnitt II.III.f) erläutert, mathematisch mit Hilfe einer Lognormal-Verteilung der Form

$$I(\tilde{\nu}) = I_m \cdot \exp\left\{-\frac{\ln 2}{\ln^2 \rho} \cdot \ln^2\left(\frac{a - \tilde{\nu}}{a - \tilde{\nu}_m}\right)\right\} \quad (\text{II.25})$$

beschreiben. [100,101] Das Emissionsspektrum von Tryptophan und die daran erfolgte Anpassung ist in Abbildung IV.3 dargestellt. Die sehr gute Übereinstimmung zwischen dem gemessenen Spektrum und der Anpassung ist deutlich zu erkennen. Die Daten der Anpassung

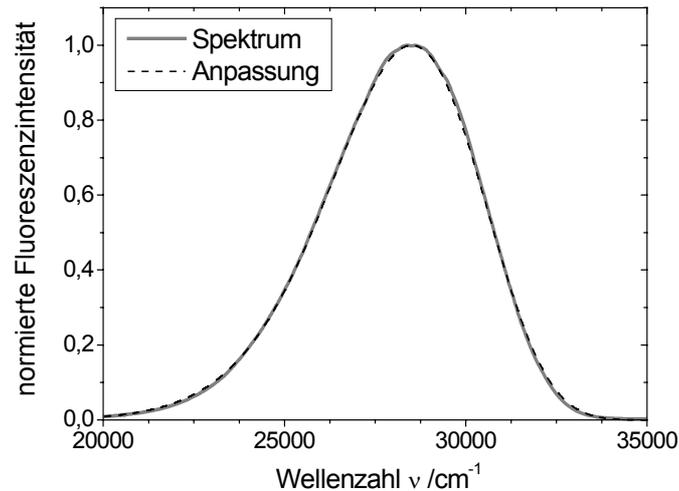


Abbildung IV.3 – Anpassung einer Lognormal-Verteilung an das Emissionsspektrum von Tryptophan in wässriger Lösung.

lieferten ein Emissionsmaximum von  $\tilde{\nu}_m = 28510 \text{ cm}^{-1} = 350,7 \text{ nm}$ . Der ermittelte Wert für den Asymmetrieparameter betrug  $\rho = 1,22$  und der funktionslimitierende Punkt der Anpassung, ab dem  $I(\tilde{\nu})=0$  gilt, wurde als  $a = 41240 \text{ cm}^{-1} = 242 \text{ nm}$  bestimmt. Das Spektrum wurde auf ein Intensitätsmaximum von  $I_m = 1$  normiert. Der Korrelationskoeffizient  $R^2$  beträgt 0,9996 und verdeutlicht somit die sehr gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Anpassung. Diese Daten stimmen gut mit bereits publizierten Daten überein ([101],  $\tilde{\nu}_m = 28250 \text{ cm}^{-1} = 353 \text{ nm}$ ,  $\rho = 1,25$ ,  $a = 39730 \text{ cm}^{-1} = 252 \text{ nm}$ ). Somit lässt sich das Emissionsspektrum von Tryptophan sehr gut über eine Lognormal-Verteilung beschreiben bzw. simulieren.

#### d) Quantenausbeute

Im Prinzip lässt sich mit Hilfe geeigneter Verbindungen mit bekannter Quantenausbeute aus dem gezeigten Emissionsspektrum von Tryptophan in Wasser die Quantenausbeute bestimmen. Da die Quantenausbeute von Tryptophan in wässriger Lösung jedoch seit langer Zeit ebenso wie die Quantenausbeute von NATA selbst als Standard zur Bestimmung der Quantenausbeuten anderer Verbindungen verwendet wird, wird an dieser Stelle auf eine Absolutkalibrierung verzichtet. Für alle weiteren Betrachtungen wird der 1968 von Eisinger und Navon bestimmte Wert für die Quantenausbeute von Tryptophan ( $\phi = 0,14$ ) verwendet. [118] Dieser Referenzwert wird beispielsweise auch von She *et al.* zur Berechnung der Quantenausbeute der Tryptophanfluoreszenz von Troponin C verwendet. [119]

#### e) Halbwertsbreite des Emissionsspektrums

Aus dem in Abbildung IV.2 gezeigten Emissionsspektrum bzw. aus der in Abbildung IV.3 dargestellten Anpassung kann die Halbwertsbreite der Emission (FWHM, ‚full width at half maximum‘) erhalten werden. Diese lässt sich zu  $\text{FWHM} = 5050 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $63,5 \text{ nm}$

bestimmen. Ein Wert für die Halbwertsbreite der Emission von Tryptophan in wässriger Lösung ist bislang nicht veröffentlicht. Die Halbwertsbreite der Emissionsbande von proteingebundenem Tryptophan dient jedoch zusammen mit dem Emissionsmaximum als Kriterium zur Einteilung von Proteinen in spektrale Klassen (vgl. auch Abschnitt II.III.d). Sie wird für vollständig lösungsmittelzugängliche Tryptophanreste im Protein in einer vergleichbaren Größe von 59-61 nm angegeben. [87] Da in wässriger Lösung die Lösungsmittelrelaxation vor der Emission von Tryptophanfluoreszenz verstärkt ist, werden dort mehr emittierende Energieniveaus zugänglich und sind somit für die vergrößerte Halbwertsbreite verantwortlich.

Die über die Halbwertsbreite der Emission bereitgestellte Information soll Rückschlüsse über die energetischen Verhältnisse im Fluorophor zulassen. Es sollte deshalb darauf hingewiesen werden, dass sich die Angabe der Halbwertsbreite in Nanometern im Gegensatz zu der Angabe in Wellenzahlen verfälschend auswirken kann. Aufgrund der Proportionalität zwischen Energie und Wellenzahl wird bei einer Angabe der Halbwertsbreite in Wellenzahlen direkt eine Information über die energetische Breite der emittierenden Niveaus geliefert. Aufgrund der Nichtlinearität zwischen Wellenzahl und Wellenlänge liefert die Angabe der Halbwertsbreite in Nanometern diese Information nicht. So kann es zum Beispiel geschehen, dass Fluorophore mit stark unterschiedlichen Emissionsmaxima in Nanometern identische Emissionshalbwertsbreiten aufweisen. Ihre Emissionshalbwertsbreiten in der zur Energie proportionalen Wellenzahl-Skala sind jedoch nicht identisch und zeigen für den blau verschobeneren Fluorophor eine energetisch wesentlich höhere Halbwertsbreite. Dies entspricht einer größeren energetischen Auffächerung der an den Übergängen beteiligten Energieniveaus.

#### f) *Stokes Shift*

Der Stokes Shift bestimmt sich gemäß Abschnitt II.I.b) aus der Differenz zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum und ist somit ein Maß für die Dissipation an Energie vor Emission der Strahlung. Aus den gegebenen Daten (Absorptions- und Emissionsmaximum) kann der Stokes Shift von Tryptophan in wässriger Lösung als  $\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F = 7390 \text{ cm}^{-1}$  bestimmt werden. Dieser Wert ist wie auch bereits die Absorptions- und Emissionsmaxima im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten. [120] Dieser im Vergleich mit den Stokes Shifts für Tyrosin und Phenylalanin (die sich aus den in Tabelle II.1 angegebenen Absorptions- und Emissionsmaxima bestimmen lassen) sehr große Wert lässt sich wiederum durch die starke energetische Absenkung des  $^1L_a$ -Zustand durch Lösungsmittelrelaxation bei Tryptophan erklären.

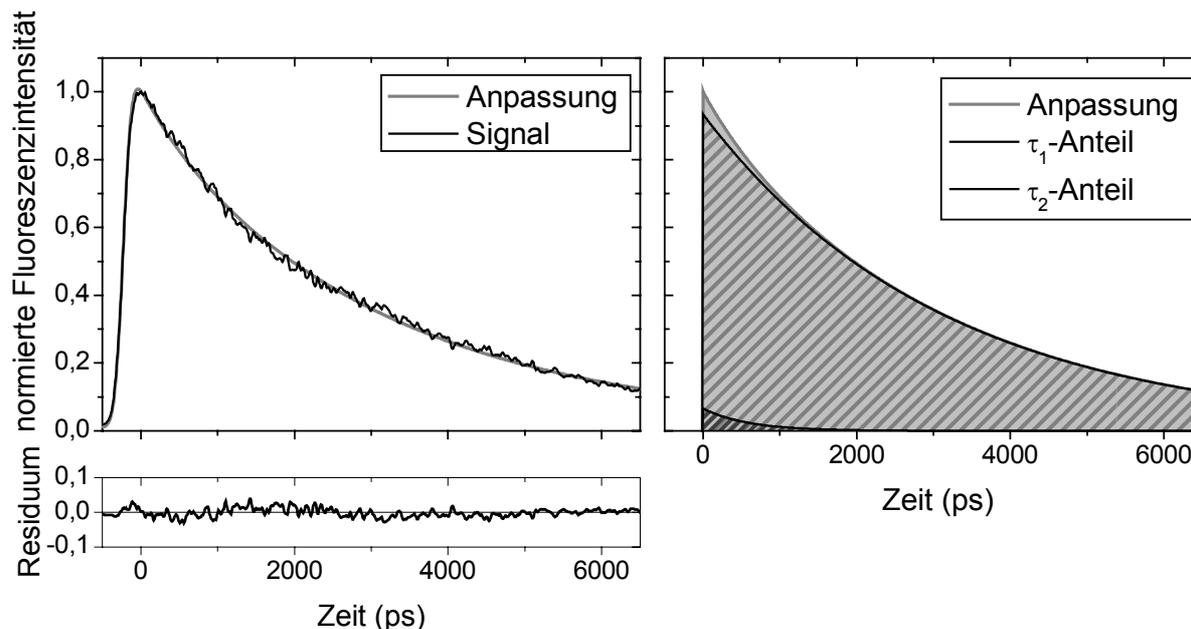


Abbildung IV.4 – Fluoreszenzabklingkurven und daran erfolgte biexponentielle Anpassung sowie das Residuum für Tryptophan in wässriger Lösung. Das ausgewertete Emissionswellenlängenintervall lag bei 345-355 nm. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Die Darstellung rechts veranschaulicht die jeweiligen Anteile der beiden Exponentialterme am Gesamtabklingen der Fluoreszenz.

Tabelle IV.1 - Daten der Biexponentialanpassung in Abbildung IV.4. Angegeben sind die jeweiligen Amplituden  $a_i$ , die einfachen Lebenszeiten  $\tau_i$  und die Amplituden-gemittelte Lebenszeit  $\tau_{m-a}$  der Anpassung sowie der Korrelationskoeffizient  $R$ :

$a_1$	$\tau_1$ (ps)	$a_2$	$\tau_2$ (ps)	$\tau_{m-a}$ (ps)	$R$
$0,934 \pm 0,045$	$3117 \pm 128$	$0,066 \pm 0,013$	$580 \pm 96$	$2943 \pm 164$	0,991

### III. Fluoreszenzlebenszeiten

Zusätzlich zu Untersuchungen der statischen Fluoreszenz wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzuntersuchungen an Tryptophan durchgeführt.

Abbildung IV.4 zeigt die normierte Fluoreszenzabklingkurve von Tryptophan in wässriger Lösung am Emissionsmaximum. An die Fluoreszenzabklingkurve wurde eine Biexponentialfunktion angepasst, deren Daten in Tabelle IV.1 angegeben sind. Es wurden zwei Fluoreszenzlebenszeiten ermittelt, die  $3,12 \pm 0,13$  ns bzw.  $0,58 \pm 0,10$  ns groß sind. Der Exponentialanteil mit der längeren Lebenszeit trägt wesentlich stärker zum Abklingen der Gesamtfluoreszenz bei als der Anteil mit der kurzen Fluoreszenzlebenszeit, wie an der wesentlich größeren Amplitude und der Veranschaulichung in Abbildung IV.4 abzulesen ist.

Das biexponentielle Abklingen der Fluoreszenz von Tryptophan wurde bereits vor fast drei Jahrzehnten beschrieben [121,122], und die hier ermittelten Fluoreszenzlebenszeiten stimmen mit den erstmals von Rayner und Szabo [123] präzise bestimmten und in der Literatur veröffentlichten Werten von  $3,15 \pm 0,05$  ns bzw.  $0,65 \pm 0,23$  ns überein. Auch dort wurde ein wesentlich stärkerer Anteil der langlebigen Komponente am Abklingen der Gesamtfluoreszenz festgestellt. Ähnliche Werte wurden auch von van Resandt *et al.* bestimmt. [124] Das biexponentielle Abklingen der Fluoreszenz wird entgegen früherer Meinungen aufgrund der energetischen Absenkung des  $^1L_a$ -Zustandes durch Lösungsmittelrelaxation heutzutage nicht mehr mit Emission aus den beiden potentiell emittierenden Zuständen  $^1L_a$  und  $^1L_b$  erklärt. Die Existenz einer zweiten Lebenszeitkomponente wird nun damit begründet, dass Tryptophan in Lösung in verschiedenen Rotations-Konformeren vorliegen kann, die aufgrund von intrinsischem Quenching unterschiedliche Fluoreszenzlebenszeiten haben. [24] Das intrinsische Quenching wird dabei durch Protonentransfer von der in Lösung in einem weiten pH-Bereich geladen vorliegenden Aminogruppe des Tryptophans verursacht. Im Gegensatz zu Tryptophan zeigt NATA ein ausschließlich monoexponentielles Abklingen der Fluoreszenz, da dort die unterschiedlichen Rotamere nach Amidierung der Aminogruppe dem Quenching durch Protonentransfer nicht mehr ausgesetzt sind.

Die Fluoreszenz von Tryptophan in Proteinen zeigt ebenfalls ein nicht monoexponentielles Abklingen der Fluoreszenz. Dies ist jedoch nicht auf die Bildung von Rotameren zurückzuführen, da dafür ähnlich wie bei NATA die Proteinstruktur zu starr ist. Vielmehr ist zu berücksichtigen, dass im Protein häufig mehr als nur ein Tryptophanrest als Fluorophor vorliegt. Doch auch die Fluoreszenz von Proteinen, die nur einen einzelnen Tryptophanrest enthalten, klingt nicht monoexponentiell ab. Zurückzuführen ist dies neben der Tatsache, dass Proteine oft in mehreren Konformationen, die zu einer unterschiedlichen Umgebung des Tryptophans und zu einem unterschiedlichen Abklingen der Fluoreszenz führen, vorliegen können, vor allem mit dem in Abschnitt II.II.a) erwähnten Phänomen der spektralen Relaxation.

#### **IV. Quenching von Tryptophan in wässriger Lösung**

In Abbildung IV.5 sind die Stern-Volmer-Auftragungen für das Quenching der Fluoreszenz von Tryptophan in wässriger Lösung mit den Fluoreszenzlöschern Acrylamid, Iodid und Cäsium gezeigt. Die Quenching-Experimente wurden mit statischen und dynamischen Fluoreszenzmethoden durchgeführt. Für die Untersuchungen der statischen Fluoreszenz wurden eventuelle Abweichungen, die auf Aktionssphären zurückzuführen sind, korrigiert (vgl. Abschnitt II.IV.a) und die Bestimmung der Stern-Volmer-Konstanten mit den korrigierten Daten durchgeführt.

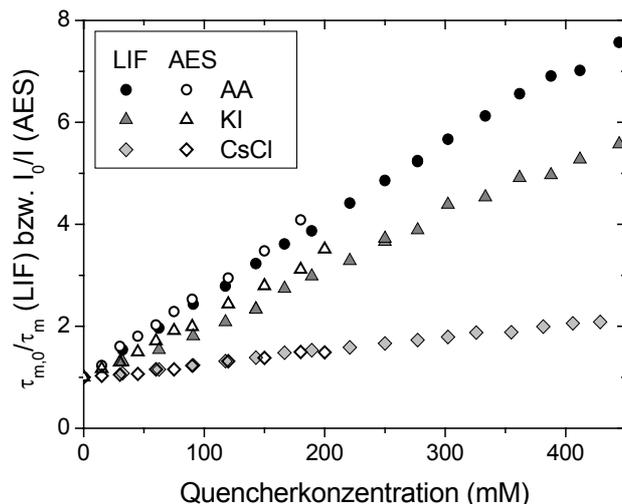


Abbildung IV.5 – Stern-Volmer-Auftragung für statische (AES) und dynamische (LIF) Fluoreszenz-Quenching-Untersuchungen an Tryptophan in wässriger Lösung. Die verwendeten Fluorophore sind Acrylamid (AA), Iodid (KI) und Cäsium (CsCl). Zur Kennzeichnung der Datenpunkte siehe Legende.

Beide Methoden liefern weitgehend konsistente Ergebnisse: Für Quenching mit Acrylamid werden Stern-Volmer-Konstanten von  $15,36 \pm 0,04$  (LIF) bzw.  $16,86 \pm 0,18 \text{ M}^{-1}$  (AES) erhalten. Im Vergleich dazu sind die Stern-Volmer-Konstanten für Quenching mit Iodid mit  $10,35 \pm 0,17$  (LIF) bzw.  $12,00 \pm 0,15 \text{ M}^{-1}$  (AES) etwas verringert. Die geringsten Stern-Volmer-Konstanten zeigt jedoch Cäsium. Diese liegen bei  $2,44 \pm 0,05$  (LIF) bzw.  $2,52 \pm 0,08 \text{ M}^{-1}$  (AES).

Die erhaltenen Daten sind im Einklang mit verschiedenen Studien, die sich mit Quenching von Tryptophan bzw. NATA in wässriger Lösung beschäftigen: Für Quenching mit Acrylamid wurde dort für Tryptophan eine Stern-Volmer-Konstante  $K_D$  von  $13,1 \text{ M}^{-1}$  publiziert. [113] Für Iodid-Quenching von Tryptophan sind Stern-Volmer-Konstanten von  $11,6 \text{ M}^{-1}$  [112] bzw.  $13,9 \text{ M}^{-1}$  [113] publiziert. Für Cäsium-Quenching wurde ebenfalls eine wesentlich geringere Stern-Volmer-Konstante von  $3,19 \text{ M}^{-1}$  veröffentlicht. [113] Diese ist auf die im Vergleich zu den anderen Quenchern verringerte Quencheffizienz von Cäsium ( $f_Q = 0,02$ ) zurückzuführen, die nur bei einem Fünftel der kollidierenden angeregten Fluorophore eine strahlungslose Rückkehr in den Grundzustand bewirkt. [84] Im Gegensatz dazu zeigen die Quencher Iodid und Acrylamid mit Quencheffizienzen nahe eins einen wesentlich stärkeren Einfluss. [24]

## V. LÖSUNGSMITTELABHÄNGIGE FLUORESCENZ AUSGEWÄHLTER TRYPTOPHAN-ANALOGA

### I. Fragestellung

Die aromatische Aminosäure Tryptophan ist einer der am häufigsten verwendeten Fluorophore in der biologischen Fluoreszenzanalytik. [24] In Proteinen mit mehr als einem Tryptophan als Fluorophor kann eine spektrale Separation der jeweiligen Tryptophanbeiträge jedoch schwierig oder sogar unmöglich sein. Aus diesem Grund ist es von Interesse, gezielt einen oder mehrere Tryptophanreste durch einen Fluorophor mit anderen spektroskopischen Eigenschaften (wie z.B. Quantenausbeute, Anregungs- bzw. Emissionsmaximum) unter Erhalt der Konformation des Proteins zu substituieren.

Chemisch modifizierte Tryptophan-Analoga stellen nützliche strukturkonservierende Alternativen für Tryptophan bei Proteinfluoreszenzuntersuchungen dar und sind in dieser Hinsicht seit mehr als 30 Jahren Gegenstand der Forschung. [88] Die beiden bislang am intensivsten erforschten Tryptophan-Analoga sind 5-Hydroxytryptophan und 7-Azatriptophan. Ersteres zeichnet sich durch eine wesentlich höherer Quantenausbeute im Vergleich zu Tryptophan aus und seine Fluoreszenz ist weniger abhängig von der Polarität der Fluorophorumgebung. [92,93] 7-Azatriptophan zeigt im Gegensatz dazu zwar geringere Quantenausbeuten als Tryptophan, ist aber wesentlich stärker von der Polarität seiner Umgebung abhängig und weist außerdem im Gegensatz zu Tryptophan ein monoexponentielles Abklingen der Fluoreszenz bei Integration über den gesamten Emissionswellenlängenbereich auf. [90,91,125]

Aufgrund der Vielzahl an kommerziell erhältlichen Tryptophan-Analoga ist ihr Potential bei Protein-Fluoreszenzuntersuchungen jedoch noch nicht ausgeschöpft. In diesem Kapitel werden deswegen statische und zeitaufgelöste Fluoreszenzstudien an Tryptophan und den sieben Tryptophan-Analoga 7-Azatriptophan, 5-Hydroxytryptophan, 5-Methoxytryptophan, 5-Methyltryptophan, 5-Fluortryptophan, 6-Fluortryptophan und 5-Bromtryptophan vorgestellt. Um eine Vielzahl von identischen Fluorophorumgebungen unter einfachsten Bedingungen zu untersuchen, wurde eine Lösungsmittelstudie durchgeführt, bei der die Fluoreszenz dieser acht Verbindungen in Wasser sowie in zehn verschiedenen primären Alkoholen (die Serie von Methanol bis *n*-Decanol) sowie *iso*-Propanol untersucht wurde. Nachteilig bei der Solvation durch Alkohole ist zwar der große Anteil von spezifischen Lösungsmittelleffekten wie Wasserstoffbrückenbindungen. Die Entscheidung, diese Lösungsmittel zu verwenden, wurde an dieser Stelle jedoch trotzdem getroffen, da so sehr ähnlich strukturierte Lösungsmittel, die gleichzeitig einen großen Polaritätsbereich (0,525 bis 0,762 auf der normalisierten  $E_T^N$ -Skala [51]) abdecken, verwendet werden konnten.

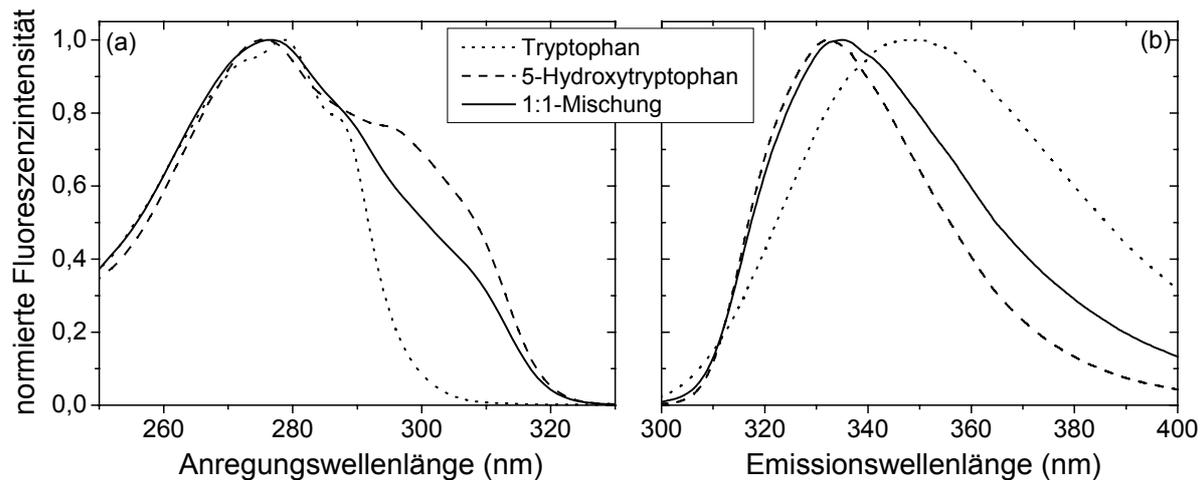


Abbildung V.1 – Normierte Anregungs- (a) und Emissionsspektren (b) bei  $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$  bzw.  $\lambda_{\text{em.}} = 335 \text{ nm}$  von Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan und ihrer 1:1-Mischung in Wasser.

Bislang existierte noch keine vergleichenden Untersuchungen über die lösungsmittel-abhängigen Fluoreszenzeigenschaften mehrerer Tryptophan-Analoga. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine entsprechende Studie publiziert. [126]

## II. Spektroskopische Separation der Tryptophan-Analoga

Für den Einsatz der Tryptophan-Analoga ist es von Bedeutung, dass sich die untersuchten Analoga spektroskopisch von Tryptophan unterscheiden. Dass dieses prinzipiell der Fall ist, zeigt Abbildung V.1, in der die Anregungs- und Emissionsspektren von Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan und ihrer 1:1-Mischung dargestellt sind.

Aus den Anregungsspektren wird deutlich, dass sich Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan trotz ähnlicher Anregungsmaxima bei ca. 270-280 nm mit Strahlung einer Wellenlänge größer als 305 nm unterschiedlich anregen lassen: Tryptophan wird ab 305 nm nicht mehr angeregt, wohingegen sich 5-Hydroxytryptophan mit Wellenlängen von bis zu 320 nm anregen lässt. Dies ist auf eine Rotverschiebung des  ${}^1L_b$ -Übergangs relativ zum  ${}^1L_a$ -Übergang bei 5-Hydroxytryptophan zurückzuführen. [46] Infolgedessen kann durch die Wahl von 5-Hydroxytryptophan als Alternative zu Tryptophan ein Fluorophor in Proteine inkorporiert werden, dessen Fluoreszenz selektiv angeregt werden kann.

Auch die Emissionsspektren von Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan unterscheiden sich stark voneinander. Tryptophan zeigt in wässriger Lösung ein Emissionsmaximum von 353 nm (vgl. Tabelle II.1), wohingegen das Emissionsmaximum von 5-Hydroxytryptophan bei 336 nm liegt.

Beide Fluorophore sollten somit unabhängig voneinander spektroskopisch untersucht werden können. Das Anregungs- und Emissionsspektrum der 1:1-Mischung von Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan zeigt, dass dies gelingt: Das Anregungsspektrum der Mischung zeigt im

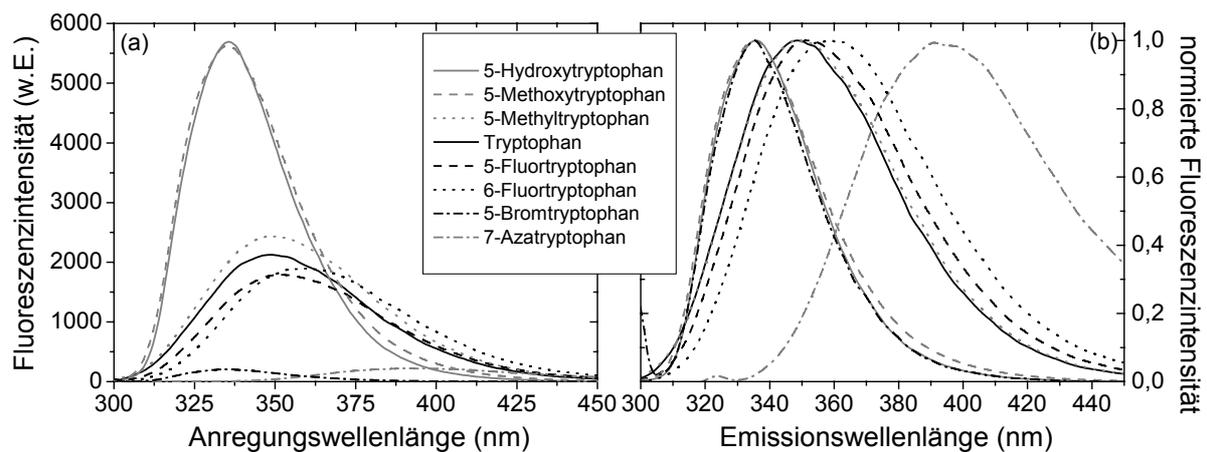


Abbildung V.2 – Reguläre (a) und normierte (b) Emissionsspektren der Tryptophan-Analoga in identisch konzentrierten wässrigen Lösungen. Die Anregung erfolgte am jeweiligen Anregungsmaximum (vgl. Tabelle V.1).

Bereich zwischen 305 und 320 nm Werte, die zwischen den Werten für reines Tryptophan bzw. 5-Hydroxytryptophan liegen. Auch die Emissionsspektren zeigen ein Maximum, das sich zwischen den Werten für Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan befindet. Es liegt jedoch nicht genau zwischen den Werten der Emissionsmaxima der beiden reinen Aminosäuren, da 5-Hydroxytryptophan eine höhere Quantenausbeute als Tryptophan besitzt und so das Spektrum der Mischung dominiert. Die für 5-Hydroxytryptophan relativ zu Tryptophan ( $\phi_{ref} = 0,14$ ) bestimmte Quantenausbeute beträgt 0,27 und ist im Einklang mit der Literatur ( $\phi_{ref} = 0,275$ ). [127] Eine vergleichbare Separation der Beiträge weiterer Fluorophore von der Fluoreszenz von Tryptophan ist auch für einige der anderen Analoga möglich.

### III. Spektren der Tryptophan-Analoga in wässriger Lösung

Abbildung V.2 zeigt die Emissionsspektren der jeweiligen Tryptophan-Analoga in wässriger Lösung an ihrem Anregungsmaximum. Die korrespondierenden Emissionsmaxima sind zusammen mit den Anregungsmaxima und den Quantenausbeuten in Tabelle V.1 protokolliert.

Einige der Emissionsspektren unterscheiden sich wie bereits bei 5-Hydroxy- und 7-Azatryptophan sehr stark von dem Tryptophanspektrum. So weist 5-Methoxytryptophan eine ähnlich starke Blauverschiebung wie 5-Hydroxytryptophan auf ( $\lambda_{em., max} = 335$  nm) und besitzt ebenfalls eine sehr große Quantenausbeute. Auch 5-Bromtryptophan zeigt ein stark blau verschobenes Emissionsmaximum ( $\lambda_{em., max} = 336$  nm), fluoresziert aber im Vergleich mit Tryptophan fast nicht. Die Emissionsspektren von 5-Methyl- und 5-Fluortryptophan unterscheiden sich im Gegensatz dazu nicht stark genug von Tryptophan, um eine Separation

<b>Analogon</b>	<b>Quantenausbeute</b>	<b>Anregungsmaximum</b>	<b>Emissionsmaximum</b>
	$\phi$	$\lambda_{\text{ex., max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em., max}}$ (nm)
5-Hydroxytryptophan	0,27	273	336
5-Methoxytryptophan	0,27	272	335
5-Methyltryptophan	0,14	287	348
5-Fluorotryptophan	0,15	286	352
5-Bromotryptophan	0,02	300	336
6-Fluorotryptophan	0,15	282	359
7-Azatriptophan	0,01	291	391
<b>Tryptophan</b>	<b>0,14</b>	<b>280</b>	<b>353</b>

Tabelle V.1 – Quantenausbeuten sowie Anregungs- und Emissionsmaxima der Tryptophan-Analoga in wässriger Lösung im Vergleich zu Tryptophan. Die Anregungs- und Emissionsmaxima für Tryptophan sind Tabelle II.1 entnommen. Die Quantenausbeute für Tryptophan wurde [118] entnommen. Um die aufgeführten Emissionsmaxima präzise zu bestimmen, wurden an die Emissionsspektren Lognormal-Funktionen angepasst, deren Maximalwert als Emissionsmaximum angegeben wird.

zuzulassen. Auch die nur wenig von Tryptophan unterschiedlichen Anregungsmaxima der beiden Fluorophore lassen keine selektive Anregung dieser Fluorophore zu. Das Anregungsmaximum von 6-Fluorotryptophan ist ebenfalls sehr ähnlich zu dem von Tryptophan. Die anderen Tryptophan-Analoga zeigen jedoch unterschiedliche Anregungsmaxima, so dass eine selektive Anregung dieser Fluorophore auch im Beisein von Tryptophan möglich sein sollte.

Weiterhin wurden deutliche Unterschiede zu Tryptophan in bezug auf die Quantenausbeuten festgestellt. Zum Beispiel betragen die Quantenausbeuten Werte zwischen 0,27 (sowohl für 5-Hydroxy als auch 5-Methoxytryptophan), 0,15 (6-Fluorotryptophan) und 0,01 (7-Azatriptophan). Für die meisten der Verbindungen wurden somit erstmalig die Quantenausbeuten bestimmt. Der für 7-Azatriptophan ermittelte Wert wie auch der für 5-Hydroxytryptophan wird durch die Literatur bestätigt (0,017 bzw. 0,275). [127]

Die festgestellten Unterschiede zwischen den Emissionsmaxima und den Quantenausbeuten der Tryptophan-Analoga im Vergleich zu Tryptophan lassen sich auf Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und dem Fluorophor zurückführen (vergleiche Abschnitt II.II): Zum einen bewirkt die Lösungsmittelrelaxation als ein genereller Lösungsmittelleffekt eine energetische Absenkung des angeregten Zustandes durch eine Umordnung des Lösungsmittels um den angeregten Fluorophor. Des Weiteren können speziell in protischen Lösungsmitteln Wasserstoffbrückenbindungen gebildet werden, die als spezifische

Lösungsmittelleffekte ebenfalls eine energetische Absenkung des angeregten Zustandes bewirken können.

Die relativ zu Tryptophan rotverschobene Emission von 6-Fluortryptophan und 7-Azatriptophan lässt sich deswegen mit einer stärkeren Interaktion dieser Fluorophore mit dem Lösungsmittel Wasser im angeregten Zustand erklären. Dies kann z.B. durch ein größeres Dipolmoment des angeregten Zustandes bedingt sein, so dass Lösungsmittelrelaxationseffekte durch die Umordnung des Lösungsmittels verstärkt werden. Für 7-Azatriptophan, dessen Fluorophor 7-Azaindol bereits Bestandteil theoretischer Studien war, wurde im Einklang mit dieser Überlegung ein größeres Dipolmoment des wahrscheinlich emittierenden  ${}^1L_a$ -Zustandes im Vergleich zu Tryptophan berechnet (6,39 D für 7-Azaindol im Vergleich zu 5,69 D für Indol). [128] Des Weiteren könnten jedoch auch verstärkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Lösungsmittel und 6-Fluoro- bzw. 7-Azatriptophan eine zusätzliche Absenkung des angeregten Zustandes bewirken.

Im Gegensatz dazu kann die Blauverschiebung der Fluoreszenz von 5-Hydroxytryptophan, 5-Methoxytryptophan und 5-Bromtryptophan zum einen mit einem geringeren Dipolmoment des angeregten Zustandes und daraus resultierend verminderter Lösungsmittelrelaxation und zum anderen mit verminderten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Fluorophor und Lösungsmittel erklärt werden. Diese Überlegung wird dadurch gestützt, dass aufgrund der großen Energiedifferenz zwischen dem  ${}^1L_a$ - und dem  ${}^1L_b$ -Zustand in 5-Hydroxytryptophan  ${}^1L_b$  vermutlich ähnlich wie in 5-Hydroxyindol der emittierende Zustand ist. [129,130] Der  ${}^1L_b$ -Zustand ist im Vergleich zu  ${}^1L_a$  weniger lösungsmittelsensitiv, da das Dipolmoment wesentlich geringer ist. Z.B. betragen die experimentell bestimmten Dipolmomente von Indol für den  ${}^1L_a$ -Zustand 5,4 D und für den  ${}^1L_b$ -Zustand nur 2,3 D. [131]

Für 5-Methyl- und 5-Fluortryptophan ist aufgrund der geringen Abweichung der Emissionsmaxima nicht davon auszugehen, dass sie stark von Tryptophan abweichende Dipolmomente des angeregten Zustandes besitzen bzw. stark unterschiedlich Wasserstoffbrückenbindungen bilden.

Die generelle Abnahme der Quantenausbeute mit Zunahme des Emissionsmaximums lässt sich ebenfalls mit einer zunehmenden Interaktion zwischen Fluorophor und Lösungsmittel für Fluorophore mit stark rot verschobenem Emissionsmaximum erklären: Je stärker generelle und spezifische Lösungsmittelleffekte zu einer Absenkung des angeregten Zustands beitragen, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass dabei strahlungslose Wege zur Rückkehr in den Grundzustand zugänglich werden.

In den folgenden Abschnitten wird nun die Veränderung verschiedener Fluoreszenzparameter in Abhängigkeit der Lösungsmittelpolarität für die erwähnten elf Alkohole untersucht.

#### **IV. Anregungsmaxima**

Auf eine Betrachtung der Anregungsmaxima in Abhängigkeit der Lösungsmittelpolarität wird an dieser Stelle verzichtet, da sich diese nicht signifikant mit dem Lösungsmittel verändern.

<b>Analogon<sup>4</sup></b>	<b>m / cm<sup>-1</sup></b>	<b><math>\Delta</math>m / cm<sup>-1</sup></b>	<b>b / cm<sup>-1</sup></b>	<b><math>\Delta</math>b / cm<sup>-1</sup></b>	<b>R</b>
5OHW	610	190	29810	30	0,755
5OMeW	230	160	30260	20	0,759
5MeW	-580	500	30310	60	0,346
5FW	-1290	390	29990	50	0,740
5BrW	-140	390	30200	50	0,116
6FW	-600	330	19150	40	0,535
7NW	20	1450	27340	170	0,005
<b>W</b>	<b>-810</b>	<b>290</b>	<b>29880</b>	<b>40</b>	<b>0,723</b>

Tabelle V.2 – Daten der linearen Anpassungen für die lösungsmittelabhängige Verschiebung der maximalen Emissionswellenzahl von Tryptophan und sieben Tryptophan-Analoga. Angegeben sind Steigungen der Anpassungen m, ihre Fehler  $\Delta$ m sowie die Achsenabschnitte b (bei  $E_T^N = 0,5$ )<sup>5</sup> und deren Fehler  $\Delta$ b. Als Maß für die Güte der Anpassung wird der Korrelationskoeffizient R angegeben.

Dieser Effekt ist damit zu begründen, dass der hauptsächliche Einfluss des Lösungsmittels auf einer Wechselwirkung mit dem angeregten Zustand beruht und sich somit in der Lage des Emissions-, nicht aber des Anregungsmaximums niederschlägt.

## V. Emissionsmaxima

Im Folgenden wird zunächst die Abhängigkeit der maximalen Emissionswellenzahl (in  $\text{cm}^{-1}$ ), die über Anpassung einer Lognormal-Funktion an die jeweiligen Emissionsspektren erhalten wurde, von der Polarität des jeweiligen Alkohols untersucht. Das jeweilige Emissionsmaximum in Nanometern kann aus dem reziproken Wert der Emissionswellenzahl und Multiplikation mit  $1 \cdot 10^7$  erhalten werden.

Abbildung V.3 zeigt beispielhaft die Veränderung des Emissionsmaximums von Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan mit der Lösungsmittelpolarität. Für alle Tryptophan-Analoga wurden lineare Anpassungen an die Auftragungen durchgeführt, um Lösungsmittelleffekte quantitativ zu erfassen. Die Parameter dieser linearen Anpassungen sind in Tabelle V.2

<sup>4</sup> Die Bezeichnung der Tryptophan-Analoga wird in Kurzschreibweise analog zum Einbuchstabencode „W“ der Aminosäure Tryptophan angegeben: 5OHW – 5-Hydroxytryptophan; 5OMeW - 5-Methoxytryptophan; 5MeW - 5-Methyltryptophan; 5FW - 5-Fluortryptophan; 5BrW - 5-Bromtryptophan; 6FW - 6-Fluortryptophan und 7NW - 7-Azatriptophan.

<sup>5</sup> Der Achsenabschnitt wird für  $E_T^N = 0,5$  angegeben, da die untersuchten Lösungsmittel ausschließlich in einem  $E_T^N$ -Bereich von 0,5 bis 0,8 lagen und die in den Tabellen und Graphen dargestellten Ergebnisse so besser vergleichbar sind.

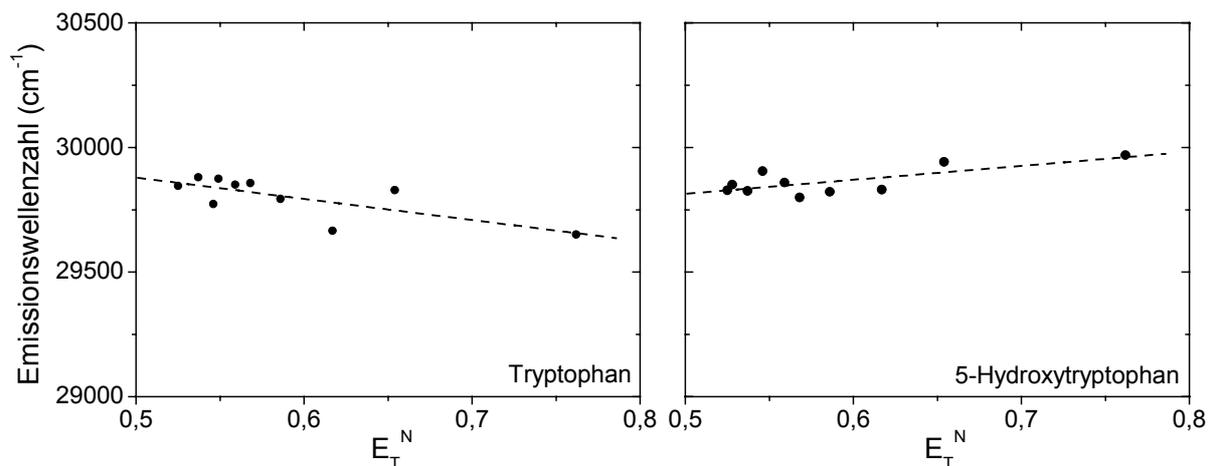


Abbildung V.3 – Veränderung der maximalen Emissionswellenzahl von Tryptophan und einem ausgewählten Tryptophan-Analogen (5-Hydroxytryptophan). Um die Veränderung der Emissionswellenzahl quantitativ zu erfassen, erfolgte eine lineare Anpassung an die Daten.

zusammengestellt. Aus den teils sehr geringen Werten für die Korrelationskoeffizienten  $R$  sowie den teils systematischen Abweichungen wird ersichtlich, dass die Annahme einer linearen Korrelation zwischen der maximalen Emissionswellenzahl und der Lösungsmittelpolarität nicht zwingend ist. Da diese Methode jedoch nur dazu dienen soll, den Einfluss des Lösungsmittels zu dokumentieren, ist sie jedoch gerechtfertigt.

Mit den beobachteten Veränderungen der maximalen Emissionswellenzahlen mit der Lösungsmittelpolarität lassen sich die Tryptophan-Analoga in drei Gruppen einteilen: Für 5-Methyltryptophan, 5-Fluortryptophan und 6-Fluortryptophan wird wie auch bei Tryptophan selbst eine Verschiebung des Emissionsmaximums hin zu höheren Wellenzahlen (entsprechend einer kleineren Wellenlänge) festgestellt. Für 7-Azatriptophan und 5-Bromtryptophan verändert sich dagegen das Emissionsmaximum nicht mit der Lösungsmittelpolarität. Für 5-Hydroxytryptophan und 5-Methoxytryptophan wird eine Zunahme der maximalen Emissionswellenzahl mit der Lösungsmittelpolarität beobachtet, entsprechend einer Abnahme der maximalen Emissionswellenlänge mit steigender Polarität.

Tryptophan zeigt im Vergleich dazu in der linearen Anpassung eine Abhängigkeit der Emissionswellenzahl mit einer Steigung von  $m = -810 \pm 290 \text{ cm}^{-1}$ . Im Vergleich dazu zeigen 5-Methyltryptophan ( $m = -580 \pm 500 \text{ cm}^{-1}$ ) und 6-Fluortryptophan ( $m = -600 \pm 330 \text{ cm}^{-1}$ ) im Rahmen ihrer Fehlergrenzen ähnliche lösungsmittelabhängige Verschiebungen des Emissionsmaximums, wohingegen 5-Fluortryptophan ( $m = -1290 \pm 390 \text{ cm}^{-1}$ ) eine etwas größere Lösungsmittelabhängigkeit in bezug auf die Emissionsmaxima zeigt.

Unter der Annahme ähnlicher spezifischer Lösungsmittelinteraktionen bei diesen Analoga im Vergleich zu Tryptophan (wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Fluorophor und Lösungsmittel), lässt sich aus diesen Ergebnissen der Schluss ziehen, dass der

emittierende Zustand von 5-Methyl- und 6-Fluortryptophan ein ähnliches Dipolmoment besitzt wie der vermutlich in allen Alkoholen emittierende  $^1L_a$ -Zustand für Tryptophan. Diese Vermutung fußt auf Berechnungen, die zumindest für Indol in allen primären Alkoholen von Methanol bis 1-Heptanol  $^1L_a$  als den emittierenden Zustand vorhersagen. [132] Aufgrund der ähnlichen Dipolmomente für die Analoga und Tryptophan kann daraus der Schluss gezogen werden, dass auch dort  $^1L_a$  der emittierende Zustand ist. Die stärkere Lösungsmittelabhängigkeit der Emissionsmaxima von 5-Fluortryptophan lässt Vermutungen zu, dass der emittierende Zustand hier ein größeres Dipolmoment im Vergleich zu Tryptophan aufweist. Die ebenfalls untersuchten Emissionsspektren der wässrigen Lösungen und die lösungsmittelabhängigen Quantenausbeuten (für letzteres siehe Abschnitt V.VI) unterstützen diese Überlegung jedoch nicht. Ohne eine genaue Kenntnis der emittierenden Zustände und ihrer Dipolmomente der Tryptophan- bzw. Indol-Analoga, die mit Ausnahme von 5-Hydroxy- und 7-Azaindol noch nicht bekannt sind, ist eine weitere Analyse hier nicht möglich.

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Tryptophan-Analoga zeigen 5-Hydroxy- ( $m = 610 \pm 190 \text{ cm}^{-1}$ ) und 5-Methoxytryptophan ( $m = 230 \pm 160 \text{ cm}^{-1}$ ) hypsochrome Verschiebungen der Emissionswellenzahl mit einer Zunahme der Lösungsmittelpolarität, wobei der Effekt für 5-Methoxytryptophan weniger ausgeprägt ist. Diese Unterschiede in der Solvatochromie lassen sich darauf zurückführen, dass in diesen zwei Fluorophoren vermutlich der weniger lösungsmittelabhängige  $^1L_b$ -Zustand der jeweils emittierende Zustand ist. [129,130,133] Da der  $^1L_b$ -Zustand keine Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität zeigen sollte und die beobachtete Zunahme der Quantenausbeuten für die hydroxylierte (und nicht die methoxylierte) Verbindung stärker ausgeprägt ist, ist es möglich, dass diese Beobachtung auf spezifische Lösungsmittelleffekte, also Wasserstoffbrückenbindungen, zurückzuführen ist. Aufgrund der geringen Zahl an verwendeten Lösungsmitteln konnte jedoch kein auf linearen Solvatationsenergie-Beziehungen basierender Ansatz verwendet werden, um dies präzise zu analysieren. [59]

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Solvatochromie der maximalen Emissionswellenzahlen für 5-Methoxy- und 5-Hydroxytryptophan im Vergleich zu Tryptophan auf den unterschiedlichen Fähigkeiten dieser Fluorophore, durch die Hydroxy- bzw. Methoxygruppe Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, beruhen können, wurden die Emissionswellenzahlen mit den Kamlet-Taft-Parametern  $\alpha$  und  $\beta$  für spezifische Lösungsmittelleffekte korreliert (vgl. Abbildung V.4). Diese geben die Fähigkeit des Lösungsmittels an, selbst Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden („Wasserstoffbrücken-Donorazidität“;  $\alpha$ ) [60] bzw. Wasserstoffbrückenbindungen zu akzeptieren (Wasserstoffbrücken-Akzeptorbasizität“;  $\beta$ ). [61] Für 5-Hydroxytryptophan konnte eine gute Korrelation dieser Parameter mit der maximalen Emissionswellenzahl erhalten werden. Daraus kann gefolgert werden, dass bei 5-Hydroxytryptophan nicht nur der generelle Lösungsmittelleffekt Solvensrelaxation, sondern auch spezifische Effekte wie Wasserstoffbrückenbindungen durch die Hydroxylgruppen der alkoholischen Lösungsmittel und durch den Fluorophor selbst (über

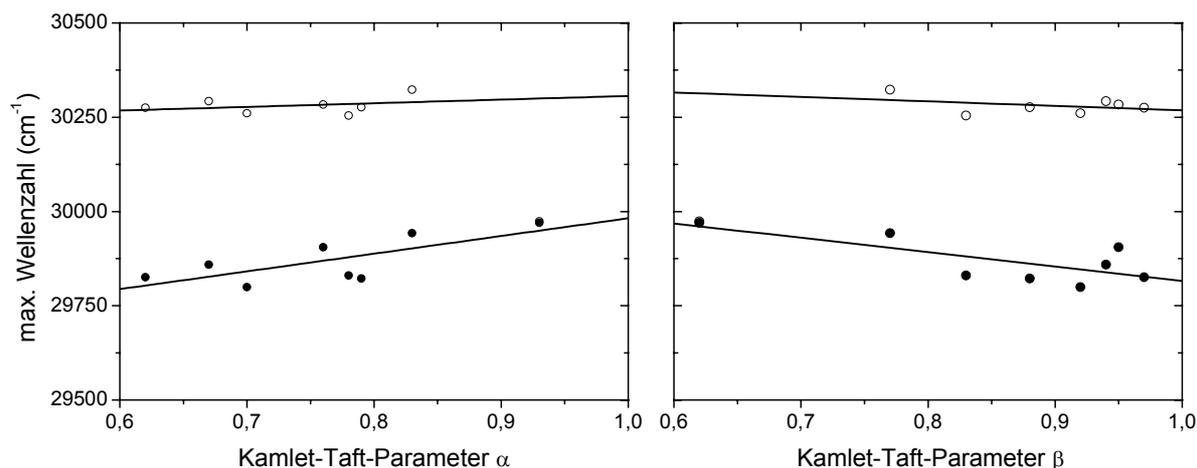


Abbildung V.4 – Veränderung der maximalen Emissionswellenzahl von 5-Hydroxytryptophan (●) und 5-Methoxytryptophan (○) mit den Kamlet-Taft-Parametern  $\alpha$  und  $\beta$ .

die indolische Hydroxygruppe) eine wichtige Rolle spielen. Dieser Effekt ist für 5-Methoxytryptophan verringert, wo zwar auch eine gute Korrelation, aber keine starke Veränderung der maximalen Emissionswellenzahl mit den Kamlet-Taft-Parametern  $\alpha$  und  $\beta$  beobachtet werden konnte. Dies lässt wiederum den Rückschluss zu, dass Wasserstoffbrückenbindungen durch die indolische Hydroxygruppe (als Donor und Akzeptor) größtenteils für die positive Veränderung der maximalen Emissionswellenzahl mit der Lösungsmittelpolarität verantwortlich ist, da in 5-Methoxytryptophan (im Vergleich zu 5-Hydroxytryptophan formal methyliert) die Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden, verringert und der Effekt weniger ausgeprägt ist.

5-Bromtryptophan ( $m = -140 \pm 390 \text{ cm}^{-1}$ ) und 7-Azatriptophan ( $m = 20 \pm 1450 \text{ cm}^{-1}$ ) zeigen innerhalb der Fehlergrenzen keine Veränderung der maximalen Emissionswellenzahl mit der Lösungsmittelpolarität. Für 7-Azatriptophan steht dies im Kontrast zu dem veröffentlichten großen Dipolmoment des  $^1L_a$ -Zustandes [134], das zu einer starken Umgebungsabhängigkeit der Fluoreszenzspektren führen sollte, wenn  $^1L_a$  der emittierende Zustand ist. Da jedoch auch die Quantenausbeuten von 7-Azatriptophan in den Alkoholen (vgl. Abschnitt V.VI) wesentlich niedriger liegen als für 7-Azatriptophan/-indol in nicht-hydroxylyischen Lösungsmitteln [135] und in Proteinen [110], muss berücksichtigt werden, dass die Fluoreszenz von 7-Azatriptophan durch alkoholische Lösungsmittel stark dynamisch gequenchet werden kann. [45] Deswegen kann möglicherweise die sonst beobachtete starke Verschiebung der Emissionsmaxima für 7-Azatriptophan bei dieser Studie nicht beobachtet werden, weil das starke Quenching die Position des Emissionsmaximums beeinflusst.

Für Tryptophan stimmen die erhaltenen Daten sehr gut mit denen von Guharay *et al.* [92] überein: Bei der Untersuchung von Tryptophan in Dioxan-Wasser-Mischungen wurde eine ähnliche Abnahme der maximalen Emissionswellenzahl mit der Lösungsmittelpolarität

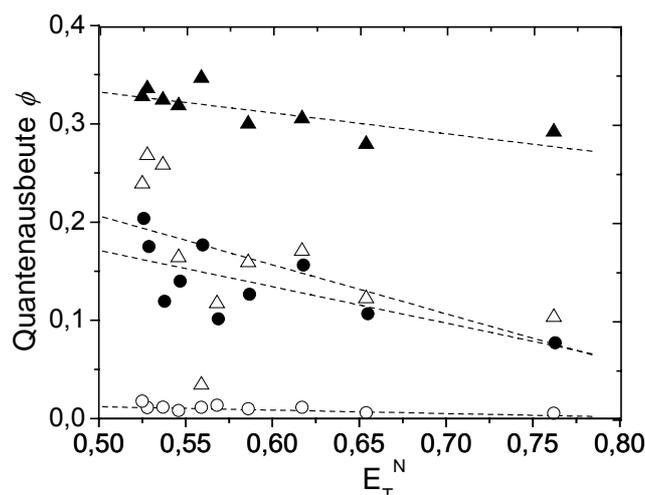


Abbildung V.5 – Veränderung der Quantenausbeuten von 5-Hydroxytryptophan (▲), 5-Methyltryptophan (△), Tryptophan (●) und 7-Azatriptophan (○) mit der Lösungsmittelpolarität  $E_T^N$ .

beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden von Guharay *et al.* jedoch unterschiedliche Effekte für 5-Hydroxy- und 7-Azatriptophan festgestellt: Für 5-Hydroxytryptophan wurde kein Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf das Emissionsmaximum beobachtet, für 7-Azatriptophan jedoch eine stark bathochrome Verschiebung der maximalen Emissionswellenzahl. Dies lässt sich mit den unterschiedlich gewählten Lösungsmittelsystemen erklären: In den Wasser-Dioxan-Gemischen sind Wasserstoffbrückenbindungen mit 5-Hydroxytryptophan vermutlich weniger ausgeprägt, so dass aufgrund des Fehlens von spezifischen Lösungsmittelleffekten der Einfluss des Lösungsmittels auf das Emissionsmaximum des Fluorophors vermindert ist. Für 7-Azatriptophan wird dagegen eine Verschiebung des Emissionsmaximums festgestellt, da das Quenching dieses Fluorophors in den Wasser-Dioxan-Gemischen weniger stark als in Alkoholen ist.

## VI. Quantenausbeuten

In Abbildung V.5 sind die Quantenausbeuten für Tryptophan und drei seiner Analoga, 5-Hydroxytryptophan, 5-Methyltryptophan und 7-Azatriptophan, für die verschiedenen  $E_T^N$ -Werte der Alkohole dargestellt. Tryptophan zeigt Quantenausbeuten zwischen 0,08 und 0,21. Die Werte für 5-Methyltryptophan sind im Vergleich dazu leicht vergrößert und erstrecken sich von 0,10 bis 0,27. Im Gegensatz zu diesen mittleren Werten zeigt 7-Azatriptophan in den zehn verwendeten Lösungsmitteln sehr niedrige Quantenausbeuten (zwischen 0,01 und 0,02), wohingegen die Quantenausbeuten für 5-Hydroxytryptophan die größten der hier untersuchten Verbindungen sind und zwischen 0,28 und 0,34 liegen.

Wie auch an den in Abbildung V.5 ebenfalls eingezeichneten linearen Anpassungen zu ersehen ist, wird zum Teil ein starker Einfluss des Lösungsmittels auf die Quantenausbeute

Analogon	m	$\Delta m$	b	$\Delta b$	R
<b>5OHW</b>	-0,21	0,07	0,318	0,021	0,753
<b>5OMeW</b>	-0,11	0,14	0,324	0,023	0,282
<b>5MeW</b>	-0,50	0,31	0,207	0,035	0,492
<b>5FW</b>	-0,36	0,14	0,208	0,015	0,686
<b>5BrW</b>	0,02	0,03	0,013	0,003	0,218
<b>6FW</b>	-0,39	0,13	0,187	0,015	0,732
<b>7NW</b>	-0,04	0,01	0,014	0,001	0,714
<b>W</b>	-0,37	0,14	0,172	0,015	0,689

Tabelle V.3 – Daten der linearen Anpassungen für die Lösungsmittelabhängigkeit der Quantenausbeuten von Tryptophan / den Tryptophan-Analoga. Dargestellt sind die Steigungen m, die Achsenabschnitte b (bei  $E_T^N = 0,5$ ), die Fehler und der Korrelationskoeffizient R.

von Tryptophan bzw. den Analoga festgestellt: Für Tryptophan verringert sich die Quantenausbeute im untersuchten Lösungsmittelpolaritätsbereich stark (um insgesamt einen Faktor 2), wohingegen für 5-Hydroxytryptophan im gleichen Bereich nur eine geringe relative Veränderung beobachtet werden kann. Im Vergleich zu Tryptophan ist die Veränderung der Quantenausbeute für 5-Methyltryptophan noch stärker ausgeprägt. 7-Azatriptophan zeigt ebenfalls eine starke relative Abnahme der Quantenausbeute mit der Lösungsmittelpolarität. Aufgrund der geringen absoluten Werte ist dies jedoch weniger offensichtlich.

In Tabelle V.3 sind die Daten der linearen Anpassungen für die Veränderungen der Quantenausbeuten aller Tryptophan-Analoga mit der Lösungsmittelpolarität dargestellt. Die stärkste Abnahme der Quantenausbeute wird für 5-Methyltryptophan ( $m = -0,50 \pm 0,31$ ) festgestellt, der entsprechende Fehler in der Steigung ist jedoch auch sehr groß. 5-Fluor- und 6-Fluortryptophan zeigen sehr ähnliche Werte wie Tryptophan ( $m = -0,36 \pm 0,14$ ;  $m = -0,39 \pm 0,13$ , bzw.  $-0,37 \pm 0,14$ ). Die Steigungen für 5-Bromtryptophan ( $m = 0,02 \pm 0,03$ ) und 7-Azatriptophan ( $-0,04 \pm 0,01$ ) sind aufgrund der niedrigen absoluten Quantenausbeuten dieser Verbindungen fast gleich Null. Die Quantenausbeuten von 5-Hydroxy- und 5-Methoxytryptophan verändern sich auch nur wenig mit der Lösungsmittelpolarität ( $m = -0,21 \pm 0,07$ ;  $m = -0,11 \pm 0,14$ ).

Die erhaltenen Daten zeigen ähnliche Tendenzen wie die bereits besprochenen lösungsmittelabhängigen Veränderungen der maximalen Emissionswellenzahl: Vermutlich besitzen die jeweils emittierenden Zustände der Fluorophore 5-Fluor-, 5-Methyl- und 6-Fluortryptophan (unter Berücksichtigung der entsprechenden Fehler) ähnliche Dipole wie Tryptophan und zeigen so eine ähnliche Lösungsmittelabhängigkeit der Quantenausbeute. Für 5-Hydroxytryptophan und 5-Methoxytryptophan ist dagegen aufgrund der geringeren

<b>Analogon</b>	$a_1$	$\tau_1$ / ps	$a_2$	$\tau_2$ / ps	$\tau_{m-a}$ / ps
<b>5OHW</b>	3200	3460	-	-	-
<b>5OMeW</b>	3120	3440	-	-	-
<b>5MeW</b>	2880	2580	260	270	2390
<b>5FW</b>	3060	2760	280	280	2560
<b>5BrW</b>	2830	3360	-	-	-
<b>6FW</b>	2120	3920	290	370	3490
<b>7NW</b>	350	3380	1330	680	1240
<b>W</b>	2790	2880	400	260	2550

Tabelle V.4 – Daten der exponentiellen Anpassungen an die Fluoreszenzabklingkurven der Tryptophan-Analoga im Vergleich zu Tryptophan. Die angegebene mittlere Fluoreszenzlebenszeit ist die Amplituden-gemittelte Lebenszeit  $\tau_{m-a}$ . Die Anregungswellenlänge betrug  $\lambda_{ex.} = 280$  nm, ausgewertet wurde ein Emissionswellenlängenintervall von  $\lambda_{em.} = 335 - 345$  nm (Ausnahme: 7NW -  $\lambda_{em.} = 365 - 375$  nm).

Umgebungsabhängigkeit des vermutlich emittierenden  $^1L_b$ -Zustandes die Lösungsmittelabhängigkeit der Quantenausbeuten dieser Verbindungen vermindert. Da der Korrelationskoeffizient für die lineare Anpassung an die lösungsmittelabhängigen Quantenausbeuten von 7-Azatriptophan vergleichbar mit den Korrelationskoeffizienten der anderen Anpassungen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die große relative Veränderung der niedrigen absoluten Quantenausbeuten von 7-Azatriptophan kein Artefakt ist. Vielmehr demonstriert dies die bereits berichtete starke Umgebungsabhängigkeit für 7-Azatriptophan, die bei der Untersuchung der maximalen Emissionswellenzahlen nicht festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu lässt die große Streuung der Daten für 5-Bromtryptophan keinen Spielraum für Interpretationen.

## **VII. Fluoreszenz-Lebenszeiten in Wasser**

Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm wurden zeit- und wellenlängenauflösende Fluoreszenzspektren aufgenommen und im Emissionswellenlängenbereich von 335 - 345 nm, nahe dem Emissionsmaximum von Tryptophan und den meisten Tryptophan-Analoga, ausgewertet. Für 7-Azatriptophan wurde aufgrund des stark rot verschobenen Emissionsmaximums (vgl. Abbildung V.2) ein Emissionswellenlängenbereich von 365 - 375 nm gewählt.

Die meisten Tryptophan-Analoga zeigen Fluoreszenzabklingkurven, an die, wie in Tabelle V.3 für ihre wässrigen Lösungen dargestellt ist, biexponentielle Funktionen angepasst werden

können. Dabei wird als Ergebnis meist eine mit einer großen Amplitude assoziierte große Fluoreszenzlebenszeit und eine kurze Lebenszeit mit einer kleineren Amplitude erhalten. Die Ausnahme stellt 7-Azatriptophan dar, dessen Fluoreszenzabfall sich zwar durch eine biexponentielle Funktion beschreiben lässt, wobei die langlebige Komponente jedoch nur eine sehr geringe Amplitude hat und der Prozess mit der kürzeren Fluoreszenzlebenszeit das Abklingen der Fluoreszenz dominiert. Die beiden Tryptophan-Analoga 5-Hydroxy- und 5-Methoxytryptophan stellen ebenfalls Ausnahmen dar, da bei ihnen bereits bei der Anpassung einer monoexponentiellen Abklingfunktion sehr gute Anpassungen erzielt werden konnten. Aufgrund der sehr geringen Quantenausbeute von 5-Bromtryptophan und dem damit verbundenen starken Rauschen des Spektrums wurde für 5-Bromtryptophan ebenfalls nur ein monoexponentieller Fluoreszenzabfall angepasst.

Biexponentielle Anpassungen an das Abklingen der Fluoreszenz wurden bereits für Tryptophan, 5-Methyltryptophan, 5-Fluortryptophan, 6-Fluortryptophan und 7-Azatriptophan in verschiedenen Studien publiziert und lieferten ähnliche Werte wie die hier angegebenen Fluoreszenzlebenszeiten. [90,110,136] Außerdem wurde eine ähnliche Lebenszeit für das monoexponentielle Abklingen der Fluoreszenz von 5-Hydroxytryptophan veröffentlicht. [97,110]

Im Gegensatz zu N-Acetyltryptophanamid (NATA) zeigt Tryptophan ein multiexponentielles Abklingverhalten, weil in Lösung unterschiedliche Rotamere vorliegen, die unterschiedlich intrinsisch gequench werden. [24] Das intrinsische Quenching wird dabei durch Protonentransfer von der in Lösung oft geladen vorliegenden Aminogruppe verursacht (vgl. Abschnitt IV.I). Ähnliches kann folglich auch für die anderen Tryptophan-Analoga angenommen werden und wirft deswegen die Frage auf, warum für 5-Hydroxy- und 5-Methoxytryptophan ein monoexponentielles Abklingen der Fluoreszenz beobachtet wird. Da bislang nur wenig über die angeregten Zustände von 5-Hydroxytryptophan (bzw. -indol) und ihre Photophysik bekannt ist, [97] lässt das monoexponentielle Abklingen der Fluoreszenz Raum für Spekulationen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die gegenseitige Rotamer-Umwandlung durch Wasserstoffbrückenbildung bei diesen Fluorophoren unterbunden wird, da sowohl 5-Hydroxy- als auch 5-Methoxytryptophan in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden.

### **VIII. Korrelation von Quantenausbeuten und Lebenszeiten**

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die jeweiligen Fluoreszenzlebenszeiten zu demonstrieren, sind die lösungsmittelabhängigen langen Fluoreszenzlebenszeiten von Tryptophan sowie die Quantenausbeuten in Abbildung V.6 dargestellt. Die Wahl der langen und nicht der gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten ist damit zu begründen, dass die kleinen Fluoreszenzlebenszeiten aufgrund ihrer geringen Amplitude starke Fehler aufweisen, die in die Berechnung der gemittelten Lebenszeiten eingehen. Da der größte Teil des Abklingens der

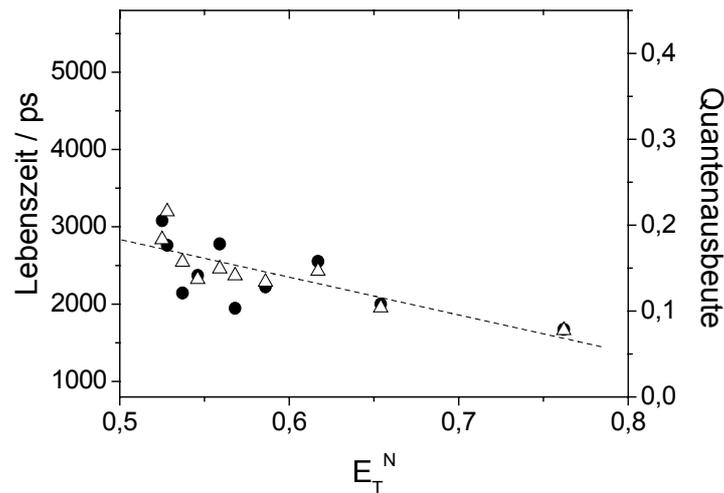


Abbildung V.6 – Lösungsmittelabhängige Veränderung der langen Fluoreszenzlebenszeit ( $\Delta$ ) und der Quantenausbeute ( $\bullet$ ) von Tryptophan. Ebenfalls dargestellt ist die lineare Anpassung an die Fluoreszenzlebenszeiten (---).

Fluoreszenz durch die große Lebenszeit beschrieben wird, ist es zulässig, an dieser Stelle nur die großen Lebenszeiten zu betrachten.

Tryptophan zeigt in den Alkoholen lange Fluoreszenzlebenszeiten, die zwischen 1,66 und 2,49 ns liegen. Im Vergleich mit den Quantenausbeuten, die in Abbildung V.6 ebenfalls dargestellt sind, streuen die Daten weniger und nehmen ebenfalls mit steigender Polarität ab. Somit liefern die Lebenszeiten von Tryptophan umgebungsabhängig die gleichen Informationen wie die Quantenausbeuten, lassen sich aber im Vergleich dazu konzentrationsunabhängig bestimmen.

Im Vergleich zu den Daten für Tryptophan sind die Lebenszeiten von 5-Hydroxytryptophan (vgl. Abbildung V.7, ebenso für 5-Methyltryptophan, 6-Fluortryptophan und 7-Azatriptophan) und 5-Methoxytryptophan (nicht dargestellt) wesentlich größer und nicht so stark von der Lösungsmittelpolarität abhängig. Für 5-Hydroxytryptophan liegen sie zwischen 3,43 und 4,02 ns und für 5-Methoxytryptophan etwas vergrößert zwischen 3,53 und 4,30 ns. 5-Fluortryptophan verhält sich mit Fluoreszenzlebenszeiten zwischen 1,77 und 2,67 ns sehr ähnlich zu Tryptophan selbst, wohingegen 6-Fluor- und 5-Methyltryptophan eine verstärkte Abnahme der Lebenszeiten mit der Lösungsmittelpolarität zeigen: 6-Fluortryptophan zeigt einen Fluoreszenzabfall mit langen Lebenszeiten zwischen 1,98 und 3,39 ns, und die Abklingkurven für 5-Methyltryptophan lassen sich durch Exponentialausdrücke mit langen Lebenszeiten zwischen 1,71 und 3,24 ns beschreiben. Somit sind die Veränderungen in den langen Lebenszeiten von 5-Methyltryptophan fast doppelt so stark ausgeprägt wie für Tryptophan selbst. 5-Bromtryptophan zeigt recht lange Lebenszeiten, die zu größeren Werten (zwischen 2,46 und 3,95 ns liegend) hin verschoben sind.

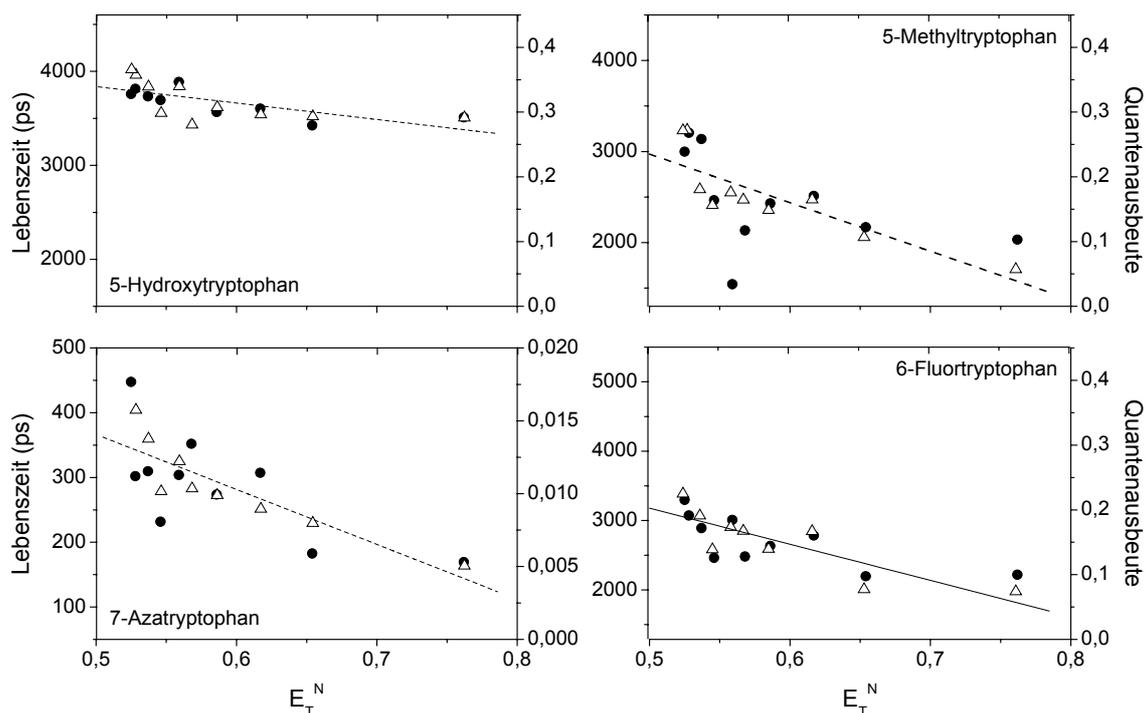


Abbildung V.7 – Lösungsmittelabhängige Veränderung der Fluoreszenzlebenszeiten ( $\Delta$ ) und der Quantenausbeuten ( $\bullet$ ) vier ausgewählter Tryptophan-Analoga. Die jeweils links stehenden Achsen geben die Lebenszeiten in Pikosekunden an, die rechts stehenden die jeweiligen Quantenausbeuten. Mit Ausnahme von 7-Azatriptophan wurde als Bezugssystem die Achse für die Quantenausbeuten auf einen Bereich von 0 – 0,45 gesetzt.

Die dynamischen Fluoreszenzspektren von 7-Azatriptophan sind stark unterschiedlich von den bis jetzt untersuchten. Bei ihnen zeigen sich in Auftragungen der langen Fluoreszenzlebenszeit gegen die Lösungsmittelpolarität aufgrund der kleinen mit ihnen assoziierten Amplituden große Fehler. Im Gegensatz zu den anderen Analoga zeigen sich aber sehr gute Korrelationen zwischen der Lösungsmittelpolarität und der kurzen Fluoreszenzlebenszeit (Abbildung V.7). Die Werte für die kurzen Lebenszeiten von 7-Azatriptophan liegen zwischen 160 und 400 ps und dokumentieren aufgrund ihrer großen relativen Änderung die außergewöhnliche Sensitivität von 7-Azatriptophan auf die Umgebungspolarität.

Insgesamt werden somit sehr gute Korrelationen zwischen der jeweiligen Fluoreszenzlebenszeit mit der größeren Amplitude und den Quantenausbeuten beobachtet. Im Rahmen der Messgenauigkeit weichen wieder 5-Hydroxytryptophan und 5-Methoxytryptophan in Bezug auf ihre lösungsmittelabhängigen Fluoreszenzlebenszeiten besonders stark von Tryptophan ab (große Fluoreszenzlebenszeiten einer monoexponentiellen Anpassung, geringe Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität). Auch zeigt 7-Azatriptophan große Unterschiede, die sich vor allem in der großen Amplitude der kurzen Fluoreszenzlebenszeit und ihrer im Vergleich zu Tryptophan wesentlich stärkeren

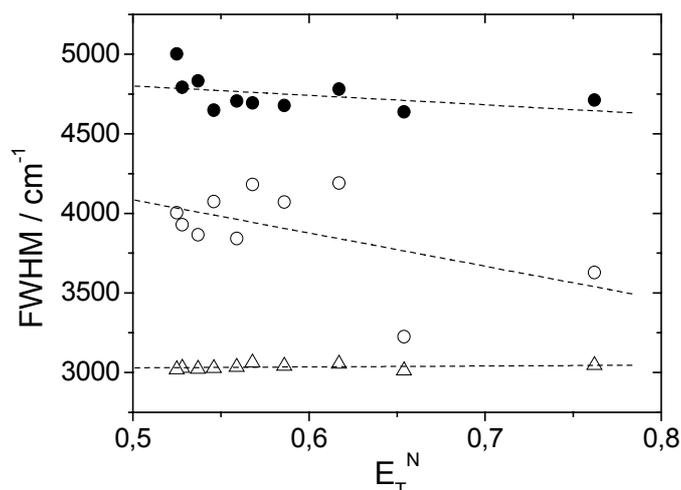


Abbildung V.8 – Veränderung der Halbwertsbreite (FWHM) von Tryptophan (●), 5-Bromtryptophan (○) und 5-Hydroxytryptophan (△) mit der Lösungsmittelpolarität.

Lösungsmittelabhängigkeit manifestiert. 5-Bromtryptophan zeigt ebenfalls ein monoexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten, reagiert aber anders als 5-Hydroxy- und 5-Methoxytryptophan ähnlich sensitiv wie Tryptophan auf eine Veränderung der Umgebungspolarität. Alle anderen Analoga zeigen ein Tryptophan sehr ähnliches Verhalten.

## IX. Emissions-Halbwertsbreiten

Die Halbwertsbreite eines Emissionsspektrums ist ein Charakteristikum des Fluoreszenzspektrums, das sehr stark von der Umgebungspolarität abhängt. [65] Außerdem dient die Halbwertsbreite von proteingebundenen Tryptophanresten dazu, diese in spektrale Klassen einzuteilen. [87]

Abbildung V.8 zeigt die Abhängigkeit der Emissionshalbwertsbreiten (*full width at half maximum*; FWHM) von Tryptophan und von zwei Tryptophan-Analoga von der Lösungsmittelpolarität. Die bestimmten Werte für die alkoholischen Tryptophanlösungen sind sehr ähnlich zu den Werten für die FWHM in Wasser (vgl. Abschnitt IV.II.e) und variieren nicht stark mit der Lösungsmittelpolarität. Die Steigung der linearen Anpassung an die FWHM von Tryptophan ( $m = -590 \text{ cm}^{-1}$ , vgl. die Daten in Tabelle V.5) ist relativ gering. Die Halbwertsbreiten von 5-Hydroxytryptophan sind im Vergleich dazu mehr als  $1000 \text{ cm}^{-1}$  schmaler und mit einer Steigung von  $60 \text{ cm}^{-1}$  weniger lösungsmittelabhängig. Ein Beispiel für stärker lösungsmittelabhängige ( $m = -2090 \text{ cm}^{-1}$ ) Halbwertsbreiten mittlerer Größe wird von 5-Bromtryptophan gestellt.

Unter Berücksichtigung der Fehler zeigen drei Verbindungen sehr ähnliche FWHMs im Vergleich zu Tryptophan. Bei diesen handelt es sich um 5-Methyl-, 5-Fluor- und 6-Fluortryptophan. Sie nehmen, wie aus den in Tabelle V.5 angegebenen Daten ersichtlich, jedoch mit der Lösungsmittelpolarität zu, wobei 5-Methyltryptophan die größte Steigung in der

Analogon	m	$\Delta m$	b	$\Delta b$	R
<b>5OHW</b>	60	70	3030	10	0,267
<b>5OMeW</b>	-230	90	3100	10	0,663
<b>5MeW</b>	1090	220	4650	30	0,852
<b>5FW</b>	490	140	4640	20	0,787
<b>5BrW</b>	-2090	1200	4090	140	0,525
<b>6FW</b>	740	260	4720	30	0,706
<b>7NW</b>	440	1030	4920	130	0,170
<b>W</b>	-590	480	4800	60	0,399

Tabelle V.5 – Daten der linearen Anpassungen für die Lösungsmittelabhängigkeit der Emissions-Halbwertsbreiten von Tryptophan und seinen Analoga. Dargestellt sind die Steigungen m, die Achsenabschnitte b (bei  $E_T^N = 0,5$ ), die Fehler und der Korrelationskoeffizient.

linearen Anpassung zeigt. 7-Azatriptophan zeigt eine etwas geringere Lösungsmittelabhängigkeit in bezug auf die Veränderung der Halbwertsbreiten, der Wert ist aber wie auch bereits bei 5-Bromtryptophan sehr stark fehlerbehaftet.

Für 5-Methoxytryptophan sind die Veränderungen der Halbwertsbreiten mit der Lösungsmittelpolarität sehr ähnlich zu 5-Hydroxytryptophan. Sie sind jedoch systematisch um 100 bis 200  $\text{cm}^{-1}$  verschoben. Die geringen Halbwertsbreiten von 5-Methoxy- und verstärkt von 5-Hydroxytryptophan lassen sich mit der größeren Tendenz dieser Moleküle zur Bildung von Wasserstoffbrücken erklären, die zu einem solvensstabilisierten angeregten Zustand führt, so dass insgesamt weniger emittierende Zustände populiert werden. Ein weiterer Grund ist aber auch, dass für Fluorophore mit einer stark blau verschobenen Emission, die also weniger Relaxationseffekten ausgesetzt sind, die Verteilung der emittierenden Zustände schmaler sein wird und auch so zu einer schmalen Emissionsbande führen sollte.

## X. Stokes Shifts

Der Energieverlust zwischen Absorption und Emission von Strahlung, der Stokes Shift, wird in Lösungsmitteln sowohl durch generelle als auch durch spezifische Lösungsmittel-eigenschaften verursacht. [24] Unter Vernachlässigung spezifischer Lösungsmittelleffekte, die sich auf chemische Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Lösungsmittel zurückführen lassen, kann die Abhängigkeit des Stokes Shifts von der Lösungsmittelpolarität mit Hilfe der Lippert-Gleichung (II.16) beschrieben werden, [137,138] die einen linearen Zusammenhang

<b>Analogon</b>	<b>m</b>	<b><math>\Delta m</math></b>	<b>b</b>	<b><math>\Delta b</math></b>	<b>R</b>
<b>5OHW</b>	-210	350	6440	30	0,222
<b>5OMeW</b>	360	410	6130	25	0,317
<b>5MeW</b>	7320	2330	5510	150	0,743
<b>5FW</b>	5370	980	4690	70	0,897
<b>5BrW</b>	-	-	-	-	-
<b>6FW</b>	210	720	6500	50	0,105
<b>7NW</b>	4310	5470	6790	370	0,286
<b>W</b>	3150	1520	5690	100	0,569

Tabelle V.6 – Daten der linearen Anpassungen für die Abhängigkeit des Stokes Shifts der Tryptophan-Analoga von der Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  des Lösungsmittels. Dargestellt sind die Steigungen m, die Achsenabschnitte b (bei  $\Delta f = 0,2$ ), die Fehler und der Korrelationskoeffizient R.

zwischen dem Stokes Shift eines Fluorophors und der Reaktionsfeldfunktion bzw. Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  vorhersagt. [65]

Abbildung V.9 zeigt für Tryptophan und drei ausgewählte Tryptophan-Analoga die Veränderung des Stokes Shift mit der Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  der verwendeten Lösungsmittel. An die Daten wurden lineare Funktionen angepasst, deren Parameter in Tabelle V.6 aufgeführt sind. Tabelle V.6 enthält des Weiteren auch die Daten für die Anpassungen für alle Tryptophan-Analoga mit Ausnahme von 5-Bromtryptophan. Dieser Fluorophor zeigte eine sehr geringe Absorption, so dass eine genaue Bestimmung der Absorptionsmaxima unmöglich war. Daraus resultierend war auch die Bestimmung der Stokes Shifts für 5-Bromtryptophan nicht möglich.

In den hier verwendeten Lösungsmitteln wird für Tryptophan nur eine geringe Veränderung des Stokes Shifts mit der Orientierungspolarisierbarkeit beobachtet. In Studien, die einen größeren Bereich an Orientierungspolarisierbarkeiten abdeckten [120], wurde ein größerer Einfluss des Lösungsmittels auf den Stokes Shift festgestellt. Ein im Vergleich zu Tryptophan noch geringerer Lösungsmiteleinfluss wird in den verwendeten Alkoholen für 5-Hydroxy- und 5-Methoxytryptophan beobachtet. Für 5-Methyl- und 5-Fluortryptophan wird eine etwas verstärkte Abhängigkeit des Stokes Shifts von der Orientierungspolarisierbarkeit des Lösungsmittels beobachtet, für 6-Fluortryptophan ist diese im Vergleich zu Tryptophan jedoch leicht verringert. Aufgrund der sehr geringen Absorption der 7-Azatriptophan-Proben war die Bestimmung der Absorptionsmaxima sehr stark fehlerbehaftet. Aus diesem Grund ist auch die Abhängigkeit des Stokes Shifts von der Orientierungspolarisierbarkeit des Lösungsmittels für 7-Azatriptophan mit einem sehr großen Fehler assoziiert. Für 5-Brom-

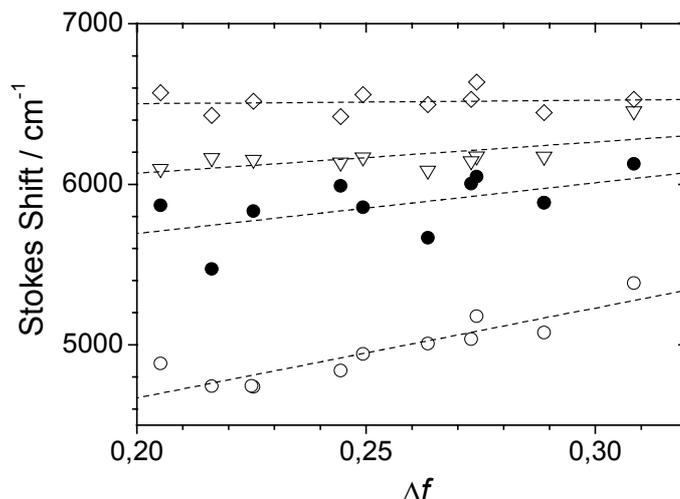


Abbildung V.9 – Veränderung des Stokes Shifts mit der Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$ : 5-Fluortryptophan (○), Tryptophan (●), 5-Methoxytryptophan (▽) und 6-Fluortryptophan (◇)

tryptophan war sowohl die Löslichkeit als auch die Absorption in den verwendeten Lösungsmitteln so gering, dass eine Bestimmung der Absorptionsmaxima und somit der Stokes Shifts nicht möglich war.

Da sich, wie in V.IV angesprochen, die Absorptionsmaxima der untersuchten Fluorophore nicht signifikant mit der Lösungsmittelpolarität (hier in Form der Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$ ) verändern, sind die beobachteten Effekte allein auf die Abhängigkeit des Emissionsmaximums von der Lösungsmittelpolarität zurückzuführen. Deshalb wird an dieser Stelle auf eine erneute Diskussion der bereits in V.V erläuterten Effekte verzichtet.

## XI. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die statischen und dynamischen Fluoreszenzeigenschaften von Tryptophan und sieben Tryptophan-Analoga vorgestellt, die in einer systematischen Lösungsmittelstudie unter Verwendung der Reihe der primären *n*-Alkohole untersucht wurden. Erstmals wurden Informationen bezüglich der Lösungsmittelabhängigkeit von Emissionsmaxima, Quantenausbeuten, Lebenszeiten, Emissionshalbwertsbreiten und Stokes Shifts der acht verwendeten Fluorophore unter identischen Messbedingungen geliefert. Diese sind mittlerweile publiziert. [126]

Die unterschiedliche Lösungsmittelabhängigkeit der Tryptophan-Analoga lässt sich auf die verschieden großen Dipolmomente ihrer möglichen emittierenden Zustände  ${}^1L_a$  und  ${}^1L_b$  im Vergleich zu Tryptophan zurückführen: Je nach Dipolmoment wird der  ${}^1L_a$ -Zustand durch Lösungsmittelrelaxation so weit abgesenkt, dass er energetisch unter dem weniger polaren  ${}^1L_b$ -Zustand zu liegen kommen kann. Das Dipolmoment von  ${}^1L_a$  bedingt so die fluoreszenzspektroskopisch untersuchte Umgebungssensitivität des betrachteten Fluorophors.

Die Analyse der erhaltenen Daten im Vergleich zu Tryptophan soll das mögliche Anwendungspotential von Tryptophan-Analoga als strukturerhaltende Alternativen zu Tryptophan bei Untersuchungen der Proteinfluoreszenz aufzeigen. Dabei ist es von besonderem Interesse, Tryptophan-Analoga zu identifizieren, die besser als Tryptophan als Proben für die lokale Umgebung dienen können, z.B. dadurch, dass sie verstärkt auf Polaritätsveränderungen der Umgebung oder der Exposition zum Lösungsmittel reagieren. Darüber können z.B. Informationen über die Fluorophorposition im Protein bzw. deren Veränderung bei Konformationsänderungen oder Interaktion mit Substraten gewonnen werden. Des Weiteren ist es von Interesse, Tryptophan-Analoga zu identifizieren, die aufgrund stark unterschiedlicher fluoreszenzspektroskopischer Eigenschaften eine klare Trennung von den Beiträgen nativer Tryptophanreste im Protein zulassen.

Für Tryptophan konnte in den untersuchten Lösungsmitteln eine Abnahme der maximalen Emissionswellenzahl (entsprechend einer geringen Zunahme der Emissionswellenlänge) bei einer Erhöhung der Lösungsmittelpolarität beobachtet werden. Auch Quantenausbeuten und Lebenszeiten einer biexponentiellen Anpassung nehmen ähnlich wie bei Proteinfluoreszenzuntersuchungen mit der Lösungsmittelpolarität ab. Lösungsmittelstudien lassen sich somit prinzipiell zur Simulation von Fluorophorumgebungen unterschiedlicher Polarität verwenden. Es konnten einige Tryptophan-Analoga mit stark abweichenden Fluoreszenzeigenschaften identifiziert werden: Die beiden Tryptophan-Analoga 5-Hydroxy- und 5-Methoxytryptophan zeigen sehr große Quantenausbeuten und monoexponentielle Fluoreszenzlebenszeiten, die sich nur gering mit der Lösungsmittelpolarität ändern. Dies gilt ebenfalls für die Emissionshalbwertbreiten und Stokes Shifts. 5-Hydroxy- und 5-Methoxytryptophan sind somit potentielle Substituenten für Tryptophan in Proteinfluoreszenzuntersuchungen, wenn Fluorophore mit einer hohen konstanten Quantenausbeute benötigt werden. Des Weiteren sind sie aufgrund der Blauverschiebung ihrer Emissionsmaxima von Interesse, wenn Fluorophore mit unterschiedlichen spektralen Überlappungen für FRET-Experimente benötigt werden.

Auch 7-Azatriptophan und 5-Bromtryptophan konnten als Tryptophan-Analoga mit geringen Quantenausbeuten und ebenfalls herausragenden spektralen Eigenschaften identifiziert werden: Die bereits publizierte starke Umgebungssensitivität von 7-Azatriptophan zeigt sich z.B. in den Veränderungen der Fluoreszenzlebenszeiten und Quantenausbeuten. Das stark rot verschobene Emissionsmaximum lässt dabei eine spektrale Separation von Tryptophan und 7-Azatriptophan zu. Das erstmalig fluoreszenzspektroskopisch charakterisierte 5-Bromtryptophan zeigt ebenfalls starke Abweichungen von Tryptophan: Das Emissionsmaximum von 5-Bromtryptophan ist ähnlich wie das für 5-Hydroxy- und 5-Methoxytryptophan erheblich blau verschoben. Die Quantenausbeuten von 5-Bromtryptophan sind im Gegensatz zu denen der anderen Fluorophore jedoch sehr gering. Dies betont das Anwendungspotential von 5-Bromtryptophan als einer zu Tryptophan strukturell ähnlichen, jedoch fast nicht fluoreszierenden Alternative bei Anwendungen, in denen die Verringerung der Fluoreszenzbeiträge ausgewählter Tryptophanreste im Protein gewünscht wird.

## VI. QUENCHINGUNTERSUCHUNGEN AN TRYPTOPHAN-ANALOGA

### I. Fragestellung

In Kapitel V wurde gezeigt, dass Tryptophan-Analoga nützliche Alternativen zu Tryptophan für Untersuchungen der Proteinfluoreszenz darstellen, die unter Konservierung der Proteinstruktur über verschiedene Methoden in das Protein inkorporiert werden können. Proteinfluoreszenz-Experimente beschäftigen sich jedoch in der Regel nicht nur mit den Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluorophore. So wird z.B. oft die allgemeine Zugänglichkeit eines Fluorophors im Protein über Fluoreszenz-Quenching-Experimente mit neutralem Acrylamid und den geladenen Spezies Cäsium ( $\text{Cs}^+$ ), Thallium ( $\text{Tl}^+$ ) und Iodid ( $\text{I}^-$ ) (vgl. Abschnitt II.IV.a) bestimmt. Für diese Untersuchungen wurden die meisten Tryptophan-Analoga bislang nicht eingesetzt. Einzig 5-Hydroxytryptophan wurde für Fluoreszenz-Quenching-Studien mit Acrylamid, Iodid und Thallium verwendet. [139,140] Die dort erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten für das proteingebundene 5-Hydroxytryptophan wurden jedoch nicht in Relation zu den Stern-Volmer-Konstanten von 5-Hydroxytryptophan in wässriger Lösung interpretiert. Bislang wurde nur für Iodid-Quenching von 5-Hydroxytryptophan eine Stern-Volmer-Konstante ermittelt. [140]

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit auf statischen Fluoreszenztechniken beruhende Quenching-Experimente mit den im vorigen Kapitel vorgestellten Tryptophan-Analoga in wässriger Lösung durchgeführt, mit dem Ziel, die Stern-Volmer-Konstanten zu ermitteln. Außerdem sollten Tryptophan-Analoga identifiziert werden, die eine von Tryptophan unterschiedliche Löschung der Fluoreszenz zeigen. Eingesetzt wurde Acrylamid als neutraler Quencher sowie Iodid als anionischer und Cäsium als kationischer Quencher. Auf die Verwendung von Thallium wurde aufgrund der Toxizität seiner Salze verzichtet.

Im Folgenden wird wegen der Fülle an Daten exemplarisch die Auswertungsstrategie an einem ausgewählten Fluorophor demonstriert. Darauf folgend werden die erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten und bimolekulare Quenchkonstanten der Tryptophan-Analoga vorgestellt und diskutiert.

### II. Quenching der Tryptophan-Analoga

#### a) Veränderung der Fluoreszenzintensitäten

Abbildung V.1 zeigt die Abnahme der Fluoreszenzintensität einer wässrigen 5-Methyltryptophanlösung bei Quenching mit verschiedenen Konzentrationen an Acrylamid. Es kann eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzintensität ohne Veränderung des

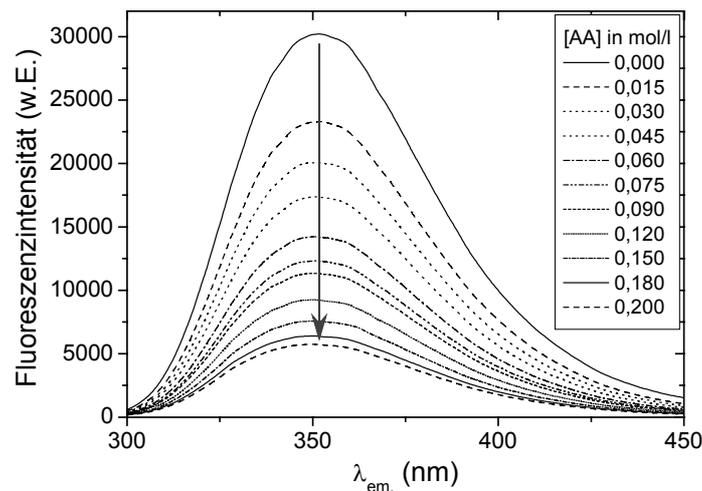


Abbildung VI.1 – Quenching durch Acrylamid (AA): Abnahme der Fluoreszenzintensität von identisch konzentrierten, jedoch mit unterschiedlichen Quencherkonzentrationen inkubierten 5-Methyltryptophanlösungen. Die Anregung erfolgte aufgrund der hohen Absorption von Acrylamid bei niedrigen Wellenlängen nicht wie bei allen anderen Quenchern am Anregungs-Maximum des Fluorophors, sondern bei 295 nm.

Emissionsmaximums beobachtet werden (siehe Pfeil). Letzteres wurde ebenfalls über eine Betrachtung der normierten Emissionsspektren kontrolliert.

Die Löschung der Fluoreszenz von 5-Methyltryptophan ist ebenso wie bei Tryptophan und den anderen Tryptophan-Analoga auf dynamisches Quenching zurückzuführen. Dies wurde mit Hilfe von Untersuchungen, die mit zeitaufgelösten Fluoreszenztechniken an ausgewählten Tryptophan-Analoga durchgeführt wurden, und in Analogie zu dem ausschließlich dynamischen Quenching von Tryptophan geschlossen (vergleiche Abschnitt II.IV.a).

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der in Abschnitt II.IV.a) beschriebenen Stern-Volmer-Auftragungen, bei denen das Verhältnis aus Fluoreszenzintensität vor und nach Quencherzugabe gegen die Konzentration an zugesetztem Quencher aufgetragen wird.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_D \cdot [Q] \quad (\text{II.4})$$

Die Stern-Volmer-Auftragung für das in Abbildung V.1 gezeigte Acrylamid-Quenching von 5-Methyltryptophan ist beispielhaft in Abbildung IV.5 dargestellt. Es ist jedoch nicht möglich, aus dieser Auftragung direkt die Stern-Volmer-Konstanten des dynamischen Quenchings durch Acrylamid zu bestimmen, da die Messdaten bei hohen Quencherkonzentrationen Abweichungen von der Linearität zeigen.

Auf die Darstellung der Stern-Volmer-Auftragungen für alle Quencher und alle Tryptophan-Analoga wird an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

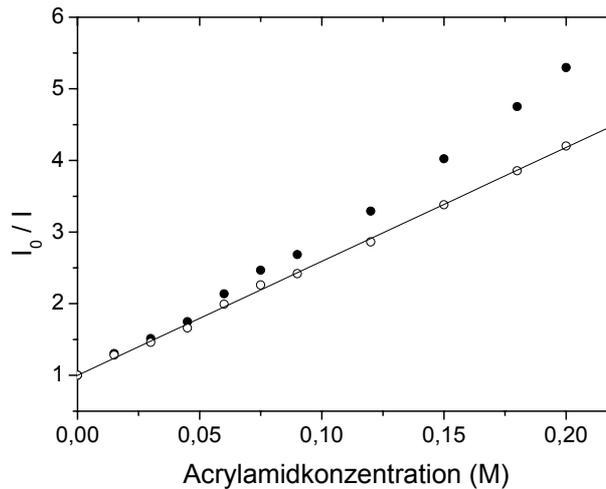


Abbildung VI.2 – Stern-Volmer-Auftragung für Acrylamid-Quenching von 5-Methyltryptophan. Dargestellt sind die über Integration über den gesamten Emissionswellenlängenbereich erhaltenen Messdaten vor (●) und nach (○) Berücksichtigung einer Aktionssphärenabweichung. An letztere erfolgte lineare Anpassung.

#### b) Aktionssphärenabweichungen

Abweichungen von der Linearität bei Stern-Volmer-Auftragungen der statischen Fluoreszenzmessungen lassen sich prinzipiell auf zwei Effekte zurückführen: auf kombiniertes Quenching (dynamisch und statisch) oder auf eine direkte Inaktivierung des Fluorophors innerhalb einer Aktionssphäre bei der Anregung um den Fluorophor (vgl. Abschnitt II.IV.a).

Alle Stern-Volmer-Auftragungen der Tryptophan-Analoga, die von der Linearität abwichen, wurden deswegen zunächst auf Anteile von statischem Quenching mit Hilfe von modifizierten Stern-Volmer-Auftragungen untersucht, in denen der quadratische Anteil einer beide Quenchformen beinhaltenden Stern-Volmer-Auftragung linearisiert wird:

$$K_{App} = \left( \frac{I_0}{I} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D \cdot K_S \cdot [Q] \quad (\text{II.34})$$

Die Analyse von modifizierten Stern-Volmer-Auftragungen lieferte für keines der Tryptophan-Analoga, die Abweichungen in ihren nicht modifizierten Stern-Volmer-Auftragungen zeigen, Hinweise auf eine Kombination von statischem und dynamischem Quenching. Sie sind deswegen hier nicht dargestellt.

Fluorophor	$V / \text{cm}^3$	$\Delta V / [\text{cm}^3]$	$r / \text{Å}$	$\Delta r / \text{Å}$
5OHW	$2,35 \cdot 10^{-21}$	$0,05 \cdot 10^{-21}$	8,25	0,06
5OMeW	$4,85 \cdot 10^{-21}$	$0,05 \cdot 10^{-21}$	10,50	0,04
5MeW	$1,95 \cdot 10^{-21}$	$0,05 \cdot 10^{-21}$	7,75	0,07
5FW	$1,80 \cdot 10^{-21}$	$0,05 \cdot 10^{-21}$	7,55	0,07
5BrW	$4,25 \cdot 10^{-21}$	$0,05 \cdot 10^{-21}$	10,05	0,04
6FW	$2,95 \cdot 10^{-21}$	$0,05 \cdot 10^{-21}$	8,90	0,05
7NW	-	-	-	-
<b>W</b>	<b><math>3,00 \cdot 10^{-21}</math></b>	<b><math>0,05 \cdot 10^{-21}</math></b>	<b>8,95</b>	<b>0,05</b>

Tabelle VI.1 – Volumina  $V$  und Radien  $r$  der Aktionssphären, die bei den Tryptophan-Analoga Abweichungen von der Linearität bei Quenching mit Acrylamid verursachen.

Infolgedessen kann geschlossen werden, dass die Nicht-Linearität der Stern-Volmer-Auftragungen auf Abweichungen durch Aktionssphären zurückzuführen ist. Es sollte somit möglich sein, die Abweichungen zu kompensieren, indem die Abweichungen zeigende Stern-Volmer-Auftragung

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot \exp([Q] \cdot V \cdot N_A) \quad (\text{II.33})$$

durch einen geeigneten Exponentialausdruck dividiert wird. Um diesen Exponentialausdruck zu finden, wurde der Einfluss verschieden großer Aktionssphären  $V$  auf die Linearisierung der Auftragung von  $I_0/I$  analysiert und der Wert für  $V$  bestimmt, bei dem der Korrelationskoeffizient  $R$  einer linearen Anpassung maximal wurde. Über diese Methode können sowohl das Volumen  $V$  der jeweiligen Aktionssphäre als auch die Stern-Volmer-Konstante  $K_D$  des dynamischen Quenchings nach der Korrektur ermittelt werden.

Der einzige Quencher, bei dem messbare Einflüsse durch Aktionssphären festgestellt werden konnten, ist Acrylamid. Für Cäsium ( $\text{Cs}^+$ ) und Iodid ( $\text{I}^-$ ) wurden für die hier untersuchten Tryptophan-Analoga keine derartigen Abweichungen festgestellt.

In Abbildung V.1 sind die erhaltenen Volumina  $V$  und Radien  $r$  der Aktionssphären für das Acrylamid-Quenching der Tryptophan-Analoga im Vergleich zu Tryptophan zusammengestellt. Für 7-Azatriptophan konnte das Volumen und der Radius der Aktionssphäre nicht ermittelt werden, da die Stern-Volmer-Konstante für 7-Azytryptophan bei gleichzeitig sehr geringen Fluoreszenzintensitäten in Wasser sehr gering ist und somit Abweichungen von der Linearität bei einer starken Streuung der Daten nicht detektiert werden können.

Fluorophor	$K_{AA} / \text{M}^{-1}$	$\Delta K_{AA} / \text{M}^{-1}$	$K_{Cs} / \text{M}^{-1}$	$\Delta K_{Cs} / \text{M}^{-1}$	$K_I / \text{M}^{-1}$	$\Delta K_I / \text{M}^{-1}$
5OHW	16,15	0,31	4,09	0,07	12,63	0,26
5OMeW	20,50	0,16	3,92	0,07	13,72	0,12
5MeW	15,85	0,11	3,67	0,12	12,09	0,19
5FW	15,02	0,22	1,79	0,06	13,06	0,25
5BrW	41,60	0,83	9,08	0,60	22,58	0,62
6FW	18,85	0,23	1,97	0,06	15,02	0,20
7NW	1,960	0,067	0,485	0,023	4,360	0,049
<b>W</b>	<b>16,86</b>	<b>0,18</b>	<b>2,52</b>	<b>0,08</b>	<b>12,00</b>	<b>0,15</b>

Tabelle VI.2 – Stern-Volmer-Konstanten für Quenching der angegebenen Tryptophan-Analoga mit Acrylamid (AA), Iodid (I<sup>-</sup>) und Cäsium (Cs<sup>+</sup>).

Die in Tabelle VI.1 protokollierten Volumina  $V$  und Radien  $r$  der für die Tryptophan-Analoga ermittelten Aktionssphären unterscheiden sich teilweise signifikant von den für Tryptophan gefundenen Werten. So zeigen 5-Methyl- und 5-Fluortryptophan eine wesentlich geringere Einflussosphäre als Tryptophan bei Quenching mit Acrylamid. Im Gegensatz dazu sind die Einflussosphären von 5-Methoxy- und 5-Bromtryptophan vergrößert. Für 5-Hydroxy- und 6-Fluortryptophan kann kein großer Effekt des jeweiligen Substituenten auf die Größe der Einflussosphäre festgestellt werden. Worauf die veränderten Einflussosphären der substituierten Tryptophane beruhen, ist ohne eine genaue Kenntnis ihrer energetisch angeregten Zustände spekulativ. Es ist davon auszugehen, dass die Substitution von Tryptophan mit verschiedenen Substituenten und an unterschiedlichen Positionen des Indolrings die elektronische Struktur des angeregten Zustandes und damit seine Interaktionsfähigkeit mit Acrylamid beeinflusst. Ohne eine weitere Kenntnis des Quenching-Mechanismus' von Acrylamid und seiner Interaktion mit den untersuchten Fluorophoren im angeregten Zustand ist an dieser Stelle eine Analyse nicht möglich.

### III. Ermittlung von Stern-Volmer-Konstanten

In Tabelle V.2 sind die für die jeweiligen Fluorophore und Quencher dargestellten Stern-Volmer-Konstanten, die entweder direkt aus den Stern-Volmer-Auftragungen (I<sup>-</sup>, Cs<sup>+</sup>) oder nach Berücksichtigung einer Aktionssphärenabweichung (Acrylamid) ermittelt werden konnten, aufgeführt. Eine graphische Darstellung der in Tabelle V.2 gezeigten Daten erfolgt in Abbildung VI.3.

Man erkennt für die meisten Fluorophore, wie bereits für Tryptophan selbst, ein deutlich effektiveres Quenching der Fluoreszenz durch Acrylamid im Vergleich zu Iodid. Die Quencheffizienz von Cäsium bei Quenching der Analoga ist (wie auch bereits für das

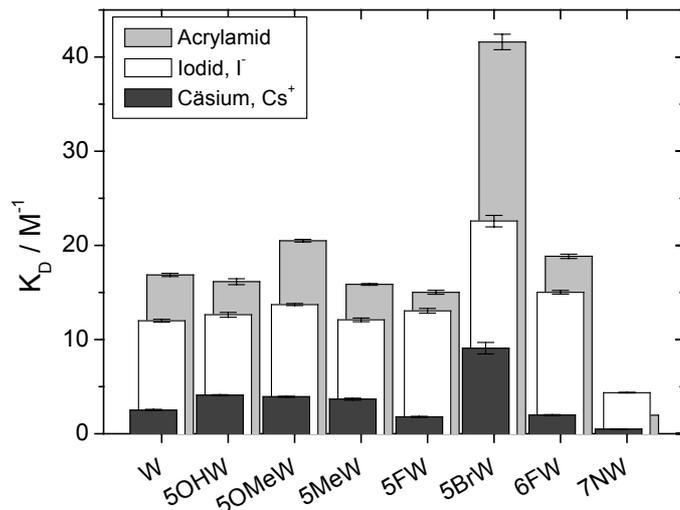


Abbildung VI.3 – Stern-Volmer-Konstanten für Tryptophan und die untersuchten Tryptophan-Analoga für Quenching mit Acrylamid, Iodid ( $I^-$ ) und Cäsium ( $Cs^+$ ).

Quenching von Tryptophan, vgl. Abschnitt IV.IV) im Vergleich zu den anderen Fluoreszenzlöschern stark erniedrigt. Die erhaltenen Werte für die Stern-Volmer-Konstanten der jeweiligen Fluorophore bei Fluoreszenzlöschung durch die drei Quencher verhalten sich uniform und sind bis auf zwei Ausnahmen sehr ähnlich zu den Werten für Tryptophan selbst. Für 5-Brom- und 7-Azatriptophan werden jedoch sehr stark unterschiedliche Stern-Volmer-Konstanten im Vergleich zu Tryptophan erhalten: 5-Bromtryptophan lässt sich im Vergleich zu Tryptophan wesentlich besser durch alle drei Fluoreszenzlöschler quenchen und die Stern-Volmer-Konstanten sind um Faktoren von bis zu 2,5 erhöht. Im Gegensatz dazu sind die Stern-Volmer-Konstanten von 7-Azatriptophan im Vergleich zu Tryptophan um bis zu einem Faktor von 3 verringert.

Bislang ist für die Tryptophan-Analoga nur eine Stern-Volmer-Konstante für Iodid-Quenching von 5-Hydroxytryptophan in wässriger Lösung veröffentlicht, die  $8,4 M^{-1}$  beträgt. [140] Dieser ist wesentlich geringer als der hier bestimmte Wert von  $12,63 M^{-1}$ . Die höhere Anzahl an Datenpunkten in der hier vorgestellten Arbeit sowie die gute Übereinstimmung der bestimmten Stern-Volmer-Konstanten für Tryptophan mit anderweitig publizierten Ergebnissen spricht jedoch für die Richtigkeit des ermittelten Wertes.

Da die Stern-Volmer-Konstante gemäß Gleichung (II.4) als das Produkt von der Fluorophor-Lebenszeit  $\tau_0$  und der bimolekularen Quenchkonstante  $k_q$  gegeben ist, können die stark unterschiedlichen Stern-Volmer-Konstanten sowohl auf die Interaktion der Fluorophore mit dem jeweiligen Quencher (über die Quenchkonstante  $k_q$ ) oder auf die Zeit, die der Fluorophor im angeregten Zustand verbringt und die ihm für Kontakte mit dem Quencher zur Verfügung steht (die Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_0$ ), zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurden aus den ermittelten Stern-Volmer-Konstanten mit den in Abschnitt V.VII bestimmten gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten die bimolekularen Quenchkonstanten der Fluorophore bestimmt.

Fluorophor	$k_{q,AA}$	$\Delta k_{q,AA}$	$k_{q,Cs}$	$\Delta k_{q,Cs}$	$k_{q,I}$	$\Delta k_{q,I}$
	$10^9 \cdot M^{-1} s^{-1}$					
5OHW	4,67	0,09	1,18	0,02	3,66	0,07
5OMeW	5,95	0,04	1,14	0,02	3,99	0,03
5MeW	6,63	0,04	1,53	0,05	5,06	0,08
5FW	5,88	0,08	0,70	0,02	5,11	0,10
5BrW	12,37	0,24	2,70	0,18	6,72	0,18
6FW	5,40	0,07	0,56	0,02	4,30	0,06
7NW	1,58	0,05	0,39	0,02	3,50	0,04
<b>W</b>	<b>6,62</b>	<b>0,07</b>	<b>0,99</b>	<b>0,03</b>	<b>4,71</b>	<b>0,06</b>

Tabelle VI.3 – Stern-Volmer-Konstanten für Quenching der angegebenen Tryptophan-Analoga mit Acrylamid (AA), Iodid (I<sup>-</sup>) und Cäsium (Cs<sup>+</sup>).

#### IV. Ermittlung von bimolekularen Quenchkonstanten

Tabelle VI.3 zeigt die berechneten bimolekularen Quenchkonstanten der Tryptophan-Analoga im Vergleich zu Tryptophan. Die enthaltenen Daten sind außerdem in Abbildung VI.4 graphisch dargestellt. Es ist deutlich zu ersehen, dass die Größe der gemittelten Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_0$  des Fluorophors nur zu einem geringen Teil für die bei 7-Azatriptophan und 5-Bromtryptophan stark unterschiedlichen Stern-Volmer-Konstanten verantwortlich ist, da die bimolekularen Quenchkonstanten sich ebenfalls für diese Verbindungen stark von denen für Tryptophan unterscheiden.

Die bimolekularen Quenchkonstanten  $k_q$  sind nach Gleichung (VI.1) [24] das Produkt aus der Quencheffizienz  $f_Q$  und der diffusionskontrollierten bimolekularen Stoßkonstante  $k_D$ :

$$K_D = k_Q \cdot \tau_0 = f_Q \cdot k_0 \cdot \tau_0 \quad (\text{VI.1})$$

Somit könnten theoretisch aus den Quenchkonstanten die Stoßkonstanten bestimmt werden. Da jedoch die Quencheffizienzen der untersuchten Quencher noch nicht präzise bestimmt wurden, wird an dieser Stelle darauf verzichtet. Es ist jedoch bekannt, dass die Quencheffizienzen von Iodid und Acrylamid nahezu eins sind, [24] wohingegen die Quencheffizienz von Cäsium ungefähr 0,2 beträgt. [84] Daraus kann dann für den Vergleich von Iodid-Quenching mit Acrylamid-Quenching gefolgert werden, dass sich die verringerten Stern-Volmer-Konstanten und ebenso die verringerten Quenchkonstanten auf erschwerte Diffusion des Quenchers Iodid im Vergleich zu Acrylamid in Lösung erklären lassen. Dies könnte z.B. dadurch begründet sein, dass Iodid aufgrund seiner Ladung eine Hydrathülle besitzt, die die Diffusion erschwert. Vergleiche zwischen den Stoßkonstanten von Iodid und

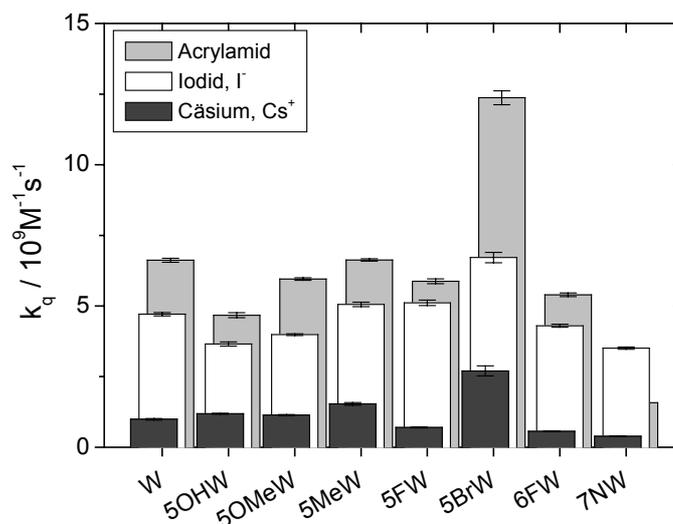


Abbildung VI.4 – bimolekulare Quenchkonstanten für Tryptophan und die untersuchten Tryptophan-Analoga für Quenching mit Acrylamid, Iodid ( $\text{I}^-$ ) und Cäsium ( $\text{Cs}^+$ ).

Cäsium werden hier aufgrund der Unsicherheit in den Werten für die Quencheffizienzen nicht gezogen.

Die Quenchkonstanten für 5-Bromtryptophan sind ebenso wie die Stern-Volmer-Konstanten dieses Fluorophores im Vergleich zu Tryptophan und den anderen Tryptophan-Analoga stark erhöht. Dies deutet darauf hin, dass die sehr hohen Stern-Volmer-Konstanten von 5-Bromtryptophan nicht etwa auf Effekten beruhen, die in einer sehr langen Fluoreszenzlebenszeit (entsprechend einer langen Zeit, in der die Deaktivierung des Fluorophors durch Quenching erfolgen kann) begründet liegen. Vielmehr kann dieser Fluorophor unabhängig von seiner Fluoreszenzlebenszeit sehr gut mit den Quenchern interagieren. Worauf dies beruht, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Möglich ist z.B. eine verminderte Hydratation für 5-Bromtryptophan, so dass ein Eindringen der Quencher zum Fluorophor vereinfacht wird.

Für 7-Azatriptophan sind dagegen die Quenchkonstanten nicht so stark wie im Vergleich zu den Stern-Volmer-Konstanten der anderen Analoga erniedrigt. Insofern sind die sehr geringen Stern-Volmer-Konstanten für 7-Azatriptophan für alle drei Quencher größtenteils in der kurzen gemittelten Fluoreszenzlebenszeit dieses Fluorophors begründet. Da 7-Azatriptophan im Vergleich mit den anderen Fluorophoren nur eine recht geringe Zeit im angeregten Zustand verweilt, steht auch weniger Zeit für eine Deaktivierung durch den Quencher zur Verfügung.

## V. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden erstmals systematische Quenching-Untersuchungen mit den drei gebräuchlichsten Fluoreszenzlöschern von Tryptophan an Tryptophan-Analoga in wässriger Lösung durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mit den Werten für Tryptophan verglichen, und, soweit Daten vorhanden waren, in den Kontext der Literatur gestellt. Für die meisten Tryptophan-Analoga wurde ein sehr ähnliches Quenching im Vergleich zu Tryptophan festgestellt. Für 5-Bromtryptophan und 7-Azatryptophan werden jedoch starke Abweichungen von Tryptophan beobachtet: Für 5-Bromtryptophan werden wesentlich vergrößerte Stern-Volmer-Konstanten beobachtet, die auf stark erhöhten Stoßkonstanten für den Fluorophor-Quencher-Kontakt beruhen. Für 7-Azatryptophan sind die Stern-Volmer-Konstanten stark erniedrigt. Anders als bei 5-Bromtryptophan ist dies aber auf die sehr kurzen Lebenszeit von 7-Azatryptophan zurückzuführen, die das zeitliche Fenster, in dem Fluorophor und Quencher miteinander wechselwirken können, minimiert.

Das festgestellte unterschiedliche Quenchverhalten dieser beiden Tryptophan-Analoga bietet ein neuartiges Anwendungspotential in Proteinfluoreszenzuntersuchungen: Durch die Verwendung von 5-Bromtryptophan kann eine sehr sensitive Probe in das Protein eingebracht werden, mit der genauer als mit Tryptophan selbst die Fluorophorzugänglichkeit bestimmt werden kann. Auch könnte es möglich sein, Quenching von 5-Bromtryptophan im Beisein weiterer Tryptophanreste zu untersuchen. Durch die Anwesenheit von 7-Azatryptophan in einem Protein, dessen Fluorophore mit Hilfe von Quenching-Untersuchungen auf ihre Zugänglichkeit hin untersucht werden sollen, kann des Weiteren die Interpretation der Daten vereinfacht werden: Da sich die Fluoreszenz von 7-Azatryptophan nur vermindert löschen lässt, kann durch Substitution ausgewählter Tryptophanreste mit 7-Azatryptophan ein Fluorophor eingebracht werden, der in Quenching-Untersuchungen nur einen geringen Beitrag zeigt. Somit kann durch die Alternative 7-Azatryptophan die Auswertung von Quenching-Daten bedeutend vereinfacht werden.

Die bislang noch nicht erfolgte Verwendung von Tryptophan-Analoga bei Quenching-Untersuchungen von Proteinen kann somit einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung von Proteinstrukturen über die Bestimmung von Fluorophorzugänglichkeiten liefern.



## VII. DAS REDOXABHÄNGIGE PROTEIN 2-CYSTEIN PEROXIREDOXIN

### I. *Biologische Relevanz*

Metabolische Reaktionen in aeroben Organismen laufen oft unter der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies („*reactive oxygen species*“; ROS) ab. Zu ihnen zählen nicht nur freie Radikale wie das Superoxid-Ion und das Hydroxyl-Radikal, sondern auch Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff. [141] Weitere Beispiele für ROS sind Alkylhydroperoxide, die durch chemische Reaktion von ungesättigten organischen Verbindungen mit Radikalen oder durch enzymatische Reaktion von mehrfach ungesättigten Lipiden mit Lipoxygenasen entstehen können. [142] In aeroben photosynthetischen Organismen entstehen reaktive Sauerstoffspezies speziell im Bereich der Elektronentransferketten in Mitochondrien und Chloroplasten, wohingegen in tierischen Organismen ROS vor allem in der Atmungskette gebildet werden. [3]

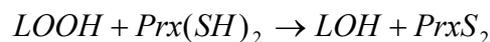
Da die ordnungsgemäße Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies im Pflanzenmetabolismus und in der molekularen Biologie nur unter genau kontrollierten Bedingungen gegeben ist, [141] wurde im Laufe der Evolution eine Reihe von Antioxidationssystemen entwickelt, um die schädlichen Einflüsse der ROS auf Nucleinsäuren, Lipide und Proteine, wie z.B. die Oxidation der Biomoleküle und die Einleitung von Kettenreaktionen, zu verringern. [143] Zu diesen Systemen zählen eine Vielzahl von Enzymen und nicht-enzymatischen niedermolekularen Verbindungen. [144]

In Pflanzen befindet sich die Hauptquelle der ROS am Photosystem I, wo Sauerstoff zusammen mit den entstandenen reduzierten Spezies zunächst zum Superoxid-Ion ( $O_2^-$ ) und dann zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgesetzt wird. In Chloroplasten kommen z.B. vier Typen von Entgiftungssystemen vor, die für das Abfangen der reaktiven Sauerstoffspezies auf Hydroperoxidbasis verantwortlich sind. Zu ihnen zählen die zwei Ascorbatperoxidasen (APx), die sich im Stroma bzw. an die Thylakoidmembran gebunden befinden, und die für die Reduktion von  $H_2O_2$ , aber nicht von Alkylhydroperoxiden verantwortlich sind. Außerdem existieren drei Typen von Enzymen, die für die Reduktion von Alkylhydroperoxiden verantwortlich sind - die Lipid-Hydroperoxid-Reductase, die stromale Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx) und das *dimere 2-Cystein Peroxiredoxin* (2-CP), das in dieser Arbeit untersucht wurde. [144]

Das dimere 2-Cystein Peroxiredoxin zählt zu der Gruppe der *Peroxiredoxine* (Prx). Diese Enzyme reduzieren verschiedene Alkylhydroperoxide und Wasserstoffperoxid mit Hilfe katalytisch aktiver Cysteinreste zu den entsprechenden Alkoholen bzw. Wasser. Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften der Peroxiredoxine ist, dass sie hämfreie Peroxidasen sind und deswegen auf einen externen Elektronendonator angewiesen sind. Da reduziertes

Thioredoxin oft die Rolle des Elektronendonors übernimmt, werden die Peroxiredoxine auch oft als Thioredoxin-Peroxidasen bezeichnet. [144]

Der Reaktionsmechanismus der Peroxiredoxine ist robust, unabhängig von sensitiven Cofaktoren und aktiv gegenüber einer hohen Zahl von Peroxiden. Dies macht sie, trotz ihrer geringen enzymatischen Effizienz mit Geschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung von  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , zu einem wichtigen Teil des antioxidierenden Verteidigungssystems in Pflanzenzellen. Nur unter nichtphysiologischen Bedingungen wird der katalytisch aktive Cysteinrest zur Sulfinsäure oxidiert und dadurch das Peroxiredoxin irreversibel inaktiviert. [145] Die von ihnen katalysierte Reduktion der Peroxide (*LOOH*) zu Alkoholen bzw. Wasser (*LOH*) unter Oxidation der Cysteinreste des Peroxiredoxins lässt sich über



formulieren. Peroxiredoxine kommen in allen Organismen von Archaeobakterien zu Säugetieren vor und sind zwischen 150 und 220 Aminosäuren groß. In Abhängigkeit von der Positionierung ihrer Cysteinreste innerhalb der Aminosäuresequenz und der Anordnung ihrer Untereinheiten werden die Peroxiredoxine in die Klassen der *1-Cystein Peroxiredoxine* (1-CP) und der *2-Cystein Peroxiredoxine* (2-CP) differenziert, die entsprechend ihrer Bezeichnung einen oder zwei konservierte Cysteinreste enthalten. [144,145]

In den 1-Cystein Peroxiredoxinen ist für die Katalyse nur der eine konservierte Cysteinrest verantwortlich, obwohl sie in einigen Organismen zusätzliche Cysteinreste enthalten können, die aber nicht am katalytischen Mechanismus beteiligt sind.

Für die 2-Cystein Peroxiredoxine können in Abhängigkeit des Katalysemechanismus und der Aminosäuresequenz drei Unterklassen differenziert werden: Die *dimeren 2-Cystein Peroxiredoxine* bestehen aus dimeren Enzymen, die über Disulfidbrücken aus zwei identischen Untereinheiten gebildet werden. Die Klasse der *monomeren Typ I Peroxiredoxine* besteht aus monomeren Enzymen, die eine intramolekulare Disulfidbrücke während der Katalyse zeigen. Bei ihnen sind die beiden die Disulfidbrücke bildenden Cysteine in der Regel durch vier Aminosäuren voneinander getrennt. Die dritte Klasse wird schließlich von den *monomeren Typ II Peroxiredoxinen* gebildet, die zwei Cysteine beinhalten, von denen aber nur eines für die katalytische Aktivität erforderlich ist.

Das hier zu untersuchende dimere 2-Cystein Peroxiredoxin zeichnet sich wie alle Peroxiredoxine durch seine variable Substratspezifität im Vergleich zu anderen antioxidierenden Enzymen aus: Neben Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) können sie ebenfalls Alkylhydroperoxide (*LOOH*) reduzieren. [143] Sie können aber des Weiteren auch aus Stickoxid und Superoxid gebildetes Peroxynitrit ( $\text{O}_2\text{NO}^-$ ) reduzieren, das ähnlich wie Peroxide DNA und Proteine durch Oxidation schädigen kann. [142] 2-Cystein Peroxiredoxine sind in der Lage, sich reversibel an der Thylakoidmembran anzulagern, [145] so dass sie vom Stroma in direkte Nähe zu den Photosystemen I und II, den Entstehungsorten ihrer Substrate, gelangen können (vgl. Abbildung VIII.1).

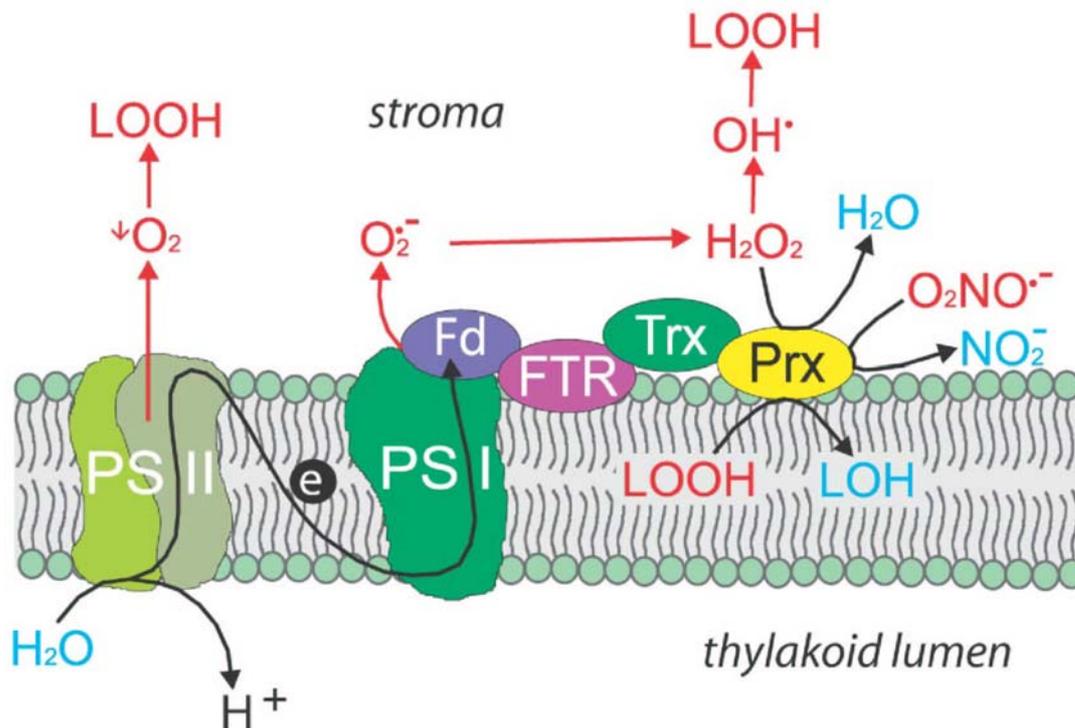


Abbildung VII.1 – Das 2-Cystein Peroxiredoxin (Prx), das sich an der Thylakoidmembran anlagern kann, katalysiert in Pflanzen die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Alkylhydroperoxiden (LOOH) und Peroxynitrit  $\text{O}_2\text{NO}^-$ , die bei der Photosynthese in den Photosystemen (PS) I und II entstehen. Die Regeneration kann durch Thioredoxin (Trx) erfolgen. (Abbildung entnommen aus [145])

Der Oxidationszustand der Cysteinreste der 2-Cystein Peroxiredoxine hat starken Einfluss auf ihre Struktur: Im oxidierten Zustand liegen 2-Cystein Peroxiredoxine antiparallel angeordnet und über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft als Dimere vor. [145] Bei Reduktion erfolgt in vielen Organismen oft jedoch keine Monomerisierung durch die Spaltung der Disulfidbrücken. Z.B. kann 2-Cystein-Peroxiredoxin aus *M. tuberculosis* als ringförmiges Dekamer (bzw. Penta-Dimer ( $\alpha_2$ )<sub>5</sub>) vorliegen, [146] das aus humanen Erythrocyten kristallisiert sogar im oxidierten Zustand dekamer. [147] Die Faktoren, die zu der Dekam-/Oligomerisierung des 2-Cystein Peroxiredoxins führen, sind noch nicht verstanden. [148] Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Oligomerisation des 2-Cystein Peroxiredoxins redoxsensitiv ist, da für das Protein aus *S. typhimurium* im oxidierten Zustand über Strukturanalysen, Lichtstreuungsexperimente und Untersuchungen der Sedimentation eine Favorisierung der Dimer-Struktur sowie niederer Oligomere berichtet wurde. Unter reduzierenden Bedingungen wird die dekamere ( $\alpha_2$ )<sub>5</sub>-Struktur bevorzugt. [148]

Das hier zu untersuchende 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste ist das erste identifizierte pflanzliche 2-Cystein Peroxiredoxin und wurde 1996 isoliert. Die Aminosäuresequenz ist in Abbildung VII.2 dargestellt. Von den 210 Aminosäuren sind 22 für spektroskopische

PDB-Eintrag	Ähnlichkeit	Organismen	Autor, Jahr
1QQ2	75 %	R. norvegicus	Hirotsu, 1999
1QMV	75 %	H. sapiens (Erythrocyten)	Schröder, 2000
1E2Y	66 %	C. fasciolata	Alphey, 2000
1KYG	58 %	S. typhimurium	Wood, 2002

Tabelle VII.1 – Homologie zwischen 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste und aus anderen Organismen. [149,150]

Untersuchungen interessant: zwei Tryptophane an den Positionen 99 und 189, sieben Tyrosine und dreizehn Phenylalanine.

## II. Strukturelle Vorüberlegungen

Für das 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste existiert bislang keine Kristallstruktur. Um einen Anhaltspunkt für die ungefähre Struktur des Proteins und speziell die Lage der zwei intrinsischen Tryptophanreste zu erhalten, wurden 2-Cystein Peroxiredoxine unterschiedlicher Organismen mit bekannter Struktur, die als Einträge in der „RCSB Protein Data Bank“ [149] zu finden sind, auf ihre Homologie<sup>6</sup> zu 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste untersucht. Die Homologie-Untersuchung wurde über einen paarweisen Abgleich der Primärsequenz mit Hilfe von *BLAST*<sup>®</sup> (= *B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool) durchgeführt, das auf der *BLAST*<sup>®</sup>-Homepage [150] kostenfrei zugänglich ist. Die Daten der vier gefundenen Proteine mit der größten Ähnlichkeit sind in Tabelle VII.1 aufgeführt.

Zu überprüfen ist, ob die Strukturen der gefundenen Proteine auch mit der für das Gersten-2-Cystein-Peroxiredoxin zu erwartenden übereinstimmt. Deswegen wurde für die Sequenz des Gersten-2-Cystein Peroxiredoxins mit Hilfe des online frei verfügbaren Tools *NPS@* (= *N*etwork *P*rotein *S*equences *@*nalysis) unter Verwendung mehrerer Verfahren<sup>7</sup> eine Sekundärstrukturvorhersage berechnet. [151] Über eine Zusammenfassung der Ergebnisse wurde eine Vorhersage für die Sekundärstruktur erhalten, die über eine farbliche Buchstaben-codierung für die erhaltenen Struktur motive im Vergleich zur Aminosäure-Sequenz in Abbildung VII.2 wiedergegeben ist.

<sup>6</sup> Identität bzw. Vergleichbarkeit der Aminosäuresequenz

<sup>7</sup> Bei diesen handelt es sich um die Vorhersagemethoden DPM, DSC, GOR4, HNNC, PHD, Predator, SIMPA96, SOPM und Second Consensus.



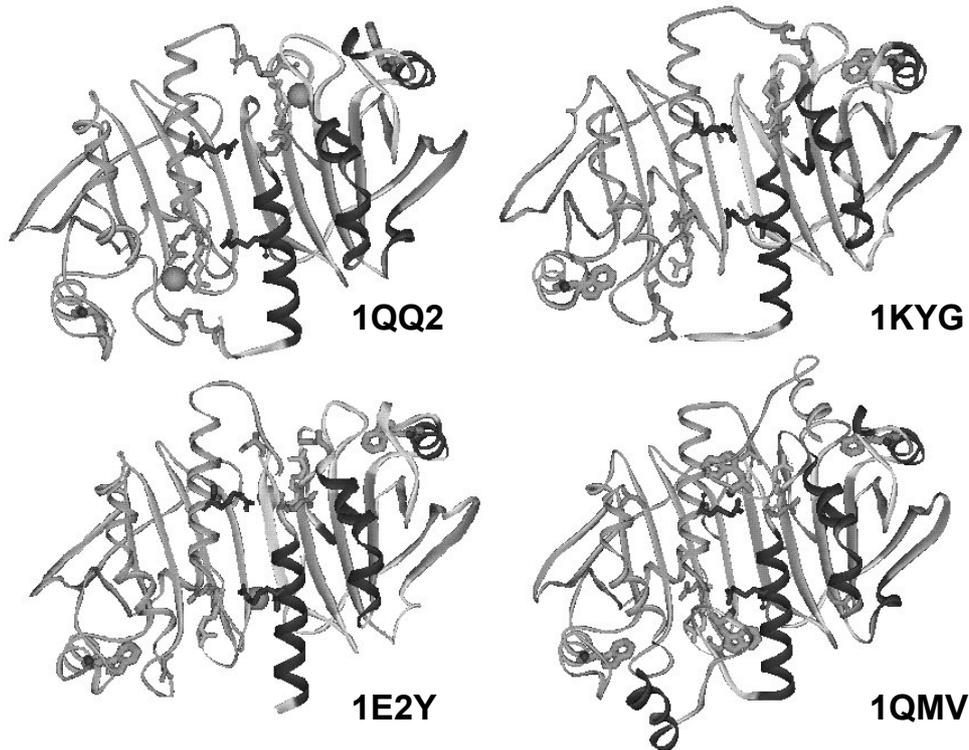


Abbildung VII.3 – Die Kristallstrukturen der Proteine mit höchster Homologie zu 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste. PDB-Eintrag bzw. Literaturstelle: 1QQ2 - [153]; 1KYG - [148]; 1E2Y - [154]; 1QMV - [147].

berechnete Sekundärstruktur-Vorhersage mit den Strukturen der vier kristallisierten Proteine deckt. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die veröffentlichten Kristallstrukturen als Basis für die Struktur des 2-Cystein Peroxiredoxins aus Gerste verwendet werden können.

Abbildung VII.3 zeigt eine Gegenüberstellung der vier veröffentlichten Strukturen: Trotz unterschiedlicher Oxidations- (1QQ2 und 1KYG liegen oxidiert, 1E2Y und 1QMV reduziert vor) und Aggregations-Zustände (1QQ2: Dimer, 1KYG: Pentamer-Fragment, möglicherweise Dekamer, 1E2Y und 1QMV: Dekamer) sind die jeweiligen Kristallstrukturen bei der Betrachtung einer einzelnen Dimer-Einheit unabhängig vom Oxidationszustand sehr ähnlich. Insofern ist davon auszugehen, dass auch das 2-Cystein Peroxiredoxins aus Gerste sehr ähnlich zu den vier gezeigten Strukturen ist.

Für den folgenden Strukturvergleich wurden die Strukturdaten des Thioredoxin-Peroxidase B aus humanen Erythrocyten (1QMV) gewählt, [147] das eines der beiden Proteine mit einer Sequenz-Homologie von 75 % ist. Außerdem ist es das einzige Protein, das auch einen vergleichbaren C-terminalen Bereich wie das 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste enthält (vgl. Abbildung VII.2). Die Struktur der humanen Thioredoxin-Peroxidase B ist in Abbildung VII.4 dargestellt. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde die eine Dimerhälfte entsprechend

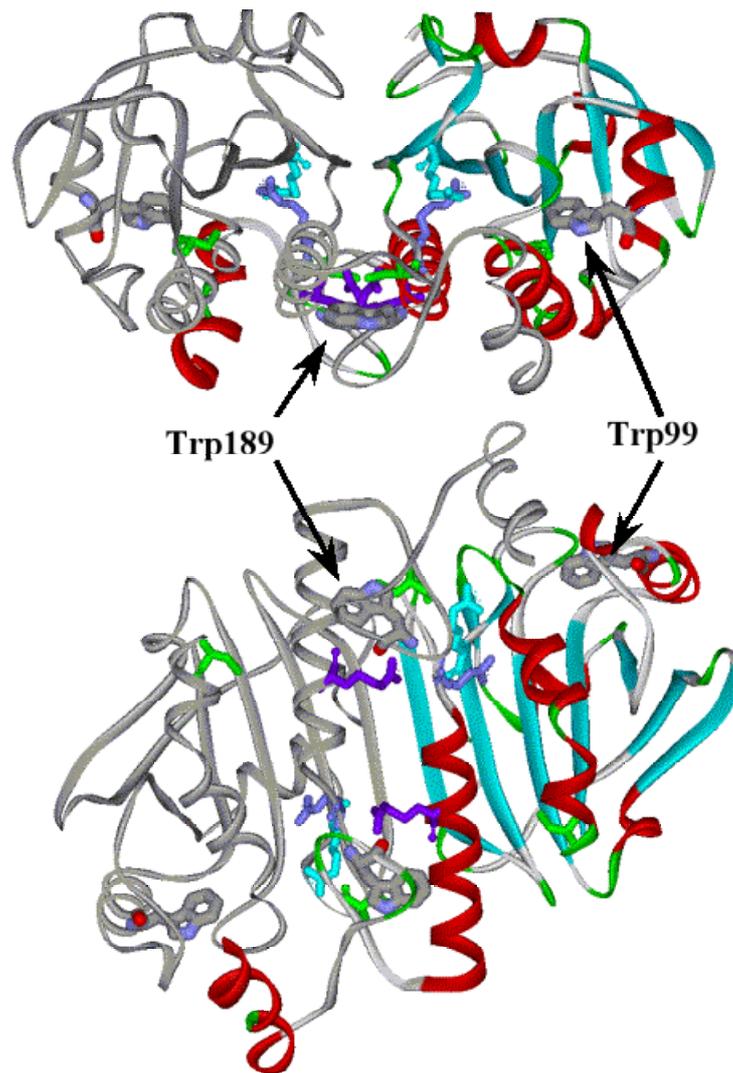


Abbildung VII.4 – Die Kristallstruktur der Thioredoxin-Peroxidase B aus Erythrocyten (2-Cystein Peroxiredoxin; 1QMV). [147] Die Kennung der gekennzeichneten Tryptophanreste entspricht ihrer Position im Gersten-2-Cystein Peroxiredoxin. Die Ansicht erfolgt aus zwei um 90° versetzten Winkeln („oben“ bzw. „vorne“).

ihrer Sekundärstrukturbereiche farblich gekennzeichnet und die andere einheitlich grau belassen.

Deutlich zu erkennen ist der für die Thioredoxin-Peroxidase B gegebene Aufbau der Dimere aus zwei halbschalenartigen Hälften mit einer recht geringen Kontaktfläche, speziell in der Aufsicht von oben. Die für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen relevanten jeweils zwei Tryptophanreste pro Monomereinheit befinden sich an einer sehr stark von der Dimer-Verbundstelle abgewandten Seite (Trp86 der Thioredoxin-Peroxidase B) bzw. direkt am Dimerverbund (Trp176). Beide Tryptophane befinden sich gemäß dieser Struktur nicht lösungsmittlexponiert, sondern relativ geschützt innerhalb des Proteins. Zu erwähnen ist

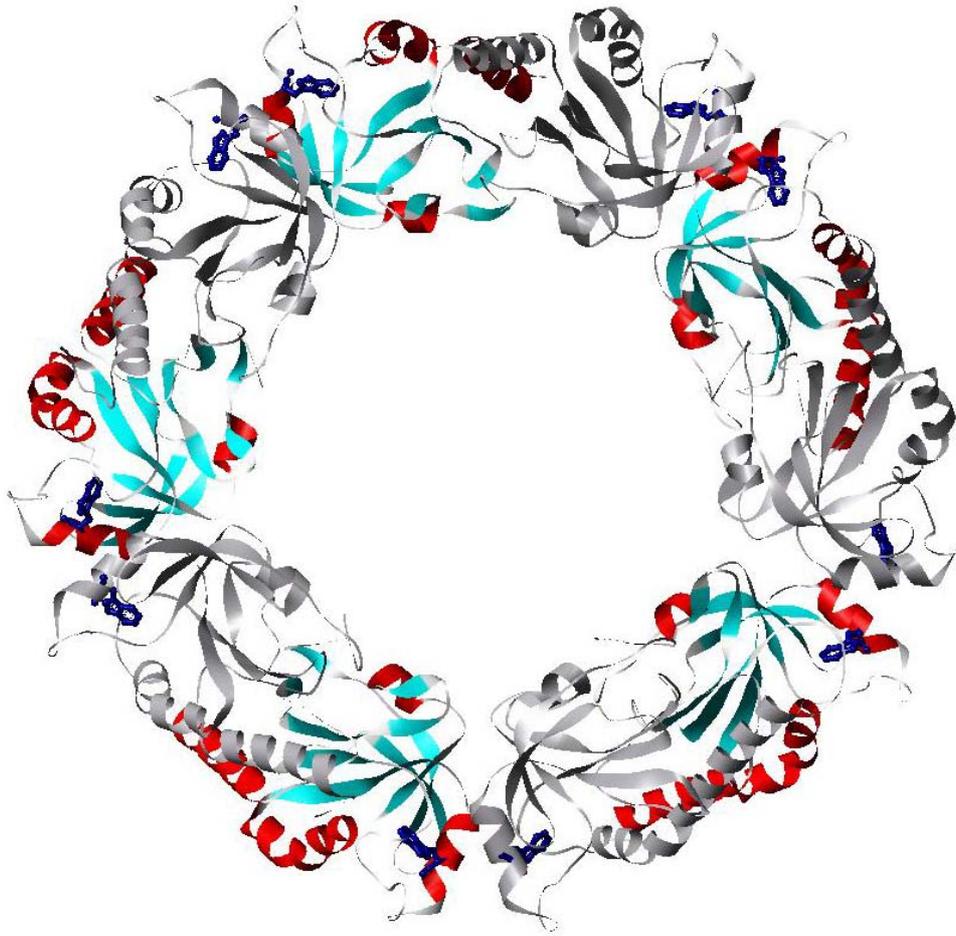


Abbildung VII.5 – Die Struktur des 2-Cystein Peroxiredoxin-Dekamers aus Erythrocyten. [147] Dunkelblau gekennzeichnet sind die Tryptophanreste, die Trp99 im Gersten-Protein entsprechen.

außerdem die starke Nähe des Tryptophanrestes 176 zum Cysteinrest 172. Über die erwähnten Analogieschlüsse ist für das 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste davon auszugehen, dass die erwähnten Tryptophane 86 und 172 der Thioredoxin-Peroxidase B den Tryptophanresten des Gersten-Proteins an den Positionen 99 und 189 entsprechen und sich diese somit ebenfalls am Dimerverbund bzw. an der vom Dimerverbund abgewandten Seite befinden. Auch ist davon auszugehen, dass sich der Tryptophanrest 189 in räumlicher Nähe zum Cysteinrest 185 befindet, der für die Ausbildung der Disulfidbrücke mit der anderen Dimerhälfte verantwortlich ist.

Zu erwähnen sind außerdem die drei farbig gekennzeichneten Argininreste der Thioredoxin-Peroxidase B an den Positionen 127 (cyan), 150 (blau) und 157 (violett), die aufgrund ihrer primär- und sekundär-strukturellen Daten den Argininresten 140, 163 und 170 des 2-Cystein Peroxiredoxins aus Gerste entsprechen dürften. Über einen Vergleich mit der Erythrocyten-Struktur ist davon auszugehen, dass sich der Tryptophanrest 189 des Gersten-Proteins in räumlicher Nähe zu den jeweiligen Argininen 140 und 163 *der gleichen* Dimerhälfte sowie in

Nähe zu dem Argininrest 170 der *gegenüberliegenden* Dimereinheit befindet. Interessant ist, dass am Dimerverbund solch eine starke Häufung polarer bzw. geladener Aminosäuren existiert. Dies deutet auf Dimerbildung nicht nur durch die Knüpfung zweier Disulfidbrücken, sondern auch auf eine zusätzliche Unterstützung durch polare bzw. ionische Wechselwirkungen hin.

### **III. Fragestellung**

Spektroskopisch soll nun überprüft werden, ob für das 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste die über Analogieschlüsse zu erwartende Struktur verifiziert werden kann. Dabei stützen sich die Untersuchungen auf die beiden intrinsischen Tryptophanreste des 2-Cystein Peroxiredoxins. Durch Verwendung geeigneter Einzeltryptophan-Mutanten werden selektiv die Fluoreszenzbeiträge der Tryptophanreste 99 und 189 untersucht. Die Analyse ausgewählter Arginin-defizienter Mutanten (R140Q, R163Q, R170Q) soll außerdem Informationen über ihr eventuelles Vorkommen in der Umgebung des Tryptophanrestes 189 liefern.

Betrachtet werden im Folgenden die erhaltenen Anregungs- und Emissionsspektren, sowie die ermittelten Lebenszeiten der beiden Fluorophore. Zugänglichkeiten der Fluorophore für neutrale (Acrylamid) und ionische Quencher (Iodid, Cäsium) sollen außerdem Schlüsse auf Lösungsmittelexposition und Ladungsverhältnisse der Umgebung zulassen. Durch Messungen in Abhängigkeit des Oxidationszustandes sollen Rückschlüsse auf strukturelle Veränderungen erhalten werden, da einige 2-Cystein Peroxiredoxine dekamer (vgl. Abbildung VII.5) bzw. oligomer vorliegen können, die Oligomerisierung jedoch auf unterschiedliche Effekte zurückgeführt wird, wie z.B. die Ionenstärke des Lösungsmittels und den Oxidationszustand. Ein Teil der hier vorgestellten Ergebnisse wurde bereits in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. K.-J. Dietz veröffentlicht. [155]

### **IV. Fluoreszenzanalyse der 2-CP-Mutanten W99L und W189L**

#### **a) Anregungs-Emissionsspektren von 2-CP**

In Abbildung VII.6 sind die Anregungs-Emissions-Spektren von oxidiertem 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste sowie seinen beiden Einzeltryptophan-Mutanten W99L und W189L dargestellt.

Im Vergleich zu dem in Abbildung III.4 dargestellten Anregungs-Emissions-Spektrum von Tryptophan in wässriger Lösung ist der Fluoreszenzbeitrag der beiden Tryptophanreste im nativen Protein blau verschoben. Dies ist typisch für Tryptophanfluoreszenz von Proteinen: Aufgrund der Abschirmung durch die anderen Aminosäuren innerhalb des nativen Proteins sind die Tryptophanreste dort verminderter Lösungsmittelrelaxation ausgesetzt, was zu einer Blauverschiebung der Fluoreszenz führt (vgl. Abschnitt II.III.d). Eine genaue Diskussion über das Ausmaß der Blauverschiebung der 2-Cystein Peroxiredoxin-Fluoreszenz und speziell die

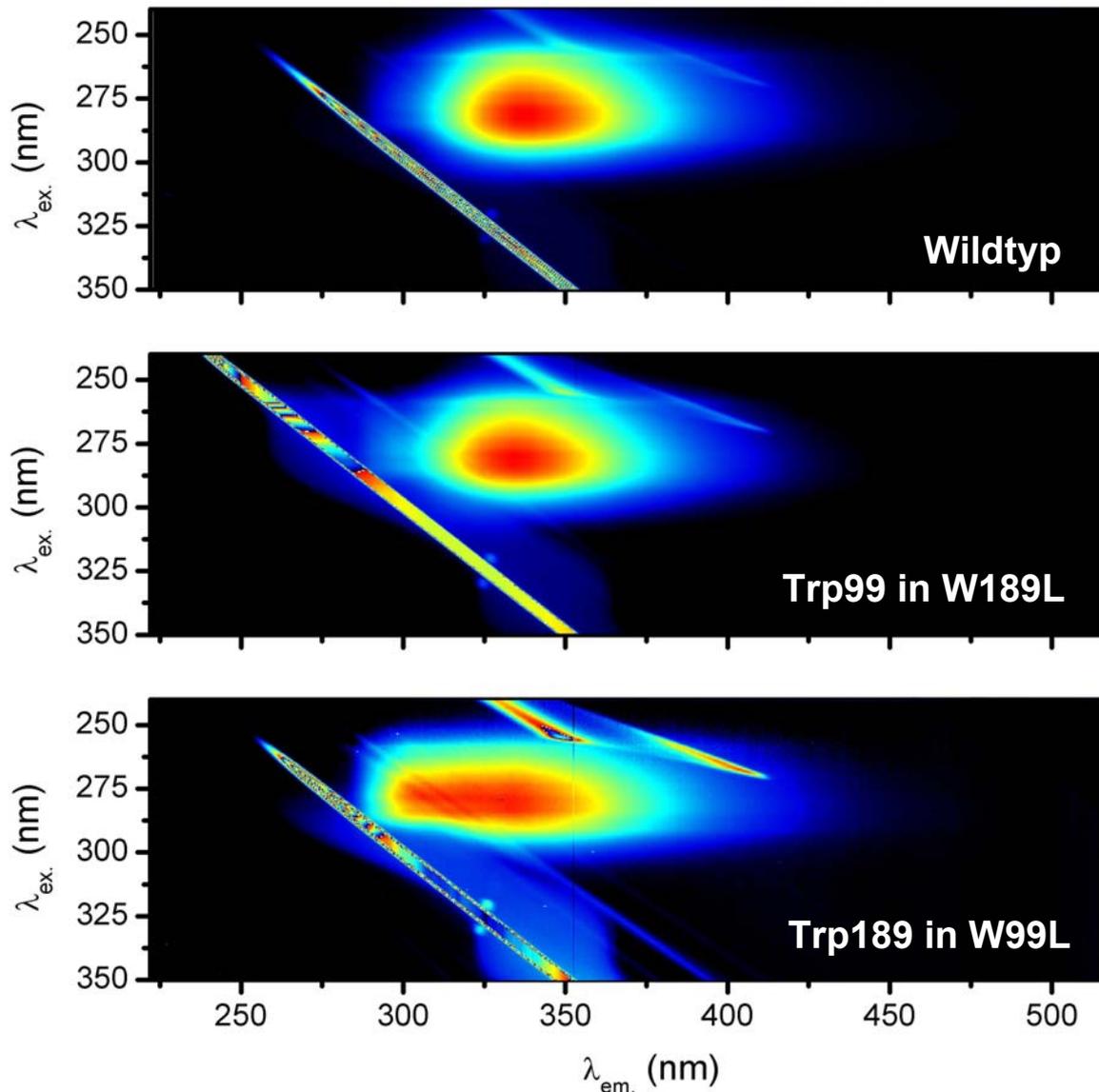


Abbildung VII.6 – Die Anregungs-Emissions-Spektren des 2-Cystein Peroxiredoxin-Wildtyps und der Mutanten W189L und W99L. Diese Einzeltryptophan-Mutanten liefern die reinen Fluoreszenzbeiträge der beiden 2-CP-Tryptophane an den Positionen 99 (Trp99) und 189 (Trp189). Zur besseren Vergleichbarkeit sind die AES auf den Maximalwert der Fluoreszenzintensität normiert.

Analyse über die Lage der Emissionsmaxima der Einzeltryptophan-Mutanten erfolgt in Abschnitt VII.IV.b).

Obwohl im Wildtyp des 2-Cystein Peroxiredoxins sieben Tyrosine im Vergleich zu nur zwei Tryptophanen vorkommen, wird fast keine Fluoreszenz von Tyrosin im charakteristischen Emissionswellenlängenbereich von 300 bis 310 nm beobachtet. Dies ist neben Tyrosinatbildung oder Quenching der Tyrosinfluoreszenz im Protein vor allem auf FRET von Tyrosin auf Tryptophan innerhalb des Proteins (vgl. Abschnitt II.IV.b) zurückzuführen und

deutet damit auf eine der recht kompakte Struktur des 2-CP hin, in der sich die 14 Tyrosine der untersuchten 2-Cystein-Peroxiredoxin-Dimere im Mittel nicht weit entfernt von einem der vier Tryptophanreste als den potentiellen Fluoreszenz-Akzeptoren befinden.

Ein Vergleich mit der Struktur der dimeren Thioredoxin-Peroxidase B [147] bestätigt dies: Dort sind die Abstände zwischen Tyrosin und seinem jeweils nächsten benachbarten Tryptophanrest zwischen 5 und 20 Å groß und somit vergleichbar mit den in Abschnitt II.IV.b) für Tryptophan und Tyrosin erwähnten Förster-Radien. Somit kann theoretisch jeder Tyrosinrest einen großen Teil seine Anregungsenergie über FRET auf einen der vier Tryptophanreste übertragen.

Die Einzeltryptophan-Mutanten des 2-Cystein-Peroxiredoxins zeigen in den AES interessante Abweichungen vom Wildtyp: Das Spektrum der nur die Fluoreszenz des Tryptophanrestes Trp99 zeigenden Einzeltryptophan-Mutante 2-CP W189L<sup>8</sup> weicht nur gering von dem des Wildtyps ab. Im Gegensatz dazu ist das AES der Mutante mit nur dem einzelnen Tryptophanrest Trp189 stark unterschiedlich: Vor allem ist augenfällig, dass im Emissionswellenlängen-Bereich von 300 bis 310 nm für Trp189 eine deutliche Fluoreszenzzunahme zu beobachten ist. Dies ist nicht auf eine extreme Blauverschiebung der Fluoreszenz dieses Tryptophanrestes im Vergleich zu den Spektren des Wildtyps zurückzuführen. Wahrscheinlicher ist dagegen, dass die Fluoreszenzerhöhung in diesem Bereich auf verminderten Tyrosin-Tryptophan-Energietransfer zurückzuführen ist, so dass im Spektrum des Proteins jetzt verstärkt Beiträge von sowohl Tyrosin als auch Tryptophan zu erkennen sind. Dafür spricht, dass sich im rot verschobenen Bereich des Spektrums die Fluoreszenz nicht signifikant verringert. Dies führt zu einer asymmetrischen Form des Spektrums, die auf Emission von mehr als einem Fluorophor zurückzuführen ist.

Daraus kann abgeleitet werden, dass es einen Tryptophanrest im 2-Cystein Peroxiredoxin gibt, der hauptsächlich als Akzeptor für Energietransfer von Tyrosin aus dient. Bei diesem handelt es sich um den Tryptophanrest an Position 99. Diese Beobachtung kann auf mehrere Arten gedeutet werden. Die einfachste und wahrscheinlichste Erklärung ist, dass sich der Großteil der Tyrosinreste in der Nähe von Trp99 und nicht in der Nähe von Trp189 befinden, da so die Energietransfereffizienz auf Trp99 aufgrund des geringeren Abstandes gemäß Gleichung (II.39) höher ist. Es kann jedoch auch zusätzliche Gründe geben: Der Tyrosinrest, der sich gemäß der in Abbildung VII.4 gezeigten Kristallstruktur in nächster Nachbarschaft zu einem Tryptophan um 2-CP befindet, ist der Tyrosinrest 164 in einer Entfernung von ca. 5 Å. Es wäre somit zu erwarten, dass er alle seine Anregungsenergie auf einen Akzeptor überträgt. Sein nächster Nachbar ist jedoch nicht ein Trp99, sondern ein Trp189. Energietransfer von Tyr164 auf Trp189 könnte nun z.B. trotz großer Nähe nicht stattfinden, wenn die Orientierung der beiden Fluorophore stark ungünstig ist. Dies ist jedoch

---

<sup>8</sup> In dieser Mutante ist der Tryptophanrest (W) an Position 189 durch ein Leucin (L) substituiert. Analog dazu zeigt die Mutante W99L nur die Fluoreszenz des Tryptophanrestes Trp189, weil bei ihr der Tryptophanrest Trp99 durch Leucin ersetzt wurde.

unwahrscheinlich, weil eine gewisse Bewegungsfreiheit innerhalb des Proteins immer noch gegeben sein sollte. Möglich wäre jedoch auch, dass kein Energietransfer von Tyrosin auf Tryptophan stattfindet, wenn in der Umgebung des Trp189 kein Tyrosin, sondern das in polarer Umgebung gebildete Tyrosinat vorliegt. Da die Fluorophorumgebung am Dimerverbund des 2-CP stark polar ist, könnte diese Erklärung für verminderten Energietransfer auf Trp189 außerdem in Betracht kommen. Energietransfer von einem beliebigen Tyrosin auf Trp189 wäre außerdem nicht (als eine Zunahme an Tryptophanfluoreszenz) zu beobachten, wenn die Fluoreszenz von Trp189 stark gequencht wäre.

Die starke Zunahme an linearen Streulichtphänomenen und anderen Anomalien in den AES bei Betrachtung der Einzeltryptophan-Mutanten (speziell von Trp189) ist neben der Normierung der Spektren auf den Maximalwert der Fluoreszenz auf Trübungen in den Lösungen zurückzuführen. Trp99 alleine zeigt eine geringere Fluoreszenzintensität als der Wildtyp, noch geringer ist die von Trp189. Diese Effekte sind darauf zurückzuführen, dass die Isolierung des Wildtyps unter einer höheren Ausbeute als der der Mutanten erfolgte: Die verwendeten Proteinstammlösungen<sup>9</sup> wurden deswegen zu unterschiedlichen Mengen bei der Präparation von Proben gleicher Konzentration verwendet, dementsprechend sind die Anteile an bei der Proteinaufarbeitung anfallenden Verunreinigungen für die Proben der untersuchten Einzeltryptophan-Mutanten höher als für den Wildtyp.

Unter der Voraussetzung, dass die in Abbildung VII.4 gezeigte Struktur stark ähnlich zu der des 2-Cystein Peroxiredoxins der Gerste ist, kann somit in Kombination mit dem Spektrum des Wildtyps und denen der Einzeltryptophan-Mutanten geschlossen werden, dass der Großteil der Proteinfluoreszenz des 2-Cystein Peroxiredoxins von Trp99 stammt, da sich die Spektren des Wildtyps und von Trp99 nicht wesentlich unterscheiden. Dies ist überraschend, da sich nach der Kristallstruktur der Tryptophanrest Trp99 in einer weiter außen befindlichen Position im Protein befindet und deswegen nach herkömmlichen Überlegungen eine geringere Fluoreszenzintensität (aufgrund der größeren Fluorophor-Zugänglichkeit für Wasser) zeigen sollte. Da sich der Tryptophanrest Trp189 nach der Kristallstruktur direkt am Dimerverbund befinden soll, wäre davon auszugehen, dass er sich in einer unpolaren, lösungsmittel-ausschließenden Umgebung tief im Inneren des gebildeten Dimers befindet. Unter Annahme der in Abbildung VII.4 gezeigten Kristallstruktur könnte die verminderte Fluoreszenzintensität von Trp189 z.B. durch eine geladene Umgebung am Dimerverbund verursacht werden.

#### **b) Emissionsspektren des 2-Cystein Peroxiredoxins**

Aus den Anregungs-Emissions-Spektren wurden die Emissionsspektren des Wildtyps und der Mutanten im oxidierten Zustand bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$  ermittelt und aus ihnen die reinen Tryptophanbeiträge zur Gesamtfluoreszenz des Proteins durch

---

<sup>9</sup> Die Konzentration des Wildtyp-Stammlösung betrug  $40,49 \mu\text{M}$ , die für die Einzeltryptophan-Mutanten  $25,30 \mu\text{M}$  (Trp99) bzw. sogar nur  $18,22 \mu\text{M}$  (Trp189).

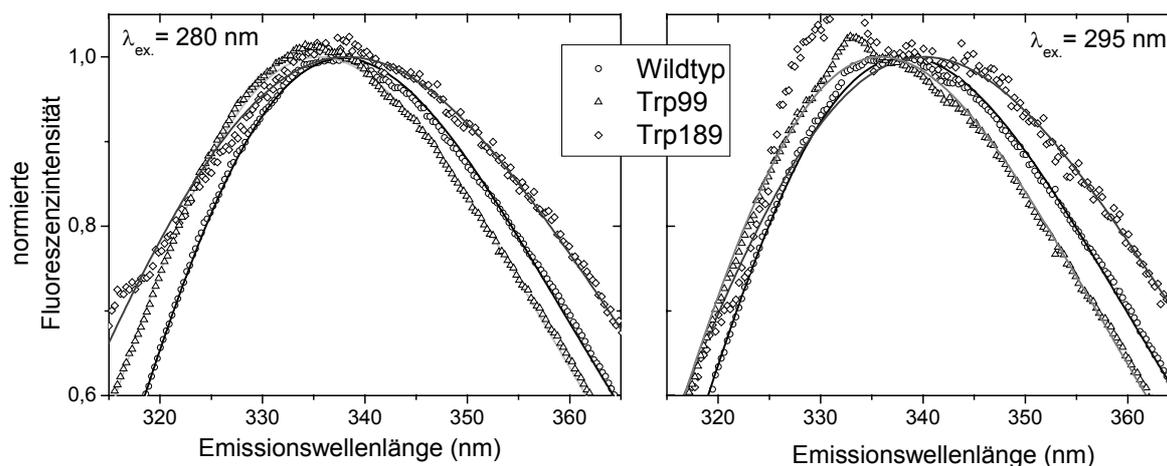


Abbildung VII.7 – Die Emissionsspektren des 2-Cystein Peroxiredoxin-Wildtyps und seiner Einzeltryptophan-Mutanten bei Anregungswellenlängen von 280 bzw. 295 nm. Ebenfalls eingezeichnet sind die angepassten Lognormal-Verteilungen.

	$\lambda_{em., max} (nm)$ ( $\lambda_{ex.} = 280 nm$ )	$\lambda_{em., max} (nm)$ ( $\lambda_{ex.} = 295 nm$ )
<b>Wildtyp</b>	338,1	338,4
<b>Trp99</b>	335,5	335,9
<b>Trp189</b>	338,3	340,1

Tabelle VII.2 – Über die Anpassung einer Lognormal-Verteilung erhaltene Emissionsmaxima für die Spektren des 2-Cystein Peroxiredoxin-Wildtyps und seiner Einzeltryptophan-Mutanten bei Anregungswellenlängen von 280 bzw. 295 nm.

Subtraktion eines entsprechend gewichteten Tyrosinspektrums gleicher Anregungswellenlänge erhalten. Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch evtl. fehlerhaft subtrahierte Beiträge von Tyrosin vom Gesamtspektrum des 2-Cystein Peroxiredoxins bei den Spektren auszuschließen, werden in Abbildung VII.7 die Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{ex.} = 280 nm$  mit denen bei  $\lambda_{ex.} = 295 nm$  verglichen. Diese sollten wegen des geringen Absorptionskoeffizienten von Tyrosin bei dieser Wellenlänge nur Tryptophanfluoreszenz zeigen. Aufgrund der geringen Quantenausbeute von Tryptophan bei 295 nm und wegen der teils starken Trübung der Proben werden dabei jedoch neben dem starken Ramansignal bei 328 nm auch starke zusätzliche Abweichungen durch Streulicht beobachtet, die nicht eliminiert werden konnten.

Um die Lage der Emissionsmaxima für die Emissionsspektren präzise zu bestimmen, wurden ohne Berücksichtigung der Streulicht zeigenden Bereiche Anpassungen an die Messdaten mit

einer Lognormal-Verteilung nach Gleichung (II.25) durchgeführt, aus denen die in Tabelle VII.2 dargestellten Emissionsmaxima in Nanometern durch Umrechnung aus der maximalen Wellenzahl  $\tilde{\nu}_m$  erhalten wurden. Zwischen den experimentellen Datensätzen und ihren Anpassungen ist eine gute Übereinstimmung, mit Ausnahme der Bereiche, in denen starkes Streulicht detektiert wird, zu beobachten. Das Spektrum des Wildtyps des 2-Cystein Peroxiredoxins zeigt ein Emissionsmaximum um 338 nm, wohingegen die beiden Einzeltryptophan-Mutanten im Einklang mit der Tatsache, dass sich das Spektrum des Wildtyps aus einer Kombination der beiden Spektren der Einzeltryptophan-Mutanten ergeben muss, dazu leicht rot (Trp189, Emissionsmaximum  $\lambda_{em., max} \approx 339$  nm) bzw. stärker blau verschoben (Trp99,  $\lambda_{em., max} \approx 336$  nm) sind. Nach der Klassifizierung nach Burstein [87] liegen diese beiden Tryptophane genau zwischen den beiden Grenzfällen für die Klasse der abgeschirmten Tryptophanreste (Klasse I;  $\lambda_{em., max} = 330-332$  nm) und für die eines an der Oberfläche angesiedelten Tryptophanrest (Klasse II;  $\lambda_{em., max} = 340-342$  nm).

Aus den unterschiedlichen Emissionsmaxima der Einzeltryptophan-Mutanten lässt sich ableiten, dass sich der Tryptophanrest 189 in einer etwas polarerer Umgebung im 2-Cystein Peroxiredoxin befindet als der Tryptophanrest 99. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den vermutlichen Positionen der beiden Tryptophanreste, wie sie in Abbildung VII.4 zu erkennen sind, überrascht: Der Tryptophanrest 189, der sich nach der Analyse der Spektren in einer polarerer Umgebung als der Tryptophanrest 99 befindet, erscheint in der Vergleichsstruktur weniger lösungsmittelzugänglich.

Erklärt werden kann dies durch eine zwar *geringere* Lösungsmittel-Zugänglichkeit, aber trotzdem *höhere* Umgebungspolarität durch z.B. stark geladene Aminosäuren in der Nähe des Tryptophanrestes 189 (sowohl nach Primärsequenz als auch Vergleichsstruktur wäre dies möglich), die ähnlich wie umgebende Lösungsmittelmoleküle für die durch Dipolrelaxation entstehende Rotverschiebung der Fluoreszenz verantwortlich sein könnten.

Im Prinzip sollte es möglich sein, aus den Spektren der Einzeltryptophan-Mutanten das Spektrum des 2-Cystein Peroxiredoxin-Wildtyps zu berechnen. Aufgrund des potentiell fehleranfälligen Abzugs der Tyrosin-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{ex.} = 280$  nm und wegen des starken Streulicht-Anteils in den relevanten Bereichen der Emissions-Spektren bei  $\lambda_{ex.} = 295$  nm wurde hier jedoch darauf verzichtet, da alternativ dazu die Fluoreszenzabklingkurven verwendet werden können, um die Beiträge der einzelnen Tryptophanreste zu der Gesamtfluoreszenz des Proteins zu bestimmen. Es ist jedoch deutlich zu sehen, dass der Tryptophanrest 189 einen geringeren Anteil als der Tryptophanrest 99 zum Gesamtspektrum leistet, da einerseits das normierte Spektrum des Tryptophanrestes 99 weniger vom Wildtyp-Spektrum abweicht und zudem das Emissionsspektrum des Tryptophanrestes 189 im nicht normierten Fall unter gleichen Aufnahmebedingungen wesentlich geringere Fluoreszenzintensitäten (und damit für Trp189 eine geringere Quantenausbeute) aufweist.

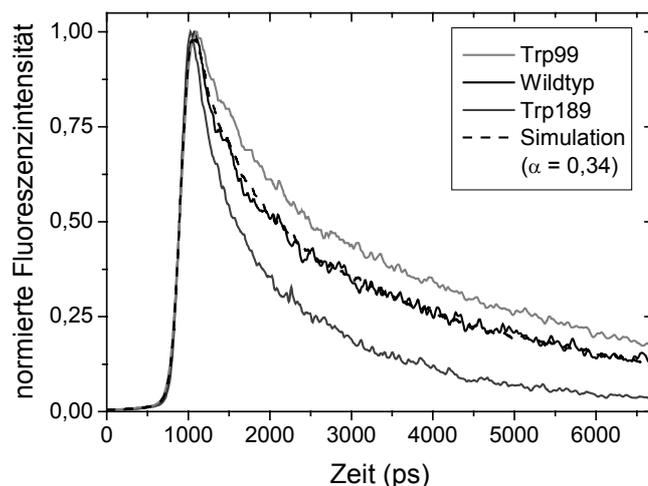


Abbildung VII.8 – normierte Fluoreszenzabklingkurven für Wildtyp und Einzeltryptophan-Mutanten des 2-Cystein Peroxiredoxins im oxidierten Zustand. Die Anregungswellenlänge betrug  $\lambda_{\text{ex.}} = 280$  nm, der ausgewertete Emissionswellenlängenbereich umfasste einen 10 nm-Bereich von 332,5 bis 342,5 nm.

	$a_1$	$\tau_1$ (ps)	$a_2$	$\tau_2$ (ps)	$\tau_{m-a}$ (ps)
<b>Wildtyp</b>	0,524	3412	0,476	411	1981
<b>Trp99</b>	0,633	3750	0,367	517	2532
<b>Trp189</b>	0,416	1819	0,584	325	934

Tabelle VII.3 – Daten der biexponentiellen Anpassungen an die Fluoreszenzabklingkurven in Abbildung VII.8. Aufgeführt sind die Amplituden  $a_1$  und  $a_2$  der beiden Exponentialausdrücke sowie die Lebenszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ . Ebenfalls dargestellt ist die Amplituden-gemittelte Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_{m-a}$  (vgl. Kapitel III.II.d).

### c) Fluoreszenzlebenszeit-Untersuchungen

In Abbildung VII.8 sind die für den Bereich der Emissionsmaxima ermittelten normierten Fluoreszenzabklingkurven des 2-Cystein Peroxiredoxin-Wildtyps und der Einzeltryptophan-Mutanten dargestellt. Die Fluoreszenzabklingkurven der Mutanten weichen deutlich von der des Wildtyps ab: Für Trp99 wird ein langsames Abklingen der Fluoreszenz beobachtet, für Trp189 ein deutlich schnelleres. Dies zeigt wiederum, dass der Tryptophanrest 189 wesentlich stärkerem Quenching ausgesetzt ist als der Tryptophanrest 99.

Die über biexponentielle Anpassungen erhaltenen Fluoreszenzlebenszeiten sowie deren relative Amplituden für das 2-Cystein Peroxiredoxin bzw. die Einzeltryptophan-Mutanten

sind in Tabelle VII.3 dargestellt. Relativ zu Tryptophan in Lösung<sup>10</sup> sind die gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten der Proteine erniedrigt, für die Mutante Trp189 sogar sehr stark. Obwohl also die fluoreszierenden Reste in eine abschirmende Proteinmatrix eingebettet sind, sind ihre Fluoreszenzlebenszeiten niedriger als für freies Tryptophan. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sich der Tryptophanrest 189 in einer stark geladenen Umgebung innerhalb des Proteins befindet, die stark quenchend auf die Fluoreszenz wirkt. Die Umgebung des Tryptophanrestes 99 wirkt im Vergleich dazu weniger quenchend auf die Fluoreszenz der entsprechenden Einzeltryptophan-Mutante, da sich dieser in einer weniger polaren Umgebung befindet, wie dies bereits auch bei der Bestimmung der Emissionsmaxima festgestellt werden konnte. Die Umgebung des Tryptophanrestes 189 wird in Kapitel VII.VI mit Hilfe von entsprechenden Ausschlussmutanten analysiert.

Die Unterschiede in den langen und kurzen Fluoreszenzlebenszeiten für den Wildtyp und die Mutanten sind vergleichbar zu den Veränderungen der gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten und werden deswegen an dieser Stelle nicht diskutiert.

Die Fluoreszenzabklingkurven der beiden Einzeltryptophan-Mutanten können dazu verwendet werden, das Abklingen der Fluoreszenz des Wildtyps gemäß

$$\text{Spektrum (Wildtyp)} = \alpha \cdot \text{Spektrum (Trp189)} + (1 - \alpha) \cdot \text{Spektrum (Trp99)} \quad (\text{VII.1})$$

zu simulieren (vgl. Abbildung VII.8, Simulation). Der so ermittelte Anteil  $\alpha$ , den dabei der Tryptophanrest 189 zur Gesamtfluoreszenz des 2-Cystein Peroxiredoxins beiträgt, kann als  $\alpha = 0,34$  bestimmt werden. Insofern trägt der Tryptophanrest 189 wesentlich weniger zur Gesamtfluoreszenz des Proteins bei als sich aus seiner Positionierung gemäß der Kristallstruktur ableiten lassen würde. Dies ist im Einklang mit den vorherigen Überlegungen, die aufgrund des starken Quenchings des Tryptophanrestes 189 auf eine nur geringe Beteiligung zur Gesamt-Proteinfluoreszenz hindeuteten.

Es sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Berechnung des Wildtypspektrums aus den Spektren der Einzeltryptophan-Mutanten aufgrund der unterschiedlich gegebenen Möglichkeiten des Energietransfers von Tyrosin auf Tryptophan nur eingeschränkt möglich ist. Gemäß den Informationen aus den AES der Einzeltryptophan-Mutanten erfolgt fast vollständiger Energietransfer von den 14 Tyrosinresten des dimeren 2-Cystein Peroxiredoxins auf Trp99 und, wenn überhaupt, nur eingeschränkter Energietransfer auf Trp189. Deswegen können Abweichungen zwischen der berechneten und der tatsächlichen Gewichtung der beiden Tryptophanreste bei der Gesamtfluoreszenz des Proteins nur dadurch zustande kommen, dass der Fluoreszenzbeitrag von Trp189 zu stark bewertet wird. Dies ist der Fall, wenn der Tryptophanrest 189 in der Einzeltryptophan-Mutante der Akzeptor für Energietransfer von Tyrosinresten ist, die im Wildtyp ihre Anregungsenergie auf Trp99

<sup>10</sup> Fluoreszenzlebenszeiten für Tryptophan in Wasser:  $\tau_m = 2943$  ps,  $\tau_l = 3117$  ps sowie  $\tau_2 = 580$  ps (bestimmt durch eigene Messungen am Emissionsmaximum  $\lambda_{em} = 353$  nm, vgl. Abschnitt IV.III).

übertragen. Eine zu schwache Bewertung des Fluoreszenzbeitrags von Trp189 aus den Abklingkurven der Einzeltryptophan-Mutante kann im Gegensatz dazu nicht erfolgen, da es nicht wahrscheinlich ist, dass bei bereits vollständigem Energietransfer von Tyrosin auf Trp99 in der Einzeltryptophan-Mutante stattdessen im Wildtyp Energietransfer von diesen Tyrosinresten auf Trp189 erfolgt. Infolgedessen ist der prozentuale Anteil von Trp189 zum Abklingen der Gesamtfluoreszenz kleiner oder gleich 34 %.

## **V. *Untersuchung der redoxabhängigen Oligomerisierung***

Im Folgenden soll überprüft werden, ob 2-Cystein Peroxiredoxin in Abhängigkeit des Oxidationszustandes oligomerisiert. Aus diesem Grund werden zunächst die Emissionsspektren der reduzierten Einzeltryptophan-Mutanten auf Veränderungen im Vergleich zu den Spektren der oxidierten Verbindungen untersucht und dann die Fluoreszenzlebenszeiten der oxidierten und reduzierten 2-Cystein Peroxiredoxine miteinander verglichen. Zeitaufgelöste Quenching-Untersuchungen für die jeweils oxidierten und reduzierten Einzeltryptophan-Mutanten sollen Unterschiede in der Umgebung der jeweiligen Tryptophanreste identifizieren. Die Reduktion der Proben erfolgte dabei durch Zusatz von 10 mM reduziertem Dithiothreitol.

### **a) *Emissionsspektren***

Die Emissionsspektren des Wildtyps des reduzierten 2-Cystein Peroxiredoxins und seiner Einzeltryptophan-Mutanten unterscheiden sich nur unwesentlich von den in Abbildung VII.7 dargestellten Emissionsspektren der Proteine im oxidierten Zustand. Aus diesem Grund wird auf ihre Darstellung und Diskussion an dieser Stelle verzichtet. Dies Ergebnis ist nicht außergewöhnlich, da Fluoreszenzlebenszeiten und selektive Quenching-Untersuchungen wesentlich sensitiver als die generelle Form der Emissionsspektren bzw. ihre Emissionsmaxima Veränderungen in der Fluorophorumgebung aufweisen.

### **b) *Fluoreszenzlebenszeiten der Proteine im reduzierten Zustand***

Abbildung VII.9 zeigt die normierten Fluoreszenzabklingkurven von 2-Cystein Peroxiredoxin und seinen Einzeltryptophan-Mutanten im reduzierten Zustand. Die Daten der angepassten biexponentiellen Fitfunktionen sind in Tabelle VII.4 dargestellt. Abbildung VII.10 visualisiert die Unterschiede in den gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten zwischen dem oxidierten und reduzierten Zustand.

Der Vergleich mit den Daten für die oxidierten Proteine zeigt, dass für das reduzierte 2-Cystein Peroxiredoxin und seine Mutanten die gemittelte Fluoreszenzlebenszeit größer ist als im oxidierten Zustand. Daraus kann geschlossen werden, dass im reduzierten Zustand die Tryptophanfluoreszenz weniger stark gequenchet wird. Ähnliches gilt im Rahmen der Messgenauigkeit für die langen und kurzen Fluoreszenzlebenszeiten: Sie sind im Vergleich zum oxidierten Zustand leicht erhöht oder bleiben gleich.

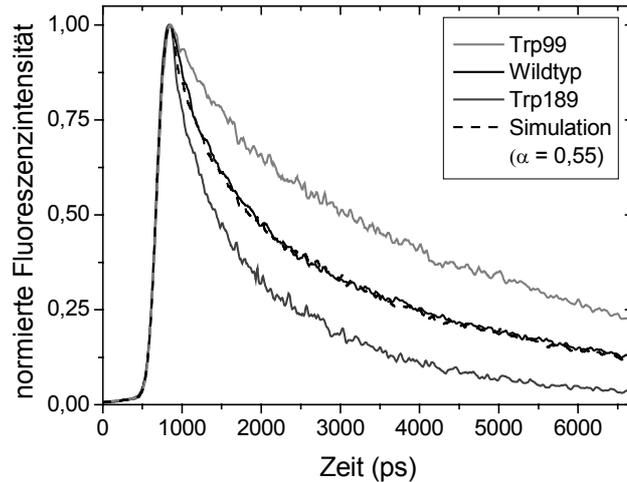


Abbildung VII.9 – normierte Fluoreszenzabklingkurven für den reduzierten Zustand des 2-Cystein Peroxiredoxin-Wildtyps und seine Einzeltryptophan-Mutanten. Die Messbedingungen sind identisch mit den in Abbildung VII.8 angegebenen. Ebenfalls dargestellt ist die Simulation des Wildtyp-Spektrums aus den Spektren der Mutanten.

	$a_1$	$\tau_1$ (ps)	$a_2$	$\tau_2$ (ps)	$\tau_{m-a}$ (ps)
<b>Wildtyp</b>	0,53	3413	0,47	459	2024
<b>Trp99</b>	0,78	4228	0,22	465	3407
<b>Trp189</b>	0,49	1951	0,51	372	1143

Tabelle VII.4 – Daten der biexponentiellen Anpassungen an die Fluoreszenzabklingkurven von reduziertem 2-CP. Aufgeführt sind die Amplituden  $a_1$  und  $a_2$ , die langen und kurzen Lebenszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  sowie die Amplituden-gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_{m-a}$ .

Die Veränderungen in den Fluoreszenzlebenszeiten bewirken eine größere Beteiligung des Tryptophanrestes 189 bei der Simulation des Wildtypspektrums: Der in Abbildung VII.9 angegebene Faktor von  $\alpha = 0,55$  gibt an, dass der Anteil dieses Tryptophanrestes am Abklingen der Gesamtfluoreszenz um 21 % zugenommen hat. Dies lässt Rückschlüsse auf eine Verminderung des Quenching dieses Tryptophanrestes im reduzierten Zustand des Proteins zu. Dies könnte z.B. darauf zurückzuführen sein, dass Kontakte mit bereits erwähnten geladenen Nachbar-Aminosäuren aufgrund der Spaltung der Disulfidbrücken vermindert sind.

Besonders stark ist der Effekt der Fluoreszenzlebenszeitverlängerung jedoch für die Einzeltryptophan-Mutante, die nur den Tryptophanrest 99 enthält. Für diesen wird eine starke Zunahme der gemittelten Fluoreszenzlebenszeit um ca. 900 ns beobachtet. Die große Veränderung der Lebenszeit ist ein starkes Indiz für eine Konformationsänderung des

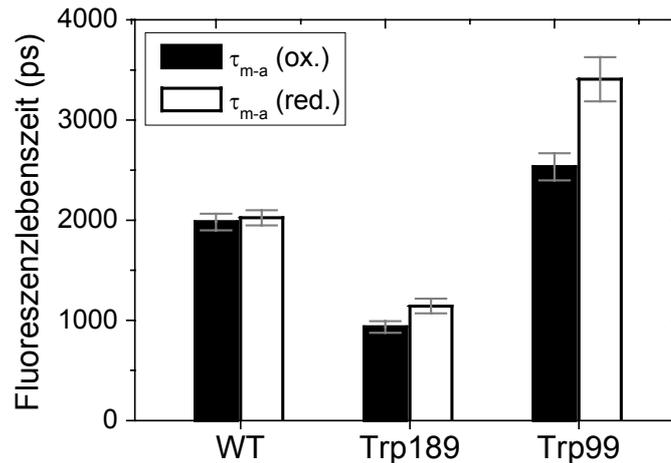


Abbildung VII.10 – Vergleich der in Tabelle VII.3 und Tabelle VII.4 angegebenen gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten von 2-Cystein Peroxiredoxin und seinen Einzeltryptophan-Mutanten.

2-Cystein Peroxiredoxins bei Reduktion. Die in Abbildung VII.4 gezeigte Struktur des 2-Cystein Peroxiredoxins lokalisiert den Tryptophanrest 99 jedoch in einer von dem Dimerverbund abgewandten Position, die somit unabhängig vom Oxidationszustand der Disulfidbrücken sein sollte. Deswegen kann die starke Zunahme der Fluoreszenzlebenszeiten von Trp99 nur durch eine Zusammenlagerung des Proteins, die die Umgebung des Trp99 direkt betrifft, erklärt werden und deutet somit auf eine Oligomerisierung von 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste unter reduzierenden Bedingungen hin. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der in Abbildung VII.5 dargestellten Kristallstruktur von dekamerem 2-Cystein Peroxiredoxin aus humanen Erythrocyten, die den  $\alpha$ -helikalen Bereich, in dem sich Trp99 befindet, als den Ort der Zusammenlagerung für die ringförmige Dekamerisierung kennzeichnet.

### c) Quenching-Untersuchungen am 2-Cystein Peroxiredoxin

Um Informationen über das redox-abhängige Oligomerisationsverhalten des 2-Cystein Peroxiredoxins zu gewinnen, wurden in beiden Oxidationszuständen Quenching-Untersuchungen an den beiden Einzeltryptophan-Mutanten mit den Quenchern Acrylamid, Cäsium und Iodid durchgeführt. So können selektiv die Zugänglichkeiten der beiden Fluorophore und Umgebungsladungen der Fluorophore bestimmt werden (vergleiche Kapitel II.IV.a). Da für die Untersuchungen des 2-Cystein Peroxiredoxins nur geringe Substanzmengen zur Verfügung standen, wurden die Quenching-Untersuchungen zeitaufgelöst durchgeführt.

Die in Abbildung VII.11 und Abbildung VII.12 dargestellten Auftragungen zeigen die Stern-Volmer-Plots der beiden Einzeltryptophan-Mutanten in beiden Oxidationszuständen als Veränderung der gemittelten Lebenszeit  $\tau_{m-i}$ . Im Gegensatz zu den zuvor angegebenen

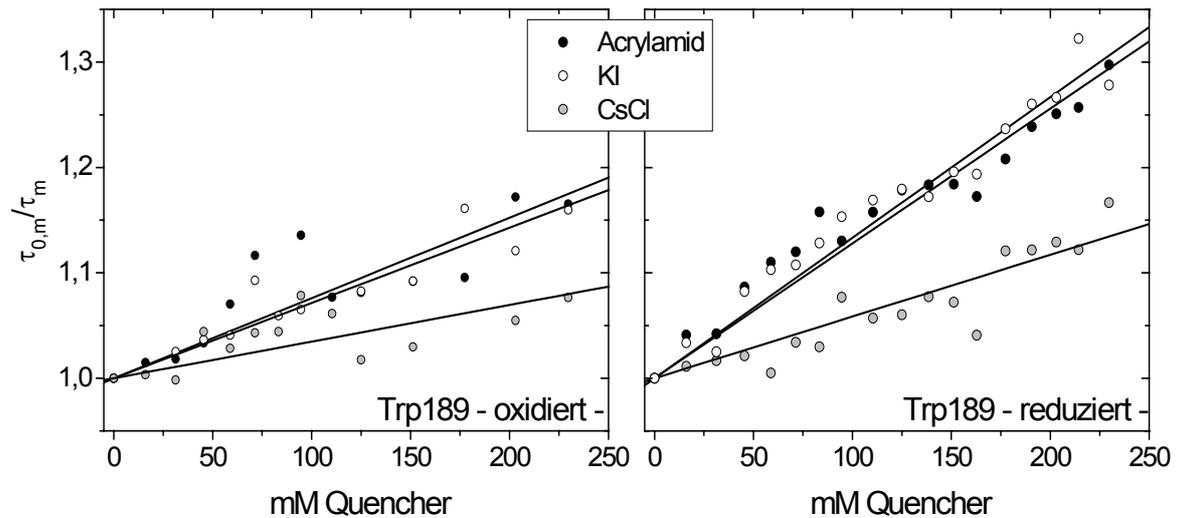


Abbildung VII.11 – Vergleich der Stern-Volmer-Auftragungen für selektives Quenching des Tryptophanrestes Trp189 des 2-Cystein Peroxiredoxins für den oxidierten und reduzierten Zustand.

Amplituden-gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten werden für die Auftragungen nun die jeweiligen Intensitäts-gemittelten Lebenszeiten (vgl. Abschnitt III.II.d) verwendet. In der Literatur hat sich zwar allgemein die Verwendung der Amplituden-gemittelten Lebenszeiten für zeitaufgelöste Quenching-Untersuchungen mit dem Ziel der Bestimmung von Stern-Volmer-Konstanten als geeigneter erwiesen, [107] diese lieferten aber in diesem Fall sehr schlechte Korrelationen, die für die Interpretation der Daten ungeeignet waren. Da außerdem aus den ermittelten Stern-Volmer-Konstanten die bimolekularen Quenchkonstanten bestimmt werden sollten, wurden die dafür besser geeigneten Intensitäts-gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten für die gesamte Auswertung verwendet.

Abbildung VII.11 zeigt die Stern-Volmer-Auftragungen für oxidiertes und reduziertes Trp189. Die aus den Auftragungen ermittelten Stern-Volmer-Konstanten  $K_D$  und die bimolekularen Quenchkonstanten  $k_q$ , die sich mit Hilfe der jeweiligen Ausgangslebenszeiten  $\tau_{m-i,0}$  berechnen lassen, sind zusammen mit Referenzwerten für monomeres Tryptophan in Tabelle VII.1 zusammengestellt. Im Vergleich zu Tryptophan in wässriger Lösung, wofür mit Hilfe der in Kapitel IV angegebenen Fluoreszenzlebenszeiten und Stern-Volmer-Konstanten Quenchkonstanten von  $k_{q,Acrylamid} = 5,86 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{q,KI} = 4,17 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und  $k_{q,CsCl} = 0,88 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bestimmt werden können, sind die Quenchkonstanten für Trp189 im oxidierten Zustand stark verringert. Dies spricht im Vergleich für die für den Tryptophanrest 189 im oxidierten Zustand ermittelten Quenchkonstanten von  $k_{q,Acrylamid} = 0,50 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{q,KI} = 0,46 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und  $k_{q,CsCl} = 0,23 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für eine stark verminderte Zugänglichkeit des Tryptophanrestes, auch im Vergleich mit Literaturdaten. [84,139,156] Also stützen auch die Quenching-Untersuchungen die Annahme, dass sich der Tryptophanrest 189 in einer wenig lösungsmittelzugänglichen Umgebung am Dimerverbund befindet.

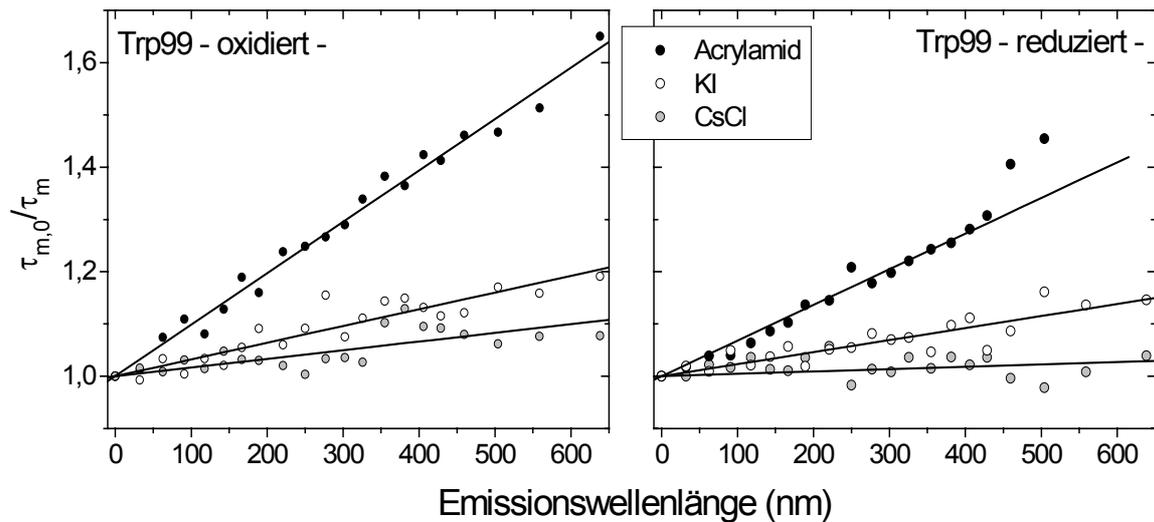


Abbildung VII.12 – Vergleich der Stern-Volmer-Auftragungen für selektives Quenching des Tryptophanrestes Trp99 des 2-Cystein Peroxiredoxins im oxidierten und reduzierten Zustand. Im Vergleich zu Abbildung VII.11 sind andere x- und y-Achsenbereiche dargestellt.

Dass die ermittelten Quenchkonstanten für Acrylamid und Iodid für Trp189 vergleichbar groß sind, überrascht: Bei den meisten Quenching-Untersuchungen wird beobachtet, dass Acrylamid Tryptophanfluoreszenz generell aufgrund seiner Unpolarität (die ein direktes Eindringen in das Protein zulässt) am stärksten löscht, wohingegen die ionischen Quencher Iodid weniger und Cäsium am wenigsten quenchend wirken. [157-161] Das verminderte Quenching von Cäsium im Vergleich zu Iodid ist auf dessen geringere Quencheffizienz  $f_Q$  zurückzuführen, die gemäß Gleichung (II.5) direkt in  $k_q$  eingeht:  $f_{Q, Acrylamid} = f_{Q, KI} = 1$ , wohingegen  $f_{Q, CsCl} = 0,2$ . [84] Für Trp189 wird jedoch ein vergleichbar starkes Quenching durch Acrylamid und Iodid im oxidierten Zustand festgestellt. Dies ist unter Annahme des Strukturvorschlages nur durch eine stärkere Umgebungsladung des Tryptophanrestes zu erklären, so dass die geladenen Quencher durch elektrostatische Wechselwirkungen zum Tryptophanrest 189 gelangen können. Durch die starke Umgebungsladung des Trp189 wird zugleich auch eine Erklärung für die geringen Fluoreszenzlebenszeiten und die geringe Fluoreszenzintensität von Trp189 gegeben, da eine Vielzahl von geladenen Aminosäure-seitengruppen quenchend wirken können (vgl. Kapitel II.III.a).

Bei Reduktion werden die bimolekularen Quenchkonstanten  $k_q$  für Trp189 etwas größer, aber sie sind nach wie vor nicht vergleichbar mit Quenchkonstanten für Tryptophanreste, die in Proteinen zum Lösungsmittel hin orientiert sind. [84] Da des Weiteren die Quenchkonstanten für Acrylamid und Iodid vergleichbar groß bleiben, ist davon auszugehen, dass bei Reduktion trotz Bruch der beiden intermolekularen Disulfidbrücken der Tryptophanrest 189 in seiner ursprünglichen Umgebung verbleibt. Die geringe Zunahme der Quencher-Zugänglichkeit ist somit durch ein geringes Aufweiten am Dimerverbund bei Reduktion, aber nicht durch eine Dissoziation der beiden Dimerhälften zu erklären.

<b>oxidiert</b>	<b>Acrylamid</b>		<b>KI</b>		<b>CsCl</b>	
	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Trp99</b>	0,98	0,25	0,32	0,08	0,17	0,04
<b>Trp189</b>	0,76	0,50	0,71	0,46	0,35	0,23

<b>reduziert</b>	<b>Acrylamid</b>		<b>KI</b>		<b>CsCl</b>	
	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Trp99</b>	0,68	0,17	0,23	0,06	0,05	0,01
<b>Trp189</b>	1,28	0,76	1,33	0,79	0,59	0,35

<b>Referenz</b>	<b>Acrylamid</b>		<b>KI</b>		<b>CsCl</b>	
	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$k_q \cdot 10^9$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Trp in H<sub>2</sub>O</b>	16,86	5,86	12,00	4,17	2,52	0,88

Tabelle VII.5 – Stern-Volmer-Konstanten  $K_D$  der in Abbildung VII.11 und Abbildung VII.12 dargestellten Auftragungen für die oxidierten bzw. reduzierten Einzeltryptophan-Mutanten des 2-Cystein Peroxiredoxins und für Tryptophan in wässriger Lösung (vgl. Kapitel IV.IV). Ebenfalls aufgeführt sind die aus den Stern-Volmer-Konstanten ermittelten bimolekularen Quenchkonstanten  $k_q$ . Die für die Berechnung von  $k_q$  verwendeten Intensitäts-gemittelten Ausgangs-Lebenszeiten  $\tau_{m-i,0}$  betragen für Trp99 3792 ps (oxidiert) bzw. 3955 ps (reduziert) und für Trp189 1520 ps (oxidiert) bzw. 1686 ps (reduziert).

Trp99 zeigt im oxidierten Zustand eine etwas größere Stern-Volmer-Konstante für Quenching durch Acrylamid als Trp189 (vgl. Abbildung VII.12 und Tabelle VII.1). Aufgrund der großen Fluoreszenzlebenszeiten für Trp99 und der sehr kleinen für Trp189 resultiert daraus aber eine kleinere Quenchkonstante  $k_q$ . Auch die Quenchkonstanten für Iodid und Cäsium sind geringer als bei Trp189. Insofern ist der Tryptophanrest 99 noch weniger als Trp189 für Fluoreszenzlöcher zugänglich. Für den Tryptophanrest 99 wird des Weiteren im Gegensatz zu den Beobachtungen für Trp189 ein stärkeres Löschen der Fluoreszenz durch Acrylamid im Vergleich zu Cäsium und Iodid beobachtet. Daraus kann geschlossen werden, dass sich der Tryptophanrest in einer typisch unpolaren Umgebung im Protein befindet, in die Acrylamid leichter als die ionischen Quencher hinein diffundieren kann.

Bei Reduktion verringert sich die Zugänglichkeit des Tryptophanrestes 99 für alle untersuchten Quencher. Für den Quencher Acrylamid verringert sich z.B. die bimolekulare Quenchkonstante um ca. 30 %. Da sich der Tryptophanrest 99 nicht in der Nähe der beiden redox-aktiven Disulfidbrücken befindet, ist die Veränderung in den Fluorophor-Zugänglichkeiten in Kombination mit der in VII.V.b) beschriebenen Verlängerung der Fluoreszenzlebenszeiten von Trp99 bei einer unveränderten Struktur der Monomereinheiten plausibel durch eine Zusammenlagerung bei Reduktion zu erklären.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen kann somit davon ausgegangen werden, dass auch das 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste oligomerisieren kann. Die hier vorgestellten Untersuchungen legen nahe, dass die Oligomerisierung des 2-CP bei Reduktion erfolgt. Ob bei der Oligomerisierung wie im Fall der Thioredoxin-Peroxidase B aus humanen Erythrocyten ringförmige Dekamere [147] gebildet werden, kann mit Hilfe der hier vorgestellten Techniken jedoch nicht untersucht werden.

Da die Oligo- bzw. Dekamerisierung des 2-Cystein Peroxiredoxins ebenfalls von der Ionenstärke der Lösung abhängen kann, [148,162] wurden Studien durchgeführt, bei denen in ursprünglich salzfreien Probelösungen die Konzentration an Kaliumchlorid schrittweise auf bis zu 300 mM erhöht wurde. Die ermittelten Fluoreszenzlebenszeiten zeigten jedoch keine Korrelation mit der Salzkonzentration. Somit konnten Hinweise auf eine von der Salzkonzentration abhängende Oligomerisierung nicht festgestellt werden.

Auf die Darstellung von Stern-Volmer-Auftragungen des Wildtyps aus zeitaufgelösten Messungen wird an dieser Stelle verzichtet. Da aufgrund der geringen Probenmengen für den 2-Cystein Peroxiredoxin-Wildtyp und seine Einzeltryptophan-Mutanten die Entscheidung getroffen wurde, die Quenching-Untersuchungen zeitaufgelöst durchzuführen, kann aus den Stern-Volmer-Auftragungen für die Fluoreszenzlebenszeiten nicht der Bruchteil der zugänglichen Fluorophore ermittelt werden (vgl. auch Abschnitt II.IV.a).

## **VI. Umgebungsanalyse von Trp189 mit Mutanten**

Um zu analysieren, welche der umgebenden Aminosäuren für die ungewöhnlich kurze Fluoreszenzlebenszeit bzw. das starke Quenching des Tryptophanrestes 189 verantwortlich ist bzw. sind, wurden weitere Mutanten des 2-Cystein Peroxiredoxins untersucht, die potentielle Quencher nicht mehr enthielten. Bei diesen wurden die Cysteine (C) an den Positionen 64 und 185 durch Serin (S) ersetzt (Mutanten C64S und C185S), da die von diesen Cysteinen im oxidierten Zustand gebildeten intermolekularen Disulfidbrücken starke Quencher für Tryptophanfluoreszenz sind. [81,163] Da die Arginine (R) an den Positionen 140, 163 und 170 des Weiteren auch potentielle Quencher der Tryptophanfluoreszenz sind, wurden sie in den Mutanten R140Q, R163Q und R170Q durch Glutamin (Q) ersetzt. Mit diesen Mutanten wurden statische und dynamische Fluoreszenzuntersuchungen durchgeführt, die im Folgenden vorgestellt werden.

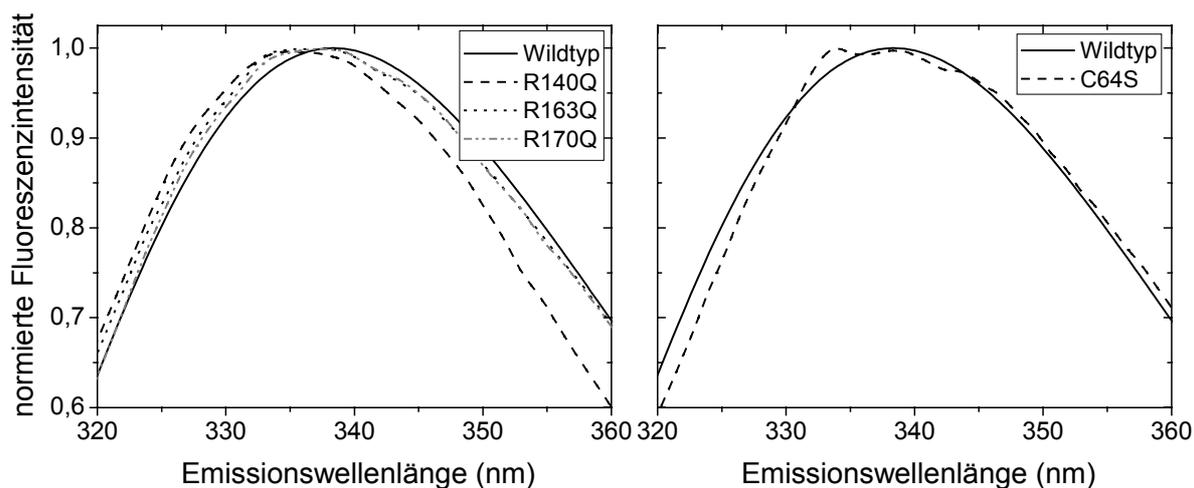


Abbildung VII.13 – Emissionsspektren weiterer Mutanten des 2-Cystein Peroxiredoxins im Vergleich zum Wildtyp. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm. Die verwendete Kennzeichnung der Mutanten wird im Text erläutert.

<b>Mutante</b>	$\lambda_{em., max}$ (nm) ( $\lambda_{ex.} = 295$ nm)
<b>Wildtyp</b>	<b>338,4</b>
C64S	339,1
R140Q	335,9
R163Q	337,6
R170Q	338,1

Tabelle VII.6 – Emissionsmaxima der in Abbildung VII.13 dargestellten Emissionsspektren verschiedener 2-CP-Mutanten. Die Emissionsmaxima wurden über Anpassung von Lognormal-Funktionen nach Burstein *et al.* ermittelt. [100,101]

#### a) *Betrachtung der Emissionsspektren*

Abbildung VII.13 zeigt die normierten Emissionsspektren dieser Mutanten bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm im Vergleich zu dem bereits in Abbildung VII.7 gezeigten Spektrum des Wildtyps. Die wieder mit Hilfe einer Anpassung gemäß Gleichung (II.25) ermittelten Emissionsmaxima sind in Tabelle VII.6 dargestellt. In bezug auf Form des Spektrums und Lage des Emissionsmaximums unterscheiden sich die Spektren der Mutanten nicht stark von dem des Wildtyps: Im Vergleich zum Emissionsmaximum des Wildtyps bei 338,4 nm sind die Emissionsmaxima der Mutanten C64S mit 339,1 nm, R163Q mit 337,6 nm und R170Q mit 338,1 nm nicht unterschiedlich genug, um Rückschlüsse darauf zuzulassen,

ob bei Deletion der entsprechenden Aminosäuren die Emission des Tryptophanrestes 189 beeinflusst wird.

Eine Ausnahme stellt dabei die Mutante R140Q dar, die ein rot verschobenes Emissionsmaximum von 335,9 nm aufweist. Dieser Wert ist zwar nicht identisch mit dem Emissionsmaximum der Einzeltryptophanmutante, die nur den Tryptophanrest 189 beinhaltet, und ähnelt eher dem Emissionsmaximum der nur Trp99 enthaltenden Mutante, lässt aber unabhängig davon Rückschlüsse darauf zu, dass sich das Emissionsverhalten der beiden Tryptophanreste bei Entfernen des Arginins 140 stark verändert.

Im Gegensatz dazu hat die Existenz der beiden Arginine an den Positionen 163 und 170 nur wenig Einfluss auf die Fluoreszenz der beiden Tryptophane. Auch beeinflusst der Cysteinrest 64 die Fluoreszenz des Wildtyps nur gering. Aus letzterem kann gefolgert werden, dass sich die beiden Cysteine 64 und 185 im oxidierten Zustand (also als stark quenched Disulfidbrücke) nicht in nächster Nähe des Tryptophanrestes 189 befinden. Es ist deswegen davon auszugehen, dass ebenso wie das Spektrum der Mutante C64S die Emissionsspektren von C185S nicht stark unterschiedlich sind.

Da jedoch in den untersuchten Mutanten beide Tryptophanreste vorhanden sind, die zur Gesamtfluoreszenz des Proteins beitragen, können Veränderungen in der Fluoreszenz von Trp189 in den statischen Spektren aufgrund des starken Einflusses von Trp99 zur Gesamtfluoreszenz eventuell übersehen werden. Aus diesem Grund wurden ebenfalls zeitaufgelöste Messungen durchgeführt, da die dort untersuchten Veränderungen des Fluoreszenzabklingens die Veränderung der Umgebung des Tryptophanrestes 189 sensitiver erfassen als die Parameter der statischen Fluoreszenzuntersuchungen.

#### *b) Fluoreszenzlebenszeiten*

Die über die dynamischen Messungen erhaltenen Lebenszeiten der biexponentiellen Anpassungen und die entsprechenden Amplituden-gemittelten Lebenszeiten sind in Tabelle VII.7 dargestellt. Abbildung VII.14 zeigt eine Gegenüberstellung der Amplituden-gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten im Vergleich zum Wildtyp. Für die untersuchten Mutanten werden ebenso wie bereits bei den Emissionsspektren nicht so starke Abweichungen wie bei der Untersuchungen der Einzeltryptophan-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

Für alle Arginin-defizienten 2-Cystein Peroxiredoxine werden jedoch starke Zunahmen in allen Fluoreszenzlebenszeiten beobachtet. Die größten Veränderungen von ca. 350 ps in den gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten zeigen dabei die Mutanten R140Q und R170Q, aber auch die Zunahme der gemittelten Fluoreszenzlebenszeit von R163Q beträgt 200 ps. Die detektierten Fluoreszenzlebenszeiten entsprechen für diese Mutanten jedoch noch nicht den Werten für die Mutante Trp99, folglich wird die Fluoreszenz von Trp189 relativ zu Trp99 in diesen Arginin-defizienten Mutanten stärker gequencht. Daraus kann geschlossen werden, dass alle drei Arginine die Fluoreszenz von Trp189 löschen und somit die geringe Fluoreszenzlebenszeit des Trp189 nicht auf eine spezifische benachbarte Aminosäure zurückzuführen ist, sondern auf die gesamte Umgebung.

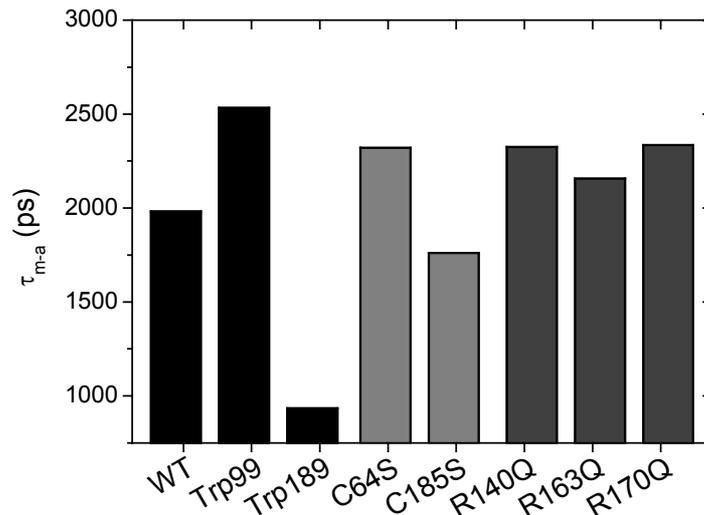


Abbildung VII.14 – Amplituden-gemittelte Lebenszeiten  $\tau_{m-a}$  der 2-Cystein Peroxiredoxin Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die Daten der biexponentiellen Anpassungen sind in Tabelle VII.7 zusammengefasst.

	$a_1$	$\tau_1$ (ps)	$a_2$	$\tau_2$ (ps)	$\tau_{m-a}$ (ps)
<b>Wildtyp</b>	0,52	3412	0,48	411	1981
<b>C64S</b>	0,51	4043	0,49	497	2320
<b>C185S</b>	0,47	3188	0,53	470	1760
<b>R140Q</b>	0,60	3530	0,40	526	2324
<b>R163Q</b>	0,55	3552	0,45	443	2157
<b>R170Q</b>	0,57	3693	0,43	503	2336

Tabelle VII.7 – Daten der biexponentiellen Anpassungen an die Fluoreszenzabklingkurven weiterer 2-CP-Mutanten. Aufgeführt sind die Amplituden  $a_1$  und  $a_2$ , die langen und kurzen Lebenszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  sowie die Amplituden-gemittelten Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_{m-a}$ .

Auch hat die Entfernung der beiden Cysteinreste einen starken Einfluss auf die Fluoreszenzlebenszeiten des Proteins: Für die 2-Cystein Peroxiredoxin C64S wird ebenfalls eine starke Zunahme der gemittelten Fluoreszenzlebenszeit beobachtet. Diese ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Existenz der Disulfidbrücken im nativen 2-Cystein Peroxiredoxin entgegen der Überlegungen in VII.VI.a) doch einen nicht vernachlässigbaren quenchenden Einfluss auf die Fluoreszenz von Trp189 hat.

Für die Mutante C185S wird aufgrund der starken Verkürzung der langen Fluoreszenzlebenszeit überraschenderweise auch eine starke Verkürzung der gemittelten Fluoreszenzlebenszeit im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Obwohl die anstelle von

Cystein eingeführte Aminosäure Serin ebenfalls ein Quencher von Tryptophanfluoreszenz ist, [82] ist nicht davon auszugehen, dass die Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeiten von C185S auf Quenching durch Serin zurückzuführen ist. Vielmehr ist aufgrund der Nähe von C185 zum C-Terminus anzunehmen, dass bei Deletion dieser für die Knüpfung der Disulfidbrücken erforderlichen Aminosäure die native Form des Proteins nicht mehr eingenommen werden kann: Durch Entfernen des Cysteins 185 wird es z.B. möglich, dass sich der C-terminale Bereich inklusive des Tryptophanrestes 189 vom Dimerverbund entfernt und sich stärker zur Lösung orientiert. Da durch eine solche Strukturveränderung die Beschaffenheit der Kontaktfläche für die Dimerisierung verändert würde, würde daraus resultierend die Dimerisierung des 2-Cystein Peroxiredoxins verhindert. Dieses würde, da das Protein selbst im reduzierten Zustand dimer vorliegt, die Stabilität von 2-CP nachhaltig beeinflussen.

Es kann somit gefolgert werden, dass die Mutante C185S sehr wahrscheinlich sehr kurze Fluoreszenzlebenszeiten im Vergleich zum Wildtyp zeigt, weil sie nicht nativ vorliegt. Im Gegensatz dazu ist davon auszugehen, dass die anderen untersuchten Mutanten aufgrund ihrer hohen Fluoreszenzlebenszeiten relativ zu Tryptophan in wässriger Lösung nativ vorliegen.

## **VII. Zusammenfassung**

Das in allen Organismen vorkommende Protein 2-Cystein Peroxiredoxin ist für die Reduktion zelltoxischer Peroxide verantwortlich und gewährleistet somit neben anderen Peroxidasen die Funktion der Zelle auch unter oxidativem Stress. Im Gegensatz zu anderen Peroxidasen enthält es jedoch keine Cofaktoren, sondern katalysiert die Reduktion seiner Substrate mit Hilfe katalytisch aktiver Cysteinreste und ist auf externe Elektronendonoren angewiesen. 2-Cystein Peroxiredoxine liegen im oxidierten Zustand antiparallel angeordnet als Homo-Dimere vor. Bei Reduktion erfolgt in vielen Organismen jedoch keine Monomerisierung. Vielmehr berichten unterschiedliche Untersuchungen davon, dass das 2-Cystein Peroxiredoxin nicht nur redoxabhängig, sondern auch in Abhängigkeit anderer Faktoren Aggregate bilden kann. Das Aggregationsverhalten des 2-Cystein Peroxiredoxins ist somit Bestandteil vieler Untersuchungen, die sich mit seiner Funktion und Regenerierung beschäftigen.

Für das hier fluoreszenzspektroskopisch untersuchte 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste existiert bislang keine Kristallstruktur. Da jedoch für eine Interpretation der erhaltenen Daten ein Kenntnis über die ungefähre Lage der spektroskopisch relevanten Tryptophanreste Trp99 und Trp189 erforderlich war, wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt, um die zu dem Gersten-Protein ähnlichsten Proteine mit bekannter Struktur zu finden. Aufbauend auf der Struktur des zu 2-Cystein Peroxiredoxin ähnlichsten Proteins, der humanen Thiooxidase B, konnte die Position des Tryptophanrestes 99 als entfernt vom Dimerverbund bestimmt werden, wohingegen der Tryptophanrest 189 an der Verbundstelle der beiden Dimerhälften lokalisiert werden konnte.

Die Untersuchung der Emissionsspektren und der Fluoreszenzlebenszeiten für den Wildtyp und zwei Einzeltryptophan-Mutanten in Kombination mit selektiven Quenching-Untersuchungen zeigten, dass sich der Tryptophanrest 189 am Dimerverbund in einer stark polaren und dennoch wenig lösungsmittelzugänglichen Umgebung befindet, wohingegen sich der Tryptophanrest 99 eher in einer unpolaren Region des Proteins mit geringer Lösungsmittlexposition befindet. Die stark polare Umgebung des Tryptophanrestes 189 hat dabei einen stark quencheden Einfluss auf seine Fluoreszenz, die zu ungewöhnlich kurzen Fluoreszenzlebenszeiten führt.

Es wurden gezielte Untersuchungen durchgeführt, um das Aggregationsverhalten des Gersten-2-Cystein Peroxiredoxins in Abhängigkeit des Redox-Zustandes zu untersuchen. Quenching-Untersuchungen sowie Daten aus statischen und dynamischen Fluoreszenzuntersuchungen zeigten, dass der Tryptophanrest 189 bei Reduktion nur wenig zugänglicher wird, wohingegen der Tryptophanrest 99 bei Reduktion in seiner Zugänglichkeit verringert wird. Aus diesen Daten kann der Schluss gezogen werden, dass das 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste ähnliche wie seine homologen Proteine aus anderen Organismen im reduzierten Zustand oligomerisiert. Für die humane Thioredoxin-Peroxidase B wird beispielsweise von einer Dekamerisierung berichtet. Die Natur der Oligomerisierung kann jedoch mit Hilfe von fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen nicht geklärt werden. Neben Aggregation bei Reduktion wird als weitere Ursache für die Oligomerisierung des 2-Cystein Peroxiredoxins ein Einfluss der Ionenstärke diskutiert. Dynamische Fluoreszenz-Untersuchungen am 2-Cystein Peroxiredoxin in unterschiedlich konzentrierten Kaliumchlorid-Salzlösungen zeigten jedoch keine Veränderung der Fluoreszenzlebenszeit mit der Ionenstärke. Daraus kann geschlossen werden, dass zumindest unter den gewählten Bedingungen keine Oligomerisierung des 2-Cystein Peroxiredoxins erfolgt.

Um schließlich die Ursache der geringen Fluoreszenzlebenszeit des Tryptophanrestes 189 im Protein zu klären, wurden Mutanten des 2-Cystein Peroxiredoxins fluoreszenzspektroskopisch untersucht, die potentielle Quencher der Tryptophanfluoreszenz nicht mehr enthielten. Es konnte gefolgert werden, dass die Fluoreszenz des Tryptophanrestes 189 nicht wegen eines spezifischen Quenchpartners stark verringert ist, sondern dass die kurzen Fluoreszenzlebenszeiten auf eine Vielzahl von geladenen Quenchern in seiner Umgebung zurückzuführen sind. Außerdem scheinen die beiden intrinsischen Disulfidbrücken um 2-Cystein Peroxiredoxin quenched auf die Emission von Trp189 zu wirken.

## VIII. DAS MANGANSTABILISIERENDE PROTEIN

### I. *Biologische Relevanz und Fragestellung*

Das Photosystem II ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Enzymkomplex, der in der Thylakoidmembran von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien vorkommt und eine der thermodynamisch anspruchvollsten Reaktionen der Biologie – die Spaltung von Wasser in Sauerstoff und reduzierende Äquivalente mit Hilfe von Lichtenergie – katalysiert. Diese Reaktion ist die Basis allen Lebens auf der Erde: Durch sie wird der für Atmungsprozesse notwendige Sauerstoff bereitgestellt, die vor UV-Strahlung schützende Ozonschicht aufrecht erhalten und die nötigen Reduktionsmittel geliefert, mit denen nach Fixierung von Kohlendioxid die verschiedensten organischen Moleküle entstehen können – Biomasse, Nahrung und Brennstoffe. [164]

Der Enzymkomplex (siehe Abbildung VIII.1) besteht aus mindestens 34 Transmembranproteinen, die eine lichtgetriebene Übertragung von Elektronen des Wassers auf Plastochinon katalysieren. [3,164] Die einzelnen Teilschritte der Redoxreaktion sind dabei die Oxidation von Wasser zu molekularem Sauerstoff und die Reduktion von Plastochinon zu Plastochinol. Von den 34 Transmembranproteinen sind mindestens sieben Polypeptide mit molekularen Massen von 49 (CP 47), 45 (CP 43), 34 (D1), 32 (D2), 9 und 4,5 ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheit des Cytochrom b-559), sowie 4 kDa (das *psbI* Genprodukt) für die photosynthetische Sauerstoffentwicklung zuständig. [165] Kernstück der Wasseroxidation ist dabei ein  $(\text{Mn})_4$ -Cluster, der sich an der zum Lumen hin ausgerichteten Seite des D1-Proteins befindet und der vermutlich *in vivo* zwei Wassermoleküle koordiniert. [164] In höheren Pflanzen kommen drei weitere nicht die Membran durchspannende Proteine mit molaren Massen von 33, 24 und 17 kDa (in Abbildung VIII.1 gekennzeichnet als O, P und Q) assoziiert mit dem Sauerstoffentwickelnden Komplex („*Oxygen evolving complex*“, *OEC*) vor, die vermutlich ebenfalls an der Koordination den  $(\text{Mn})_4$ -Clusters beteiligt sind. [164,166]

Von diesen drei Proteinen nimmt die erstmalig 1979 isolierte 33 kDa-Komponente [167] die interessanteste Rolle ein: Es ist das einzige der drei Proteine, das ebenfalls in Cyanobakterien, den primitivsten Organismen, die zur Photosynthese fähig sind, vorkommt. Des Weiteren können die 24 und 17 kDa-Proteine durch Waschen mit Salzlösungen (z.B. 1 M NaCl) entfernt werden, wohingegen das 33 kDa-Protein an Ort und Stelle verbleibt. Die Tatsache, dass sich das 33 kDa-Protein unter alkalischen Bedingungen gleichzeitig mit dem  $(\text{Mn})_4$ -Cluster unter vollständigem Verlust der Aktivität von dem OEC entfernen läßt, wurde deswegen ursprünglich als Indiz dafür gewertet, dass das 33 kDa-Protein *in vivo* direkt mit dem aktiven Zentrum des Photosystems II assoziiert vorliegt. [166]

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die selektive Abspaltung der 33 kDa-Komponente vom OEC ohne Beeinflussung der Position des  $(\text{Mn})_4$ -Clusters (jedoch unter Verlust der

Aktivität) möglich ist und dass des Weiteren eine Rekonstitution mit Wiederherstellung der vollständigen Enzymaktivität möglich ist. [168] Außerdem konnte beobachtet werden, dass unter geeignet gewählten Bedingungen bei Dissoziation des 33 kDa Proteins vom OEC teilweise nur zwei Manganionen des  $(\text{Mn})_4$ -Clusters freigesetzt werden. Zudem kann die Freisetzung von Mangan durch hohe Chloridkonzentrationen unterbunden werden. [169] Demzufolge ist das 33 kDa-Protein nicht direkt an der Bindung des  $(\text{Mn})_4$ -Clusters beteiligt, stabilisiert aber direkt oder indirekt seine Position im OEC. Aus diesem Grund wird die 33 kDa-Komponente des Photosystems II in der Literatur auch als Manganstabilisierendes Protein („*Manganese stabilizing protein*“, *MSP*) bezeichnet.

1986 konnte erstmalig die Aminosäuresequenz des MSP aufgeklärt werden. [170] Ihr zufolge handelt es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten MSP aus Spinat um ein aus 248 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem für spektroskopische Untersuchungen interessanten Tryptophan, acht Tyrosinen und 13 Phenylalaninen. Des Weiteren existieren im MSP zwei Cysteinreste, die im nativen Zustand oxidiert als Disulfidbrücke vorliegen. [171] Die große Diskrepanz zwischen dem gelelektrophoretisch bestimmten Molekulargewicht von ca. 33 kDa und dem tatsächlichen, über die Aminosäuresequenz berechneten von 26,7 kDa konnte dabei über Lichtstreuungsuntersuchungen auf eine stark gestreckte Struktur des MSP, die zu Dimensionen von ca.  $12,6 \times 3,0$  nm führt, zurückgeführt werden. [172]

Das stöchiometrische Verhältnis des MSP zum Reaktionszentrum des Photosystems II wird in der Literatur trotz der Vielzahl an durchgeführten Untersuchungen kontrovers diskutiert: [173] Eine Röntgenstrukturuntersuchung an einer Photosystem II-Präparation aus *Synechococcus elongatus* mit einer Auflösung von 3,8 Å konnte einen Teil eines als MSP identifizierten Proteins an der Oberfläche des OEC lokalisieren. [174] Sie stützt somit die These von nur einem MSP pro  $(\text{Mn})_4$ -Cluster. Es gibt aber auch Studien, die von zwei MSP pro  $(\text{Mn})_4$ -Cluster im Photosystem II berichten. [175] Eventuell ist dieser Unterschied in der MSP-Stöchiometrie darauf zurückzuführen, dass bei höheren Pflanzen und Algen in MSP zwei Erkennungsdomänen vorhanden sind, die für die Bindung an Photosystem II verantwortlich sind, wohingegen in Cyanobakterien die in Eukaryoten gefundene N-terminale Erkennungsdomäne des MSP fehlt. [176]

Bislang konnte trotz der geringen Größe und einer Vielzahl von Versuchen keine Kristallstruktur des MSP erhalten werden. Zum Teil ist dies mit einer sehr flexiblen Struktur des MSP zu erklären, [177] die z.B. durch die Existenz von ‚*natively unfolded*‘- oder ‚*molten globule*‘-Strukturen gedeutet werden kann. [177-179] Charakterisiert werden können diese beiden Zustände als Mischung schneller, miteinander in einem Gleichgewicht stehender Konformere, die gemittelt nur wenig Sekundärstruktur und keinen hydrophoben Proteinkern beinhalten (daher der Terminus ‚*natively unfolded structure*‘) bzw. als eine expandierte Form des gefalteten, nativen Zustands, wie er z.B. auch bei der Proteinfaltung beobachtet werden kann (‚*molten globule*‘).

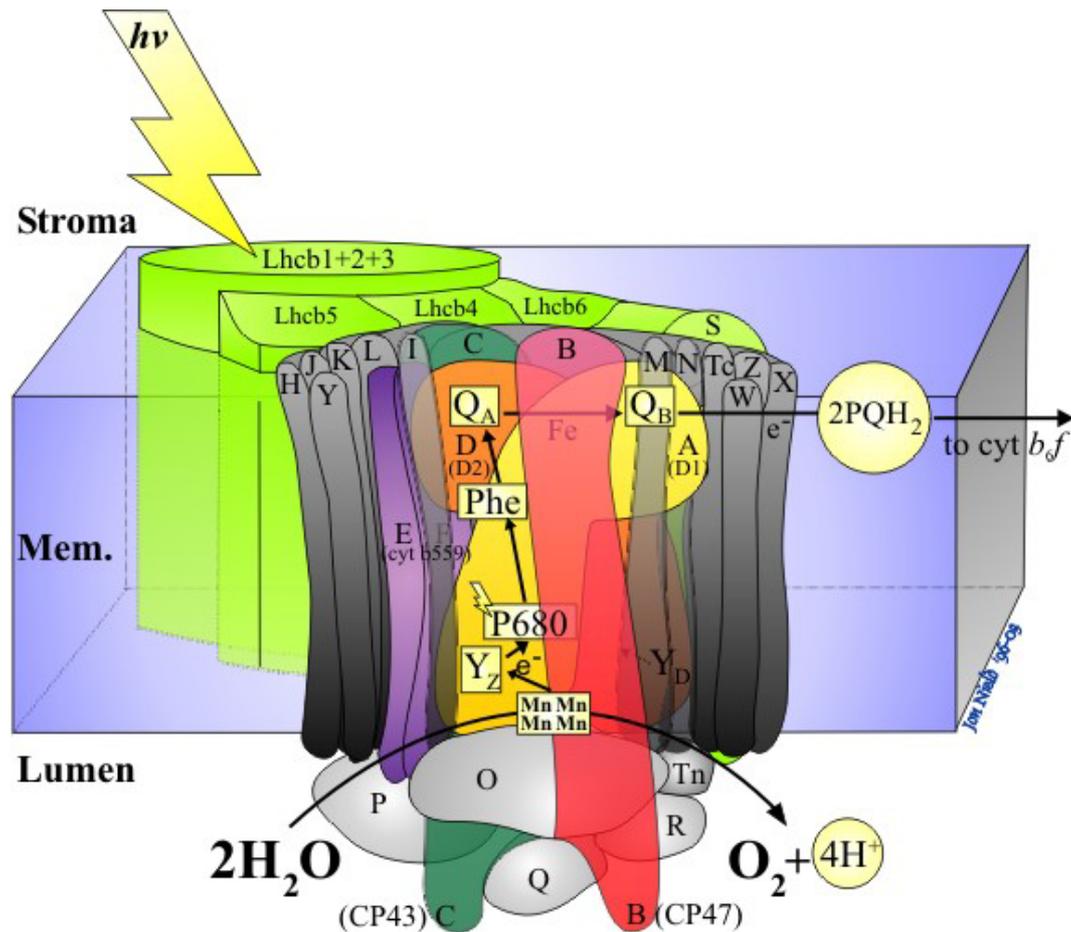


Abbildung VIII.1 – Schematische Darstellung des Photosystems II. Die jeweiligen dargestellten Proteine sind gemäß der Nomenklatur ihrer Genprodukte gekennzeichnet – z.B. O  $\hat{=}$  *psbO*, kennzeichnend für MSP bzw. das 33 kDa Protein. [180]

Über verschiedene Methoden lassen sich jedoch einige Aussagen über die Struktur des MSP treffen: Zum einen wurden über ein Alignment mit Aminosäuresequenzen des MSP aus Pflanzen, Algen und Cyanobakterien die innerhalb dieser Sequenzen konservierten Aminosäuren identifiziert, um dann aus dieser Konsensussequenz eine Sekundärstruktur des MSP zu berechnen. [181] Das Ergebnis dieser Strukturvorhersage sagt in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Circular dichroismus-Messungen und FT-IR-Untersuchungen [166,182,183] aus, dass im MSP der  $\beta$ -Faltblattanteil im Vergleich zu dem an  $\alpha$ -Helices wesentlich größer ist (38,3 bzw. 3,2 %). Des Weiteren besteht das MSP nach dieser Analyse zu 38,7 % aus Aminosäuren, die an der Ausbildung einer Schleife beteiligt sind. Trotz des Gesamtanteils an  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -Helixbereichen von 41,5 %, der lokal zu einer sehr geringen Lösungsmittelzugänglichkeit der beteiligten Aminosäuren führen kann, ist demnach der Anteil an Aminosäuren, die sich in Schleifen bzw. in nicht definierten Strukturbereichen befinden, mit insgesamt 58,5 % sehr hoch. Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass es sich bei einer derartigen Verteilung von Sekundärstrukturelementen im MSP mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein offenes, gestrecktes oder sehr flexibles Protein handelt, und stützt

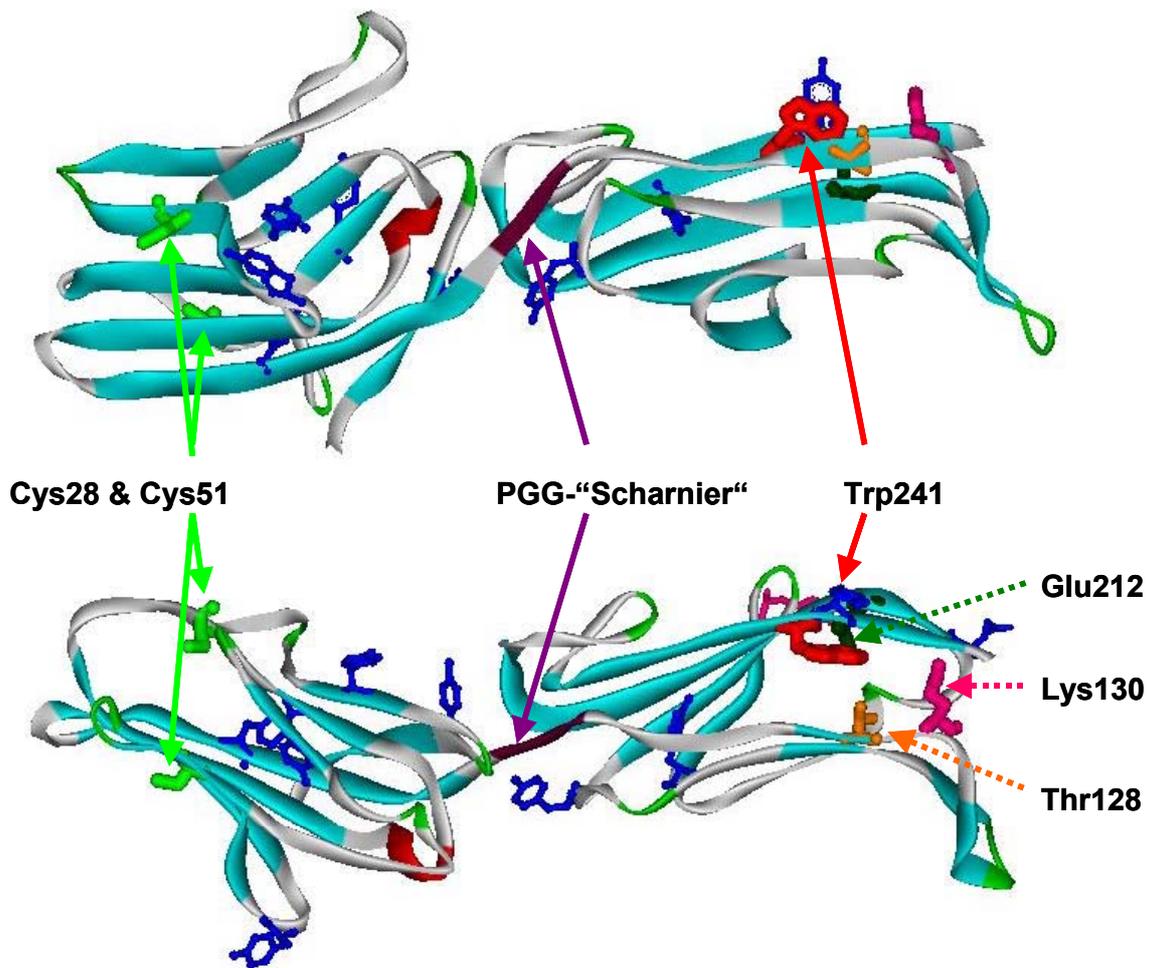


Abbildung VIII.2 – Strukturvorhersage des MSP aus Spinat auf Basis des T-Lymphozyten-Adhäsions-Glykoproteins (PDB: 1hnf). [184] Deutlich zu erkennen ist der starke  $\beta$ -Faltblattanteil an der Proteinstruktur sowie die wahrscheinliche Unterteilung des Proteins in zwei Domänen, die über ein flexibles PGG-„Scharnier“ miteinander verbunden sind. Die Sicht auf das Protein erfolgt aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln, die um  $90^\circ$  versetzt sind.

somit die erwähnten Strukturüberlegungen. Die Strukturvorhersage lokalisiert außerdem den einen Tryptophanrest des MSP in einem wohldefinierten  $\beta$ -Faltblattbereich.

Über einen Abgleich von Aminosäuresequenz und berechneter Strukturvorhersage des MSP mit 3D-Koordinaten von Proteinen bekannter Struktur wurde eine Sequenz-Struktur-Anpassung durchgeführt („*Threading*“ – vergleiche Abschnitt II.III.c). [184] Ihr zufolge kann das humane T-Lymphozyten-Adhäsions-Glykoprotein als Templat für die Strukturmodellierung des MSP verwendet werden. Der Vorschlag, ein bei der Zelladhäsion beteiligtes Protein für die Modellierung eines Proteins des OEC zu verwenden, ist an dieser Stelle nicht kritisch zu bewerten, da Proteine mit gleicher Faltung durchaus unterschiedliche Funktionen übernehmen können. [185]

Über die Technik des *Threadings* wurde das in Abbildung VIII.2 dargestellte Strukturmodell des MSP erhalten. [184] Ihm zufolge liegt das MSP in zwei Domänen mit sehr hohen

$\beta$ -Faltblattanteilen vor, die über ein sehr flexibles Prolin-Glycin-Glycin-Motiv (PGG-„Scharnier“) miteinander verbunden sind. Die beiden charakteristischen Cysteinreste (grün) befinden sich in der N-terminalen Domäne und nahe genug beieinander, um *in vivo* die erwähnte Disulfidbrücke auszubilden. Das vermutlich für die Flexibilität des MSP verantwortliche PGG-Motiv ist violett gekennzeichnet. Der einzige Tryptophanrest (Trp241, rot gekennzeichnet) befindet sich in der C-terminalen Domäne des MSP nach innen gerichtet als Teil des  $\beta$ -Faltblattverbundes. Alle Tyrosinreste (blau gekennzeichnet) mit Ausnahme des direkt neben dem Tryptophanrest befindlichen Tyr242 befinden sich dem Modell zufolge mindestens 15 Å von diesem Tryptophanrest entfernt (Tyr150 bzw. Tyr167) bzw. sogar in der anderen  $\beta$ -Faltblattdomäne des MSP. Für die Umgebung des Tryptophanrestes 241 sind außerdem potentielle Fluoreszenz-Quencher gekennzeichnet: Thr128 (~ 5,0 Å entfernt; orange), Lys130 (~ 8,5 Å entfernt; pink) und Glu212 (~ 8,2 Å entfernt; dunkelgrün).

Das gezeigte Strukturmodell ist im Einklang mit den meisten Veröffentlichungen, die sich mit Struktur und Dynamik des MSP beschäftigen: Es gibt den über spektroskopische Methoden ermittelten hohen  $\beta$ -Faltblattanteil wieder, zeigt die in hydrodynamischen Studien detektierte gestreckte Struktur und lokalisiert die zwei Cysteinreste in Positionen, die die Knüpfung der Disulfidbrücke zulassen. Zudem gibt das Zwei-Domänen-Modell in Kombination mit dem hohen  $\beta$ -Faltblattanteil zwangsläufig auch eine Erklärung für das vermehrte Auftreten von Aminosäuren in Schleifen oder ungeordneten Bereichen und somit gleichzeitig für die berichtete geringe Stabilität des MSP. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei der in Abbildung VIII.2 dargestellten Struktur um einen Strukturvorschlag handelt. Für die tatsächliche Struktur des MSP sind gewisse Abweichungen zu erwarten. Die dargestellte Struktur liefert jedoch einige Ansatzpunkte, mit denen vorläufig gearbeitet werden kann.

Die erhaltene Struktur soll mit fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen überprüft werden und gleichzeitig als Grundgerüst für selbige dienen: Mit Hilfe diverser Methoden soll die Lage des Tryptophanrestes sowie seine Umgebung unter Verwendung des Modells untersucht werden. Außerdem soll das Modell über Fluoreszenz-Quenching des Tryptophanrestes, das Informationen über die Fluorophorzugänglichkeit liefert, verifiziert werden. Fluoreszenzspektroskopische Entfaltungsstudien sollen Aufschluss über die Protein-stabilität geben. Des Weiteren soll die Interaktionsfähigkeit von MSP mit diversen zwei- und dreiwertigen Ionen ähnlicher Radien untersucht werden, da für MSP eine mögliche Bindung von Ionen (speziell von Calcium) berichtet wird. [186] Ebenso wird als eine der Rollen des MSP die Regulierung der Calcium-Anforderungen des Photosystems II diskutiert. [166] Der Meinung anderer Autoren zufolge könnte jedoch die Bindung aufgrund des hohen pI-Wertes des MSP (pI = 5,2) auf unspezifische Effekte zurückzuführen sein. [187]

## **II. Generelle Fluoreszenzeigenschaften**

### **a) AES: Apo-MSP im nativen und denaturierten Zustand**

In Abbildung VIII.3 sind die Anregungs-Emissions-Spektren für natives und denaturiertes Apo-MSP<sup>11</sup> dargestellt. Ein Vergleich der Spektren zeigt, dass relativ zum denaturierten Protein die Emission des einzigen Tryptophanrestes im nativen Protein stark gequenchet wird. Dies ist ungewöhnlich, da im Allgemeinen die Tryptophanfluoreszenz von denaturierten Proteinen aufgrund des bei ihnen verstärkten Solvens-Quenchings stark vermindert ist. [24]

### **b) Anregungsspektren für natives bzw. denaturiertes MSP**

Aus den AES erhaltene und in Abbildung VIII.4 dargestellte normierte Anregungsspektren zeigen deutliche Fluoreszenzunterschiede für natives und denaturiertes Apo-MSP. Für denaturiertes MSP befindet sich in dem Anregungsspektrum für eine Emissionswellenlänge von 308 nm ein Anregungsmaximum bei  $\lambda_{\text{ex.}} = 282 \text{ nm}$ , das auf Tyrosinmission zurückzuführen ist. In dem Spektrum für natives MSP befindet sich das Anregungsmaximum ebenfalls bei  $\lambda_{\text{ex.}} = 282 \text{ nm}$ , ist nun aber gemeinsam Tyrosin und Tryptophan zuzuordnen. Zusätzlich existiert jedoch eine sehr deutliche Schulter bei  $\lambda_{\text{ex.}} = 292 \text{ nm}$ , die ausschließlich auf Tryptophanemission zurückzuführen ist. Wegen der geringen Absorption von Tyrosin bei Wellenlängen oberhalb von 292 nm ist es also möglich, dort selektiv nur Tryptophan anzuregen. Der signifikante Fluoreszenzbeitrag von Tryptophan bei Emissionswellenlängen von 308 nm im nativen Protein deutet zudem auf eine beträchtliche Blauverschiebung des Tryptophanfluoreszenz im MSP hin.

### **c) Vergleich der Emissionsspektren bei 280 und 295 nm**

In Abbildung VIII.5 werden die Emissionsspektren von Apo-MSP im nativen und denaturierten Zustand für zwei unterschiedliche Anregungswellenlängen mit den Spektren einer Tryptophanlösung gleicher Konzentration verglichen.

Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm wird das Spektrum des nativen MSP von Tyrosin (linke Schulter des blau gekennzeichneten Spektrums in Abbildung VIII.5) dominiert. Der geringe Fluoreszenzanteil des Tryptophanrestes im nativen MSP (grün eingezeichnet) lässt sich durch Subtraktion eines Tyrosinspektrums geeigneter Intensität von dem Spektrum der nativen MSP-Form bestimmen. Dieser geringe Fluoreszenzanteil des Tryptophans am Gesamtspektrum des nativen MSP ist ungewöhnlich, da normalerweise auch bei hohen Anteilen von Tyrosin im Protein dessen Fluoreszenz aufgrund von Energietransfer-Prozessen relativ zu der von Tryptophan stark vermindert ist. [24] Deutlich zu erkennen ist eine starke Zunahme an Tryptophanfluoreszenz bei Denaturierung.

---

<sup>11</sup> Kennzeichnung: ionenfreies oxidiertes MSP wird in Kurzform als Apo-MSP bezeichnet. Dem entgegengesetzt ist die Bezeichnung Holo-MSP für ionenbindendes oxidiertes MSP. Probenpräparation: 15  $\mu\text{M}$  Apo-MSP in 25 mM Mes-Puffer pH 6,5, 10 mM NaCl. Denaturierung erfolgt mit 8 M Guanidinium-Hydrochlorid.

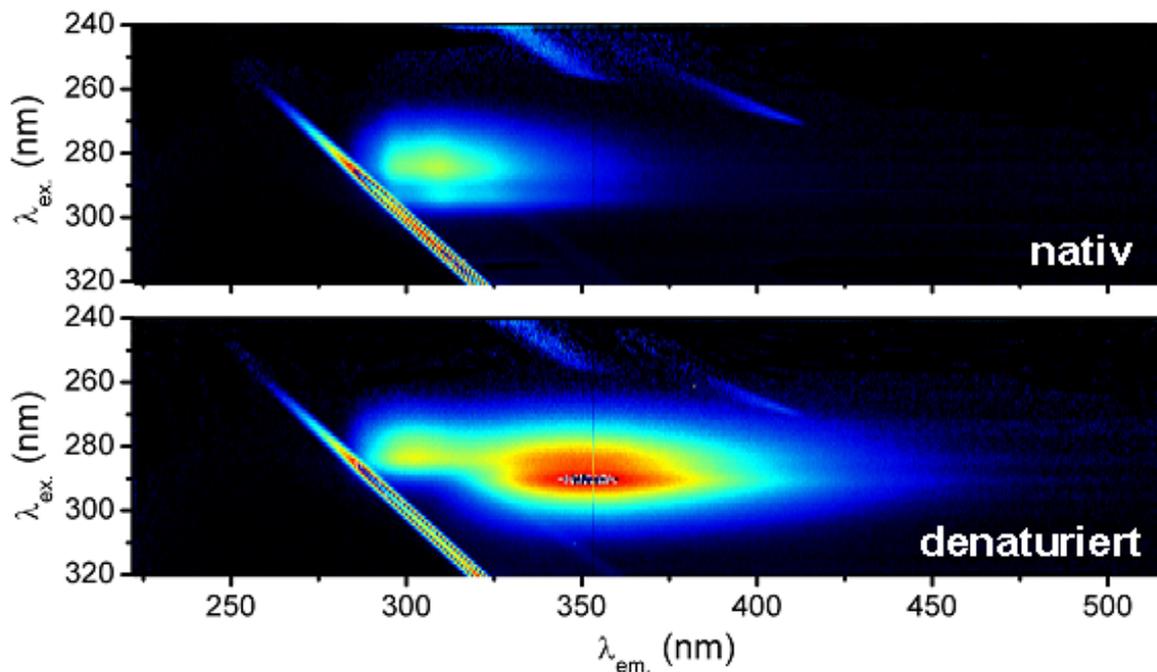


Abbildung VIII.3 – Anregungs-Emissions-Spektren von Apo-MSP im nativem bzw. denaturierten Zustand<sup>11</sup>

Beides zusammen deutet auf starkes internes Quenching sowie geringen intramolekularen Tyrosin-Tryptophan-Energietransfer durch ungewöhnlich große Tyrosin-Tryptophan-Abstände im Protein hin. Da sich nach dem Strukturmodell mit Ausnahme des direkt benachbarten Tyrosins (Tyr242) alle anderen Tyrosinreste in einem Abstand von mindestens 15 Å von dem Tryptophanrest befinden und der Förster-Abstand für FRET zwischen Tyrosin und Tryptophan in Proteinen zwischen 9 und 18 Å liegt, [24] sind sie vermutlich zu weit

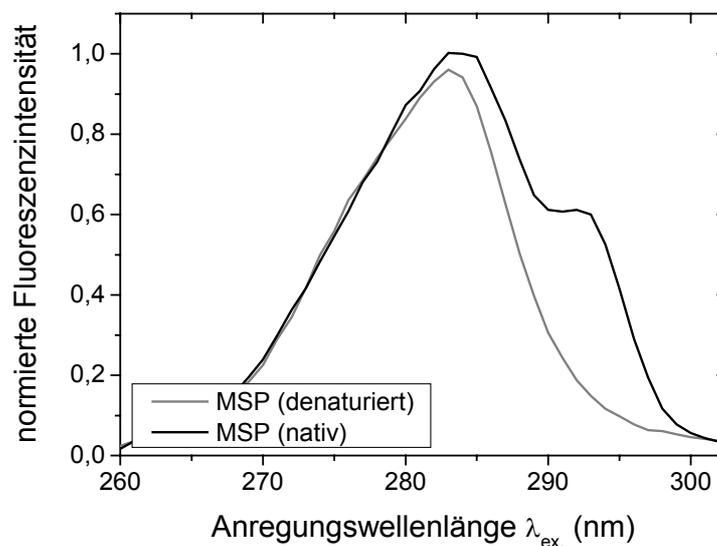


Abbildung VIII.4 – Anregungsspektren von nativem/denaturiertem MSP bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{em.} = 308$  nm.

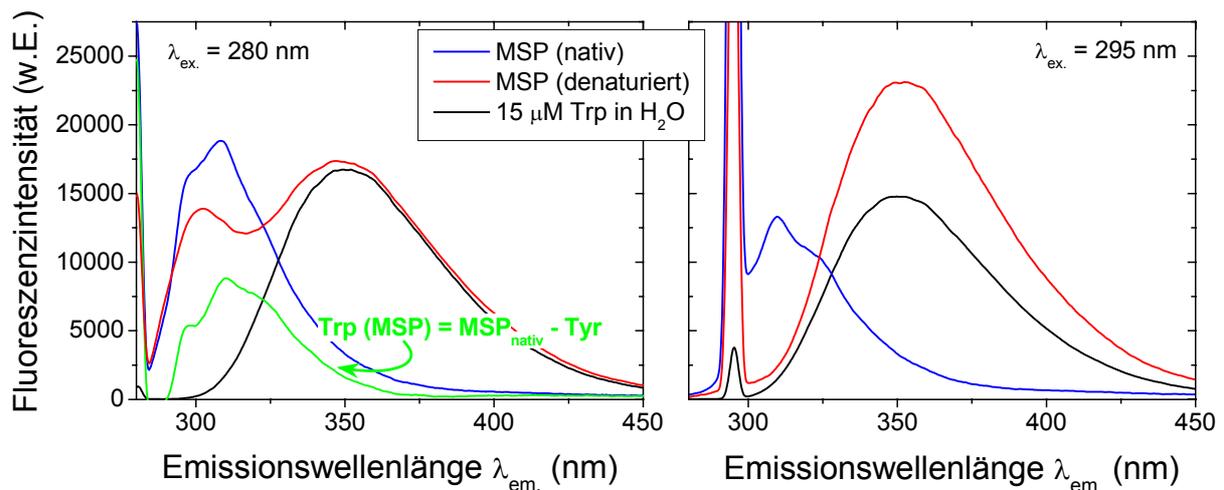


Abbildung VIII.5– Emissionsspektren von nativem und denaturiertem Apo-MSP sowie einer wässrigen Tryptophan-Lösung bei Anregungswellenlängen von  $\lambda_{\text{ex.}} = 280$  und  $295$  nm.

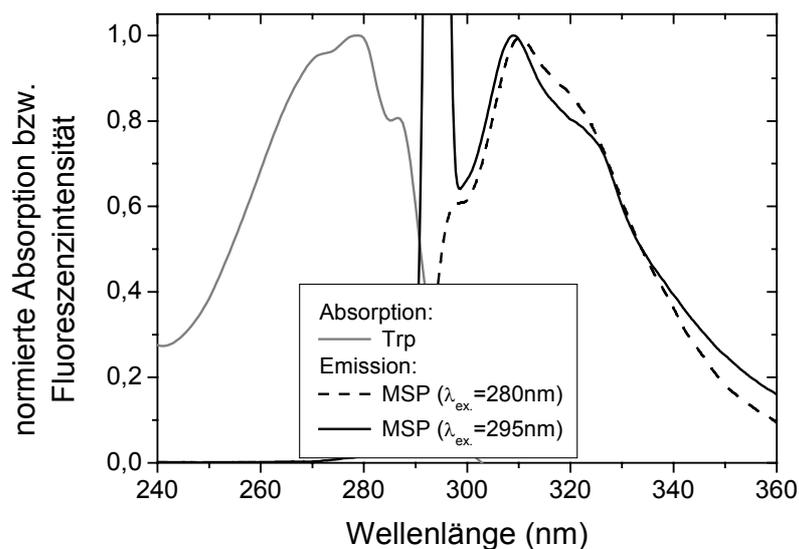


Abbildung VIII.6 – Nur leicht verzerrte Spiegelsymmetrie von Absorptions- und Emissionsspektren (für  $\lambda_{\text{ex.}} = 280$  und  $295$  nm) im MSP.

entfernt, um als FRET-Donoren für Trp241 fungieren zu können. Der nicht stattfindende Energietransfer von Tyr242 auf Trp241 ist mit einer ungünstigen Orientierung der beiden Fluorophore zu erklären, die ebenfalls einen Einfluss auf die Energietransfereffizienz hat.

Das interne Quenching der Tryptophanfluoreszenz kann auf die räumliche Nähe verschiedener Aminosäuren zurückzuführen sein. Dafür kommen z.B. (in der Reihenfolge ihrer Quencheffizienzen) Cystin [81], Cystein [188], Prolin [83], Methionin [188], Glutamat [84], Aspartat [188], Arginin [83], Histidin, Serin und Threonin [188], Glycin und Lysin [83] sowie Valin und Alanin [188] in Betracht. Von Quenching durch Cystin/Cystein (Cys28 & Cys51) sowie Methionin (Met78) ist nicht auszugehen, da sich diese Aminosäuren nach der

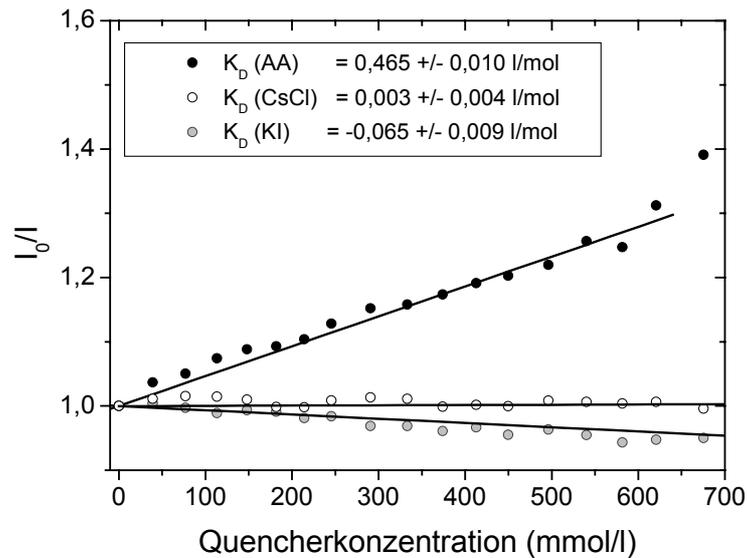


Abbildung VIII.7 – Stern-Volmer-Plots für Quenching des nativen MSP mit Acrylamid (AA), KI und CsCl. Vgl. Abbildung VIII.8 für Stern-Volmer-Auftragungen für denaturiertes MSP.

Modellstruktur in der anderen Domäne des MSP und somit zu weit von dem Tryptophanrest entfernt befinden. Da sich außerdem in der Nähe des Tryptophans keine Prolinreste befinden, ist das interne Quenching vermutlich auf geladene Aminosäuren wie Glutamat, Aspartat, Arginin und Lysin, oder auf Threonin zurückzuführen. Die wahrscheinlichsten Quencher sind die in Abbildung VIII.2 dargestellten Reste Thr128, Lys130 und Glu212 in Abständen von ca. 5,0, 7,0 bzw. 8,7 Å. Welche(r) der genannten Aminosäuren für die geringe Quantenausbeute des Tryptophans verantwortlich ist oder sind, ist ohne Kristallstruktur nur über die Untersuchung verschiedener Deletionsmutanten zu klären.

Die Emissionsspektren des Tryptophans im nativen Protein, die entweder durch Subtraktion eines geeigneten Tyrosinspektrums vom gemessenen Gesamtspektrum bei  $\lambda_{\text{ex.}} = 280 \text{ nm}$  oder durch selektive Anregung des Tryptophans bei  $\lambda_{\text{ex.}} = 295 \text{ nm}$  erhalten wurden, zeigen eine stark strukturierte Form. Diese stammt nicht etwa von einer Überlagerung des sehr geringen Fluoreszenzsignals mit dem Raman-Signal des Wassers, das bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm bei 310 nm bzw. für eine Anregungswellenlänge von 295 nm bei 328 nm im Spektrum zu sehen ist. Stattdessen ist sie auf die verminderte Lösungsmittelrelaxation aufgrund des sehr geringen Stokes Shift des Fluorophors zurückzuführen, so dass die normalerweise in Proteinfluoreszenzuntersuchungen nicht mehr gegebene Spiegelsymmetrie (vgl. Abbildung VIII.6) von Absorptions- und Emissionsspektrum des Tryptophans wieder eintritt. Dies wurde bereits für Azurin und Amicyanin berichtet. [189,190] Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass Azurin ebenfalls ein Protein mit hohem  $\beta$ -Faltblattanteil und einem innerhalb des  $\beta$ -Faltblattbereichs nach innen gerichteten Tryptophan ist. [191]

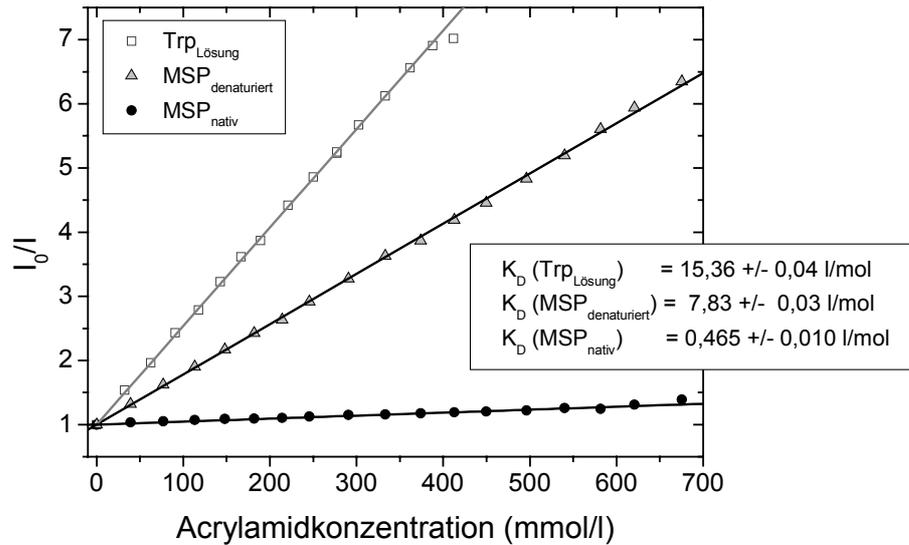


Abbildung VIII.8 – Stern-Volmer-Auftragung für Acrylamid-Quenching von nativem und denaturiertem MSP verglichen mit der einer wässrigen Tryptophan-Lösung.

### III. Quenching-Untersuchungen am MSP-Tryptophan

Um die Zugänglichkeit des Tryptophans im MSP zu ermitteln, wurden Quenching-Untersuchungen mit Acrylamid (im nativen und im mit Guanidinium-Hydrochlorid denaturierten Zustand) sowie mit Cäsium und Iodid (nur im nativen Zustand) durchgeführt. Wegen der geringen Quantenausbeute des MSP-Tryptophans und wegen des starken Tyrosinanteils an der Proteinfluoreszenz wurden die Quenching-Daten für eine Anregungswellenlänge von 295 nm ausgewertet.

Abbildung VIII.7 zeigt die Stern-Volmer-Auftragungen für Quenching des Tryptophans im nativen Apo-MSP mit neutralem Acrylamid sowie mit den geladenen Quenchern Iodid ( $I^-$ ) und Cäsium ( $Cs^+$ ). Im nativen Zustand ist die Stern-Volmer-Konstante für Acrylamid-Quenching des Tryptophans nur sehr gering ( $K_D = 0,465$  l/mol; Vergleichswert für nicht Protein-gebundenes Tryptophan:  $K_D = 15,36$  l/mol), was bedeutet, dass dieser Rest extrem schlecht zugänglich ist. Dies wurde bereits durch das stark blau verschobene Emissionsmaximum impliziert. Aufgrund der geringen Zugänglichkeit des Tryptophans im MSP kann auf eine Korrektur der Einflussphäre bei den Stern-Volmer-Auftragungen verzichtet werden (vgl. Abschnitt II.IV.a). Im Vergleich zu Azurin<sup>12</sup> ( $\lambda_{em.,max} = 308$  nm) ist der Tryptophanrest im MSP bei ähnlichem Emissionsmaximum ( $\lambda_{em.,max} = 309$  nm) etwas besser zugänglich. [193]

Für Quenching durch Iodid und Cäsium sind die Stern-Volmer-Konstanten im Prinzip gleich null. Ein bevorzugtes Quenching der Tryptophanfluoreszenz durch geladene Quencher, wie es

<sup>12</sup> Literaturwerte für Acrylamid-Quenching bei Azurin:  $K_D$ (Holo-Azurin)  $\approx 0$  l/mol;  $K_D$ (Apo-Azurin) = 0,24 l/mol. [192]

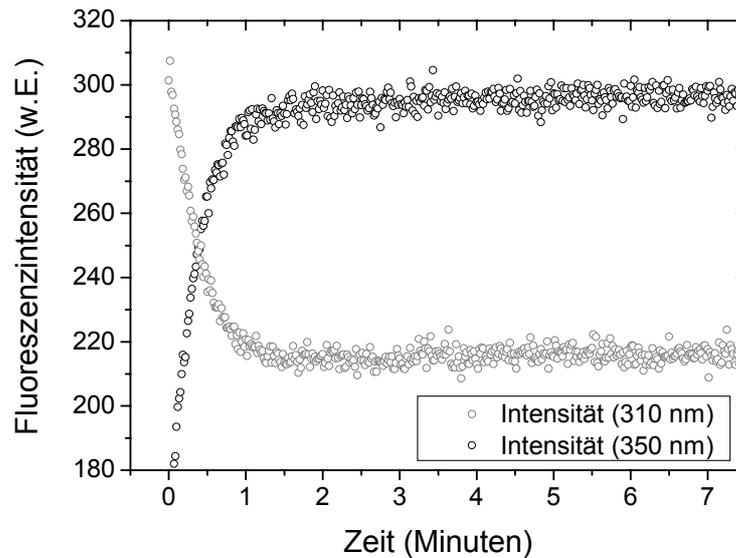


Abbildung VIII.9 – Zeitliche Abhängigkeit der Harnstoff-Entfaltung von oxidiertem Apo-MSP (detektiert als Fluoreszenzintensität bei Emissionswellenlängen von 310 bzw. 350 nm).

bei geladenen Tryptophanumgebungen auftritt, wird somit nicht beobachtet. Die für Iodid ermittelte negative Stern-Volmer-Konstante ist vermutlich ein Artefakt, das z.B. auf eine strukturelle Änderung oder Zusammenlagerung des Proteins bei Iodid-Zugabe zurückzuführen ist, da sich hierbei die Fluoreszenzintensität des Tryptophans selektiv erhöht, anstatt gequench zu werden. Der Tryptophanrest liegt also definitiv in einer extrem unpolaren, solvensunzugänglichen Umgebung vor.

Über Quenching des Tryptophans im denaturierten MSP lässt sich die erfolgreiche Entfaltung des MSP nachweisen (Abbildung VIII.8). Die Stern-Volmer-Konstante (berechnet über eine lineare Anpassung an die erhaltenen Messdaten nach Berücksichtigung der Einflussphären-Abweichung) liegt in diesem Fall mit 7,83 l/mol unter dem Wert für freies Tryptophan von 15,36 l/mol. Dies ist dadurch zu erklären, dass trotz Denaturierung immer noch eine gewisse Einschränkung in Bezug auf die Zugänglichkeit des Tryptophans vorliegt: Im Gegensatz zu freiem Tryptophan liegt das MSP-Tryptophan nach der Entfaltung nicht monomer, sondern als Bestandteil der Polypeptidkette vor. Deswegen kann es im entfalteten Zustand nicht uneingeschränkt zugänglich sein.

#### **IV. Stabilität des MSP - Entfaltungsstudien**

Die Stabilität eines Proteins kann bei Denaturierung neben anderen Verfahren über fluoreszenzspektroskopische Methoden bestimmt werden. [103,194] Die Denaturierung kann dabei auf chemischem [195-197] (z.B. mit Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid) oder thermischem [198,199] Wege erfolgen. In der Literatur werden für die Entfaltung je nach Protein ein- [200-202] und mehrstufige [192,203] Entfaltungsvorgänge vorgestellt, so dass nicht notwendigerweise von einem einfachen Prozess auszugehen ist.

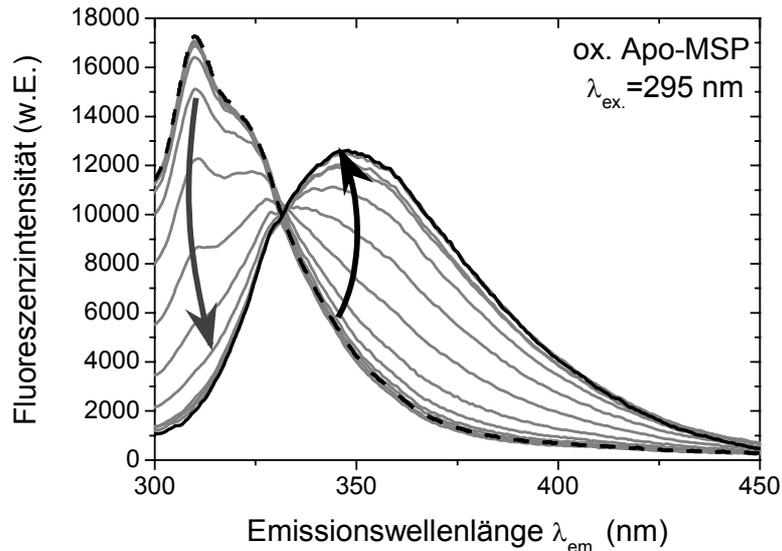


Abbildung VIII.10 – Veränderung der Emissionsspektren von oxidiertem Apo-MSP bei der Denaturierung mit Harnstoff. Grenzfälle: (--) native und (—) denaturierte Form des MSP. Die Anregungswellenlänge war  $\lambda_{\text{ex.}} = 295 \text{ nm}$ .

**a) Chemische Denaturierung mit Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid**

Notwendig für die Auswertung ist, dass zum Zeitpunkt der Spektrenaufnahme die Denaturierung bis zur Einstellung des Gleichgewichtes erfolgt ist, da Entfaltungsvorgänge durchaus auch im Minuten- bis Stunden-Zeitraum stattfinden können. Aus diesem Grund wurde zunächst die Entfaltung des MSP nach Zugabe von Harnstoff zeitabhängig untersucht (Abbildung VIII.9).

Nach Zugabe des Harnstoffs erkennt man eine starke Abnahme an Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 310 nm, nahe dem Emissionsmaximum des Tryptophanrestes im nativen Protein. Bei 350 nm (nahe dem Emissionsmaximum von Tryptophan in wässriger Lösung) ist hingegen eine starke Zunahme zu beobachten. Deutlich zu erkennen ist, dass nach Zugabe von Harnstoff (Konzentration in Lösung nach Zugabe: 3,8 M) die Entfaltung sehr schnell innerhalb eines Zeitraumes von ca. einer Minute vollständig erfolgt. Für die im Folgenden vorgestellten spektroskopischen Denaturierungsstudien wurde deswegen darauf geachtet, nach jedem einzelnen Pipettierschritt ca. zwei Minuten zu warten, um zu gewährleisten, ein im Gleichgewicht befindliches System zu untersuchen.

**b) Veränderung der Emissionsspektren bei Denaturierung**

Abbildung VIII.10 zeigt beispielhaft für oxidiertes Apo-MSP die Veränderung der bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm aufgenommenen Emissionsspektren während der konzentrationsabhängigen Denaturierung mit 0 bis 7 M Harnstoff. Die Pfeile kennzeichnen die bereits erwähnte Fluoreszenzabnahme bei  $\sim 310 \text{ nm}$  (grau) und die Zunahme der Fluoreszenz bei  $\sim 350 \text{ nm}$ . Da die Messungen so durchgeführt wurden, dass zu einer bestimmten Menge an Proteinlösung schrittweise unterschiedliche Mengen einer

hochkonzentrierten Harnstofflösung in die Küvette gegeben wurden, wurde die Proteinlösung im Zuge der Denaturierungstitration verdünnt. Dieser Verdünnungseffekt wurde bei der Auswertung berücksichtigt und die dargestellten Spektren sind auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  normiert.

c) *Entfaltung von oxidiertem Apo-MSP – Betrachtung der Emissionsmaxima*

In Abbildung VIII.11 ist die Veränderung des Emissionsmaximums ( $\lambda_{\text{ex.}} = 295 \text{ nm}$ ) von oxidiertem Apo-MSP bei der Denaturierung mit Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid dargestellt.

Die dargestellten Emissionsmaxima entsprechen den Maximalwerten der geglätteten Emissionsspektren. Für den Fall, dass die Spektren (speziell im Übergangsbereich der Entfaltung) einen sehr starken Raman-Anteil bei 328 nm enthielten, der mit dem Emissionsmaximum des Spektrums interferierte, wurde an die Messdaten eine Lognormal-Verteilung gemäß Gleichung (II.25) (vgl. Abschnitt II.III.f) angepasst, über die nach Umrechnung aus der Maximalfrequenz  $\tilde{\nu}_m$  das Emissionsmaximum erhalten werden konnte. Für die stark strukturierten Spektren der nativen Formen ist die Anpassung nicht verwendbar, für die Bestimmung von Emissionsmaxima bei Spektren mit starken Raman-Anteilen ist sie jedoch gut geeignet (vergleiche auch Abschnitt VII.IV.b).

Mit beiden Denaturierungsmitteln erfolgt eine vollständige Entfaltung, wie aus der Verschiebung des Emissionsmaximums von ca. 310 nm zu ca. 350 nm im Laufe der Titration zu erkennen ist. Des Weiteren deutet die Tatsache, dass die Entfaltungskurve kein Plateau durchläuft, auf einen einstufigen Entfaltungsprozess hin. [200,201,204]

Die jeweiligen Übergangsbereiche befinden sich bei unterschiedlichen Konzentrationen an Denaturant: Für Guanidinium-Hydrochlorid findet die Entfaltung bei niedrigen

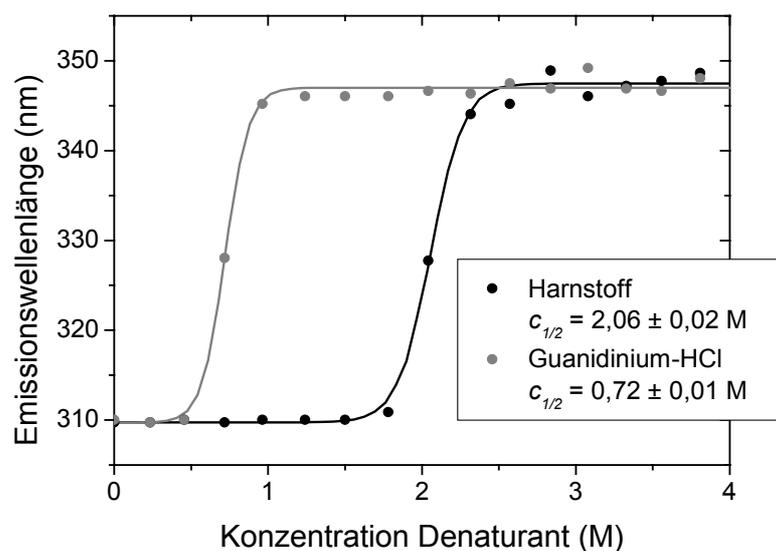


Abbildung VIII.11 – Veränderung des Emissionsmaximums von oxidiertem Apo-MSP bei der Denaturierung mit Harnstoff bzw. Guanidinium-Hydrochlorid.

Konzentrationen (unter 1 M) statt, wohingegen mehr als doppelt so hohe Harnstoffkonzentrationen für die Entfaltung benötigt werden. Dies Resultat liegt darin begründet, dass es sich bei Guanidinium-Hydrochlorid um das stärkere der beiden Denaturierungsmittel handelt. [200,202,203,205] Um die erhaltenen Entfaltungskurven quantitativ auszuwerten, wurde an die Daten eine sigmoidale Boltzmann-Funktion gemäß

$$y(x) = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 - \exp\left(\frac{x - c_{1/2}}{dx}\right)} \quad (\text{VIII.1})$$

angepasst, die sehr gut die Bestimmung der Übergangspunkte  $c_{1/2}$  („*transition midpoints*“ = „*points of half maximum fluorescence intensity*“) [204,206,207] der Entfaltung gestattete.

Für Guanidinium-Hydrochlorid liegt der Übergangspunkt der Entfaltung bei  $c_{1/2} = 0,72 \pm 0,01$  M und für Harnstoff bei  $c_{1/2} = 2,06 \pm 0,02$  M. Im Vergleich zu anderen publizierten einstufigen Entfaltungsvorgängen sind diese Werte sowohl für Guanidinium-Hydrochlorid [198,203,208,209] als auch für Harnstoff [202,204,210] sehr niedrig. Für Guanidinium-Hydrochlorid ist es sogar der niedrigste Wert verglichen mit allen gefundenen Literaturdaten. Diese Werte deuten somit auf eine ungewöhnlich geringe Stabilität für MSP hin.

#### d) *Entfaltung von oxidiertem Apo-MSP - Veränderung der Intensitäten*

Abbildung VIII.13 zeigt die relative Änderung der Fluoreszenzintensität des oxidierten Apo-MSP bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex.}} = 295$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{\text{em.}} = 346$  nm bei Denaturierung mit Guanidinium-Hydrochlorid und Harnstoff. Die Veränderung der Fluoreszenz lässt sich als ein einstufiger Prozess beschreiben, wie an der guten Übereinstimmung mit der Anpassung (sigmoidale Boltzmann-Funktion) zu sehen ist.

Die unterschiedliche Fluoreszenz für den nativen und den denaturierten Zustand des Proteins kann wieder dazu benutzt werden, die jeweiligen Übergangspunkte der Entfaltung zu bestimmen. Diese liegen nach dieser Methode für eine Entfaltung mit Harnstoff bei  $c_{1/2} = 1,93 \pm 0,06$  M und für Guanidinium-Hydrochlorid bei  $c_{1/2} = 0,73 \pm 0,01$  M und sind im Rahmen der Fehler identisch mit den in Absatz c) bestimmten Daten. Die erhaltenen Daten sind sehr ähnlich zu Literaturdaten, die für die Entfaltung des ebenfalls aus Spinat isolierten oxidierten Apo-MSP mit Guanidinium-Hydrochlorid einen Entfaltungspunkt von  $c_{1/2} \approx 0,5$  M lieferte. [199]

Da der Übergangspunkt der Entfaltung abhängig von dem verwendeten Denaturierungsmittel ist, kann er nicht für den Vergleich der MSP-Stabilität mit anders denaturierten Proteinen angewendet werden. Informativer ist deswegen die Änderung der Freien Enthalpie für den Entfaltungsvorgang, die aus den Fluoreszenzdaten wie folgt bestimmt werden kann. [103]

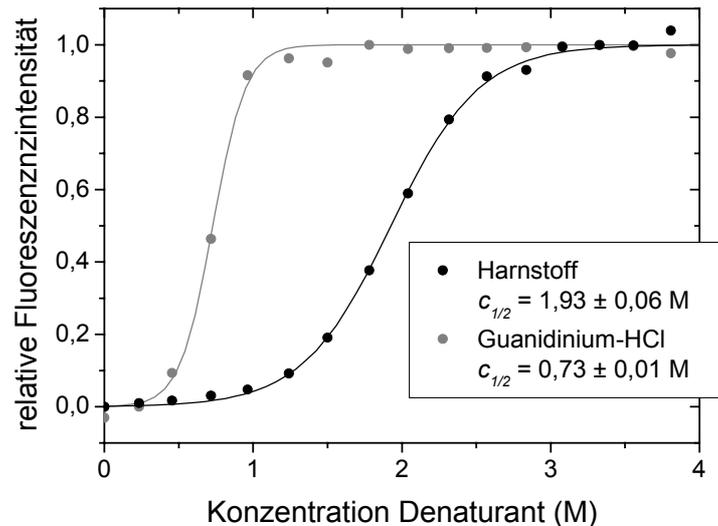


Abbildung VIII.13 – Relative Änderung der MSP-Fluoreszenz bei 346 nm bei Denaturierung mit Guanidinium-Hydrochlorid und Harnstoff.

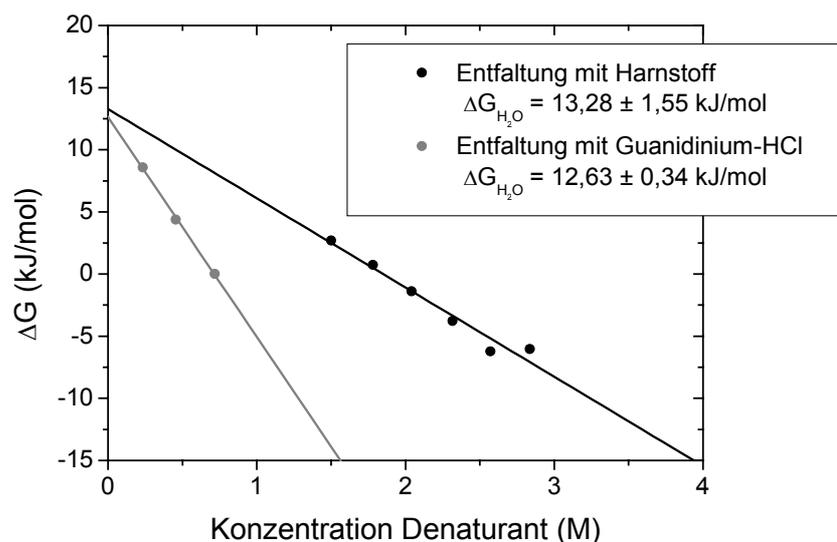


Abbildung VIII.12 – Bestimmung der Freien Entfaltungs-Enthalpie über eine Extrapolation für die Entfaltungsdaten für Guanidinium-Hydrochlorid und Harnstoff. Da für die Auswertung nur die Werte im Übergangsbereich von Abbildung VIII.13 verwendet werden können, ist die Zahl der Datenpunkte stark verringert.

Die Gleichgewichtskonstante  $K$  für die Entfaltungsreaktion kann durch den jeweiligen Fluoreszenzbeitrag  $I$  bei einer bestimmten Denaturantenkonzentration sowie den der reinen nativen bzw. entfalteten Komponente  $I_N$  bzw.  $I_E$  ausgedrückt werden (Abschnitt II.IV.c):

$$K = \frac{I_N - I}{I - I_E} \quad (\text{II.40})$$

Die Freie Entfaltungs-Enthalpie  $\Delta G$  lässt sich über die von der Denaturantenkonzentration abhängige Gleichgewichtskonstante bei der jeweiligen Temperatur  $T$  gemäß

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K \quad (\text{VIII.2})$$

bestimmen. Zur Bestimmung der tatsächlichen Proteinstabilität, also der Freien Enthalpie für eine Entfaltung ohne chemische Hilfsmittel  $\Delta G_{H_2O}$ , wird für mehrere erhaltene  $\Delta G$ -Werten ein linearer Zusammenhang mit der jeweiligen Konzentration des Denaturierungsmittels angenommen und auf eine Konzentration von 0 M über

$$\Delta G = \Delta G_{H_2O} - m \cdot [\text{Denaturant}] \quad (\text{VIII.3})$$

extrapoliert. [103] Die Steigung  $m$  ist dabei ein Maß für die Wechselwirkung des jeweiligen Agens mit dem zu denaturierenden Protein und ist umso negativer, je besser die Denaturierung mit diesem Stoff erfolgt.

Abbildung VIII.12 zeigt die Bestimmung der Freien Entfaltungs-Enthalpie ohne chemische Zusätze  $\Delta G_{H_2O}$  aus den in Abbildung VIII.13 dargestellten Fluoreszenzveränderungen des Apo-MSP bei der Entfaltung mit Guanidinium-Hydrochlorid und Harnstoff. Deutlich zu erkennen ist die stärkere Änderung der Freien Entfaltungs-Enthalpie mit der Konzentration an Guanidinium-Hydrochlorid im Vergleich zu Harnstoff. Des Weiteren liefern beide chemischen Entfaltungsmethoden vergleichbare Werte für die Entfaltungs-Enthalpie des MSP, die für die Bestimmung mit Harnstoff  $13,28 \pm 1,55$  kJ/mol und mit Guanidinium-Hydrochlorid  $12,63 \pm 0,34$  kJ/mol beträgt. Somit ist diese Methode zur Analyse der chemischen Denaturierung eine exzellente Möglichkeit zur Bestimmung der Entfaltungs-Enthalpien von Proteinen. Eine 1989 durchgeführte Studie [199] lieferte für die Freie Entfaltungs-Enthalpie des Apo-MSP aus Spinat zwei Werte von 11,7 bzw. 18,4 kJ/mol. Diese Werte wurden über zwei unterschiedliche Extrapolationsverfahren mit dem gleichen Datensatz erhalten und bestätigen im Rahmen ihrer hohen Abweichung voneinander die hier ermittelten Ergebnisse. Die bestimmten Werte von ca. 13 kJ/mol liegen im Vergleich zu den Literaturdaten für andere Proteine, wie bereits die Werte für die Übergangspunkte, sehr niedrig. Es sind nur wenige Proteine mit einer vergleichbar niedrigen Stabilität bekannt. [195,197,200] Z.B. ist das in Bezug auf die Lage des Emissionsmaximums sehr ähnliche Azurin im Vergleich dazu wesentlich stabiler.<sup>13</sup> Folglich kann die publizierte geringe Stabilität des Apo-MSP über die hier vorgestellten Untersuchungen verifiziert werden.

---

<sup>13</sup> Die Entfaltung von Kupfer-bindendem Azurin mit Guanidinium-Hydrochlorid verläuft einstufig. Der Übergangspunkt der Entfaltung von Holo-Azurin wird mit 3,94 M und die Freie Entfaltungs-Enthalpie mit 52,2 kJ/mol Azurin angegeben. Für Apo-Azurin beträgt der Übergangspunkt der Entfaltung 1,66 M. Ein Wert für die Entfaltungsenthalpie von Apo-Azurin wurde nicht bestimmt. [209]

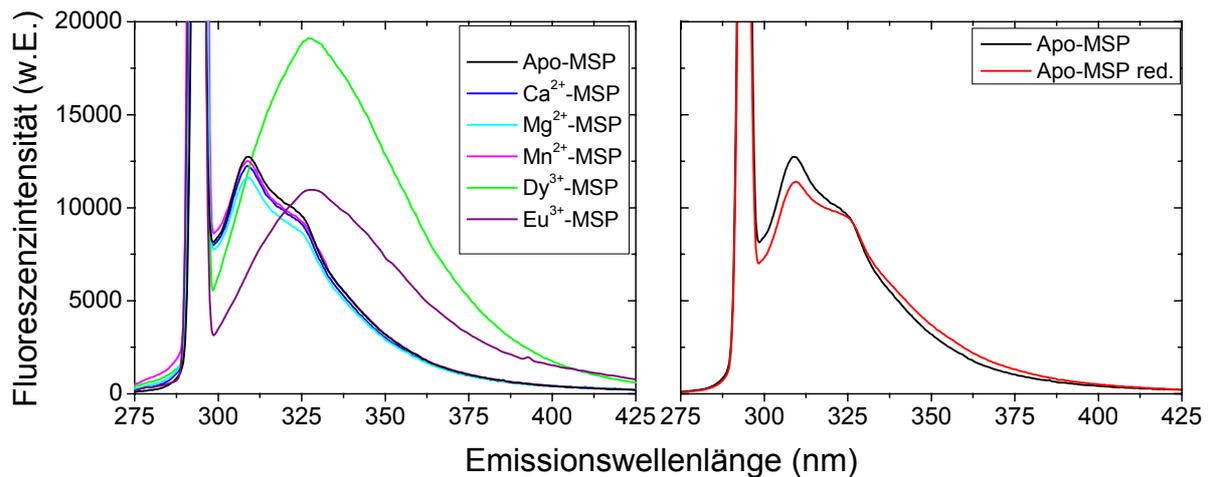


Abbildung VIII.14 - Emissionsspektren des MSP bei  $\lambda_{\text{ex.}} = 295 \text{ nm}$  bei Inkubation mit verschiedenen Ionen und in Abhängigkeit des Redoxzustandes. Die MSP-Konzentration ist  $10 \mu\text{M}$ . Die Ionenkonzentration beträgt  $2 \text{ mM}$ ; Reduktion erfolgt durch  $10 \text{ mM DTT}$ .

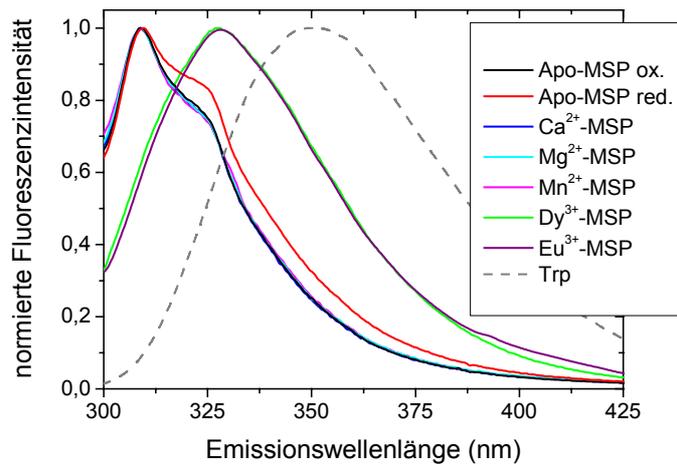
## V. Ionenbindung des MSP

Das Manganstabilisierende Protein soll auf eine noch nicht geklärte Art und Weise den  $(\text{Mn})_4$ -Cluster des Photosystems II stabilisieren. Außerdem wird als eine seiner weiteren Funktionen die Bindung von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) diskutiert. [186] Es wurden daher verschiedene Experimente durchgeführt, um herauszufinden, ob fluoreszenzspektroskopisch die Bindung von Mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ ) und Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) oder von Ionen vergleichbarer Ionenradien, wie dem zweiwertigen Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) sowie den dreiwertigen Ionen Dysprosium ( $\text{Dy}^{3+}$ ) und Europium ( $\text{Eu}^{3+}$ ), nachgewiesen werden kann.

Betrachtet wurde dabei der Unterschied in den Emissionsspektren und den Fluoreszenzlebenszeiten der jeweiligen Holo-Formen (erhalten über Inkubation des oxidierten Apo-MSP mit  $2 \text{ mM}$  Chlorid des entsprechenden Ions) zu der ionenfreien Apo-Form. Außerdem wurde die Stabilität der jeweiligen Holo-Formen des MSP über Denaturierung mit Harnstoff bestimmt. Schließlich wurde eine Bindungsstudie durchgeführt, bei der zu oxidiertem Apo-MSP schrittweise kleine Mengen an Salzlösung (Konzentration in der Proteinlösung  $0 - 14 \text{ mM}$ ) gegeben wurde, um über eine Änderung der relativen Fluoreszenz die jeweiligen Bindungskonstanten zu bestimmen.

### a) Anregungs- und Emissionsspektren für Ionenbindung des MSP

In Abbildung VIII.14 sind die Emissionsspektren für das Apo-MSP sowie für die mit verschiedenen Ionen inkubierten Holo-Formen dargestellt. Um zudem den Einfluss der einen Disulfidbrücke [171] auf die Struktur des MSP zu untersuchen, wurde das Apo-MSP sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand untersucht.



	$\lambda_{em., max.}$ (nm)
MSP (ox.)	308,7
MSP (red.)	309,5
Ca <sup>2+</sup> -MSP	308,7
Mg <sup>2+</sup> -MSP	309,0
Mn <sup>2+</sup> -MSP	308,7
Dy <sup>3+</sup> -MSP	327,0
Eu <sup>3+</sup> -MSP	327,5

Abbildung VIII.15 – normierte Emissionsspektren bei  $\lambda_{ex.} = 295$  nm. Zum Vergleich aufgeführt ist das Emissionsspektrum von Tryptophan in wässriger Lösung. Versuchsbedingungen siehe oben.

Die Spektren für MSP, das mit den zweiwertigen Ionen inkubiert wurde, zeigen (im Gegensatz zu MSP, das mit dreiwertigen Ionen inkubiert wurde und dann Emissionsmaxima bei  $\sim 327$  nm aufweist) das stark blau verschobene Emissionsmaximum bei  $\sim 309$  nm, das schon für Apo-MSP beobachtet wurde. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist die Lage der Emissionsmaxima identisch, wie an den normierten Spektren sowie den angegebenen Daten in Abbildung VIII.15 zu erkennen ist. Auch in Bezug auf die Fluoreszenzintensitäten sind die Spektren der mit Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> inkubierten Formen sehr ähnlich zum oxidierten Apo-MSP: Es kann kein stark quenchender Einfluss der gebundenen Ionen festgestellt werden. Somit ist im Gegensatz zu Azurin und Amicyanin die Quantenausbeute des MSP nur zu einem geringen Teil abhängig von der Ionenbindung. [190,211] Das unveränderte Emissionsmaximum und die geringe Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bindung dieser Ionen unspezifisch erfolgt. Möglich ist natürlich auch, dass eine spezifische Bindung der Ionen in der Tryptophan nicht enthaltenden Domäne des MSP stattfindet und somit keine Fluoreszenzveränderung bewirkt.

Die Reduktion der einen Disulfidbrücke im MSP hat, ähnlich wie die Ionenbindung, einen nur geringen Einfluss auf die Lage des Emissionsmaximums und die Quantenausbeute. Zwar kann eine leichte Verschiebung des Emissionsmaximums um ca. 0,8 nm sowie eine Verstärkung der Schulter bei  $\sim 330$  nm im Spektrum beobachtet werden, aber diese Indizien sind nicht ausgeprägt genug, um Rückschlüsse auf eine strukturelle Veränderung des MSP bei Reduktion zuzulassen. Die geringe Veränderung in den Spektren ist damit konsistent, dass sich die beiden Cysteinreste, die im oxidierten Apo-MSP eine Disulfidbrücke bilden, in dem Modell weit entfernt von dem spektroskopisch untersuchten Tryptophanrest befinden, da ihr Oxidationszustand keine relevanten Einfluss auf die MSP-Fluoreszenz zeigt.

Das stark unterschiedliche Emissionsmaximum sowie der generelle starke Unterschied in der Form der Spektren des mit Dysprosium oder Europium inkubierten MSP kann auf unterschiedlichen Phänomenen beruhen, die auf spezielle Wechselwirkungen von Dysprosium und Europium mit MSP zurückzuführen sind. Zum einen ist es möglich, dass durch Bindung von  $\text{Dy}^{3+}$  oder  $\text{Eu}^{3+}$  durch MSP ein Komplex gebildet wird, der selbst fluoresziert. Dieser könnte sowohl im Grundzustand als auch im angeregten Zustand des Tryptophans (*Exciplex*) gebildet werden. Auch Energietransfer von Tryptophan auf die Lanthanide ist denkbar, da Lanthanide im Gegensatz zu den Hauptgruppen- oder Übergangsmetallelementen fluoreszieren können und häufig für Energietransfer-Untersuchungen mit Proteinen eingesetzt werden. [212] Des Weiteren ist aber auch möglich, dass die Bindung der untersuchten Lanthanidionen durch MSP im Gegensatz zu der Bindung anderer Ionen eine Konformationsänderung des Proteins induziert, durch die sich die lokale Umgebung des Tryptophans verändert und somit zu einer veränderten Emission führt. Die unterschiedlichen Effekte beruhen auf unterschiedlichen Voraussetzungen und haben verschiedene Auswirkungen auf Absorption und Emission. Dies soll im Folgenden diskutiert werden.

Die Bildung eines Komplexes im Grund- oder angeregten Zustand des Tryptophans setzt zwingend voraus, dass sich die Bindestelle für Dysprosium oder Europium in der Nähe des Tryptophans im Protein befindet. Für das Auftreten von Energietransfer zwischen Tryptophan und den Lanthanidionen ist dagegen aufgrund der abstandabhängigen Dipol-Dipol-Wechselwirkung eine räumliche Nähe zwischen beiden nur bedingt zu erwarten. Für eine Veränderung der Tryptophanfluoreszenz aufgrund einer induzierten Konformationsänderung ist eine Annäherung zwischen Tryptophan und den Lanthaniden dagegen nicht unbedingt vorauszusetzen, da Konformationsänderungen in Proteinen auch durch Substratbindung in anderen Bereichen des Proteins induziert werden können.

Um die Ursache für die unterschiedliche Fluoreszenz des Lanthanid-bindenden MSP zu identifizieren, sind einige Vorüberlegungen bezüglich der Absorption sinnvoll: Für den Fall der Komplexbildung zwischen Dysprosium/Europium und proteingebundenem Tryptophan im Grundzustand ist ein verändertes Absorptionsspektrum der Proteinlösung zu erwarten. Dies ist bei *Exciplex*bildung oder Energietransfer von Tryptophan auf die Lanthanide nicht der Fall, da dort die Wechselwirkung zwischen Tryptophan und dem jeweiligen Ion erst nach der Anregung des Tryptophans erfolgt. Auch bei einer lokalen Konformationsänderung des Proteins sollte sich das Absorptionsspektrum des Proteins nicht notwendig verändern.

Für die beschriebenen Möglichkeiten sind ebenfalls Unterschiede in den statischen Emissionsspektren zu erwarten: Für den Fall der Komplexbildung im Grundzustand ist die Lage des Emissionsmaximums sowie die Quantenausbeute nicht vorhersehbar, ebenso wenig für die Bildung eines *Exciplex*es. Fluoreszenz von evtl. nicht-komplexierendem MSP-Tryptophan wird nur bei nicht-quantitativ verlaufender Komplexbildung beobachtet. Beim Auftreten von Energietransfer sollte jedoch selektiv die Tryptophanemission bei den bekannten Emissionsmaxima verringert und die Fluoreszenz des Lanthanids dafür erhöht werden. Für den Fall einer Konformationsänderung bei Ionenbindung sollten die

Fluoreszenzmaxima in den statischen Spektren zwischen 308 und 353 nm liegen, da diese Wellenlängen Indikatoren für maximale Solvensabschirmung (308 nm - Beispiel Azurin) bzw. vollständige Lösungsmittlexposition (353 nm - Tryptophan in wässriger Lösung) sind. Schließlich sind auch Unterschiede in den zeitaufgelösten Spektren zu erwarten: Für eine Komplexbildung zwischen Dysprosium/Europium und Tryptophan im Grundzustand ist die Fluoreszenzlebenszeit des gebildeten Komplexes ebenso wie für die Bildung eines Exciplexes nicht vorherzusagen, und Anteile an nicht-komplexierendem Tryptophan am Abklingen der Proteinfluoreszenz sind wieder nur bei einer nicht-quantitativ ablaufenden Komplexbildung zu detektieren. Für den Fall des Energietransfers sind jedoch für den FRET-Donor Tryptophan im MSP kürzere Fluoreszenzlebenszeiten im Vergleich zu den Werten des Apo-MSP zu erwarten. Über die Fluoreszenzlebenszeiten für den Fall einer Konformationsänderung des MSP bei Ionenbindung können keine Vorhersagen getroffen werden, da sowohl die benachbarten Aminosäuren als auch die Lösungsmittlexposition die Lebenszeiten des Tryptophans beeinflussen.

Nach diesen Vorüberlegungen können nun einige der Möglichkeiten, die zu der unterschiedlichen Fluoreszenz des mit den Lanthaniden inkubierten MSP führen können, ausgeschlossen werden: Da das Absorptionsspektrum des mit Dysprosium oder Europium inkubierten MSP (ebenso wie für alle anderen Ionen) identisch mit dem des Apo-MSP ist, ist nicht von einer Komplexbildung zwischen Dysprosium und dem MSP-Tryptophan im Grundzustand auszugehen. Auch kann Energietransfer von Tryptophan auf Dysprosium ausgeschlossen werden, da sich in diesem Fall die Fluoreszenzintensität des Dysprosiums bei seinen charakteristischen Emissionswellenlängen bei 487, 576 oder 669 nm [213] erhöhen sollte und dies nicht das relativ dazu blau verschobene Emissionsmaximum der Dysprosium-MSP-Probe bei  $\sim 327$  nm erklärt. Das gleiche gilt für Energietransfer von Tryptophan auf Europium. Die Tatsache, dass kein Energietransfer von Tryptophan auf Dysprosium/Europium stattfindet, ist des Weiteren in eingeschränkter Weise ein Hinweis darauf, dass vermutlich nicht von einer Exciplexbildung zwischen Tryptophan und den Lanthaniden im MSP auszugehen ist: Energietransferstudien mit Tryptophan und verschiedenen Lanthaniden inklusive Dysprosium werden in der Literatur häufig durchgeführt, um Bindung der Ionen in der Nähe des jeweiligen Tryptophans nachzuweisen [212], so dass Tryptophan und Dysprosium ein geeignetes Überlappungsintegral besitzen müssen. Die Tatsache, dass kein Energietransfer auftritt, deutet somit auf eine gewisse räumliche Distanz zwischen Tryptophan und Dysprosium hin. Schließlich findet die Komplexbildung von Tryptophan und Lanthaniden ( $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  und auch  $\text{Dy}^{3+}$ ) in wässriger Lösung zwar in der Literatur Erwähnung, [213] das von reinem Tryptophan unterschiedliche Fluoreszenzverhalten der Komplexe konnte jedoch als FRET der Tryptophan-Anregungsenergie auf das jeweilige Lanthanid identifiziert werden.

Insofern ist davon auszugehen, dass bei Bindung der Lanthanide durch das MSP eine Konformationsänderung des Proteins induziert wird, die zu einer etwas stärkeren Exposition des Tryptophanrestes führt. Diese ist durch das Emissionsmaximum bei 327 nm

gekennzeichnet und deutet im Vergleich mit anderen Proteinen immer noch auf eine geringe Lösungsmittlexposition hin. [87] Gleichzeitig wird bei der Konformationsänderung das zuvor diskutierte intramolekulare Quenching der Tryptophanfluoreszenz verringert, so dass die Fluoreszenzintensität der Probe zunimmt.

Verzichtet wurde auf eine Darstellung der Anregungsspektren bei  $\lambda_{em.} = 309$  nm an dieser Stelle. Mit Ausnahme der Dysprosium bzw. Europium bindenden Form, deren Tryptophan bei dieser Wellenlänge keine Fluoreszenz zeigt, unterscheiden sie sich nicht wesentlich von dem Spektrum des Apo-MSP in Abbildung VIII.4.

#### *b) Fluoreszenz-Lebenszeiten von Apo- und Holo-Formen des MSP*

Um weitere Informationen über die Fluorophorumgebung sowie die teils geringe Quantenausbeute im MSP zu erhalten, wurden zeitaufgelöste Studien bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{ex.} = 292$  nm mit der oxidierten und reduzierten Apo-Form sowie mit den mit verschiedenen Ionen inkubierten Holo-Formen durchgeführt. Bei dieser Anregungswellenlänge ist der Tyrosinanteil in den Spektren immer noch vernachlässigbar gering, so dass davon auszugehen ist, dass die ermittelten Fluoreszenzabklingkurven ausschließlich Informationen über den einen Tryptophanrest im MSP liefern.

Abbildung VIII.16 zeigt die normierten erhaltenen Fluoreszenzabklingkurven der Proben bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{em.} = 308$  nm sowie die an sie angepassten biexponentiellen Funktionen, deren Fit-Parameter in Tabelle VIII.1 aufgeführt sind. Ein graphischer Vergleich der erhaltenen Lebenszeiten ist in Abbildung VIII.17 dargestellt.

Ein Vergleich der gemessenen Lebenszeiten für die mit verschiedenen Ionen inkubierten Formen des MSP mit den Lebenszeiten einer wässrigen Tryptophanlösung<sup>14</sup> zeigt, dass die Lebenszeiten des Tryptophanrestes im Protein ungewöhnlich kurz sind. Die lange Lebenszeit, die in Proteinen typischerweise Werte zwischen 3 und 8 ns annimmt, [24] ist mit nur ca. 1,1 – 1,4 ns stark verringert und sogar weit niedriger als die Lebenszeit des Tryptophans in wässriger Lösung. Da die lange Lebenszeit des Apo-MSP-Tryptophans relativ zu der Lebenszeit des vollständig Lösungsmittel-exponierten Tryptophans stark erniedrigt ist, kann die außergewöhnlich kurze Lebenszeit im MSP nicht auf Solvens-Quenching zurückzuführen sein. Sie ist, wie bereits in VIII.II.c) diskutiert, auf internes Quenching durch nicht genau identifizierbare Nachbargruppen zurückzuführen.

Festzustellen ist, dass sich wie schon die Emissionsspektren auch die Fluoreszenzabklingkurven der unterschiedlichen Formen nur wenig unterscheiden: Lebenszeiten und Abklingkurven für oxidiertes und reduziertes MSP sind quasi identisch. Dies ist entweder darauf zurückzuführen, dass unter den gewählten Bedingungen bei Reduktion keine Strukturveränderung erfolgt oder dass eine strukturelle Veränderung nur in der die Cysteinreste beinhaltenden N-terminalen  $\beta$ -Faltblattdomäne stattfindet.

---

<sup>14</sup> Fluoreszenzlebenszeiten einer biexponentiellen Anpassung für Tryptophan in Wasser:  $\tau_m = 2973$  ps,  $\tau_1 = 3117$  ps sowie  $\tau_2 = 580$  ps (bestimmt am Emissionsmaximum  $\lambda_{em.} = 353$  nm, vergleiche Tabelle IV.1).

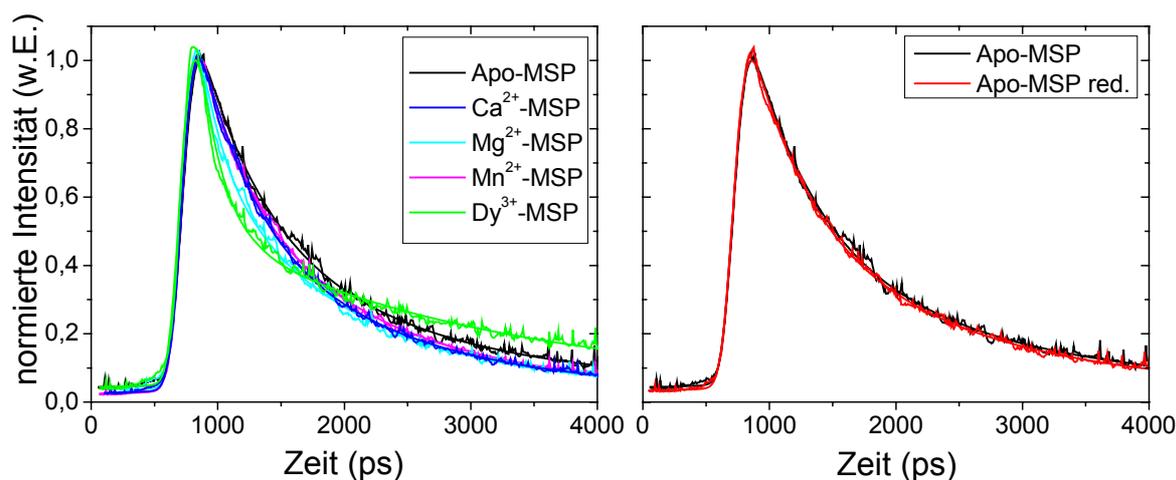


Abbildung VIII.16 – Vergleichend dargestellte Fluoreszenzabklingkurven für MSP bei  $\lambda_{em.} = 307,5$  nm: Vergleich der Apo-Form mit den mit verschiedenen Ionen inkubierten Holo-Formen (links); oxidierte und reduzierte Apo-Form (Reduktion über 10 mM DTT; rechts).

Tabelle VIII.1– Aus den biexponentiellen Anpassungen an die Fluoreszenzabklingkurven erhaltene Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_i$  für die verschiedenen MSP-Formen sowie ihre Amplituden  $a_i$  und Fehler  $\delta \tau_i$ :  $\tau_1$  – lange Lebenszeit,  $\tau_2$  – kurze Lebenszeit,  $\tau_{m-a}$  – Amplitudengemittelte Lebenszeit.

	$a_1$	$\tau_1$ [ps]	$\delta \tau_1$ [ps]	$a_2$	$\tau_2$ [ps]	$\delta \tau_2$ [ps]	$\chi^2$	$\tau_{m-a}$ [ps]	$\delta \tau_m$ [ps]
<b>MSP (ox.)</b>	<b>0,46</b>	<b>1465</b>	250	<b>0,54</b>	<b>453</b>	24	220	<b>923</b>	257
<b>MSP (red.)</b>	<b>0,49</b>	<b>1432</b>	238	<b>0,51</b>	<b>415</b>	20	165	<b>911</b>	225
<b>Ca<sup>2+</sup>-MSP</b>	<b>0,48</b>	<b>1317</b>	212	<b>0,52</b>	<b>437</b>	23	157	<b>863</b>	244
<b>Dy<sup>3+</sup>-MSP</b>	<b>0,31</b>	<b>2238</b>	789	<b>0,69</b>	<b>174</b>	5	354	<b>804</b>	273
<b>Mg<sup>2+</sup>-MSP</b>	<b>0,50</b>	<b>1129</b>	349	<b>0,50</b>	<b>179</b>	9	322	<b>656</b>	213
<b>Mn<sup>2+</sup>-MSP</b>	<b>0,53</b>	<b>1316</b>	220	<b>0,47</b>	<b>365</b>	17	162	<b>866</b>	199

Auch die Inkubation mit verschiedenen Ionen (mit Ausnahme von Dy<sup>3+</sup>) hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Fluoreszenzlebenszeiten. Zwar verringern sich bei Inkubation mit Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und vor allem Mg<sup>2+</sup> sowohl die kurzen als auch die langen Fluoreszenzlebenszeiten des MSP, durch die ohnehin sehr geringe Fluoreszenzlebenszeit des Tryptophans im Apo-MSP fällt dieser Effekt aber nicht stark ins Gewicht. Zurückzuführen ist er vermutlich auf eine rigidere Struktur des MSP durch unspezifische Ionenbindung nach Ionenzugabe, die das bereits diskutierte intermolekulare Quenching verstärkt. Hinweise auf eine spezifische Bindung von Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> können somit auch über zeitaufgelöste Fluoreszenzuntersuchungen nicht erhalten werden.

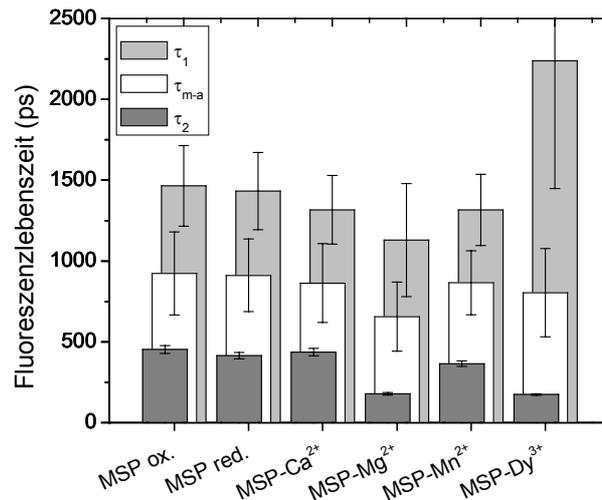


Abbildung VIII.17 – Gegenüberstellung der erhaltenen Fluoreszenzlebenszeiten des biexponentiellen Anpassungen für die verschiedenen MSP-Formen:  $\tau_1$  – lange Lebenszeit,  $\tau_2$  – kurze Lebenszeit,  $\tau_{m-a}$  - Amplituden-gemittelte Lebenszeit.

Interessant ist wiederum der Effekt, der bei Inkubation mit Dysprosium auftritt: Die lange Fluoreszenzlebenszeit ist im Vergleich mit der Apo-Form um mehr als eine Nanosekunde größer. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Tryptophanrest bei der Bindung des Dysprosiums nicht nur etwas weiter lösungsmittel exponiert wird, sondern gleichzeitig der Kontakt mit den quenchenden Nachbaraminosäuren verringert wird. Dies erhöht die Fluoreszenzlebenszeit durch vermindertes intramolekulares Quenching bei gleichzeitiger Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums durch verstärkte Lösungsmittelrelaxation. Es ist davon auszugehen, dass die Lebenszeiten für Europium bindendes MSP ebenfalls im Vergleich zu den Werten für Apo-MSP vergrößert sind. Die Studien zur Europiumbindung wurden jedoch erst durchgeführt, als das für die Untersuchung der Fluoreszenzlebenszeiten erforderliche Pikosekundensystem nicht mehr zur Verfügung stand.

Aufgrund der sehr geringen Quantenausbeute und des geringen Emissionswellenlängenbereichs des MSP und auch wegen des starken Raman-Anteils an den Spektren, der nicht vollständig abgetrennt werden konnte, konnte die Wellenlängenabhängigkeit der Fluoreszenzlebenszeiten nicht betrachtet und deswegen *decay-associated spectra* nicht erstellt werden.

### c) Entfaltungsstudien an verschiedenen Holo-MSP

Um Informationen über die jeweilige Stabilität der mit den unterschiedlichen Ionen inkubierten Formen des MSP zu erhalten, wurden Denaturierungsstudien mit Harnstoff durchgeführt, mit dem Ziel, wie für die Apo-Form die Entfaltungspunkte  $c_{1/2}$  sowie die Freien Entfaltungs-Enthalpien  $\Delta G_{H_2O}$  zu bestimmen.

### *Veränderung des Emissionsmaximums*

Zunächst wurde, wie in Abbildung VIII.18a) dargestellt, die Verschiebung des Emissionsmaximums bei der Denaturierung mit Harnstoff untersucht. Mit Ausnahme des mit Dysprosium oder Europium inkubierten MSP weisen die erhaltenen Entfaltungskurven eine sehr hohe Ähnlichkeit zu der Harnstoffentfaltungskurve des oxidierten Apo-MSP auf: Die Übergangspunkte für die Entfaltung der Holo-MSP haben ähnliche Werte wie für das oxidierte Apo-MSP ( $c_{1/2} = 2,06 \pm 0,02$  M) und sind leicht vergrößert. Dies deutet darauf hin, dass die mit den jeweiligen Ionen inkubierten Holo-MSP erst bei leicht höheren Harnstoffkonzentrationen denaturiert werden, erklärbar durch eine gering erhöhte Proteinstabilität durch die vermutlich unspezifische Ionenbindung.

Im Gegensatz dazu hat das reduzierte Apo-MSP einen leicht erniedrigten Übergangspunkt ( $c_{1/2} = 2,00 \pm 0,02$  M), was sich durch eine verringerte Proteinstabilität bei Reduktion der Disulfidbrücke erklären lässt. Groß ist der beschriebene Effekt jedoch nicht. Aufgrund der geringen Unterschiede bei der Denaturierung von oxidiertem und reduziertem Apo-MSP ist nicht davon auszugehen, dass die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücke notwendig für die Struktur der Domäne ist, die den Tryptophanrest 241 beinhaltet.

Für MSP, das mit Dysprosium oder Europium inkubiert wurde, zeigen sich im Laufe der Denaturierung stark unterschiedliche Emissionsmaxima im Vergleich zu Apo-MSP. Wie bereits in VIII.V.a) beschrieben, ist der Ausgangswert des Emissionsmaximums aufgrund einer Konformationsänderung nach Bindung des Ions wesentlich größer als für die anderen MSP-Formen. Auch erfolgt die Entfaltung der Lanthanide bindenden MSP nicht bei vergleichbar geringen Harnstoffkonzentrationen wie bei der Bindung anderer Ionen ( $\text{Dy}^{3+}$ :  $5,16 \pm 0,12$  M;  $\text{Eu}^{3+}$ :  $5,24 \pm 0,05$  M im Vergleich zu  $\sim 2$  M für die anderen Formen). Bei den angewandten Messbedingungen war es sogar unmöglich, MSP-Lösungen in ausreichend hohen Harnstoffkonzentrationen anzusetzen, um die vollständige Denaturierung des Proteins zu beobachten (siehe Messpunkte und Extrapolation in Abbildung VIII.18b). Dies deutet auf eine höhere Stabilität der  $\text{La}^{3+}$ -MSP im Vergleich zu dem mit den zweiwertigen Ionen inkubierten MSP hin.

### *Veränderung der Fluoreszenzintensitäten*

Über die Veränderung der Fluoreszenzintensität (Abbildung VIII.19) während der Denaturierung des mit verschiedenen Ionen inkubierten MSP wurden komplementäre Ergebnisse zu den Daten für die Verschiebung des Emissionsmaximums erhalten. Wieder sind, mit Ausnahme des Dysprosium/Europium bindenden MSP, die Ergebnisse sehr ähnlich zu den bereits für das Apo-MSP erhaltenen. Die Auswahl der betrachteten Emissionswellenlänge wurde dabei für die jeweiligen MSP-Formen für die Auswertung so getroffen, dass größtmögliche Intensitätsveränderungen detektiert werden konnten ( $\lambda_{\text{em.}} = 346$  nm für alle MSP-Formen mit Ausnahme der mit Lanthaniden inkubierten;  $\lambda_{\text{em.}} = 335$  nm für Inkubation mit  $\text{Dy}^{3+}$  und  $\text{Eu}^{3+}$ ).

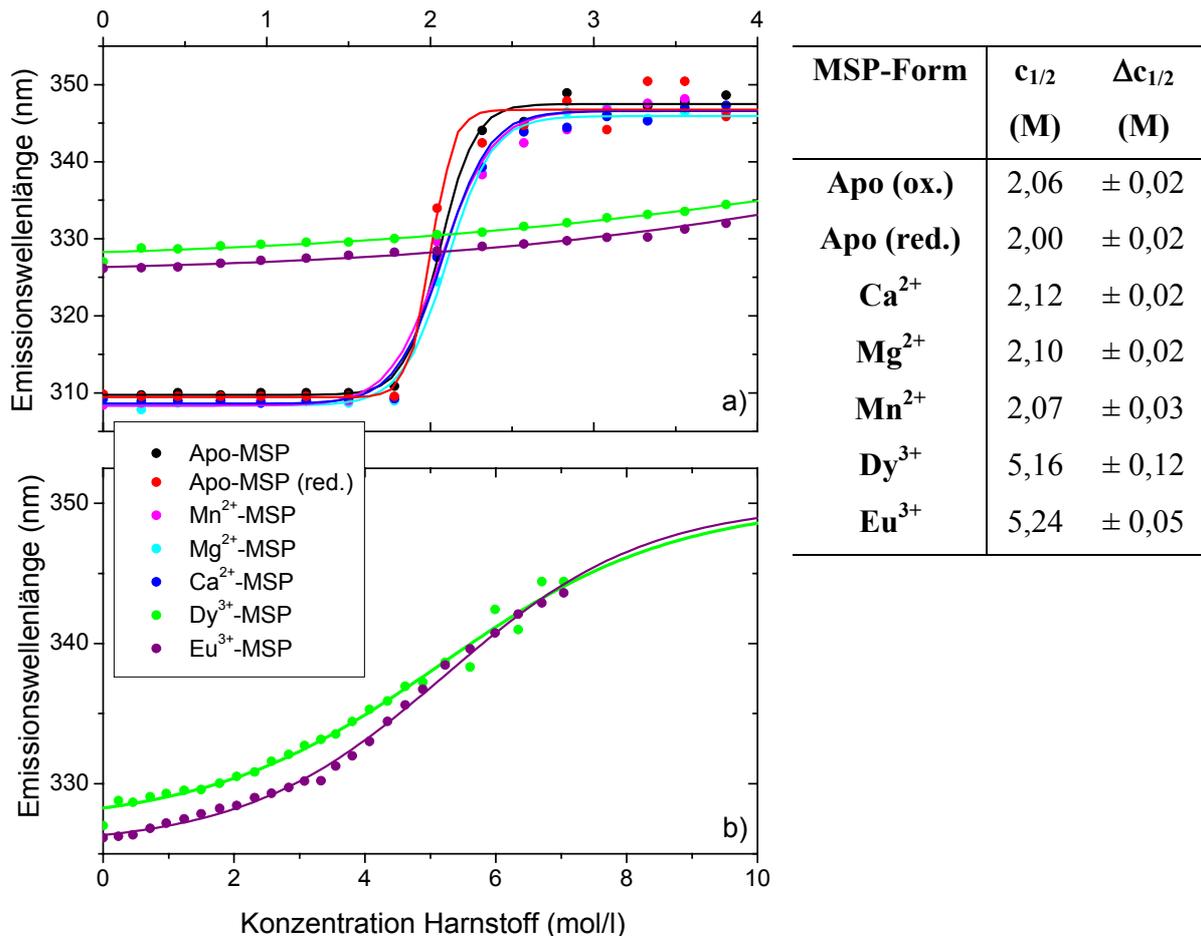


Abbildung VIII.18 – a) Veränderung der Emissionsmaxima der Holo-MSP bei Harnstoff-Denaturierung im Vergleich zu den Werten für ox. und red. Apo-MSP, ausgewertet für  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ . Bei starken Raman-Signalen in signifikanten Wellenlängenbereichen in den Spektren wurde das Emissionsmaximum über Anpassung einer Lognormal-Verteilung bestimmt. Die untere Abbildung b) zeigt die Entfaltung des Dy<sup>3+</sup>- bzw. Eu<sup>3+</sup>-MSP über den vollständigen nötigen Konzentrationsbereich.

Die Anpassung sigmoidaler Boltzmann-Funktionen lieferte für die Inkubation mit den Ionen Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> Entfaltungs-Übergangspunkte, die innerhalb der Fehlergrenzen identisch mit denen sind, die für die Verschiebung des Emissionsmaximums bestimmt wurden. Ein früher liegender Übergangspunkt ( $c_{1/2} = 1,99 \pm 0,04 \text{ M}$ ) wurde jedoch für das oxidierte Apo-MSP bestimmt, ein späterer für das reduzierte ( $c_{1/2} = 2,36 \pm 0,03 \text{ M}$ ). Diese Ergebnisse stehen nicht zwangsläufig in Kontrast zu den Daten, die bei der Betrachtung der Emissionsmaxima erhalten wurden, da die Änderung der Tryptophanfluoreszenzintensität (als Indikator für verschiedene Umgebungseinflüsse auf das Tryptophan) nicht unbedingt komplementär zu der Veränderung des Emissionsmaximums (als Effekt der

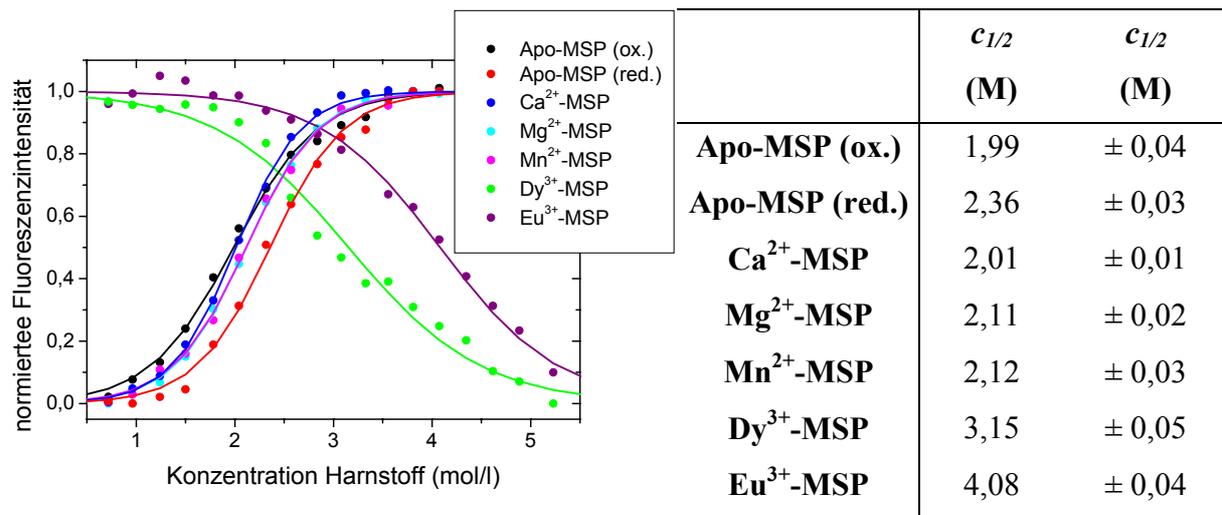


Abbildung VIII.19 – Veränderung der Fluoreszenzintensitäten der Holo- und Apo-MSP bei Denaturierung mit Harnstoff, ausgewertet für  $\lambda_{\text{ex.}} = 295 \text{ nm}$  und für  $\lambda_{\text{em.}} = 346 \text{ nm}$  (Apo- und Holo-Formen für  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) bzw.  $\lambda_{\text{em.}} = 335 \text{ nm}$  ( $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ).

Lösungsmittelrelaxation unmittelbar ein Indikator für die Lösungsmittelzugänglichkeit des Tryptophanrestes) bei der Entfaltung verlaufen muss.<sup>15</sup>

Große Unterschiede für die Veränderung der Fluoreszenzintensität des Lanthanide bindenden MSP wurden im Vergleich zu dem mit zweiwertigen Ionen inkubierten MSP und dem in beiden Oxidationszuständen untersuchten Apo-MSP festgestellt. Für letztere wird eine Zunahme an Fluoreszenzintensität während der Denaturierung festgestellt, da die Tryptophanfluoreszenz im nativen Protein dort stark gequenchet wird: Bei der Denaturierung werden die fluoreszenzlöschenden Umgebungseinflüsse aufgehoben, und im Laufe der Titration nimmt die Fluoreszenzintensität trotz gleichzeitig erfolgender Lösungsmittelexposition (und damit Solvensquenching) zu. Für das Dysprosium bzw. Europium bindende MSP wird der Tryptophanrest nach der diskutierten Umlagerung weniger quenchenden Nachbaraminosäuren ausgesetzt. Somit ist seine Fluoreszenzintensität im nativen Zustand höher als die einer äquimolaren wässrigen Tryptophanlösung und nimmt infolgedessen im Zuge der Denaturierungstiteration ab. Die Übergangspunkte für die

<sup>15</sup> Über Modellierung der Emissionsspektren von Lösungen zweier Fluorophore mit verschiedenen Emissionsmaxima in unterschiedlichen Verhältnissen kann gezeigt werden, dass sich bei einer linearen Veränderung der Gesamtfluoreszenzintensität die Emissionsmaxima der Mischungsspektren sigmoidal verändern. Für eine 1:1-Mischung der Fluorophore ist dabei die sigmoidale Beschreibung der Emissionsmaxima symmetrisch bezüglich des Übergangspunktes, für eine beliebige Mischung dagegen unsymmetrisch. Daraus resultiert für das MSP, das bei der Denaturierung als ein Gemisch von „nativen“ und „denaturiertem“ Tryptophan betrachtet werden kann, die nicht zwangsläufige Komplementarität der Informationen aus den Fluoreszenzintensitäten und Emissionsmaxima bei der Entfaltung.

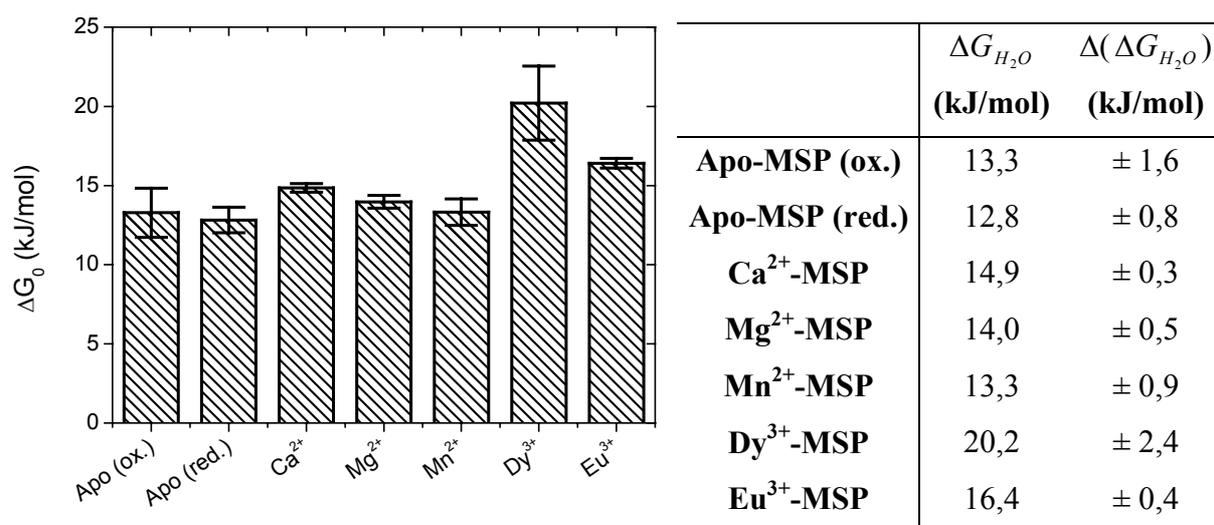


Abbildung VIII.20 – Freie Entfaltungs-Enthalpien der verschiedenen Apo- und Holo-MSP-Formen, bestimmt aus den Fluoreszenzänderungen für  $\lambda_{\text{ex.}} = 295\text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 346\text{ nm}$  (Apo- und Holo-Formen für  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) bzw.  $\lambda_{\text{em.}} = 335\text{ nm}$  ( $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ).

Harnstoff-abhängigen Fluoreszenzintensitäten ( $\text{Dy}^{3+}$ :  $3,15 \pm 0,05\text{ M}$ ;  $\text{Eu}^{3+}$ :  $4,08 \pm 0,04\text{ M}$ ) liegen wie die Übergangspunkte für die Veränderung der Emissionsmaxima bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen als für die anderen Holo-MSP und deuten wiederum auf eine erhöhte Proteinstabilität für Lanthanide bindendes MSP hin. Die Diskrepanz in den Übergangspunkten ( $\sim 3,5\text{ M}$  für die Veränderung der Fluoreszenzintensität und  $\sim 5,2\text{ M}$  für die Veränderung des Emissionsmaximums) ist wieder mit dem nicht gleichförmigen Einfluss des Denaturierungsmittels auf die betrachteten Fluoreszenzparameter zu begründen.

Im Folgenden soll aus den Entfaltungskurven für die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten die Freien Entfaltungs-Enthalpien  $\Delta G_{H_2O}$  für die verschiedenen Ionen bindenden MSP bestimmt werden.

#### *Freie Entfaltungs-Enthalpien*

Die ermittelten Freien Entfaltungs-Enthalpien  $\Delta G_{H_2O}$  für das mit unterschiedlichen Ionen inkubierte MSP sind in Abbildung VIII.20 sowie in der nebenstehenden Tabelle dargestellt. Aus der Auftragung wird ersichtlich, dass Inkubation mit den meisten Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) verglichen mit den bereits in Abschnitt VIII.IV bestimmten Daten nicht zu einer starken Erhöhung der Proteinstabilität führt: Bei der Bindung von Calcium bzw. Magnesium erhöht sich die Proteinstabilität um 1,6 bzw. 0,7 kJ/mol. Für die Bindung von Mangan kann keine Erhöhung der Proteinstabilität festgestellt werden. Insofern ist davon auszugehen, dass es sich tatsächlich um eine unspezifische Bindung dieser Ionen handelt, da durch eine

selektive elektrostatische Wechselwirkung zwischen Ion und Bindestelle eine starrere und somit schlechter zerstörbare Struktur induziert werden sollte.

Anders ist dies für die Inkubation des MSP mit Dysprosium bzw. Europium, die auf eine besondere Art und Weise mit dem MSP wechselwirken: Die Bindung von Dysprosium führt nach der gezeigten Umlagerung des Proteins zu einer Struktur, die ca. 7 kJ/mol stabiler ist als Apo-MSP bzw. mit anderen Ionen inkubiertes MSP. Auch die Bindung von Europium führt zu einer Erhöhung der Proteinstabilität, jedoch nur um ca. 3 kJ/mol. Die ermittelte Erhöhung der Freien Entfaltungsenthalpien für  $\text{Dy}^{3+}$  bzw.  $\text{Eu}^{3+}$  bindendes MSP sind dabei im Vergleich mit einer Studie, die sich mit der Bindung von Lanthaniden an  $\alpha$ -helikale doppelsträngige Polypeptide beschäftigt, etwas größer. [214] Die selektiv stärkere Bindung von Dysprosium und Europium durch MSP im Gegensatz zu Calcium, Magnesium oder Mangan lässt sich vermutlich durch die höhere Ladungsdichte der Lanthanidionen erklären, da diese im Gegensatz zu den anderen betrachteten Ionen bei vergleichbarem Ionenradius<sup>16</sup> dreiwertig sind. Durch dieses hohe Ladung/Radius-Verhältnis sollten elektrostatische Wechselwirkung mit hypothetischen Bindestellen anders geartet als für die zweiwertigen Ionen sein.

Die höhere Stabilität des MSP nach Bindung von  $\text{Dy}^{3+}$  im Vergleich zu  $\text{Eu}^{3+}$  kann aufgrund des für Dysprosium größeren Ladung/Radius-Verhältnis erklärt werden: Eine festere Bindung sollte durch verstärkte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen  $\text{Dy}^{3+}$  und Protein eine starrere Struktur des Proteins induzieren, die aufgrund der Rigidität weniger leicht zu denaturieren ist.

#### d) *Bindungsstudien mit Hilfe von statischen Fluoreszenzuntersuchungen*

Im Folgenden wird die Ionenbindung des MSP in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration an zugegebenem Ion untersucht, mit dem Ziel, Dissoziationskonstanten und Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Bindung zu identifizieren und somit Hinweise auf die Art der Bindung zu erhalten.

##### *Zeitabhängige Untersuchung der Ionenbindung*

Abbildung VIII.21 zeigt exemplarisch für eine Emissionswellenlänge ( $\lambda_{\text{em.}} = 327 \text{ nm}$ ) die zeitabhängige Veränderung der Fluoreszenzintensität des MSP-Tryptophans bei Inkubation des Proteins mit den Ionen Dysprosium ( $\text{Dy}^{3+}$ ), Europium ( $\text{Eu}^{3+}$ ) bzw. Mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ ). Es sind deutliche Unterschiede in der zeitlichen Fluoreszenzentwicklung nach Zugabe der verschiedenen Ionen zu ersehen: Nach der Zugabe von  $\text{Mn}^{2+}$  wie auch für alle anderen zweiwertigen Ionen (hier nicht dargestellt) bleibt die Fluoreszenzintensität des MSP bei allen Emissionswellenlängen unverändert, wohingegen, wie in Abbildung VIII.22 demonstriert, nach Zugabe von  $\text{Dy}^{3+}$  (ebenso wie für  $\text{Eu}^{3+}$ ) eine starke Zunahme an Fluoreszenzintensität im rot verschobenen Spektralbereich zu erkennen ist. Gleichzeitig kann nach Dysprosium- bzw.

<sup>16</sup> Ionenradien der angegebenen Ionen bei achtfacher Koordination:  $\text{Mn}^{2+}$  - 1,10 Å,  $\text{Ca}^{2+}$  - 1,26 Å,  $\text{Mg}^{2+}$  - 1,03 Å,  $\text{Dy}^{3+}$  - 1,17 Å,  $\text{Eu}^{3+}$  - 1,21 Å. [215]

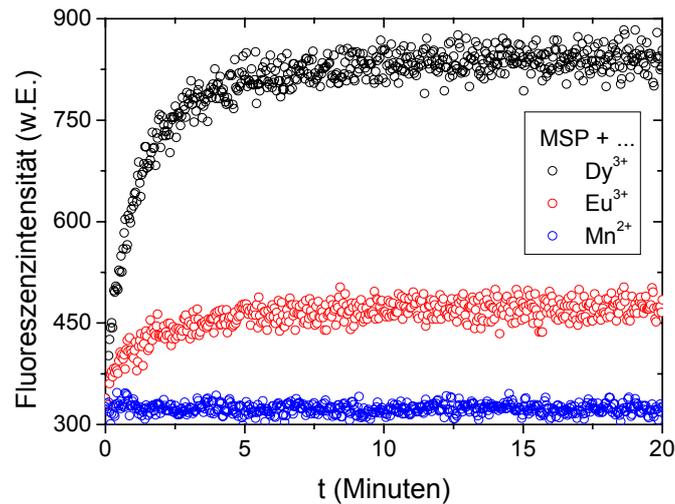


Abbildung VIII.21 – Zeitabhängige Betrachtung der Fluoreszenz während der Inkubation von MSP (15  $\mu\text{M}$ ) mit 50 mM  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ . ( $\lambda_{\text{ex.}} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em.}} = 327 \text{ nm}$ )

Europiumzugabe eine Abnahme an Fluoreszenzintensität im blau verschobenen Bereich des Spektrums ( $\sim 309 \text{ nm}$ ) verzeichnet werden.

Die starke zeitliche Zunahme der Fluoreszenzintensität im rot verschobenen Spektralbereich ist konsistent mit den in VIII.V.a) untersuchten statischen Fluoreszenzspektren des mit  $\text{Eu}^{3+}$  oder  $\text{Dy}^{3+}$  inkubierten Apo-MSP, bei denen sich das Emissionsmaximum des MSP nach Zugabe der Ionen von  $\sim 309 \text{ nm}$  zu  $327 \text{ nm}$  verschob. Durch Informationen, die aus den statischen und dynamischen Messungen stammen, konnte die Rotverschiebung der Fluoreszenz auf eine Umlagerung des Proteins zurückgeführt werden. Die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität nach der Zugabe der Lanthanide lässt nun Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf des Prozesses inklusive der Umlagerung zu.

Nach Zugabe von  $\text{Mn}^{2+}$  und den anderen zweiwertigen Ionen wird keine zeitliche Veränderung der Fluoreszenz des MSP-Tryptophans beobachtet. Dies ist damit zu begründen, dass die beobachtete unspezifische Bindung der zweiwertigen Ionen durch MSP wesentlich schneller erfolgt als die spezifische Bindung der Lanthanide. Somit wird sie, speziell, da ihr Einfluss auf die Fluoreszenzintensitäten und die Lage der Emissionsmaxima nur sehr gering ist, durch die zeitabhängige Fluoreszenzmessung nicht detektiert. Da es mit fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen nicht möglich ist, eine Bindung der erwähnten zweiwertigen Ionen beobachten, wird deswegen die zeitliche Untersuchung der Ionenbindung auf Dysprosium und Europium beschränkt.

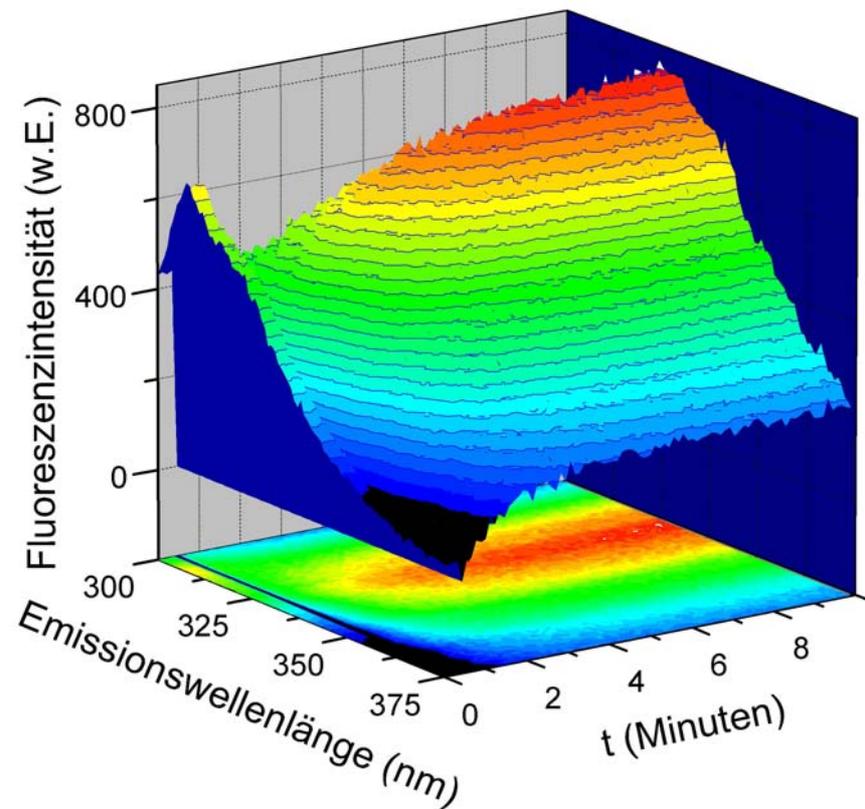


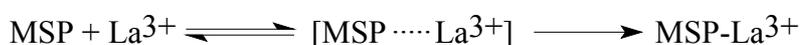
Abbildung VIII.22 – Zeitliche Veränderung der Emissionsspektren von 15  $\mu\text{M}$  MSP bei der Inkubation mit 50 mM  $\text{DyCl}_3$ . ( $\lambda_{\text{ex.}} = 295$  nm). Die in Abbildung VIII.21 für Dysprosium dargestellten Daten entsprechen einem Schnitt am Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{em.}} = 327$  nm.

Die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität während der Bindung lässt sich durch unterschiedliche Modelle beschreiben, je nachdem, was für ein Bindungsmechanismus zugrunde gelegt wird. Für die Dysprosium- oder Europiumbindung des MSP sind dabei die folgenden zwei unterschiedlichen Bindungsreaktionen denkbar:

- a) Die Bindung des  $\text{La}^{3+}$  durch MSP ist eine Gleichgewichtsreaktion zweiter Ordnung, deren Hinreaktion sich für hohe Dysprosiumkonzentrationen näherungsweise als eine Reaktion pseudo-erster Ordnung ausdrücken lässt:



- b) Die Bindung von  $\text{La}^{3+}$  durch MSP ist ein zweistufiger Prozess, dessen erster Reaktionsschritt die als Reaktion pseudo-erster Ordnung betrachtete Bindungsreaktion zweiter Ordnung ist, gefolgt von einer weiteren Umsetzung des Zwischenproduktes zum Endprodukt:



Durch Aufstellen und Integration der jeweiligen Geschwindigkeitsgesetze können Ausdrücke für die zeitliche Gesamtfluoreszenzänderung durch das Edukt MSP und das Produkt

MSP-La<sup>3+</sup> ermittelt werden, so dass man für die Veränderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit des jeweiligen Prozesses Exponentialausdrücke der folgenden Form erhält:

$$I(t) = y_0 + A_1 \cdot \left(1 - e^{-t/\tau_1}\right) + A_2 \cdot \left(1 - e^{-t/\tau_2}\right) \quad (\text{VIII.4})$$

Dabei kennzeichnet  $y_0$  die Ausgangsfluoreszenz vor Zugabe des Lanthanidions, die vor der Messung bestimmt wird, und für a) ist ein monoexponentieller Anstieg zu erwarten (d.h.,  $A_1 \neq 0$  und  $A_2 = 0$ ). Für den in b) dargestellten zweistufigen Prozess ist hingegen eine biexponentielle Veränderung der Fluoreszenzintensität zu beobachten (d.h.,  $A_1 \neq 0$  und  $A_2 \neq 0$ ).

Abbildung VIII.23a) und Abbildung VIII.24a) zeigen die zeitlichen Veränderungen der Tryptophanfluoreszenzintensität bei Inkubation von MSP mit Dy<sup>3+</sup> bzw. Eu<sup>3+</sup> und jeweils zwei an sie angepasste Exponentialausdrücke, deren Parameter in Tabelle VIII.2 und Tabelle VIII.3 dargestellt sind. An den in b) dargestellten Residua und an den angegebenen Korrelationskoeffizienten R ist deutlich zu erkennen, dass die biexponentiellen Funktionen die zeitliche Änderung der Fluoreszenz wesentlich besser beschreiben als die monoexponentiellen Anpassungen, die systematische Abweichungen enthalten. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung der Lanthanidionen durch MSP über einen assoziativen Mechanismus verläuft. Gestützt wird dies des Weiteren von der in den Abbildung VIII.23c) und Abbildung VIII.24c) mit dargestellten zeitlichen Veränderung der Emissionsmaxima, die sich im zeitlichen Verlauf der Bindungsreaktion ebenfalls über einen zweistufigen Prozess veränderten. Die Übergangspunkte für die Veränderung der Emissionsmaxima stimmen dabei mit den ermittelten Halbwertszeiten für die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Exponentialanteile überein.

Die ermittelten zwei Lebenszeiten für die exponentielle Fluoreszenzintensitätsveränderung liegen für beide Bindungsstudien (Dy<sup>3+</sup>:  $\tau_1 = 0,81 \pm 0,05$  Minuten,  $\tau_2 = 3,93 \pm 0,42$  Minuten; Eu<sup>3+</sup>:  $\tau_1 = 0,37 \pm 0,13$ ,  $\tau_2 = 2,53 \pm 0,28$  Minuten) im Minutenbereich. Insofern kann festgehalten werden, dass es sich bei der Bindung der Lanthanidionen durch MSP um einen sehr langsamen Prozess handelt. [216,217]

Fraglich ist nun, ob nach Identifikation des assoziativen Bindungsmechanismus geklärt werden kann, wie die Bindung in den beiden einzelnen Teilschritten erfolgt. Die Veränderung der Emissionsmaxima liefert dafür Hinweise: Für die erste Reaktionsstufe zeigt sie einen starken Effekt (Verschiebung des Emissionsmaximums um ca. 15 nm für beide MSP-Bindungsstudien), gefolgt von einer langsameren, weniger ausgeprägten Emissionsmaximaverschiebung um ca. 3 nm. Dies deutet darauf hin, dass bereits die Ionenbindung die Konformationsänderung induziert, da sich die Lösungsmittlexposition des Tryptophanrestes, wie an der Veränderung des Emissionsmaximums zu ersehen, stark ändert. Dieser Konformationsänderung folgt vermutlich eine Festigung der Ionenbindung, die eine weitere, geringere Verschiebung des Emissionsmaximums bewirkt.

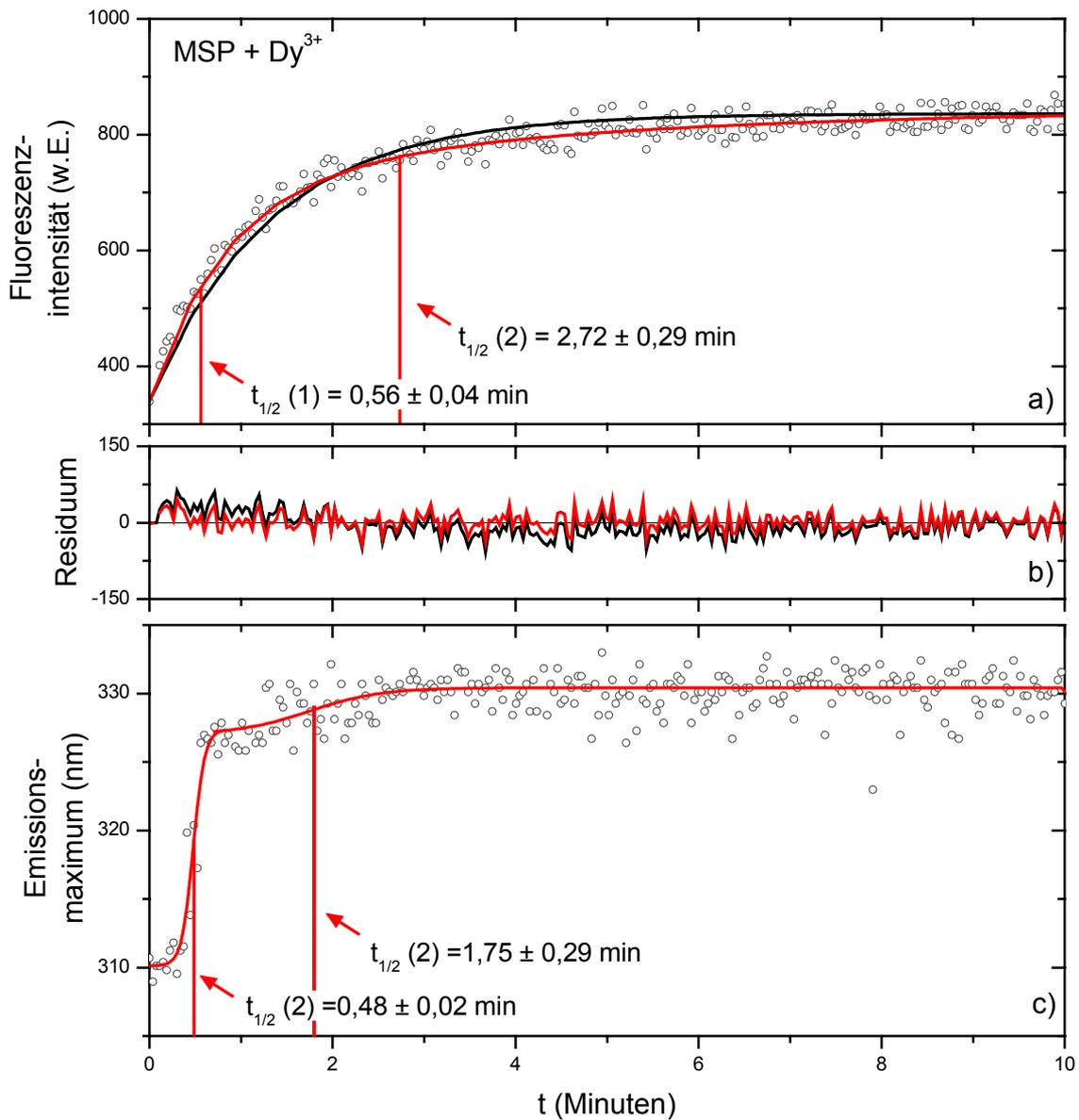


Abbildung VIII.23 – Zeitliche Veränderung der Fluoreszenz bei Dysprosium-Bindung durch MSP: a) zeitabhängige Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{em.}} = 327 \text{ nm}$ ) und Anpassung monoexponentieller (—) bzw. biexponentieller (—) Funktionen; b) Residua für die erfolgten Anpassungen in a); c) Veränderung des Emissionsmaximums bei Bindung sowie Ermittlung der Übergangspunkte durch Anpassung von zwei sigmoidalen Boltzmann-Funktionen.

Tabelle VIII.2 – Parameter der Anpassungen an die zeitliche Veränderung der MSP-Fluoreszenzintensität durch  $\text{Dy}^{3+}$  (Abbildung VIII.23a) für ein fest gesetztes  $y_0 = 340 \text{ nm}$ . Die erhaltenen Lebenszeiten dienen zur Bestimmung der Halbwertszeiten in Abbildung VIII.23.

Anpassung	$a_1$	$\tau_1 / \text{min.}$	$a_2$	$\tau_2 / \text{min.}$	$\chi^2$	$R^2$
monoexponentiell	496	$1,30 \pm 0,02$	-	-	406,24	0,91458
biexponentiell	367	$0,81 \pm 0,05$	135	$3,93 \pm 0,42$	295,69	0,93791

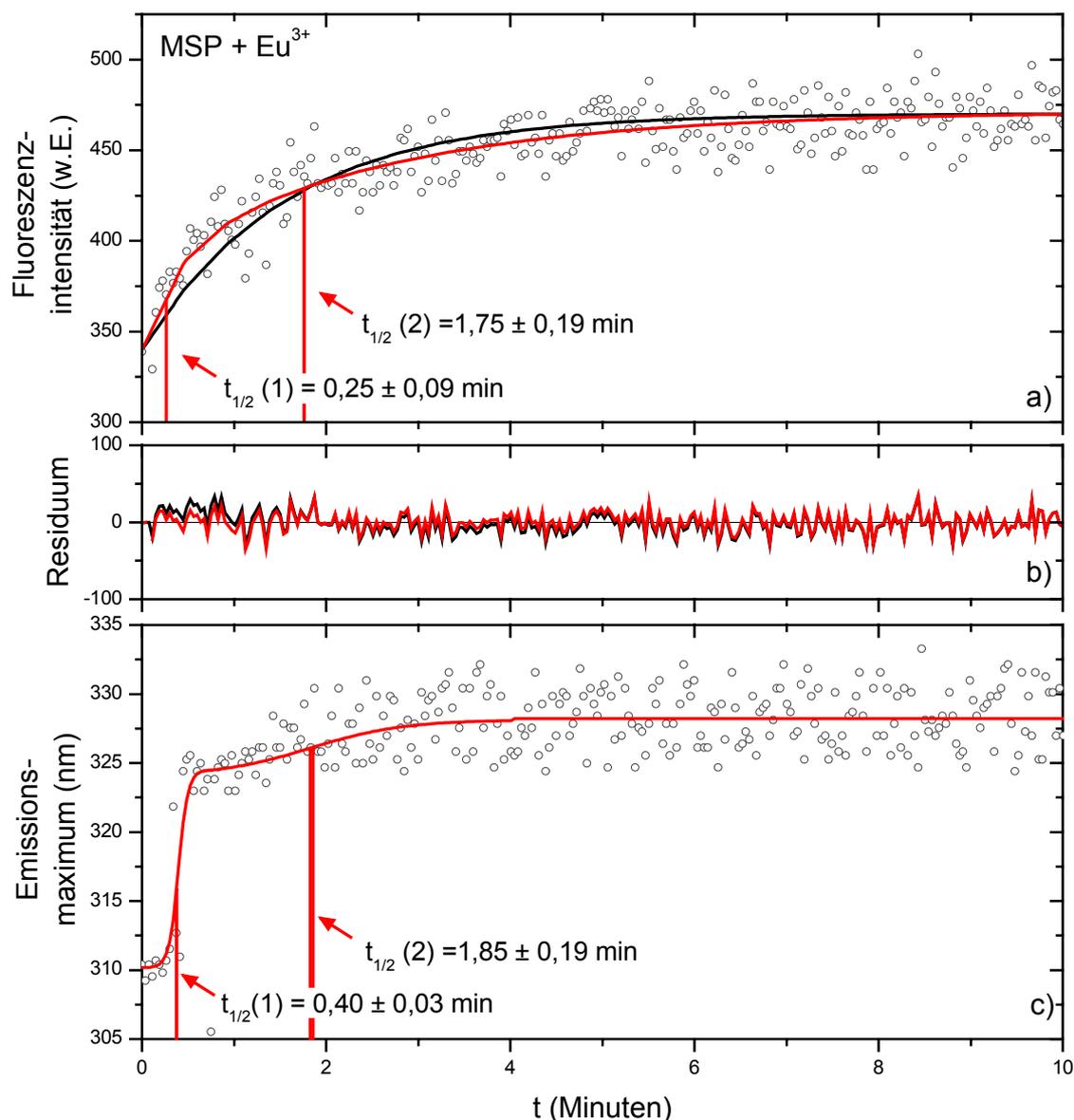


Abbildung VIII.24 - Zeitliche Veränderung der Fluoreszenz bei Europium-Bindung durch MSP: a) zeitabhängige Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{em.} = 327$  nm) und Anpassung monoexponentieller (—) bzw. biexponentieller (—) Funktionen; b) Residua für die erfolgten Anpassungen in a); c) Veränderung des Emissionsmaximums bei Bindung sowie Ermittlung der Übergangspunkte durch Anpassung von zwei sigmoidalen Boltzmann-Funktionen.

Tabelle VIII.3 - Parameter der Anpassungen an die zeitliche Veränderung der MSP-Fluoreszenzintensität durch  $\text{Eu}^{3+}$  (Abbildung VIII.24a) für ein fest gesetztes  $y_0 = 340$  nm. Die erhaltenen Lebenszeiten dienen zur Bestimmung der Halbwertszeiten in Abbildung VIII.24a).

Anpassung	$a_1$	$\tau_1 / \text{min.}$	$a_2$	$\tau_2 / \text{min.}$	$\chi^2$	$R^2$
monoexponentiell	130	$1,55 \pm 0,06$	-	-	1,88,10	0,6362
biexponentiell	47,5	$0,37 \pm 0,13$	83,9	$2,53 \pm 0,28$	176,54	0,6591

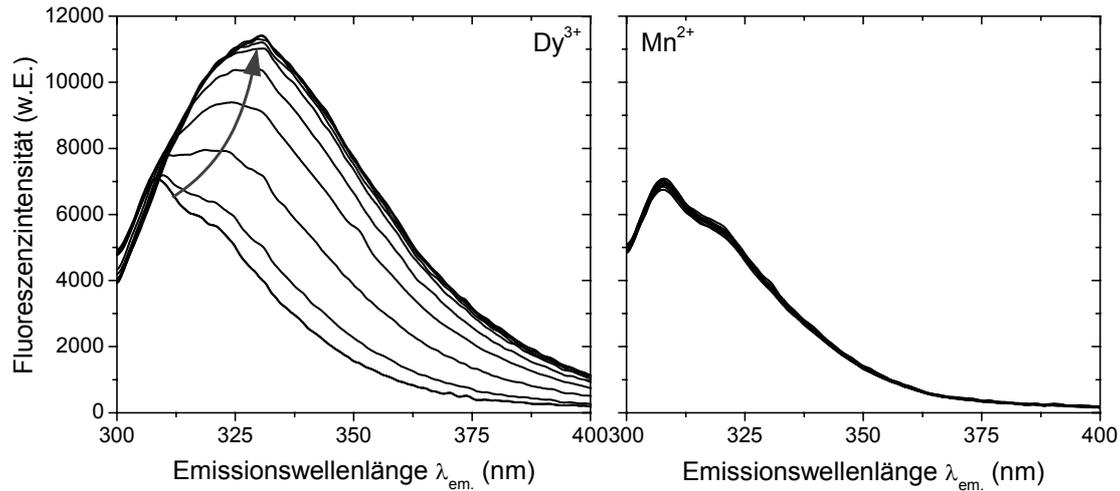


Abbildung VIII.25 - Änderung der Fluoreszenzspektren von MSP bei Inkubation mit neun verschiedenen Konzentrationen (0 – 10 mM) an  $\text{Mn}^{2+}$  bzw.  $\text{Dy}^{3+}$ .

#### Konzentrationsabhängige Bindungsstudien

Nach der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Lanthanidbindung durch MSP sind des Weiteren die Dissoziationskonstanten der  $\text{MSP-La}^{3+}$ -Komplexe zu bestimmen, da diese Rückschlüsse auf die Stärke der Bindungen zulassen. Aus diesem Grund wurde die Veränderung der MSP-Fluoreszenzintensität für Ionenkonzentrationen zwischen 0 und 10 mM in Titrationsreihen untersucht. Beispielhaft ausgewählte Ergebnisse sind in Abbildung VIII.25 dargestellt. Im Einklang mit vorherigen Untersuchungen, die eine unspezifische Bindung der zweiwertigen Ionen  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  nahe legten, wurden keine Veränderungen der Fluoreszenzintensität des MSP-Tryptophans festgestellt, die es gestattet hätten, eine Dissoziationskonstante für die Ionenbindung zu bestimmen. Für die spezifische Bindung von  $\text{Dy}^{3+}$  und  $\text{Eu}^{3+}$  lassen dagegen die starken spektralen Veränderungen die Bestimmung von Komplex-Dissoziationskonstanten  $K_d$  zu.

Sie werden über eine Anpassung der von der Ionenkonzentration  $[\text{La}^{3+}]_0$  abhängigen Gesamtfluoreszenzintensität  $I$  an die zu Gleichung (II.46) analoge Gleichung

$$\begin{aligned}
 I &= \alpha \cdot [\text{MSP}] + \beta \cdot [\text{MSP-La}^{3+}] \\
 &= \alpha \cdot ([\text{MSP}]_0 - [\text{MSP-La}^{3+}]) + \beta \cdot [\text{MSP-La}^{3+}] \\
 &= \alpha \cdot [\text{MSP}]_0 + (\beta - \alpha) \cdot \left\{ \frac{[\text{MSP}]_0 + [\text{La}^{3+}]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\frac{([\text{MSP}]_0 + [\text{La}^{3+}]_0 + K_d)^2}{4} - [\text{MSP}]_0[\text{La}^{3+}]_0} \right\} \quad (\text{VIII.5})
 \end{aligned}$$

mit den Variablen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $K_d$  erhalten. Die Anpassung der jeweiligen Gesamtfluoreszenzintensitäten der Apo- und sich bildenden Holo-Form des MSP an die hier dargestellte Funktion ist in Abbildung VIII.26 dargestellt. Die über die Anpassungen ermittelten Dissoziationskonstanten betragen  $K_d = 1,40 \pm 0,23$  mM für die Dysprosiumbindung und

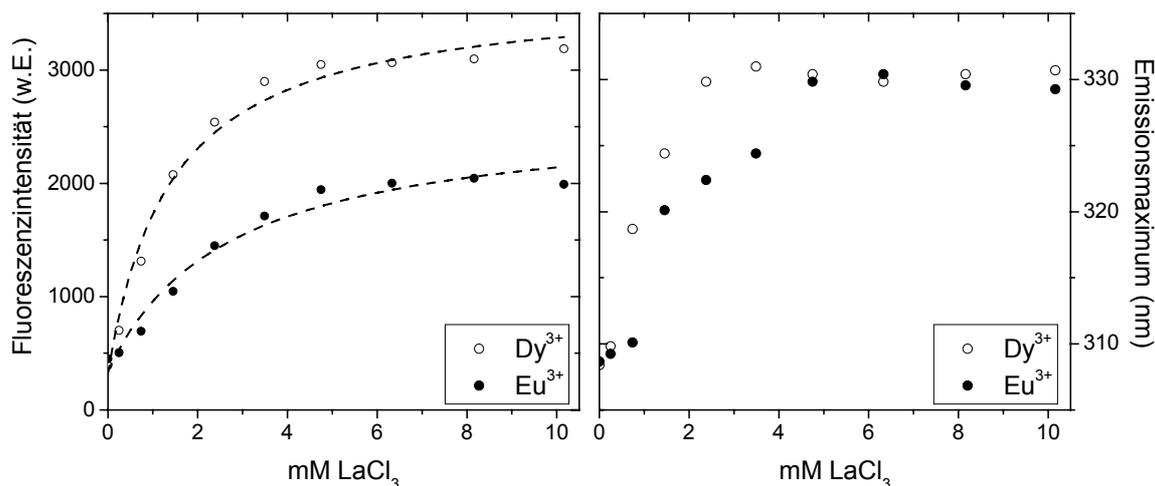


Abbildung VIII.26 – Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung von Dy<sup>3+</sup> und Eu<sup>3+</sup> durch MSP: Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten bei  $\lambda_{em.} = 375$  nm (links) und der Emissionsmaxima (rechts)

$K_d = 2,69 \pm 0,80$  mM für die Europiumbindung. Die Ionenbindung im MSP ist somit schwächer als bei vielen anderen Proteinen [218-220], aber noch nicht außergewöhnlich gering [221]. Die Korrelationskoeffizienten der Anpassungen sind jedoch nicht vollständig zufriedenstellend (Dy<sup>3+</sup>:  $R = 0,9902$ ; Eu<sup>3+</sup>:  $R = 0,9745$ ).

Bessere Anpassungen werden erhalten, wenn neben den Variablen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $K_d$  auch die Ausgangskonzentration des Proteins  $[MSP]_0$  variabel gesetzt wird. Die durchgeführten Anpassungen liefern dann zwar sehr gute Korrelationskoeffizienten und kleinere Werte für die Dissoziationskonstanten, ergeben aber physikalisch keinen Sinn, da sie als Anpassungen für die Ausgangskonzentration  $[MSP]_0$  Werte zwischen 1,8 und 3,6 mM liefern. Diese liegen mehr als das Hundertfache über der angenommenen und über Absorptionsmessungen verifizierten Ausgangskonzentration von MSP. Unter der Voraussetzung, dass ein Teil des aufgereinigten Proteins nicht nativ vorlag und somit nicht fähig zur Ionenbindung war, können zwar Abweichungen von der bestimmten Ausgangskonzentration bei der Messung festgestellt werden, diese sollten aber zu geringeren Messwerten für die Proteinkonzentration und außerdem nicht zu derart großen Schwankungen führen.

Insofern ist die nicht sehr zufriedenstellende Qualität der Anpassung vermutlich auf Abweichungen zurückzuführen, die bei höheren Lanthanidkonzentrationen auf Proteinzusammenlagerungen, auf Mehrfachbindungsprozesse oder auf Absorptionseffekte durch die Lanthanide zurückzuführen sind. Worauf genau die Abweichungen zurückzuführen sind, ist an dieser Stelle nicht zu klären. Da wegen der geringen Fluoreszenzintensität der Proben Wert auf ein hohes Auflösungsvermögen der Fluoreszenzspektren gelegt wurde, wurde das Rayleigh-Signal übersteuert, so dass normalerweise über Rayleigh-Streuung zugängliche Informationen über potentielle Proteinzusammenlagerungen nicht zur Verfügung stehen. Des Weiteren ist es im Gegensatz zu der Annahme der einfachen Ionenbindung nicht

möglich, fluoreszenzspektroskopisch die Bindungskonstanten  $K_{d1}$  und  $K_{d2}$  für eine potentielle zweifache Lanthanidbindung zu bestimmen.

Trotz der vermutlich ungenauen Bestimmung der Dissoziationskonstanten für Dysprosium- und Europiumbindung werden wichtige Informationen geliefert: Die Werte liegen im millimolaren Bereich und somit ist die Bindung der Lanthanide durch MSP nicht sehr stark. Außerdem ist deutlich zu sehen, dass die Bindung für Dysprosium stärker als für Europium ist, da die entsprechende Dissoziationskonstante für den MSP-Dy<sup>3+</sup>-Komplex geringer als für den MSP-Eu<sup>3+</sup>-Komplex ist. Für eine festere Bindung von Dysprosium durch MSP spricht bereits die in Abschnitt VIII.V.a) vorgestellte Analyse der Emissionsspektren: Diese zeigten für die Dysprosium-Bindung bei gleicher Konzentration eine wesentlich höhere Fluoreszenzintensität als für die Europium-Bindung. Daraus kann geschlossen werden, dass sich der Tryptophanrest nach der Umlagerung in einer geschützteren Umgebung befindet, wenn die Umlagerung durch Dysprosium statt Europium induziert wird. Tryptophan ist somit geringerem Solvens-Quenching ausgesetzt. Zurückzuführen ist die festere Bindung des Dysprosioms auf sein größeres Ladung/Radius-Verhältnis im Vergleich zu Europium.

## **VI. Zusammenfassung**

Das Manganstabilisierende Protein (MSP) ist in höheren Pflanzen eines der drei extrinsischen Proteine des Photosystems II, die u.a. für die durch einen (Mn)<sub>4</sub>-Cluster katalysierte Oxidation von Wasser zu Sauerstoff verantwortlich sind. Da der Mechanismus der Reaktion noch nicht vollständig geklärt ist, ist speziell die Rolle dieses Proteins, das höchstwahrscheinlich an der Koordination des Clusters im Enzymkomplex beteiligt ist, von Interesse. Bislang konnte für MSP keine Kristallstruktur erhalten werden. Aus diesem Grund wurde die Kombination verschiedener fluoreszenzspektroskopischer Techniken dazu angewendet, Informationen über die Umgebung des einen intrinsischen Tryptophanrestes und die Stabilität des Proteins zu erhalten. Speziell sollte dabei die Validität der einen bisher vorhandenen Strukturvorhersage, die auf Basis von Alignment-Methoden in Kombination mit einer neuartigen Sequenz-Struktur-Anpassung erstellt wurde, überprüft werden. Auch sollte der Einfluss des Oxidationszustandes auf die Struktur des MSP untersucht werden. Da des Weiteren in der Literatur neben der Stabilisierung des (Mn)<sub>4</sub>-Clusters die Bindung von Ionen als eine weitere Funktion des MSP diskutiert wird, sollten verschiedene Ionen-Bindungsstudien mit MSP durchgeführt werden.

Aufgrund des Emissionsspektrums von oxidiertem MSP, das ein ungewöhnlich stark blau verschobenes Emissionsmaximum zeigte, konnte für den Tryptophanrest im Einklang mit der Strukturvorhersage aufgrund der geringen Lösungsmittelrelaxation eine sehr stark hydrophobe und somit wenig lösungsmittelzugängliche Umgebung festgestellt werden. Auch Fluoreszenz-Quenching-Untersuchungen lokalisieren den Tryptophanrest in einer nur sehr wenig für neutrales Acrylamid und überhaupt nicht für die ionischen Quencher Iodid und Cäsium zugänglichen Umgebung. Interessanterweise ist trotz der starken Solvensabschirmung

die Tryptophanemission ungewöhnlich stark gequenchet. Zurückzuführen ist dies einerseits auf sehr große Tyrosin-Tryptophan-Abstände im Protein, die FRET von Tyrosin auf Tryptophan verhindern, so dass die Anregungs-Emissions-Spektren des nativen Proteins von Tyrosin dominiert werden. Des Weiteren ist die geringe Fluoreszenzintensität des Tryptophanrestes auf starkes internes Quenching durch benachbarte Aminosäuren zurückzuführen, wie sich in den statischen und dynamischen Spektren gleichermaßen zeigt. Die wahrscheinlichsten Stoßpartner des Tryptophanrestes, die sich aus der Strukturvorhersage ergeben, sind die Reste Thr128, Lys130 und Glu212, die sich in Abständen zwischen 5,0 und 8,7 Å von dem Tryptophanrest entfernt befinden. Entfaltungsstudien lieferten überraschende Informationen über die Stabilität des MSP, das trotz der stark solvensabgeschirmten Umgebung des Tryptophanrestes eine nur geringe Entfaltungsenthalpie besitzt. Dies Ergebnis ist konsistent mit diversen Untersuchungen, die auf eine hohe Flexibilität bzw. geringe Stabilität des MSP hinweisen.

Der Status der Disulfidbrücke zeigt keinen großen Einfluss auf die Fluoreszenz des Tryptophans: Lebenszeiten und Emissionsspektren wie auch Entfaltungsenthalpien sind für oxidiertes und reduziertes MSP vergleichbar groß. Insofern ist davon auszugehen, dass der Oxidationszustand der beiden Cysteinreste die Umgebung des Tryptophanrestes und somit vermutlich die Gesamtstruktur des Proteins nicht oder nicht stark beeinflusst.

Ionenbindungs-Studien zeigen, dass entgegen einiger publizierter Ergebnisse [186] keine spezifische Bindung von zweiwertigen Ionen wie Calcium, Magnesium und Mangan erfolgt: Fluoreszenzlebenszeiten, Emissionsspektren und ermittelte Entfaltungsenthalpien zeigen keine signifikante Diskrepanz zu ionenfreiem MSP. Auch zeit- und konzentrationsabhängige Bindungsstudien lieferten keine Hinweise auf eine selektive Bindung dieser Ionen. Eine unspezifische Bindung dieser Ionen aufgrund der hohen Ladung des Proteins unter physiologischen Bedingungen ist jedoch den erhaltenen Daten zufolge wahrscheinlich. Insofern kann die diskutierte Rolle des MSP als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher für die Wasseroxidation *in vitro* bislang nicht verifiziert werden.

Eine sehr deutliche spezifische Bindung der dreiwertigen Lanthanidionen Dysprosium und Europium kann jedoch im Gegensatz zu den untersuchten zweiwertigen Ionen festgestellt werden: Durch Kombination von Daten aus Absorptions- und Emissionsspektren mit Fluoreszenzlebenszeiten konnten die Fluoreszenzveränderungen nach Zugabe von Lösungen dreiwertiger Europium- und Dysprosiumsalze auf eine Umlagerung des Proteins zurückgeführt werden, woraus eine stärkere Lösungsmittelexposition des Tryptophanrestes bei gleichzeitiger Verminderung des internen Quenchings resultiert. Die Bindung der Ionen führt dabei zu einer Zunahme der Proteinstabilität, die für die Dysprosiumbindung stärker ausgeprägt ist. Zeitabhängige Untersuchungen der Ionenbindung liefern die Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung dieser Ionen: Die Bindung von Europium und Dysprosium ist demzufolge ein über die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten und der Emissionsmaxima nachweisbarer zweistufiger Prozess, der im Minutenbereich und damit sehr langsam erfolgt. Über Ionen-konzentrationsabhängige Fluoreszenzuntersuchungen wurden des Weiteren die

Bindungskonstanten der Lanthanidbindung bestimmt. Diese liegen im millimolaren Bereich, wobei Dysprosium die kleinere der beiden Bindungskonstanten zeigt. Die festere Bindung von Dysprosium bei gleichzeitig stärkerer Erhöhung der Proteinstabilität ist dabei auf das größere Ladung/Radius-Verhältnis für  $Dy^{3+}$  zurückzuführen, das zu stärkeren elektrostatischen Interaktionen führt.

Die durchgeführten Untersuchungen stützen somit den durch Vorhersage erhaltenen Strukturvorschlag des Proteins und liefern außerdem darüber hinausgehende Informationen, die Hypothesen für weitere Funktionen des MSP zulassen. Die geringe ermittelte Stabilität ist im Einklang mit der postulierten Funktion des MSP: Die Stabilisierung des  $(Mn)_4$ -Clusters an der Lumenalseite des Transmembran-Komplexes könnte bei einer gleichzeitigen hohen Flexibilität des Proteins die Katalyse positiv beeinflussen. Speziell die Untersuchung der Ionenbindung lässt Rückschlüsse auf die Interaktionsfähigkeit des MSP im Enzymkomplex zu: Da *in vitro* keine Bindung von Calcium, Magnesium und Mangan festgestellt werden konnte, kann vermutlich rückgeschlossen werden, dass MSP nicht als Speicherprotein durch direktes Bereitstellen von  $Ca^{2+}$  an der Regulierung des Calciumbedarfs des Photosystems II beteiligt ist. Die *in vitro* ermittelte Affinität des MSP für höher geladenen Lanthanidionen mit einer mit Calcium vergleichbaren Größe hat vermutlich keine biologische Relevanz, da Lanthanide nur in sehr geringen Mengen vorkommen und bei biologischen Prozessen keine wichtige Rolle spielen. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass MSP zusammen mit anderen Komponenten des Enzymkomplexes nicht nur bei der Stabilisierung des  $(Mn)_4$ -Clusters, sondern auch bei der Stabilisierung oder Übertragung für die Reaktion essentieller Calcium-Ionen bzw. anderer Ionen beteiligt sein könnte. Eine Speicherfunktion für Calcium kann dagegen ausgeschlossen werden.

## IX. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zur Untersuchung biochemischer Systeme sind Verfahren zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur und zur Detektion umgebungsabhängiger Strukturveränderungen essentiell, da sich nur bei Kenntnis der Struktur die Interaktion biochemischer Systeme miteinander, wie z.B. von Proteinen mit ihren Substraten, molekular interpretieren lässt. Die gebräuchlichsten experimentellen Verfahren zur Aufklärung von Proteinstrukturen beruhen auf der Röntgenkristallographie, der NMR-Spektroskopie und der Cryo-Elektronenmikroskopie. Sie bergen jedoch den Nachteil, dass sich ihr Einsatzgebiet auf hohe Konzentrationsbereiche bzw. auf feste Phasen beschränkt. Deshalb sind sensitive Verfahren, die auch unter physiologischen Konzentrationen Aussagen über die Struktur und ihre Veränderungen ermöglichen, zur Untersuchung dieser Systeme unerlässlich.

Die vorliegende Arbeit demonstriert die erfolgreiche Anwendung von statischen und dynamischen Fluoreszenztechniken zur Untersuchung von Proteinen unter Verwendung der autofluoreszenten Aminosäure Tryptophan. Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine sehr sensitive Technik, die neben dieser Grundvoraussetzung sehr selektive Untersuchungen unter nicht-invasiven Bedingungen zulässt. Sie ist speziell für die Untersuchung von Proteinen ein bedeutendes Werkzeug, das unter der Verwendung autofluoreszenter Proteinbestandteile ohne die Notwendigkeit einer externen Probenmarkierung strukturelle Informationen und Antworten auf kinetische Fragestellungen liefert.

Zur erfolgreichen Realisierung der durchgeführten Studien war die Kombination mehrerer fluoreszenzspektroskopischer Techniken und die Adaptation bislang nicht verwendeter Analyseverfahren notwendig: Zur Detektion der statischen Fluoreszenzeigenschaften der Untersuchungsobjekte wurde die bislang noch nicht weit etablierte Anregungs-Emissions-Spektroskopie verwendet, bei der über die Aufnahme von vielen Emissionsspektren über einem definierten Anregungswellenlängenbereich dreidimensionale Fluoreszenzspektren erhalten werden. Die dynamischen Fluoreszenzeigenschaften der Proben wurden mit Hilfe von simultan zeit- und wellenlängenauflösender Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung eines Kurzpulslasers analysiert, wobei ebenfalls dreidimensionale Spektren erhalten wurden.

Fluoreszenzspektroskopisch konnten so unter Verwendung der unterschiedlichen Methoden Informationen über das Interaktionsverhalten der untersuchten Proteine mit sich selbst und anderen Agenzien erhalten werden. Generelle Studien der statischen und dynamischen Fluoreszenz von Tryptophan in Proteinen, die unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurden, ermöglichten dabei Rückschlüsse auf die Fluorophorposition innerhalb des Proteins in Abhängigkeit der veränderten Parameter. Die Untersuchungen der Fluoreszenz-Löschung (Quenching) lieferten zusätzliche Informationen über die Umgebung und die Zugänglichkeit des jeweiligen Tryptophanrestes. Diese Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in der Arbeitsgruppe für systematische Untersuchungen eingesetzt und für dynamische als auch

statische Untersuchungsmethoden etabliert. Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Tryptophanreste in Deletionsmutanten des betrachteten Proteins konnte Kontakte zwischen dem untersuchten Tryptophanrest und der entfernten Aminosäure sowie deren Anteil an Struktur und Funktionalität des Proteins identifizieren. Die Quantifizierung der Messergebnisse ermöglichte außerdem die Bestimmung von kinetischen und thermodynamischen Parametern wie Bindungskonstanten und Proteinstabilitäten. Letztere wurden ebenfalls erstmalig in dieser Arbeitsgruppe bestimmt.

Die aromatische Aminosäure Tryptophan ist der wichtigste intrinsische Fluorophor in Proteinen. Seine Fluoreszenz ist stark umgebungsabhängig und lässt so indirekt Rückschlüsse auf die Fluorophorumgebung zu. In Proteinen mit vielen Tryptophanresten ist ihre spektroskopische Separation jedoch nicht immer möglich. Chemisch modifizierte Tryptophan-Analoga können unter geeigneten Bedingungen als strukturkonservierende Alternativen zu Tryptophan verwendet werden. Grundvoraussetzung dafür ist, dass sich ihre Fluoreszenzeigenschaften stark von Tryptophan unterscheiden. Wichtig ist aber auch oft eine von Tryptophan unterschiedliche Veränderung der Fluoreszenz bei Variation der Umgebungspolarität. Veränderungen der Fluorophorumgebung im Protein lassen sich durch die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel simulieren. Der Einsatz von Lösungsmitteln zur Simulation unterschiedlicher Umgebungspolaritäten im Protein und deren Quantifizierung war bislang ebenfalls vor Ort nicht etabliert.

Mit einer Kombination der vorgestellten Techniken lassen sich komplexe Fragestellungen auf molekularer und makromolekularer Ebene bezüglich Sensitivität, Struktur, Strukturvariabilität, Stabilität und Interaktionsverhalten beantworten. So konnte fluoreszenzspektroskopisch z.B. sowohl die redox-abhängige Zusammenlagerung des Proteins 2-Cystein Peroxiredoxin als auch die auf Unterschieden in der molekularen Struktur beruhenden lösungsmittelabhängigen Fluoreszenzunterschiede von Tryptophan und 7-Azatriptophan analysiert werden.

Da es bislang keine systematische Untersuchung zu den Eigenschaften aller zur Verfügung stehenden kommerziell erhältlichen Tryptophan-Analoga gab, wurde in dieser Arbeit eine fluoreszenzspektroskopische Lösungsmittelstudie mit verschiedenen Tryptophan-Analoga durchgeführt, um ihr Anwendungspotential bei Proteinfluoreszenzuntersuchungen zu analysieren. So waren bereits die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der Tryptophan-Analoga 5-Hydroxy- und 7-Azatriptophan wohl charakterisiert, nicht bekannt waren jedoch die korrespondierenden Stern-Volmer-Konstanten und Quenckkonstanten, die Aussagen über die Sensitivität gegenüber Fluoreszenzlöschern zulassen. Auch wurde erst in dieser Arbeit erstmals die herausragende Rolle von 5-Bromtryptophan in bezug auf Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung identifiziert. Insgesamt wurden mit den durchgeführten Untersuchungen Daten erhalten, die eine umfassende Dokumentierung der Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Tryptophan-Analoga im Vergleich zu Tryptophan und eine

Zusammenstellung von vielen bislang nicht publizierten fluorophorspezifischen Konstanten ermöglichte. Aufgrund der durchgeführten Studien sollten Untersuchungen der Fluoreszenz von Tryptophan-Analoga enthaltenden Mutanten eines Proteins in Zukunft wesentlich aussagekräftiger werden.

Bei den beiden untersuchten Proteinsystemen handelt es sich um das 2-Cystein Peroxiredoxin aus Gerste und das Manganstabilisierende Protein aus Spinat. Mit ihnen durchgeführte Studien konnten wesentlich das Wissen über diese beiden Proteine vergrößern und offene Fragen klären. So konnte über eine Analyse der Emissionsmaxima und der Fluoreszenzlebenszeiten der beiden intrinsischen Tryptophanreste im 2-Cystein Peroxiredoxin in Kombination mit Fluoreszenz-Quenching-Untersuchungen die Position der beiden Reste fluoreszenzspektroskopisch analysiert werden. Dabei konnte der eine Tryptophanrest des im oxidierten Zustand dimer vorliegenden Proteins im Einklang mit Kristallstrukturen aus anderen Organismen an einer von der Dimerverbundstätte abgewandten Seite lokalisiert werden. Der zweite Tryptophanrest, dessen Position über Kristallstrukturanalysen bislang nicht ermittelt werden konnte, ließ sich über sein Emissionsmaximum und seine Quencherzugänglichkeit im oxidierten Zustand an der Dimerverbundstätte bestimmen. Somit lieferten die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen strukturelle Informationen, die über andere Methoden bislang nicht erhalten werden konnten. Des Weiteren konnte eine redoxabhängige Aggregation des 2-Cystein Peroxiredoxins aus Gerste fluoreszenzspektroskopisch detektiert werden: Über die Analyse der redoxabhängigen Fluoreszenzlöschung wurde dabei festgestellt, dass der an der Dimerverbundstätte befindliche Tryptophanrest bei Reduktion stärker zugänglich wird, wohingegen der andere Tryptophanrest für Fluoreszenzlöcher weniger erreichbar wird. Da für das 2-Cystein Peroxiredoxin aus anderen Organismen teilweise von einer Zusammenlagerung unter Bildung ringförmiger Multimere berichtet wird, ist die verminderte Zugänglichkeit dieses Tryptophanrestes im Gerstenprotein bei Reduktion somit mit einer Aggregation des Proteins unter reduzierenden Bedingungen zu erklären.

Das Manganstabilisierende Protein zeigte ein ungewöhnlich stark blau verschobenes Emissionsmaximum, das auf eine sehr geringe Zugänglichkeit seines einzigen Tryptophanrestes schließen lässt. Dies wurde mit Hilfe von Fluoreszenz-Quenching-Untersuchungen bestätigt. Obwohl die geringe Zugänglichkeit des Tryptophanrestes auf eine hohe Strukturierung seiner Umgebung hindeutet, wurde mit Hilfe von Denaturierungsstudien eine sehr geringe Stabilität für das Manganstabilisierende Protein ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse stützen Strukturberechnungen, die für das Manganstabilisierende Protein eine Struktur mit zwei Regionen mit sehr hohen  $\beta$ -Faltblattanteilen, die über ein sehr flexibles Prolin-Glycin-Glycin-Motiv verbunden sind, vorhersagen. Neben dem stark blau verschobenen Emissionsmaximum wurde eine sehr geringe Fluoreszenzintensität des emittierenden Tryptophanrestes beobachtet. Dies ließ sich einerseits auf sehr große Tyrosin-Tryptophan-Abstände, die zu vermindertem Energietransfer von Tyrosin auf Tryptophan

führen, und andererseits auf starkes intramolekulares Quenching im Manganstabilisierenden Protein zurückführen. Da als eine der möglichen Funktionen des Manganstabilisierenden Proteins die Bindung bzw. Speicherung von Calcium diskutiert wird, wurden Ionenbindungsstudien mit Calcium und verschiedenen Ionen vergleichbarer Größe durchgeführt. Ein Hinweis auf eine Bindung von Calcium wurde dabei *in vitro* nicht erhalten. Es ist infolgedessen nicht davon auszugehen, dass das Manganstabilisierende Protein ohne Wechselwirkung mit anderen Cofaktoren eine Calcium-Speicherfunktion erfüllt. Es konnte jedoch eine mit einer Umlagerung des Proteins einhergehende Bindung der Lanthanidionen Dysprosium und Europium beobachtet werden. Diese führt zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinstabilität. Es ist davon auszugehen, dass die Bindung der Lanthanidionen keinen physiologischen Zweck erfüllt. Da die verwendeten Lanthanidionen im Gegensatz zu dem zweiwertigen Calcium-Ion jedoch dreiwertig sind, lassen sie Rückschlüsse darauf zu, dass das Manganstabilisierende Protein vermutlich nicht an der Speicherung von Ionen, möglicherweise aber an ihrer Übertragung beteiligt ist.

Die durchgeführten Untersuchungen helfen somit, Strukturen, strukturelle Veränderungen und Funktionen von Proteinen zu analysieren. Bei der Abwesenheit von Kristallstrukturen können sie Strukturberechnungen verifizieren und liefern des Weiteren Hinweise auf die tatsächliche Struktur des Proteins in Lösung, die nicht notwendigerweise der Kristallstruktur entspricht. Außerdem können thermodynamische und kinetische Fragestellungen aufgeklärt werden. Die verwendeten Techniken und experimentellen Aufbauten eignen sich also hervorragend zur Untersuchung von Proteinen unter physiologischen Konzentrationen und ohne externe Fluoreszenzmarkierung.

Dennoch gibt es Ansätze zur Verbesserung der eingesetzten Apparaturen: Das Anregungs-Emissions-Spektrometer könnte durch die Verwendung eines mehrsträngigen Glasfaserkabels maßgeblich verbessert werden. Durch dieses könnten neben Messungen der Fluoreszenz z.B. Absorptionsspektren simultan aufgenommen werden. Durch die Verwendung von Polarisatoren könnten außerdem statische Anisotropiemessungen durchgeführt werden. Für den Aufbau zur Untersuchung der zeitaufgelösten laserinduzierten Fluoreszenz wäre der direkte Einsatz der hochrepetitiven Strahlung des Titan-Saphir-Lasers vorteilhaft. Bei Verwendung einer Synchroscan-Streakkamera zur zweidimensionalen Detektion oder einer Photon-Counting-Anlage zur punktwisen Detektion könnten dann Messungen bei einer Verringerung der Strahlungsdichte am Messort durchgeführt werden. So würde die Photodegradation empfindlicher Proben und ebenso die Wahrscheinlichkeit von Mehrphotonenprozessen verringert und die Genauigkeit der Messungen erhöht. Des Weiteren könnten Messungen der Phosphoreszenz durch zugängliche Zeitfenster bis in den Millisekundenbereich hinein durchgeführt werden. Ein entsprechendes Experiment befindet sich zur Zeit im Aufbau.

Anknüpfend an die vorgestellten Untersuchungsmethoden könnten über ihre Kombination weitere Substanzen umfassend charakterisiert werden. Um die durchgeführten Lösungsmittel-

studien an den Tryptophan-Analoga und die erhaltenen Ergebnisse auf Proteinsysteme zu übertragen, ist als nächster Schritt die systematische Synthese und fluoreszenzspektroskopische Analyse von Tryptophan-Analoga enthaltenden Peptiden sinnvoll.

Des Weiteren könnten neben der bereits erfolgreichen Denaturierung von Proteinen mit Hilfe chemischer Substanzen in dem bereits zur Verfügung stehenden temperierbaren Probenhalter thermische Denaturierungsstudien durchgeführt werden und kombiniert ausgewertet werden. Darüber könnten neben der über chemische Denaturierungsstudien zugänglichen Veränderung der Freien Enthalpie auch Enthalpie- und Entropieveränderungen während der thermischen Denaturierung erfasst werden. [41] Außerdem könnte eine Kombination von Denaturierungs- und Quenching-Untersuchungen an Proteinen dazu beitragen, Entfaltungsmechanismen aufzuklären, da die Vorgänge, die zu Faltung und Entfaltung eines Proteins führen, noch nicht vollständig verstanden sind.



## X. ANHANG

### I. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

#### Lateinische Buchstaben

Abkürzung	Erklärung
2-CP	2-Cystein Peroxiredoxin
$a$	Amplitude ( <i>hier</i> : einer exponentiellen Anpassung)
AA	Acrylamid
$A$	Absorption
AES	Anregungs-Emissions-Spektroskopie bzw. -Spektrum
$c$	Lichtgeschwindigkeit ( $c = 2,998 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ )
DTT	Dithiothreitol
$E$	Energietransfereffizienz für FRET
$E_T^N$	normierte Lösungsmittelpolarität nach Dimroth & Reichardt
$f_Q$	Quencheffizienz
FRET	Förster- / Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FWHM	Halbwertsbreite ( <i>'full width at half maximum'</i> )
$h$	Plancksches Wirkungsquantum ( $h = 6,62618 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ )
$I$	Intensität absorbierter / emittierter Strahlung
$K$	Gleichgewichtskonstante
$k_0$	Diffusionskontrollierte Stoßkonstante
$K_{App}$	Scheinbare Stern-Volmer-Konstante für kombiniertes Quenching
$K_d$	Komplexdissoziationskonstante
$K_D$	Stern-Volmer-Konstante
$k_q$	Bimolekulare Quenchkonstante
$K_S$	Komplexbildungskonstante
$k_T$	Geschwindigkeitskonstante für Energietransfer
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat
MSP	Manganstabilisierendes Protein
$n$	Brechungsindex
$N$	Teilchenzahl

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
$N_A$	Avogadro-Zahl ( $N_A = 6,02205 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
NATA	N-Acetyltryptophanamid
OEC	Sauerstoffentwickelnder Komplex des PS II (,oxygen evolving complex')
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
$r$	Radius
$R$	Gaskonstante ( $R = 8,31441 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
$R_0$	Förster-Abstand
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (,reactive oxygen species')
$V$	Volumen

---

### Griechische Buchstaben

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
$\alpha$	Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Azidität nach Kamlet & Taft
$\beta$	Wasserstoffbrücken-Donor-Basizität nach Kamlet & Taft
$\Delta f$	Reaktionsfeldfunktion / Orientierungspolarisierbarkeit
$\Delta G$	Freie Enthalpie ( <i>hier</i> : der Proteinentfaltung)
$\phi$	Quantenausbeute
$\varepsilon$	Molarer Absorptionskoeffizient
$\Gamma$	Emissionsrate
$\lambda$	Wellenlänge
$\mu$	Dipolmoment
$\nu$	Frequenz
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
$\pi^*$	Lösungsmittelpolarität / -polarisierbarkeit nach Kamlet & Taft
$\rho$	Bandensymmetrieparameter einer Lognormal-Verteilung
$\tau$	Fluoreszenzlebenszeit

---

**II. Die Kurzschreibweise der biogenen Aminosäuren**

---

Aminosäure	Abkürzung [3]	1-Buchstabencode [3]
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

---

### III. **Abkürzungen verwendeter Tryptophan-Analoga**

<b>Tryptophan-Analogon</b>	<b>Abkürzung</b>
5-Hydroxytryptophan	5OHW
5-Methoxytryptophan	5OMeW
5-Methyltryptophan	5MeW
5-Fluortryptophan	5FW
5-Bromtryptophan	5BrW
6-Fluortryptophan	6FW
7-Azatryptophan	7NW

### IV. **Lösungsmittelparameter der eingesetzten Alkohole**

<b>Alkohol</b>	$E_T^N$ [51]	$\pi^*$ [222]	$\alpha$ [222]	$\beta$ [222]
Methanol	0,762	0,60	0,93	0,62
Ethanol	0,654	0,54	0,83	0,77
1-Propanol	0,617	0,52	0,78	0,83
2-Propanol	0,546	0,48	0,76	0,95
1-Butanol	0,586	0,47	0,79	0,88
1-Pentanol	0,568	0,44	0,70	0,92
1-Hexanol	0,559	0,41	0,67	0,94
1-Heptanol	0,549	0,39	0,64	0,96
1-Octanol	0,537	0,37	0,62	0,97
1-Nonanol	0,528	-	-	-
1-Decanol	0,525	-	-	-

**XI. LITERATUR**

- [1] N.A. Campbell, *Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 2000.
- [2] A.L. Lehninger, D.L. Nelson und M.M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994.
- [3] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994.
- [4] Z. Deyl, *Electrophoresis: a survey of techniques and applications*, Elsevier, Amsterdam, 1979.
- [5] T. Kleinert, *Elektrophoretische Methoden in der Proteinanalytik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990.
- [6] W. Heller, M. Schallies und K. Schmidt, Elektrophoretische Trennverfahren: vom einfachen Demonstrationsversuch zur hochauflösenden Proteinanalytik, *Chemistry and Experimental Technology*, 1977, **3**, 233.
- [7] H. Sternbach, *Chromatographische Methoden in der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990.
- [8] P. Schuck, Analytische Ultrazentrifugation in der modernen Biochemie, *Laborpraxis*, 1992, **16**, 55.
- [9] B.W. Matthews, X-Ray-Structures of Proteins, in: *The Proteins* (Ed. H. Neurath und R. L. Hill), Academic Press, London, New York, 1977.
- [10] J. Drenth, *Principles of Protein X-Ray Crystallography*, Springer Verlag, Hamburg, 1994.
- [11] J.N. Forkey, M.E. Quinlan und Y.E. Goldman, Protein structural dynamics by single-molecule fluorescence polarization, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2000, **74**, 1-35.
- [12] G.D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, New York, 1996.
- [13] A. Rodger und B. Norden, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford University Press, Oxford, 1997.

- 
- [14] B. Guigliarelli und P. Bertrand, Application of EPR spectroscopy to the structural and functional study of iron-sulfur proteins, *Advances in Inorganic Chemistry*, 1999, **47**, 421-497.
- [15] J.N.S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, 1995.
- [16] A.K. Bhuyan, Real-time NMR measurements of protein folding and hydrogen exchange dynamics, *Current Science*, 1999, **77**, 942-650.
- [17] M. Pfuhl, Protein nuclear magnetic resonance spectroscopy in the new millennium, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A - Physical Sciences & Engeneering*, 2000, **358**, 513-545.
- [18] G.M. Clore und A.M. Gronenborn, NMR structure determination of proteins and protein complexes larger than 20 kDa, *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998, **2**, 564-570.
- [19] C.H. Arrowsmith und Y.S. Wu, NMR of large (> 25 kDa) proteins and protein complexes, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1998, **32**, 277-286.
- [20] K.H. Gardner und L.E. Kay, The use of H-2, C-13, N-15 multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1998, **27**, 357-406.
- [21] L. Stryer, Fluorescence spectroscopy of proteins, *Science*, 1968, **162**, 526-533.
- [22] D.M. Jameson, J.C. Croney und P.D.J. Moens, Fluorescence: Basic concepts, practical aspects, and some anecdotes, in: *Methods in Enzymology*, Band 360 (Ed. G. Marriott und I. Parker), Academic Press, New York, 2003.
- [23] S. D'Auria und J.R. Lakowicz, Enzyme fluorescence as a sensing tool: new perspectives in biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, **12**, 99-104.
- [24] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1999.
- [25] E. Dufour, M.F. Devaux, P. Fortier und S. Herbert, Delineation of the structure of soft cheeses at the molecular level by fluorescence spectroscopy - relationship with texture, *International Dairy Journal*, 2001, **11**, 465-473.
- [26] D.R. Parks und L.A. Herzenberg, Fluorescence-Activated Cell Sorting - Theory, Experimental Optimization, and Applications in Lymphoid-Cell Biology, in: *Methods*

- in Enzymology*, Band 108 (Ed. G. Di Sabato, J. J. Langone und H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 1984.
- [27] C. Chamberlain und K.M. Hahn, Watching proteins in the wild: Fluorescence methods to study protein dynamics in living cells, *Traffic*, 2000, **1**, 755-762.
- [28] P.I.H. Bastiaens und R. Pepperkok, Observing proteins in their natural habitat: the living cell, *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, **25**, 631-637.
- [29] F.S. Wouters, P.J. Verveer und P.I.H. Bastiaens, Imaging biochemistry inside cells, *Trends in Cell Biology*, 2001, **11**, 203-211.
- [30] E.A. Jares-Erijman und T.M. Jovin, FRET imaging, *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 1387-1395.
- [31] R.B. Sekar und A. Periasamy, Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations, *Journal of Cell Biology*, 2003, **160**, 629-633.
- [32] Y.L. Yan und G. Marriott, Analysis of protein interactions using fluorescence technologies, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, **7**, 635-640.
- [33] R. Cubeddu, D. Comelli, C. D'Andrea, P. Taroni und G. Valentini, Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine, *Journal of Physics D - Applied Physics*, 2002, **35**, R61-R76.
- [34] M.F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P.C. Traub, C.F. Vohringer und T.O. Joos, Protein microarray technology, *Drug Discovery Today*, 2002, **7**, 815-822.
- [35] N.L. Thompson, A.M. Lieto und N.W. Allen, Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy, *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, **12**, 634-641.
- [36] P. Schwille und U. Kettling, Analyzing single protein molecules using optical methods, *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, **12**, 382-386.
- [37] M.F. Garcia-Parajo, J.A. Veerman, R. Bouwhuis, R. Vallee und N.F. van Hulst, Optical probing of single fluorescent molecules and proteins, *ChemPhysChem*, 2001, **2**, 347-360.
- [38] P.R. Callis,  $^1L_a$  and  $^1L_b$  transitions of tryptophan: Applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins, in: *Methods in Enzymology*, Band 278 (Ed. L. Brand und M. L. Johnson), Academic Press, New York, 1997.

- [39] Y. Engelborghs, The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins, *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2001, **57**, 2255-2270.
- [40] B. Somogyi und Z. Lakos, Protein Dynamics and Fluorescence Quenching, *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology*, 1993, **18**, 3-16.
- [41] M.R. Eftink, The use of fluorescence methods to monitor unfolding translations in proteins, *Biophysical Journal*, 1994, **66**, 482-501.
- [42] E. Bucci und R.F. Steiner, Anisotropy Decay of Fluorescence as an Experimental Approach to Protein Dynamics, *Biophysical Chemistry*, 1988, **30**, 199-224.
- [43] T. Heyduk, Measuring protein conformational changes by FRET/LRET, *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**, 292-296.
- [44] S. Ercelen, D. Kazan, A. Erarslan und A.P. Demchenko, On the excited-state energy transfer between tryptophan residues in proteins: the case of penicillin acylase, *Biophysical Chemistry*, 2001, **90**, 203-217.
- [45] J.B.A. Ross, A.G. Szabo und C.W.V. Hogue, Enhancement of Protein Spectra with Tryptophan Analogs: Fluorescence Spectroscopy of Protein-Protein and Protein-Nucleic Acid Interactions, in: *Methods in Enzymology*, Band 278 (Ed. L. Brand und M. L. Johnson), Academic Press, New York, 1997.
- [46] S.M. Twine und A.G. Szabo, Fluorescent amino acid analogs, in: *Methods in Enzymology*, Band 360 (Ed. G. Mariott und I. Parker), Academic Press, San Diego, 2003.
- [47] P.W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH, Weinheim, Basel, 1990.
- [48] J.N. Demas und G.A. Crosby, Measurement of photoluminescence quantum yields - Review, *Journal of Physical Chemistry*, 1971, **75**, 991-1024.
- [49] H.V. Drushel, R.C. Cox und A.L. Sommers, Correction of luminescence spectra and calculation of quantum efficiencies using computer techniques, *Analytical Chemistry*, 1963, **35**, 2166-2172.
- [50] J.R. Lakowicz, On spectral relaxation in proteins, *Photochemistry and Photobiology*, 2000, **72**, 421-437.
- [51] C. Reichardt, Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators, *Chemical Reviews*, 1994, **94**, 2319-2358.

- [52] J.E. Dubois, E. Goetz und A. Bienvenue, Influence des solvants sur la transition  $n \rightarrow \pi^*$  des cétones saturées, *Spectrochimica Acta*, 1964, **20**, 1815-1828.
- [53] M.J. Kamlet, J.L.M. Abboud und R.W. Taft, An Examination of Linear Solvation Energy Relationships, *Progress in Physical Organic Chemistry*, 1980, **13**, 485-630.
- [54] E. Bunzel und S. Rajagopal, Studies of Azo and Azoxy Dye-stuffs .19. Solvatochromic Studies of Novel Azo Merocyanine Dyes - the  $\pi^*_{\text{Azo}}$ -Scale of Solvent Polarity, *Journal of Organic Chemistry*, 1989, **54**, 798-809.
- [55] C. Laurence, P. Nicolet, M.T. Dalamati, J.L.M. Abboud und R. Notario, The empirical treatment of solvent-solute interactions - 15 years of  $\pi$ , *Journal of Physical Chemistry*, 1994, **98**, 5807-5816.
- [56] H.B. Römpf, J.H. Falbe und M.H. Regitz, *Römpf-Chemie-Lexikon*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
- [57] E. Bunzel und S. Rajagopal, Solvatochromism and Solvent Polarity Scales, *Accounts of Chemical Research*, 1990, **23**, 226-231.
- [58] K. Dimroth, C. Reichardt, T. Siepmann und F. Bohlmann, Über Pyridinium-N-Phenol-Betaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln, *Liebigs Annalen der Chemie*, 1963, **661**, 1-37.
- [59] M.J. Kamlet, C. Dickinson und R.W. Taft, Linear Solvation Energy Relationships - Solvent Effects on Some Fluorescence Probes, *Chemical Physics Letters*, 1981, **77**, 69-72.
- [60] R.W. Taft und M.J. Kamlet, Solvatochromic Comparison Method .2. Alpha-Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (Hbd) Acidities, *Journal of the American Chemical Society*, 1976, **98**, 2886-2894.
- [61] M.J. Kamlet und R.W. Taft, Solvatochromic Comparison Method .1. Beta-Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (Hba) Basicities, *Journal of the American Chemical Society*, 1976, **98**, 377-383.
- [62] M. Sun und P.S. Song, Solvent Effects on the Fluorescent States of Indole Derivatives-Dipole Moments, *Photochemistry and Photobiology*, 1977, **25**, 3-9.
- [63] A. Vlahovici und H. Ofenberg, Temperature and solvent influence on the fluorescence spectrum of anthracene and anthracene-diethylaniline exciplex, *Journal of Luminescence*, 1982, **27**, 413-424.

- 
- [64] G. Wermuth und W. Rettig, The interaction of close-lying excited states - solvent influence on fluorescence rate and polarization in substituted indolines, *Journal of Physical Chemistry*, 1984, **88**, 2729-2735.
- [65] M. Maroncelli und G.R. Fleming, Picosecond solvation dynamics of coumarin 153: the importance of molecular aspects of solvation, *Journal of Chemical Physics*, 1987, **86**, 6221-6239.
- [66] R. Sander, R. Menzel und K.H. Naumann, Solvent induced broadening of fluorescent electronic transitions of paraterphenyl, *Berichte der Bunsen-Gesellschaft - Physical Chemistry Chemical Physics*, 1992, **96**, 188-194.
- [67] M. Vincent, J. Gallay und A.P. Demchenko, Solvent relaxation around the excited-state of indole - analysis of fluorescence lifetime distributions and time-dependent spectral shifts, *Journal of Physical Chemistry*, 1995, **99**, 14931-14941.
- [68] D. Magde, G.E. Rojas und P.G. Seybold, Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes, *Photochemistry and Photobiology*, 1999, **70**, 737-744.
- [69] E.H. Gilmore, G.E. Gibson und D.S. McClure, Absolute quantum efficiencies of luminescence of organic molecules in solid solution, *Journal of Chemical Physics*, 1952, **20**, 829-836.
- [70] E.H. Gilmore, Correction, *Journal of Chemical Physics*, 1955, **23**, 399.
- [71] J.R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 3: Biochemical Applications*, Plenum Press, New York, 1992.
- [72] A.P. Demchenko, *Ultraviolet Spectroscopy of Proteins*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1986.
- [73] J.W. Longworth, Excited State Interactions in Macromolecules, *Photochemistry and Photobiology*, 1968, **7**, 587-596.
- [74] J. Sipior und M. Sulkes, Spectroscopy of tryptophan derivatives in supersonic expansions: addition of solvent molecules., *Journal of Chemical Physics*, 1988, **88**, 6146-6156.
- [75] A.G. Szabo, K.R. Lynn, D.T. Kracjarski und D.M. Rayner, Tyrosinate Fluorescence Maxima at 345 nm in Proteins lacking Tryptophan at pH 7, *Febs Letters*, 1978, **94**, 249-252.
- [76] R.F. Steiner und R. Kolinski, The Phosphorescence of Oligopeptides containing Tryptophan and Tyrosine, *Biochemistry*, 1968, **7**, 1014-1018.

- [77] J.A. Knopp und J.W. Longworth, Energy Transfer in Oligotyrosyl Compounds: Fluorescence Quenching as a Function of the Ionization of the Phenolic Hydroxyl Groups, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1968, **154**, 436-443.
- [78] T. Alev-Behmoaras, J.J. Toulmé und C. Hélène, Quenching of Tyrosine Fluorescence by Phosphate Ions: A model Study for Protein-Nucleic Acid Complexes, *Photochemistry and Photobiology*, 1979, **30**, 533-539.
- [79] R.A. Engh, L.X.Q. Chen und G.R. Fleming, Conformation dynamics of tryptophan: a proposal for the origin of the non-exponential fluorescence decay, *Chemical Physics Letters*, 1986, **126**, 365-372.
- [80] H. Edelhoich, R.L. Perlman und M. Wilchek, Fluorescence Studies with Tyrosyl Peptides, *Biochemistry*, 1968, **7**, 3893-3900.
- [81] R.W. Cowgill, Fluorescence and Protein Structure: Fluorescence Quenching by disulfide and sulfhydryl groups, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1967, **140**, 37-44.
- [82] M. Van Gilst und B.S. Hudson, Histidine-tryptophan interactions in T4 lysozyme: 'Anomalous' pH dependence of fluorescence, *Biophysical Chemistry*, 1996, **63**, 17-25.
- [83] R.F. Steiner und E.P. Kirby, The Interaction of the Ground and Excited States of Indole Derivatives with Electron Scavengers, *Journal of Physical Chemistry*, 1969, **73**, 4130-4135.
- [84] T.A. Wells, M. Nakazawa, K. Manabe und P.S. Song, A conformational change associated with the phototransformation of pisum phytochrome-a as probed by fluorescence quenching, *Biochemistry*, 1994, **33**, 708-712.
- [85] B. Rost, C. Sander und R. Schneider, PHD - An Automatic Mail Server for Protein Secondary Structure Prediction, *Computer Applications in the Biosciences*, 1994, **10**, 53-60.
- [86] A. Finazzi-Agro, C. Giovagno, L. Aviglian, G. Rotilio und B. Mondovi, Luminescence quenching in azurin, *European Journal of Biochemistry*, 1973, **34**, 20-24.
- [87] E.A. Burstein, N.S. Vedenkina und M.N. Ivkova, Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochemistry and Photobiology*, 1973, **18**, 263-279.
- [88] S. Schlesinger, The effect of amino acid analogues on alkaline phosphate formation in *Escherichia coli* K-12, *Journal of Biological Chemistry*, 1968, **243**, 3877-3883.

- 
- [89] Y. Chen, R.L. Rich, F. Gai und J.W. Petrich, Fluorescent species of 7-azaindole and 7-azatryptophan in water, *Journal of Physical Chemistry*, 1993, **97**, 1770-1780.
- [90] Y. Chen, F. Gai und J.W. Petrich, Single-exponential decay of the nonnatural amino-acid 7-azatryptophan and the nonexponential fluorescence decay of tryptophan in water, *Journal of Physical Chemistry*, 1994, **98**, 2203-2209.
- [91] A.V. Smirnov, D.S. English, R.L. Rich, J. Lane, L. Teyton, A.W. Schwabacher, S. Luo, R.W. Thornburg und J.W. Petrich, Photophysics and biological applications of 7-azaindole and its analogs, *Journal of Physical Chemistry B*, 1997, **101**, 2758-2769.
- [92] J. Guharay, B. Sengupta und P.K. Sengupta, An assessment of the usefulness of 5-hydroxytryptophan as an optical probe, *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1998, **54**, 185-190.
- [93] G.R. Moran und P.F. Fitzpatrick, A continuous fluorescence assay for tryptophan hydroxylase, *Analytical Biochemistry*, 1999, **266**, 148-152.
- [94] C.W.V. Hogue und A.G. Szabo, Characterization of aminoacyl-adenylates in bacillus-subtilis tryptophanyl-transfer RNA-synthase, by the fluorescence of tryptophan analogs 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan, *Biophysical Chemistry*, 1993, **48**, 159-169.
- [95] L.E. Steward, C.S. Collins, M.A. Gilmore, J.E. Carlson, J.B.A. Ross und A.R. Chamberlin, In vitro site-specific incorporation of fluorescent probes into beta-galactosidase, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, **119**, 6-11.
- [96] C.S. Farah und F.C. Reinach, Regulatory properties of recombinant tropomyosins containing 5- hydroxytryptophan: Ca<sup>2+</sup>-binding to troponin results in a conformational change in a region of tropomyosin outside the troponin binding site, *Biochemistry*, 1999, **38**, 10543-10551.
- [97] K. Das, K.D. Ashby, A.V. Smirnov, F.C. Reinach, J.W. Petrich und C.S. Farah, Fluorescence properties of recombinant tropomyosin containing tryptophan, 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan, *Photochemistry and Photobiology*, 1999, **70**, 719-730.
- [98] C.W.V. Hogue, S. Doublet, H. Xue, J.T. Wong, C.W. Carter und A.G. Szabo, A concerted tryptophanyl-adenylate-dependent conformational change in *Bacillus subtilis* tryptophanyl-tRNA synthetase revealed by the fluorescence of Trp92, *Journal of Molecular Biology*, 1996, **260**, 446-466.

- 
- [99] J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin und E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111**, 8013-8014.
- [100] E.A. Burstein, S.M. Abornev und Y.K. Reshetnyak, Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms, *Biophysical Journal*, 2001, **81**, 1699-1709.
- [101] E.A. Burstein und V.I. Emelyanenko, Log-normal description of fluorescence spectra of organic fluorophores, *Photochemistry and Photobiology*, 1996, **64**, 316-320.
- [102] J.R. Lakowicz und G. Weber, Quenching of Fluorescence by Oxygen. A Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules, *Biochemistry*, 1973, **12**, 4161-4170.
- [103] C.N. Pace, B.A. Shirley und J.A. Thomson, Measuring the conformational stability of a protein, in: *Protein Structure - a practical approach*, Band 1 (Ed. E. D. Creighton), IRL Press, New York, 1989.
- [104] M. Letzgus, AES-Control, 2003.
- [105] A. Bülter, AES-Eval, 2003.
- [106] A. Bülter, M. Letzgus und A. Brockhinke, WinImgeval, 2003.
- [107] A. Sillen und Y. Engelborghs, The correct use of "average" fluorescence parameters, *Photochemistry and Photobiology*, 1998, **67**, 475-486.
- [108] J. Reader, C.J. Sansonetti und J.M. Bridges, Irradiances of spectral lines in mercury pencil lamps, *Applied Optics*, 1996, **35**, 78-83.
- [109] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley und T. Gray, How to Measure and Predict the Molar Absorption-Coefficient of A Protein, *Protein Science*, 1995, **4**, 2411-2423.
- [110] C.Y. Wong und M.R. Eftink, Incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease: Stability toward thermal and guanidine-HCl induced unfolding, *Biochemistry*, 1998, **37**, 8947-8953.
- [111] G.R. Moran, R.S. Phillips und P.F. Fitzpatrick, Influence of steric bulk and electrostatics on the hydroxylation regioselectivity of tryptophan hydroxylase: Characterization of methyltryptophans and azatryptophans as substrates, *Biochemistry*, 1999, **38**, 16283-16289.

- [112] S.S. Lehrer, Solute perturbation of protein fluorescence - quenching of tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion, *Biochemistry*, 1971, **10**, 3254-3260.
- [113] E. Rust, D.L. Martin und C.H. Chen, Cofactor and tryptophan accessibility and unfolding of brain glutamate decarboxylase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, **392**, 333-340.
- [114] F.W.J. Teale und G. Weber, Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids, *Biochemical Journal*, 1957, **65**, 476-482.
- [115] A. White, Effect of pH on Fluorescence of Tyrosine, Tryptophan and Related Compounds, *Biochemical Journal*, 1959, **71**, 217-220.
- [116] J.R. Platt, Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons, *Journal of Chemical Physics*, 1949, **17**, 489-495.
- [117] E.A. Burstein, E.A. Permyakov, V.A. Yashin, S.A. Burkhanov und A.F. Agro, Fine-Structure of Luminescence Spectra of Azurin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1977, **491**, 155-159.
- [118] J. Eisinger und G. Navon, Fluorescence quenching and isotope effect of tryptophan, *Journal of Chemical Physics*, 1969, **50**, 2069-2077.
- [119] M.D. She, W.J. Dong, P.K. Umeda und H.C. Cheung, Tryptophan mutants of troponin C from skeletal muscle - An optical probe of the regulatory domain, *European Journal of Biochemistry*, 1998, **252**, 600-607.
- [120] O.M. Kumar und M.K. Machwe, Fluorescence of tryptophan in solvents of varying dipole moments, *Indian Journal of Pure & Applied Physics*, 1985, **23**, 155-157.
- [121] W.X. Balcavage und T. Alvager, Fluorescence Lifetime of Tryptophan and Proteins, *Molecular Photochemistry*, 1976, **7**, 309-323.
- [122] G.S. Beddard, G.R. Fleming, G. Porter und R.J. Robbins, Time-resolved fluorescence from biological systems. Tryptophan and simple peptides, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A - Mathematical & Physical Sciences*, 1980, **298**, 321-334.
- [123] D.M. Rayner und A.G. Szabo, Time Resolved Fluorescence of Aqueous Tryptophan, *Canadian Journal of Chemistry - Revue Canadienne de Chimie*, 1978, **56**, 743-745.

- [124] R.W.W. Vanresandt, R.H. Vogel und S.W. Provencher, Double Beam Fluorescence Lifetime Spectrometer with Sub-Nanosecond Resolution - Application to Aqueous Tryptophan, *Review of Scientific Instruments*, 1982, **53**, 1392-1397.
- [125] Y. Chen, F. Gai und J.W. Petrich, Solvation of 7-azaindole in alcohols and water - evidence for concerted, excited-state, double proton transfer in alcohols, *Journal of the American Chemical Society*, 1993, **115**, 10158-10166.
- [126] K. Lotte, R. Plessow und A. Brockhinke, Static and time-resolved fluorescence investigations of tryptophan analogues - a solvent study, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2004, **3**, 348-359.
- [127] K. Guzow, M. Szabelski, J. Malicka und W. Wiczak, Synthesis of a new, highly fluorescent amino acid derivative: N-[(tert-butoxy)carbonyl]-3-[2-(1H-indol-3-yl)benzoxazol-5-yl]- L-alanine methyl ester, *Helvetica Chimica Acta*, 2001, **84**, 1086-1092.
- [128] A.C. Borin und L. Serrano-Andres, A theoretical study of the absorption spectra of indole and its analogs: indene, benzimidazole, and 7-azaindole, *Chemical Physics*, 2000, **262**, 253-265.
- [129] J. Catalan, P. Perez und A.U. Acuna, Indole Spectroscopy - the Location of the  $^1L_a$  and  $^1L_b$  Electronic States and the Absorption-Spectrum, *Journal of Molecular Structure*, 1986, **142**, 179-182.
- [130] B. Sengupta, J. Guharay und P.K. Sengupta, Luminescence behaviour of 5-hydroxyindole in different environments, *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2000, **56**, 1213-1221.
- [131] L.S. Slater und P.R. Callis, Molecular-orbital theory of the  $^1L_a$  and  $^1L_b$  states of indole. 2. an ab-initio study, *Journal of Physical Chemistry*, 1995, **99**, 8572-8581.
- [132] J. Catalan und C. Diaz, First reported evidence that solvent polarity induces an  $^1L_b \leftrightarrow ^1L_a$  inversion in the indole chromophore, *Chemical Physics Letters*, 2003, **368**, 717-723.
- [133] M.R. Eftink, L.A. Selvidge, P.R. Callis und A.A. Rehms, Photophysics of Indole-Derivatives - Experimental Resolution of  $L_a$  and  $L_b$  Transitions and Comparison with Theory, *Journal of Physical Chemistry*, 1990, **94**, 3469-3479.
- [134] L. Serrano-Andres, M. Merchan, A.C. Borin und J. Stalring, Theoretical studies on the spectroscopy of the 7-azaindole monomer and dimer, *International Journal of Quantum Chemistry*, 2001, **84**, 181-191.

- [135] C.F. Chapman und M. Maroncelli, Excited-state tautomerization of 7-azaindole in water, *Journal of Physical Chemistry*, 1992, **96**, 8430-8441.
- [136] M.R. Eftink, Y.W. Jia, D. Hu und C.A. Ghiron, Fluorescence quenching studies with tryptophan analogs - excited-state interactions involving the side-chain amino group, *Journal of Physical Chemistry*, 1995, **99**, 5713-5723.
- [137] E. Lippert, Dipolmoment und Elektronenstruktur von angeregten Molekülen, *Zeitschrift für Naturforschung Part A - Astrophysik, Physik und Physikalische Chemie*, 1955, **10**, 541-545.
- [138] E. Lippert, Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrberechtigung (Venia Legendi) für das Fach Physikalische Chemie an der Technischen Hochschule Stuttgart - Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand, *Zeitschrift für Elektrochemie*, 1957, **61**, 962-975.
- [139] S. Callaci und T. Heyduk, Conformation and DNA binding properties of a single-stranded DNA binding region of sigma(70) subunit from Escherichia coli RNA polymerase are modulated by an interaction with the core enzyme, *Biochemistry*, 1998, **37**, 3312-3320.
- [140] M.K. Greene, N.K. Steede und S.J. Landry, Domain-specific spectroscopy of 5-hydroxytryptophan-containing variants of Escherichia coli DnaJ, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, **1480**, 267-277.
- [141] G. Noctor und C.H. Foyer, Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, **49**, 249-279.
- [142] K.J. Dietz, F. Horling, J. König und M. Baier, The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation, *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53**, 1321-1329.
- [143] M. Baier und K.J. Dietz, Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic Arabidopsis, *Plant Physiology*, 1999, **119**, 1407-1414.
- [144] N. Rouhier und J.P. Jacquot, Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes, *Photosynthesis Research*, 2002, **74**, 259-268.
- [145] K.J. Dietz, Plant peroxiredoxins, *Annual Review of Plant Biology*, 2003, **54**, 93-107.

- [146] R. Chauhan und S.C. Mande, Characterization of the Mycobacterium tuberculosis H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity, *Biochemical Journal*, 2001, **354**, 209-215.
- [147] E. Schröder, J.A. Littlechild, A.A. Lebedev, N. Errington, A.A. Vagin und M.N. Isupov, Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 angstrom resolution, *Structure*, 2000, **8**, 605-615.
- [148] Z.A. Wood, L.B. Poole, R.R. Hantgan und P.A. Karplus, Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2- cysteine peroxiredoxins, *Biochemistry*, 2002, **41**, 5493-5504.
- [149] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov und P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**, 235-242. (<http://www.rcsb.org/pdb/>)
- [150] S.F. Altschul, W. Gish, E.W. Myers, W. Miller und D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 1990, **215**, 403-410. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- [151] C. Combet, C. Blanchet, C. Geourjon und G. Deléage, NPS@: Network Protein Sequence Analysis, *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, **25**, 147-150. (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>)
- [152] D. Milburn, R. Laskowski und J. Thornton, Sequences annotated by structure: a tool to facilitate the use of structural information in sequence analysis, *Protein Engineering*, 1998, **11**, 855-859. (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/sas/>)
- [153] S. Hirotsu, Y. Abe, K. Okada, N. Nagahara, H. Hori, T. Nishino und T. Hakoshima, Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**, 12333-12338.
- [154] M.S. Alpey, C.S. Bond, E. Tetaud, A.H. Fairlamb und W.N. Hunter, The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins, *Journal of Molecular Biology*, 2000, **300**, 903-916.
- [155] J. König, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, M. Baier und K.J. Dietz, Reaction Mechanism of Plant 2-Cys Peroxiredoxin: role of the C terminus and the quaternary structure, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 24409-24420.
- [156] E.M. Storch, J.S. Grinstead, A.P. Campbell, V. Daggett und W.M. Atkins, Engineering out motion: A surface disulfide bond alters the mobility of tryptophan 22

- in cytochrome b(5) as probed by time-resolved fluorescence and  $^1\text{H-NMR}$  experiments, *Biochemistry*, 1999, **38**, 5065-5075.
- [157] P. Dolashka-Angelova, S. Stoeva und W. Voelter, Spectroscopic properties of a novel neutral proteinase from *Saccharomonospora canescens*, *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology*, 2000, **125**, 11-19.
- [158] J. Schütz, P. Dolashka-Angelova, R. Abrashev, P. Nicolov und W. Voelter, Isolation and spectroscopic characterization of the structural subunits of keyhole limpet hemocyanin, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2001, **1546**, 325-336.
- [159] T. Fox, L. Ferreira-Rajabi, B.C. Hill und A.M. English, Quenching of intrinsic fluorescence of yeast cytochrome-c peroxidase by covalently-bound and noncovalently-bound quenchers, *Biochemistry*, 1993, **32**, 6938-6943.
- [160] R.C. Augusteyn, K.P. Ghiggino und T. Putilina, Studies in the location of aromatic amino acids in alpha-crystallin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, **1162**, 61-71.
- [161] A.K. Sau, C.A. Chen, J.A. Cowan, S. Mazumdar und S. Mitra, Steady-state and time-resolved fluorescence studies on wild type and mutant *Chromatium vinosum* high potential iron proteins: Holo- and apo-forms, *Biophysical Journal*, 2001, **81**, 2320-2330.
- [162] J. König, M. Baier, F. Horling, U. Kahmann, G. Harris, P. Schurmann und K.J. Dietz, The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**, 5738-5743.
- [163] J. Hennecke, A. Sillen, M. Huber-Wunderlich, Y. Engelborghs und R. Glockshuber, Quenching of tryptophan fluorescence by the active-site disulfide bridge in the DsbA protein from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 1997, **36**, 6391-6400.
- [164] J. Barber, Photosystem II: the engine of life, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2003, **36**, 71-89.
- [165] T.M. Bricker, Oxygen Evolution in the Absence of the 33-Kilodalton Manganese-Stabilizing Protein, *Biochemistry*, 1992, **31**, 4623-4628.
- [166] Q. Xu, J. Nelson und T.M. Bricker, Secondary Structure of the 33 kDa, Extrinsic Protein of Photosystem-II - A Far-UV Circular-Dichroism Study, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1994, **1188**, 427-431.

- [167] T. Kuwabara und N. Murata, Purification and Characterization of 33 Kilodalton Protein of Spinach-Chloroplasts, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1979, **581**, 228-236.
- [168] T. Ono und Y. Inoue, Reconstitution of Photosynthetic Oxygen Evolving Activity by Rebinding of 33 kDa Protein to CaCl<sub>2</sub>-Extracted Ps-Ii Particles, *Febs Letters*, 1984, **166**, 381-384.
- [169] T. Kuwabara, M. Miyao, T. Murata und N. Murata, The Function of 33 kDa Protein in the Photosynthetic Oxygen-Evolution System Studied by Reconstitution Experiments, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, **806**, 283-289.
- [170] H. Ohoka, S. Tanaka, K. Wada, T. Kuwabara und N. Murata, Complete Amino-Acid-Sequence of 33-Kda Protein Isolated from Spinach Photosystem-II Particles, *Febs Letters*, 1986, **197**, 63-66.
- [171] S. Tanaka und K. Wada, The Status of Cysteine Residues in the Extrinsic 33 kDa Protein of Spinach Photosystem-Ii Complexes, *Photosynthesis Research*, 1988, **17**, 255-266.
- [172] I.Z. Zubrzycki, L.K. Frankel, P.S. Russo und T.M. Bricker, Hydrodynamic studies on the manganese-stabilizing protein of photosystem II, *Biochemistry*, 1998, **37**, 13553-13558.
- [173] T. Shutova, A. Villarejo, B. Zietz, V. Klimov, T. Gillbro, G. Samuelsson und G. Renger, Comparative studies on the properties of the extrinsic manganese-stabilizing protein from higher plants and of a synthetic peptide of its C-terminus, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2003, **1604**, 95-104.
- [174] A. Zouni, H.T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger und P. Orth, Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 angstrom resolution, *Nature*, 2001, **409**, 739-743.
- [175] Q. Xu und T.M. Bricker, Structural Organization of Proteins on the Oxidizing Side of Photosystem-II - 2 Molecules of the 33 kDa Manganese-Stabilizing Proteins Per Reaction Center, *Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**, 25816-25821.
- [176] H. Popelkova, M.M. Im und C.F. Yocum, N-terminal truncations of manganese stabilizing protein identify two amino acid sequences required for binding of the eukaryotic protein to photosystem II and reveal the absence of one binding-related sequence in cyanobacteria, *Biochemistry*, 2002, **41**, 10038-10045.

- [177] N. Lydakis-Simantiris, R.S. Hutchison, S.D. Betts, B.A. Barry und C.F. Yocum, Manganese stabilizing protein of photosystem II is a thermostable, natively unfolded polypeptide, *Biochemistry*, 1999, **38**, 404-414.
- [178] P.H. Weinreb, W.G. Zhen, A.W. Poon, K.A. Conway und P.T. Lansbury, NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded, *Biochemistry*, 1996, **35**, 13709-13715.
- [179] T. Shutova, K.D. Irrgang, V.V. Klimov und G. Renger, Is the manganese stabilizing 33 kDa protein of photosystem II attaining a 'natively unfolded' or 'molten globule' structure in solution?, *Febs Letters*, 2000, **467**, 137-140.
- [180] Barber, J. und Nield, J., <http://www.bio.ic.ac.uk/research/barber/index.html>, Wolfson Laboratories, Department of Biological Sciences, Imperial College London, 2003.
- [181] J. las Rivas und P. Heredia, Structural predictions on the 33 kDa extrinsic protein associated to the oxygen evolving complex of photosynthetic organisms, *Photosynthesis Research*, 1999, **61**, 11-21.
- [182] M. Sonoyama, A. Motoki, G. Okamoto, M. Hirano, H. Ishida und S. Katoh, Secondary structure and thermostability of the photosystem II manganese-stabilizing protein of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1996, **1297**, 167-170.
- [183] T. Shutova, K.D. Irrgang, V.V. Klimov und G. Renger, Is the manganese stabilizing 33 kDa protein of photosystem II attaining a 'natively unfolded' or 'molten globule' structure in solution?, *Febs Letters*, 2000, **467**, 137-140.
- [184] F. Pazos, P. Heredia, A. Valencia und J. las Rivas, Threading structural model of the manganese-stabilizing protein PsbO reveals presence of two possible beta-sandwich domains, *Proteins - Structure Function and Genetics*, 2001, **45**, 372-381.
- [185] R.B. Russell, P.D. Sasiени und M.J.E. Sternberg, Supersites within superfolds. Binding site similarity in the absence of homology, *Journal of Molecular Biology*, 1998, **282**, 903-918.
- [186] L.X. Zhang, H.G. Liang, J. Wang, W.R. Li und T.Z. Yu, Fluorescence and Fourier-transform infrared spectroscopic studies on the role of disulfide bond in the calcium binding in the 33 kDa protein of photosystem II, *Photosynthesis Research*, 1996, **48**, 379-384.

- [187] T.M. Bricker und L.K. Frankel, The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of Photosystem II: A critical assessment, *Photosynthesis Research*, 1998, **56**, 157-173.
- [188] M. VanGilst und B.S. Hudson, Histidine-tryptophan interactions in T4 lysozyme: 'Anomalous' pH dependence of fluorescence, *Biophys. Chem.*, 1996, **63**, 17-25.
- [189] A. Grinvald, J. Schlessinger, I. Pecht und I.Z. Steinberg, Homogeneity and Variability in Structure of Azurin Molecules Studied by Fluorescence Decay and Circular-Polarization, *Biochemistry*, 1975, **14**, 1921-1929.
- [190] N. Rosato, G. Mei, I. Savini, F. Delbolgia, A. Finazzi-Agro, A. Lommen und G.W. Canters, Intrinsic Fluorescence of the Bacterial Copper-Containing Protein Amicyanin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991, **284**, 112-115.
- [191] C. Hammann, A. Messerschmidt, R. Huber, H. Nar, G. Gilardi und G.W. Canters, X-ray crystal structure of the two site-specific mutants Ile7Ser and Phe110Ser of azurin from *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Molecular Biology*, 1996, **255**, 362-366.
- [192] R. Mallinson, R. Carter und C.A. Ghiron, Acrylamide quenching studies with azurin B, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1981, **671**, 117-122.
- [193] M.R. Eftink und C.A. Ghiron, Exposure of tryptophanyl residues in proteins - quantitative determination by fluorescence quenching studies, *Biochemistry*, 1976, **15**, 672-680.
- [194] C. Tanford, Protein Denaturation - Part C.: Theoretical Models for the Mechanisms of Denaturation, in: *Advances in Protein Chemistry*, Band 24 (Ed. C. B. jr. Anfinsen, J. T. Edsall und F. M. Richards), Academic Press, New York, London, 1970.
- [195] A.C. Clark, J.F. Sinclair und T.O. Baldwin, Folding of Bacterial Luciferase Involves A Nonnative Heterodimeric Intermediate in Equilibrium with the Native Enzyme and the Unfolded Subunits, *Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**, 10773-10779.
- [196] D. Sarkar und C. DasGupta, Characterization of a molten globule intermediate during GdnHCl-induced unfolding of RTEM beta-lactamase from *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1996, **1296**, 85-94.
- [197] P. Wojciak, A. Mazurkiewicz, A. Bakalova und R. Kuciel, Equilibrium unfolding of dimeric human prostatic acid phosphatase involves an inactive monomeric intermediate, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003, **32**, 43-54.

- 
- [198] S. Omar und M. Beauregard, Dissociation and Unfolding of Jack Bean Urease Studied by Fluorescence Emission-Spectroscopy, *Journal of Biotechnology*, 1995, **39**, 221-228.
- [199] S. Tanaka, Y. Kawata, K. Wada und K. Hamaguchi, Extrinsic 33-Kilodalton Protein of Spinach Oxygen-Evolving Complexes - Kinetic-Studies of Folding and Disulfide Reduction, *Biochemistry*, 1989, **28**, 7188-7193.
- [200] S. Godbole, A.C. Dong, K. Garbin und B.E. Bowler, A lysine 73->histidine variant of yeast iso-1-cytochrome c: Evidence for a native-like intermediate in the unfolding pathway and implications for m value effects, *Biochemistry*, 1997, **36**, 119-126.
- [201] M. Ogawa, R. Miyagi, T. Tamiya und T. Tsuchiya, Comparison of the stability of fish light meromyosins by guanidine hydrochloride denaturation, *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology*, 1999, **122**, 439-446.
- [202] E. Zerovnik, V. Janjic, A. Francky und B. Mozetic-Francky, Equilibrium and transient intermediates in folding of human macrophage migration inhibitory factor, *European Journal of Biochemistry*, 1999, **260**, 609-618.
- [203] J.A.T. Hornby, J.K. Luo, J.M. Stevens, L.A. Wallace, W. Kaplan, R.N. Armstrong und H.W. Dirr, Equilibrium folding of dimeric class mu glutathione transferases involves a stable monomeric intermediate, *Biochemistry*, 2000, **39**, 12336-12344.
- [204] I. DalleDonne, A. Milzani und R. Colombo, The tert-butyl hydroperoxide-induced oxidation of actin Cys-374 is coupled with structural changes in distant regions of the protein, *Biochemistry*, 1999, **38**, 12471-12480.
- [205] J.K. Grimsley, J.M. Scholtz, C.N. Pace und J.R. Wild, Organophosphorus hydrolase is a remarkably stable enzyme that unfolds through a homodimeric intermediate, *Biochemistry*, 1997, **36**, 14366-14374.
- [206] F. Edwin und M.V. Jagannadham, Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, **1479**, 69-82.
- [207] S. Bettati, B. Campanini, S. Vaccari, A. Mozzarelli, G. Schianchi, T.L. Hazlett, E. Gratton und S. Benci, Unfolding of pyridoxal 5'-phosphate-dependent O-acetylserine sulfhydrylase probed by time-resolved tryptophan fluorescence, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2002, **1596**, 47-54.

- [208] L.L. Zheng, C.W.V. Hogue und J.D. Brennan, Effects of metal binding affinity on the chemical and thermal stability of site-directed mutants of rat oncomodulin, *Biophysical Chemistry*, 1998, **71**, 157-172.
- [209] J. Leckner, N. Bonander, P. Wittung-Stafshede, B.G. Malmstrom und B.G. Karlsson, The effect of the metal ion on the folding energetics of azurin, a comparison of the native, zinc and apoprotein, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1997, **1342**, 19-27.
- [210] Y.H. Kim, D.M. Kapfer, J. Boekhorst, N.H. Lubsen, H.P. Bachinger, T.R. Shearer, L.L. David, J.B. Feix und K.J. Lampi, Deamidation, but not truncation, decreases the urea stability of a lens structural protein, beta B1-crystallin, *Biochemistry*, 2002, **41**, 14076-14084.
- [211] A.G. Szabo, T.M. Stepanik, D.M. Wayner und N.M. Young, Conformational Heterogeneity of the Copper-Binding Site in Azurin - A Time-Resolved Fluorescence Study, *Biophysical Journal*, 1983, **41**, 233-244.
- [212] M.P. Bemquerer, C. Bloch, H.F. Brito, E.E.S. Teotonio und M.T.M. Miranda, Steady-state luminescence investigation of the binding of Eu(III) and Tb(III) ions with synthetic peptides derived from plant thionins, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, **91**, 363-370.
- [213] Y.T. Yang, Q.D. Su, H.Z. Zhao und G.W. Zhao, Photoacoustic spectra of complexes of tryptophan with Sm(III), Tb(III) and Dy(III), *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1998, **54**, 645-649.
- [214] W.D. Kohn, C.M. Kay und R.S. Hodges, Effects of lanthanide binding on the stability of de novo designed alpha-helical coiled-coils, *Journal of Peptide Research*, 1998, **51**, 9-18.
- [215] N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, de Gruyter, Berlin, New York, 1995.
- [216] I. Bougie, S. Charpentier und M. Bisailon, Characterization of the metal ion binding properties of the hepatitis C virus RNA polymerase, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 3868-3875.
- [217] M. Bisailon und I. Bougie, Investigating the role of metal ions in the catalytic mechanism of the yeast RNA triphosphatase, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 33963-33971.

- [218] K. Depina, C. Navarro, L. McWalter, D.H. Boxer, N.C. Price, S.M. Kelly, M.A. Mandrandberthelot und L.F. Wu, Purification and Characterization of the Periplasmic Nickel-Binding Protein Nika of Escherichia-Coli K12, *European Journal of Biochemistry*, 1995, **227**, 857-865.
- [219] O.S. Kwon und J.E. Churchich, Binding of the activating ion Co(II) to myo-inositol monophosphatase monitored by fluorescence and phosphorescence spectroscopy, *Journal of Protein Chemistry*, 1997, **16**, 1-9.
- [220] M.H. Valladares, A. Felici, G. Weber, H.W. Adolph, M. Zeppezauer, G.M. Rossolini, G. Amicosante, J.M. Frere und M. Galleni, Zn(II) dependence of the Aeromonas hydrophila AE036 metallo-beta-lactamase activity and stability, *Biochemistry*, 1997, **36**, 11534-11541.
- [221] E. Persson und L.C. Petersen, Structurally and Functionally Distinct Ca<sup>2+</sup> Binding-Sites in the Gamma-Carboxyglutamic Acid-Containing Domain of Factor VIIa, *European Journal of Biochemistry*, 1995, **234**, 293-300.
- [222] M.H. Abraham, P.L. Grellier, J.L.M. Abboud, R.M. Doherty und R.W. Taft, Solvent Effects in Organic-Chemistry - Recent Developments, *Canadian Journal of Chemistry - Revue Canadienne de Chimie*, 1988, **66**, 2673-2686.

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706