

Zur Kooperativität des Vogelspinnen- Hämocyanins: Untersuchungen am Ensemble und an Einzel-Molekülen

Dissertation zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

Fachbereich Biologie

Johannes Gutenberg – Universität, Mainz

Wolfgang Erker

geb. in Frankfurt / Main

Mainz, September 2001

Tag der mündlichen Prüfung 21. Jan 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Allgemeine Einführung	3
2.1. Kooperativer O ₂ -Transport	3
2.1.1. Atmungsproteine	3
2.1.2. Beschreibung von Kooperativität	5
2.2. Hämocyane	8
2.2.1. Übersicht	8
2.2.2. Ausgewählte Hämocyane	11
2.3. Zielsetzung	12
3. Material	15
3.1. Bezugsquellen	15
3.1.1. Chemikalien	15
3.1.2. Geräte	16
3.2. Hämocyane	17
3.2.1. <i>Eurypelma californicum</i>	18
3.2.2. <i>Panulirus interruptus</i>	19
4. Beladung - Ensemble	21
4.1. Einleitung	21
4.1.1. Ziele	21
4.1.2. Beladungssignale	21
4.1.3. Förster-Transfer	23

4.2. Methoden	25
4.2.1. Einstellen der O ₂ -Beladung	25
4.2.2. Spektroskopie	26
4.2.3. Abstände innerhalb der Hämocyanine	27
4.3. Ergebnisse	27
4.3.1. Erweiterung der Theorie	27
4.3.2. Fehlerabschätzung	30
4.3.3. Ausgangsgrößen	31
4.3.4. Theoretische Betrachtung	35
4.3.5. Klasseneinteilung der Tryptophane	38
4.3.6. Einfluß der Beweglichkeit	43
4.3.7. Einfluß der Oligomerisierung	44
4.4. Diskussion	48
4.4.1. Förster-Transfer im Ensemble	48
4.4.2. Hämocyanin der Vogelspinne	48
4.4.3. Hämocyanin der Languste	51
4.4.4. Einfluß der Beweglichkeit	52
4.4.5. Einfluß der Oligomerisierung	54
4.4.6. Verallgemeinerung	57
4.4.7. Kommentar zu Ricchelli <i>et al.</i> (1987)	59

5. Konformation - Ensemble 63

5.1. Einleitung	63
5.1.1. Nachweis verschiedener Konformationen	63
5.1.2. Ziele	64
5.1.3. Modifikation von Proteinen	65
5.1.4. Quervernetzung von Hämocyaninen	67
5.2. Methoden	70
5.2.1. Quervernetzung	70
5.2.2. Elektrophorese	70
5.2.3. O ₂ -Bindung	73
5.2.4. Spektroskopie	74
5.2.5. Elektronen-Mikroskopie	74
5.3. Ergebnisse	75
5.3.1. Chemische Vernetzung von Hämocyanin	75
5.3.2. Charakterisierung der Funktion	80
5.3.3. Charakterisierung der Struktur	83

5.4. Diskussion	94
5.4.1. Quervernetzung des Hämocyanins	94
5.4.2. Funktion vernetzter Hämocyanine	95
5.4.3. Realisierung verschiedener Affinitäten	97
5.4.4. Struktur vernetzter Hämocyanine	102
5.4.5. Ausblick	104
6. Beladung - Einzel-Moleküle	107
6.1. Einleitung	107
6.1.1. Ziele	107
6.1.2. Spektroskopie einzelner Proteine	107
6.1.3. Zwei-Photonen-Anregung	108
6.1.4. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie	112
6.1.5. Photostabilität	113
6.1.6. FluoSpheres	114
6.2. Methoden	115
6.2.1. Spektroskopie	115
6.2.2. O ₂ -Bindung	117
6.2.3. UV-Bestrahlung	117
6.2.4. Gel-Elektrophorese	117
6.2.5. Fluoreszenz-Markierung	118
6.2.6. Immobilisierung	118
6.3. Ergebnisse	119
6.3.1. Vergleich von Ein- und Zwei-Photonen-Anregung	119
6.3.2. Photostabilität qualitativ	124
6.3.3. Modelle zur Photostabilität	128
6.3.4. Photostabilität quantitativ	132
6.3.5. Abbildung von Einzel-Molekülen	135
6.3.6. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie	139
6.4. Diskussion	142
6.4.1. Zwei-Photonen-Anregung	142
6.4.2. Photostabilität	143
6.4.3. Abbildung von Einzel-Molekülen	147
6.4.4. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie	149
6.4.5. Ausblick	150

7. Konformation - Einzel-Moleküle **151**

7.1. Einleitung	151
7.1.1. Atomare Kraft-Mikroskopie	151
7.1.2. Abbildung von Proteinen	152
7.1.3. Immobilisierung	153
7.1.4. Ziele	155
7.2. Methoden	155
7.2.1. Immobilisierung	155
7.2.2. Mikroskopie	156
7.3. Ergebnisse	157
7.3.1. Messungen in Lösung	157
7.3.2. Messungen an Luft	160
7.4. Diskussion	162
7.4.1. Niedrige Reaktivität	162
7.4.2. Hohe Reaktivität	163
7.4.3. Moderate Reaktivität	165
7.4.4. Ausblick	166

8. Ausblick **167**

9. Literatur **171**

Abkürzungsverzeichnis **191**

Danksagung **195**

Lebenslauf **197**

1. Zusammenfassung

Die Transport-Eigenschaften von Atmungsproteinen werden durch kooperatives Bindungsverhalten optimiert. Kooperativität bedeutet eine Änderung der O₂-Affinität während der Bindung und läßt sich durch die Wechselbeziehung zwischen O₂-Beladung und Konformation beschreiben.

In dieser Arbeit wurde das 24-mer Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* bzgl. Beladung und Konformationen charakterisiert. Die Messungen wurden jeweils auf der Ensemble- und Einzel-Molekül-Ebene durchgeführt und lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Ensemble

Die Beladung von Hämocyaninen mit O₂ läßt sich über ein Absorptions- und ein Fluoreszenz-Signal verfolgen. Die Natur des zweiten Signals wurde theoretisch und experimentell analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß (1) die Fluoreszenz-Löschung, die bei der Bindung von O₂ auftritt, vollständig durch Förster-Transfer erklärt werden kann, (2) der Einfluß der Konformation dabei vernachlässigbar ist und (3) auch die Oligomerisierung keinen Einfluß auf die Löschung hat.

Die Konformation von Hämocyaninen konnte mit Crosslinkern im oxy- und deoxy-Zustand fixiert werden. Die Ergebnisse führen zu einer neuen Vorstellung der Realisierung von Affinität. Danach handelt es sich nicht um eine statische Eigenschaft, die durch die Konformation des aktiven Zentrums festgelegt ist, sondern um einen dynamischen Prozess, bei dem Affinität durch den Wechsel zwischen zwei Konformationen der Protein-Matrix realisiert wird.

Einzel-Moleküle

Es gelang erstmalig, einzelne Proteine über ihre intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz nachzuweisen. In unserem Fall waren dies Hämocyanine. Hierzu wurde der nicht-lineare Prozess der Zwei-Photonen-Anregung genutzt. Die spektroskopischen Eigenschaften der Tryptophan-Fluoreszenz blieben dabei gegenüber der klassischen Ein-Photonen-Anregung unverändert. Die Intensität pro Molekül war für eine Abbildung zu gering. Jedoch reichte sie für die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie aus, um individuelle Hämocyanin-Moleküle detektieren und deren Diffusionskoeffizienten bestimmen zu können.

Die Abbildung einzelner Hämocyanin-Moleküle gelang dagegen mit Hilfe der Atomaren Kraft-Mikroskopie (AFM). Die Proteine konnten durch Adsorption und mildes Eintrocknen so immobilisiert werden, daß ihre native Struktur erhalten blieb, sie aber dennoch hinreichend fest an die Oberfläche gebunden waren. Dadurch ließen sich Bilder guter Qualität erhalten, bei denen die Hexamere innerhalb der 4x6-meren Struktur aufgelöst werden konnten.

2. Allgemeine Einführung

2.1. Kooperativer O₂-Transport

2.1.1. Atmungsproteine

Unter den O₂-Transport-Proteinen des Tierreiches existiert nicht die große Vielfalt, die man erwarten sollte. Bei allen Atmungsproteinen wird der Sauerstoff reversibel über Metallatome gebunden, wobei die Natur nur die Elemente Fe und Cu nutzt (Tab. 2.1). Mit diesen zwei Elementen haben sich vier verschiedene Typen von aktiven Zentren entwickelt. Die Metallatome werden dabei entweder über eine prosthetische Gruppe (Porphyrin-Ring) an das Protein gebunden oder direkt (koordinativ), überwiegend durch Histidine. Alle O₂-Transport-Proteine besitzen eine Quartär-Struktur, aufgrund derer sie sich in sechs Klassen einteilen lassen (Tab. 2.1).

Metall-Atom	aktives Zentrum	Quartär-Struktur	Atmungsprotein
Fe	Häm	4-mer	Hämoglobin
	Häm	2x6x12-mer	Erythrocyruorin
	Häm, modif.	2x6x12-mer	Chlorocyruorin
	2 Fe	8-mer	Hämerythrin
Cu	2 Cu	1x6-mer – 8x6-mer	Hämocyruanin (Arthropoden)
	2 Cu	1x10-mer / 2x10-mer	Hämocyruanin (Mollusken)

Tab. 2.1: Atmungsproteine

Die O₂-Transport-Proteine des Tierreiches lassen sich auf zwei Metall-Atome, vier Typen von aktiven Zentren und sechs Quartär-Strukturen zurückführen. Die Daten stammen aus [1 – 8].

O₂-Transport-Proteine haben die Aufgabe, Sauerstoff in den respiratorischen Epithelien zu binden und ihn anschließend in den Geweben wieder abzugeben. Die entsprechenden O₂-Konzentrationen im Blut sind in Abb. 2.1 durch einen blauen bzw. grauen Balken dargestellt. Der O₂-Transport wird besonders effizient, wenn die Proteine beim ersten Schritt vollständig beladen und beim zweiten vollständig entladen werden. Mit anderen Worten: in der Lunge (oder Kiemen) sollte der Sauerstoff leicht gebunden werden (hohe O₂-Affinität), im Gewebe aber auch leicht wieder abgegeben werden (niedrige O₂-Affinität). Die normale, d.h. nicht-kooperative, Bindung eines Liganden an ein Protein folgt dem Massenwirkungsgesetz und ist hyperbolisch (Abb. 2.1, gestrichelt). Mit einer solchen Kennlinie läßt sich die Aufgabe des O₂-Transportes nur schlecht erfüllen, weil der Unterschied der O₂-Beladungen von Lunge und Gewebe immer klein ausfällt (Abb. 2.1 zeigt ein Beispiel). Dadurch bleibt die Transport-Kapazität des Blutes ebenfalls klein.

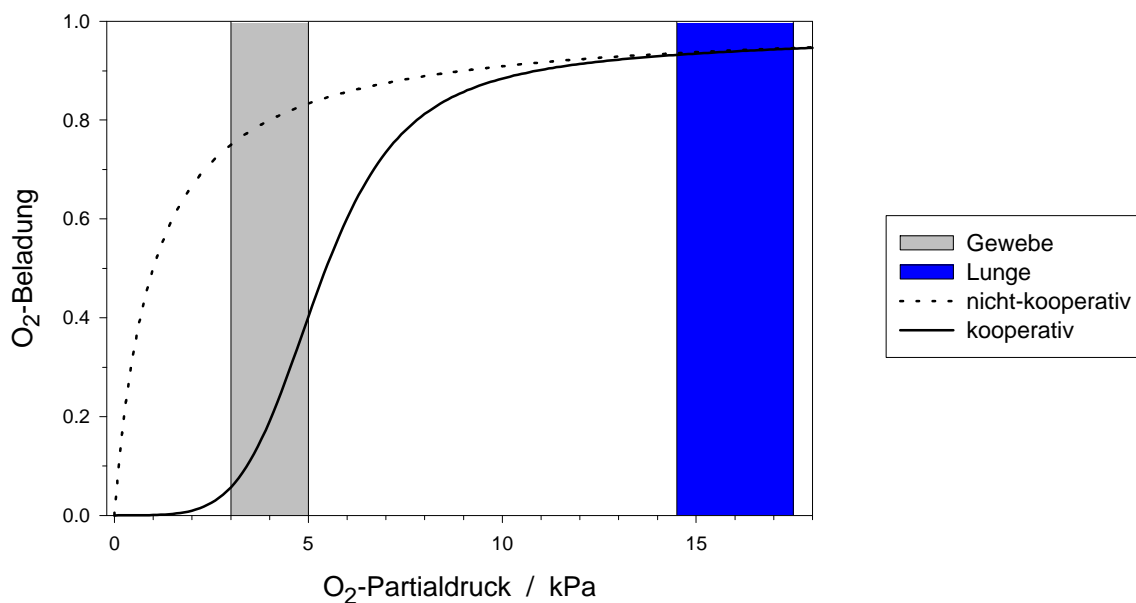


Abb. 2.1: Sauerstoff-Bindungskurven schematisch

Die Aufgabe der Atmungsproteine besteht darin, in den respiratorischen Epithelien (blauer Balken) möglichst viel O₂ aufzunehmen, d.h. hohe Beladung. In den Geweben (grauer Balken) soll dann eine weitgehende O₂-Abgabe erfolgen, d.h. niedrige Beladung. Eine hyperbolische Bindungskurve, wie sie bei nicht-kooperativer Bindung auftritt, ist hierfür schlecht geeignet. Wesentlich höhere Transport-Kapazitäten erlauben sigmoide Kurven, die nur durch kooperative Liganden-Bindung zu realisieren sind.

Wesentlich effektiver sind Atmungsproteine, die ihre O₂-Affinität während der O₂-Bindung verändern können. D.h. die Bindung von Sauerstoff an einem aktiven Zentrum beeinflusst andere aktive Zentren des selben Moleküls. Als Folge davon steigt die Affinität von unbesetzten Bindungsstellen, so daß weitere O₂-Moleküle leichter gebunden werden können. Die anfängliche O₂-Bindung ist also ein

Signal, das sich in Form einer Affinitätsänderung im Molekül ausbreitet: eine O₂-induzierte Änderung der O₂-Affinität. Der beschriebene Vorgang heißt Kooperativität und setzt eine Wechselwirkung zwischen den aktiven Zentren voraus. Dies ist nur bei Molekülen mit mehreren Bindungsstellen möglich, meist oligomeren Protein-Komplexen (Tab. 2.1). Kooperativität drückt sich in einer sigmoiden Bindungskurve aus (Abb. 2.1, durchgezogene Linie), die wesentlich höhere Transport-Kapazitäten erlaubt.

Obwohl sich Atmungsproteine durch eine Änderung der Affinität auszeichnen, wird zu ihrer Charakterisierung häufig nur ein einziger Wert für eine mittlere Affinität verwendet. Dabei wird der Sauerstoff-Partialdruck (p₅₀) angegeben, der zur Besetzung der Hälfte aller Bindungsstellen führt.

2.1.2. Beschreibung von Kooperativität

Jede kooperative O₂-Bindung setzt die Existenz unterschiedlicher Affinitäten voraus (→ 2.1.1.). Somit läßt sich Kooperativität über die Wechselbeziehungen zwischen O₂-Beladung und Affinität beschreiben. Es gibt zahlreiche Modelle, die verschiedene Arten von Wechselbeziehungen postulieren. Die wichtigsten sollen vorgestellt werden.

Modell von Hill

Die erste Beschreibung einer kooperativen Bindungskurve lieferte 1910 Archibald Hill [9]. Er nahm an, daß n Liganden L gleichzeitig an ein Protein P binden.



Dies läßt sich auch so interpretieren, daß bei Bindung des ersten Liganden die Affinität an den verbleibenden n-1 Bindungsstellen auf unendlich anwächst. Damit ist das Modell von Hill in seiner Affinitätsänderung so extrem, daß es in der Natur nicht realisierbar ist. Es stellt aber einen sehr nützlichen Grenzfall bei der Analyse von Bindungskurven dar. Nach dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich für das Hill-Modell eine

$$\text{Dissoziationskonstante} \quad K = \frac{[P] \cdot [L]^n}{[PL_n]} \quad (2.2)$$

Der Beladungsgrad, d.h. der Anteil an besetzten Bindungsstellen als Funktion der Liganden-Konzentration, ergibt eine sigmoide Bindungskurve.

$$\text{Beladungsgrad} \quad \Theta = \frac{[L]^n}{K + [L]^n} \quad (2.3)$$

Die Hill-Gleichung (Gleichung 2.3) lässt sich jedoch auch in einer Geraden-Form darstellen:

$$\log\left(\frac{\Theta}{1-\Theta}\right) = n \cdot \log([L]) - \log(K) \quad (2.4)$$

Somit ergeben Bindungskurven nach dem Modell von Hill bei Auftragung von $\log(\Theta / 1-\Theta)$ gegen $\log([L])$ eine Gerade (Abb. 2.2, gestrichelt).

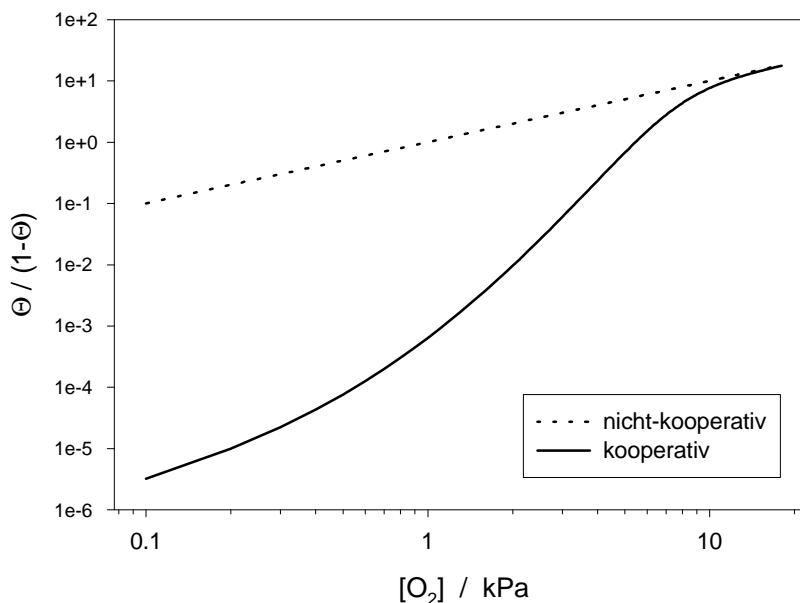


Abb. 2.2: Hill-Auftragung

Beide Achsen sind logarithmisch skaliert. Dargestellt sind die Sauerstoff-Bindungskurven aus Abb. 2.1. Jede Hyperbel ergibt in dieser Auftragung eine Gerade (gestrichelt, Hill-Modell mit $n = 1$), während Bindungskurven, die vom Modell nach Hill abweichen, gekrümmte Kurven ergeben (durchgezogene Linie).

Andere Typen von Bindungskurven weichen von der Geradenform ab (Abb. 2.2, durchgezogene Linie). Allerdings ist jede Tangente eine Gerade und somit eine mögliche Hill-Kurve. Die Tangentensteigung beschreibt also, wieviele Bindungsstellen n synchron an dieser Stelle des Bindungsprozesses beteiligt sind. Aus der Hill-Auftragung lässt sich für jede Bindungskurve die Kooperativität als Funktion der Liganden-Konzentration ablesen. Zur Charakterisierung von Bindungskurven wird der Hill-Koeffizient n_{Hill} , die Tangentensteigung bei Halbsättigung, herangezogen. Der theoretische Maximalwert von n_{Hill} ist gleich der Zahl der Bindungsstellen n pro Protein.

Symmetrie-Modell

Das Symmetrie-Modell (MWC-Modell) wurde 1965 von Monod, Wyman und Changeux vorgestellt [10]. Es geht davon aus, daß alle Bindungsstellen eines Proteins Affinitätsänderungen nur gemeinsam durchführen können. Somit existieren für jedes Molekül genau zwei Zustände: ein nieder- und ein hoch-affiner. Als weitere Annahme wird Affinität mit Konformation gleichgesetzt. Dies erlaubt es, ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen den Konformationen (Affinitäten) zu postulieren. Die nieder-affine Konformation wird mit T bezeichnet, die hoch-affine mit R und die Gleichgewichtskonstante mit L.



Die Bindung von Liganden an Moleküle der R-Form entfernt diese aus dem Gleichgewicht zwischen den unbeladenen Molekülen. Das System relaxiert durch Umwandlung von Molekülen der T-Form in die R-Form. Dies stellt die für Kooperativität notwendige Affinitätssteigerung dar. Das Modell liefert eine sehr einfache und somit elegante Beschreibung von Kooperativität [11, 12]. Es scheint für kleinere Proteine, wie das Hämoglobin oder die Pyruvat-Kinase, gut geeignet zu sein [13, 14, 15].

sequenzielles Modell

Das sequenzielle Modell (KNF-Modell) wurde 1966 von Koshland, Némethy und Filmer eingeführt [16]. Die Grundlagen wurden bereits 1923 von Pauling gelegt [17]. Das Modell überträgt das Prinzip des "Induced-Fit" auf allosterische Proteine [12]. Auch hier werden zwei verschiedene Affinitäten postuliert, aber diesmal nicht auf der Ebene des Proteins, sondern separat für jede Bindungsstelle. Wieder wird Affinität mit Konformation gleichgesetzt. Die Bindung eines Liganden an ein aktives Zentrum bewirkt eine Konformationsänderung von $T \rightarrow R$ an einem benachbarten Zentrum des selben Moleküls. Dadurch steigt an diesem Zentrum die Affinität und ein Ligand kann dort leichter gebunden werden. Dies bewirkt wiederum eine Affinitätsänderung am nächsten aktiven Zentrum, usw.. Das Modell ist sehr allgemein gehalten. So bleibt z.B. offen, auf wieviele und welche aktive Zentren sich die Affinitätsänderung überträgt. Dies macht das KNF-Modell bei größeren Proteinen kompliziert in der Anwendung und führt zu derart vielen Parametern, daß eine Überprüfung kaum möglich ist [18].

Nesting-Modell

Zur Beschreibung der kooperativen Liganden-Bindung größerer Protein-Komplexe stellt das MWC-Modell eine zu starke Vereinfachung dar, wohingegen das KNF-Modell aufgrund der vielen Parameter keine Analyse zuläßt. 1986 wurde das Nesting-Modell vorgeschlagen, bei dem verschiedene Ebenen von Kooperativität postuliert werden [19, 20]. Das Modell orientiert sich stark an den strukturellen Hierarchien der Atmungsproteine (Tab. 2.1.). Danach existieren einzelne Module (allosterische Einheiten), die für sich bereits kooperativ sind. Diese werden zu einem größeren Gebilde zusammengefügt, wobei die Wechselwirkung zwischen den Modulen auch kooperativer Art ist. Die Beschreibung der Kooperativität innerhalb der Module bzw. innerhalb des

Gesamt-Moleküls kann jeweils nach einem der oben beschriebenen Modelle erfolgen. Somit sind auch gemischte Modelle, z.B. ein KNF-Modell eingebettet in ein MWC-Modell, möglich.

Eine spezielle Form des Nesting-Modells, die häufig auch als "Nesting-Modell" bezeichnet wird, bettet ein MWC-Modell (mit den Konformationen t und r) in ein weiteres MWC-Modell (mit den Konformationen T und R) ein [19, 20]. Das Modell postuliert für jede allosterische Einheit vier verschiedene Konformationen (tT, rT, tR, rR). Für das Gesamt-Molekül ergeben sich daraus sechs unterschiedliche Konformationen [18 – 20].

2.2. Hämocyanine

2.2.1. Übersicht

Hämocyanine sind die O₂-Transport-Proteine vieler Arthropoden (Spinnen, Krebse) und Mollusken (Schnecken, Tintenfische). Sie liegen frei gelöst in der Hämolymphe vor, d.h. extrazellulär, und sind sehr groß [5, 6, 21 – 23]. Obwohl die Hämocyanine von Arthropoden und Mollusken die gleichen aktiven Zentren besitzen, unterscheiden sie sich in ihrer Quartär-Struktur sehr deutlich.

aktives Zentrum

Das aktive Zentrum der Hämocyanine ist ein Cu-Zentrum vom Typ 3, d.h. es ist zweikernig und EPR-inaktiv [24, 25]. Jedes Cu-Atom ist über drei Histidine koordinativ an das Protein gebunden (Abb. 2.3) [26 – 28]. Ein Molekül O₂ kann reversibel zwischen den beiden Cu-Atomen in einer *side-on* $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ -Koordination gebunden werden [29 – 32]. Der Sauerstoff entzieht dabei beiden Cu(I)-Ionen je ein Elektron, wodurch er sie zu Cu(II) oxidiert und selbst als Peroxid O₂²⁻ vorliegt. Bei der O₂-Bindung verringert sich der Cu-Cu-Abstand von 0,46 nm auf 0,36 nm [29]. Mit Ausnahme der beiden axialen Histidine liegen alle Bindungspartner in einer Ebene [29 – 32].

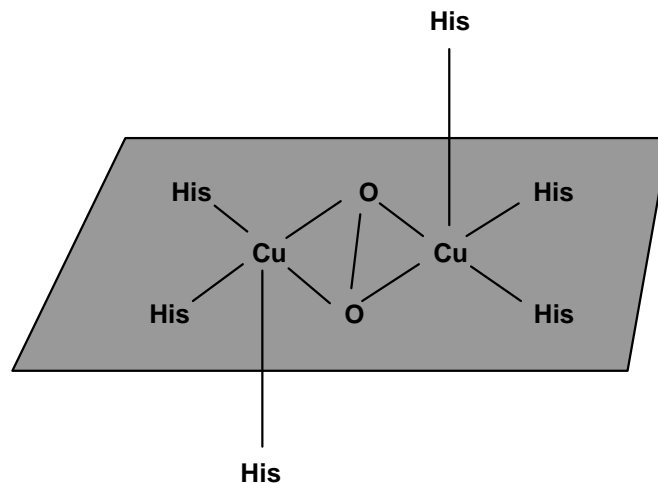


Abb. 2.3: Struktur des aktiven Zentrums

Das aktive Zentrum der Hämocyanine ist ein Cu-Zentrum vom Typ 3. Es enthält zwei Cu-Atome, die von jeweils drei Histidinen (His) ligandiert werden. Der Sauerstoff wird als Peroxid in einer *side-on*-Konformation gebunden. Mit Ausnahme der beiden axialen Histidine liegen alle Bindungspartner in einer Ebene [29 – 32].

Mollusken

Das Hämocyanin der Mollusken hat die Form eines Hohlzylinders mit 5- oder 10-facher Rotationssymmetrie (Abb. 2.4). Die kleinste strukturelle Einheit eines Mollusken-Hämocyanins ist aus 10 Untereinheiten aufgebaut, von denen jede eine Molmasse von 330 bis 460 kg/mol hat [22, 23]. Diese Untereinheiten bestehen aus 7 - 8 funktionellen Einheiten (Domänen) mit Molmassen von ungefähr 50 kg/mol und jeweils einer O₂-Bindungsstelle.

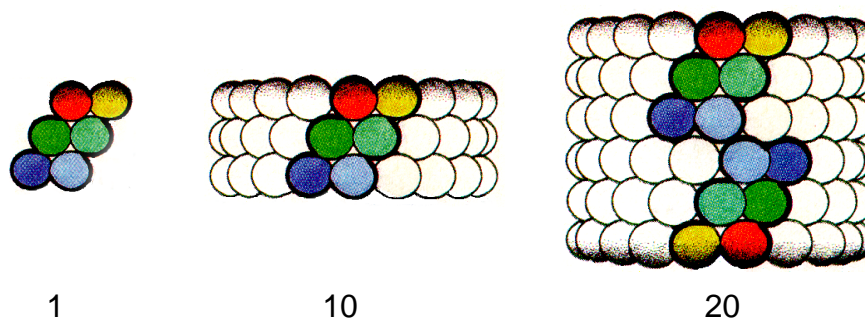


Abb. 2.4: Strukturelle Hierarchie der Mollusken-Hämocyanine

Die Untereinheiten bestehen aus 7 – 8 Domänen (links). Jede Domäne ist durch eine farbige Kugel dargestellt, wobei pro Untereinheit jeweils zwei durch die anderen verdeckt sind. Zehn Untereinheiten lagern sich zu einem Hohlzylinder zusammen (mitte). Bei manchen Tierarten assoziieren diese Zylinder zu 20-meren (rechts). Die Nummern geben die Anzahl der Untereinheiten im Oligomer an.

Jeder Zylinder hat dementsprechend eine Molmasse von etwa 4.000 kg/mol. Das Dodekamer ist trotz Rotationssymmetrie asymmetrisch aufgebaut. Eine Seite der hohlzylindrischen Form wird durch einen Kragen eingeengt. Abhängig von den Bedingungen und der Tierklasse assoziieren sie zu Didekameren [22]. *In vitro* kann man auch lange, stäbchenförmige Aggregate beobachten [6, 33].

Arthropoden

Die Hämocyanine der Arthropoden bestehen aus würfelförmigen Hexameren mit einer Kantenlänge von ungefähr 10 nm [21 – 23]. Je nach Organismus lagern sich 1, 2, 4, 6 oder 8 Hexamere zum nativen Protein zusammen (Abb. 2.5). Jede Untereinheit besitzt jeweils eine O₂-Bindungsstelle. Die Untereinheiten der Hexamere haben Molmassen zwischen 67 und 90 kg/mol, sind nierenförmig und bestehen aus drei Domänen [26 – 29]. Domäne I ist α -helikal und abhängig von der Spezies glykosiliert. Domäne II enthält das aktive Zentrum bestehend aus einem 4- α -Helix-Bündel mit den beiden Cu-Ionen [26, 27]. Domäne III enthält eine siebensträngige β -Faß-Struktur und zwei große Schleifen, die vermutlich die ganze Untereinheit zusammenhalten.

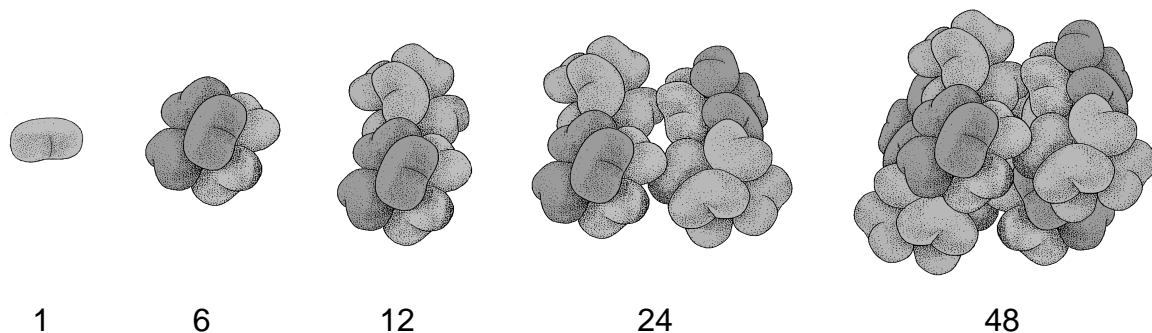


Abb. 2.5: **Strukturelle Hierarchie der Arthropoden-Hämocyanine**

Arthropoden-Hämocyanine sind aus nierenförmigen Untereinheiten aufgebaut (links). Jede Untereinheit besitzt eine O₂-Bindungsstelle. Nativ treten nur Vielfache von Hexameren auf: 1x6- bis 8x6-mere. Die Nummern geben die Anzahl der Untereinheiten im Oligomer an.

O₂-Bindungsverhalten

Bei Hämocyaninen steigt die Kooperativität der O₂-Bindung mit der Aggregationshöhe [21, 34]. Das komplexe Bindungsverhalten läßt sich derzeit nur mit einem Nesting-Modell angemessen beschreiben (\rightarrow 2.1.2.). Dabei wird der strukturellen Hierarchie eine funktionelle gegenübergestellt. Insbesondere das "Nesting-Modell", das auf der Schachtelung von zwei MWC-Modellen beruht, liefert gute Ergebnisse (\rightarrow 2.1.2.). Es wurde bei der Analyse der O₂-Bindungskurven von neun verschiedenen Hämocyaninen mit unterschiedlichen Aggregationsstufen angewendet. In allen Fällen war die Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment sehr gut [18, 20, 23, 35 – 39].

2.2.2. Ausgewählte Hämocyane

In dieser Arbeit wurde vor allem das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* untersucht (Tier: Abb. 3.1, Hämocyanin: Abb. 2.6). Es gehört zu den am besten charakterisierten Hämocyaninen. Das Vogelspinnen-Hämocyanin besteht aus vier Hexameren und hat eine Molmasse von 1.720 kg/mol. Die 24 Untereinheiten setzen sich aus 7 verschiedenen Typen zusammen (a-g), deren Sequenzen bekannt sind [40]. Die Molmassen der Untereinheiten liegen zwischen 70 und 75 kg/mol. Zwar existiert noch keine Röntgenstruktur, jedoch sind die Positionen der Untereinheiten-Typen in der Quartärstruktur bekannt, Abb. 2.6 [41].

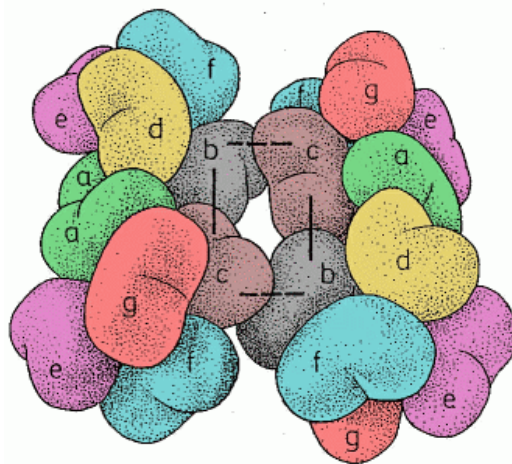


Abb. 2.6: Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum*

Es besteht aus vier Hexameren, die sich aus sieben verschiedenen Untereinheiten-Typen (a-g) zusammensetzen. Die Kontakte zwischen den Hexameren werden über die Untereinheiten b und c vermittelt.

Jedes Hexamer enthält die Untereinheiten a, d, e, f und g, sowie eine der Untereinheiten b oder c. Beide Hexamer-Typen lagern sich zu Dodekameren zusammen, zwei von diesen identischen 12-meren assoziieren zum nativen Protein. Sowohl die Kontakte zwischen den Hexameren eines Halb-Moleküls als auch zwischen den zwei 12-meren werden über die Untereinheiten b und c vermittelt. Das Gesamt-Molekül hat eine Größe von $20 \times 20 \times 10 \text{ nm}^3$. Die O_2 -Bindung erfolgt mit hoher Kooperativität ($n_{\text{Hill}} = 7$) und weist eine hohe Affinität ($p_{50} = 12 \text{ Torr}$) auf [42 – 44].

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit weitere Hämocyane untersucht bzw. spielten bei der Diskussion der Ergebnisse eine wichtige Rolle. Die Eckdaten dieser Hämocyane sind in Tab. 2.2 zusammengefaßt.

Name	<i>Eurypelma californicum</i>	<i>Panulirus interruptus</i>	<i>Limulus polyphemus</i>	<i>Helix pomatia</i>
Tier	Vogelspinne	Languste	Pfeilschwanz-Krebs	Weinberg-Schnecke
Klasse	Arthropoden	Arthropoden	Arthropoden	Mollusken
Quartär-Struktur	4x6	1x6	8x6	2x10
Molmasse (kg/mol)	1.720	450	3.500	8.000
Größe (nm ³)	20 x 20 x 10	10 x 10 x 10	20 x 20 x 20	∅ ≈ 33 nm h ≈ 18 nm
Hill-Koeffizient	7	3	3	3
O ₂ -Affinität (p ₅₀ / Torr)	12	4	7	6

Tab. 2.2: Ausgewählte Hämocyane

Von den Hämocyaninen, die in dieser Arbeit untersucht bzw. diskutiert werden, sind für einen groben Überblick die wichtigsten strukturellen und funktionellen Daten aufgelistet [21 – 23, 26, 42, 45 – 48].

Die Hämocyane der Languste *Panulirus interruptus* und des Pfeilschwanz-Krebses *Limulus polyphemus* sind von besonderem Interesse, da hierfür Röntgen-Kristallstrukturen vorliegen [26 – 29].

2.3. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die kooperative O₂-Bindung des 24-meren Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* untersucht werden. Kooperativität bedeutet eine Änderung der O₂-Affinität während der Bindung und lässt sich durch die Wechselbeziehung zwischen O₂-Beladung und Konformation beschreiben. Hieraus ergaben sich zwei inhaltliche Schwerpunkte: die Charakterisierung von Beladungen und Konformationen.

Alle Modelle, die Kooperativität beschreiben (→ 2.1.2.), betrachten das Verhalten von Einzel-Molekülen. Die experimentelle Überprüfung erfolgte aber bisher immer am Ensemble. Daraus ergaben sich die zwei methodischen Schwerpunkte dieser Arbeit: die Messungen sollten auf der Ensemble- und der Einzel-Molekül-

Ebene durchgeführt werden. Die einzelnen Kapitel der durchgeführten Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

	Beladung	Konformation
Ensemble	Förster-Transfer Kapitel 4	Crosslinking Kapitel 5
Einzel-Moleküle	Zwei-Photonen-Anregung Kapitel 6	Atomare Kraft-Mikroskopie Kapitel 7

3. Material

3.1. Bezugsquellen

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad *pro analysis*. Sämtliche Lösungen wurden mit Wasser aus einer Reinstwasser-Anlage (Milli-Q Plus PF, Millipore, Eschborn) angesetzt.

3.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Bio-Rad, München
Acrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose M	Amesham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Typ VII	Sigma, Deisenhofen
Antiseren	Charles River, Sulzfeld
APS	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CaCl ₂	Fluka, Neu-Ulm
Coomassie-Blau	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Fluka, Neu-Ulm
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Gel-Marker	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
MgCl ₂	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natrium-Veronal	Merck, Darmstadt
SDS	Fluka, Neu-Ulm
TEMED	Roth, Karlsruhe
Toluol	Fluka, Neu-Ulm

Triethylamin	Fisher Chemicals, Leicestershire (Großbritannien)
Tris	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Fluka, Neu-Ulm
Veronal	Merck, Darmstadt
<u>Crosslinker</u>	
BS ³	Pierce, Rockfort (USA)
DMP	Pierce, Rockfort (USA)
DSG	Pierce, Rockfort (USA)
Glurraldehyd	Roth, Karlsruhe
Gold	Dieses wurde uns freundlicherweise von der AG Knoll (MPI für Polymerforschung, Mainz) zur Verfügung gestellt.
NHS-Chlor-Silan	Das Silan mit einer Kettenlänge von 11 C-Atomen wurde uns freundlicherweise von der AG Rühle (früher MPI für Polymerforschung, Mainz, jetzt Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.
Sulfo-BSOCOES	Pierce, Rockfort (USA)
Sulfo-DST	Pierce, Rockfort (USA)
Sulfo-EGS	Pierce, Rockfort (USA)
<u>Fluorophore</u>	
FluoSpheres	Molecular Probes, Leiden (Niederlande)
TAMRA	Molecular Probes, Leiden (Niederlande)
Tryptophan	Fluka, Neu-Ulm
<u>Gase</u>	
Eichgas (5 % O ₂)	Linde, Frankfurt
Sauerstoff	Linde, Frankfurt
Stickstoff	Linde, Frankfurt

3.1.2. Geräte

AFM	Nanoscope III	Digital Instruments, Santa Barbara (USA)
Analysen-Waage	A 200 S	Sartorius, Göttingen
Argon-Ionen-Laser	Innova Sabre	Coherent, Santa Clara (USA)
CCD-Kameras	1100PB	Princeton Instruments, Trenton (USA)
Doppel-Monochromator	Pro-500i	Acton Research, Acton (USA)
Elektronen-Mikroskop	EM 900	Zeiss, Jena
Elektrophorese-Kammer	Multiphor 2117	LKB, Bromma (Schweden)
Filter-Fluorimeter	Ratio 2	Farrand optical, New York (USA)

Fluorimeter	F-4500	Hitachi, Tokio (Japan)
	F-4000	Hitachi, Tokio (Japan)
Fraktionssammler	Modell 2110	Bio-Rad, München
Hochspannungsgerät	PowerPack 3000	Bio-Rad, München
Krypton-Ionen-Laser	2080	Spectra Physics, Darmstadt
O ₂ -Meter	GMH 3690	Greisinger electronic, Regenstauf
OPO	“advanced ring”	APE, Berlin
pH-Meter	Digital 646	Knick, Berlin
Photometer	U-3000	Hitachi, Tokio (Japan)
Photomultiplier	R4220P	Hamamatsu (Japan)
Photonen-Zähler	SR 400	Stanford Research (USA)
Raster-Tisch (3D)	P517.3CL	Physik. Instrumente, Waldbronn
Rührer	Ikamag Reo	Roth, Karlsruhe
Spektrograph	SpectraPro 508i	Acton Research, Acton (USA)
“spin-coater”	Eigenbau	AG Butt, Universität Mainz
Tisch-Zentrifuge	Universal 16R	Hettich, Tuttlingen
Ti-Sa-Laser	Mira-F	Coherent, Santa Clara (USA)
Vakuum-Verdampfer	BAE 250-T	Balzers (Liechtenstein)
Wasserbäder	WK 100	Colora Messtechnik, Lorch
<u>Zubehör</u>		
AFM-Spitzen	NSC 12/200	MDT (Rußland)
Atmosbag	Atmosbag	Sigma, Deisenhofen
Auto-Korrelator	ALV 5000/E	ALV, Langen
Clark-Elektrode	Spezialanfertigung	Greisinger electronic, Regenstauf
dichroitischer Spiegel	Spezialanfertigung	AHF, Tübingen
Filme (EM)	4489	Kodak, Stuttgart
Filterpapier	Nr. 595	Schleicher und Schüll, Dassel
Gel-Filtrationsröhrchen	PD-10	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Küvetten (Standard)	Quarz	Hellma, Müllheim
(rund)	Spezialanfertigung	Werkstatt, Universität Mainz
Säulen-Matrix	Biogel A5m	Bio-Rad, München
Ultra-Filtrationsröhrchen	Ultrafree-4	Millipore, Eschborn
UV-Lampe	66142	Oriel, Stratford (USA)
UV-Objektiv	Ultrafluor	Zeiss, Jena

3.2. Hämocyanine

In dieser Arbeit wurde fast ausschließlich das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* untersucht. Lediglich in Kapitel 4 wurden auch Messungen am Hämocyanin der Languste *Panulirus interruptus* durchgeführt.

3.2.1. *Eurypelma californicum*

Zur Gewinnung des Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum* (Abb. 3.1, links) wurden Spinnen im Institut gehalten. Sie wurden von "Carolina Biological Supply", Charlotte (USA), bezogen. Die Haltung erfolgte einzeln in Plastik-Wannen (15 cm hoch, 30 x 30 cm² Grundfläche, Boden mit Torf / Sand bedeckt) bei etwa 23 °C. Die Spinnen wurden einmal pro Woche mit einem Heimchen gefüttert.

Zur Gewinnung des Hämocyanins wurde das Perikard der Spinnen mit einer Kanüle punktiert. An der Einstichstelle trat Hämolymphe aus, die mit einer Pasteur-Pipette aufgenommen wurde. Es wurden nur ausgewachsene Tiere verwendet, die jeweils etwa 0,5 mL Hämolymphe lieferten.

Zur Entfernung von groben Verunreinigungen (Haare, Zellen) wurde die Hämolymphe 20 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt hauptsächlich Hämocyanin, das sich aufgrund seiner Größe durch Gefiltration in einem Schritt aufreinigen ließ. Die Gelfiltration wurde im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Die Säule (Ø = 1,5 cm; Länge = 120 cm) enthielt eine Matrix aus Biogel A5m. Als Elutionspuffer diente

Tris-Puffer	100 mM	Tris / HCl, pH = 7,8 (bei 20 °C)
	5 mM	CaCl ₂
	5 mM	MgCl ₂

Das Auftragsvolumen lag bei 2 – 3 mL, der Fluß bei 15 – 18 mL/h (durch die Gravitation hervorgerufen). Das Eluat wurde fraktioniert (V = 2 mL) und mittels Immun-Gel-Elektrophorese (→ 5.2.2.) und Absorptionsspektroskopie auf Reinheit und Funktion überprüft. Zur Bestimmung der Hämocyanin-Konzentration wurde die Absorption bei 278 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon(278 \text{ nm}) = 1,10 \text{ (mg/mL} \times \text{cm)}^{-1}$ verwendet [49]. Die so untersuchten Protein-Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.



Abb. 3.1: Die Vogelspinne *Eurypelma californicum* (links) und die Languste *Panulirus spec.* (rechts)

3.2.2. *Panulirus interruptus*

Das Hämocyanin der Languste *Panulirus interruptus* (Abb. 3.1, rechts) war ein Geschenk von Jaap Beintima (Reichsuniversität Groningen, Niederlande). Es lag in kristalliner Form vor und wurde in Tris-Puffer für Crustaceen gelöst.

Crustaceen-Puffer	100 mM	Tris / HCl, pH = 7,5 (bei 20 °C)
	20 mM	CaCl ₂
	20 mM	MgCl ₂

Die Hämocyanin-Konzentration wurde über die Absorption bei 278 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von $\epsilon(278 \text{ nm}) = 1,19 \text{ (mg/mL} \times \text{cm)}^{-1}$ wurde aus der Sequenz berechnet [28, 50]. Die Hämocyanin-Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

4. Beladung - Ensemble

4.1. Einleitung

Dieses Kapitel behandelt die Charakterisierung verschiedener Beladungen auf der Ensemble-Ebene. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Rüdiger Hübler (AG Decker, Molekulare Biophysik, Universität Mainz) durchgeführt.

4.1.1. Ziele

In diesem Kapitel soll der Frage nachgegangen werden, ob die Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz in oxygenierten Hämocyaninen auf Förster-Transfer zurückgeführt werden kann. Hierzu soll die theoretisch zu erwartende Quantenausbeute berechnet werden – unter der Annahme, daß die Löschung auf Förster-Transfer zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis soll dann mit experimentellen Daten verglichen werden. Die Aussagekraft soll durch eine Fehler-Rechnung abgeschätzt werden.

4.1.2. Beladungssignale

Hämocyanine besitzen zwei intrinsische Beladungssignale, die die Besetzung der aktiven Zentren mit Sauerstoff anzeigen: ein Absorptions- und ein Fluoreszenz-Signal. Obwohl ein linearer Zusammenhang zwischen der Beladung und den Signalen jeweils nur für zwei Hämocyanine gezeigt wurde, wird davon ausgegangen, daß beide Beladungssignale für alle Hämocyanine Gültigkeit haben [5, 33, 51].

Die Bindung von Sauerstoff an Hämocyanine führt zu zwei charakteristischen Absorptionsbanden: einer stärkeren um 340 nm (Abb. 4.1), mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 20.000 / \text{M cm}$, und einer schwächeren um 560 nm, mit $\epsilon = 1.000 / \text{M cm}$ [5, 33]. Für ein Arthropoden-Hämocyanin (*Homarus americanus*) und ein Mollusken-Hämocyanin (*Helix pomatia*) konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der O₂-Beladung und der 340 nm-Absorptionsbande gezeigt werden [52, 53].

Hämocyanine enthalten Tryptophane, deren Fluoreszenz bei Bindung von O₂ an die aktiven Zentren gelöscht wird. Für ein Arthropoden-Hämocyanin (*Eurypelma californicum*) und ein Mollusken-Hämocyanin (*Levantina hierosolima*) konnte ein

linearer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz-Löschung und der Absorption bei 340 nm gezeigt werden [42, 54]. Zusammen mit der Linearität zwischen Absorptionsbande und O₂-Beladung bedeutet dies, daß auch für die Fluoreszenz-Quantenausbeute ein linearer Zusammenhang mit der O₂-Beladung besteht.

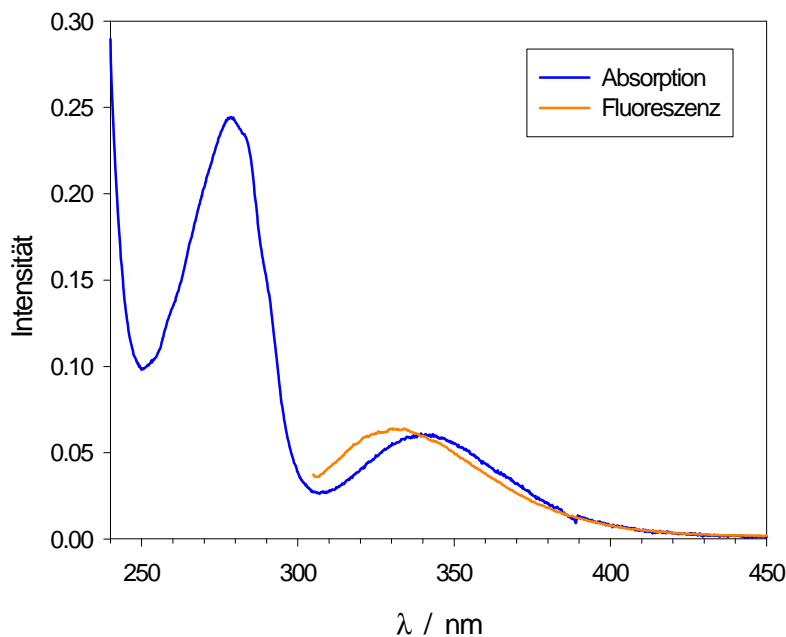


Abb. 4.1: Überlappung von Absorptions- und Fluoreszenz-Spektren bei oxygenierten Hämocyaninen

Das Absorptionsspektrum von Hämocyaninen (blau) zeigt neben der typischen Protein-Bande um 280 nm bei O₂-Beladung auch eine Absorptionsbande bei 340 nm. Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum (orange, Anregung bei 295 nm) hat ein Maximum bei etwa 331 nm. Beide Banden überlappen sich stark. Hier sind die Spektren vom 24-meren Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* in Tris-Puffer (→ 3.2.1.) bei 20°C gezeigt.

Die Ursache der Fluoreszenz-Löschung wurde bei Mollusken-Hämocyaninen untersucht und kontrovers diskutiert. Shaklai und Daniel (1970) vermuteten Förster-Transfer als Ursache, wobei die Tryptophane als Donoren und die aktiven Zentren als Akzeptoren fungieren sollten [54]. Ihre Annahme stützt sich auf die starke Überlappung des Fluoreszenz-Spektrums der Tryptophane mit dem Absorptionsspektrum des Cu-O₂-Zentrums (Abb. 4.1). Das Emissionsmaximum der Tryptophan-Fluoreszenz liegt bei etwa 331 nm (Abb. 4.1, orange), das Absorptionsmaximum der oxygenierten Cu-Zentren bei 340 nm (Abb. 4.1, blau). Für das Hämocyanin der Schnecke *Levantina hierosolima* bestimmten Shaklai und Daniel (1970) einen Förster-Abstand (→ 4.1.3.) von $R_0 = 3,0$ nm, der groß genug war, um diese Hypothese plausibel erscheinen zu lassen [54]. Eine weitergehende Analyse war aufgrund fehlender Sequenzen und 3D-Strukturen nicht möglich. Ricchelli *et al.* (1987) widersprachen dieser Hypothese [51]. Sie

untersuchten das Hämocyanin vom Tintenfisch *Octopus vulgaris* mit drei verschiedenen Liganden im aktiven Zentrum und kamen zu dem Schluß, daß bei Oxygenierung ein anderer Löschprozess wirksam sein müsse. Ihre Analyse war jedoch fehlerhaft, was in Kapitel 4.4.7. diskutiert wird.

4.1.3. Förster-Tansfer

Angeregte Fluorophore (Donoren) können ihre Anregungsenergie strahlungslos auf benachbarte Chromophore (Akzeptoren) übertragen. Die Theorie hierzu ist 1948 von Förster entwickelt worden [55].

Beschreibung für ein Donor-Akzeptor-Paar

Für eine Energie-Übertragung nach Förster ist eine Überlappung vom Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors notwendig. Das Ausmaß der Überlappung wird durch das Überlappungsintegral J ausgedrückt. J ist definiert durch [56 – 59]

$$J = \frac{\int FI \cdot \varepsilon \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda}{\int FI \cdot d\lambda} \quad (4.1)$$

wobei ε der molare Extinktionskoeffizient des Akzeptors als Funktion der Wellenlänge λ ist. FI ist die Fluoreszenz-Intensität des Donors in Abwesenheit von Akzeptoren (ebenfalls als Funktion der Wellenlänge λ). Förster-Transfer beruht auf einer Kopplung der Dipol-Momente von Donor und Akzeptor. Solche Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sind stark abstandsabhängig: die Kopplung nimmt mit der sechsten Potenz des Abstandes r ab [60]. Die Transfer-Effizienz E , d.h. der Anteil angeregter Fluorophore, der über Förster-Transfer entvölkert wird, ist nach [59, 61]

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (4.2)$$

Hierbei ist R_0 der Abstand, bei dem genau die Hälfte der angeregten Fluorophore über Energie-Transfer relaxieren [55]. Er wird kritischer Abstand oder Förster-Abstand genannt. R_0 ist gegeben durch [59]

$$R_0^6 = \frac{8,79 \cdot 10^{-5}}{10^6} \cdot \frac{J \kappa^2 \Phi_0}{n^4} \quad (4.3)$$

Hiebei ist J das Überlappungsintegral aus Gleichung (4.1), n der Brechungsindex des Mediums zwischen Donor und Akzeptor und Φ_0 die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit von Akzeptoren. κ^2 ist der Orientierungsfaktor, der die Lage der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor beschreibt und einen

Wert nur im Bereich von 0 – 4 annehmen kann. Förster-Abstände liegen typischerweise in einem Bereich von 1 nm – 6 nm, so daß Förster-Transfer auch durch Lösungsmittel oder Proteine hindurch erfolgen kann [62 – 64].

Bewegungen von Donor und Akzeptor

Die Gleichungen (4.2) und (4.3) erlauben die Beschreibung des Energie-Transfers nur für ein Donor-Akzeptor-Paar mit festem Abstand und fester Orientierung. Rotation und Diffusion der Fluorophore wurden nicht berücksichtigt, d.h. beide Prozesse müssen wesentlich langsamer erfolgen als der Energie-Transfer.

Für die Diffusion trifft dies im allgemeinen zu. Der Einfluß der Diffusion kann nur bei Fluorophoren mit sehr langer Fluoreszenz-Lebensdauer und hoher Diffusionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Als Beispiel sind hier die Lanthaniden zu nennen, deren Lebensdauern im ms-Bereich liegen [65]. Bei Proteinen treten jedoch Lebensdauern im ns-Bereich auf, so daß die Diffusion vollständig vernachlässigt werden kann [61].

Von Förster stammt eine Erweiterung, die auch die Rotation der Fluorophore berücksichtigt [55]. Hierbei wird angenommen, daß die Rotation von Donor und Akzeptor wesentlich schneller erfolgt als die zum Transfer benötigte Zeit. Die Rotation hat lediglich einen Einfluß auf den Orientierungsfaktor κ^2 . Die zeitliche Mittelung über alle Orientierungen liefert einen Wert von $\kappa^2 = 2/3 = 0,667$ (siehe auch Tab. 4.1). Durch Einsetzen in Gleichung (4.3) ergibt sich ein mittlerer Förster-Abstand R_0 .

Ensemble-Messungen

Die Beschreibung des Energie-Transfers nach den Gleichungen (4.2) und (4.3) ist lediglich auf ein Donor-Akzeptor-Paar anwendbar. In der Regel werden jedoch Ensemble-Messungen durchgeführt, wobei zwei Grenzfälle zu unterscheiden sind. Im ersten Fall liegt ein Donor-Akzeptor-Paar in identischen Kopien vor. Dadurch sind r und R_0 für alle Paare gleich und das System kann wie ein einziges Donor-Akzeptor-Paar behandelt werden. Die Gleichungen bleiben anwendbar.

Im zweiten Grenzfall besteht das Ensemble aus Donoren und Akzeptoren ohne feste Bindung, z.B. eine homogene Farbstoff-Lösung. Hierbei ist einem Donor kein bestimmter Akzeptor zugeordnet, wodurch sich r und R_0 für jedes der vielen Donor-Akzeptor-Paare unterscheiden. Für eine quantitativen Beschreibung nach Gleichung (4.2) müßten r und R_0 für jedes Paar bekannt sein, was aufgrund der großen Teilchenzahlen nicht möglich ist. Es lassen sich jedoch Ensemble-Mittelwerte berechnen. Für den Fall der freien Rotation von Donor und Akzeptor ergibt sich wiederum ein Orientierungsfaktor von $\kappa^2 = 2/3$ [55, 66]. Für "eingefrorene" Lösungen, in denen die Rotation wesentlich langsamer als die Transfer-Rate erfolgt, liefert die Mittelung den kleineren Wert $\kappa^2 = 0,476$ [66, 67]. Die Werte von κ^2 sind für die verschiedenen Systeme in Tab. 4.1 zusammengefaßt.

	festе Orientierung	freie Rotation
einzelnes Donor-Akzeptor-Paar	0 – 4 *	0,667
Ensemble	0,476	0,667

Tab. 4.1: Mittelwerte für κ^2 in Abhängigkeit vom untersuchten System

Können Donor und Akzeptor frei rotieren, so ist eine zeitliche Mittelung über alle Orientierungen erforderlich. Bei Viel-Teilchen-Systemen, z.B. homogenen Farbstoff-Lösungen, muß eine Ensemble-Mittelung durchgeführt werden. (*) Für ein einzelnes Donor-Akzeptor-Paar mit fester Orientierung nimmt der Orientierungsfaktor einen festen Wert im Bereich 0 – 4 an. Es läßt sich kein Mittelwert angeben. Die Werte stammen aus [55, 66, 67].

Welcher Wert für den Orientierungsfaktor gewählt werden sollte, hängt von dem untersuchten System ab. In der Praxis wird jedoch fast immer $\kappa^2 = 2/3$ verwendet – unabhängig vom untersuchten System [57, 61].

4.2. Methoden

4.2.1. Einstellen der O₂-Beladung

Die hier untersuchten Hämocyane der Vogelspinne (*Eurypelma californicum*) und der Languste (*Panulirus interruptus*) besitzen eine O₂-Affinität von $p_{50} = 12$ Torr bzw. $p_{50} = 4$ Torr (Tab. 2.2). An Luft, mit einem O₂-Partialdruck von $p_{O_2} = 160$ Torr (Luftdruck 760 Torr, O₂-Gehalt 20,9 %) liegen beide Hämocyane vollständig oxygeniert vor.

Zur Deoxygenierung wurden die Hämocyanin-Lösungen auf Uhrgläsern ausgebreitet und für 90 min in einer Atmosbag unter N₂-Atmosphäre inkubiert. Der verbleibende O₂-Gehalt lag bei etwa 0,3 %, was einem Partialdruck von $p_{O_2} = 2,3$ Torr entsprach. Für die spektroskopischen Messungen wurden die Lösungen in Küvetten mit Schraubverschluß überführt. Das Fehlen der Absorptionsbande bei 340 nm zeigte die erfolgte Deoxygenierung an (→ 4.1.2.).

4.2.2. Spektroskopie

Die Absorptions- und Fluoreszenz-Messungen wurden mit Halbmikro-Küvetten aus Quarz durchgeführt. Die optische Weglänge betrug 1 cm und die Temperatur lag, wenn nicht anders angegeben, bei 20 °C.

Innerer Filter-Effekt

Die Fluoreszenz-Detektion erfolgte im rechten Winkel und wurde um den Inneren Filter-Effekt bei der Anregung korrigiert [61]:

$$FI_{\text{korr}} = FI_{\text{gem}} \cdot 10^{\text{Abs} / 2} \quad (4.4)$$

Hierbei bezeichnet FI die Fluoreszenz-Intensität. Die Indizes korr und gem stehen für korrigierte bzw. gemessene Intensitäten. Abs ist die Absorption der Probe bei der Anregungswellenlänge. Der Innere Filter-Effekt auf Seiten der Emission konnte vernachlässigt werden, da die Weglänge und damit auch die Absorption dort wesentlich geringer waren.

Fluoreszenz-Quantenausbeute

Die Quantenausbeute der oxy- und deoxy-Hämocyanine wurde durch Vergleich mit einem Standard bestimmt. Als Standard wurde Tryptophan in 1 mM Tris, pH = 7,0 verwendet (Quantenausbeute $\Phi_{\text{Trp}} = 0,13$ [68]). Die Messungen mit dem Standard wurden als einzige bei 23 °C durchgeführt (wie bei [68] angegeben). Es wurden jeweils Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm detektiert, um den Inneren Filter-Effekt korrigiert und auf die Absorption bei 295 nm normiert. Aufgrund der vergleichsweise geringen Stokes-Verschiebung von Tryptophan kam es zu einer Überlagerung des Anregungslichtes mit dem Emissionsspektrum. Um auch diesen Teil der Spektren in die Berechnungen mit einbeziehen zu können, wurden die Spektren durch Gauß-Kurven angepaßt und der kurzwellige Teil extrapoliert. Aus dem Verhältnis der Flächen unter den extrapolierten Kurven (FI) ergab sich die Quantenausbeute Φ [61]:

$$\Phi_{\text{Hc}} = \frac{FI_{\text{Hc}}}{FI_{\text{Trp}}} \cdot \Phi_{\text{Trp}} \quad (4.5)$$

Hierbei bezieht sich der Index Hc auf die Hämocyanin-Probe, der Index Trp auf die Tryptophan-Referenz.

Überlappungsintegral

Die Berechnung der Überlappungsintegrale J aus den Absorptions- und Emissionsbanden erfolgte nach Gleichung (4.1). Die 340 nm-Absorptionsbande der oxy-Hämocyanine überlagerte sich jedoch mit der Protein-Absorption bei 280 nm (Abb. 4.1). Um dennoch das ungestörte Absorptionssignal des Cu-O₂-Zentrums zu erhalten, wurde die 340 nm-Absorptionsbande durch eine Gauß-Kurve angepaßt. Die Absorption wurde nach dem Lambert-Beer-Gesetz über die

Konzentration in den molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ umgerechnet. Die Hämocyanin-Konzentrationen wurden über die Absorption bei 278 nm bestimmt. Als Extinktionskoeffizient wurde für das Vogelspinnen-Hämocyanin ein Wert von $\epsilon(278 \text{ nm}) = 1,10 \text{ (mg/mL} \times \text{cm)}^{-1}$ verwendet [49]. Für das Langusten-Hämocyanin wurde aus der Sequenz ein Wert von $\epsilon(278 \text{ nm}) = 1,19 \text{ (mg/mL} \times \text{cm)}^{-1}$ berechnet [28, 50]. Die Fluoreszenz-Emissionsspektren wurden wie oben beschrieben durch Gauß-Kurven angepaßt.

4.2.3. Abstände innerhalb der Hämocyanine

Die Abstände r der Tryptophane zu den aktiven Zentren wurden mit Hilfe dreier bekannter Röntgen-Kristallstrukturen bestimmt. Gemessen wurden jeweils die Abstände zwischen dem $C_{\delta 2}$ -Atom der Tryptophan-Seitenketten und der Mitte zwischen den beiden Cu-Atomen.

Für das Hämocyanin der Vogelspinne existiert bislang keine Röntgen-Kristallstruktur. Allerdings ähneln sich die Sequenzen der Untereinheiten des *Eurypelma*-Hämocyanins mit der kristallisierten Untereinheit II des *Limulus*-Hämocyanins sehr stark: 68 % - 79 % Homologie bzw. 52 % - 64 % Identität [40]. Dies gestattet es, die Struktur der *Limulus*-Untereinheit II, die mit 0,36 nm aufgelöst wurde, auf die *Eurypelma*-Untereinheiten zu übertragen. Das entsprechende Sequenz-Alignment wurde von Voit *et al.* (2000) übernommen [40]. Für nicht konservierte Tryptophane wurden die Aminosäuren an der entsprechenden Position verwendet. Von der Untereinheit II des *Limulus*-Hämocyanins existieren zwei Röntgen-Strukturen, eine oxy- und eine deoxy-Form (Dateien 1oxy.pdb und 1lla.pdb in der Protein-Datenbank Brookhaven, <http://www.rcsb.org/pdb/>) [27, 29]. Für beide Strukturen wurden die Abstände r ermittelt. Bei den Kristallstrukturen der *Limulus*-Untereinheiten handelt es sich um Hexamere. Um alle Donor-Akzeptor-Abstände innerhalb des 4x6-meren *Eurypelma*-Hämocyanins berücksichtigen zu können, wurden vier Hexamere verwendet. Deren relative Anordnung zueinander ist durch Elektronenmikroskopie bestimmt worden [69, 70].

Die Abstände r im 1x6-meren Hämocyanin von *Panulirus interruptus* wurden aus der verfeinerten Röntgen-Kristallstruktur (Auflösung 0,32 nm; Datei 1hcy.pdb) bestimmt [28].

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Erweiterung der Theorie

Hämocyanine enthalten sehr viele Tryptophane (als potentielle Donoren) und zahlreiche Cu-Zentren (als potentielle Akzeptoren). Um Försters Theorie auf

Hämocyanine anwenden zu können, ist eine Erweiterung auf multi-Donor- und multi-Akzeptor-Systeme notwendig. Diese Erweiterung sollte einerseits individuelle Donor-Akzeptor-Abstände berücksichtigen, die für einige Hämocyanine bekannt sind. Andererseits muß sie einen mittleren Förster-Radius R_0 verwenden, da nicht für jedes Donor-Akzeptor-Paar individuelle Förster-Radien meßbar sind. Die Erweiterung soll in diesem Abschnitt hergeleitet werden.

Die Quantenausbeute eines Fluorophors ist definiert als

$$\Phi_0 = \frac{k_F}{k_F + k_R} \quad (4.6)$$

wobei k_F und k_R die Übergangsraten für die Fluoreszenz bzw. alle anderen Prozesse sind, die zur Entvölkerung des angeregten Zustandes beitragen. Kommt ein Löschprozess mit der Übergangsrate k_Q hinzu, ergibt sich für die Quantenausbeute

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_R + k_Q} = \frac{1}{\frac{1}{\Phi_0} + \frac{k_Q}{k_F}} \quad (4.7)$$

Handelt es sich bei dem Löschprozess um Förster-Transfer, so wird k_Q durch

$$k_Q = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (4.8)$$

beschrieben [55]. Hierbei ist R_0 der Förster-Abstand, r der Abstand zwischen Donor und Akzeptor und τ_D die Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptor [61, 71], d.h.

$$\tau_D = \frac{1}{k_F + k_R} \quad (4.9)$$

Aus den Gleichungen (4.8), (4.9) und (4.6) ergibt sich

$$\frac{k_Q}{k_F} = \frac{1}{\Phi_0} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (4.10)$$

Somit kann die Quantenausbeute des Fluorophors (Gleichung (4.7)) bei Löschung durch Förster-Transfer geschrieben werden als:

$$\Phi = \frac{\Phi_0}{1 + \left(\frac{R_0}{r} \right)^6} \quad (4.11)$$

Für ein System aus D gleichen Donoren mit unterschiedlichen Abständen r_i zu einem Akzeptor ergibt sich eine gemittelte Quantenausbeute

$$\langle \Phi \rangle = \frac{1}{D} \sum_i^D \Phi_i = \frac{1}{D} \sum_i^D \frac{\Phi_0}{1 + \left(\frac{R_0}{r_i} \right)^6} \quad (4.12)$$

Besteht das System dagegen aus einem Donor und mehreren (A) Akzeptoren mit verschiedenen Übergangsraten k_{Qj} , so verändert sich Gleichung (4.7) zu

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_R + \sum_j^A k_{Qj}} = \frac{1}{\frac{1}{\Phi_0} + \sum_j^A \frac{k_{Qj}}{k_F}} \quad (4.13)$$

Diese Gleichung beschreibt die Löschung bei Konkurrenz verschiedener Lösprozesse. Einsetzen von Gleichung (4.10) ergibt anstelle von Gleichung (4.11) eine Quantenausbeute

$$\Phi = \frac{\Phi_0}{1 + \sum_j^A \left(\frac{R_0}{r_j} \right)^6} \quad (4.14)$$

r_j bezeichnet die Abstände zwischen dem Donor und den verschiedenen Akzeptoren.

Vereinigt man die Gleichungen (4.12) und (4.14) zu einem System, bei dem D Donoren durch A Akzeptoren gelöscht werden (Einsetzen von Gleichung (4.14) in den mittleren Term von Gleichung (4.12)), erhält man

$$\langle \Phi \rangle = \frac{1}{D} \sum_i^D \frac{\Phi_0}{1 + \sum_j^A \left(\frac{R_0}{r_{ij}} \right)^6} \quad (4.15)$$

Der Abstand r_{ij} bezeichnet dabei die Distanz zwischen dem Donor i und dem Akzeptor j . In ähnlicher Weise ist eine Herleitung bei Dewey / Hammes (1980) zu finden [72].

Bei dieser Herleitung wurde davon ausgegangen, daß Donoren und Akzeptoren unter sich jeweils gleich sind. Dies bedeutet, daß die ungelöschte Quantenausbeute Φ_0 und der Förster-Abstand R_0 Konstanten sind.

4.3.2. Fehlerabschätzung

Die Güte der theoretischen Betrachtung kann durch eine Fehlerfortpflanzung nach Gauß abgeschätzt werden [73].

Fehler von R_0^6

R_0^6 ist durch Gleichung (4.3) gegeben. Fehlerbehaftet sind die Größen J , κ^2 , Φ_0 und n . Für eine Fehlerabschätzung werden die partiellen Ableitungen von R_0^6 nach diesen Größen benötigt:

$$\text{Überlappungsintegral } J \quad \frac{\partial R_0^6}{\partial J} = \frac{R_0^6}{J} \quad (4.16)$$

$$\text{Orientierungsfaktor } \kappa^2 \quad \frac{\partial R_0^6}{\partial \kappa^2} = \frac{R_0^6}{\kappa^2} \quad (4.17)$$

$$\text{Quantenausbeute } \Phi_0 \quad \frac{\partial R_0^6}{\partial \Phi_0} = \frac{R_0^6}{\Phi_0} \quad (4.18)$$

$$\text{Brechungsindex } n \quad \frac{\partial R_0^6}{\partial n} = -4 \cdot \frac{R_0^6}{n} \quad (4.19)$$

Der absolute Fehler von R_0^6 ergibt sich nach Gauß aus

$$\Delta R_0^6 = \sqrt{\sum_i^4 \left(\frac{\partial R_0^6}{\partial x_i} \cdot \Delta x_i \right)^2} \quad (4.20)$$

wobei x_i die fehlerbehafteten Größen und Δx_i deren absolute Fehler sind.

Fehler der berechneten Quantenausbeute

Die zu berechnende Quantenausbeute wird durch Gleichung (4.15) beschrieben. Hierbei sind die Größen Φ_0 , R_0^6 und r_{ij} fehlerbehaftet. Die partiellen Ableitungen:

$$\text{Quantenausbeute } \Phi_0 \quad \frac{\partial \langle \Phi \rangle}{\partial \Phi_0} = \frac{\langle \Phi \rangle}{\Phi_0} \quad (4.21)$$

$$\text{Förster-Abstand } R_0^6 \quad \frac{\partial \langle \Phi \rangle}{\partial R_0^6} = -\frac{1}{\Phi_0} \cdot \frac{1}{D} \cdot \sum_i^D \Phi_i^2 \cdot \left(\sum_j^A \frac{1}{r_{ij}^6} \right) \quad (4.22)$$

Für den Abstand r_{ij} zwischen einem bestimmten Donor i und einem bestimmten Akzeptor j ergibt sich als partielle Ableitung:

$$\text{Abstand } r_{ij} \quad \frac{\partial \langle \Phi \rangle}{\partial r_{ij}} = \frac{1}{D} \cdot \frac{6}{\Phi_0} \cdot \Phi_i^2 \cdot \frac{R_0^6}{r_{ij}^7} \quad (4.23)$$

Der absolute Fehler der Quantenausbeute für die Abstände von allen Donoren ($i = 1, \dots, D$) zu allen Akzeptoren ($j = 1, \dots, A$) ist dann

$$\Delta \langle \Phi \rangle |_r = \sqrt{\sum_i^D \sum_j^A \left(\frac{\partial \langle \Phi \rangle}{\partial r_{ij}} \cdot \Delta r_{ij} \right)^2} \quad (4.24)$$

Der Gesamt-Fehler (absolut) der berechneten Quantenausbeute ergibt sich nach Gauß aus:

$$\Delta \langle \Phi \rangle = \sqrt{\left(\frac{\partial \langle \Phi \rangle}{\partial \Phi_0} \cdot \Delta \Phi_0 \right)^2 + \left(\frac{\partial \langle \Phi \rangle}{\partial R_0^6} \cdot \Delta R_0^6 \right)^2 + \Delta \langle \Phi \rangle |_r^2} \quad (4.25)$$

Hierbei sind die Gleichungen (4.20) bis (4.24) einzusetzen.

4.3.3. Ausgangsgrößen

Die Untersuchungen wurden an den Hämocyaninen der Vogelspinne *Eurypelma californicum* und der Languste *Panulirus interruptus* durchgeführt. Die für die Berechnungen notwendigen Ausgangsgrößen sind im folgenden aufgeführt.

Förster-Abstände

Die mittleren Förster-Radien R_0 wurden nach Gleichung (4.3) berechnet. Dafür war die Kenntnis von vier Größen notwendig: J , κ^2 , Φ_0 und n .

- **Überlappungsintegral J**

Das Überlappungsintegral J wurde mit Hilfe von Gleichung (4.1) aus den Absorptions- und Emissionsspektren berechnet (\rightarrow 4.2.2.). Für das Vogelspinnen-Hämocyanin sind exemplarisch zwei der verwendeten Spektren in Abb. 4.1. dargestellt. Aus 13 Messungen ergab sich ein Mittelwert von $J = 1,72 \cdot 10^{14} \cdot \text{nm}^4 / \text{M cm}$ (Standardabweichung 5 %). Für das Hämocyanin der Languste sind exemplarisch zwei Spektren in Abb. 4.2 dargestellt. Es ergab sich ein Mittelwert von $J = 1,51 \cdot 10^{14} \cdot \text{nm}^4 / \text{M cm}$ (2 Messungen, Abweichung 1,4 %). Der Gesamtfehler bei der Bestimmung der Überlappungsintegrale wurde mit 7 % veranschlagt.

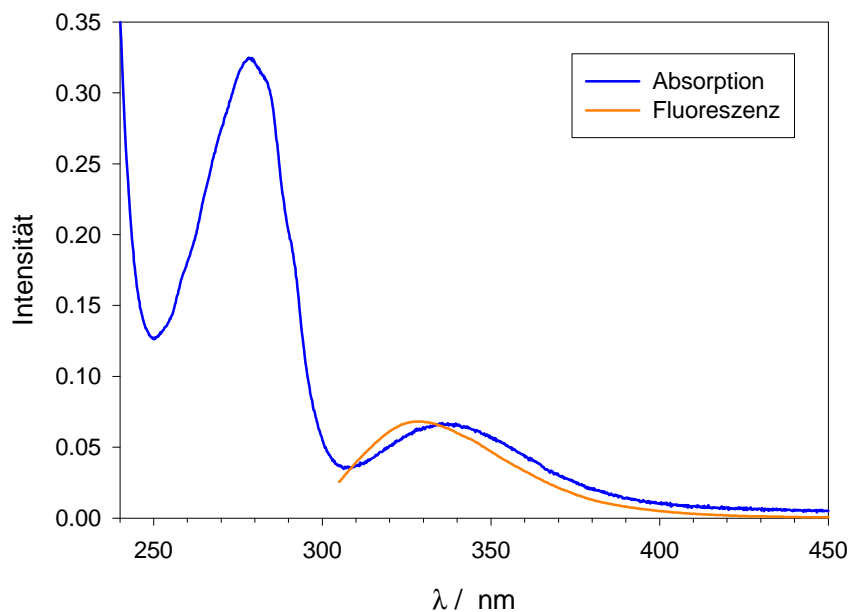


Abb. 4.2: Spektren zur Berechnung des Überlappungsintegrals bei der Languste *Panulirus interruptus*

Dargestellt ist das Absorptionsspektrum (blau) und das Fluoreszenz-Emissionsspektrum (orange, Anregung bei 295 nm) in Crustaceen-Puffer (pH = 7,5) bei 20 °C.

- Orientierungsfaktor κ^2
Für eine statistische Verteilung mit fester Orientierung der Übergangsdipolmomente, die hier angenommen wurde, ergibt sich ein mittlerer Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 0,476$ (\rightarrow 4.1.3.). Um der verhältnismäßig großen Unsicherheit des einzelnen κ^2 Rechnung zu tragen, wurde ein relativer Fehler von 50 % angenommen.
In Abschnitt 4.3.6. wird die Berechnung von R_0 auch für den Fall der freien Rotation von Donor und Akzeptor durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ergibt sich für den Orientierungsfaktor ein Wert von $\kappa^2 = 2/3$ (\rightarrow 4.1.3.).
- Quantenausbeute des ungelöschten Systems Φ_0
Die Messungen der Quantenausbeuten (\rightarrow 4.2.2.) ergaben für das Hämocyanin von *Eurypelma* einen Mittelwert von $\Phi_0 = 0,0727$ (3 Messungen, Standardabweichung 3 %), für das *Panulirus*-Hämocyanin $\Phi_0 = 0,0527$ (2 Messungen, Abweichung 5 %). Als Gesamtfehler der gemessenen Ausbeuten wurden jeweils 10 % angenommen. Dieser setzt sich aus zwei Teilen zusammen: der statistische Fehler der hier durchgeführten Messungen sowie ein systematischer Fehler, hervorgerufen durch die Ungenauigkeit der Referenz (8 %) [68].

- Brechungsindex n

Der Brechungsindex von Hämocyaninen ist nicht bekannt. Hier wurde ein für Proteine typischer Wert von $n = 1,4$ angenommen und eine mögliche Abweichung mit einem Fehler von 5 % berücksichtigt [58, 59, 61].

Quantenausbeute des gelöschten Systems Φ

Die Messungen der Quantenausbeuten (\rightarrow 4.2.2.) ergaben für das oxy-Hämocyanin der Vogelspinne einen Mittelwert von $\Phi_{\text{gem}} = 0,0055$ (9 Messungen, Standardabweichung 7,4 %). Damit sinkt bei Oxygenierung die Quantenausbeute auf ein Dreizehntel ($\Phi_{\text{oxy}} / \Phi_{\text{deoxy}} = 0,0055 / 0,0727 \approx 1 / 13$). Für das oxy-Hämocyanin der Languste wurde ein Mittelwert von $\Phi_{\text{gem}} = 0,0130$ bestimmt (2 Messungen, Abweichung 1,5 %). Als Gesamt-Fehler der gemessenen Quantenausbeuten wurden jeweils 15 % angenommen.

Löschung durch Förster-Transfer

Die Berechnung der Fluoreszenz-Löschung durch Förster-Transfer wurde nach Gleichung (4.15) durchgeführt und setzt neben dem Förster-Abstand R_0 und der Quantenausbeute Φ_0 die Kenntnis von drei weiteren Parametern voraus: A , D und r_{ij} .

- Anzahl der Akzeptoren A

Die Anzahl der Akzeptoren ist gleich der Anzahl der aktiven Zentren. Sie ergibt sich bei den hier untersuchten Arthropoden-Hämocyaninen aus der Anzahl der Untereinheiten (\rightarrow 2.2.1.).

- Anzahl der Donoren D

Die Anzahl der Donoren, d.h. der Tryptophane, ergibt sich aus der Aminosäure-Sequenz. Für das Hämocyanin von *Eurypelma* wurden die Sequenzen aller sieben Untereinheiten kürzlich entschlüsselt [40]. Die Untereinheiten enthalten zwischen fünf und acht Tryptophane, insgesamt besitzt das 24-mer $D = 148$ Tryptophane.

Das *Panulirus*-Hämocyanin besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten-Typen [26, 28]. Die Tryptophane sind aber in beiden Untereinheiten-Typen konserviert, so daß die Untereinheiten hier als gleich angesehen werden können. Beim Hämocyanin der Languste enthält jede der sechs Untereinheiten neun konservierte Tryptophane, so daß $D = 54$ ist [26, 28].

- Abstände r_{ij}

Die Abstände r_{ij} zwischen Donoren und Akzeptoren wurden in beiden Hämocyaninen über Röntgen-Kristallstrukturen bestimmt (\rightarrow 4.2.3.). Bei der Berechnung wurden alle Abstände innerhalb der Oligomere mit $r_{ij} \leq 5,5$ nm berücksichtigt. In Abb. 4.3 sind die Abstände in Form von Verteilungen dargestellt. Als möglicher Fehler wurde bei jeder einzelnen Abstandsbestimmung eine Unsicherheit von $\Delta r = 0,02$ nm veranschlagt.

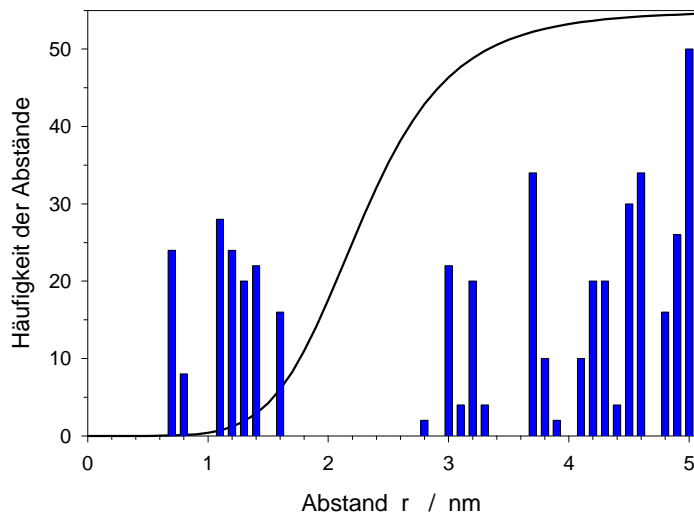
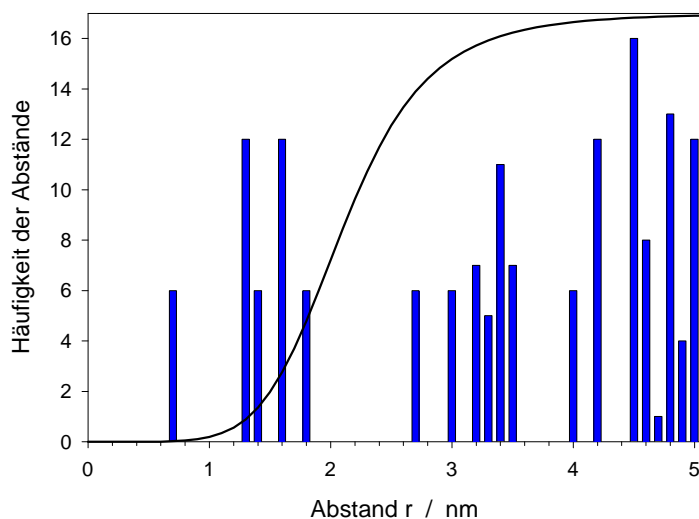
Eurypelma californicum*Panulirus interruptus*

Abb. 4.3: Verteilungen der Donor-Akzeptor-Abstände innerhalb des 24-meren Hämocyanins der Vogelspinne und des 6-meren Hämocyanins der Languste

Die Donor-Akzeptor-Abstände wurden in Klassen mit einer Breite von 0,1 nm eingeteilt und die Häufigkeit in Form blauer Balken dargestellt. Die durchgezogenen Linien geben die Quantenausbeuten eines Donor-Akzeptor-Paares als Funktion des Abstandes an. Sie wurden nach Gleichung (4.11) mit den Förster-Abständen aus Tab. 4.2 berechnet.

Eurypelma Die Abstände basieren auf der Röntgen-Kristallstruktur des oxy-Hämocyanins von *Limulus polyphemus* [29]. Als Förster-Abstand wurde $R_0 = 2,27$ nm verwendet.

Panulirus Die Abstände basieren auf der verbesserten Röntgen-Kristallstruktur [28]. Als Förster-Abstand wurde $R_0 = 2,10$ nm verwendet.

4.3.4. Theoretische Betrachtung

Förster-Abstände

Die zur Berechnung der Förster-Abstände notwendigen Ausgangsgrößen, sowie die Ergebnisse und Fehler sind in Tab. 4.2 zusammengefaßt. Hierbei wurde davon ausgegangen, daß in den Hämocyaninen die Donoren und Akzeptoren mit statistisch verteilter, aber fester Orientierungen vorliegen ($\kappa^2 = 0,476$; Tab. 4.1).

	<i>Eurypelma</i> 24-mer	<i>Panulirus</i> 6-mer	Fehler %
Ausgangsgrößen			
Überlappungsintegral J ($10^{14} \cdot \text{nm}^4 / \text{M cm}$)	1,72	1,51	7
Orientierungsfaktor κ^2	0,476	0,476	50
Quantenausbeute Φ_0	0,0727	0,0527	10
Brechungsindex n	1,4	1,4	5
Ergebnis			
Förster-Abstand R_0^6	136 nm ⁶	87 nm ⁶	55
Förster-Abstand R_0	2,27 nm	2,10 nm	9

Tab. 4.2: Förster-Abstände bei fester Orientierung der Donoren und Akzeptoren

Aufgelistet sind die Ausgangsgrößen, Ergebnisse und Fehler für die Hämocyanine der Vogelspinne *Eurypelma californicum* und der Languste *Panulirus interruptus*. Die Förster-Abstände wurden mit Gleichung (4.3) berechnet, die Fehler mit Gleichung (4.20).

Für beide Hämocyanine ergeben sich ähnliche Werte: ein Förster-Abstand von $R_0 = 2,27 \text{ nm}$ für die Vogelspinne und $R_0 = 2,10 \text{ nm}$ für die Languste. Der kleinere Wert bei der Languste resultiert aus dem kleineren Überlappungsintegral und der kleineren Quantenausbeute. Der Fehler von R_0^6 ist mit 55 % relativ groß. Diese Unsicherheit wird hauptsächlich durch die Ungewißheit von κ^2 verursacht. Da der Förster-Abstand R_0 aber nur mit der sechsten Wurzel von κ^2 abhängt (Gleichung 4.3), reduziert sich der Fehler für R_0 auf ein sechstel, d.h. 9 %.

Theoretische Betrachtung

Die theoretisch zu erwartende Fluoreszenz-Löschung durch Förster-Transfer wurde nach Gleichung (4.15) berechnet. Die Ausgangsgrößen, Ergebnisse und Fehler zeigt Tab. 4.3.

	<i>Eurypelma</i> 24-mer		<i>Panulirus</i> 6-mer deoxy
	oxy	deoxy	
Ausgangsgrößen			
Anzahl der Akzeptoren A	24	24	6
Anzahl der Donoren D	148	148	54
deoxy-Quantenausbeute Φ_0	0,0727	0,0727	0,0527
Förster-Abstand R_0 in nm	2,27	2,27	2,10
theor. Betrachtung			
Quantenausbeute Φ_{theo}	0,0057	0,0060	0,0164
Fehler $\Delta\Phi_{\text{theo}}$	0,0019	0,0021	0,0039

Tab. 4.3: Berechnung der Löschung innerhalb des 24-meren Hämocyanins der Vogelspinne und des 6-meren Hämocyanins der Languste

Die Berechnungen der theoretisch zu erwartenden Fluoreszenz-Löschung durch Förster-Transfer wurden mit Gleichung (4.15) durchgeführt. Es wurde von einer statistisch verteilten, aber festen Orientierung ausgegangen ($\kappa^2 = 0,476$; Tab. 4.1).

Die Berechnungen ergeben eine sehr starke Löschung der Hämocyanin-Fluoreszenz bei Oxygenierung. Beim Vogelspinnen-Hämocyanin sinkt die Quantenausbeute von $\Phi_0 = 0,0727$ auf $\Phi_{\text{theo}} = 0,0057$ bzw. 0,0060. Damit reduziert sich die Quantenausbeute bei Oxygenierung auf ein Dreizehntel, wobei die Unterschiede zwischen der oxy- und deoxy-Struktur vernachlässigbar sind. Beim Langusten-Hämocyanin sinkt die Quantenausbeute von $\Phi_0 = 0,0527$ auf $\Phi_{\text{theo}} = 0,0164$ und reduziert sich damit auf ein Drittel. Die Fehler-Fortpflanzung liefert für beide Hämocyanine Fehler, die bei etwa 30 % der berechneten Quantenausbeuten liegen (Tab. 4.3).

Vergleich mit der Messung

Die gemessenen Quantenausbeuten bestätigen die starke Löschung der Hämocyanine im oxygenierten Zustand (\rightarrow 4.3.3.). Beim Vogelspinnen-Hämocyanin stimmen die berechneten Quantenausbeuten von $\Phi_{\text{theo}} = 0,0057$ bzw. 0,0060 überragend gut mit der gemessenen von $\Phi_{\text{gem}} = 0,0055$ (\rightarrow 4.3.3.) überein. Die Abweichungen von 0,0002 bzw. 0,0005 sind deutlich kleiner als der Gesamtfehler der Berechnung von $\Delta\Phi_{\text{theo}} = 0,0019$ bzw. 0,0021 (Tab. 4.3). Damit lässt sich die gesamte Fluoreszenz-Löschung vollständig durch Förster-Transfer erklären. Übersichtshalber sind die verschiedenen Quantenausbeuten und Fehler in Abb. 4.4 für die oxy-Konformation des Vogelspinnen-Hämocyanins veranschaulicht.

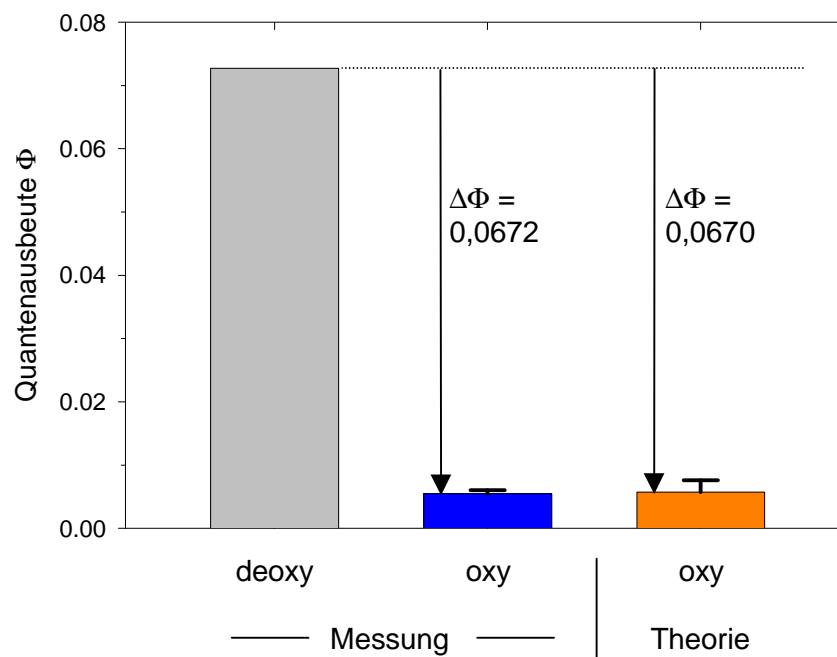


Abb. 4.4: Schematische Darstellung von gemessener und berechneter Quantenausbeute des Vogelspinnen-Hämocyanins

Die Messungen ergeben für die Fluoreszenz-Quantenausbeute des deoxy-Hämocyanins einen Wert von $\Phi_0 = 0,0727$ (grauer Balken), der durch die Löschung bei Oxygenierung auf $\Phi_{\text{Mess}} = 0,0055$ (blauer Balken) reduziert wird. Wird die oxy-Konformation zugrunde gelegt, so ergibt die theoretische Betrachtung bei Oxygenierung eine Quantenausbeute von 0,0057 (orangefarbener Balken). Für die oxy-Quantenausbeuten sind jeweils die Fehler eingezeichnet.

Auch für das Hämocyanin der Languste stimmen Messung und Berechnung gut überein. Die gemessene Quantenausbeute liegt bei $\Phi_{\text{gem}} = 0,0130$ (\rightarrow 4.3.3.), die berechnete bei $\Phi_{\text{theo}} = 0,0164$. Damit ist auch hier die Abweichung kleiner als der Gesamtfehler der Berechnung von $\Delta\Phi_{\text{theo}} = 0,0039$ (Tab. 4.3).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Übereinstimmung von Theorie und Experiment sehr gut ist, besonders beim Vogelspinnen-Hämocyanin.

4.3.5. Klasseneinteilung der Tryptophane

In diesem Abschnitt soll für beide Hämocyane untersucht werden, ob die Fluoreszenz-Löschung eine Unterteilung der Tryptophane in verschiedene Klassen bewirkt.

Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum*

Zwischen den beiden beim Vogelspinnen-Hämocyanin untersuchten Konformationen bestehen keine wesentlichen Unterschiede. Daher wird im folgenden nur eine der beiden, die oxy-Struktur, herausgegriffen.

Beim Hämocyanin der Vogelspinne liegt eine Zweiteilung der Donor-Akzeptor-Abstände vor (Abb. 4.3 oben). Um den Förster-Abstand R_0 herum existiert eine Lücke, so daß sich die Abstände links bzw. rechts davon gruppieren. Dies läßt auch eine Zweiteilung der Tryptophane in Bezug auf ihre Fluoreszenz-Intensität erwarten. In Tab. 4.4 sind die berechneten Quantenausbeuten Φ für alle im Hämocyanin der Vogelspinne vorkommenden Tryptophane aufgeführt (Spalte 4). In Spalte 5 ist angegeben, um wieviel Prozent die Fluoreszenz-Intensität durch Förster-Transfer verringert wird.

gegenüberliegende Seite:

Tab. 4.4: Löschung der sieben Untereinheiten-Typen des Vogelspinnen-Hämocyanins

Die Nummerierung der Aminosäuren (Spalte 3) entspricht der *Limulus*-Sequenz [29]. Für die Rechnung nach Gleichung (4.15) wurden die Parameter $A = 24$, $D = 148$, $\Phi_0 = 0,0727$ und $R_0 = 2,27$ nm verwendet. Die Abstände r zwischen den Tryptophanen (Donoren) und den aktiven Zentren (Akzeptoren) wurden auf Grundlage der Röntgenstruktur des oxy-Hämocyanins von *Limulus polyphemus* ermittelt [29].

Untereinheit	Atom	Trp (Nr.)	Φ	Löschung %
a	C ₈₂	174	0,0014	99
	C ₈₂	176	0,0001	100
	S ₈	272	0,0061	92
	C ₈₂	326	0,0032	96
	C ₈₂	538	0,0027	97
b	C ₈₂	174	0,0014	99
	C ₈₂	176	0,0001	100
	C ₈₂	184	0,0102	86
	C ₈₂	326	0,0032	96
	C ₈₂	363	0,0003	100
	C ₈₂	538	0,0027	97
	C ₈₂	612	0,0556	24
c	C ₈₂	174	0,0014	99
	C ₈₂	176	0,0001	100
	C ₈₂	184	0,0103	86
	S ₈	272	0,0061	92
	C ₈₂	326	0,0032	96
	C ₈₂	363	0,0003	100
	C ₈₂	538	0,0027	97
d	C ₈₂	174	0,0014	99
	C ₈₂	176	0,0001	100
	S ₈	272	0,0061	92
	C ₈₂	326	0,0032	96
	C ₈₂	366	0,0015	98
	C ₈₂	538	0,0027	97
e	C ₈₂	174	0,0014	99
	C ₈₂	176	0,0001	100
	C ₈₂	184	0,0103	86
	S ₈	272	0,0061	92
	C ₈₂	326	0,0032	96
	C ₈₂	538	0,0027	97
f	C ₈₂	174	0,0014	99
	C ₈₂	176	0,0001	100
	C ₈₂	184	0,0103	86
	S ₈	272	0,0061	92
	C ₈₂	538	0,0027	97
g	C ₈	33	0,0642	12
	C ₈₂	174	0,0014	99
	C ₈₂	176	0,0001	100
	C ₈₂	184	0,0103	86
	S ₈	272	0,0061	92
	C ₈₂	326	0,0032	96
	C ₈₂	363	0,0003	100
	C ₈₂	538	0,0027	97

Die Berechnung liefert die erwartete Zweiteilung der Tryptophane in Bezug auf ihre Fluoreszenz-Intensität. In Tab. 4.4 werden bis auf zwei Tryptophane alle zu 86 – 100 % gelöscht. Die beiden kaum gelöschten Tryptophane liegen in den Untereinheiten b (Trp 612) bzw. g (Trp 33). Die Untereinheit b tritt im 24-mer zweimal auf, die Untereinheit g viermal (\rightarrow 2.2.2). Für diese sechs Tryptophane ergibt sich daraus ein Beitrag zur Gesamt-Fluoreszenz-Intensität ($\Phi_{\text{theo}} = 0,0057$) des oxy-Zustandes von

$$\frac{2 \cdot \Phi(\text{Trp b612}) + 4 \cdot \Phi(\text{Trp g33})}{148 \cdot \Phi_{\text{theo}}} = \frac{2 \cdot 0,0556 + 4 \cdot 0,0642}{148 \cdot 0,0057} = 0,44$$

Damit sind diese sechs Tryptophane für 44 % der berechneten Fluoreszenz-Intensität beim oxygenierten 24-mer verantwortlich. Die bei der Rechnung verwendeten Größen sind fehlerbehaftet. Zur Fehlerabschätzung wurden die Fehler der Ausgangsgrößen geschätzt (\rightarrow 4.3.3.) und die Fehlerfortpflanzung nach Gleichung (4.25) berechnet. Dabei ergab sich ein Gesamtfehler von $\Delta\Phi_{\text{theo}} = 0,0019$. Der Gesamtfehler läßt sich bzgl. der verwendeten Ausgangsgrößen aufschlüsseln (Tab. 4.5).

	angenommener Fehler	Fehlerfortpflanzung
Ausgangsgrößen		
deoxy-Quantenausbeute Φ_0	10 %	0,0006
Förster-Abstand R_0^6	55 %	0,0018
Abstände r_{ij}	0,02 nm	0,00003
Gesamt-Fehler $\Delta\Phi_{\text{theo}}$		0,0019

Tab. 4.5: Fehlerabschätzung bei der Löschung innerhalb des Vogelspinnen-Hämocyanins

Die Fehler wurden mit den Gleichungen (4.20) – (4.25) berechnet.

Der Gesamtfehler wird fast ausschließlich durch die Unsicherheit bzgl. R_0^6 bestimmt, die wiederum durch die Unsicherheit bzgl. κ^2 dominiert wird (\rightarrow 4.3.4., speziell Tab. 4.2). Auffällig ist weiterhin, daß die Fehler bei der Bestimmung der Donor-Akzeptor-Abstände sehr klein sind und somit keinen Einfluß auf den Gesamt-Fehler haben.

Hämocyanin der Languste *Panulirus interruptus*

Auch beim Hämocyanin der Languste liegt eine Zweiteilung der Donor-Akzeptor-Abstände vor (Abb. 4.3 unten). Die Lücke um den Förster-Abstand R_0 ist allerdings nicht so deutlich ausgeprägt wie beim Vogelspinnen-Hämocyanin. Die zu erwartenden Quantenausbeuten und Löschungen sind in Tab. 4.6 aufgelistet.

Untereinheit	Atom	Trp (Nr.)	Φ	Löschung %
a bzw. b	C _{δ2}	71	0,0186	65
	C _{δ2}	96	0,0477	9
	C _{δ2}	197	0,0002	100
	C _{δ2}	204	0,0049	91
	C _{δ2}	205	0,0119	77
	C _{δ2}	222	0,0043	92
	C _{δ2}	239	0,0424	20
	C _{δ2}	248	0,0066	88
	C _{δ2}	500	0,0108	80

Tab. 4.6: Löschung der Untereinheiten des Langusten-Hämocyanins

Für die Rechnung nach Gleichung (4.15) wurden die Parameter $A = 6$, $D = 54$, $\Phi_0 = 0,0527$ und $R_0 = 2,10$ nm verwendet. Die Abstände r zwischen den Tryptophanen (Donoren) und den aktiven Zentren (Akzeptoren) wurden auf Grundlage der Röntgenstruktur ermittelt.

Zwei der neun Tryptophane aus Tab. 4.6 werden kaum gelöscht: Trp 96 und Trp 239. Ihr Beitrag zur Gesamt-Fluoreszenz-Intensität des oxygenierten Hexamers ($\Phi_{\text{theo}} = 0,0164$) beträgt

$$\frac{6 \cdot \Phi(\text{Trp 96}) + 6 \cdot \Phi(\text{Trp 239})}{54 \cdot \Phi_{\text{theo}}} = \frac{6 \cdot 0,0477 + 6 \cdot 0,0424}{54 \cdot 0,0164} = 0,61$$

d.h. 61 %. Somit liegt auch hier die erwartete Zweiteilung der Tryptophane bzgl. ihrer Fluoreszenz-Intensität vor.

Die Fehlerfortpflanzung ergab einen Gesamtfehler von $\Delta\Phi_{\text{theo}} = 0,0039$, der sich auch hier bzgl. der verwendeten Ausgangsgrößen aufschlüsseln lässt (Tab. 4.7).

	angenommene Fehler	Fehlerfortpflanzung
Ausgangsgrößen		
deoxy-Quantenausbeute Φ_0	10 %	0,0016
Förster-Abstand R_0^6	55 %	0,0035
Abstände r_{ij}	0,02 nm	0,0001
Gesamt-Fehler $\Delta\Phi_{\text{theo}}$		0,0039

Tab. 4.7: Fehlerabschätzung bei der Löschung innerhalb des Langusten-Hämocyanins

Die Fehler wurden mit den Gleichungen (4.20) – (4.25) berechnet.

Wiederum wird fast der gesamte Fehler durch die Ungewissheit von R_0^6 bestimmt und die Beiträge der Abstandsfehler sind vernachlässigbar.

4.3.6. Einfluß der Beweglichkeit

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, welchen Einfluß die Beweglichkeit von Donoren und Akzeptoren auf die berechneten Quantenausbeuten haben kann. Dazu wurde die theoretische Betrachtung aus Abschnitt 4.3.4. für den Fall der freien Rotation von Donoren und Akzeptoren wiederholt.

Förster-Abstände

Im Falle der freien Rotation geht ein Orientierungsfaktor von $\kappa^2 = 2/3$ in die Berechnungen ein (Tab. 4.1), wodurch sich der Förster-Abstand R_0 ändert. Die Ausgangsgrößen, Ergebnisse und Fehler der erneuten Berechnung sind in Tab. 4.8 zusammengefaßt.

	<i>Eurypelma</i> 24-mer	<i>Panulirus</i> 6-mer	rel. Fehler %
Ausgangsgrößen			
Überlappungsintegral J ($10^{14} \cdot \text{nm}^4 / \text{M cm}$)	1,72	1,51	7
Orientierungsfaktor κ^2	2/3	2/3	50
Quantenausbeute Φ_0	0,0727	0,0527	10
Brechungsindex n	1,4	1,4	5
Ergebnis			
Förster-Abstand R_0^6	191 nm ⁶	122 nm ⁶	55
Förster-Abstand R_0	2,40 nm	2,23 nm	9

Tab. 4.8: Förster-Abstände bei freier Rotation der Donoren und Akzeptoren

Bei den Ausgangsgrößen hat sich gegenüber Tab. 4.2 lediglich der Orientierungsfaktor geändert (Tab. 4.1). Die Förster-Abstände wurden mit Gleichung (4.3) berechnet, die Fehler mit Gleichung (4.20).

Der größere Orientierungsfaktor führt bei beiden Hämocyaninen zu Förster-Abständen, die um 0,13 nm größer sind (Tab. 4.2). Die relative Änderung von R_0 fällt gering aus, da κ^2 nur mit der sechsten Wurzel zu R_0 beiträgt (Gleichung 4.3).

Theoretische Betrachtung und Vergleich mit der Messung

Die Berechnung der Löschung durch Förster-Transfer wurde mit den größeren Förster-Radien R_0 wiederholt. Gegenüber den Berechnungen aus Abschnitt 4.3.4. wurde ansonsten keine Ausgangsgröße verändert. Der Förster-Abstand R_0 hat keinen Einfluß auf die Werte der gemessenen Quantenausbeuten Φ_{gem} . Die Ausgangsgrößen, Ergebnisse und Fehler der erneuten Berechnung sind in Tab. 4.9 dargestellt.

	<i>Eurypelma</i> 24-mer		<i>Panulirus</i> 6-mer
	oxy	deoxy	deoxy
Ausgangsgrößen			
Anzahl der Akzeptoren A	24	24	6
Anzahl der Donoren D	148	148	54
deoxy-Quantenausbeute Φ_0	0,0727	0,0727	0,0527
Förster-Abstand R_0 in nm	2,40	2,40	2,23
theor. Betrachtung			
Quantenausbeute Φ_{theo}	0,0047	0,0049	0,0143
Fehler $\Delta\Phi_{\text{theo}}$	0,0016	0,0017	0,0034
Messung			
Quantenausbeute Φ_{gem}	0,0055	0,0055	0,0130
Fehler $\Delta\Phi_{\text{gem}}$	0,0008	0,0008	0,0020

Tab. 4.9: Berechnung der Löschung innerhalb des 24-meren Hämocyanins der Vogelspinne und des 6-meren Hämocyanins der Languste

Die Berechnungen der theoretisch zu erwartenden Fluoreszenz-Löschung durch Förster-Transfer wurden mit Gleichung (4.15) durchgeführt. Es wurde von freier Rotation der Donoren und Akzeptoren ausgegangen ($\kappa^2 = 2/3$; Tab. 4.1).

Aufgrund der größeren Förster-Radien ergibt sich bei den Berechnungen eine stärkere Löschung der Tryptophane. Die berechneten Quantenausbeuten sind dadurch gegenüber den Werten aus Tab. 4.3 etwas niedriger. Im Falle des *Eurypelma*-Hämocyanins führt dies zu einer Abweichung zwischen berechneter und gemessener Quantenausbeute von $\Delta\Phi = \Phi_{\text{gem}} - \Phi_{\text{theo}} = 0,0008$ (oxy-Konformation, Tab. 4.9). Im Falle von $\kappa^2 = 0,476$ ergab sich lediglich eine Differenz von $\Delta\Phi = 0,0002$ (\rightarrow 4.3.4.). Beim Hämocyanin der Languste verringert sich dagegen der Unterschied von $\Delta\Phi = 0,0034$ ($\kappa^2 = 0,476$; \rightarrow 4.3.4.) auf $\Delta\Phi = 0,0013$ ($\kappa^2 = 2/3$; Tab. 4.9).

Auch mit den größeren Förster-Radien stimmen für beide Hämocyanine berechnete und gemessene Quantenausbeuten innerhalb der Fehler überein.

4.3.7. Einfluß der Oligomerisierung

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluß benachbarte Untereinheiten auf die Fluoreszenz-Löschung haben können. Dazu wurden die Berechnungen aus Abschnitt 4.3.4. noch einmal durchgeführt, wobei aber für jedes Tryptophan nur das aktive Zentrum der selben Untereinheit als Akzeptor zugelassen wurde.

Förster-Abstände

Als Förster-Radien wurden die Werte aus Tab. 4.2 verwendet. Hierbei wurde davon ausgegangen, daß sich die Donoren und Akzeptoren nicht bewegen können, d.h. mit statistischer aber fester Orientierung vorliegen ($\kappa^2 = 0,476$).

Donor-Akzeptor-Abstände

Durch die Nicht-Berücksichtigung benachbarter Untereinheiten verändert sich die Anzahl der Akzeptoren pro Tryptophan auf $A = 1$. Dadurch ergaben sich für beide Hämocyanine andere Verteilungen der Donor-Akzeptor-Abstände (Abb. 4.5). Als Folge, daß nur Abstände innerhalb der Untereinheiten berücksichtigt werden, treten fast ausschließlich Abstände auf, die deutlich kleiner als der jeweilige Förster-Radius sind (Abb. 4.5). Die Unterschiede gegenüber Abb. 4.3, wo auch der Einfluß des Oligomeres berücksichtigt wurde, spielen sich dagegen nur bei Abständen ab, die deutlich größer als der jeweilige Förster-Radius sind.

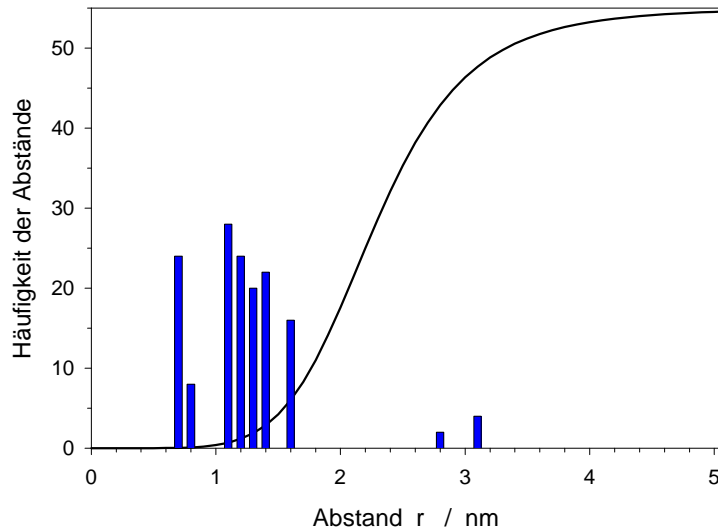
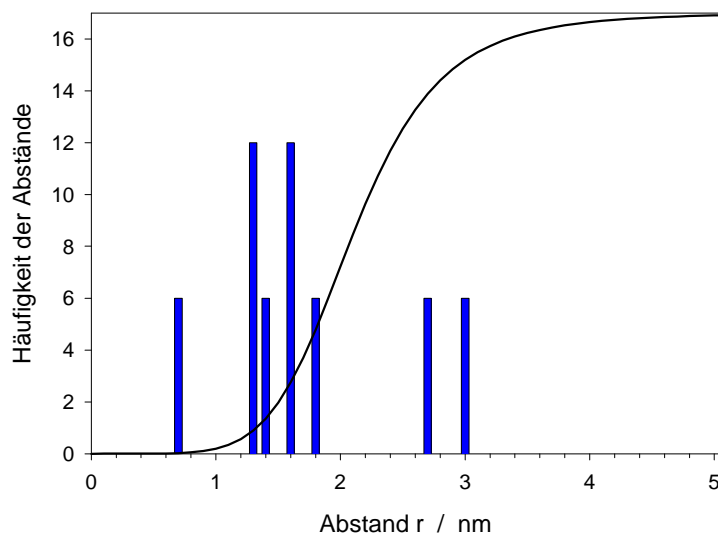
Eurypelma californicum*Panulirus interruptus*

Abb. 4.5: Verteilung der Donor-Akzeptor-Abstände innerhalb der Untereinheiten beim Hämocyanin der Vogelspinne und der Languste

Es wurden nur Donor-Akzeptor-Abstände innerhalb der Untereinheiten berücksichtigt. Die Abstände wurden in Klassen mit einer Breite von 0,1 nm eingeteilt und die Häufigkeit in Form blauer Balken dargestellt. Die durchgezogenen Kurven geben die Quantenausbeute eines Donor-Akzeptor-Paares als Funktion des Abstandes an. Sie wurden nach Gleichung (4.11) berechnet.

Eurypelma Die Abstände basieren auf der Röntgen-Kristallstruktur des oxy-Hämocyanins von *Limulus polyphemus* [29]. Als Förster-Abstand wurde $R_0 = 2,27$ nm verwendet.

Panulirus Die Abstände basieren auf der verbesserten Röntgen-Kristallstruktur [28]. Als Förster-Abstand wurde $R_0 = 2,10$ nm verwendet.

Theoretische Betrachtung und Vergleich mit der Messung

Die theoretische Betrachtung wurde pro Donor mit nur einem Akzeptor und den veränderten Donor-Akzeptor-Abständen wiederholt. Gegenüber den Berechnungen aus Abschnitt 4.3.4. wurde ansonsten keine Ausgangsgröße verändert. Auch die Werte der gemessenen Quantenausbeuten Φ_{gem} , die anhand der oligomeren Hämocyanine bestimmt wurden, bleiben unbeeinflusst (\rightarrow 4.3.3.). Tab. 4.10 faßt Ausgangsgrößen, Ergebnisse und Fehler zusammen.

	<i>Eurypelma</i> 24-mer		<i>Panulirus</i> 6-mer
	oxy	deoxy	deoxy
Ausgangsgrößen			
Anzahl der Akzeptoren A	1	1	1
Anzahl der Donoren D	148	148	54
deoxy-Quantenausbeute Φ_0	0,0727	0,0727	0,0527
Förster-Abstand R_0 in nm	2,27	2,27	2,10
theor. Betrachtung			
Quantenausbeute Φ_{theo}	0,0058	0,0061	0,0168
Fehler $\Delta\Phi_{\text{theo}}$	0,0019	0,0020	0,0038
Messung			
Quantenausbeute Φ_{gem}	0,0055	0,0055	0,0130
Fehler $\Delta\Phi_{\text{gem}}$	0,0008	0,0008	0,0020

Tab. 4.10: Berechnung der Löschung innerhalb der Untereinheiten

Die Berechnungen wurden mit Gleichung (4.15) für den Fall von statistischer aber fester Orientierung der Donoren und Akzeptoren ($\kappa^2 = 0,476$) durchgeführt. Es wurden nur Donor-Akzeptor-Paare innerhalb der Untereinheiten zugelassen.

Die Ergebnisse dieser Berechnung weichen nur minimal von den Werten ab, bei denen der Einfluß des Oligomers berücksichtigt wurde (Tab. 4.3). Die Abweichungen liegen für beide *Eurypelma*-Strukturen bei $\Delta\Phi = 0,0001$ und für *Panulirus* bei $\Delta\Phi = 0,0004$. Somit ändert sich nichts an der sehr guten Übereinstimmung der theoretischen Betrachtung mit den experimentellen Werten. Der Einfluß benachbarter Untereinheiten im Oligomer auf die Löschung der Tryptophane kann offensichtlich vernachlässigt werden.

4.4. Diskussion

4.4.1. Förster-Transfer im Ensemble

Bei der Beschreibung des Förster-Transfers (\rightarrow 4.1.3.) wurden für Ensemble-Messungen zwei Grenzfälle unterschieden: (1) ein Donor-Akzeptor-Paar mit festem Abstand r und festem Förster-Radius R_0 liegt in identischen Kopien vor, (2) Donoren und Akzeptoren zeigen keine Wechselwirkung, wodurch sich statistische Mittelwerte für r und R_0 ergeben.

Ensemble-Messungen zum intra-molekularen Förster-Transfer in Hämocyaninen stellen eine Mischform dar. Proteine sind formtreue Polymere, wodurch Abstand und Orientierung eines Donor-Akzeptor-Paares weitgehend erhalten bleiben. Die Tatsache, daß ein Ensemble von Einzel-Molekülen untersucht wird, ändert hieran nichts. Soweit besteht eine Übereinstimmung zum ersten Grenzfall. Allerdings enthalten Hämocyanine nicht nur ein Donor-Akzeptor-Paar, sondern eine größere Anzahl. Einerseits ist die Zahl der auftretenden Donor-Akzeptor-Paare noch abzählbar, so daß im Falle einer bekannten 3D-Struktur individuelle Abstände r_i angegeben werden können. Andererseits ist es nicht möglich, für jedes Donor-Akzeptor-Paar die Größen J , Φ_0 , κ^2 und n individuell zu bestimmen. Hier bleibt nur die Möglichkeit des statistischen Mittelwertes R_0 . Somit ist zur Analyse des Förster-Transfers in Hämocyaninen eine "gemischte" Theorie notwendig, die einerseits individuelle Abstände r_i berücksichtigt, andererseits einen mittleren Förster-Abstand R_0 verwendet. Eine solche Erweiterung von Försters Theorie konnte in Abschnitt 4.3.1. entwickelt werden. Die Notwendigkeit, Analysen mit einer solchen "gemischten" Theorie durchzuführen, verdeutlichen die Abbildungen 4.3 und 4.5. Sie zeigen, daß die Donor-Akzeptor-Abstände in Hämocyaninen nicht statistisch verteilt sind. Eine Analyse, die statistische Abstandsverteilungen voraussetzt, d.h. den zweiten Grenzfall zugrunde legt, führt daher zu Fehlinterpretationen. Ein solcher Fall wird in Abschnitt 4.4.7. diskutiert.

4.4.2. Hämocyanin der Vogelspinne

Die Messungen zeigen eine besonders starke Fluoreszenz-Löschung im Hämocyanin der Vogelspinne. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute sinkt von $\Phi_0 = 0,0727$ im deoxy-Zustand auf $\Phi_{\text{gem}} = 0,0055$ im oxy-Zustand (\rightarrow 4.3.3.). Die Werte stimmen recht gut mit früher veröffentlichten Quantenausbeuten von $\Phi_0 = 0,065$ bzw. $\Phi = 0,006$ überein [74]. Die theoretische Betrachtung, bei der ausschließlich Förster-Transfer als Löschmechanismus zugelassen wurde, kommt zum gleichen Ergebnis. Die berechneten Quantenausbeute für den oxy-Zustand liegen je nach zugrunde gelegter Struktur bei $\Phi_{\text{theo}} = 0,0057$ bzw. $0,0060$ (Tab. 4.3). Die Abweichungen zum Meßergebnis sind minimal und wesentlich kleiner als der erwartete Fehler (Tab. 4.3). Dies bedeutet:

- Die Fluoreszenz-Löschung im oxygenierten Hämocyanin der Vogelspinne kann vollständig durch Förster-Transfer erklärt werden.

- Die Annahme eines mittleren Förster-Abstandes für alle Donor-Akzeptor-Paare ist gerechtfertigt. Der angenommene Orientierungsfaktor ($\kappa^2 = 0,476$) setzt zwar eine statistische Verteilung der Orientierungen voraus, d.h. letztlich unendlich viele Teilchen (Tab. 4.1), aber die gute Übereinstimmung zeigt, daß auch mit 148 Donoren und 24 Akzeptoren eine Teilchenmittelung akzeptabel ist.

Von dem Hämocyanin des Pfeilschwanz-Krebse *Limulus polyphemus*, das die strukturelle Grundlage der hier durchgeführten Rechnungen bildet, existieren zwei Röntgen-Kristallstrukturen. Im einen Fall wurde oxy-Hämocyanin kristallisiert, im anderen Fall deoxy-Hämocyanin [27, 29]. Die theoretische Betrachtung wurde für beide Strukturen durchgeführt (\rightarrow 4.3.4.). Die beiden berechneten Quantenausbeuten unterscheiden sich nur minimal ($\Delta\Phi = 0,0003$) und sind innerhalb der Fehler identisch. Somit haben Konformationsänderungen, die das *Limulus*-Hexamer während der O_2 -Beladung durchführt, keinen Einfluß auf die Fluoreszenz-Löschung des Vogelspinnen-Hämocyanins. Dies gilt für die beiden Endzustände (vollständig oxygeniert bzw. deoxygeniert) und dürfte damit auch für die Zwischenstufen gelten. Daher hat die Art, wie die Konformationsänderung erfolgt, keinen Einfluß auf das Signal. Die Fluoreszenz-Löschung ist unabhängig vom Mechanismus der kooperativen Wechselwirkung.

Der Fehler der Berechnung, $\Delta\Phi = 0,0019$ bzw. $0,0021$, wird von drei Größen verursacht (Tab. 4.5): der Quantenausbeute Φ_0 , dem Förster-Radius R_0 und den Donor-Akzeptor-Abständen r_{ij} . Dominiert wird der Fehler vom Beitrag bzgl. R_0 . Dieser wird wiederum durch die Unsicherheit bzgl. des Orientierungsfaktors κ^2 bestimmt (Tab. 4.2). Somit wird auch der Gesamtfehler der Rechnung im wesentlichen durch die Ungewissheit von κ^2 hervorgerufen.

Besonders auffällig ist der geringe Beitrag vom Fehler der Abstände r_{ij} , der um zwei Größenordnungen kleiner ist und somit vollständig vernachlässigt werden kann (Tab. 4.5). Hier stellt sich die Frage, wieso der Einfluß von Δr auf die berechnete Quantenausbeute so gering ist. Dafür ist vor allem die starke Abstandsabhängigkeit des Energie-Transfers verantwortlich. In erster Näherung kann die Quantenausbeute $\Phi(r)$, beschrieben durch Gleichung (4.11) und dargestellt in den Abb. 4.3 und 4.5, in Näherung als Stufenfunktion angesehen werden. Die Lage der Stufe fällt mit dem Förster-Abstand zusammen. Dadurch trägt der Fehler einer Abstandsbestimmung nur dann zum Gesamtfehler bei, wenn die Stufe dabei überschritten wird. Dies ist in Abb. 4.6 veranschaulicht.

Exemplarisch wurden zwei Abstände gewählt (blau bzw. orange), um die Wirkung der Stufenfunktion zu demonstrieren. Eine kleine Unsicherheit Δr bei der Abstandsbestimmung (blau bzw. orange) hat keinen Einfluß auf die Quantenausbeute. Aber auch eine größere Unsicherheit (grau) trägt nur dann zum Gesamtfehler bei, wenn sie in der Nähe der Stufe und in Richtung der Stufe auftritt. So ist der große Fehler des blauen Balkens ohne Einfluß auf das Ergebnis. Beim großen Fehler des orange-farbenen Balkens macht sich nur der linke Teil bemerkbar. Da beim Hämocyanin der Vogelspinne aber kaum Donor-Akzeptor-Abstände in der Nähe der Stufe auftreten (Abb. 4.3), muß Δr sehr groß werden, bevor die Stufe überschritten wird.

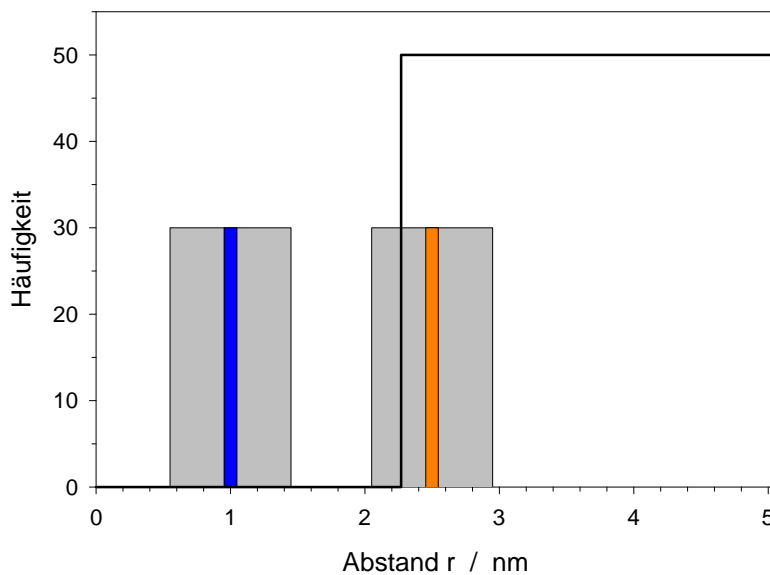


Abb. 4.6: Zum geringen Einfluß des Abstandsfehlers auf die berechnete Quantenausbeute

Die Quantenausbeute $\Phi(r)$ nach Gleichung (4.11) kann in 1. Näherung als Stufenfunktion betrachtet werden. Um die Wirkung dieser Stufenfunktion zu demonstrieren, wurden exemplarisch zwei Abstände gewählt (blau bzw. orange). Kleine Unsicherheiten bei der Abstandsbestimmung (blauer bzw. orange-farbener Balken) haben keinen Einfluß auf das Ergebnis. Größere Unsicherheiten (graue Balken) tragen nur dann zum Gesamtfehler bei, wenn sie in der Nähe der Stufe und in Richtung der Stufe auftreten. So hat hier nur der rechte grauen Balkens einen Einfluß auf das Ergebnis.

Dabei wurde angenommen, daß bei jeder einzelnen Abstandsbestimmung eine Unsicherheit von $\Delta r = 0,02$ nm besteht. Diese Unsicherheit ließe sich auch um den Faktor 25 erhöhen, und immer noch wäre der Beitrag von Δr zum Gesamtfehler deutlich kleiner als der Beitrag von ΔR_0 . Anders ausgedrückt: es ist für die Fluoreszenz-Löschung unwesentlich, ob das Hämocyanin Konformationsänderungen durchführt, bei denen sich die Donor-Akzeptor-Abstände um bis zu 0,5 nm verschieben können. Dies aber sind für die Änderung einer Konformation große Dimensionen. Dies verdeutlicht noch einmal, warum die Konformation keinen Einfluß auf die Löschung haben sollte.

Das Fehlen von Donor-Akzeptor-Abständen in der Nähe des Förster-Abstandes führt zu einer inhomogenen Abstandsverteilung (Abb. 4.3 oben). Die Abstände sind entweder deutlich kleiner als der Förster-Radius oder deutlich größer. Dies ließ zwei Tryptophan-Klassen bzgl. der Fluoreszenz-Löschung erwarten, was durch die theoretische Betrachtung auch bestätigt wurde. Es konnten sechs Tryptophane identifiziert werden, die kaum gelöscht werden und für 44 % der Gesamt-Fluoreszenz-Intensität im oxy-Zustand verantwortlich sind (Tab. 4.4). Die restlichen 142 Tryptophane werden durch die O_2 -Bindung sehr stark gelöscht. Illustriert wird dieser Sachverhalt durch Abb. 4.5 (oben), wo die Abstands-

verteilung nur die Donor-Akzeptor-Abstände innerhalb der Untereinheiten berücksichtigt. Die nur schwach gelöschten sechs Tryptophane erscheinen auf der rechten Seite, deutlich getrennt durch eine Lücke von den restlichen 142 Tryptophanen.

Fazit

Die Fluoreszenz-Löschung im oxygenierten Hämocyanin der Vogelspinne kann vollständig durch Förster-Transfer erklärt werden. Die Konformation hat keinen Einfluß auf die Löschung. Die Löschung zeigt eine Zweiteilung der Tryptophane in stark bzw. kaum löschrbare Tryptophane.

4.4.3. Hämocyanin der Languste

Die Fluoreszenz-Löschung des Langusten-Hämocyanins ist nicht so ausgeprägt wie beim Hämocyanin der Vogelspinne. Die gemessene Quantenausbeute sinkt bei Oxygenierung von $\Phi_0 = 0,0527$ auf $\Phi_{\text{gem}} = 0,0130$ (\rightarrow 4.3.4), d.h. "nur" auf ein Viertel. Wiederum kommt die theoretische Betrachtung zu einem Ergebnis, das innerhalb der Fehler mit dem experimentellen Wert identisch ist (Tab. 4.3). Damit konnte auch für das Hämocyanin einer zweiten Tierart gezeigt werden, daß die Fluoreszenz-Löschung bei Oxygenierung vollständig durch Förster-Transfer erklärt werden kann.

Im Vergleich zur Vogelspinne ergeben sich bei der Languste größere Abweichungen und Fehler. Diese lassen sich im Rahmen der Theorie verstehen. Die Abweichung zwischen der berechneten und der gemessenen Quantenausbeute beträgt 0,0034 bei *Panulirus* gegenüber 0,0002 bei *Eurypelma* (Tab. 4.3). Die Ursache hierfür liegt in der deutlich geringeren Anzahl an Donoren und Akzeptoren (Tab. 4.3). Dadurch ergibt sich eine schlechtere Statistik, so daß die Ensemble-Mittelung weniger gut anwendbar ist (\rightarrow 4.1.3.). Die idealisierte Rechnung mit einem mittleren Förster-Abstand R_0 kann die inhomogenen Verhältnisse im Hämocyanin weniger gut beschreiben.

Der Gesamtfehler der Rechnung ist mit $\Delta\Phi_{\text{theo}} = 0,0039$ größer als beim *Eurypelma*-Hämocyanin ($\Delta\Phi_{\text{theo}} = 0,0019$; oxy-Konformation, Tab. 4.3). Dies ergibt sich aus der Verteilungen der Donor-Akzeptor-Abstände, die keine so deutliche Lücke um den Förster-Radius bilden (Abb. 4.3 und 4.5). Dadurch kann sich eine Unsicherheit bzgl. des Förster-Abstandes R_0 , die auch hier den größten Teil des Gesamtfehlers ausmacht (Tab. 4.7), stärker bemerkbar machen.

Dennoch sind auch hier die Donor-Akzeptor-Abstände nicht gleichmäßig verteilt (Abb. 4.3 unten und Abb. 4.5 unten). Um den Förster-Abstand herum existiert eine kleinere Lücke, so daß sich wieder zwei Tryptophan-Klassen bilden: eine mit stark und eine mit kaum gelöschten Tryptophanen. Die Berechnungen zeigen, daß 12 der 54 Tryptophane nur schwach gelöscht werden und für 61 % der Gesamt-Quantenausbeute verantwortlich sind (Tab. 4.6). Die restlichen 42 Tryptophane werden stark gelöscht.

Dies erklärt auch, warum die Quantenausbeute des oxy-Hämocyanins von *Panulirus* größer ist ($\Phi_{\text{gem}} = 0,0130$) als von *Eurypelma* ($\Phi_{\text{gem}} = 0,0055$). Der

Anteil an stark gelöschten Tryptophanen ist kleiner. Bei der Vogelspinne enthielt die Klasse der stark gelöschten Tryptophane 142 von 148 Tryptophanen, bei der Languste sind es "nur" 42 von 54 Tryptophanen (Abb. 4.5).

Fazit

Auch für das Hämocyanin einer zweiten Tierart konnte gezeigt werden, daß Förster-Transfer vollständig für die Fluoreszenz-Löschung bei Oxygenierung verantwortlich ist. Die Unterschiede im Ausmaß der Löschung beider Hämocyanine lassen sich im Rahmen der erweiterten Förster-Theorie verstehen.

4.4.4. Einfluß der Beweglichkeit

Bei der theoretischen Betrachtung ist die Beweglichkeit der Donoren und Akzeptoren zu berücksichtigen. Die Beweglichkeit geht in Form des Orientierungsfaktors κ^2 in die Berechnungen ein (\rightarrow 4.1.3.). Bei den hier durchgeführten Ensemble-Messungen ist für den Fall der freien Rotation ein Wert von $\kappa^2 = 2/3$ zu verwenden, bei festen Orientierungen dagegen $\kappa^2 = 0,476$ (Tab. 4.1). Da diese Größe einer direkten Messung nicht zugänglich ist, muß sie geschätzt werden [61, 75].

Es ist offensichtlich, daß das aktive Zentrum (Abb. 2.3) mit seinen zwei Cu-Atomen, den sechs ligandierenden Histidinen und den zwei gebundenen Sauerstoff-Atomen nicht frei rotieren kann. Es ist vielmehr fest mit der Protein-Matrix verbunden. Sollte die Beweglichkeit der Fluorophore einen Einfluß auf den Energie-Transfer haben, kann dies nur über die Rotation der Tryptophane relativ zum Hämocyanin erfolgen. Die Beweglichkeit von Fluorophoren läßt sich mittels Fluoreszenz-Anisotropie untersuchen [61, 76]. Beim Vogelspinnen-Hämocyanin führt die Denaturierung zu einer Abnahme der Anisotropie, d.h. zu einer Zunahme der Beweglichkeit [47]. Somit liegen im nativen Hämocyanin die Tryptophane nicht frei beweglich vor.

Die theoretischen Betrachtungen wurden daher mit dem Wert für feste Orientierungen ($\kappa^2 = 0,476$) durchgeführt. Um dennoch einen möglichen Einfluß der Beweglichkeit zu untersuchen, wurden die Berechnungen für den Fall der freien Rotation mit $\kappa^2 = 2/3$ wiederholt (\rightarrow 4.3.6.). Zum Vergleich sind die mit beiden κ^2 -Werten erhaltenen Ergebnisse in Tab. 4.11 zusammengestellt.

	<i>Eurypelma</i> 24-mer		<i>Panulirus</i> 6-mer deoxy
	oxy	deoxy	
theor. Betrachtung			
Φ_{theo} mit $\kappa^2 = 0,476$	0,0057	0,0060	0,0164
Φ_{theo} mit $\kappa^2 = 2/3$	0,0047	0,0049	0,0143
Messung			
Φ_{gem}	0,0055	0,0055	0,0130

Tab. 4.11: Quantenausbeuten in Abhängigkeit vom Orientierungsfaktor
Zusammenstellung der Ergebnisse aus Tab. 4.3 und 4.9.

Für das *Eurypelma*-Hämocyanin liegt die gemessene Quantenausbeute zwischen den beiden berechneten. Beim *Panulirus*-Hämocyanin paßt dagegen der berechnete Wert bei freier Rotation besser. Es ist aber zu beachten, daß: (1) die Unterschiede klein ausfallen, (2) alle Unterschiede kleiner als die jeweiligen Fehler sind (Tab. 4.3 und 4.9) und (3) alle berechneten Quantenausbeuten innerhalb der Fehler mit den gemessenen übereinstimmen (Tab. 4.3 und 4.9). Somit lassen die Ergebnisse keine eindeutige Aussage über die Beweglichkeit von Donoren und Akzeptoren zu.

Fazit

Die Beweglichkeit von Donoren und Akzeptoren spielt eine untergeordnete Rolle.

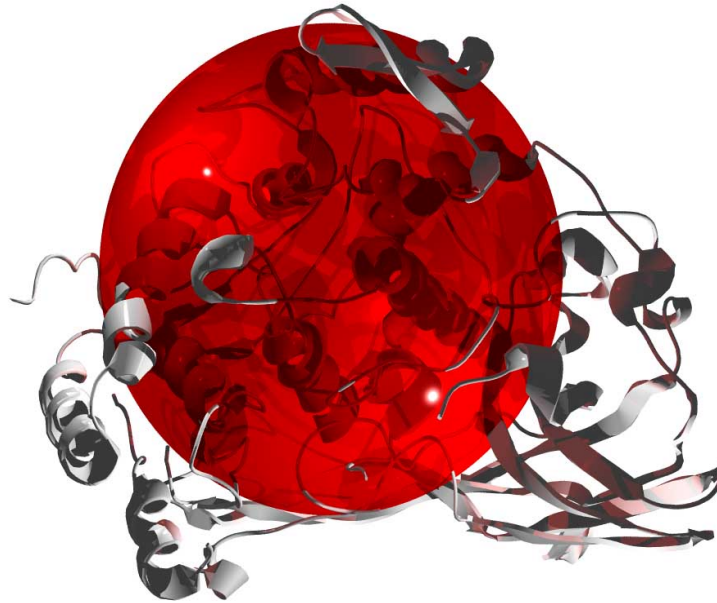
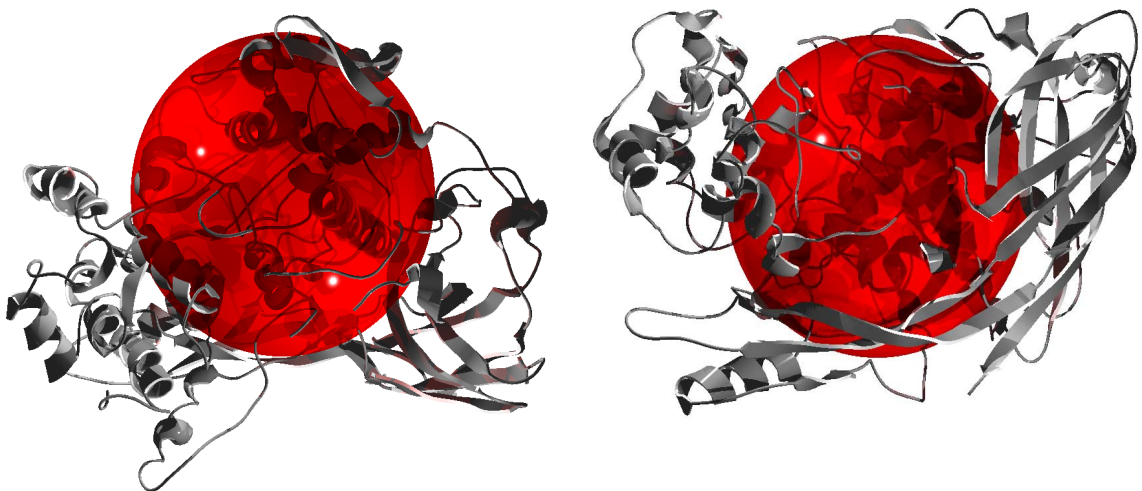
4.4.5. Einfluß der Oligomerisierung

Welchen Einfluß hat die Oligomerisierung auf die Fluoreszenz-Löschung? Anders gefragt: wird ein Tryptophan im wesentlichen durch das aktive Zentrum derselben Untereinheit gelöscht oder spielen benachbarte Untereinheiten auch eine wichtige Rolle? Der Einfluß benachbarter Untereinheiten auf die Löschung wurde durch Vergleichsrechnungen ermittelt. Im einen Fall wurden sämtliche Akzeptoren im Oligomer berücksichtigt (\rightarrow 4.3.4.), im anderen Fall blieb die Löschung der Tryptophane auf das aktive Zentrum der selben Untereinheit beschränkt (\rightarrow 4.3.7.). Im zweiten Fall gibt es also für jeden Donor genau einen Akzeptor. Die Ergebnisse mit und ohne Berücksichtigung des Oligomers sind in Tab. 4.12 zusammengestellt.

	<i>Eurypelma</i> 24-mer		<i>Panulirus</i> 6-mer
	oxy	deoxy	deoxy
theor. Betrachtung			
Φ_{theo} für das Oligomer	0,0057	0,0060	0,0164
Φ_{theo} für die Untereinheiten	0,0058	0,0061	0,0168
Messung			
Φ_{gem}	0,0055	0,0055	0,0130

Tab. 4.12: Einfluß der Oligomerisierung auf die Quantenausbeuten
Zusammenstellung der Ergebnisse aus Tab. 4.3 und 4.10. Den theoretischen Betrachtungen liegt ein Orientierungsfaktor von $\kappa^2 = 0,476$ zugrunde.

Die Nicht-Berücksichtigung der anderen Untereinheiten verändert in beiden Hämocyaninen die Quantenausbeuten nur minimal (*Eurypelma*: $\Delta\Phi = 0,0001$ bzw. *Panulirus*: $\Delta\Phi = 0,0004$), was vernachlässigt werden kann. Demzufolge werden die Untereinheiten unabhängig voneinander gelöscht. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der Förster-Abstand in einem Bereich um das aktive Zentrum liegt, der die Tryptophane derselben Untereinheit einschließt, aber nicht in benachbarte Untereinheiten hineinreicht. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 4.7 für beide Hämocyanine veranschaulicht, wo jeweils eine Kugel um das aktive Zentrum gezeichnet ist, deren Radius gerade dem Förster-Abstand R_0 entspricht. Die Kugel hüllt jeweils den größten Teil der Untereinheit ein, ohne aber über diese herauszuragen.

Eurypelma californicum*Panulirus interruptus***Abb. 4.7:****Der Förster-Radius in Bezug zur Größe der Untereinheiten**

Dargestellt sind jeweils die Untereinheiten a vom Hämocyanin der Vogelspinne und der Languste. Um das aktive Zentrum jeder Untereinheit ist eine Kugel eingezeichnet, deren Radius gleich dem Förster-Abstand ist. Die Kugeln hüllen den größten Teil der Untereinheiten ein, insbesondere Domäne 2 mit dem aktiven Zentrum, ohne aber über diese herauszuragen. Für *Eurypelma* lag der Förster-Radius bei $R_0 = 2,27$ nm, für *Panulirus* bei $R_0 = 2,10$ nm (Tab 4.2). Die Panulirus-Untereinheit ist zweimal dargestellt: von vorne (links) und um 90° nach hinten gedreht (rechts).

Aus den Röntgen-Kristallstrukturen ergeben sich Abstände zwischen den sechs Cu-Zentren im Hexamer von 4,6 nm – 6,8 nm [5, 26]. Folglich liegen die aktiven Zentren mehr als zwei Förster-Radien voneinander entfernt, so daß keine Überlappung der Kugeln stattfinden kann. Somit kann auch kein Tryptophan innerhalb von zwei Förster-Kugeln liegen. Aus dieser Tatsache ergeben sich drei wichtige Konsequenzen, die besprochen werden sollen.

- **Oligomerisierungsgrad**
Die Löschung ist unabhängig vom Oligomerisierungsgrad. Jedes Tryptophan kann nur durch das aktive Zentrum derselben Untereinheit gelöscht werden. Die Fluoreszenz jeder einzelnen Untereinheit wird dadurch innerhalb eines 24-mers in gleicher Weise gelöscht wie in einem 12-, 6- oder Monomer. Somit kann die Fluoreszenz-Löschung auch zur Untersuchung von Dissoziat oder aufgereinigten Untereinheiten verwendet werden.
- **Reihenfolge der O₂-Bindung**
In Abschnitt 2.1.2. wurden verschiedene Modelle zur kooperativen O₂-Bindung vorgestellt. Diese unterscheiden sich darin, wieviele Untereinheiten und in welcher Reihenfolge diese an einer kooperativen Bindung beteiligt sind. Da die Untereinheiten unabhängig voneinander gelöscht werden, ist die Löschung auch unabhängig davon, in welcher Reihenfolge die Untereinheiten innerhalb eines Oligomeres besetzt werden. Veranschaulicht wird dies in Abb. 4.8, wo die dargestellten Hämocyanin-Moleküle trotz verschiedener Bindungsstellen für die zwei Sauerstoff-Moleküle das gleiche Fluoreszenz-Signal liefern. Somit verhält sich das Fluoreszenz-Signal neutral bzgl. der verschiedenen Modelle zur kooperativen O₂-Bindung. Durch Messung von O₂-Bindungskurven mittels Fluoreszenz-Intensität wird keines der Modelle bevor- oder benachteiligt.

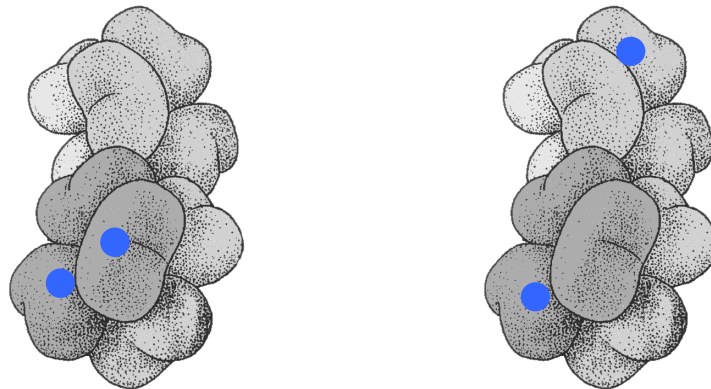


Abb. 4.8: Gleiches Fluoreszenz-Signal trotz verschiedener Bindungsstellen
Schematische Darstellung von zwei 12-meren Hämocyanin-Molekülen, die jeweils mit zwei Sauerstoff-Molekülen (blau) besetzt sind. Da die Fluoreszenz der Untereinheiten unabhängig voneinander gelöscht werden, liefern beide Hämocyanine das gleiche Fluoreszenz-Signal. Die Reihenfolge, in der die O₂-Bindungszentren besetzt werden, spielt keine Rolle.

- Linearität

Bei beiden Hämocyaninen wird davon ausgegangen, daß die Absorptionsbande bei 340 nm und die Fluoreszenz-Quantenausbeute lineare Funktionen der O₂-Beladung sind (→ 4.1.2.). Nach Gleichung (4.1) wäre somit auch das Überlappungsintegral J eine lineare Funktion der O₂-Beladung. Folglich sollte zwischen der Quantenausbeute Φ und dem Überlappungsintegral J ebenfalls ein linearer Zusammenhang bestehen. Den durchgeführten Berechnungen liegt Gleichung (4.11) zugrunde. Wird in diese die Gleichung (4.3) für den Förster-Abstand eingesetzt, ergibt sich

$$\Phi = \frac{\Phi_0}{1 + \frac{\text{konst} \cdot J}{r^6}} \quad (4.26)$$

Dies mag überraschen, denn Gleichung (4.26) liefert offensichtlich keinen linearen Zusammenhang zwischen Quantenausbeute und Überlappungsintegral. Beim Überlappungsintegral der Hämocyanine handelt es sich jedoch um einen Ensemble-Mittelwert, der auf der Ebene einzelner Donor-Akzeptor-Paare keine Entsprechung findet. Da ein aktives Zentrum nur in der mit Sauerstoff beladenen oder unbeladenen Form auftreten kann, sind Zwischenwerte nicht möglich. Somit kann auch das Überlappungsintegral eines einzelnen Donor-Akzeptor-Paares nur zwei Werte annehmen: den Maximalwert oder Null. Folglich liegen die Untereinheiten, die, wie gezeigt wurde, unabhängig voneinander gelöscht werden, ebenfalls nur in einer gelöschten oder ungelöschten Form vor. Beim Ensemble setzen sich die meßbaren Zwischenwerte aus unterschiedlichen Anteilen der beiden Spezies zusammen. Somit ist die Quantenausbeute für beide untersuchten Hämocyanine eine lineare Funktion der O₂-Beladung. Für das Hämocyanin von *Eurypelma* ist diese Linearität experimentell gezeigt worden, für das *Panulirus*-Hämocyanin bisher nicht [42].

4.4.6. Verallgemeinerung

In dieser Arbeit wurden die Hämocyanine von zwei Arthropoden, einer Vogelspinne und einer Languste, untersucht. Für beide Hämocyanine konnte gezeigt werden, daß Förster-Transfer für die Fluoreszenz-Löschung bei Oxygenierung verantwortlich ist und daß die Löschung ein lineares Signal der O₂-Beladung ist. Von großem Interesse ist die Frage, inwieweit diese Aussagen auch auf andere Hämocyanine übertragbar sind.

Förster-Transfer

Alle Hämocyanine, sowohl die von Arthropoden als auch die von Mollusken, besitzen gleiche aktive Zentren (→ 2.2.1.). Ebenfalls für alle Hämocyanine gleich sind die spektroskopischen Signale, die mit der O₂-Beladung verbunden sind: eine Absorptionsbande bei 340 nm und die Löschung der Tryptophan-

Fluoreszenz (\rightarrow 4.1.2.). Somit sind alle Voraussetzungen für Förster-Transfer vorhanden und dieser ist mit sehr großer Sicherheit bei allen Hämocyaninen für die Fluoreszenz-Löschung verantwortlich.

Linearität

Die Frage nach der Linearität von Fluoreszenz-Löschung und O_2 -Beladung läuft darauf hinaus, wie groß der Einfluß benachbarter Untereinheiten auf die Löschung ist. Die Wirkung benachbarter Untereinheiten kann dann vernachlässigt werden, wenn sich kein Tryptophan im Wirkungsbereich von mehreren aktiven Zentren befindet. Dies läßt sich auch so ausdrücken, daß die in Abb. 4.7 dargestellten Kugeln nicht mit den entsprechenden Kugeln benachbarter Untereinheiten überlappen dürfen. Findet doch eine Überlappung statt, sollten sich keine Tryptophane im Überlappungsbereich befinden. Hier muß aufgrund der verschiedenen Quartärstrukturen zwischen Arthropoden- und Mollusken-Hämocyaninen unterschieden werden (\rightarrow 2.2.1.). Die Abstände zwischen den aktiven Zentren innerhalb der Oligomere sind für beide Typen verschieden.

- Alle Arthropoden-Hämocyanine zeigen den gleichen Aufbau und besitzen ähnlich große Untereinheiten [21 – 23, 33]. Da die aktiven Zentren bei den beiden kristallisierten Hämocyaninen mehr als zwei Förster-Radien voneinander entfernt sind, ist davon auszugehen, daß dies auch bei allen anderen Arthropoden-Hämocyaninen der Fall ist. Somit sollte auch dort der lineare Zusammenhang bestehen.
- Der genaue Abstand von aktiven Zentren in Mollusken-Hämocyaninen ist nicht bekannt. Er soll grob über die Mantelfläche abgeschätzt werden: Mollusken-Hämocyanine haben die Form eines Hohlzylinders, wobei die Höhe $h \approx 18$ nm und der Durchmesser $d \approx 33$ nm beträgt (\rightarrow 2.2.1.). Die zehn Untereinheiten enthalten jeweils 7 – 8 Domänen. Da pro Untereinheit eine Domäne den Kragen bildet, entfallen im ungünstigsten Fall $n = 70$ aktive Zentren auf die Mantelfläche. Angenommen, die aktiven Zentren verteilen sich gleichmäßig über die Mantelfläche, so ergibt sich ein Abstand von

$$\sqrt{\frac{d \cdot \pi \cdot h}{n}} = \sqrt{\frac{33 \text{ nm} \cdot \pi \cdot 18 \text{ nm}}{70}} = 5,2 \text{ nm}$$

Dieser Wert ist groß genug, um eine Überlappung der Förster-Kugeln auszuschließen. Für das Hämocyanin von *Levantina hierosolima* konnte die Linearität von Löschung und O_2 -Beladung auch experimentell gezeigt werden [54]. Da die Struktur der Mollusken-Hämocyanine konserviert ist, deutet auch dies darauf hin, daß bei allen Mollusken-Hämocyaninen der lineare Zusammenhang besteht.

Fazit

Es ist davon auszugehen, daß die Fluoreszenz-Löschung bei Hämocyaninen allgemein auf Förster-Transfer zurückzuführen ist und ein lineares Beladungssignal darstellt.

4.4.7. Kommentar zu Ricchelli *et al.* (1987)

Im Jahr 1987 veröffentlichten Ricchelli *et al.* eine Arbeit zur Fluoreszenz-Löschung von Hämocyaninen, die Förster-Transfer als Löschprozess ausschloß [51]. Damit steht sie im Widerspruch zu den hier präsentierten Ergebnissen.

Veröffentlichung von Ricchelli *et al.*

Ricchelli *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit das Hämocyanin aus dem Tintenfisch *Octopus vulgaris*. Dabei verglichen sie die Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz in Abhängigkeit von drei verschiedenen Liganden im aktiven Zentrum. Als Liganden verwendeten sie O₂, CO und ANS (Anilino-naphthalen-sulfonsäure). Die Absorptionsspektren der liganden-besetzten aktiven Zentren zeigten in allen drei Fällen eine Überlappung mit den Fluoreszenz-Emissionsspektren der Tryptophane. Daher sollte in allen drei Fällen Förster-Transfer von den Tryptophanen auf die aktiven Zentren möglich sein. Aus den spektroskopischen Daten berechneten sie für jeden Liganden nach Gleichung (4.3) den Förster-Abstand R₀ (Tab. 4.13). Für den Fall, daß Förster-Transfer für die Fluoreszenz-Löschung verantwortlich ist, läßt sich die Transfer-Effizienz E aus den Quantenausbeuten berechneten [59, 61]:

$$E = 1 - \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (4.27)$$

Hierbei ist Φ die Quantenausbeute des liganden-besetzten Hämocyanins und Φ_0 die des liganden-freien (ungelöschten). Die von Ricchelli *et al.* bestimmten Werte sind in Tab. 4.13 angegeben. Weiterhin lösten sie Gleichung (4.2) nach dem Abstand r auf:

$$r = R_0 \cdot \sqrt[6]{\frac{1}{E} - 1} \quad (4.28)$$

Mit Gleichung (4.28) berechneten sie für jeden Liganden einen Abstand r (Tab. 4.13). Dieser eine Abstand r sollte stellvertretend die Abstände aller Donor-Akzeptor-Paare im Hämocyanin repräsentieren.

Ligand	Förster-Abstand R_0 / nm	Transfer-Effizienz E	Abstand r / nm
O ₂	2,5	0,67	2,2
CO	1,5	0,43	1,5
ANS	2,4	0,95	1,5

Abb. 4.13: Ergebnisse von Ricchelli *et al.* [51]

Ricchelli *et al.* untersuchten die Tryptophan-Fluoreszenz des Hämocyanins von *Octopus vulgaris* in Abhängigkeit von drei verschiedenen Liganden im aktiven Zentrum. Aus ihren spektroskopischen Daten berechneten sie R_0 und E und mit Hilfe von Gleichung (4.2) auch einen Abstand r. ANS steht für den Farbstoff Anilino-naphthalen-sulfonsäure.

Schließlich verglichen sie die Abstände r der drei Liganden: im Falle von CO und ANS ergaben sich identische Werte, wogegen für O₂ ein deutlich abweichender Wert berechnet wurde (Tab. 4.13). Daraus schlossen sie, daß im Falle von CO und ANS der gleiche Löschmechanismus vorliegen müsse (Förster-Transfer), bei O₂ als Ligand jedoch ein anderer.

Widerlegung

Die Gleichungen (4.2) bzw. (4.28) sind, wie in Abschnitt 4.1.3. ausgeführt wurde, nur für ein einzelnes Donor-Akzeptor-Paar gültig. Eine Übertragung auf Ensemble-Messungen ist möglich, aber nur für die zwei beschriebenen Grenzfälle: (1) identische Kopien, (2) statistische Abstandsverteilung. Hämocyanine stellen jedoch eine Mischform dar (\rightarrow 4.4.1.), wie die Abstandsverteilungen (Abb. 4.3 und 4.5) belegen. Somit führt die Anwendung von Gleichung (4.28) zu Resultaten, die sich nicht ohne weiteres interpretieren lassen.

Ein Rechenbeispiel soll dies verdeutlichen: Betrachtet werden soll ein Modellsystem, das aus fünf Donoren und einem Akzeptor besteht. Die Abstände zwischen dem Akzeptor und den Donoren sollen bei 0,5 / 1 / 1,5 / 2 und 2,5 nm liegen. Mit Gleichung (4.15) läßt sich die Löschung der Donoren berechnen und eine mittlere Quantenausbeute Φ_{theo} des Modellsystems angeben. Diese Berechnung wurde für zwei verschiedene Förster-Radien durchgeführt (Tab. 4.14). Anschließend wurde analog zu Ricchelli *et al.* verfahren: mit Gleichung (4.27) wurde die Transfer-Effizienz E und mit Gleichung (4.28) der Abstand r bestimmt (Tab. 4.14).

Obwohl die Donor-Akzeptor-Abstände in beiden Fällen gleich sind, ergibt die Anwendung von Gleichung (4.28) bei dem Modellsystem unterschiedliche Abstände r. Mit anderen Worten: der Abstand r hängt unerwarteterweise vom Förster-Radius R_0 ab, mit dem das System untersucht wird. Damit kann der Abstand r nicht als Stellvertreter aller Donor-Akzeptor-Abstände dienen.

Modellsystem	kleiner Förster-Abstand R_0	großer Förster-Abstand R_0
Ausgangsgrößen		
Anzahl der Akzeptoren A	1	1
Anzahl der Donoren D	5	5
ungelöschte Quantenausbeute Φ_0	0,5	0,5
Förster-Abstand R_0 in nm	1,5	2,5
theor. Betrachtung		
Quantenausbeute Φ_{theo}	0,2386	0,0756
analog zu Ricchelli <i>et al.</i>		
Transfer-Effizienz E	0,52	0,85
Abstand r in nm	1,48	1,88

Tab. 4.14: Abhängigkeit der Löschung eines Modellsystems vom Förster-Abstand

Das System soll aus fünf Donoren bestehen, die von einem Akzeptor über Förster-Transfer gelöscht werden. Die Donor-Akzeptor-Abstände liegen bei 0,5 / 1 / 1,5 / 2 und 2,5 nm. Die Quantenausbeute wurde mit Gleichung (4.15) für zwei verschiedene Förster-Radien berechnet. Die Transfer-Effizienz E wurde nach Gleichung (4.27) und der Abstand r nach Gleichung (4.28) berechnet.

Ricchelli *et al.* gingen davon aus, daß die Donor-Akzeptor-Abstände für alle drei Liganden gleich sind, wie in dem Modellsystem mit den fünf Donoren. Weiterhin gingen sie davon aus, daß eine vergleichende Analyse mit verschiedenen Förster-Radien auch sinnvolle Werte liefern würde. D.h. Werte des Abstandes r, die sich vergleichen lassen, also unabhängig vom Förster-Radius sein müssen. Wie das Beispiel mit dem Modellsystem zeigt, ist diese Annahme nicht zutreffend.

Tatsächlich scheidet also bei einem Vergleich der drei Liganden CO aus, da es gegenüber den beiden anderen Systemen einen um 1,0 nm bzw. 0,9 nm kleineren Förster-Radius aufweist (Tab. 4.13). O₂ und ANS sollten bis zu einem gewissen Grade vergleichbar sein, da sie ähnliche R₀-Werte zeigen (R₀ = 2,5 nm bzw. 2,4 nm). Der dennoch zu beobachtenden Unterschied in der Transfer-Effizienz E bzw. des Abstandes r bei beiden Liganden könnte auf die Modifikation des ANS-Hämocyanins zurückzuführen sein. Bei diesem wurden zuerst die Cu-Atome der aktiven Zentren entfernt (apo-Hämocyanin), um Platz für die anschließende Bindung des ANS zu schaffen. Offenbar hatten diese Eingriffe größere Nebenwirkungen als erhofft.

5. Konformation - Ensemble

5.1. Einleitung

Dieses Kapitel behandelt den Nachweis und die Charakterisierung verschiedener Konformationen auf der Ensemble-Ebene. Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Tuzek (Anorganische Chemie, Universität Mainz; jetzt Anorganische Chemie, Universität Kiel) durchgeführt.

5.1.1. Nachweis verschiedener Konformationen

Obwohl an Arthropoden-Hämocyaninen seit über 30 Jahren intensiv geforscht wird, ist der direkte Nachweis verschiedener Konformationen nur in sehr wenigen Fällen gelungen. Die veröffentlichten Resultate sind in Tab. 5.1 zusammengefaßt:

Tierart	Methode	Literatur
<i>Eurypelma californicum</i>	Röntgen-Kleinwinkelstreuung Analytische Ultra-Zentrifugation Fluoreszenz-Markierung	[69] [77] [78, 79]
<i>Helix pomatia</i>	Stopped-Flow (Dissoziation)	[80]
<i>Homarus americanus</i>	Röntgen-Kleinwinkelstreuung	[81]
<i>Limulus polyphemus</i>	Farbstoff-Bindung Stopped-Flow (Dissoziation)	[45] [80]
<i>Panulirus interruptus</i>	Antikörper-Bindung	[82]
<i>Panulirus japonicus</i>	Farbstoff-Bindung	[83]

Tab. 5.1: Übersicht der bisher veröffentlichten Arbeiten, die experimentell verschiedene Konformationen bei Hämocyaninen nachwiesen

In den meisten Fällen wurden Konformationsunterschiede zwischen der oxy- und deoxy-Form nachgewiesen. Bemerkenswerter Weise ließen sich mit der Röntgen-Kristallstruktur-Analyse, bei der die eindeutigsten Ergebnisse erwartet wurden, nur sehr kleine Unterschiede in der Tertiär- und Quartär-Struktur feststellen: das homo-Hexamere der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* (→ 2.2.2.) zeigt in der oxy-Form nur einen reduzierten Cu-Cu-Abstand, der auf die Bindung des Sauerstoffes zwischen den beiden Atomen zurückzuführen ist [29]. Als Folge davon vergrößert sich die Bindungslänge zwischen den Cu-Atomen und den Histidinen im aktiven Zentrum [29].

Die Existenz verschiedener Konformationen läßt sich auch indirekt aus Beladungssignalen ableiten: Für die kooperative Sauerstoff-Bindung von neun verschiedenen Hämocyaninen liefert das "Nesting-Modell" eine sehr gute Beschreibung (→ 2.2.1.). Das Modell basiert auf der Schachtelung von zwei MWC-Modellen, wobei für jede Untereinheit vier, für das Gesamt-Molekül sechs verschiedene Konformationen postuliert werden (→ 2.1.2.).

Die Bindung von Sauerstoff ist bei Atmungsproteinen häufig an die Freisetzung von Protonen gekoppelt: Bohr-Effekt [11, 12]. Die Abgabe von Protonen ist somit primär ein Beladungseffekt, kein Konformationssignal. Allerdings sollte bei einem reinen Beladungssignal das Verhältnis von freigesetzten Protonen zu gebundenem O₂ konstant sein. Bei der Oxygenierung des *Eurypelma*-Hämocyanins variiert dieses Verhältnis [84]. Es kann sogar zu einer Vorzeichenänderung kommen, d.h. einer H⁺-Aufnahme bei O₂-Bindung. Daraus wurde auf die Existenz von wenigstens vier verschiedenen Konformationen geschlossen.

5.1.2. Ziele

Das Nesting-Modell sagt für das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* sechs verschiedene Konformationen voraus. Diese sind bisher nur grob über die Röntgen-Kleinwinkel-Streuung, Analytische Ultra-Zentrifugation und Fluoreszenz-Markierung charakterisiert worden. Die Charakterisierung beschränkte sich ausschließlich auf die Quartär-Struktur. Es wurden keinerlei Untersuchungen zu Änderungen des aktiven Zentrums durchgeführt.

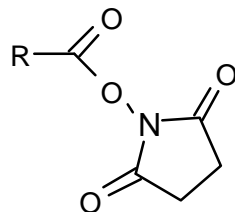
Ziel dieses Kapitels ist es, die Konformationen des oxy- und deoxy-Zustandes besser zu charakterisieren, wobei auch die aktiven Zentren berücksichtigt werden sollten. Mit den meisten Methoden sind aber Experimente bei verschiedenen O₂-Konzentrationen nicht oder nur schwer zu realisieren. Dieses Problem sollte dadurch umgangen werden, daß die Konformationen durch Crosslinker im oxy- und deoxy-Zustand fixiert werden. Anschließend sollten die "eingefrorenen" Strukturen bei O₂-Konzentrationen charakterisiert werden, die für das jeweilige Meßverfahren geeignet sind.

5.1.3. Modifikation von Proteinen

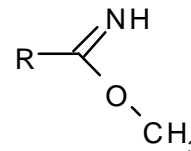
Für zahlreiche Anwendungen, z.B. die Markierung mit Farbstoffen oder die Quervernetzung mit Crosslinkern, ist die Modifikation von Proteinen wünschenswert. Proteine besitzen i.a. keine reaktiven Gruppen. Daher werden zur Modifikation aktivierte Farbstoffe bzw. Crosslinker verwendet. Diese enthalten Reste, die mit dem Protein reagieren können. Auf Seiten des Proteins kommen für die Reaktion vor allem Amino- und Thiol-Gruppen in Frage, aber auch Reaktionen mit Carboxylgruppen oder C-H-Bindungen sind möglich. In dieser Arbeit wurden nur Modifikationen an NH_2 -Gruppen vorgenommen. Daher sollen die wichtigsten amino-reaktiven Reste vorgestellt werden.

Modifikation von Aminogruppen

Zur Modifikation von NH_2 -Gruppen müssen diese unprotoniert vorliegen [62]. Dadurch richtet sich der optimale pH-Wert für die Kopplung nach dem pK_a -Wert des Amins. Dieser liegt für α -Amine (N-Terminus) bei $\text{pK}_a \approx 7$, wogegen die ϵ -Aminogruppen der Lysine einen $\text{pK}_a > 10$ besitzen [62]. Bei Proteinen reagieren bevorzugt die Lysin-Seitenketten [85]. Folglich sollte die Kopplung bei einem möglichst alkalischen pH-Wert stattfinden. Jedoch tritt bei den meisten Reagenzien als Konkurrenz-Reaktion Hydrolyse auf, die ebenfalls mit steigendem pH-Wert zunimmt [85]. Die Kopplungen werden in der Praxis daher zwischen pH-Werten von 7,0 und 10,0 durchgeführt [62, 85]. Als reaktive Gruppen kommen Isothiocyanate, Sulfonylchloride, aktivierte Carboxylsäuren, gemischte Anhydride und NHS-Ester zum Einsatz [62, 86].



NHS-Ester



Imido-Ester

Abb. 5.1: reaktive Gruppen zur Modifikation von Aminogruppen

R = Rest, der an die Aminogruppe eines Proteins gebunden werden soll (z.B. Fluorophor oder Crosslinker)

NHS = N-Hydroxy-succinimid

- Isothiocyanat

Bei der Reaktion von Isothiocyanaten ($\text{R-N}=\text{C}=\text{S}$) mit Aminen bilden sich Thioharnstoffe [62, 63]. Die Kopplung erfordert meist einen höheren pH-Wert ($\text{pH} > 9,0$) [62]. Isothiocyanate sind die am weitesten verbreiteten Gruppen zur Modifikation von Aminen [62].

- **NHS-Ester**
Die NHS-Ester (N-Hydroxy-succinimid-Ester; Abb. 5.1) reagieren bevorzugt mit primären Aminen, wobei sich eine Peptidbindung ausbildet [63, 85]. Sowohl bei der Kopplung als auch bei der Hydrolyse wird die NHS-Gruppe abgespalten [85]. Die Kopplung wird typischerweise bei pH = 8,5 (7-9) durchgeführt [62, 85].
- **Imido-Ester**
Imido-Ester (Abb. 5.1) reagieren sehr selektiv mit primären Aminen unter Bildung eines Imidoamids [85]. Die Reaktion wird meistens bei pH = 8,5 – 9,0 durchgeführt [85]. Das Produkt ist im Alkalischen jedoch nicht stabil, es hydrolysiert langsam [85].
- **Aldehyd**
Bei der Reaktion von Aldehyden (R-CHO) mit primären Aminen bildet sich zunächst eine Schiffsche Base, die dann zu einem Alkylamin reduziert wird [62].

Quervernetzung

Für die Quervernetzung von Proteinen existiert inzwischen eine relativ breite Palette an Crosslinkern [62, 85 – 87]. Dabei gibt es eine Reihe von Parametern, die bei der Auswahl der Crosslinker für eine konkrete Fragestellung zu berücksichtigen sind.

- **Anzahl der funktionellen Gruppen**
Zur Quervernetzung von Proteinen werden üblicherweise bifunktionelle Crosslinker verwendet. Sie verbinden zwei mehr oder weniger benachbarte Seitenketten. Dadurch werden Konformationsänderungen verhindert, die diese beiden Reste voneinander entfernen würden. Es gibt auch Beispiele, in denen monofunktionelle Crosslinker die intra-molekulare Beweglichkeit unterbunden haben, im allgemeinen sind diese aber weniger gut geeignet [46].
- **homo- / hetero-funktionelle Gruppen**
Bei bifunktionellen Crosslinkern besteht die Möglichkeit, die zwei funktionellen Gruppen gleich (homo) oder unterschiedlich (hetero) zu wählen. Im Falle von homo-funktionellen Gruppen reagieren diese vorzugsweise intra-molekular [62, 87]. Bei hetero-funktionellen Crosslinkern findet überwiegend inter-molekulare Vernetzung statt [62, 87]. Diese Art von Crosslinkern ist also gut für die Kopplung von zwei verschiedenen Molekülen geeignet [62].
- **NH₂- / SH-reaktiv**
Die Reaktion von Crosslinkern mit Aminogruppen lässt sich leicht kontrollieren und die gebildeten Produkte sind stabil. Bei der Vernetzung von Thiolgruppen ist die Reaktion schwerer zu kontrollieren und die Produkte sind nicht im gleichen Maße stabil (die Oxidation ist i.a. reversibel) [62]. Daher sind, sofern keine weiteren Beschränkungen vorliegen, amino-reaktive Crosslinker vorzuziehen.

- **Löslichkeit**
Viele Crosslinker sind und waren (vor allem in den Anfängen) hydrophob und daher nur in organischen Lösungsmitteln löslich. Um in physiologischem Milieu arbeiten zu können, sollten die Crosslinker wasserlöslich sein. Inzwischen sind viele der Crosslinker in einer modifizierten und dadurch wasserlöslichen Form erhältlich (spez. der Firma Pierce) [86, 87].
- **spaltbare Gruppen**
Es gibt Crosslinker bei denen sich die Vernetzung rückgängig machen lässt. Diese Crosslinker enthalten eine spaltbare Gruppe im Verbindungsteil. Dabei handelt es sich entweder um eine Glykol-Struktur, die mit Periodat oxidativ gespalten werden kann, oder es liegt eine Disulfid-Brücke vor, die reaktiv spaltbar ist [63, 87].
- **Abstand**
Ein wichtiger Punkt bei der Auswahl ist der Abstand zwischen den reaktiven Gruppen. Wird er zu klein gewählt kann unter Umständen keine Vernetzung stattfinden, wird er zu groß gewählt kann die Beweglichkeit der gekoppelten Proteine unerwünscht hoch sein.

5.1.4. Quervernetzung von Hämocyaninen

Es sollte versucht werden, durch intra-molekulare Vernetzung die Beweglichkeit des Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* vollständig zu unterbinden. Für die Quervernetzung kommen vor allem Amino- und Thiol- Gruppen in Frage (→ 5.1.3.). Abb. 5.2 soll einen Eindruck vermitteln, welche Seitenketten hierfür besser geeignet sind. An der Oberfläche des Hämocyanins sind kaum freie Cysteine zugänglich. Dagegen stehen zahlreiche Lysine als potentielle Reaktionspartner zur Verfügung. Daher wurden für die Quervernetzung des Hämocyanins amino-reaktive Crosslinker ausgewählt. Insgesamt richtete sich die Auswahl der Crosslinker nach folgenden Kriterien (→ 5.1.3.): bi-funktional, homo-funktional, NH_2 -reaktiv, wasserlöslich, nicht spaltbar. Unter den kommerziell erhältlichen Crosslinkern, die diese Kriterien am besten erfüllten, wurde eine Auswahl getroffen, die sich am Abstand der aktivierten Reste orientierte (Tab. 5.2). Der Abstand wurde von 0,64 nm bis 1,61 nm in ungefähr 0,15 nm-Schritten variiert. Insgesamt wurden sieben Crosslinker untersucht.

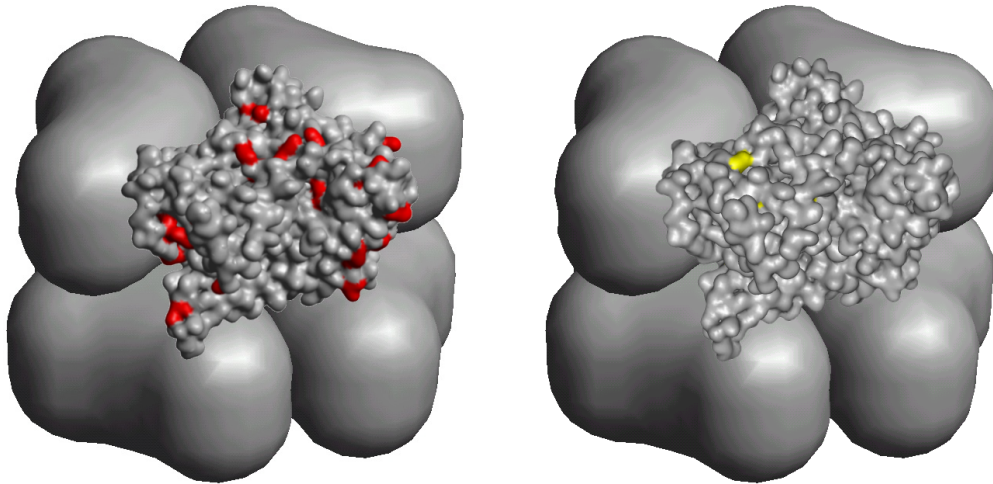


Abb. 5.2: Lage der Lysine und Cysteine in der Untereinheit a des Vogelspinnen-Hämocyanins

Dargestellt sind schematisch zwei Hexamere, mit jeweils einer Untereinheit in ihrer drei-dimensionalen Struktur (van der Waals-Radien). Die Struktur der Untereinheit (Typ a) ist ein Modell. Sequenz und Struktur sind Voit *et al.* (2000) entnommen [40]. Links wurden die Lysine rot gefärbt, rechts die Cysteine gelb. Für die Fixierung von Konformationen erscheinen die Lysine wesentlich besser geeignet.

Crosslinker	Abstand nm	reaktive Gruppen 2 x
BS ³	1,14	NHS-Ester
DMP	0,92	Imido-Ester
DSG	0,77	NHS-Ester
Glutaraldehyd	0,77	Aldehyd
Sulfo-BSOCOES	1,30	NHS-Ester
Sulfo-DST	0,64	NHS-Ester
Sulfo-EGS	1,61	NHS-Ester

Tab. 5.2: Die verwendeten Crosslinker

BS ³	Bi-(sulfosuccinimidyl)-suberat
DMP	Di-methyl-pimelimidat
DSG	Di-succinimidyl-glutarat
Sulfo-BSOCOES	Bis-(2-(sulfosuccinimido-oxycarbonyloxy)-ethyl)-sulfon
Sulfo-DST	Disulfosuccinimidyl-tartrat
Sulfo-EGS	Ethylen-glykol-bis-(sulfo-succinimidyl-succinat)

Es ist bereits früher versucht worden, Hämocyanine mit Crosslinkern zu fixieren (Tab. 5.3). Dabei wurde ein Arthropoden-Hämocyanin, das auch hier verwendete der Vogelspinne *Eurypelma californicum*, und ein Mollusken-Hämocyanin, von der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (Tab. 2.2), untersucht. Bei den meisten Crosslinkern handelte es sich um amino-reaktive Reagenzien. Sie waren in der Regel spaltbar und hatten einen Abstand der reaktiven Gruppen von $\approx 1,1$ nm.

Hämocyanin	Crosslinker	Abstand nm	reaktive Gruppen 2 x	Literatur
<i>Eurypelma californicum</i>	DMS	1,1	Imido-Ester	[88, 89]
	DTBP	1,2	Imido-Ester	[88, 89]
	DTSSP	1,2	NHS-Ester	[88]
<i>Helix pomatia</i>	DMS	1,1	Imido-Ester	[46]
	MAI	-	1 x Imido-Ester	[46]
	Chlorhexidin-Diacetat	$\approx 2,3$	Chlorphenol	[90]

Tab. 5.3: Übersicht der bisher veröffentlichten Arbeiten zur Quervernetzung von Hämocyaninen

DMS Di-methyl-subimidat

DTBP Di-methyl-3,3'-di-thio-bis-propionimidat

DTSSP 3,3'-Di-thio-bis-(sulfo-succinimidyl-propionat)

MAI Methyl-aceto-imidoester (mono-valent)

Beim Crosslinker Chlorhexidin-Diacetat findet keine kovalente Verknüpfung statt: die beiden Chlorphenol-Gruppen wechselwirken hydrophob mit dem Protein.

Es ist jedoch in keiner der Arbeiten gelungen, die Konformationen vollständig zu fixieren. In allen Fällen blieb eine mehr oder weniger große "Rest-Kooperativität" bestehen. Daher war es auch nie möglich, mit Crosslinkern die Konformationen des oxy- und deoxy-Zustandes zu charakterisieren. Weiterhin ist es nur in einem Fall gelungen, zwischen oxygeniert und deoxygeniert vernetzten Proben zu unterscheiden [46].

5.2. Methoden

5.2.1. Quervernetzung

Alle Crosslinker (CL) enthielten reaktive Gruppen, die in der Lage waren, mit Aminogruppen zu reagieren. Daher konnte kein Tris-Puffer verwendet werden (→ 3.2.1.). Für die Vernetzungsreaktionen wurde Borat-Puffer verwendet.

Borat-Puffer	25 mM	Borsäure / NaOH, pH = 8,5 (bei 20 °C)
	5 mM	CaCl ₂
	5 mM	MgCl ₂

Das Hämocyanin lag zunächst in Tris-Puffer vor. Es wurde durch Ultra-Zentrifugation mit Borat-Puffer umgepuffert bis die Tris-Konzentration unter 5 pM lag. Die Vernetzungen wurden mit oxy- und deoxy-Hämocyanin durchgeführt (→ 4.2.1.). Die Ansätze bestanden aus Hämocyanin-Lösung (Volumen $V = 50 \mu\text{L}$, Konzentration $c = 3 \text{ mg/mL}$) und Crosslinker-Lösung ($V = 30 - 100 \mu\text{L}$, $c = 1 - 20 \text{ mM}$). Diese wurden bei Raumtemperatur ohne Schütteln 30 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Tris-Puffer abgebrochen ($V = \text{ad } 0,6 \text{ mL}$; → 3.2.1.) und das Gemisch für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden deoxy-Proben wieder oxygeniert, sämtliche Ansätze durch zweimalige Ultra-Zentrifugation mit Tris-Puffer gereinigt und analysiert.

Der Crosslinker DSG ist schlecht wasserlöslich. Daher wurde mit Dimethylsulfoxid zunächst eine konzentrierte Lösung angesetzt ($c = 10 \text{ mM}$) und diese mit Puffer verdünnt.

5.2.2. Elektrophorese

Mit drei verschiedenen Elektrophorese-Verfahren wurden Struktur und Stabilität der quervernetzten Hämocyanine (Hc) überprüft.

denaturierende Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Acrylamid-Stammlösung enthielt 30 % Acrylamid und 0,8 % Bis-acrylamid. Das Sammelgel enthielt 3 % Acrylamid, das Trenngel 7,5 %. Sauerstoffradikale wurden mit TEMED entfernt, die radikalische Polymerisation mit APS gestartet.

Sammelgel	125 mM	Tris / HCl, pH = 6,8
	10 %	Acrylamid-Stammlösung
	0,2 %	SDS
	0,4 %	TEMED
	0,006 %	APS

Trenngel	375 mM	Tris / HCl, pH = 8,8
	25 %	Acrylamid-Stammlösung
	0,2 %	SDS
	0,2 %	TEMED
	0,006 %	APS

Vor dem Auftragen wurde die Hämocyanin-Lösung 1:2 mit Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt.

Denaturierungspuffer	30 mM	Tris / HCl, pH = 6,8
	1,25 %	SDS
	2,5 %	β-Mecaptoethanol
	5 %	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau

Das Auftragsvolumen betrug 20 µL. Pro erwarteter Bande wurden ca. 2 µg Protein aufgetragen ($c(Hc) = 0,5 - 1 \text{ mg/mL}$). Als Marker wurde *high molecular weight standard mixture* verwendet, die Protein-Standards im Bereich 30 – 200 kg/mol enthält.

Lauf-Puffer	188 mM	Glycin / NaOH, pH = 8,3
	25 mM	Tris
	0,1 %	SDS

Die Elektrophorese wurde bei 20 °C durchgeführt. Im Sammelgel wurde eine Spannung von 80 V angelegt, im Trenngel 100 V. Sobald die Bromphenolblau-Banden den unteren Rand des Geles erreicht hatten, wurde die Elektrophorese abgebrochen. Inkubation für 30 min in Färbelösung führte zum Anfärben des Gels und zur räumlichen Fixierung der Proteine.

Färbelösung	50 %	Methanol
	10 %	Eisessig
	0,2 %	Coomassie-Blau

Anschließend wurde die Gel-Matrix in Entfärbelösung über Nacht entfärbt.

Entfärbelösung	40 %	Methanol
	10 %	Eisessig

native Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die native Gel-Elektrophorese unterschied sich nur in wenigen Punkten von der denaturierenden: Im Ansatz für die Gele wurde das SDS weggelassen und Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 verwendet. Anstelle eines Denaturierungspuffers wurde ein nativer Probenpuffer verwendet.

Probenpuffer	50 %	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau

Die Proben wurden 3:4 mit nativem Probenpuffer versetzt und nicht erhitzt. Beim Laufpuffer wurde ebenfalls kein SDS verwendet. Die native Gelelektrophorese wurde im Kühlraum bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Alle weiteren Schritte entsprachen den oben beschriebenen.

Immun-Gel-Elektrophorese

Hierbei handelt es sich um eine zwei-dimensionale Elektrophorese. Für die erste Dimension wurde ein 6,5 x 15 cm großes Agarose-Gel hergestellt.

1. Agarose-Gel	1 %	Agarose
	0,4 %	Natrium-Veronal
	0,08 %	Veronal

Aus dem Gel wurden drei Löcher gestanzt: zwei für Bromphenolblau-Lösung ($V = 2 \mu\text{L}$) und eins in der Mitte für die Probe ($1 \mu\text{g}$ pro zu erwartendem Gipfel, $V = 4 \mu\text{l}$). Das Gel wurde am Rand mit Filterpapier als Pufferbrücke bedeckt.

Laufpuffer	0,4 %	Natrium-Veronal
	0,08 %	Veronal

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 600 V für 30 min durchgeführt. Anschließend wurde der etwa 1 cm breite Probenstreifen ausgeschnitten und ein zweites Agarose-Gel (4,5 x 5 cm) angegossen.

2. Agarose-Gel	1 %	Agarose
	0,4 %	Natrium-Veronal
	0,08 %	Veronal
	2,5 %	Antiserum

Die zweite Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 300 V für 12 – 18 h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 5 min mit Papiertüchern getrocknet, für 10 min in 0,6 % NaCl-Lösung gewaschen. Beide Schritte wurde noch zweimal wiederholt, wobei der letzte Waschschrift mit reinem Wasser durchgeführt wurde. Es folgten zwei Trocknungsschritte: 5 min mit Papiertüchern und 15 – 20 min mit einem Fön. Anschließend wurde das Gel für 5 min in Färbelösung gefärbt.

Färbelösung	40 %	Methanol
	10 %	Eisessig
	0,5 %	Coomassie-Blau

Nach waschen des Gels mit Wasser erfolgte das Entfärben, bis der Hintergrund weitgehend entfärbt war.

Entfärbelösung	40 %	Isopropanol
	10 %	Eisessig

Abschließend wurde das fertige Gel mit Wasser gewaschen und mit einem Fön getrocknet.

5.2.3. O₂-Bindung

Zur Charakterisierung der quervernetzten Hämocyanine wurde deren O₂-Bindungsverhalten untersucht. Hierzu wurde das fluorimetrisch-polarographische Verfahren nach Loewe genutzt, d.h. die in Kapitel 4 analysierte Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz [42]. Die Beladung wurde über die integrale Fluoreszenz-Intensität mit einem Filter-Fluorimeter gemessen. Zur Anregung diente eine Hg-Dampflampe und ein Interferenz-Bandpaß-Filter (Transmission bei 280 nm). Die Emission wurde im Anschluß an einen Kantenfilter (Transmission oberhalb 340 nm) detektiert.

Der Gasfluß der Apparatur ist schematisch in Abb. 5.3 dargestellt. Der Gasfluß wurde mit Hilfe eines optischen Flußmessers auf 3 - 4 L/h eingestellt. Um Verdunstungen zu vermeiden, wurden alle Gase durch einen temperierten Befeuchter geleitet und so mit Wasserdampf gesättigt. Die Probe wurde zuerst mit 100 % Sauerstoff vollständig oxygeniert. Anschließend erfolgte eine langsame Deoxygenierung mit 100 % Stickstoff. Zum Schluß wurde Eichgas mit 5 % Sauerstoff über die Probe geleitet.

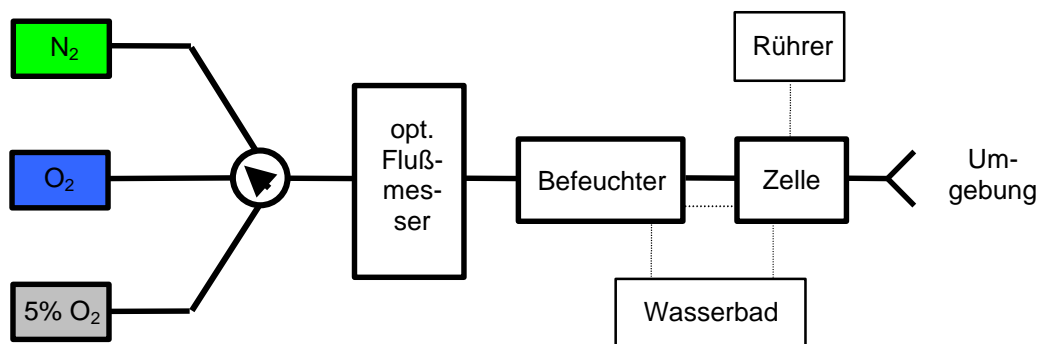


Abb. 5.3: Schematischer Aufbau des Gasflusses der O₂-Bindungsapparatur

Die Meßzelle war offen, so daß das in die Zelle geleitete Gas anschließend in die umgebende Raumluft abgegeben wurde.

Die Messung des O₂-Partialdruckes erfolgte in der Hämocyanin-Lösung mit einer Clark-Elektrode. Das Elektrodensignal wurde über die Ausgangswerte bei 100 % und 5 % Sauerstoff geeicht. Die Signale des Fluoreszenz-Detektors und der Clark-Elektrode wurden auf einem xy-Schreiber ausgegeben, was die gewünschte O₂-Bindungskurve FI([O₂]) lieferte. Die Kurven wurde digitalisiert und ausgewertet (→ 2.1.2.) [88].

Die Hämocyanin-Lösungen hatten eine Konzentration von $c = 0,1 - 0,2$ mg/mL und ein Volumen von $V = 0,6$ mL. Ein paddelförmiger Rührer sorgte für Durchmischung der Lösung ohne das Hämocyanin dabei zu schädigen.

5.2.4. Spektroskopie

Absorptions- und Fluoreszenz-Messungen wurden mit handelsüblichen Geräten bei 20 °C durchgeführt.

Fluoreszenz-Löschung

Zur Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz wurden eine 4 M Acrylamid-Lösung verwendet. Diese wurde in 20 µL-Schritten zur Hämocyanin-Lösung ($V = 1$ mL) gegeben. Die Fluoreszenz-Intensitäten wurden auf die Verdünnung und den Inneren Filter-Effekt nach Gleichung (4.4) korrigiert. Die Auswertung erfolgte nach der

Stern-Volmer-Gleichung
$$\frac{F_0}{F_I} = 1 + K \cdot [Q] \quad (5.1)$$

Hierbei ist F_0 die Fluoreszenz-Intensität ohne Löscher, F_I die Fluoreszenz-Intensität in Gegenwart des Löschers Q mit der Konzentration $[Q]$. K ist die Löschkonstante.

Resonanz-Raman

Die Resonanz-Raman-Messungen wurden von Dr. René Dillinger (AG Tuzcek, Anorganische Chemie, Universität Mainz; jetzt Anorganische Chemie, Universität Kiel) durchgeführt. Sie hat die Meßapparatur im Rahmen ihrer Doktorarbeit aufgebaut [91, 92].

Anregungsquelle war ein Krypton-Ionen-Laser. Die Emissionslinie bei 350,7 nm wurde zur resonanten Anregung des oxy-Hämocyanins verwendet. Die spektrale Analyse des gestreuten Lichtes erfolgte mit einem Doppel-Monochromator (Gitter mit 3600 Furchen / mm, spektrale Auflösung $3,5 \text{ cm}^{-1}$). Zur Detektion diente eine N_2 -gekühlte CCD-Kamera (1100 x 330 pixel).

Zur Anregung wurde typischerweise eine Laserleistung von 10 mW verwendet, bei einer Meßdauer von 1000 s. Jeweils 10-fache Ansätze an gecrosslinkten Hämocyanin-Lösungen (\rightarrow 5.2.1.) wurden durch Ultra-Filtration aufkonzentriert ($c = 10 \text{ mg/mL}$). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur an einem Meßvolumen von $V = 100 \text{ µL}$ durchgeführt.

5.2.5. Elektronen-Mikroskopie

Die elektronen-mikroskopischen Bilder wurden von Dirk Scheffler (AG Markl, Zoologie, Universität Mainz) aufgenommen. Die Abbildung erfolgte in Transmission bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV und wurde auf Photopapier festgehalten.

Zur Kontrastverstärkung wurden die Hämocyanine mit Schwermetall-Atomen angefärbt. Die Negativ-Färbung erfolgte nach einem Verfahren von Harris [93]: Auf Parafilm wurden fünf Tropfen ($V = 20 \text{ µL}$) vorbereitet, in die die Oberfläche

des mit Kohlenstoff beschichtete Kupfer-Netzchens der Reihe nach getaucht wurde. Zuerst erfolgte durch Eintauchen in Hämocyanin-Lösung ($c = 0,03$ mg/mL, Tris-Puffer, → 3.2.1.) die Adsorption der Proteine an die Kohlenstoff-Schicht. Darauf folgten drei Waschgänge mit Wasser, d.h. das Netzchen wurde in drei Tropfen Wasser getaucht. Anschließend wurden die Moleküle in einem Tropfen Uranylacetat (1 %) gefärbt und die Netzchen an der Luft getrocknet.

5.3. Ergebnisse

5.3.1. Chemische Vernetzung von Hämocyanin

Um das Hämocyanin in der oxy- bzw. deoxy-Konformation fixieren zu können, mußten zunächst geeignete Crosslinker und Kopplungsbedingungen gefunden werden. Der Nachweis, daß tatsächlich einzelne Konformationen "eingefroren" werden konnten, wurde auf zwei Ebenen geführt: auf struktureller und funktioneller.

struktureller Nachweis

Inwieweit die Vernetzung des 24-meren Hämocyanins erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde zunächst durch denaturierende Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE, → 5.2.2.) überprüft. Dabei wurde durch Zugabe von SDS und Erhitzen auf 95 °C die Dissoziation und Denaturierung der Proteine erzwungen. Nicht-vernetzte Proben zerfielen in ihre Untereinheiten, vernetzte Proben blieben als 24-meres Aggregat bestehen. Beide Spezies ließen sich aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Größe leicht mittels Gel-Elektrophorese trennen.

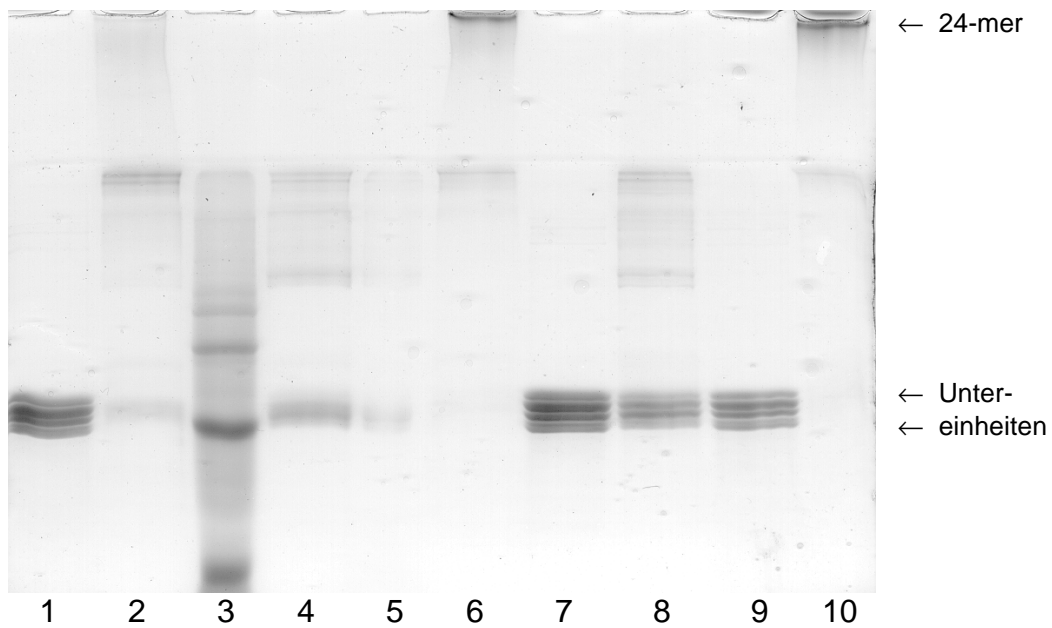


Abb. 5.4: Nachweis der Vernetzung durch SDS-PAGE

Alle Hämocyanin-Proben wurden im deoxygenierten Zustand in Borat-Puffer (\rightarrow 5.2.1.) quervernetzt. Der Ansatz bestand aus 50 μ L Hämocyanin ($c = 4$ mg/mL) und 100 μ L Crosslinker ($c = 1$ mM).

Spur 1:	ohne Crosslinker	Spur 6:	DSG
Spur 2:	BS ³	Spur 7:	Sulfo-DST
Spur 3:	Marker	Spur 8:	Sulfo-BSCOES
Spur 4:	Sulfo-EGS	Spur 9:	DMP
Spur 5:	frei	Spur 10:	Glutaraldehyd

Im gezeigten Gel (Abb. 5.4) zerfiel die Referenz vollständig in ihre Untereinheiten (Spur 1). Die Modifikation des Hämocyanins mit DSG und Glutaraldehyd führte zu einer fast vollständigen Vernetzung (Spuren 6 und 10). Mit BS³, Sulfo-EGS, und Sulfo-BSCOES ließ sich teilweise eine Vernetzung erzielen (Spuren 2, 4 und 8), wogegen Sulfo-DST und DMP keinen sichtlichen Einfluß hatten (Spuren 7 und 9).

Die Kopplungsbedingungen im Ansatz (Hämocyanin- und Crosslinker-Konzentrationen, Verhältnis beider Konzentrationen) wurden variiert, um eine bessere Vernetzung zu erzielen. Die optimalen Crosslinker-Konzentration, die für eine vollständige Vernetzung notwendig waren, sind in Tab. 5.4 aufgelistet.

CL	[CL] mM
BS ³	20
DMP	> 25
DSG	10
Glutaraldehyd	10
Sulfo-BSOCOES	> 1 *
Sulfo-DST	> 1
Sulfo-EGS	2,5 *

Tab. 5.4: Optimale Crosslinker-Konzentrationen für eine vollständige Vernetzung

Die Kopplungsansätze enthielten 50 μL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 100 μL Crosslinker der angegebenen Konzentration.

- * Die denaturierende Gel-Elektrophorese führt zur Spaltung des Crosslinkers.
- > Zur vollständigen Quervernetzung des Hämocyanins ist eine deutlich höhere als die angegebene Konzentration erforderlich.

Zwei der sieben Crosslinker, DMP und Sulfo-DST, reagierten nicht oder nur sehr schlecht mit Hämocyanin. Bei Sulfo-BSOCOES und Sulfo-EGS erschien eine Quervernetzung zwar möglich, aber durch die denaturierende Gel-Elektrophorese wurden die Crosslinker gespalten. Es handelte sich um spaltbare Crosslinker, da für den entsprechenden Längenbereich kommerziell nur solche erhältlich waren. Dagegen erschienen die Crosslinker BS³, DSG und Glutaraldehyd zum Fixieren von Konformationen gut geeignet zu sein. Alle weiteren Versuche wurden ausschließlich mit diesen drei Crosslinkern durchgeführt.

funktioneller Nachweis

Als Nachweis der Fixierung von Konformationen wurde das O₂-Bindungsverhalten der Hämocyanin-Proben untersucht (\rightarrow 5.2.3.). Hierbei ist vor allem die Kooperativität von Bedeutung. Die Affinität wird in Abschnitt 5.3.2. besprochen. Als Beispiel werden graphisch die Ergebnisse der Vernetzung mit Glutaraldehyd gezeigt (Abb. 5.5).

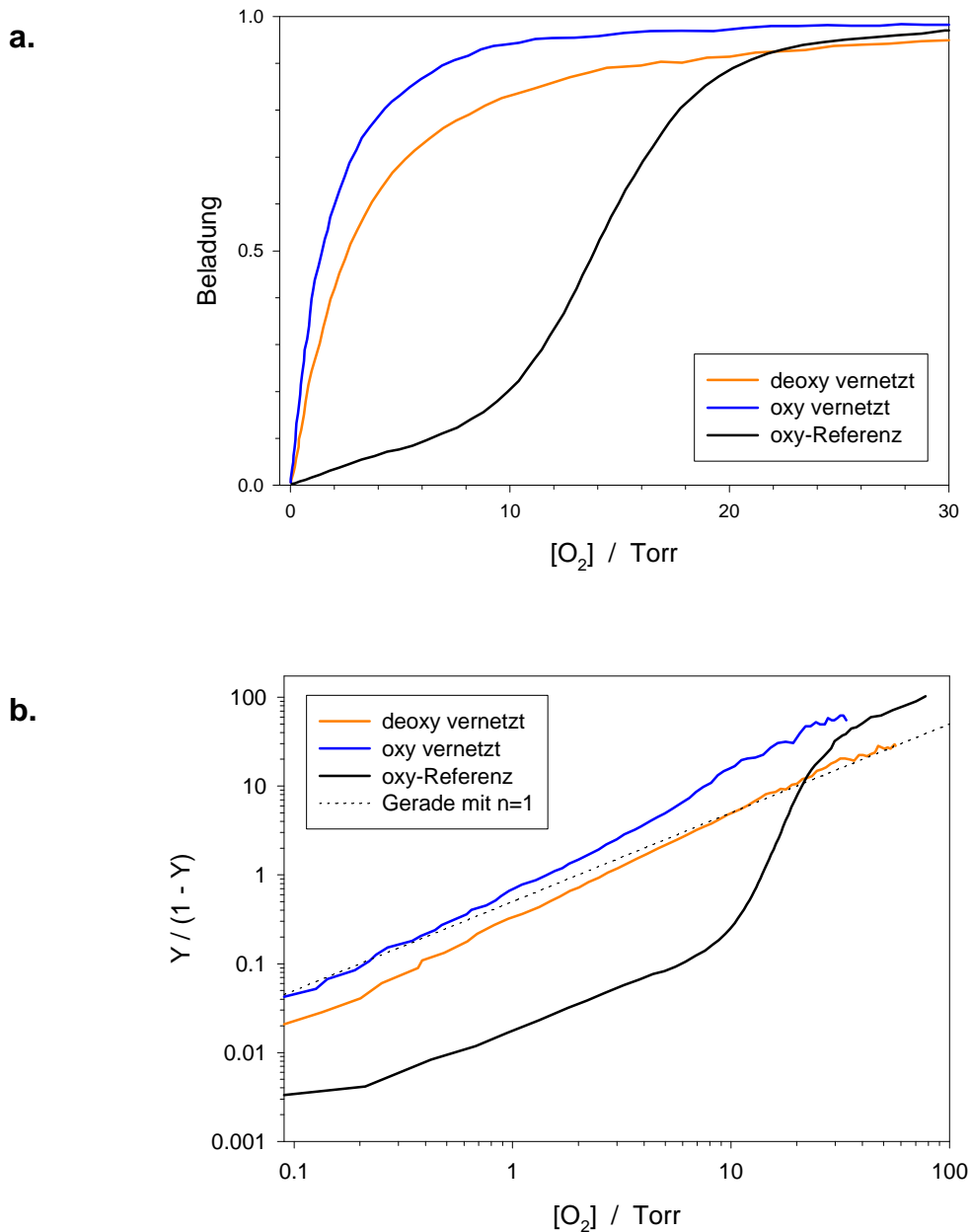


Abb. 5.5: **O₂-Bindungskurven von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt worden war**

Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 50 μL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 30 μL Crosslinker ($c = 10 \text{ mM}$). Die Referenz wurde wie die im oxy-Zustand vernetzte Probe behandelt, aber nicht mit Crosslinker sondern mit Puffer versetzt. Die Vernetzung fand in Borat-Puffer (\rightarrow 5.2.1.) statt, die Messung der Bindungskurven in Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.).

weitere Beschreibung auf der gegenüberliegenden Seite:

- a. Bindungskurven
Die Probe ohne Crosslinker zeigt einen sigmoiden Verlauf, die gecrosslinkten Proben einen nahezu hyperbolischen. Die Sauerstoff-Affinitäten liegen bei $p_{50} = 2,6$ Torr (deoxy vernetzt), 1,4 Torr (oxy vernetzt) und 13,7 Torr (ohne Crosslinker).
- b. Hill-Auftragung
Quervernetzte Proben liefern Geraden, die Probe ohne Crosslinker eine sigmoide Kurve. Die Hill-Koeffizienten liegen bei $n_{Hill} = 1,3$ (deoxy vernetzt), 1,2 (oxy vernetzt) und 6,0 (ohne Crosslinker).

Die Probe ohne Crosslinker zeigte den erwarteten sigmoiden Verlauf: die Bindung ist hoch-kooperativ mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{Hill} = 6,0$ [34]. Die Vernetzung führte zu fast hyperbolischen Bindungskurven, d.h. einer drastischen Abnahme der Kooperativität. Bei den vernetzten Proben fand demnach nahezu keine Kommunikation zwischen den Untereinheiten eines Oligomeres statt. Dies belegt, daß die Quervernetzung erfolgreich war und einzelne Konformationen eingefroren werden konnten. Die Ergebnisse aller Bindungskurven bzgl. der Kooperativität sind in Tab. 5.5 zusammengefaßt.

Probe	Kooperativität n_{Hill}	
	oxy	deoxy
Hc + BS ³	3,3	1,7 1,9 2,5
Hc + DSG	2,6	1,2 1,8
Hc + Glutaraldehyd	1,2	1,0 1,3 1,3 0,9

Tab. 5.5: Kooperativität der O₂-Bindung von gecrosslinktem Hämocyanin
Die Tabelle enthält die Ergebnisse aller Einzel-Experimente. "oxy" bzw. "deoxy" gibt die Sauerstoff-Beladung des Hämocyanins (Hc) zum Zeitpunkt der Quervernetzung an. Die Vernetzung fand in Borat-Puffer (→ 5.2.1.) statt, die Messung der Bindungskurven in Tris-Puffer (→ 3.2.1.).

Mit den drei näher untersuchten Crosslinkern läßt sich die Kooperativität weitgehend eliminieren. Vor allem Glutaraldehyd ist hierfür besonders gut geeignet. Der Beladungsgrad zum Zeitpunkt der Vernetzung hat auf das Ergebnis keinen erkennbaren Einfluß.

5.3.2. Charakterisierung der Funktion

Die Fähigkeit des Hämocyanins, Sauerstoff zu binden, läßt sich leicht spektroskopisch untersuchen: die Bindung von O₂ führt zu einer Absorptionsbande bei 340 nm und zur Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz (→ 4.1.2.).

Absorption

Die Absorptionsspektren von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt wurde, sind in Abb. 5.6 dargestellt.

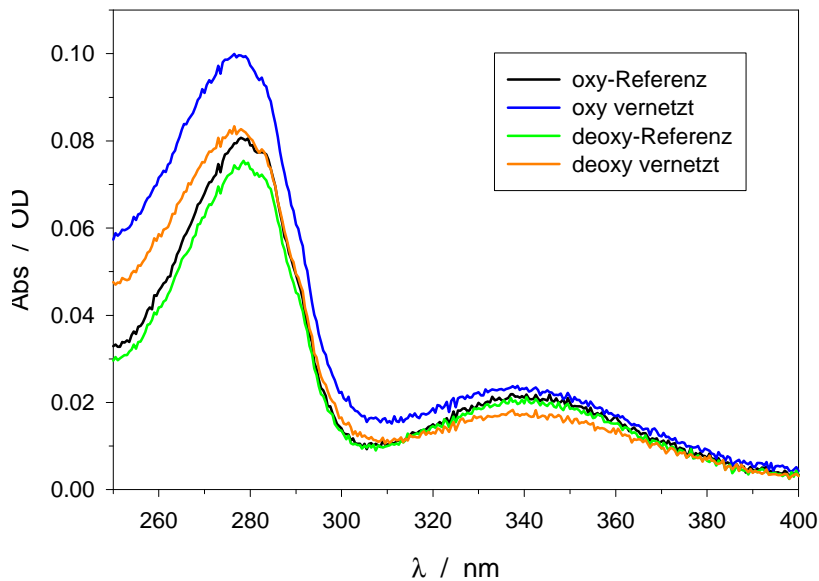


Abb. 5.6: Absorptionsspektren von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt worden war

Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 50 µL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 100 µL Crosslinker ($c = 12 \text{ mM}$) in Borat-Puffer (→ 5.2.1.). Die Referenzen wurden wie die vernetzten Proben behandelt, aber nicht mit Crosslinker sondern mit Puffer versetzt. Alle Messungen wurden im oxygenierten Zustand in Tris-Puffer (→ 3.2.1.) durchgeführt.

Die Absorptionsbanden bei 340 nm zeigten nur geringe Unterschiede, so daß davon ausgegangen werden kann, daß gecrosslinktes Hämocyanin in gleicher Weise O₂ binden konnte wie unbehandeltes.

Auffällig ist bei den quervernetzten Proben ein Anstieg der Absorption im kurzwelligen Bereich, speziell bei 250 nm. Dies ist auf die Bildung von Aggregaten zurückzuführen, die das Licht streuen und so einen scheinbaren Anstieg der Absorption vortäuschen. Die Lichtstreuung folgt einer λ^{-4} -Abhängigkeit, so daß kurzwelliges Licht stärker gestreut wird als langwelliges [64].

Fluoreszenz

Das zweite Beladungssignal, die Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz, ist an eine spektrale Verschiebung gekoppelt: wenn die Fluoreszenz bei 280 nm angeregt wird, führt die Oxygenierung des Hämocyanins zu einer so starken Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz, daß das Emissionsspektrum von der Tyrosin-Fluoreszenz dominiert wird. Dies führt zu einer Blauverschiebung des Emissionsmaximums von 336 nm nach 303 nm. Störungen des Hämocyanins (Deoxygenierung, Dissoziation, Denaturierung) führen zu einem Anstieg der Tryptophan-Fluoreszenz und damit auch zu einer Rotverschiebung des Emissionsmaximums. Die Fluoreszenz-Emissionsspektren von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt wurde, sind in Abb. 5.7 dargestellt.

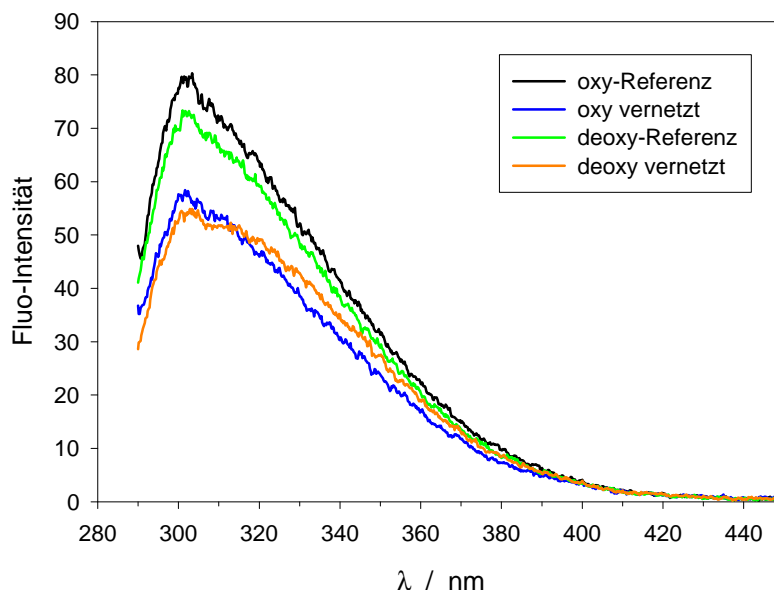


Abb. 5.7: Fluoreszenz-Emissionsspektren von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt worden war

Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 50 μL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 100 μL Crosslinker ($c = 12 \text{ mM}$) in Borat-Puffer (\rightarrow 5.2.1.). Die Referenzen wurden wie die vernetzten Proben behandelt, aber nicht mit Crosslinker sondern mit Puffer versetzt. Alle Messungen wurden im oxygenierten Zustand in Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.) durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ angeregt.

Die Spektren zeigen einheitlich ein Emissionsmaximum bei 303 nm, das von der Tyrosin-Fluoreszenz herrührt. Es tritt keine Rotverschiebung auf, die auf Deoxygenierung, Dissoziation oder Denaturierung hindeuten würde. Lediglich bei der deoxygeniert vernetzten Probe (orange) ist an der rechten Flanke ein leichter Anstieg zu erkennen, der auf geringfügig erhöhte Tryptophan-Fluoreszenz zurückzuführen ist. Dieser Effekt ist jedoch vernachlässigbar. Die Intensität der gecrosslinkten Proben ist etwas niedriger.

O₂-Bindung

Die Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz wurde genutzt, um O₂-Bindungskurven der vernetzten Hämocyanine zu messen (→ 5.2.3.). Da die Kooperativität nach Möglichkeit eliminiert wurde, fällt der Hill-Koeffizient zur Charakterisierung weg. Entscheidend ist die Affinität der Sauerstoff-Bindung. In Tab. 5.6 sind die O₂-Affinitäten von allen Experimenten mit quervernetzten Hämocyanin-Proben zusammengefaßt.

Probe	Affinität p ₅₀ / Torr	
	oxy	deoxy
Hc + BS ³	4,0	5,0 7,1 3,4
Hc + DSG	5,0	4,2 2,5
Hc + Glutaraldehyd	1,4	3,8 3,3 2,6 3,4

Tab. 5.6: O₂-Affinität von quervernetztem Hämocyanin

Die Tabelle enthält die p₅₀-Werte aller Einzel-Experimente (Bindungskurven), deren Hill-Koeffizienten in Tab. 5.5 aufgeführt sind. "oxy" bzw. "deoxy" gibt die Sauerstoff-Beladung des Hämocyanins (Hc) zum Zeitpunkt der Quervernetzung an. Die Vernetzungen fanden in Borat-Puffer (→ 5.2.1.) statt, die Messungen in Tris-Puffer (→ 3.2.1.).

Natives Hämocyanin hatte als Oligomer eine Sauerstoff-Affinität von p₅₀ = 13,7 Torr. Bei quervernetzten Hämocyanin-Proben lag die Affinität wesentlich höher: p₅₀ = 1,3 – 5 Torr. Damit war die O₂-Affinität meist größer als die von einzelnen Untereinheiten (p₅₀ = 5 Torr) [94]. Überraschend ist, daß die Affinitätssteigerung unabhängig davon war, in welchem O₂-Beladungszustand das Hämocyanin vernetzt wurde. Für deoxygeniert gecrosslinktes Hämocyanin ist eine geringe Affinität erwartet worden. Dieses Resultat trat nicht nur bei Glutaraldehyd, sondern auch bei den beiden anderen, untersuchten Crosslinkern auf (Tab. 5.6). Offenbar spielt die Art des verwendeten Crosslinkers keine Rolle.

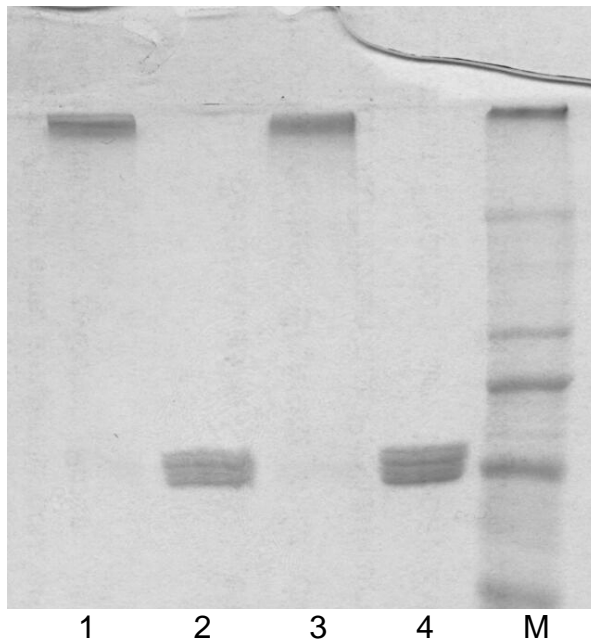
5.3.3. Charakterisierung der Struktur

Gel-Elektrophorese

Die Quartär-Struktur der Hämocyanine wurde mittels denaturierender und nativer Gel-Elektrophorese untersucht (→ 5.2.2.). Als Beispiel sind in Abb. 5.8 die Gele von Proben, die mit Glutaraldehyd vernetzt wurden, gezeigt.

Bei der denaturierenden Gel-Elektrophorese (Abb. 5.8.a) wanderten die quervernetzten 24-meren Aggregate kaum in das Gel ein, wogegen die Referenzen vollständig in ihre Untereinheiten zerfielen. Oxygeniert und deoxygeniert vernetztes Hämocyanin ließ sich im Gel nicht unterscheiden (Spuren 1 und 3). Somit wurden oxy- und deoxy-Hämocyanin gleichermaßen gut vernetzt. Durch die denaturierenden Bedingungen während der Elektrophorese wurden die Konformationen der Proteine stark verändert. Insofern war es nicht verwunderlich, daß sich mit dieser Methode keine Unterschiede zwischen den beiden gecrosslinkten Proben ergaben.

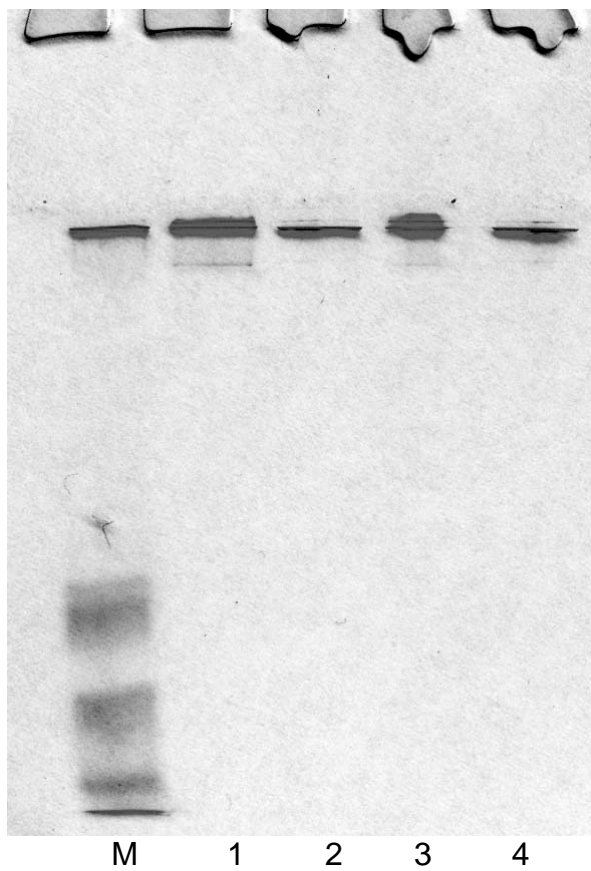
a.

Sammel-
gel

← 24-mer

Trenn-
gel← Unter-
← einheiten

b.

Sammel-
gel

← 24-mer

Trenn-
gel← Unter-
← einheiten

Abb. 5.8: Legende siehe gegenüberliegende Seite

Abb. 5.8: Gel-Elektrophorese von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt worden war

Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 50 µL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 100 µL Crosslinker ($c = 12 \text{ mM}$) in Borat-Puffer (\rightarrow 5.2.1.). Die Referenzen wurden wie die vernetzten Proben behandelt, aber nicht mit Crosslinker sondern mit Puffer versetzt.

- a. denaturierende Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE; 7,5 %)
Die beiden quervernetzten Proben liefen nur wenig in das Gel ein. D.h. unabhängig vom Beladungszustand fand eine vollständige Vernetzung statt. Die Referenzen dissoziierten dagegen in ihre Untereinheiten, die weit in das Gel wanderten.
- b. native Gel-Elektrophorese (PAGE; 7,5 %)
Abgesehen vom Marker liefen die Proben nur wenig in das Gel ein. D.h. unter nativen Bedingungen enthielt keine der Proben dissoziiertes Hämocyanin. Bei den gecrosslinkten Proben ist eine Verbreiterung der Bande zu erkennen.

Spur 1: im oxy-Zustand quervernetzt
Spur 2: oxy-Referenz (nicht vernetzt)
Spur 3: im deoxy-Zustand quervernetzt
Spur 4: deoxy-Referenz (nicht vernetzt)
Spur M: Marker

Mit der nativen Gel-Elektrophorese (Abb. 5.8.b) ließen sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden quervernetzten Proben feststellen. Die vernetzten Proben zeigten breitere Banden als die Referenzen, was wiederum auf Aggregate aus mehreren miteinander vernetzten 24-meren zurückzuführen ist.

In beiden Gelen war in den Auftragstaschen kein Protein zu detektieren. Dies zeigte, daß die auftretenden Aggregate vergleichsweise klein waren, da diese noch in das Sammelgel einlaufen konnten.

Immun-Gel-Elektrophorese

Mit der Immun-Gel-Elektrophorese (→ 5.2.2.) wurde die drei-dimensionale Struktur und die Oberfläche der modifizierten Hämocyanine untersucht. In Abb. 5.9 sind die Ergebnisse von Hämocyanin-Proben zu sehen, die mit Glutaraldehyd quervernetzt wurden.

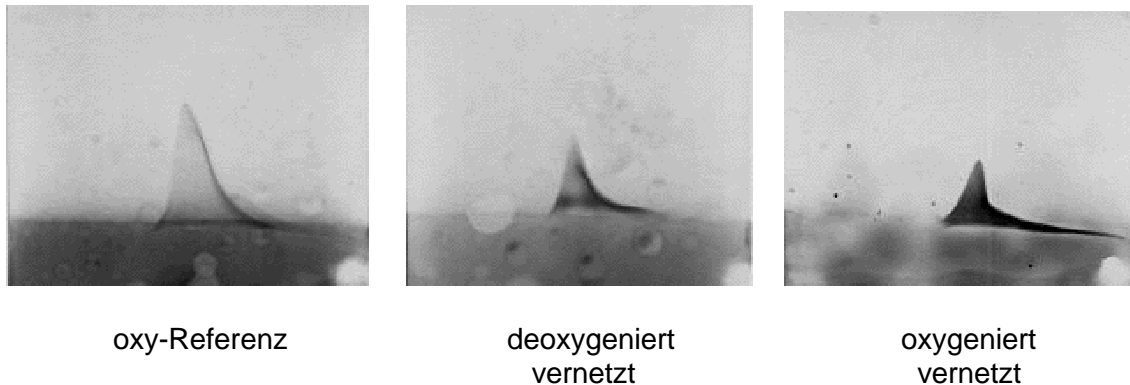


Abb. 5.9: Immun-Gel-Elektrophorese von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt worden war

Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 50 μL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 100 μL Crosslinker ($c = 12 \text{ mM}$) in Borat-Puffer (→ 5.2.1.). Die Referenz wurden wie die im oxy-Zustand vernetzte Proben behandelt, aber nicht mit Crosslinker sondern mit Puffer versetzt.

Bei allen untersuchten Proben wurden die Epitope an der Hämocyanin-Oberfläche von den Antikörpern erkannt. Eine Dissoziation oder Denaturierung konnte nicht detektiert werden. Die Messungen zeigten jeweils nur eine Bande im Gel an, d.h. die Proben waren immunologisch einheitlich. Somit ließen sich auch mit dieser Methode keine Unterschiede zwischen den beiden gecrosslinkten Proben feststellen.

Resonanz-Raman

Die Struktur der aktiven Zentren wurde mit der Resonanz-Raman-Spektroskopie (→ 5.2.4.) untersucht. Da das einfache Raman-Signal viel zu schwach wäre, sind Messungen nur bei resonanter Anregung, d.h. im oxy-Zustand über die 340 nm-Absorptionsbande, möglich. Die Anregung der aktiven Zentren führt zu Schwingungen zwischen den Cu-Atomen und den Stickstoff-Atomen der sie bindenden Histidine (Abb. 2.3). Das stärkste Signal, bei einer Verschiebung von $\approx 280 \text{ cm}^{-1}$, wird durch die Cu-N-Schwingung der axialen Histidine hervorgerufen [95]. Es sollte zum Nachweis von Konformationsänderungen besonders gut geeignet sein [95]. Als Beispiel sind die Ergebnisse der Vernetzung mit Glutaraldehyd gezeigt (Abb. 5.12).

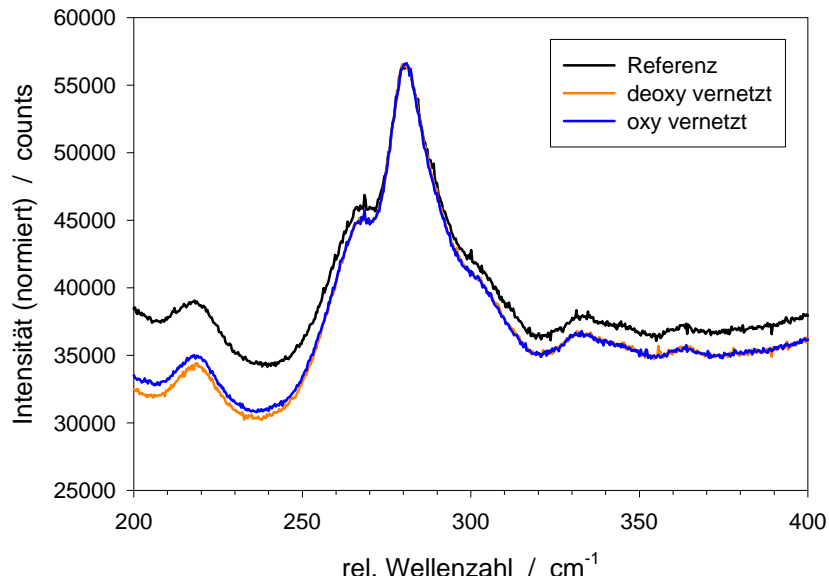


Abb. 5.12: Resonanz-Raman-Spektren von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt worden war

Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 500 μL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 300 μL Crosslinker ($c = 10 \text{ mM}$) in Borat-Puffer ($\rightarrow 5.2.1.$). Die Referenz wurde wie die vernetzten Proben behandelt, aber nicht mit Crosslinker sondern mit Puffer versetzt. Die Proben wurden vor der Messung auf $c = 10 \text{ mg/mL}$ aufkonzentriert. Alle Messungen wurden im oxygenierten Zustand in Tris-Puffer ($\rightarrow 3.2.1.$) durchgeführt. Die Raman-Streuung wurde bei $\lambda_{\text{ex}} = 350,7 \text{ nm}$ mit einer Leistung von 10 mW angeregt.

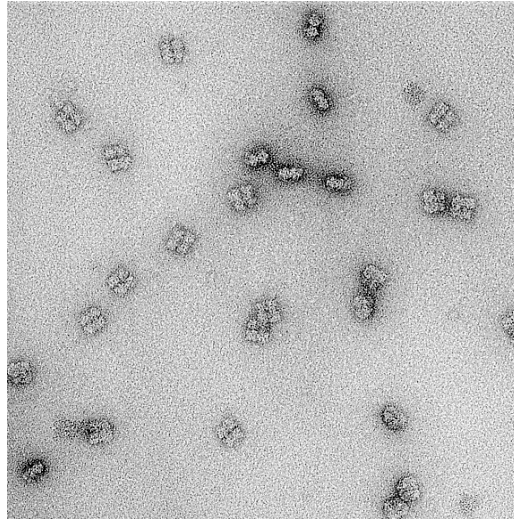
Bei allen Spektren war die Lage der Maxima identisch. D.h., daß weder das Crosslinken noch der Beladungszustand des Hämocyanins beim Crosslinken einen Einfluß auf die Struktur des aktiven Zentrums hatten.

Die leichten Abweichungen an den Flanken sind darauf zurückzuführen, daß die Konzentrationen der drei Proben nicht identisch waren. Dadurch ist der Untergrund im Verhältnis zum Maximum unterschiedlich stark ausgeprägt.

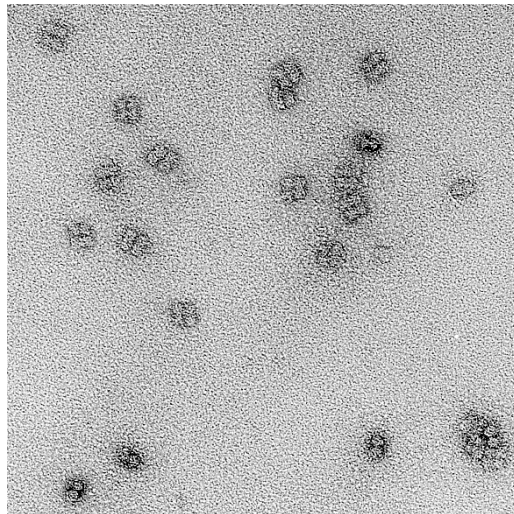
Elektronen-Mikroskopie

Die Quartär-Struktur der vernetzten Hämocyanine wurde mittels Elektronen-Mikroskopie ($\rightarrow 5.2.5.$) untersucht. Die Proben wurden zur Kontrast-Verstärkung mit Uranylacetat negativ angefärbt (Abb. 5.10).

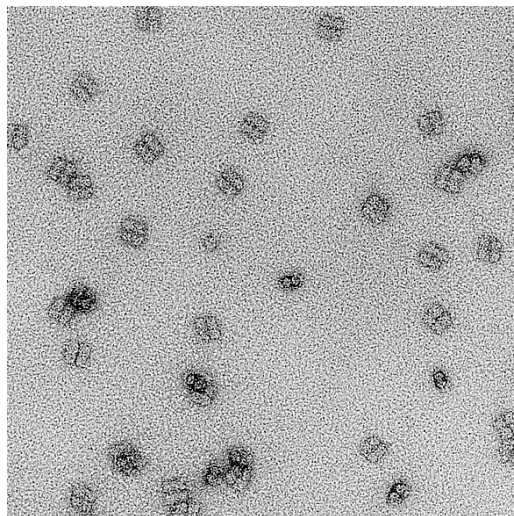
- a. Referenz
nicht quervernetzt



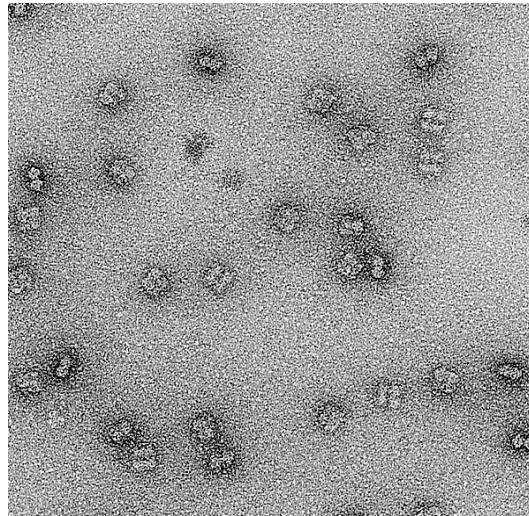
- b. Glutaraldehyd
oxy quervernetzt



- c. Glutaraldehyd
deoxy quervernetzt



d. BS³
deoxy quervernetzt



e. DSG
deoxy quervernetzt

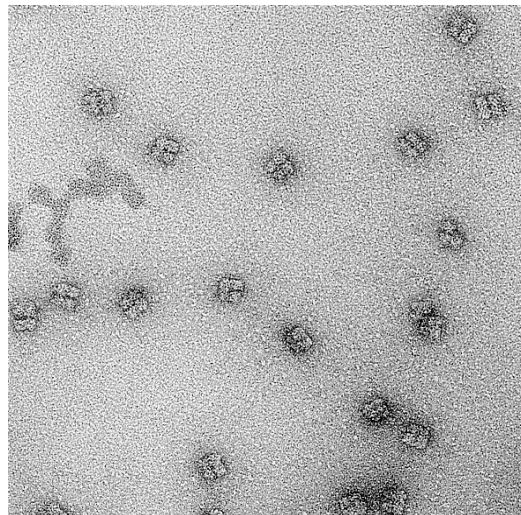


Abb. 5.10: Elektronen-mikroskopische Aufnahmen von quervernetzten Hämocyaninen

Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 50 μL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) in Borat-Puffer ($\rightarrow 5.2.1.$).

- a. Die Referenz wurde anstelle von Crosslinker-Lösung mit 100 μL Puffer versetzt.
- b. + c. Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit jeweils 100 μL Glutaraldehyd ($c = 12 \text{ mM}$) quervernetzt.
- d. + e. Die Vernetzung erfolgte durch 30 μL Crosslinker ($c = 1 \text{ mM}$) im deoxy-Zustand.

Das 24-mere Hämocyanin hat die Form eines halben Würfels (\rightarrow Abb. 2.6). Daraus ergeben sich zwei bevorzugte Orientierungen bzgl. einer Oberfläche. Das 4x6-mere Hämocyanin kann flach auf der Oberfläche liegen. Hierbei ist die

Furche zwischen den beiden Halbmolekülen und die Furche zwischen den beiden Hexameren innerhalb der Halbmoleküle zu sehen. Dadurch lassen sich die vier Hexamere erkennen. Andererseits kann das Hämocyanin aufrecht stehen, so daß sich jeweils zwei Hexamere übereinander befinden. Dies erhöht den Kontrast, wodurch aufrecht stehende Moleküle dunkler erscheinen. Beide Orientierungen sind in den Abbildungen zu erkennen. Auf allen Bildern schauen die Hämocyanin-Moleküle ähnlich wie die nicht vernetzten Moleküle (Abb. 5.10.a) aus. Speziell heißt dies, es gab keine offensichtlichen Unterschiede zwischen

- unbehandeltem und gecrosslinktem Hämocyanin
- Proben, die im oxy- und deoxy-Zustand vernetzt worden waren
- Proben, die mit verschiedenen Crosslinkern vernetzt worden waren

Auf allen elektronen-mikroskopischen Aufnahmen von gecrosslinkten Hämocyaninen waren auch Aggregate zu erkennen, wie sie in Abb. 5.11 dargestellt sind.

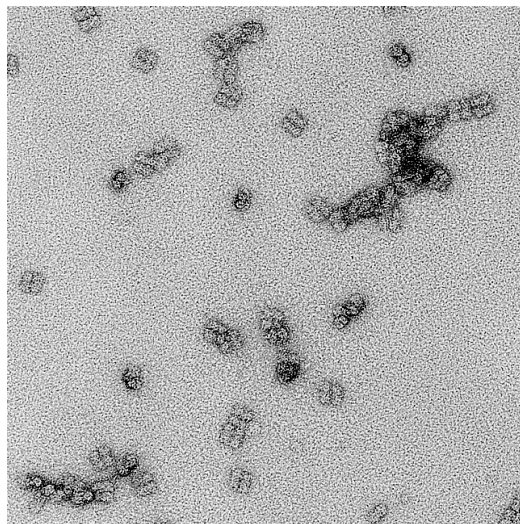


Abb. 5.11: Elektronen-mikroskopische Aufnahme von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt worden war

Das Hämocyanin wurde mit Glutaraldehyd im deoxy-Zustand quervernetzt. Es handelt sich um die selbe Probe wie in Abb. 5.10.c. Neben einzelnen Hämocyanin-Molekülen sind mehrere Aggregate zu erkennen.

Die Aggregate wiesen keine einheitliche Größe auf. Dies dürfte die Verbreiterung der Banden in der nativen Gel-Elektrophorese erklären (Abb. 5.8.b).

Fluoreszenz-Spektren

Die Umgebung der Tryptophane in den Hämocyaninen wurde mittels Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht. Die Lage des Emissionsmaximums ist ein Sensor der Tryptophan-Umgebung [61]. Um Störungen durch die Tyrosin-Fluoreszenz zu vermeiden, wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ angeregt [61].

Unbehandeltes Hämocyanin weist bei Deoxygenierung eine charakteristische Rotverschiebung der Tryptophan-Fluoreszenz von $\Delta\lambda = 6 \text{ nm}$ auf (Abb. 5.13). Diese Verschiebung ist reversibel, kann also nicht auf Denaturierung des Proteins zurückgeführt werden.

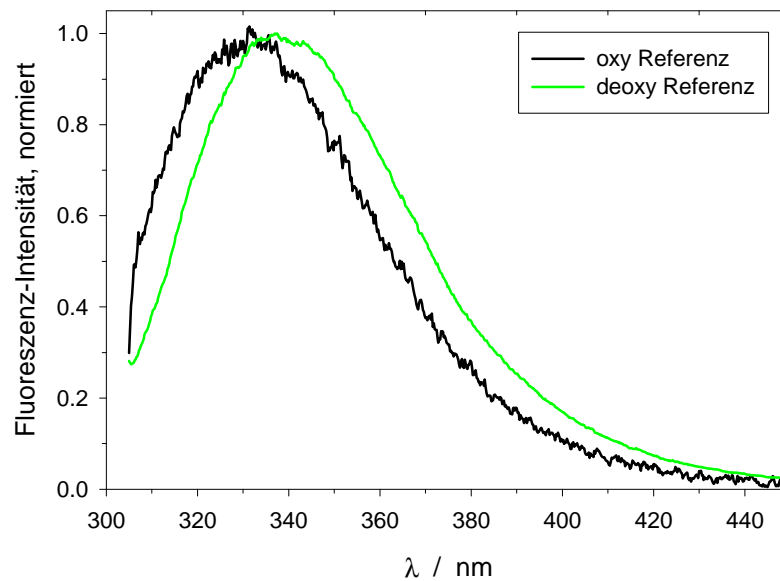


Abb. 5.13: Tryptophan-spezifische Fluoreszenz-Emissionsspektren von nativem Hämocyanin

Die Messungen wurden in Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.) bei einer Hämocyanin-Konzentration von $c = 0,1 \text{ mg/mL}$ durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, so daß nur Tryptophane angeregt wurden. Die Spektren wurden auf eine maximale Fluoreszenz-Intensität von Eins normiert. Das Spektrum von oxy-Hämocyanin (schwarz) ist deutlich verrauschter, da die Intensität nur 1/13 der von deoxy-Hämocyanin (grün) beträgt (\rightarrow 4.3.3.).

Die Frage ist nun, ob es sich bei dieser Maximumverschiebung um ein Beladungs- oder Konformationssignal handelt. Dazu wurden auch mit Glutaraldehyd vernetzte Hämocyanin-Proben untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.7 zusammengefaßt.

Probe	λ_{\max} / nm oxy	λ_{\max} / nm deoxy
oxy Referenz	331	337
oxy gecrosslinkt	330	335
deoxy Referenz	331	337
deoxy gecrosslinkt	331	334

Tab. 5.7: Maxima der Fluoreszenz-Emissionsspektren von gecrosslinktem Hämocyanin

Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 50 μL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 100 μL Crosslinker ($c = 12 \text{ mM}$) in Borat-Puffer (\rightarrow 5.2.1.). Die Referenzen wurden wie die vernetzten Proben behandelt, aber nicht mit Crosslinker sondern mit Puffer versetzt. Alle Messungen wurden in Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.) durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, so daß nur Tryptophane angeregt wurden. Der Fehler bei der Maximumbestimmung kann auf etwa $\pm 1 \text{ nm}$ geschätzt werden.

Die beiden Referenzen zeigten die gleiche Lage der Maxima. Dies bestätigt noch einmal, daß das Hämocyanin bei der Deoxygenierung keinen nennenswerten Schaden genommen hatte. Die vernetzten Proben zeigten im oxygenierten Zustand die gleiche Lage des Maximums und bei Deoxygenierung eine ähnliche Rotverschiebung. Somit scheint es sich bei der Maximumverschiebung um ein reines Beladungssignal zu handeln, auf das die Konformation keinen Einfluß hat. Dies läßt sich dadurch verstehen, daß die Fluoreszenz-Eigenschaften von oxy- und deoxy-Hämocyanin von zwei verschiedenen Tryptophan-Klassen bestimmt werden. Tryptophane, die im oxy-Hämocyanin nicht gelöscht werden, tragen zur Fluoreszenz von deoxy-Hämocyanin nur zu 1/13 bei (\rightarrow 4.3.3.). Offensichtlich besitzen die beiden Tryptophan-Klassen unterschiedliche Emissionsmaxima. Abschließend läßt sich festhalten, daß bzgl. der Tryptophan-Fluoreszenz kein Unterschied zwischen den quervernetzten Proben festgestellt werden konnte.

Fluoreszenz-Löschung

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Löschung wurde die Zugänglichkeit der Tryptophane für Löscher-Moleküle untersucht. Das Hämocyanin wurde mit Glutaraldehyd vernetzt. Die Fluoreszenz wurde mit Acrylamid gelöscht, wobei alle Messungen an oxygenierten Proben in Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.) durchgeführt wurden. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse einer Messung sind in Abb. 5.14 als Stern-Volmer-Diagramm dargestellt (Gleichung 5.1).

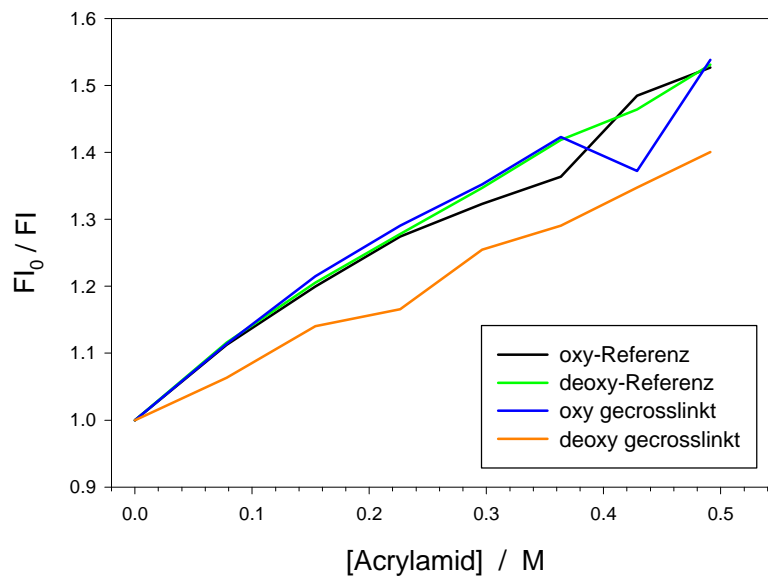


Abb. 5.14: Fluoreszenz-Löschung mit Acrylamid von Hämocyanin, das mit Glutaraldehyd vernetzt worden war

Das Hämocyanin wurde im oxy- und deoxy-Zustand mit Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kopplungsansätze enthielten jeweils 50 μL Hämocyanin ($c = 3 \text{ mg/mL}$) und 100 μL Crosslinker ($c = 12 \text{ mM}$) in Borat-Puffer (\rightarrow 5.2.1.). Die Referenzen wurden wie die vernetzten Proben behandelt, aber nicht mit Crosslinker sondern mit Puffer versetzt. Alle Messungen wurden im oxygenierten Zustand in Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.) durchgeführt. Die Meßwerte sind als Stern-Volmer-Diagramm dargestellt (Gleichung 5.1). Die deoxy gecrosslinkte Probe läßt sich deutlich schlechter löschen als die drei anderen Proben.

Während die Kurven der beiden Referenzen und die der oxygeniert vernetzten Probe identische Verläufe zeigten, ließ sich das deoxygeniert quervernetzte Hämocyanin deutlich schlechter löschen. Dies bedeutet dreierlei: (1) Die beiden gecrosslinkten Proben unterschieden sich, d.h. es wurden tatsächlich zwei verschiedene Konformationen "eingefroren". (2) Es scheinen bzgl. der Zugänglichkeit der Tryptophane keine Unterschiede zwischen unbehandeltem und oxygeniert vernetztem Hämocyanin zu bestehen. Dies spricht dafür, daß diese Proben in der gleichen Konformation vorlagen. (3) Die Tryptophane waren im deoxy-Zustand für den im Lösungsmittel befindlichen Löscher Acrylamid schlechter zugänglich. Dies weist auf eine kompaktere Konformation des im deoxy-Zustand vernetzten Hämocyanins hin.

In Abb. 5.14 sind einzelne Meßpunkte zu erkennen, die unterhalb der Kurve liegen. Diese Meßfehler beruhen auf einer ungenügenden Durchmischung der 4 M Acrylamid-Lösung mit der Hämocyanin-Lösung.

5.4. Diskussion

5.4.1. Quervernetzung des Hämocyanins

Der Nachweis, daß die Konformationen im oxy- und deoxy-Zustand fixiert werden konnten, wurde auf zwei Ebenen geführt: auf struktureller und funktioneller Ebene.

Der strukturelle Nachweis bestand darin, daß Eingriffe, die normalerweise die Protein-Struktur verändern, ohne Wirkung bleiben sollten. Bei den bisher publizierten Arbeiten war es üblich, das Hämocyanin schonenden dissoziierenden Bedingungen auszusetzen. Dabei dissoziierte unbehandeltes Hämocyanin in seine Untereinheiten, diese blieben aber intakt [46, 88 – 90]. Quervernetztes Hämocyanin konnte nicht dissoziieren. Allerdings zeigte sich, daß bereits intra-molekulare Vernetzungen innerhalb der Untereinheiten die Dissoziation des Oligomers verhindern können [88, 89]. Unter denaturierenden Bedingungen zerfielen die gecrosslinkten oligomeren Hämocyanine in mehr oder weniger große Aggregate [88, 89].

In dieser Arbeit wurde die Vernetzung durch das drastischere Verfahren der Denaturierung überprüft. Dadurch wurde nicht nur eine Stabilisierung des Oligomers sichergestellt, sondern auch die Quervernetzung zwischen den Untereinheiten. Die Proben wurden denaturierenden Bedingungen ausgesetzt, wobei unbehandeltes Hämocyanin dissoziierte und die Untereinheiten denaturierten. Bei Hämocyanin, dessen Untereinheiten miteinander vernetzt waren, konnte dagegen keine Dissoziation erfolgen. Es blieben mehr oder weniger denaturierte 24-mere erhalten (mit nicht wohl-definierten Zuständen). Die Änderung des Denaturierungsverhaltens der Hämocyanine bei Quervernetzung ließ sich leicht durch die denaturierende Gel-Elektrophorese nachweisen. Von den sieben getesteten Crosslinkern (Tab. 5.2) zeigten drei, BS^3 , DSG und Glutaraldehyd, daß sie unter denaturierenden Bedingungen die Dissoziation des Hämocyanins verhinderten (Abb. 5.4 und Abb. 5.8). Somit waren die Untereinheiten miteinander vernetzt, was die Ausbreitung von Konformationssignalen im Molekül sehr unwahrscheinlich machte.

Bei Hämocyaninen läßt sich eine fixierte Struktur sehr gut über funktionelle Veränderungen im O_2 -Bindungsverhalten nachweisen. Kooperativität setzt Affinitätsänderungen voraus, die durch Konformationsänderungen im Molekül realisiert werden (\rightarrow 2.1.1.). Ist die Konformation eines Hämocyanins "eingefroren", sollte sich die Affinität nicht mehr ändern und entsprechend keine kooperative O_2 -Bindung beobachtet werden können. Das Fehlen von kooperativen Wechselwirkungen führt beim Vogelspinnen-Hämocyanin zu hyperbolischen Bindungskurven mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{Hill} = 1$, was an einem Untereinheiten-Gemisch gezeigt werden konnte [34].

Der Effekt ließ sich an den Bindungskurven der vernetzten Hämocyanine zeigen: während die unbehandelte Probe einen Hill-Koeffizienten von $n_{Hill} = 6,0$ besaß, konnte die Kooperativität der quervernetzten Proben stark reduziert bzw. eliminiert werden (Tab. 5.5). Dabei hatte der Beladungszustand des

Hämocyanins zum Zeitpunkt der Vernetzung keinen Einfluß auf die Reduzierung der Kooperativität. Speziell mit dem Crosslinker Glutaraldehyd gelang es, das Hämocyanin derart zu vernetzen, daß mit Hill-Koeffizienten von $n_{\text{Hill}} = 0,9 - 1,3$ die kooperativen Wechselwirkungen weitgehend unterbunden werden konnten (Tab. 5.5). Die im folgenden beschriebenen Eigenschaften lassen sich dadurch eindeutig den fixierten Konformationen zuordnen und sind nicht auf eine "Rest-Kooperativität" zurückzuführen.

Fazit

Der erste Schritt, das "Einfrieren" der Konformationen, konnte erfolgreich durchgeführt werden.

5.4.2. Funktion vernetzter Hämocyanine

Hat sich durch das Crosslinken die Fähigkeit des Hämocyanins, Sauerstoff zu binden, verändert? Beide Signale, die die O₂-Beladung von Hämocyaninen monitoren (→ 4.1.2.), zeigten bei den vernetzten Proben keine Unterschiede. Die Absorptionsbande bei 340 nm, die durch den Cu-O₂-Komplex (einen *ligand to metal charge transfer complex*) hervorgerufen wird, blieb weitgehend unverändert (Abb. 5.6) [96]. Auch die daraus resultierende, in Kapitel 4 untersuchte Fluoreszenz-Löschung der Tryptophane trat vollständig auf (Abb. 5.7). Beides weist darauf hin, daß die O₂-Transport-Kapazität im Vergleich zu unbehandeltem Hämocyanin unverändert blieb. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei einem anderen Hämocyanin, dem der Weinbergschnecke *Helix pomatia*, gemacht [46]. Dort hatte die Quervernetzung ebenfalls keinen Einfluß auf die O₂-Transport-Kapazität.

Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage zur Messung von O₂-Bindungskurven, da das Meßprinzip auf der Fluoreszenz-Löschung beruht (→ 5.2.3). Das O₂-Bindungsverhalten wird durch die Kooperativität und die Affinität charakterisiert. Auf die Kooperativität wurde oben im Zusammenhang mit dem Nachweis der Fixierung von Konformationen eingegangen (→ 5.4.1). Hier soll nun der Einfluß auf die Affinität, ausgedrückt durch die O₂-Konzentration bei Halbsättigung (p_{50}), besprochen werden.

Es war zu erwarten, daß die im oxy-Zustand vernetzten Hämocyanin-Proben eine hohe O₂-Affinität zeigten. Dies wurde auch tatsächlich beobachtet (Tab. 5.6). Während die Affinität der unbehandelten Probe bei $p_{50} = 13,7$ Torr lag, zeigte die mit Glutaraldehyd quervernetzte eine Affinität von $p_{50} = 1,4$ Torr (Tab. 5.6). Die Affinität der im oxy-Zustand vernetzten Hämocyanin-Probe war somit deutlich höher als bei unbehandeltem Hämocyanin. Das war nicht verwunderlich, da unbehandeltes Hämocyanin während der O₂-Beladung seine Affinität ändert (→ 2.1.1.). Somit charakterisiert der p_{50} -Wert von unbehandeltem Hämocyanin nicht die Affinität des oxy-Zustandes, sondern eine Zwischenstufe.

Überraschenderweise zeigten aber die im deoxy-Zustand vernetzten Proben eine ähnlich hohe Affinität wie die im oxy-Zustand vernetzten ($p_{50} = 2,6 - 3,8$ Torr;

Tab. 5.6). Dies ist insofern ungewöhnlich, da sich der deoxy-Zustand durch eine niedrige Affinität auszeichnen sollte (→ 2.1.1.). Eine starke Erhöhung der Affinität von deoxy-Hämocyanin hervorgerufen durch Quervernetzung ist bereits zweimal beobachtet worden: bei [88], mit dem Crosslinker DMS und dem wie hier verwendeten Hämocyanin der Vogelspinne, sowie bei [46], mit dem monofunktionalen Crosslinker MAI und dem Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (→ 5.1.4.). Die Ursache für die hohe Affinität blieb jedoch unklar. Hier stellt sich die Frage, ob überhaupt unterschiedliche Konformationen fixiert worden sind? Eine mögliche Erklärung wäre zum Beispiel, daß die Crosslinker eine bestimmte Konformation induzieren bzw. nur diese fixieren, da nur dann die Abstände zwischen den Lysinen für eine Vernetzung geeignet sind. Dadurch würde unabhängig von den Kopplungsbedingungen immer nur diese Konformation den Messungen zugänglich sein. Aus den folgenden zwei Gründen erscheint diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich:

- Fünf verschiedene Crosslinker lieferten gleiche Resultate: die Crosslinker BS³, DSG und Glutaraldehyd wurden hier untersucht (Tab. 5.2), der Crosslinker DMS bei [88] und der Crosslinker MAI bei [46] (Tab. 5.3). Hierbei handelt es sich um mono- und bi-funktionale Crosslinker mit Aldehyden, NHS- und Imido-Estern als reaktive Gruppen. Der Abstand dieser Gruppen variiert von 0,77 – 1,14 nm. Somit können die Ergebnisse nicht auf einen bestimmten Crosslinker, einen Typ von reaktiven Gruppen oder deren Abstand zurückgeführt werden.
- Zwei verschiedene Hämocyanine liefern gleiche Resultate: das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* wurde hier (→ 5.3.2.) und bei [88] verwendet, das Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* bei [46]. Beim ersten handelt es sich um ein Arthropoden-Hämocyanin, das zweite ist ein Mollusken-Hämocyanin. Beide Hämocyanin-Typen unterscheiden sich in ihrer Quartärstruktur sehr deutlich (→ 2.2.1.). Folglich können die Ergebnisse auch nicht in einer bestimmten Hämocyanin-Konformation ihre Ursache haben.

Demzufolge kann eine spezifische Wechselwirkung zwischen einer bestimmten Hämocyanin-Konformation und den Crosslinkern außer Betracht gelassen werden.

5.4.3. Realisierung verschiedener Affinitäten

Ausgangspunkt dieses Projektes war die Vorstellung, daß Hämocyane verschiedene O_2 -Affinitäten besitzen, denen jeweils eine bestimmte Konformation der Protein-Matrix und des aktiven Zentrums zugeordnet werden könne. Insbesondere sollte oxygeniertes Hämocyanin bevorzugt in einer hoch-affinen Form vorliegen (R-Zustand), deoxygeniertes Hämocyanin in einer nieder-affinen (T-Zustand; → 2.1.1.). Diese verschiedenen Konformationen sollten sich mit Hilfe von Crosslinkern "einfangen" (fixieren) lassen und anschließend charakterisiert werden. Allerdings zeigte sich, daß unabhängig vom Oxygenierungsgrad immer eine hoch-affine Form fixiert worden war (Tab. 5.6). Hier wird ein Modell vorgestellt, mit dem sich diese Ergebnisse beschreiben lassen. Ausgangspunkt ist die Annahme, daß das Hämocyanin zum Zeitpunkt der Quervernetzung im R- bzw. T-Zustand vorlag und diese Zustände auch tatsächlich von den Crosslinkern fixiert wurden. Daß dennoch der vernetzte T-Zustand eine dem vernetzten R-Zustand ähnliche Affinität aufwies, wird so gedeutet, daß durch die Quervernetzung gerade die Eigenschaften des T-Zustandes zerstört wurden, die ihn vom R-Zustand unterschieden. Hierbei könnte es sich um die Flexibilität der Protein-Matrix handeln. Daraus folgt, daß die Protein-Matrix die Affinität modulieren kann. Dies stellt die Grund-Annahme des folgenden Modells dar.

In dem Modell soll zunächst eine Trennung der Gesamt-Affinität in zwei Beiträge vorgenommen werden: einen Beitrag der aktiven Zentren und einen der Protein-Matrix. Die O_2 -Affinität der aktiven Zentren wird als konstant angenommen und soll damit unabhängig von dem Beladungszustand oder der Konformation des Proteins sein. Diese „Grund“-Affinität der aktiven Zentren soll durch die Protein-Matrix moduliert werden können. Gegenüber der wässrigen Umgebung stellt das Protein einen Bereich mit geringerer Diffusionsgeschwindigkeit für Sauerstoff dar: die mittlere Diffusionskonstante sinkt auf etwa 20 – 50 % ab [97]. Dadurch reduziert das Protein die Geschwindigkeit, mit der O_2 zum aktiven Zentrum gelangen kann (bzw. von diesem weg). In dem Modell werden zwei Konformationen postuliert, die sich hinsichtlich ihrer Passierbarkeit für O_2 deutlich unterscheiden. Zum einen sollte es eine offene Form geben, die Diffusionskanäle, bewegliche Strukturen oder ähnliches besitzt, in der O_2 leicht, d.h. schnell, diffundieren kann. Zum anderen sollte es eine geschlossene Form geben, die eine eher kompakte Struktur ohne Kanäle aufweist, in der der Sauerstoff nur langsam vorankommt. Schematisch sind diese beiden Konformationen in Abb 5.15 dargestellt, wobei lediglich der besseren Darstellbarkeit wegen Diffusionskanäle abgebildet sind. Es ist jeweils nur eine Untereinheit schematisch abgebildet. Diese soll stellvertretend für alle 24 Untereinheiten innerhalb des 24-meren Vogelspinnen-Hämocyanins stehen. Eine solche Untereinheit ist nicht identisch mit einer isolierten Untereinheit, da die Oligomerisierung sicherlich einen Einfluß auf die Affinität und Konformation der Untereinheiten hat.

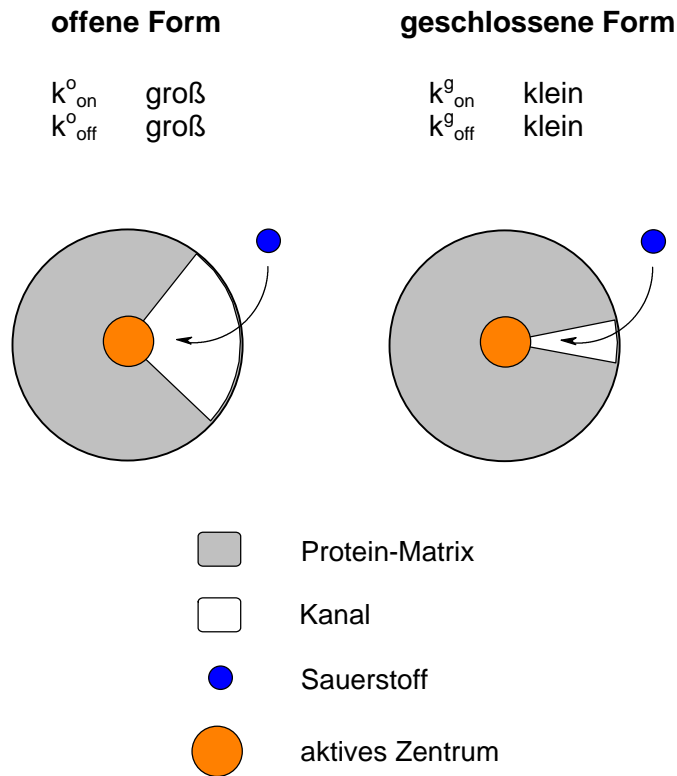


Abb. 5.15: Schematische Darstellung der beiden Konformationen in dem Modell zur Affinität

Bei dem Modell wird angenommen, daß es zwei verschiedene Konformationen der Protein-Matrix gibt, die sich hinsichtlich ihrer Permeabilität für Sauerstoff unterscheiden. In einer offenen Form kann die Diffusion schnell erfolgen (große Geschwindigkeitskonstanten). In einer geschlossenen Form kann der Sauerstoff dagegen nur langsam zum aktiven Zentrum bzw. von diesem weg diffundieren (kleine Geschwindigkeitskonstanten).

Um die Affinität dieser beiden Zustände zu beschreiben, muß berücksichtigt werden, daß Affinität eine Gleichgewichtseigenschaft ist. Die Bindung von Sauerstoff an eine (nicht-kooperative) Hämocyanin-Untereinheit kann als



geschrieben werden. Hierbei sind k_{on} und k_{off} die Geschwindigkeitskonstanten der Oxygenierung bzw. Deoxygenierung. Die Gleichgewichtskonstante (Dissoziationskonstante) K_{diss} ergibt sich zu

$$K_{\text{diss}} = \frac{[\text{Hc}] \cdot [\text{O}_2]}{[(\text{Hc} + \text{O}_2)]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (5.3)$$

Bei Halbsättigung ist $[(Hc+O_2)] = [Hc]$, woraus sich

$$K_{\text{diss}} = [O_2]_{50} = p_{50} \quad (5.4)$$

ergibt. Die entsprechende Sauerstoff-Konzentration $[O_2]_{50}$ (Partialdruck) wird als Halbsättigungsdruck p_{50} bezeichnet und zur Charakterisierung der Affinität verwendet. In Abb. 5.15 besitzt die offene Form hohe Geschwindigkeitskonstanten (k_{on}^o - und k_{off}^o -Rate sind groß), die geschlossene Form entsprechend niedrigere Raten (k_{on}^g - und k_{off}^g -Rate sind klein). Dadurch, daß sich beim Übergang von der offenen in die geschlossene Form beide Geschwindigkeitskonstanten in die gleiche Richtung ändern, bleibt jedoch das Verhältnis der jeweiligen Raten gleich.

$$\frac{k_{\text{off}}^g}{k_{\text{on}}^g} = \frac{k_{\text{off}}^o}{k_{\text{on}}^o} \quad (5.5)$$

Beide Formen weisen die gleiche Affinität auf. Die Protein-Matrix verändert also nicht die Lage des Gleichgewichtes sondern nur die Geschwindigkeit, mit der es sich einstellt. Daher reichen diese zwei Formen noch nicht aus, um verschiedene Affinitäten zu realisieren. Jedoch kann ein Zustand beschrieben werden. Unter der Annahme, daß die Affinität der aktiven Zentren hoch sei, läßt sich so der hoch-affine R-Zustand beschreiben. Es handelt sich um Zustände, die neben der Fähigkeit, O_2 zu binden, keine Flexibilität der Protein-Matrix benötigen. Dies ist in Abb. 5.16 dargestellt, wobei die dickeren Wände der Kanäle andeuten, daß hier keine Konformationsänderungen bei O_2 -Bindung möglich sein sollen. Hierbei bleibt zunächst offen, ob es sich bei dem R-Zustand um die feste offene Form (Abb. 5.16 oben) oder die feste geschlossene Form (Abb. 5.16 unten) handelt.

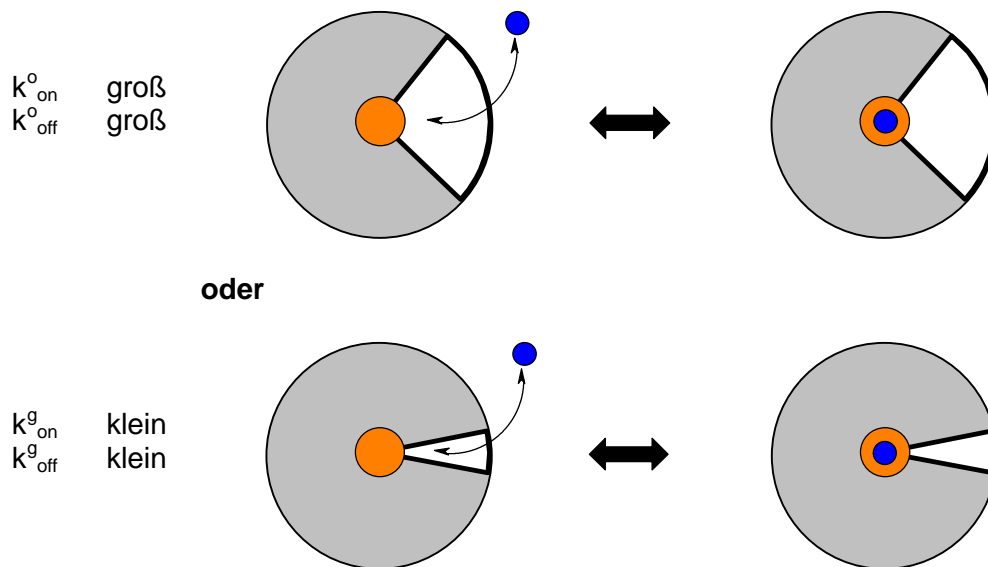


Abb. 5.16: Zwei mögliche Zustände des hoch-affinen R-Zustandes im vorgeschlagenen Modell

Die Zustände treten als feste Konformation auf, d.h. es sollen keine Konformationsänderung bei Bindung von O₂ stattfinden. Dies ist graphisch durch die dickeren Wände der Kanäle angedeutet. Derzeit läßt sich noch nicht entscheiden, ob es sich dabei um die offene Form (oben) oder die geschlossene (unten) handelt.

Wie ließe sich mit diesem Modell eine Veränderung in der O₂-Affinität (p_{50}) erklären? Es wird angenommen, daß die Affinität der aktiven Zentren immer hoch sei. Dann stellt sich die Frage, wie eine niedrige Affinität der Untereinheiten (T-Zustand) realisiert werden kann. Gemäß der Grund-Annahme dieser Modellvorstellung müssen dynamische Prozesse der Protein-Matrix eine Rolle spielen. Abb. 5.17 zeigt eine Möglichkeit zur Realisierung. Der nieder-affine T-Zustand besteht zunächst aus der geschlossenen Konformation (Abb. 5.17 oben). Bei Bindung von O₂ am aktiven Zentrum wird eine Änderung der Protein-Matrix induziert, so daß die Untereinheit in die offene Form übergeht (Abb. 5.17 unten). Nach der Abgabe des Sauerstoffes wandelt sich das Protein wieder in die geschlossene Form um (Abb. 5.17 oben).

Betrachtet man die Geschwindigkeitskonstanten, so ergibt sich folgendes Bild: Ein O₂-Molekül hat es wegen des engeren Kanals zunächst schwer, zum aktiven Zentrum zu gelangen. Dadurch ist die k_{on}^{g} -Rate niedrig. Durch die Konformationsänderung verbreitert sich der Kanal, wodurch es gebundenem Sauerstoff leicht gemacht wird, sich wieder zu entfernen. Dadurch ist die $k_{\text{off}}^{\text{o}}$ -Rate hoch. Das Verhältnis der beiden Raten

$$\frac{k_{\text{off}}^{\text{o}}}{k_{\text{on}}^{\text{g}}} > \frac{k_{\text{off}}^{\text{g}}}{k_{\text{on}}^{\text{g}}} = \frac{k_{\text{off}}^{\text{o}}}{k_{\text{on}}^{\text{o}}} \quad (5.6)$$

ist hoch, was einer niedrigen Affinität entspricht. Man kann diesen dynamischen Zustand demnach als T-Zustand definieren.

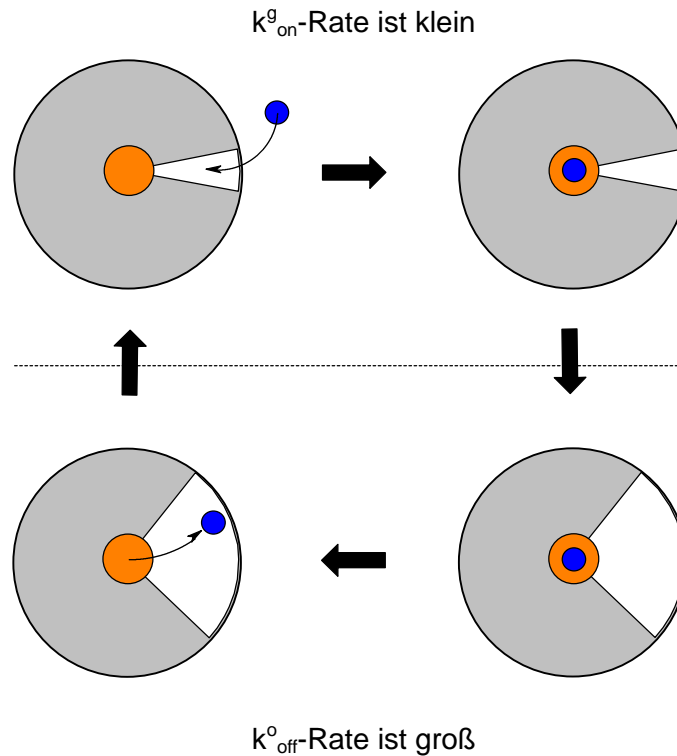


Abb. 5.17: Der nieder-affine T-Zustand im vorgeschlagenen Modell

Die Untereinheiten liegen in der geschlossenen Form vor. Die Bindung von O₂ induziert einen Übergang der Protein-Matrix in die offene Form. O₂ kann somit nur schlecht (langsam) an das aktive Zentrum binden, aber leicht (schnell) wieder abgegeben werden ($k_{on}^g < k_{off}^o$). Nach der Abgabe von O₂ wandelt sich das Protein wieder in die geschlossene Form um.

Für die Realisierung einer niedrigen Affinität ist es notwendig, daß der in Abb. 5.17 dargestellten Zyklus nur in der angegebenen Richtung durchlaufen werden kann. Die Bindung und Abgabe von Sauerstoff sind mit Sicherheit reversible Prozesse, aber die Konformationsänderungen der Protein-Matrix sollen nur in eine Richtung ablaufen können: bei gebundenem O₂ kann sich das Protein nur von der geschlossenen in die offene Form umwandeln, ohne gebundenes O₂ nur in umgekehrter Richtung.

Interpretation der CL-Ergebnisse

Die Wirkung der Crosslinker auf das O₂-Bindungsverhalten läßt sich nun sehr einfach verstehen: Nach dem Modell liegt der hoch-affine R-Zustand als feste Konformation vor (Abb. 5.16). Das Fixieren der Struktur mit Hilfe der Crosslinker ändert daran nichts. Insofern sollten Konformation und Affinität der im oxy-Zustand quervernetzten Hämocyanine dem R-Zustand entsprechen. Die O₂-Bindungskurven belegen dies: die Affinität ist immer hoch (Tab. 5.6). Ob es sich

dabei um die offene oder geschlossene Form handelt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht entschieden werden.

Nach dem Modell besteht eine wesentliche Eigenschaft des nieder-affinen T-Zustandes in der Dynamik der Protein-Matrix, d.h. in der Fähigkeit, Konformationsänderungen durchführen zu können. Diese Fähigkeit wird durch die Quervernetzung aber gerade unterbunden. Die Vernetzung der geschlossenen Form (Abb. 5.17 oben links) mit extern bindenden Crosslinkern verhindert den Konformationsübergang bei O₂-Bindung. Die Untereinheit bleibt in der geschlossenen Form, woraus sich als Affinität $p_{50} = k_{\text{off}}^g / k_{\text{on}}^g$ ergibt. Dies entspricht einer hohen Affinität, die von $p_{50} = k_{\text{off}}^o / k_{\text{on}}^o$ nicht unterschieden werden kann. Damit erscheint die deoxygenierte Form bei Vernetzung als hoch-affiner R-Zustand. Und genau diese hohe Affinität konnte beim Messen der O₂-Bindungskurven beobachtet werden: der quervernetzte T-Zustand unterschied sich in seiner Affinität nicht oder nur unwesentlich vom quervernetzten R-Zustand.

Fazit

Das vorgestellte Modell kann die Affinitäten der quervernetzten Hämocyane beschreiben. Es macht folgende strukturelle Voraussagen, was die Konformation der quervernetzten Hämocyane betrifft. Das im T-Zustand vernetzte Hämocyanin sollte in einer geschlossenen Form vorliegen. Beim oxy-Hämocyanin kann noch nicht gesagt werden, ob es in der offenen oder geschlossenen Form auftritt.

5.4.4. Struktur vernetzter Hämocyane

Mit der native Gel-Elektrophorese, Immun-Gel-Elektrophorese und Elektronen-Mikroskopie war es nicht möglich, zwischen unbehandelten und quervernetzten Hämocyanin-Proben zu unterscheiden. Lediglich durch Zerstörung der Quartär-Struktur bei der denaturierenden Gel-Elektrophorese war eine Trennung von unbehandeltem und quervernetztem Hämocyanin möglich. Als Nebeneffekt der Quervernetzung traten geringe Mengen kleinerer Aggregate auf. Diese ließen sich auf den elektronen-mikroskopischen Aufnahmen erkennen (Abb. 5.11), machten sich aber auch in einer Bandenverbreiterung bei der nativen Gel-Elektrophorese (Abb. 5.8.b) und durch erhöhte Lichtstreuung bei den Absorptionmessungen (Abb. 5.6) bemerkbar.

Mit den genannten Methoden konnten auch keinerlei Unterschiede zwischen oxygeniert und deoxygeniert vernetzten Hämocyanin-Molekülen detektiert werden. Vergleichbare Resultate wurden schon früher erhalten [88, 89]. Oxygeniert und deoxygeniert gecrosslinktes Vogelspinnen-Hämocyanin war weder mit nativer Gel-Elektrophorese oder Immun-Gel-Elektrophorese noch durch Trypsin-Spaltung zu unterscheiden.

Mit den Raman-Messungen konnten direkt Eigenschaften des aktiven Zentrums untersucht werden. Doch auch mit dieser Methode war weder eine Unterscheidung zwischen unbehandeltem und quervernetztem Hämocyanin möglich,

noch zwischen oxygeniert und deoxygeniert gecrosslinktem. Insofern widersprechen diese Experimente der klassischen Affinitätsvorstellung, die ja gerade im aktiven Zentrum Unterschiede zwischen den Konformationen des oxy- und deoxy-Zustandes postulierte. Hier sei noch einmal betont, daß die Hämocyanin-Proben ohne kooperative O₂-Bindung hergestellt werden konnten. Daher können die Meßergebnisse eindeutig der oxy- bzw. deoxy-Konformation zugeordnet werden.

Die Verschiebung des Maximums der Tryptophan-Fluoreszenz bei Deoxygenierung wurde schon früher mit einer vergleichbaren Änderung von $\Delta\lambda = 5$ nm beobachtet [74]. Dabei blieb aber offen, ob es sich um ein Konformations- oder Beladungssignal handelt. Mit Hilfe der quervernetzten Hämocyanine konnte nun gezeigt werden, daß es sich um ein Beladungssignal handelt. Die Messungen liefern somit keine Information zur Konformation. Sie bestätigen aber noch einmal, daß die O₂-Bindung des Hämocyanins durch die Vernetzung nicht beeinträchtigt wird, und daß das Hämocyanin durch die Deoxygenierung keinen Schaden genommen hatte.

Bei der Fluoreszenz-Löschung der Tryptophane durch Acrylamid verhielt sich die deoxygeniert vernetzte Probe deutlich anders als die oxygeniert gecrosslinkte oder die Referenzen (Abb. 5.14). Diese Messungen haben eine doppelte Bedeutung: Zum einen erlaubten sie die Unterscheidung von oxygeniert und deoxygeniert vernetztem Hämocyanin. Damit lieferten sie den experimentellen Beweis, daß beim Crosslinken tatsächlich verschiedene Konformationen fixiert worden waren. Von den Crosslinkern wurde also keine Konformation induziert oder selektiert.

Andererseits lassen sich Rückschlüsse auf die Art der vernetzten Konformationen machen. Diese Schlüsse sollten nur als Indizien angesehen werden, da das Modell Aussagen über die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Sauerstoff macht und nicht über die Zugänglichkeit der Tryptophane für Acrylamid.

Oxygeniertes und oxygeniert vernetztes Hämocyanin sollten sich in der Konformation nicht unterscheiden. Dies wurde durch die Löscherperimente bestätigt. Bei der Beschreibung des Modells konnte nicht entschieden werden, ob oxygeniertes Hämocyanin in der offenen oder geschlossenen Form vorliegt (Abb. 5.16). Deoxygeniertes Hämocyanin sollte aber in der geschlossenen Form vorliegen (Abb. 5.17 oben links). Der deutliche Unterschied in der Löschbarkeit der beiden vernetzten Hämocyanine spricht für folgendes Bild. Im T-Zustand vernetztes Hämocyanin liegt in der geschlossenen Konformation vor, so daß eine schlechtere Zugänglichkeit der Tryptophane und somit eine geringere Löschung besteht. Die deutlich bessere Löschbarkeit des quervernetzten R-Zustandes spricht für die offene Form. Dieses Ergebnis würde auch mit den Resultaten der Röntgen-Kleinwinkel-Streuung und der analytischen Ultra-Zentrifugation übereinstimmen, wonach oxygeniertes Hämocyanin weniger kompakt vorliegt [69, 77]. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die diesem Bild möglicherweise widersprechen. Kinetische Messungen der Oxygenierung bzw. Deoxygenierung von nativem, d.h. nicht quervernetztem Hämocyaninen deuten darauf hin, daß sich die Affinitäten des R- und T-Zustandes vor allem in den k_{off} -Raten unterscheiden [98]. Dies ließe sich mit dem neuen Modell erklären, wenn der R-

Zustand fest in der geschlossenen Form (Abb. 5.16 unten) vorläge. Dann würden sich R- und T-Zustand bei der Oxygenierung nicht unterscheiden (beide geschlossene Form), dafür aber bei der Deoxygenierung (offene Form beim T-Zustand, geschlossene Form beim R-Zustand). Insofern würden die kinetischen Untersuchungen nicht mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Fluoreszenz-Löschung zusammenpassen. Allerdings wurde bei der Analyse der kinetischen Messungen ein Zwei-Zustandsmodell angenommen, daß aber nicht ausreicht, um das komplexe O₂-Bindungsverhalten des 24-meren Hämocynins zu beschreiben [18, 20, 35, 37, 38].

Fazit

Die Unterschiede zwischen oxygeniert und deoxygeniert vernetztem Hämocyanin fallen sehr subtil aus. In der Struktur der aktiven Zentren konnten mittels Resonanz-Raman-Messungen keine Veränderungen festgestellt werden. Insofern widersprechen die Experimente der klassischen Vorstellung, wonach die Konformation des aktiven Zentrums für die Affinität maßgeblich sei. Dagegen lassen sich die Befunde zur Struktur und Funktion vernetzter Hämocyanine durch das hier vorgestellte Modell erklären.

5.4.5. Ausblick

Ein wesentlicher Aspekt des neuen Modells liegt darin, daß die O₂-Affinität über die Permeabilität der Protein-Matrix eingestellt wird. Entscheidend ist die Geschwindigkeit, mit der O₂ zum aktiven Zentrum bzw. von diesem weg diffundieren kann. Diese Diffusionsgeschwindigkeiten sollten sich durch kinetische Untersuchungen der O₂-Bindung bzw. -Abgabe, z.B. mit der Stopped-Flow-Technik, messen lassen. Entsprechende Experimente mit quervernetzten Hämocyaninen sind für die nähere Zukunft geplant. Auf diesem Weg sollte sich z.B. entscheiden lassen, welche der beiden Möglichkeiten den oxy-Zustand (Abb. 5.16) zutreffend beschreibt.

Ein weiteres Ziel wird sein, das vorliegende Affinitätsmodell mit den bestehenden Kooperativitätsmodellen zu verbinden. Hierzu sind noch Erweiterungen notwendig. Dies wird allein durch die Tatsache deutlich, daß die Bindungskurven des *Eurypelma*-Hämocyanins nach dem "Nesting-Modell" mindestens vier verschiedene Affinitäten zu ihrer Beschreibung benötigen (→ 5.1.1.), das Affinitätsmodell aber in der jetzigen Form nur zwei Affinitäten anbietet.

Beschreibt das vorgestellte Modell ein molekül-spezifisches Phänomen oder läßt es sich auch auf die Liganden-Bindung anderer Proteine anwenden? Als Beispiel möchte ich auf das in seiner Funktion ähnliche Hämoglobin hinweisen (→ 2.1.1.). Beim tetrameren Hämoglobin scheinen deutliche Parallelen zu existieren: die Behandlung des Hämoglobins mit Crosslinkern führt meist zu nieder-affinen Produkten, unabhängig vom Beladungszustand während der Vernetzung [99 – 108]. Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei der Konformation mit hoher Affinität um einen dynamischen Zustand handelt, während die Konformation mit

niedriger Affinität fest wäre. Somit scheinen die Rollen von statischem und dynamischem Zustand gegenüber dem Hämocyanin vertauscht zu sein. Die Übertragung des Modells auf andere Proteine wird unterstützt durch die Tatsache, daß z.B. beim Myoglobin die Trennung der Affinität in zwei Bereiche, einen des aktiven Zentrums und einen der Protein-Matrix, von mehreren Autoren diskutiert wird [109, 110].

6. Beladung - Einzel-Moleküle

6.1. Einleitung

Dieses Kapitel behandelt die Untersuchungen bzgl. der Charakterisierung verschiedener Beladungen auf der Ebene einzelner Hämocyanin-Moleküle. Das Projekt wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Basché (Physikalische Chemie, Universität Mainz) durchgeführt.

6.1.1. Ziele

Ziel der durchgeführten Experimente war es, die Beladungsverteilung von Hämocyaninen in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration zu bestimmen. Hierzu sollten einzelne Hämocyanin-Moleküle immobilisiert und abgebildet werden. Die Detektion sollte über die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz erfolgen, die zugleich ein Beladungssignal darstellt. Aus der Beladung von sehr vielen individuellen Hämocyaninen ergäben sich dann Beladungsverteilungen bei vorgegebenen Sauerstoff-Konzentrationen. Fernziel war die Messung von Sauerstoff-Bindungskurven an einzelnen Hämocyanin-Molekülen. Hierbei sollten die zeitlichen Beladungsfluktuationen verfolgt werden.

Um Schwierigkeiten bei der Anregung im UV-Bereich zu umgehen, wurde eine relativ neue Technik, die Zwei-Photonen-Anregung, verwendet. Wie sich diese neue Art der Anregung auf die Fluoreszenz-Eigenschaften von Hämocyaninen auswirkt, war noch unklar. Daher sollte als erstes eine Charakterisierung der Fluoreszenz am Ensemble durchgeführt werden.

6.1.2. Spektroskopie einzelner Proteine

Die erste Untersuchung an einzelnen Proteinen wurde von Rotman (1961) durchgeführt [111]. Die Experimente gelangen ihm ohne eine besondere apparative Ausstattung (er benutzte eine batterie-betriebene Lampe), indem er die enzymatische Aktivität der β -D-Galaktosidase nutzte. Das Enzym wandelte ein nicht-fluoreszierendes Substrat in ein fluoreszierendes Produkt um. Obwohl damit das Protein nur indirekt nachgewiesen wurde, konnte er die β -D-Galaktosidase bzgl. Molmasse, Aktivität, thermischer Inaktivierung und Modifikation auf der Einzel-Molekülebene charakterisieren. Mit dieser Arbeit war Rotman seiner Zeit etwa 30 Jahre voraus. Die nächsten Veröffentlichungen

erschieden erst Mitte der 90er Jahre. Hierbei wurden zwei andere Enzyme, die Laktat-Dehydrogenase [112 – 115] und die alkalische Phosphatase [116, 117], untersucht.

Ein direkter spektroskopischer Nachweis von Proteinen wurde meist mit Hilfe von Fluoreszenz-Markierungen durchgeführt. Es gibt nur wenige Beispiele, in denen ein intrinsisches Fluoreszenz-Signal genutzt werden konnte: Phycoerythrin [118], *green fluorescent protein* (GFP) [119, 120], Licht-Sammelkomplex (LHC) [121] und Cholesterin-Oxidase [122]. Diese vier Proteine zeichnen sich durch außergewöhnliche Fluorophore im sichtbaren Spektralbereich aus. Aber praktisch alle Proteine enthalten intrinsische Fluorophore (Tyrosin, Tryptophan), die für Untersuchungen am Ensemble genutzt werden. Bisher liegen jedoch noch keine Arbeiten zu Untersuchungen an Einzel-Molekülen vor. Der Grund liegt (1) in der Schwierigkeit eine geeignete Lichtquelle für den UV-Bereich zu finden, (2) in dem hohen Untergrund bei UV-Anregung und (3) in der geringen Quantenausbeute von Tyrosin ($\Phi = 0,14$) und Tryptophan ($\Phi = 0,13$) [68].

Immobilisierung

Für die Abbildung einzelner Moleküle ist deren räumliche Immobilisierung erforderlich. Hier bieten sich aufgrund ihrer Transparenz Gele an, in die sich Proteine leicht einbetten lassen. Es wurden Agarose-Gele [122] und Polyacrylamid-Gele [120, 123] verwendet. Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, einzelne Proteine an Oberflächen zu immobilisieren (\rightarrow 7.1.3.). Geeignete Verfahren sind die Adsorption [124 – 126], kovalente Anheftung [127] und *spin coating* [119]. Außerdem lassen sich durch eine Strukturierung der Oberfläche nanoskopisch begrenzte Volumina herstellen, in denen das Protein eingeschlossen werden kann [111, 115].

6.1.3. Zwei-Photonen-Anregung

Die meisten Probleme beim Nachweis von Protein-Fluoreszenz lassen sich durch ein relativ neues Verfahren, die Zwei-Photonen-Anregung, umgehen [128 – 130]. Obwohl die Idee der Zwei-Photonen-Anregung 70 Jahre alt ist (Maria Göppert-Mayer, 1931), bedurfte es doch einer Reihe technischer Entwicklungen, um diesen Prozess auch realisieren zu können [131].

Prinzip

Den klassischen Fall der Anregung bzw. Absorption stellt die Ein-Photonen-Anregung (*one photon excitation*, OPE) dar. Ein elektronisches System, das sich im Grundzustand befindet, geht durch Absorption eines Photons in den angeregten Zustand über. Dieses Photon besitzt die gesamte Energie, die für den Übergang notwendig ist (in Abb. 6.1 und Abb. 6.2 blau dargestellt). Anschließend relaxiert das System in den Schwingungsgrundzustand und kann von dort aus ein Fluoreszenz-Photon emittieren (in Abb. 6.1 und Abb. 6.2 grün dargestellt).

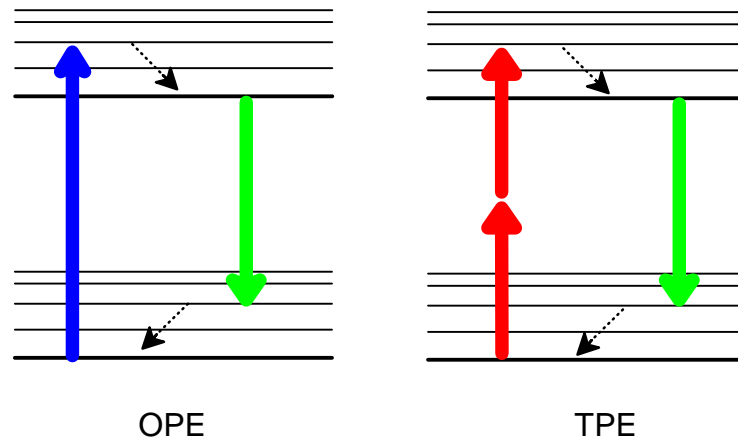


Abb. 6.1: Fluoreszenz-Zyklen bei der Ein- und Zwei-Photonen-Anregung

- OPE** Bei der klassischen Ein-Photonen-Anregung erfolgt der Übergang durch die Absorption eines hoch-energetischen Photons (blau). Das System relaxiert (schwarzer Pfeil) und kann Fluoreszenzlicht (grün) emittieren.
- TPE** Bei der Zwei-Photonen-Anregung absorbiert die Probe direkt hintereinander zwei nieder-energetische Photonen (rot). Ihre zusammengefaßte Energie entspricht der des Übergangs. Relaxation und Emission verlaufen wie bei der Ein-Photonen-Anregung.

Die Zwei-Photonen-Anregung (*two photon excitation*, TPE) ist ein nicht-linearer Prozess, bei dem die für den Übergang notwendige Energie nicht von einem sondern zwei Photonen geliefert wird (in Abb. 6.1 und Abb. 6.2 rot dargestellt) [131]. Anschaulich läßt sich dies so darstellen, daß zunächst ein Photon absorbiert wird, wodurch das System auf ein virtuelles Niveau angehoben wird. Dieses Niveau ist extrem instabil. Seine Lebensdauer $\Delta\tau$ wird durch die Unschärfe-Relation

$$\Delta E \cdot \Delta\tau \approx h \quad (6.1)$$

bestimmt und liegt in der Größenordnung von einer Femto-Sekunde [132]. Hierbei ist ΔE der energetische Abstand zu den realen Niveaus des Systems und h das Plancksche Wirkungsquantum. Wird innerhalb der Lebensdauer $\Delta\tau$ ein zweites Photon absorbiert, erreicht das System das gleiche Energie-Niveau wie im Ein-Photonen-Fall. Auch die anschließende Relaxation und Emission eines Fluoreszenz-Photons entsprechen den Vorgängen bei der Ein-Photonen-Anregung (in Abb. 6.1 und Abb. 6.2 grün dargestellt).

Die Wahrscheinlichkeit für ein solches Doppel-Absorptionsereignis steigt mit dem Quadrat der Anregungsintensität [129, 133]. Allgemein läßt sich die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität (FI) von der Anregungsintensität (AI) durch

$$FI \sim AI^2 \quad (6.2)$$

beschreiben, wobei n die Anzahl der pro Anregung benötigten Photonen ist [134, 135]. Für die Ein-Photonen-Anregung ergibt sich $n = 1$, für die Zwei-Photonen-Anregung dagegen $n = 2$. Bei den Lichtintensitäten, die in klassischen Fluorimetern auftreten, ist die Zwei-Photonen-Anregung jedoch vernachlässigbar. Es bedarf einer starken Lichtquelle (Laser), die zudem stark fokussiert werden muß (Objektiv mit hoher numerischer Apertur), um die Ausbeute des Zwei-Photonen-Prozesses auf ein meßbares Maß anzuheben [129]. Weiterhin ist es von Vorteil, die Anregungsenergie in Pulsen zu bündeln [128].

Vorteil

Ein wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß sowohl das Anregungslicht als auch die Fluoreszenz von Verunreinigungen einen sehr großen spektralen Abstand zur Tryptophan-Fluoreszenz bei 336 nm haben (Abb. 6.2). Dies erleichtert die Trennung des schwachen Fluoreszenz-Lichtes von dem um mehrere Größenordnungen stärkeren Anregungslicht [133, 136].

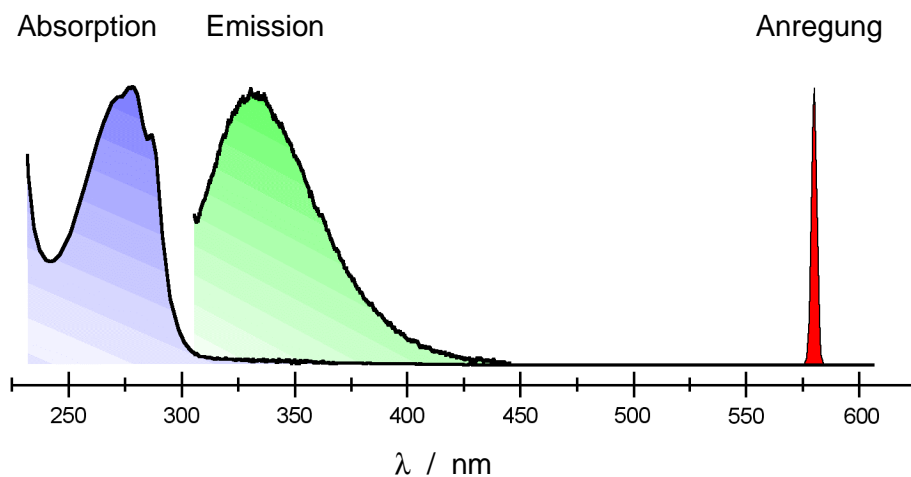


Abb. 6.2: Spektrale Lage der Zwei-Photonen-Anregung relativ zur klassischen Ein-Photonen-Anregung

Die klassische Ein-Photonen-Absorption der Tryptophane im Hämocyanin ist blau dargestellt. Bei der Zwei-Photonen-Anregung wird die Probe jedoch mit Licht der doppelten Wellenlänge (rot) angeregt. Das emittierte Fluoreszenz-Spektrum ist grün dargestellt. Die Farben stimmen mit denen in Abb. 6.1 überein.

Mit dieser Methode konnten bereits einzelne Fluorophore nachgewiesen werden: Rhodamin B in Lösung [133], Diphenyl-okta-tetraen in einer Festkörpermatrix [137] und Coumarin-120 in Lösung [138].

Auswahlregeln

Bei der Anregung von Atomen ist es nicht möglich, mit Ein- und Zwei-Photonen-Anregung die selben Niveaus zu erreichen: jedes Absorptionereignis ist immer mit einer Änderung der Nebenquantenzahl l um ± 1 verbunden [139]. Dadurch wird eine Änderung der

$$\text{Parität} \quad (-1)^l \quad (6.3)$$

hervorgerufen [139]. Die Parität ändert sich im Ein-Photonen-Fall einmal, im Zwei-Photonen-Fall dagegen zweimal, bleibt also gleich [135]. Somit sind durch Ein-Photonen-Anregung ausschließlich die Niveaus erreichbar, die im Zwei-Photonen-Fall gerade verboten sind. Da dies auch umgekehrt gilt, sind die beiden Anregungsarten komplementär.

Bei der Absorption auf molekularer Ebene kann diese Auswahlregel "aufgeweicht" sein. Ihre Gültigkeit hängt stark von der Symmetrie des Systems ab. Hochsymmetrische Moleküle, wie z.B. Benzol oder Tyrosin, verhalten sich diesbezüglich wie Atome [140, 141]. Die Zwei-Photonen-Anregung kann nicht in dasselbe Niveau erfolgen wie im Ein-Photonen-Fall. Daher muß im Zwei-Photonen-Fall ein energetisch höher liegendes Niveau angeregt werden: das Anregungsspektrum ist um etwa 30 nm blauverschoben [140, 142]. Dagegen muß bei unsymmetrischen Molekülen die Paritätsänderung nicht streng erfüllt sein. Tryptophan stellt aufgrund des 2. Ringes und des Stickstoff-Atoms ein hinreichend unsymmetrisches System dar. Es ist in diesem Fall möglich, durch Ein- und Zwei-Photonen-Anregung die selben Übergänge anzuregen [140, 143]. Es tritt keine Verschiebung des Anregungsmaximums auf.

Proteine

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Aminosäuren hat Konsequenzen für die Anregung von Proteinen. Im Ein-Photonen-Fall werden diese üblicherweise bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt, da dort Tyrosin und Tryptophan stark absorbieren [61]. Im Zwei-Photonen-Fall ist dies anders: durch die Blauverschiebung des Tyrosinspektrums absorbiert bei einer Wellenlänge von $2 \times 280 \text{ nm} = 560 \text{ nm}$ fast ausschließlich Tryptophan [140, 142].

Da die Zwei-Photonen-Anregung eine relativ neue Methode ist, sind bisher noch nicht viele Proteine untersucht worden. Veröffentlichungen zur Tryptophan-Fluoreszenz liegen von sieben Proteinen vor: Hämoglobin [141, 144], Albumin [141, 142, 145, 146], Trypsin [141], Thyroglobulin [141], Purin-Nucleosid-Phosphorylase [142], Laktat-Alkohol-Dehydrogenase [147] und einer Mutante des Troponin C [148]. Die Arbeiten kommen weitgehend zu dem Ergebnis, daß die Eigenschaften der Tryptophan-Fluoreszenz (Spektrien, Lebensdauer, spektrale Verschiebungen bei Löschung oder Denaturierung) mit denen der Ein-Photonen-Anregung übereinstimmen. Lediglich in der ältesten Arbeit (von 1987) wird von Abweichungen berichtet. Hier sind bei Zwei-Photonen-Anregung Rotverschiebungen der Emissionsspektren um 20 nm beobachtet worden [141].

6.1.4. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ist eine Methode zur Bestimmung der Diffusion von Fluorophoren. Dabei werden Fluktuationen der Fluoreszenz-Intensität in einem sehr kleinen Anregungsvolumen detektiert. Die Fluktuationen werden durch die Diffusion einzelner Moleküle in und aus dem Laser-Fokus hervorgerufen. Dadurch ist das Licht, das von einzelnen Fluorophoren emittiert wird, zeitlich gebündelt (korreliert). Diese Korrelation wird ausgenutzt, um die Verweildauer der Moleküle im Anregungsvolumen zu ermitteln. Meßgröße ist die Fluoreszenz-Intensität FI als Funktion der Zeit t . Diese wird mit sich selbst korreliert. Die Auto-Korrelation wird durch eine Korrelationsfunktion beschrieben, wobei τ der Verschiebe-Parameter ist [149].

$$G(\tau) = \frac{\int FI(t) \cdot FI(t + \tau) dt}{\int FI^2(t) dt} \quad (6.4)$$

Für bestimmte Bewegungsformen der Fluorophore, z.B. die freie Diffusion in drei Dimensionen, kann die Korrelationsfunktion durch geeignete Modelle beschrieben werden. Jedoch hängt das Modell von der Art der Anregung ab.

Ein-Photonen-Anregung

Bei der Ein-Photonen-Anregung mit konfokaler Detektion kann die freie Diffusion in drei Dimensionen durch die Korrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{\gamma}{V_{\text{eff}} \cdot c} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}\right)^{-1/2} \quad (6.5)$$

beschrieben werden [149, 150]. Hierbei ist γ der Kontrast-Faktor, V_{eff} das effektive Fokus-Volumen, c die Konzentration und D der Diffusionskoeffizient. Weiterhin gehen die Abmessungen des Fokus ein (Abfall auf $1/e^2$), dessen Radius senkrecht zur Strahlrichtung mit ω_0 und in Strahlrichtung mit z_0 bezeichnet wird. Bei Ein-Photonen-Anregung kann der Fokus durch drei Gauß-Funktionen beschrieben werden, woraus sich

$$V_{\text{eff}} = \sqrt{\frac{\pi^3}{8}} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0 \quad (6.6)$$

ergibt [151].

Zwei-Photonen-Anregung

Bei Zwei-Photonen-Anregung muß eine deutlich modifizierte Form von Gleichung (6.5) verwendet werden [152]. Der Fokus wird in diesem Fall durch zwei Gauß- und eine Lorentz-Funktionen beschrieben, was zu der analytisch nicht darstellbaren Form

$$G(\tau) = \frac{2}{\pi^2 c \omega_0^2 \sqrt{4\pi D \tau}} \int \frac{\exp\left(-\frac{8 \pi^2 \omega_0^2}{a \lambda^2} b^2\right)}{b^4 + (2+a)b^2 + \frac{a^2}{4}} \cdot \left[\frac{2b^2 + a - 4}{\sqrt{2(2+b^2)}} + \frac{2}{\sqrt{2+b^2+a}} \right] db \quad (6.7)$$

führt, wobei

$$a = \frac{16 D \tau}{\omega_0^2} \quad (6.8)$$

und λ die Anregungswellenlänge ist. Das Integral muß numerisch berechnet werden [152].

6.1.5. Photostabilität

Fluorophore

Ein kritischer Punkt bei Einzel-Molekül-Experimenten ist die Stabilität des Fluorophors. Ein licht-induzierter Verlust der Fluoreszenz (Bleichen) tritt bei allen Farbstoffen auf und begrenzt die maximale Meßzeit [153]. Dadurch sind selbst bei einem guten Fluorophor, wie z.B. Rhodamin, nicht mehr als $10^5 - 10^6$ Photonen zu erwarten [154, 155]. Die Ursachen für diesen Prozess sind nicht klar. Allerdings läßt sich die Photostabilität auf zwei Weisen deutlich erhöhen: durch Zugabe von Reduktionsmitteln, wie z.B. Mercaptoethanol [125], oder durch Entfernung von Sauerstoff. Dies geschieht häufig enzymatisch durch Verbrennen von Glukose durch das Enzym Glukose-Oxidase [125, 156 – 159]. Bei gleichzeitiger Anwendung beider Verfahren kann die Photostabilität um den Faktor 600 – 1000 verbessert werden [125, 154]. Aufgrund dieser Beobachtungen werden chemische Veränderungen am Fluorophor, vermutlich durch Oxidation oder Radikalbildung, als Ursache für das Bleichen angesehen [153, 154].

Proteine

Befinden sich die Fluorophore innerhalb von Proteinen, werden sie durch dieses geschützt. Die Protein-Matrix setzt die Zugänglichkeit der Fluorophore für Radikale oder Sauerstoff herab [97, 160, 161]. Jedoch soll bei der Untersuchung von Proteinen neben den Fluorophoren natürlich auch das Protein stabil bleiben. Dies ist nicht unbedingt der Fall, da Inaktivierung bzw. Denaturierung von Proteinen auftreten kann [162, 163]. So spaltet UV-Licht Disulfid-Brücken, die für den Erhalt der Tertiärstruktur wichtig sind [163 – 167]. Das Licht wird von benachbarten Aromaten absorbiert und dann auf die Cystine übertragen [163, 164]. Hierbei spielt Tryptophan die wichtigste Rolle, aber auch von Tyrosin absorbiertes Licht kann zur Spaltung führen [164].

Zwei-Photonen-Anregung

Die Wahrscheinlichkeit eines Zwei-Photonen-Prozesses ist selbst für erlaubte Übergänge um Größenordnungen kleiner als die eines Ein-Photonen-Prozesses [168]. Um bei einem Fluorophor gleiche Fluoreszenz-Intensitäten hervorzurufen, ist im Falle der Zwei-Photonen-Anregung daher eine höhere Anregungsintensität im Vergleich zur Ein-Photonen-Anregung notwendig.

Bei biologischen Proben wird allgemein eine Wellenlängen-Abhängigkeit der Photostabilität beobachtet: Licht mit kürzerer Wellenlänge schädigt mehr als langwelliges. Zur quantitativen Beschreibung der Schädigung wird eine λ^{-n} -Abhängigkeit diskutiert, wobei n im Bereich 2 – 4 liegen soll [168]. Die Wellenlängen-Abhängigkeit läßt somit bei der Zwei-Photonen-Anregung eine geringere Schädigung der Probe erwarten.

Die entscheidende Frage ist, welcher der beiden Effekte überwiegt. Hierzu gibt es eine Abschätzung von Brakenhoff *et al.* [168]: Danach ist bei gleichen Fluoreszenz-Intensitäten die Anregungsintensität bei Zwei-Photonen-Anregung mindestens 100-mal höher als bei der Ein-Photonen-Anregung. Die Strahlenbelastung wird aufgrund der Wellenlängen-Abhängigkeit bestenfalls um den Faktor $2^4 = 16$ reduziert. Somit führt die Zwei-Photonen-Anregung zu einer etwa 10-mal höheren Strahlendosis der Probe und sollte bzgl. der Photostabilität keine Vorteile gegenüber der Ein-Photonen-Anregung bringen.

6.1.6. FluoSpheres

FluoSpheres sollten als leicht nachweisbare Modellsysteme für Hämocyane dienen. Dabei handelt es sich um kleine Kunststoff-Kügelchen der Firma Molecular Probes [62]. Die verwendeten FluoSpheres sind an ihrer Oberfläche mit dem Protein Avidin quervernetzt (\rightarrow unten). Dieses Protein enthält ebenfalls Tryptophane, die ähnliche Fluoreszenz-Eigenschaften wie das Vogelspinnen-Hämocyanin besitzen. Die Kügelchen sind in verschiedenen Größen erhältlich: $\emptyset = 1 \mu\text{m} / 200 \text{ nm} / 40 \text{ nm}$. Abhängig von der Größe variiert die Menge an gebundenem Avidin und somit auch die Anzahl der Tryptophane pro Kügelchen. FluoSpheres sind auch mit einer Farbstoff-Markierung erhältlich, die sich im Inneren der Kügelchen befindet. Der Farbstoff absorbiert und emittiert im sichtbaren Bereich. Dadurch sollten sich einzelne FluoSpheres mit einem empfindlichen Ein-Photonen-Mikroskop nachweisen lassen.

Avidin ist ein Protein, das im Eileiter und den Eiern von Vögeln, Amphibien und Reptilien vorkommt [169]. Es ist ein Homo-Tetramer mit einer Molmasse von 66 kg/mol [62, 63, 169]. Jede Untereinheit enthält 152 Aminosäuren, die eine β -Faß-Struktur, bestehend aus acht anti-parallelen Faltblättern, bilden [63]. Die Untereinheiten sind über Disulfid-Brücken miteinander verbunden [169]. Avidin hat die Aufgabe, Biotin (Vitamin H) zu binden, wodurch vermutlich das Wachstum von Mikroorganismen im nährstoffreichen Ei verhindert werden soll [12, 62, 63, 169]. Die Stärke der Bindung reicht mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 10^{-15} \text{ M}$ an die von kovalenten Bindungen heran [12, 63, 170]. Jede Untereinheit besitzt eine Biotin-Bindungsstelle [62, 63]. Ein tetrameres Avidin-Molekül enthält 16 Tryptophane (vier je Untereinheit) [169]. Deren Emission besitzt ein Maximum

bei $\lambda_{em} = 337$ nm mit einer Quantenausbeute von $\Phi = 0,135$ [169, 171]. Das in den FluoSpheres verwendete Avidin ist zuvor modifiziert worden [62]. Dies hat wenig Einfluß auf die Biotin-Bindung oder Fluoreszenz sondern dient lediglich dazu, unspezifische Wechselwirkungen zu verringern [62, 170].

6.2. Methoden

6.2.1. Spektroskopie

Ein-Photonen-Anregung: Ensemble

Die Messungen am Ensemble mit der klassischen Ein-Photonen-Anregung (Absorptions- und Fluoreszenz-Spektren) wurden wie in Abschnitt 4.2.2. beschrieben durchgeführt.

Ein-Photonen-Anregung: Einzel-Moleküle

Über die Fluoreszenz nach Ein-Photonen-Anregung wurde die Immobilisierung einzelner FluoSpheres bzw. einzelner fluoreszenz-markierter Hämocyanine kontrolliert (\rightarrow 6.3.5.). Dazu wurde ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop der Arbeitsgruppe Basché (Physikalische Chemie, Universität Mainz) benutzt. Der Aufbau ist in [172] beschrieben. Die Experimente wurden von Markus Lippitz (AG Basché) durchgeführt.

Zwei-Photonen-Anregung: Ensemble und Einzel-Moleküle

Die Messungen zur Zwei-Photonen-Anregung wurden an einem Laser-Raster-Mikroskop durchgeführt. Aufbau und Durchführung erfolgten im Rahmen eines gemeinsamen DFG-Projektes der Arbeitsgruppen Basché und Decker. Das Mikroskop wurde von Markus Lippitz (AG Basché, Physikalische Chemie, Universität Mainz) im Rahmen seiner Doktorarbeit aufgebaut und betreut. Die wesentlichen Punkte des Aufbaus (Abb. 6.3) sollen kurz erläutert werden.

Die Lichtquelle bestand aus einem mehrstufigen fs-Lasersystem. Ein von einem Argon-Ionen-Laser (Leistung = 15 W) gepumpter Titan-Sapphir-Laser erzeugte Pulse mit einer Wellenlänge von etwa 800 nm und einer Breite von typischerweise $\tau_p = 180$ fs. Damit wurde ein optisch-parametrischer Oszillator synchron gepumpt, der über einen 4-Wellen-Mischprozess Licht von etwa 1200 nm erzeugte. Dieses Licht wurde bereits im Oszillator frequenz-verdoppelt, wodurch das System die Erzeugung von fs-Pulsen im Wellenlängenbereich von $600 \text{ nm} \pm 70 \text{ nm}$ mit Leistungen bis zu 300 mW ermöglichte. Das Anregungslicht wurde mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur (100 x, NA = 1,2) auf die Probe fokussiert. Mit dem selben Objektiv wurde das Fluoreszenz-Licht eingesammelt und dann durch einen dichroitischen Spiegel und mehrere Filter herausgefiltert. Zur Detektion wurde ein Peltier-gekühlter GaAIAs-Photomultiplier

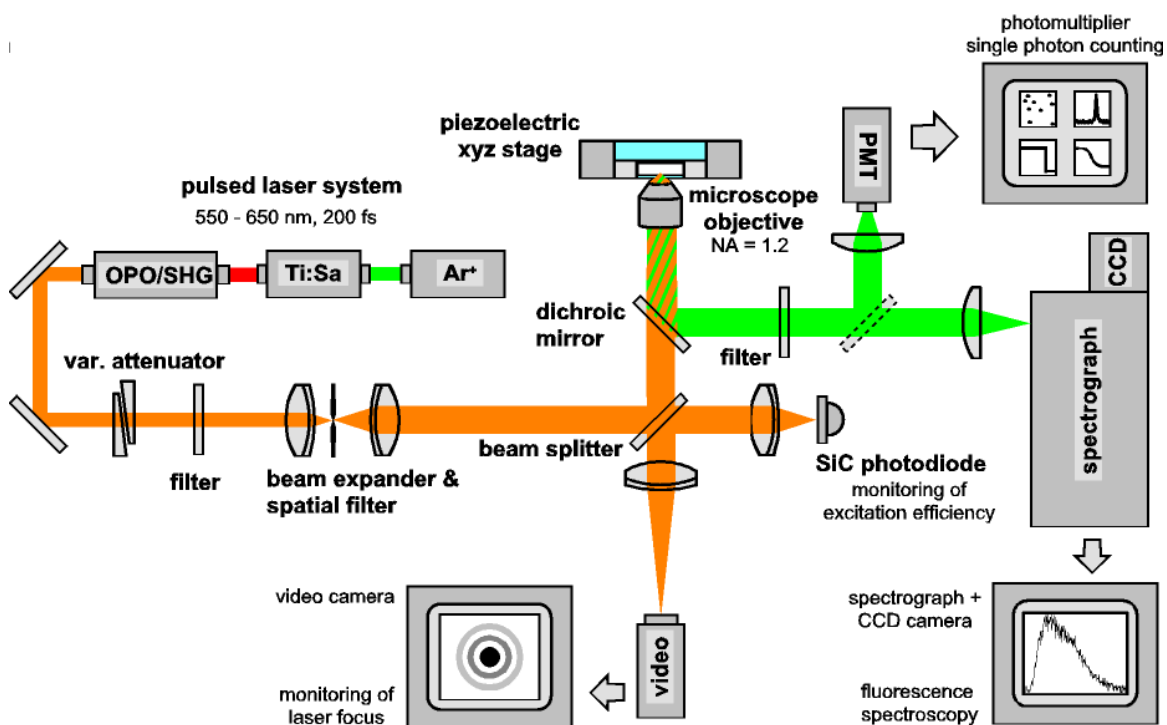


Abb. 6.3: Aufbau des Laser-Raster-Mikroskops zur Zwei-Photonen-Anregung
 Ar⁺: Argon-Ionen-Laser; CCD: CCD-Kamera; NA: numerische Apertur;
 OPO: optisch parametrischer Oszillator; SHG: Frequenzverdopplung;
 PMT: Photomultiplier; SiC: Siliziumcarbid (Material der Photodiode);
 Ti:Sa: Titan-Saphir-Laser

eingesetzt. Die üblicherweise verwendeten Avalanche-Photodioden sind in diesem Spektralbereich nicht empfindlich genug. Zur Messung von Spektren dienten ein Spektrograph und eine CCD-Kamera (N₂-gekühlt, CCD-Chip mit verstärkter Empfindlichkeit im UV). Zwei-dimensionale Bilder wurden mit Hilfe eines piezomechanischen 3D-Raster-Tisches (Verstellbereich 100 x 100 x 10 μm³) erzeugt, der die Probe durch den Laser-Fokus führte. Ein Photonen-Zähler registrierte dabei die Fluoreszenz-Intensität und steuerte den Raster-Tisch. Bei Ensemble-Messungen befand sich der Fokus etwa 20 μm weit in der Probe (ohne Bewegung des Raster-Tisches). Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

Mit Hilfe der Korrelationsspektroskopie sollte die Diffusion einzelner Hämocyanin-Moleküle nachgewiesen werden. Entsprechende Messungen wurden sowohl mit unbehandeltem Hämocyanin und Zwei-Photonen-Anregung durchgeführt als auch mit fluoreszenz-markiertem Hämocyanin (→ 6.2.5.) und Ein-Photonen-Anregung. Der Detektorausgang beider Mikroskope (Photodiode bzw. Photomultiplier) wurde jeweils an eine digitale Auto-Korrelator-Karte angeschlossen, die die Berechnung der Korrelationsfunktion nach Gleichung (6.4) durchführte.

Die Größe des jeweiligen Fokus, d.h. die Radien senkrecht (ω_0) und parallel (z_0) zur Strahlrichtung, wurde mit Hilfe von FluoSpheres ($\varnothing = 40$ nm) bestimmt.

6.2.2. O₂-Bindung

Die Hämocyanin-Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung wurde bei verschiedenen O₂-Beladungen untersucht. Um die O₂-Konzentration in der Probenlösung variieren zu können, wurde der Aufbau des Zwei-Photonen-Mikroskops erweitert. Die Erweiterung entsprach weitgehend der in Abschnitt 5.2.3. beschriebenen O₂-Bindungsapparatur. Abgesehen von Lichtquelle und Detektion bestanden folgende Unterschiede: es wurde keine Küvette mit Standard-Format (1 x 1 cm² Grundfläche) verwendet, sondern eine zylinderförmige ($\varnothing = 2,5$ cm). Anregung und Detektion erfolgen von unten durch den Boden der Küvette, der aus einem Quarz-Deckglas (Dicke 0,2 mm) bestand. Das Probenvolumen lag bei $V = 0,8$ mL.

6.2.3. UV-Bestrahlung

Die Photostabilität des Hämocyanins wurde durch Bestrahlung mit dem Licht einer starken UV-Lampe untersucht. Als Lichtquelle diente eine Hg(Xe)-Bogenlampe mit einer Leistung von 500 W und einer Leuchtdichte von etwa 100 mW / cm². Der Xe-Anteil lieferte ein kontinuierliches Spektrum, das durch das diskrete Spektrum des Hg überlagert wurde. Dadurch besaß die Lampe intensive Emissionslinien bei 297 / 313 / 334 / 365 / 405 / 435 / 546 und 576 nm. Der Infrarot-Anteil wurde durch eine Wassersäule (Länge 8 cm, wassergekühlt) weggefiltert. Die Hämocyanin-Lösung ($c = 2$ mg/mL; Tris-Puffer, → 3.2.1.) wurde in einer Quarz-Küvette bei Raumtemperatur bestrahlt. Nach 0 / 10 / 20 / 40 / 60 / 90 / 120 / 150 und 180 min wurden jeweils 100 μ L der Lösung entnommen, 1:10 mit Puffer verdünnt und bis zur Analyse dunkel gelagert. Die Analyse der bestrahlten Proben wurde etwa 30 min nach der letzten Probenentnahme unter oxy-Bedingungen (Luft-Sauerstoff) durchgeführt.

6.2.4. Gel-Elektrophorese

Die Stabilität des Hämocyanins nach UV-Bestrahlung wurde unter anderem mittels nativer Gel-Elektrophorese untersucht. Das Verfahren ist im Abschnitt 5.2.2. beschrieben worden.

6.2.5. Fluoreszenz-Markierung

Mit Hilfe von Fluoreszenz-Markierungen sollte die Immobilisierung einzelner Hämocyanin-Moleküle nachgewiesen werden. Hierzu wurde das Hämocyanin über seine Aminogruppen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Tetra-methyl-Rhodamin (TAMRA) kovalent markiert. Bei der Markierung lagen alle Lösungen in Borat-Puffer vor (\rightarrow 5.2.1.). Zu 100 μ L Hämocyanin-Lösung ($c = 3$ mg/mL) wurden 30 μ L Farbstoff-Lösung ($c = 1$ mM) gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Tris-Puffer ($V = \text{ad } 1$ mL) abgebrochen. Der freie Farbstoff, d.h. Farbstoff, der nicht an das Hämocyanin gekoppelt war, wurde durch Gelfiltration entfernt. Anschließend wurde das fluoreszenz-markierte Hämocyanin durch Ultra-Filtration weiter gereinigt und aufkonzentriert. Die letzten drei Schritte erfolgten mit Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.).

Der Farbstoff ist schlecht wasserlöslich. Daher wurde mit Dimethylsulfoxid zunächst eine konzentrierte Lösung angesetzt ($c = 10$ mM) und diese mit Borat-Puffer 1:10 verdünnt. Der Anteil an organischem Lösungsmittel im Kopplungsansatz lag damit bei 2,3 %.

6.2.6. Immobilisierung

Agarose-Gel

Aus der pulverförmigen Agarose wurde mit Puffer eine Mischung hergestellt (Konzentration $c = 1 - 10$ %) und auf 95 °C erhitzt, bis sich eine klare Lösung ergab. Danach wurde die Lösung auf etwa 45 °C abgekühlt und mit den FluoSpheres oder der Hämocyanin-Lösung gemischt. Die Lösung wurde für die mikroskopischen Untersuchungen auf ein Deckglas gegeben, wo sie erstarrte. Im Falle von Hämocyanin wurde Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.) verwendet, bei den FluoSpheres der vom Hersteller angegebene Phosphat-Puffer [62]:

Phosphat -Puffer	50 mM	Na-Phosphat, pH = 7,5 (bei 20 °C)
	50 mM	NaCl

Poly-Acrylamid-Gel

Wie im Abschnitt 5.2.2. (native Gel-Elektrophorese) beschrieben, wurde ein natives Poly-Acrylamid-Gel hergestellt. Jedoch wurde die Acrylamid-Konzentration auf 7,5 % erhöht und der Ansatz enthielt bereits Hämocyanin ($c = 0,1$ mg/mL).

Adsorption

Die Hämocyanin-Lösung ($c = 0,003$ mg/mL; Tris-Puffer, \rightarrow 3.2.1.) wurde in die Küvette bzw. auf das Deckglas gegeben und die an der Glasoberfläche adsorbierten Moleküle im Mikroskop untersucht. Die dabei in der Lösung verbliebenen Moleküle hatten aufgrund des konfokalen Aufbaus bzw. der starken Fokussierung des Lasers keinen Einfluß auf das Experiment.

6.3. Ergebnisse

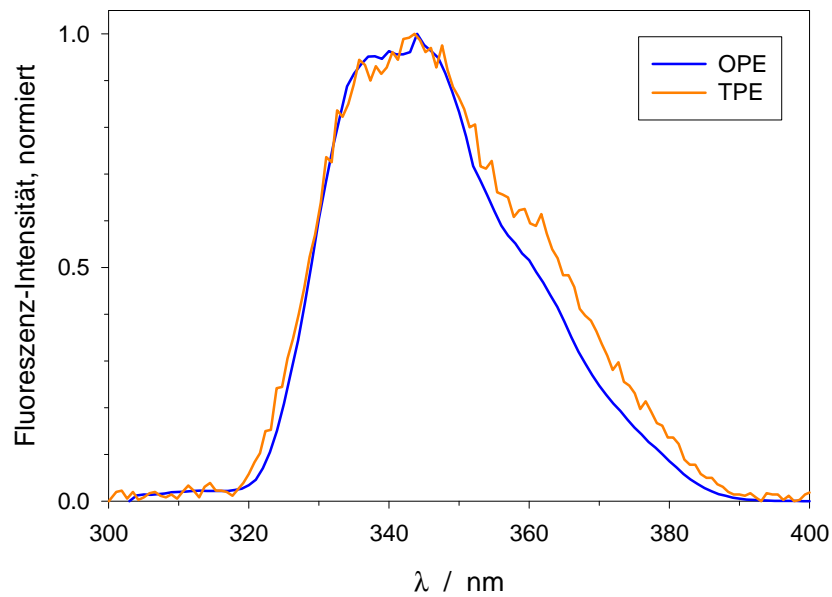
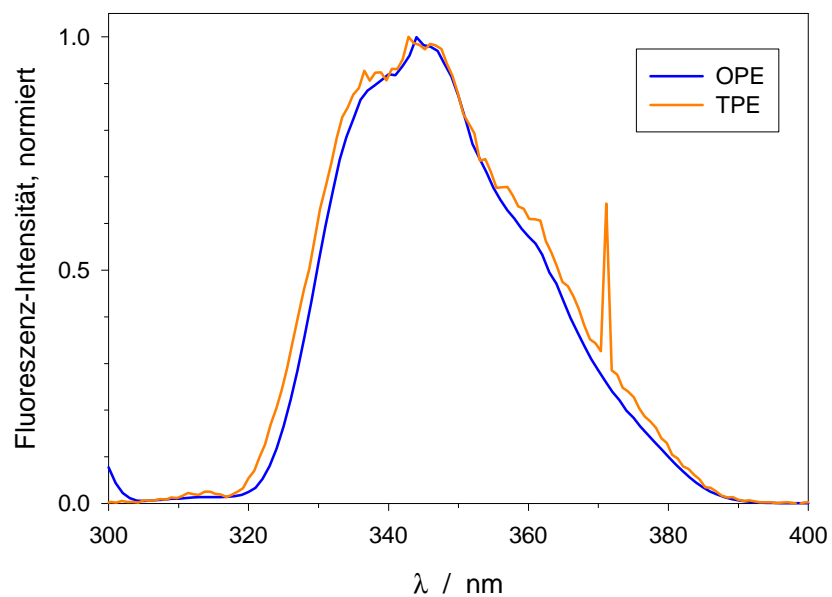
6.3.1. Vergleich von Ein- und Zwei-Photonen-Anregung

Emissionsspektren

Mögliche Veränderungen der Tryptophan-Fluoreszenz bei Zwei-Photonen-Anregung wurden mit Hilfe der Emissionsspektren analysiert. Dabei wurde die Lage der Emissionsmaxima und die Form der Spektren untersucht.

Der experimentelle Aufbau zur Zwei-Photonen-Anregung enthielt Filter im Emissionsstrahlengang, die die Form der Spektren veränderten. Um die Spektren nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung miteinander vergleichen zu können, wurden die OPE-Spektren mit den Filter-Charakteristiken multipliziert. Die daraus resultierenden Spektren von oxy- und deoxy-Hämocyanin sind zusammen mit den TPE-Spektren in Abb. 6.4 dargestellt.

Nach der Filter-Korrektur stimmten die Ein-Photonen-Spektren sehr gut mit den Zwei-Photonen-Spektren überein. Dies galt sowohl für oxygeniertes als auch für deoxygeniertes Hämocyanin. Die Spektren zeigten deutlich, daß die Fluoreszenz-Emission beim Hämocyanin von der Art der Anregung unbeeinflusst blieb. Eine ähnlich gute Übereinstimmung ergab sich auch für freies Tryptophan in Lösung (hier nicht gezeigt).

oxy-Hämocyanin**deoxy-Hämocyanin****Abb. 6.4: Vergleich der Emissionsspektren nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung**

Die Spektren wurden von einer Hämocyanin-Lösung ($c = 0,26 \text{ mg/mL}$) in Tris-Puffer ($\rightarrow 3.2.1.$) bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Die Anregungswellenlänge lag im Falle der Ein-Photonen-Anregung (OPE) bei 295 nm , im Falle der Zwei-Photonen-Anregung (TPE) bei 590 nm (Laser-Leistung = $5,5 \text{ mW}$; Linse mit 50 mm Brennweite anstelle des Objektivs). Bei allen Spektren wurde die Intensität auf Eins normiert, die OPE-Spektren außerdem mit den Charakteristiken der TPE-Filter multipliziert.

Fluoreszenz-Löschung

Weiterhin wurde untersucht, ob Löschprozesse durch die Art der Anregung beeinflusst werden. Dies wurde zunächst an der Löschung von freiem Tryptophan durch Iodid getestet. Die Stern-Volmer-Auftragung (\rightarrow 5.2.4.) für beide Anregungsarten ist in Abb. 6.5 dargestellt.

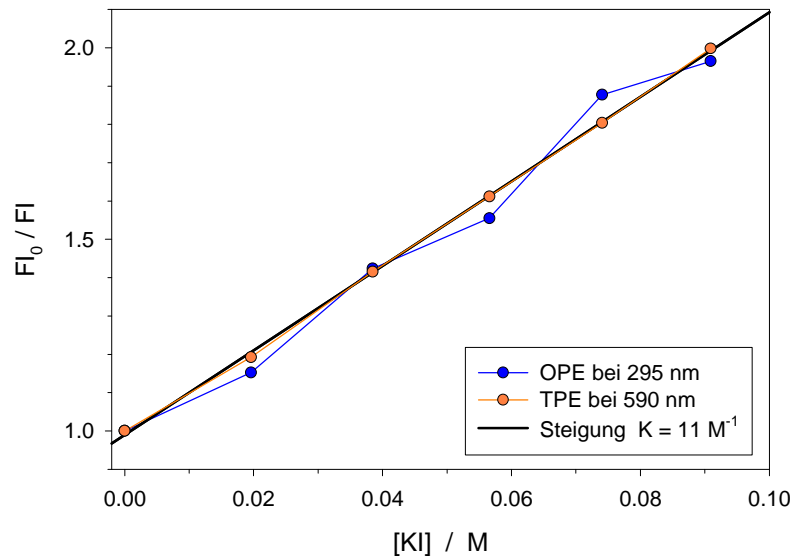


Abb. 6.5: Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz durch Iodid nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung

Stern-Volmer-Auftragung nach Gleichung (5.1), wobei FI_0 die Fluoreszenz-Intensität ohne Löscher bezeichnet, FI die Fluoreszenz-Intensität mit Löscher. Die Tryptophan-Konzentration lag bei $c = 10 \mu\text{M}$. Die Anregungswellenlänge lag im Falle der Ein-Photonen-Anregung (OPE) bei 295 nm, im Falle der Zwei-Photonen-Anregung (TPE) bei 590 nm (Laser-Leistung = 8,5 mW; Linse mit 50 mm Brennweite anstelle des Objektivs).

Die Stern-Volmer-Auswertung ergab für beide Anregungsarten identische Resultate. Beide Kurven ergaben jeweils Geraden, aus der sich eine Löschkonstante von $K = 11 \text{ M}^{-1}$ ermitteln ließ. Die kleinen Schwankungen der Werte bei Ein-Photonen-Anregung sind auf eine nicht ideale Durchmischung von Hämocyanin- und Iodid-Lösung zurückzuführen. Bei den Untersuchungen zur Zwei-Photonen-Anregung wurde dies von einem elektrischen Rührer bewerkstelligt (\rightarrow 6.2.2.).

Außerdem wurde untersucht, inwieweit die Löschung der Hämocyanin-Fluoreszenz bei Oxygenierung von der Art der Anregung abhängt. Hierzu wurde die Fluoreszenz-Intensität einer Hämocyanin-Probe bei verschiedenen O_2 -Beladungen nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung gemessen. In Abb. 6.6 sind die ermittelten Intensitäten gegeneinander aufgetragen.

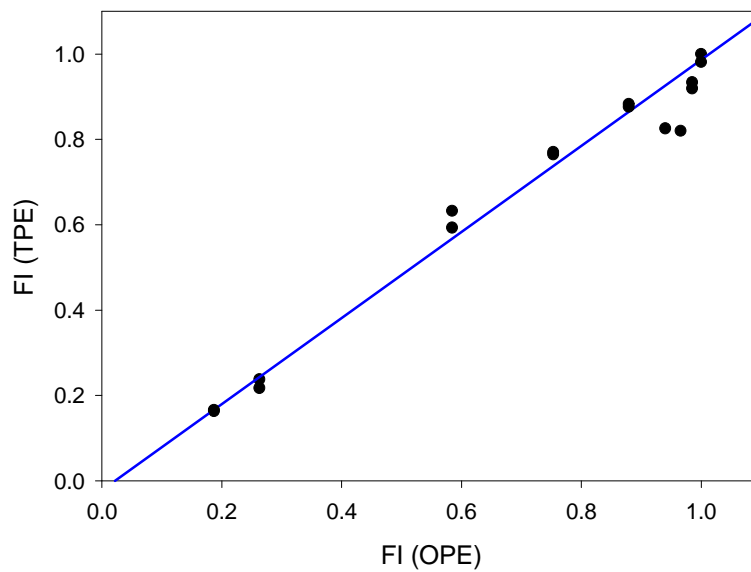


Abb. 6.6: Löscherung der Hämocyanin-Fluoreszenz bei Oxygenierung nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung

Die Fluoreszenz-Intensitäten (FI) wurden von einer Hämocyanin-Lösung ($c = 0,1 \text{ mg/mL}$) in Tris-Puffer ($\rightarrow 3.2.1.$) bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen und der maximale Wert auf Eins normiert. Die Anregungswellenlänge lag im Falle der Ein-Photonen-Anregung (OPE) bei 295 nm , im Falle der Zwei-Photonen-Anregung (TPE) bei 590 nm (Laser-Leistung = $2,1 \text{ mW}$; Linse mit 50 mm Brennweite anstelle des Objektivs).

Es besteht ein linearer Zusammenhang der Fluoreszenz-Quantenausbeuten nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung. Demnach erfolgt auch die Löscherung der Tryptophan-Fluoreszenz bei Oxygenierung unabhängig von der Art der Anregung.

Abhängigkeit von der Anregungsintensität

Die Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit von der Anregungsintensität wurde untersucht. Bei Ein-Photonen-Anregung ergab sich ein linearer Zusammenhang (hier nicht gezeigt). Abb. 6.7 zeigt die entsprechenden Kurven bei Zwei-Photonen-Anregung für Tryptophan, oxy- und deoxy-Hämocyanin.

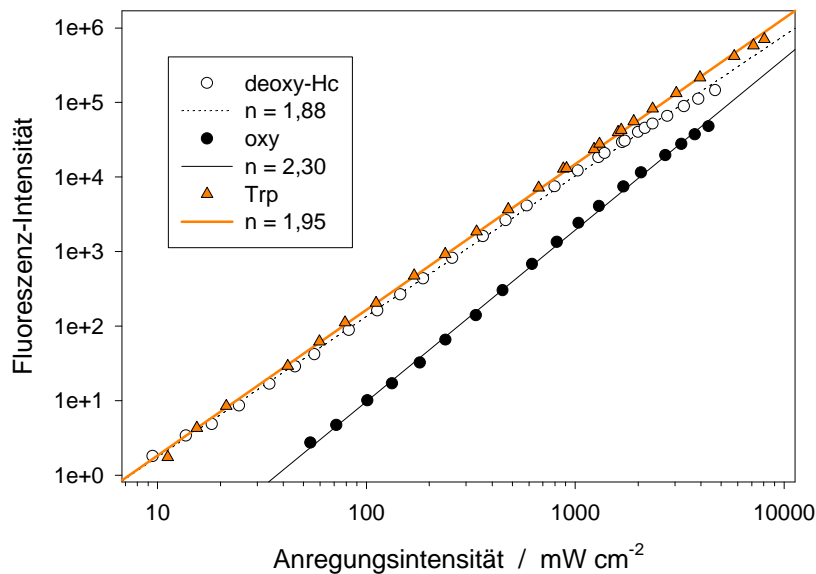


Abb. 6.7: Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität von der Anregungsintensität bei Zwei-Photonen-Anregung

Untersucht wurde freies Tryptophan in Lösung ($c = 1 \text{ mM}$) und Hämocyanin-Lösung ($c = 3 \text{ mg/mL}$), beide in Tris-Puffer ($\rightarrow 3.2.1.$) bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Anregungswellenlänge lag bei 590 nm .

Alle Proben ergaben bei doppelt-logarithmischer Darstellung Geraden mit Steigungen von etwa Zwei. Diese quadratische Abhängigkeit war der Nachweis, daß die Fluoreszenz durch Zwei-Photonen-Anregung hervorgerufen wurde. Dennoch zeigten sich Unterschiede: während die Geradensteigung des Tryptophans gut mit dem erwarteten Wert von Zwei übereinstimmte ($n = 1,95$), zeigte deoxygeniertes Hämocyanin eine etwas geringere Steigung ($n = 1,88$), oxygeniertes Hämocyanin eine merklich größere Steigung ($n = 2,30$). Offensichtlich war die Photostabilität der drei Proben unterschiedlich. Auf diese Ergebnisse wird in Abschnitt 6.3.4. erneut eingegangen.

6.3.2. Photostabilität qualitativ

Um die Photostabilität des Hämocyanins zu testen, wurde Hämocyanin-Lösung mit dem Licht einer starken, breitbandigen UV-Lampe bestrahlt (→ 6.2.3.). Anschließend folgten Untersuchungen bzgl. Struktur und Funktion der Hämocyanine in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer.

Einfluß auf die Struktur

Der Aggregationszustand der bestrahlten Hämocyanine wurde mittels nativer Gel-Elektrophorese (→ 6.2.4.) untersucht. Die Poly-Acrylamid-Konzentration wurde so gewählt (3 %), daß Untereinheiten weit in das Gel einwandern konnten, das 24-mer dagegen nur wenig. Die Ergebnisse der Bestrahlungsreihe sind in Abb. 6.8. dargestellt.

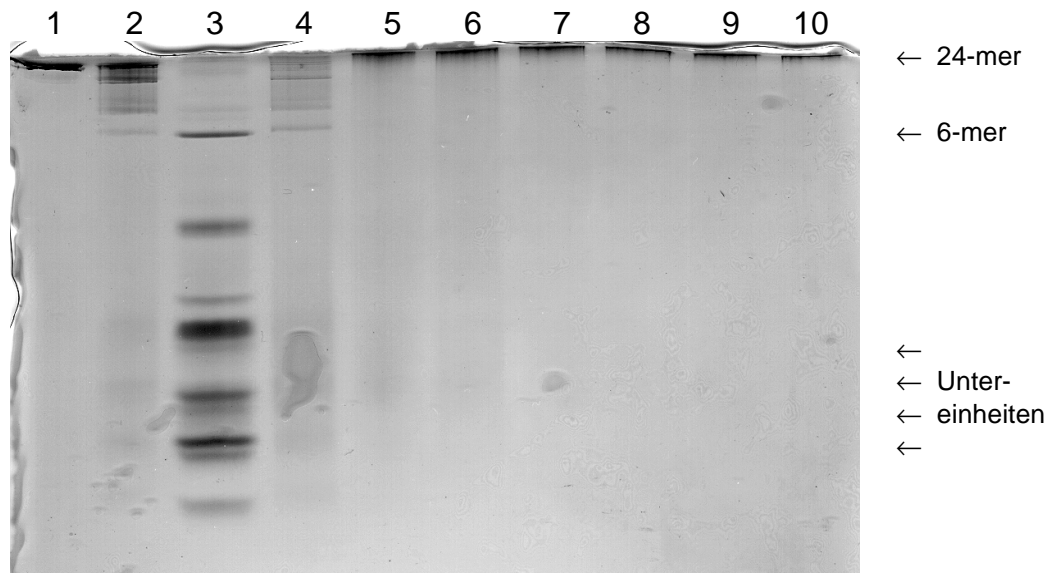


Abb. 6.8: Einfluß von UV-Bestrahlung auf die Quartär-Struktur des 24-meren Vogelspinnen-Hämocyanins

Hämocyanin-Lösung ($c = 2 \text{ mg/mL}$) in Tris-Puffer (→ 3.2.1.) wurde mit UV-Licht bei Raumtemperatur (20 °C) bestrahlt. In regelmäßigen Abständen wurden $100 \text{ }\mu\text{L}$ entnommen und auf $c = 0,2 \text{ mg/mL}$ verdünnt. Mit diesen Proben wurde eine native Gel-Elektrophorese (3 % Poly-Acrylamid bei $\text{pH} = 7,5$) durchgeführt.

Spur 1:	0 min	Spur 6:	60 min
Spur 2:	10 min	Spur 7:	90 min
Spur 3:	Marker	Spur 8:	120 min
Spur 4:	20 min	Spur 9:	150 min
Spur 5:	40 min	Spur 10:	180 min

Das 24-mer (Spur 1) dissoziierte rasch in seine Untereinheiten (Spuren 2 und 4), die anschließend aggregierten (Spuren 5 – 10).

Die Referenz (ohne Bestrahlung) wanderte als 24-mer nur wenig in das Gel ein (Spur 1). Aber bereits bei der ersten bestrahlten Probe (Dauer 10 min) war eine Dissoziation des Hämocyans in die Untereinheiten zu beobachten (Spur 2). Aus dem Verschwinden der 24-mer-Bande in Spur 4 kann geschlossen werden, daß die Dissoziation bereits nach 20 min vollständig abgeschlossen war. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer bildeten sich Aggregate, die zu groß waren und daher am oberen Rand der Trenngels liegen blieben (Spuren 5 – 10). D.h., spätestens ab 40 min denaturierten die Untereinheiten. Dies deckte sich mit einer Trübung der Lösung, die beobachtet werden konnte.

Einfluß auf die Funktion

Hämocyane besitzen zwei intrinsische Signale, die die O₂-Beladung anzeigen: eine Absorptionsbande bei 340 nm und die Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz (→ 4.1.2.). Die Funktion des Hämocyans, d.h. die Fähigkeit Sauerstoff zu binden, wurde mit beiden Signalen überprüft. Die Proben der Bestrahlungsreihe wurden etwa 30 min nach der letzten Proben-Entnahme mittels Absorptions- und der Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht.

Die Absorptionsspektren in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (Abb. 6.9) zeigten zwei unterschiedliche Entwicklungen an: das Verschwinden der Bande bei 340 nm (Pfeil) und ein starkes Ansteigen des Untergrundes.

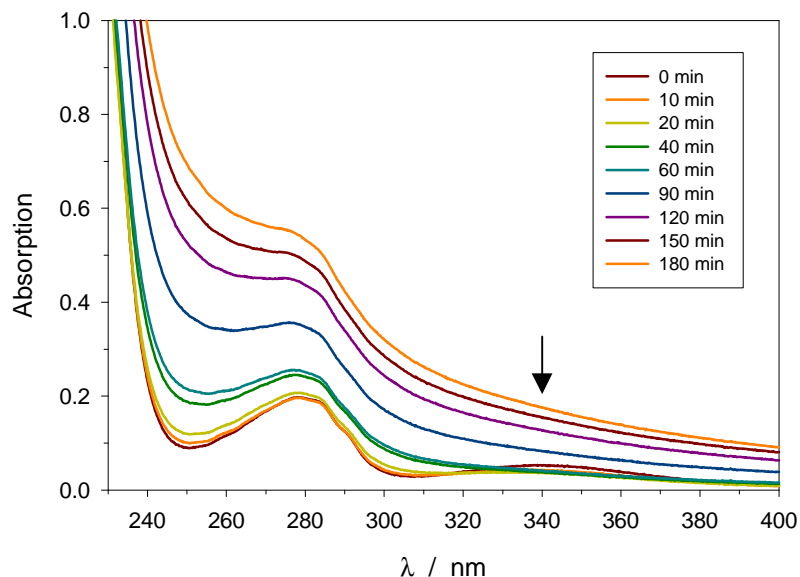


Abb. 6.9: Einfluß von UV-Bestrahlung auf die Absorption des Hämocyans

Hämocyanin-Lösung ($c = 2 \text{ mg/mL}$) in Tris-Puffer (→ 3.2.1.) wurde mit UV-Licht bei Raumtemperatur (20 °C) bestrahlt. In regelmäßigen Abständen wurden $100 \text{ }\mu\text{L}$ entnommen und auf $c = 0,2 \text{ mg/mL}$ verdünnt. Der Pfeil zeigt auf die für oxygeniertes Hämocyanin spezifische Absorptionsbande bei 340 nm .

Alle Proben waren bei der Untersuchung atmosphärischen Bedingungen ausgesetzt, somit sollten intakte Hämocyanine vollständig oxygeniert vorliegen (\rightarrow 4.2.1.). Die Absorptionsbande bei 340 nm verschwand jedoch mit zunehmender Bestrahlungsdauer. Dieser Verlust zeigte eine Deoxygenierung der Hämocyanine an. D.h. die Bestrahlung der Hämocyanin-Lösung führte zu einer irreversiblen Zerstörung der aktiven Zentren: sie hatten ihre Fähigkeit, O_2 zu binden, verloren. Dieser Prozess begann schon nach 10 min und war nach 40 min abgeschlossen.

Während der gesamten Belichtungsreihe stieg der Untergrund stark an. Da dies vor allem im kurzwelligen Bereich stattfand, ist die Absorptionszunahme auf Licht-Streuung zurückzuführen. Die Streuung wurde durch Aggregation der Protein-Moleküle hervorgerufen, ein Prozess, der als Folge von deren Denaturierung auftrat.

Die Fluoreszenz-Spektren in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (Abb. 6.10.a) zeigten einen starken Anstieg der Quantenausbeute an. Dieser wurde durch die Zunahme der Tryptophan-Fluoreszenz bei 335 nm verursacht. Die Zunahme führte auch zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums. Beide Veränderungen sind in Abb. 6.10.b und Abb. 6.10.c separat dargestellt.

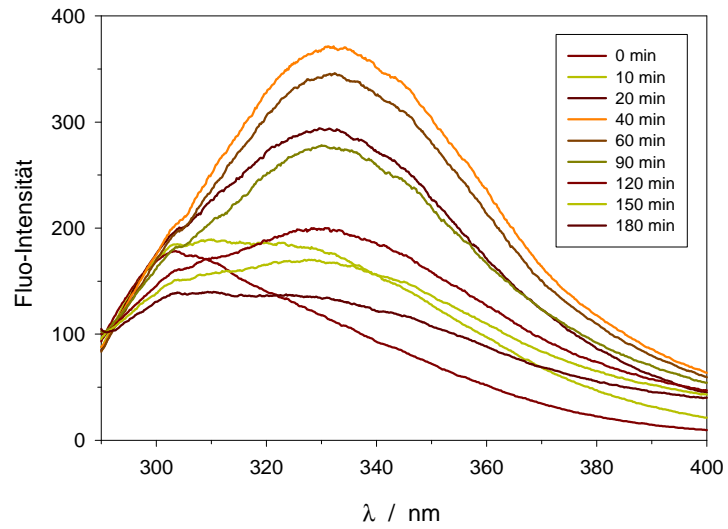
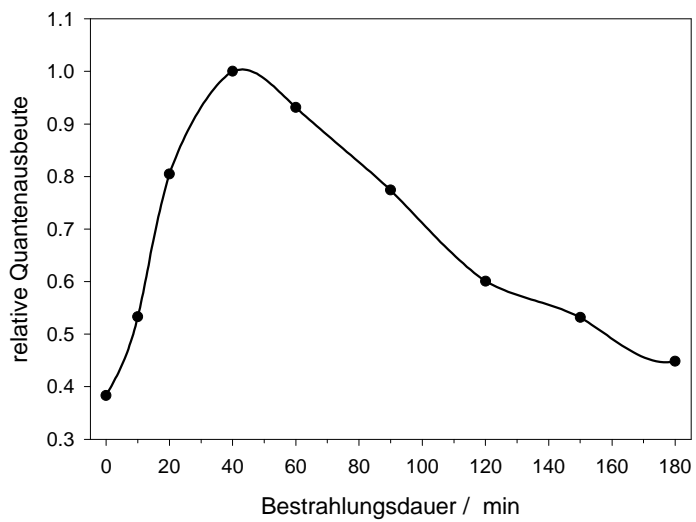
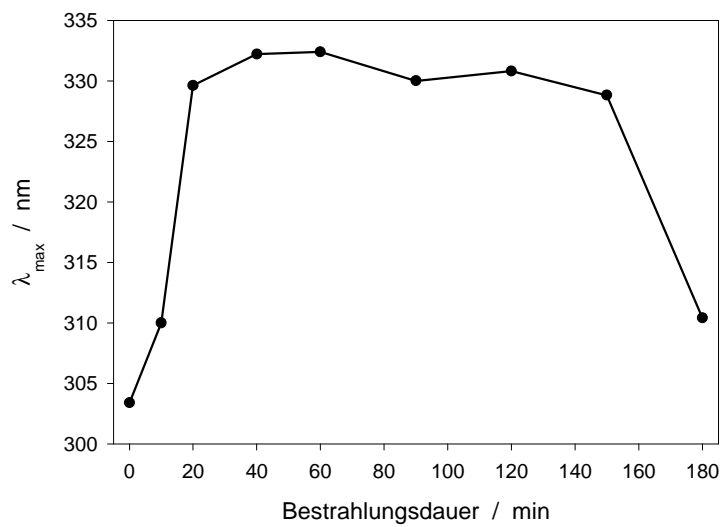
Die Fluoreszenz-Intensität nahm mit zunehmender Bestrahlungsdauer zunächst zu, erreicht ihr Maximum nach 40 min, und sank dann wieder. Anstieg und Abfall der Fluoreszenz-Intensität waren hauptsächlich auf die Tryptophan-Fluoreszenz zurückzuführen (Abb. 6.10.a). Der Anstieg wurde durch die Dissoziation und Deoxygenierung der Hämocyanine verursacht. Der langsame Abfall der Fluoreszenz-Intensität ließ auf Bleichen der Tryptophane schließen. Die Tyrosin-Fluoreszenz blieb lange Zeit konstant und sank erst nach etwa 120 min, aber relativ langsam (Abb. 6.10.a).

Das Emissionsmaximums (Abb. 6.10.c) zeigte zunächst eine Rotverschiebung ($\lambda_{\max} \approx 303 \text{ nm} \rightarrow 333 \text{ nm}$). Diese begann bereits nach 10 min, war aber schon nach 20 min abgeschlossen. Sie war auf eine Zunahme der Tryptophan-Fluoreszenz zurückzuführen, die eine Folge der Dissoziation und Deoxygenierung war (\rightarrow 5.3.2.). Bis zu einer Bestrahlungsdauer von 150 min blieb die Lage der Emissionsmaxima konstant. Solange wurden die Spektren von der Tryptophan-Fluoreszenz dominiert. Danach machte sich das Bleichen der Tryptophane bemerkbar. Nach einer Bestrahlungsdauer von 180 min war die Tryptophan-Fluoreszenz-Intensität wieder auf den Wert der Tyrosin-Fluoreszenz gefallen (Abb. 6.10.a, Tyrosin-Emissionsmaximum bei 303 nm). Dadurch fand eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums in Richtung 303 nm statt.

gegenüberliegende Seite:

Abb. 6.10: Einfluß von UV-Bestrahlung auf die Fluoreszenz des Hämocyanins

Hämocyanin-Lösung ($c = 2 \text{ mg/mL}$) in Tris-Puffer (\rightarrow 3.2.1.) wurde mit UV-Licht bei Raumtemperatur ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) bestrahlt. In regelmäßigen Abständen wurden $100 \text{ }\mu\text{L}$ entnommen und auf $c = 0,2 \text{ mg/mL}$ verdünnt. Die Fluoreszenz-Emissionsspektren wurden bei $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ angeregt.

a. Spektren**b. Quantenausbeute****c. Maxima**

Wellenlängen-Abhängigkeit

Um festzustellen, ob die beobachteten Veränderungen am Hämocyanin auf Licht einer bestimmten Wellenlänge zurückzuführen waren, wurde Hämocyanin-Lösung mit Licht der Wellenlängen 280 nm, 340 nm bzw. 365 nm bestrahlt. Es konnten jedoch nur geringfügige Veränderungen festgestellt werden. Struktur und Funktion schienen weitgehend erhalten geblieben zu sein. Allerdings wurde durch den Einbau von Bandpaß-Filtern neben dem Spektrum auch die Licht-Intensität erheblich verändert (ca. zwei Größenordnungen). Somit konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Schädigung der Probe durch die hohe Intensität oder Licht einer bestimmten Wellenlänge hervorgerufen wurde.

6.3.3. Modelle zur Photostabilität

Unter Berücksichtigung der bei der UV-Bestrahlung beobachteten Veränderungen am Hämocyanin (→ 6.3.2.) soll eine quantitative Beschreibung der Photostabilität bei Zwei-Photonen-Anregung vorgenommen werden.

Die Fluoreszenz-Intensität (FI) in Abhängigkeit von der Anregungsintensität (AI) wird bei der Zwei-Photonen-Anregung durch Gleichung (6.2) mit $n = 2$ beschrieben. In den Proportionalitätsfaktor gehen neben dem Extinktionskoeffizienten und apparativen Parametern auch die Konzentration c_0 und die Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_0 ein [129, 133].

$$FI \sim c_0 \cdot \Phi_0 \cdot AI^2 \quad (6.9)$$

Es soll angenommen werden, daß durch das Anregungslicht die Fluorophore verändert werden können (z.B. Bleichen oder Deoxygenierung von oxy-Hämocyanin). Durch die Modifikation sinkt die Konzentration c_0 der unmodifizierten Fluorophore. Dem wirkt die Diffusion entgegen. Die Zwei-Photonen-Messungen wurden an einem offenen Meßvolumen durchgeführt. Dadurch konnten veränderte Moleküle aus dem Fokus diffundieren und durch neue, nicht veränderte Moleküle ersetzt werden. Die Geschwindigkeit eines solchen Austausches ist umgekehrt proportional zu der Verweildauer τ_{Fokus} der Moleküle im Fokus. Diese läßt sich nach Mertz (1998) abschätzen [173]

$$\tau_{\text{Fokus}} = \frac{\omega_0^2}{1,8 D} \ln \left(\frac{6\pi\omega_0}{\lambda} \right) \quad (6.10)$$

Hierbei ist ω_0 der Fokus-Durchmesser senkrecht zur Strahlrichtung, D der Diffusionskoeffizient der Teilchen und λ die Wellenlänge des Lichtes. Werden die bei der UV-Bestrahlung des Hämocyanins gefundenen Prozesse (Bleichen, Deoxygenierung, → 6.3.2.) auch bei der Zwei-Photonen-Anregung angenommen, so lassen sich folgende Modelle aufstellen.

Modell 1

Beim ersten Modell wird angenommen, daß das Bleichen der Fluorophore mit einer konstanten Rate aus dem angeregten Zustand S_1 erfolgt. Dies führt zu einer meßbaren Abnahme der Fluoreszenz-Intensität, die auf eine Abnahme der Fluorophor-Konzentration (von c_0 auf c) im Laser-Fokus zurückzuführen ist. Einem vollständigen Ausbleichen der Probe wirkt der diffusive Austausch mit umgeblichenen Fluorophoren entgegen. Aus beiden Prozessen ergibt sich eine zeitliche Änderung der Konzentration von

$$\frac{dc}{dt} = -c k_A \Phi_B + (c_0 - c) \frac{1}{\tau_{\text{Fokus}}} \quad (6.11)$$

Hierbei ist k_A die Rate, mit der die Fluorophore angeregt werden, und Φ_B die Bleich-Quantenausbeute, d.h. die Wahrscheinlichkeit mit der eine Anregung zum Bleichen führt. Der letzte Term beschreibt die Diffusion der geblichenen Teilchen aus dem Fokus. Unter stationären Bedingungen tritt keine zeitliche Änderung auf, woraus sich nach [173]

$$c = c_0 \frac{1}{1 + \tau_{\text{Fokus}} \cdot k_A \cdot \Phi_B} \quad (6.12)$$

ergibt. Die Anregungsrate k_A läßt sich nach [174] berechnen:

$$k_A = \gamma \frac{0,66 \sigma}{2 f \tau_p} \left(\frac{AI}{h \nu} \right)^2 \quad (6.13)$$

wobei γ der Kontrastfaktor, σ der Anregungsquerschnitt, f die Pulsfrequenz des Lasers, τ_p die Pulsbreite des Lasers, h das Plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz des Anregungslichtes ist. Die meßbare Gesamt-Fluoreszenz-Intensität erhält man durch Einsetzen von Gleichung (6.12) in Gleichung (6.9).

Im Falle des oxy-Hämocyanins soll neben einer Reduzierung der Konzentration c_0 auch eine Änderung der Quantenausbeute Φ_0 angenommen werden. Oxy-Hämocyanin (O_x) kann durch Absorption von Licht in einen angeregten Zustand (O_x^*) gebracht werden. Der angeregte Zustand löscht die Fluoreszenz nicht mehr, kann aber wieder in den löschenden Grundzustand relaxieren.



Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten sind mit k bezeichnet, n gibt die Anzahl der bei der Anregung beteiligten Photonen an. Durch die Einwirkung des Lichtes sind zwei oxy-Hämocyanin-Spezies entstanden, so daß sich ein

Beladungsgrad Θ definieren läßt. Dieser gibt den relativen Anteil des oxy-Hämocyanins im Grundzustand an.

$$\Theta = \frac{[O_x]}{[O_x] + [O_x^*]} = \frac{1}{1 + \frac{[O_x^*]}{[O_x]}} = \frac{1}{1 + \frac{k_1}{k_2} AI^n} \quad (6.15)$$

Der Beladungsgrad sollte für oxy-Hämocyanin bei $\Theta = 1$ liegen, wird aber durch die Wirkung des Lichtes reduziert. Wenn der angeregte Zustand die Fluoreszenz nicht mehr löschen kann, steigt die Quantenausbeute von O_x^* auf das 13-fache (\rightarrow 4.3.3.). Für beide Spezies zusammen resultiert daraus eine Fluoreszenz-Quantenausbeute von

$$\Phi = \Phi_0 (\Theta + 13 (1 - \Theta)) \quad (6.16)$$

Hierbei ist Φ_0 die Quantenausbeute des oxy-Hämocyanins im Grundzustand. Die meßbare Gesamt-Fluoreszenz-Intensität erhält man durch Einsetzen der Gleichungen (6.12) und (6.16) in Gleichung (6.9).

Modell 2

Alternativ dazu soll ein zweites Modell betrachtet werden, bei dem das Bleichen der Fluorophore durch Absorption von zwei Photonen, d.h. intensitätsabhängig, aus dem elektronischen Grundzustand S_0 heraus erfolgt. Auch in diesem Fall verringert sich die Konzentration c_0 an unmodifizierten Fluorophoren. Die bei Berücksichtigung von Bleichen und Diffusion resultierende Verringerung der Konzentration c_0 ergibt sich dann aus

$$\frac{dc}{dt} = -c k_{\text{Bleich}} A I^2 + (c_0 - c) \frac{1}{\tau_{\text{Fokus}}} \quad (6.17)$$

Hierbei ist k_{Bleich} die intensitätsabhängige Bleichrate. Unter stationären Bedingungen ergibt sich

$$c = c_0 \frac{1}{1 + \tau_{\text{Fokus}} \cdot k_{\text{Bleich}} \cdot A I^2} \quad (6.18)$$

Die messbare Fluoreszenz-Intensität ergibt sich durch Einsetzen der Gleichung (6.18) in Gleichung (6.9).

Beim oxy-Hämocyanin soll als weiterer Prozess eine licht-induzierte Deoxygenierung angenommen werden, so daß sich die Konzentration des oxy-Hämocyanins c_{oxy} weiter verringert: Gleichung (6.17) muß um einen Term erweitert werden, der diese zusätzliche Entfernung von oxy-Hämocyanin berücksichtigt. Unter der Annahme, daß die Deoxygenierung durch die Absorption eines Photons aus dem elektronischen Grundzustand S_0 erfolgt, ergibt sich die zeitliche Änderung der Konzentration zu

$$\frac{dc_{\text{oxy}}}{dt} = -c_{\text{oxy}} k_{\text{Bleich}} A I^2 - c_{\text{oxy}} k_D A I + (c_0 - c_{\text{oxy}}) \frac{1}{\tau_{\text{Fokus}}} \quad (6.19)$$

wobei k_D die Geschwindigkeitskonstante der Deoxygenierung ist. Unter stationären Bedingungen folgt

$$c_{\text{oxy}} = c_0 \frac{1}{1 + \tau_{\text{Fokus}} \cdot k_{\text{Bleich}} \cdot A I^2 + \tau_{\text{Fokus}} \cdot k_D \cdot A I} \quad (6.20)$$

Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß durch die Deoxygenierung eine Hämocyanin-Spezies erzeugt wird, deren Fluoreszenz-Quantenausbeute 13-mal so hoch ist wie die für oxygeniertes Hämocyanin (\rightarrow 4.3.3.), d.h.

$$\Phi_{\text{deoxy}} = 13 \Phi_0 \quad (6.21)$$

Die Konzentration c_{deoxy} dieser zweite Spezies ergibt sich analog zu

$$c_{\text{deoxy}} = c_{\text{oxy}} \frac{\tau_{\text{Fokus}} \cdot k_D \cdot A I}{1 + \tau_{\text{Fokus}} \cdot k_{\text{Bleich}} \cdot A I^2} \quad (6.22)$$

wobei auch hier das Bleichen der Fluorophore berücksichtigt wurde. Die meßbare Gesamt-Fluoreszenz-Intensität setzt sich aus den Fluoreszenz-Intensitäten beider Spezies zusammen,

$$\begin{aligned} FI_{\text{ges}} &\sim FI_{\text{oxy}} + FI_{\text{deoxy}} \\ &\sim (c_{\text{oxy}} \cdot \Phi_0 + c_{\text{deoxy}} \cdot \Phi_{\text{deoxy}}) A I^2 \end{aligned} \quad (6.23)$$

wobei die Gleichungen (6.20), (6.22) und (6.21) einzusetzen sind.

6.3.4. Photostabilität quantitativ

In Abschnitt 6.3.1. wurde für freies Tryptophan in Lösung und oxy- bzw. deoxy-Hämocyanin die Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit von der Anregungsintensität untersucht. Mit Hilfe der in Abschnitt 6.3.3. beschriebenen Modelle wurden Anpassungen an diese Messungen vorgenommen. Als erstes Ergebnis kann festgehalten werden, daß sich keine der Kurven ohne die Annahme von Bleichprozessen, d.h. ausschließlich mit Gleichung (6.9), beschreiben ließ.

Bleichen aus dem angeregten Zustand S_1

Beim ersten Modell wurde Bleichen aus dem angeregten Zustand S_1 angenommen (Gleichung 6.12). Hierzu wurde die Verweildauer τ_{Fokus} der Moleküle im Fokus nach Gleichung (6.10) mit folgenden Werten berechnet. Der Fokus-Radius wurde mit Hilfe von FluoSpheres zu $\omega_0 = 350$ nm bestimmt. Als Diffusionskoeffizient von Tryptophan wurde der des ähnlich großen Cuomarin verwendet ($D = 80 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) [138], der Diffusionskoeffizient der Hämocyanine wurden mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie gemessen ($D = 2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, Tab. 6.3). Die Wellenlänge des Anregungslichtes lag bei 590 nm. Die Anregungsrate k_A wurde nach Gleichung (6.13) mit den folgenden Werten berechnet. Der Laser hatte eine Pulsfrequenz von $f = 76$ MHz und eine Pulsbreite von $\tau_P = 180$ fs. Der Kontrastfaktor nimmt bei Zwei-Photonen-Anregung einen Wert von $\gamma = 3/16$ an (Beschreibung des Fokus-Profiles durch zwei Gauß- und eine Lorentz-Funktion) [173]. Als Anregungsquerschnitt von Tryptophan wurde $\sigma = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s}$ verwendet [140].

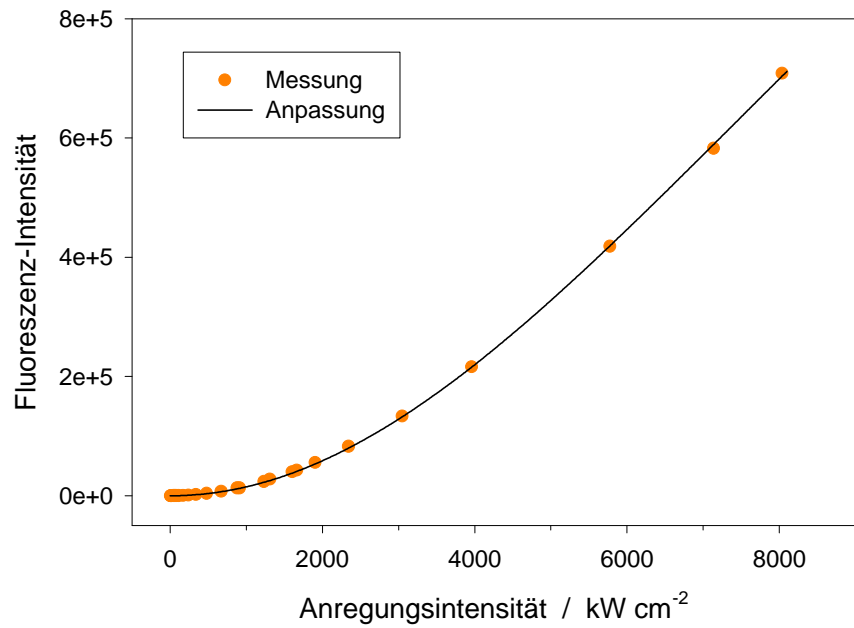
Die Anpassungen lieferten folgende Ergebnisse: Beim Tryptophan in Lösung sowie deoxy-Hämocyanin lieferte das Modell mit Zwei-Photonen-Anregung und Bleichen eine gute Beschreibung der Meßwerte. Beim oxy-Hämocyanin reichten dagegen diese zwei Prozesse nicht aus. Erst durch Hinzunahme der Populierung eines angeregten Zustandes (O_x^*) ließen sich die Meßwerte anpassen (Gleichung 6.14). Die Anpassungen wurden mit den Exponenten $n = 1$ und $n = 2$ durchgeführt. Die bessere Beschreibung lieferte das Modell, das einen Ein-Photonen-Prozess ($n = 1$) zugrunde legte. Die jeweils besten Anpassungen sind für alle drei Proben in Abb. 6.11 graphisch dargestellt. Bei allen drei Proben ist die Übereinstimmung von Modell und Meßwerten gut.

Die Anpassungen lieferten jeweils eine Bleich-Quantenausbeute Φ_B . Diese läßt sich auch durch

$$\Phi_B = \frac{k_B}{k_F + k_B + k_R} = \frac{k_B}{k_F} \Phi_0 \quad (6.24)$$

ausdrücken. Hierbei steht k für die verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten, wobei die Indizes F, B und R für Fluoreszenz, Bleichen und Rest (z.B. innere Umwandlung, Förster-Transfer) stehen. Das hier beschriebene k_B ist verschieden von dem oben definierten k_{Bleich} , da letzteres von der Anregungsintensität abhängt, k_B aber nicht.

Tryptophan



Hämocyanin

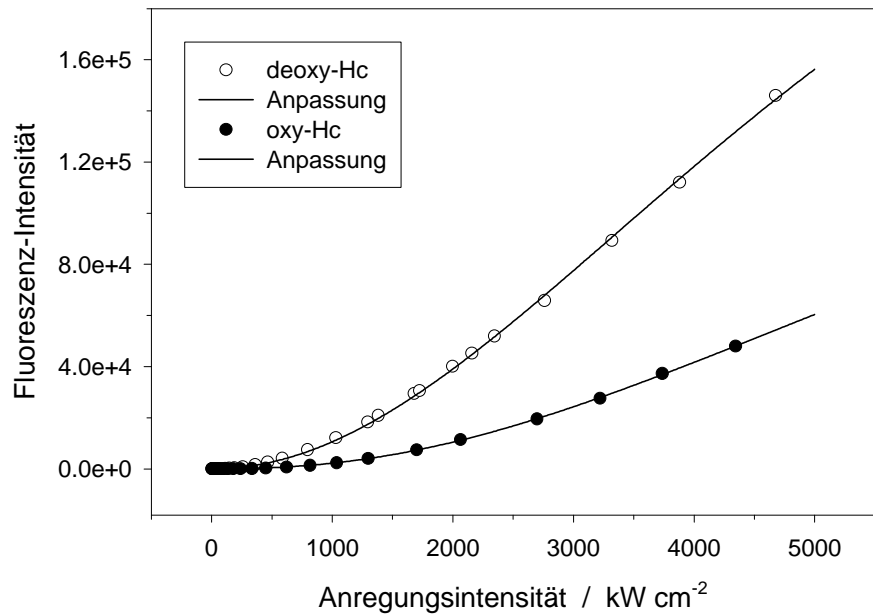


Abb. 6.11: Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit von der Anregungsintensität bei Zwei-Photonen-Anregung mit Anpassung

Bei den Punkten handelt es sich um Meßwerte, die aus Abb. 6.8 übernommen wurden. Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassungen nach dem Modell mit Bleichen aus dem angeregten Zustand S_1 dar. Die Anpassung der Tryptophan- und deoxy-Hämocyanin-Werte wurde mit Gleichung (6.9) und (6.12) vorgenommen, die der oxy-Hämocyanin-Werte zusätzlich mit Gleichung (6.16) mit $n = 1$.

Bei Kenntnis der Fluoreszenz-Quantenausbeuten und -raten lassen sich die Bleichraten k_B berechnen. Die Parameter sowie die berechneten Bleichraten sind in Tab. 6.1 aufgeführt.

Ergebnisse der Anpassungen	Trp	deoxy-Hc	oxy-Hc
Anpassung			
Proportionalitätsfaktor (kW / cm^2) ⁻² M ⁻¹	0,0150	0,0109	0,0016
Bleich-Quanten- ausbeute Φ_B	0,0717	0,0092	0,0120
Anregung von O_x^* k_1 / k_2 (kW / cm^2) ⁻¹	–	–	38×10^{-6}
Konstanten			
Fluoreszenzrate k_F / s^{-1}	$3,8 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$
Fluoreszenz-Quanten- ausbeute Φ_0	0,13	0,0727	0,0055
Geschwindigkeits- konstanten			
Bleichen k_B / s^{-1}	$2,1 \times 10^8$	$0,54 \times 10^8$	18×10^8

Tab. 6.1: Ergebnisse der Anpassungen mit Bleichen aus dem angeregten Zustand S_1

Die Meßwerte von freiem Tryptophan und deoxy-Hämocyanin wurden mit den Gleichungen (6.9) und (6.12) angepasst. Für die Anpassung der oxy-Hämocyanin-Werte wurde zusätzlich Gleichung (6.16) mit $n = 1$ verwendet. Die Werte der Konstanten stammen aus [64, 68, 74] bzw. Abschnitt 4.3.3. Zur Berechnung der Bleichraten wurde Gleichung (6.24) benutzt.

Die Quantenausbeute von Tryptophan stammt aus [68], die der Hämocyanine wurde gemessen (\rightarrow 4.3.3.). Die Fluoreszenzrate für Tryptophan stammt aus [64], die der Hämocyanine wurde von Boteva *et al.* (1993) übernommen [74]. Die niedrigste Bleichrate ergab sich für deoxy-Hämocyanin. Freies Tryptophan und oxy-Hämocyanin zeigten im Vergleich dazu vier- bzw. 33-fach höhere Bleichraten (Tab. 6.1).

Bleichen aus dem Grundzustand S_0

Alternativ wurden als mögliche Bleichprozesse solche angenommen, die durch Absorption von zwei Photonen aus dem elektronischen Grundzustand S_0 erfolgten (Gleichung 6.9 und 6.18). Die Verweildauer der Moleküle im Fokus wurde wie beim ersten Modell berechnet. Beim Tryptophan in Lösung sowie deoxy-Hämocyanin liefert auch dieses Modell gute Übereinstimmungen mit den Meßwerten. Beim oxy-Hämocyanin reichen wiederum diese zwei Prozesse nicht aus. Durch Hinzunahme einer licht-induzierten Deoxygenierung (Gleichung 6.21 und 6.22) ließen sich die Meßwerte aber sehr gut anpassen. Die jeweils besten Anpassungen dieses zweiten Modells stimmen qualitativ mit denen des ersten Modells (Abb. 6.12) überein. Auf eine Abbildung der Kurven wurde daher verzichtet. Die Anpassungen liefern direkt die Geschwindigkeitskonstanten, die in Tab. 6.2 aufgeführt sind.

Ergebnisse der Anpassungen	Trp	deoxy-Hc	oxy-Hc
Proportionalitätsfaktor (kW / cm ²) ⁻² M ⁻¹	0,0150	0,0109	0,0018
Bleichen k _{Bleich} / (kW / cm ²) ⁻² s ⁻¹	28,6 × 10 ⁻⁶	3,7 × 10 ⁻⁶	2,4 × 10 ⁻⁶
Deoxygenierung k _D / (kW / cm ²) ⁻¹ s ⁻¹	–	–	3,3 × 10 ⁻³

Tab. 6.2: Ergebnisse der Anpassungen mit Bleichen aus dem Grundzustand S_0

Die Meßwerte von freiem Tryptophan und deoxy-Hämocyanin wurden mit Gleichungen (6.9) und (6.18) angepasst. Für die Anpassung der oxy-Hämocyanin-Werte wurde Gleichung (6.23) verwendet.

Die Bleichraten von oxy- und deoxy-Hämocyanin sind fast identisch, sie unterscheiden sich lediglich um einen Faktor von 1,5. Dagegen liegt die Bleichrate für freies Tryptophan in Lösung etwa eine Größenordnung über der der Hämocyanine.

6.3.5. Abbildung von Einzel-Molekülen

Der Nachweis einzelner Moleküle sollte durch Abbildung erfolgen. Beim Schritt vom Ensemble zum einzelnen Hämocyanin wurden Zwischenstufen eingefügt. Dabei dienten mit dem Protein Avidin ummantelte FluoSpheres als Modellsysteme (→ 6.1.6.). An diesen Kügelchen sollten Nachweis-Empfindlichkeit der Tryptophan-Fluoreszenz und Immobilisierung optimiert werden.

Ein-Photonen-Anregung

Zum Nachweis der Immobilisierung einzelner Moleküle wurde die Ein-Photonen-Anregung verwendet. Einzelne FluoSpheres wurden über den gelb-grünen Farbstoff im Innern der Kügelchen nachgewiesen. Dieser läßt sich bei $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm anregen [62]. Hämocyanine enthalten keine Fluorophore, die im sichtbaren Spektralbereich anregbar wären. Sie wurden daher mit dem Farbstoff Tetramethyl-Rhodamin markiert (\rightarrow 6.2.5.). Zur Immobilisierung wurden mehrere Verfahren untersucht (\rightarrow 6.2.6.):

- Adsorption

Zur Adsorption wurde eine verdünnte Suspension der FluoSpheres auf ein Deckglas gegeben. Bei Fokussierung des Anregungsstrahles in das Lösungsvolumen ließen sich keine einzelnen Kügelchen abbilden (Abb. 6.12, links). Lediglich die Drift größerer Aggregate führte zu vereinzelt Streifen, da diese so langsam durch den Fokus wanderten, daß sie aufgezeichnet werden konnten. Wurde der Fokus dagegen auf die Deckglas-Oberfläche gerichtet, ließen sich einzelne, immobilisierte FluoSpheres nachweisen (Abb. 6.12, rechts). Dieses Verfahren war sowohl bei den größeren FluoSpheres ($\varnothing = 200$ nm) erfolgreich als auch bei den kleinen ($\varnothing = 40$ nm). Auf die gleiche Weise konnten auch einzelne Hämocyanin-Moleküle immobilisiert werden (Abb. 6.13 rechts).

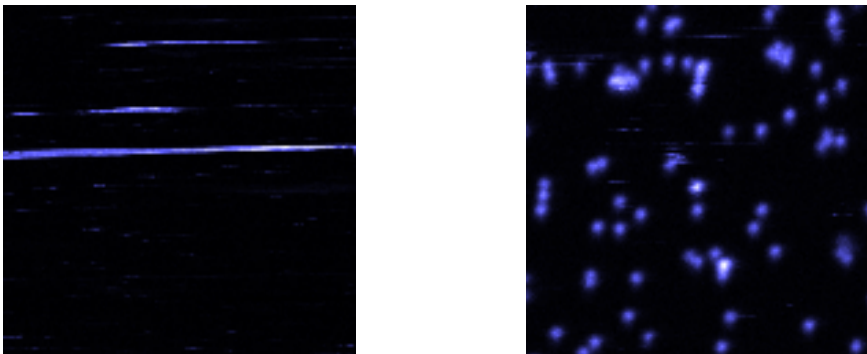


Abb. 6.12: Ein-Photonen-Anregung von fluoreszenz-markierten FluoSpheres

Die FluoSpheres hatten einen Durchmesser von $\varnothing = 200$ nm. Eine Suspension mit $1,25 \times 10^{11}$ Teilchen pro mL in Phosphat-Puffer wurde auf ein Deckglas pipettiert. Die Anregung erfolgte bei 488 nm mit einer Leistung von 0,1 nW. Für das Bild wurden $10 \times 10 \mu\text{m}$ mit 128×128 Pixeln bei 3 ms/pixel abgerastert.

links Der Laser-Fokus befand sich etwa $20 \mu\text{m}$ von der Glasoberfläche entfernt in der Lösung. Die Kügelchen diffundierten frei in der Lösung und waren daher nicht zu erkennen. Die drei sichtbaren Streifen wurden von größeren, diffundierenden Aggregaten hervorgerufen.

rechts Der Fokus befand sich auf der Oberfläche des Deckglases. Einzelne FluoSpheres, die durch Adsorption an die Glasoberfläche immobilisiert wurden, ließen sich abbilden.

- Poly-Acrylamid-Gel

Es wurde auch versucht, einzelne Hämocyane und FluoSpheres durch Gele räumlich zu fixieren. Für diesen Zweck ist Poly-Acrylamid als Gel-Matrix aus mehreren Gründe nicht geeignet. Auch nach der Polymerisation gibt es noch unpolymerisiertes Acrylamid im Gel, das die Tryptophan-Fluoreszenz löscht [61]. Weiterhin emittierte Poly-Acrylamid selbst Fluoreszenz bei UV-Anregung und absorbierte das Fluoreszenzlicht der Tryptophane.

- Agarose-Gel

Weiterhin wurde als Gel-Matrix Agarose untersucht, aber auch hier war die Immobilisierung nicht erfolgreich. Abb. 6.13 (links) zeigt als Beispiel den Versuch, Hämocyanin in einem 1%igen Agarose-Gel zu fixieren. Die Abbildung eines Bereichs im Gel zeigte jedoch keine Einzel-Moleküle. Die maximale Fluoreszenz-Intensität ist mit 700 cps sehr niedrig (siehe unten). Vereinzelt treten helle Punkte auf (ein Pixel): hier war während der Messung dieses Punktes kurzzeitig ein Hämocyanin im Detektionsvolumen, bei der Messung des benachbarten Punktes aber schon nicht mehr. Um eine Verbesserung zu erzielen, wurde die Agarose-Konzentration in den Gelen von 1 % - 5 % variiert. Bei höheren Konzentrationen wurde das Gel allerdings derart viskos, daß eine homogene Durchmischung von Agarose- und Hämocyanin-Lösung nicht mehr gewährleistet werden konnte.

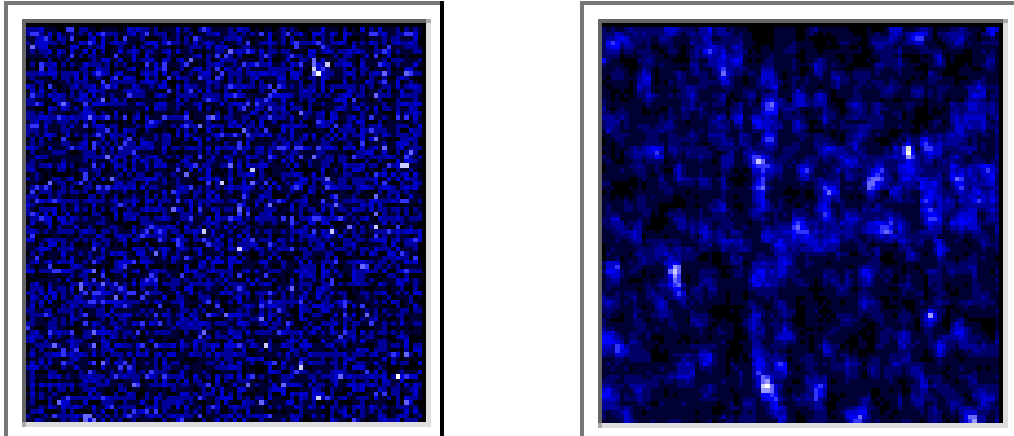


Abb. 6.13: Ein-Photonen-Anregung von Rhodamin-markiertem Hämocyanin

Die Lösung enthielt 1 % Agarose sowie eine Hämocyanin-Konzentration von $c = 0,3 \mu\text{g/mL}$. Die Anregung erfolgte bei 488 nm mit einer Leistung von $0,95 \mu\text{W}$. Jedes Rasterbild umfaßt $10 \times 10 \mu\text{m}$, die mit 128×128 Pixel bei 3 ms/pixel aufgenommen wurden.

links Der Laser war etwa $20 \mu\text{m}$ von der Glasoberfläche entfernt in die Lösung fokussiert. Die hellsten Punkte entsprechen einer Fluoreszenz-Intensität von 700 cps.

rechts Der Fokus befand sich auf der Oberfläche des Deckglases. Zu sehen sind einzelne Hämocyanin-Moleküle, die durch Adsorption an der Glasoberfläche immobilisiert wurden. Die hellsten Punkte entsprechen einer Fluoreszenz-Intensität von 13.600 cps.

Auch die Verwendung einer *low gelling*-Agarose (in Anlehnung an [122]) brachte keine Verbesserung. Wurde der Laserstrahl dagegen auf die Deckglas-Oberfläche fokussiert, konnten einzelne, adsorbierte Hämocyane beobachtet werden (Abb. 6.13, rechts). Die maximale Fluoreszenz-Intensität ist mit 13.600 cps rund 20-mal höher als im Gel. Erneutes Abbilden der selben Stelle an der Oberfläche lieferte ein Bild mit gleichem Muster. Daraus kann geschlossen werden, daß die Wechselwirkung von Oberfläche und Protein zu einer dauerhaften Immobilisierung führte. Diese Art der Immobilisierung war auch dann erfolgreich, wenn keine Agarose verwendet wurde.

Zwei-Photonen-Anregung

Das an der Oberfläche der FluoSpheres gebundene Avidin enthält pro Molekül 16 Tryptophane und ist in der Lage, vier Moleküle Biotin zu binden (\rightarrow 6.1.6.). Somit läßt sich die Anzahl an gebundenen Tryptophanen über die vom Hersteller angegebene Biotin-Bindekapazität bestimmen.

Die von uns verwendete Charge der größeren FluoSpheres ($\varnothing = 200$ nm) besaß eine Biotin-Bindekapazität von 2,2 nmol(Biotin)/mg(FluoSpheres). Daraus ergibt sich bei einer Dichte der Kügelchen von $\rho = 1,055$ g/mL eine Anzahl von 24.000 Tryptophanen pro Kügelchen. Die am Deckglas adsorbierten Kügelchen ließen sich über ihre Tryptophan-Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung problemlos nachweisen (hier nicht gezeigt).

Die kleineren FluoSpheres ($\varnothing = 40$ nm) besaßen eine Biotin-Bindekapazität von 4,0 nmol(Biotin)/mg(FluoSpheres), was nur noch 340 Tryptophanen pro Kügelchen entsprach. Auch diese FluoSpheres wurden durch Adsorption immobilisiert und ließen sich über ihre Tryptophan-Fluoreszenz nachweisen (Abb. 6.14). Der Nachweis gelang mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von ungefähr 10:1. Im Gegensatz dazu gelang die Abbildung einzelner Hämocyane über ihre intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung nicht. Um eine Verbesserung zu erzielen, wurden die folgenden Parameter variiert: (1) die Hämocyane wurden deoxygeniert, um ihre Fluoreszenz-Quantenausbeute anzuheben (Kapitel 4). (2) Die Hämocyane wurden quervernetzt, um eine Dissoziation und Denaturierung zu verhindern (Kapitel 5). (3) Die Anregungsintensität wurde im Bereich von 0,5 – 5 mW variiert. (4) Es wurden verschiedene Anregungswellenlängen im Bereich von 560 – 590 nm untersucht. Bei keiner der angegebenen Variationen ließen sich einzelne Hämocyane durch Zwei-Photonen-Anregung abbilden.

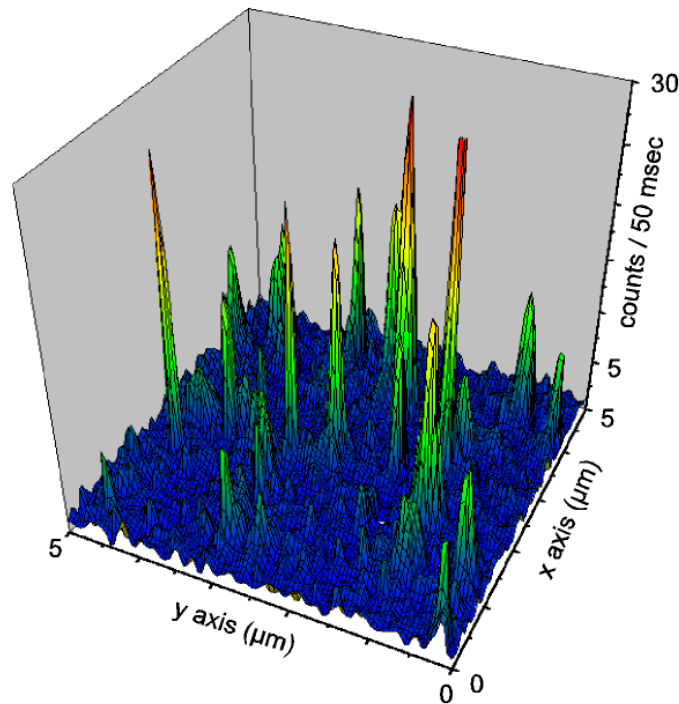


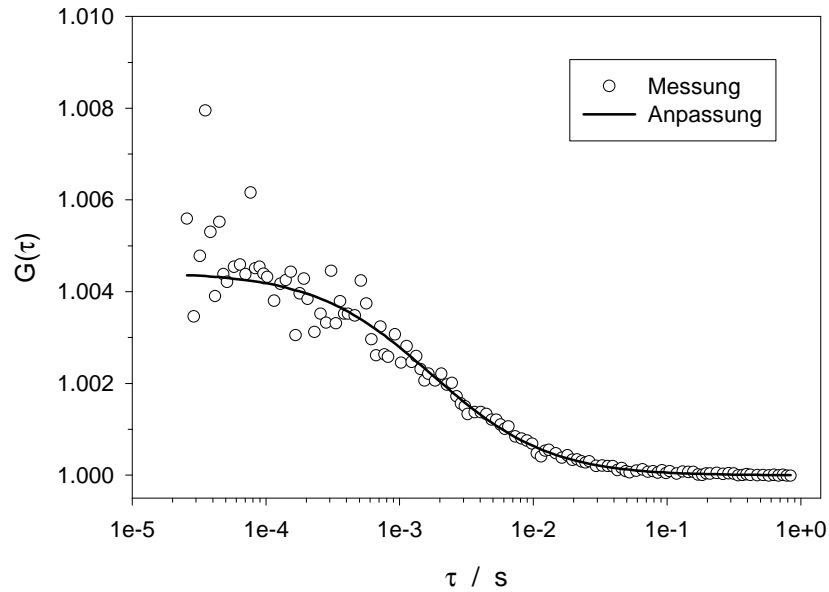
Abb. 6.14: Zwei-Photonen-Anregung von Avidin-markierten FluoSpheres

Die FluoSpheres hatten einen Durchmesser von $\varnothing = 40$ nm und enthielten 340 Tryptophane. Eine Suspension mit $1,56 \times 10^{11}$ Teilchen pro mL in Phosphat-Puffer wurde auf ein Deckglas pipettiert. Die Anregung erfolgte bei 590 nm mit einer Leistung von 2,1 mW. Für das Bild wurden $5 \times 5 \mu\text{m}$ mit 100×100 Pixeln bei 50 ms/pixel abgerastert. Der Fokus befand sich auf der Oberfläche des Deckglases.

6.3.6. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

Mit der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie sollte die Diffusion einzelner Hämocyanin-Moleküle nachgewiesen werden. Als Kontrolle für den Nachweis einzelner Moleküle diente die Bestimmung der Diffusionskonstanten. Hierbei wurde sowohl fluoreszenz-markiertes Hämocyanin (\rightarrow 6.2.5.) nach Ein-Photonen-Anregung als auch unmarkiertes Hämocyanin über die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung untersucht. Die erhaltenen Auto-Korrelationsfunktionen beider Proben sind in Abb. 6.15 dargestellt.

OPE



TPE

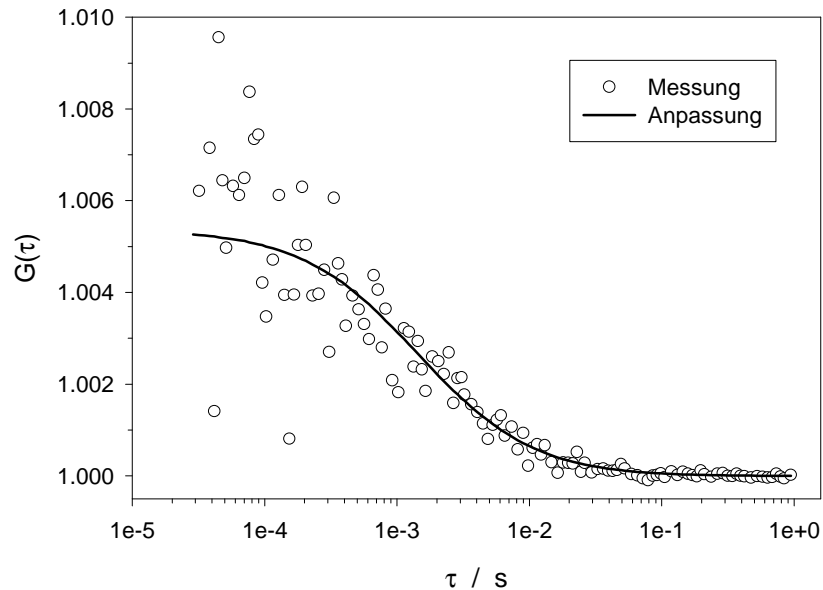


Abb. 6.15: Fluoreszenz-Korrelationsfunktionen von Hämocyanin

OPE Ein-Photonen-Anregung von fluoreszenz-markierten Hämocyaninen ($c = 0,3 \text{ mg/mL}$) in Tris-Puffer ($\rightarrow 3.2.1.$). Angeregt wurde bei 488 nm (Laser-Leistung $3 \text{ } \mu\text{W}$). Die Meßdauer betrug 25 min .

TPE Zwei-Photonen-Anregung von unmarkiertem, deoxygeniertem Hämocyanin ($c = 0,3 \text{ mg/mL}$) in Tris-Puffer ($\rightarrow 3.2.1.$). Angeregt wurde bei 590 nm (Laser-Leistung $48 \text{ } \mu\text{W}$). Die Meßdauer betrug 30 min .

Wegen des schwächeren Signals ergab sich bei Messung der Tryptophan-Fluoreszenz eine Kurve, die etwas mehr verrauscht war. An die Meßpunkte wurde jeweils die Korrelationsfunktion für den Fall der freien Diffusion in drei Dimensionen angepaßt. Die OPE-Kurve wurde mit Gleichung (6.5) angepaßt, die TPE-Kurve mit Gleichung (6.7). Die Ausgangsgrößen und die Ergebnisse der Anpassungen sind in Tab. 6.3 zusammengefaßt.

	Ein-Photonen-Anregung	Zwei-Photonen-Anregung
Ausgangsgrößen		
Kontrast-Faktor γ	0,35	–
Fokus-Radien ω_0	370 nm	430 nm
z_0	2200 nm	–
Anregungswellenlänge λ	–	590 nm
Ergebnis		
Diffusionskoeffizient D ($10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{s}$)	2,1	1,9

Tab. 6.3: Beschreibung der Korrelationsfunktionen für den Fall der freien Diffusion

Konstanten und Ergebnisse der angepaßten Korrelationsfunktionen aus Abb. 6.15. Die Kurve nach Ein-Photonen-Anregung wurde mit Gleichung (6.5) angepaßt, die Kurve nach Zwei-Photonen-Anregung mit Gleichung (6.7). Dort wo keine Werte angegeben sind (–), werden sie für die Anpassung nicht benötigt.

Bei beiden Anregungsarten war die Messung einer Korrelationsfunktion nach Gleichung (6.4) möglich. D.h., es konnten Intensitätsfluktuationen, hervorgerufen durch die Diffusion einzelner Hämocyanine im Fokus, detektiert werden. Die Anpassungen an beide Kurven lieferten die gleichen Diffusionskonstanten. Somit war der Nachweis einzelner Hämocyanine über ihre intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz gelungen.

6.4. Diskussion

6.4.1. Zwei-Photonen-Anregung

Für den Nachweis einzelner Proteine ist die klassische Ein-Photonen-Anregung schlecht geeignet, weshalb die Tryptophane mit Hilfe eines Mehr-Photonen-Prozesses angeregt werden sollten [128, 129, 175]. Dabei wird die benötigte Anregungsenergie durch die gleichzeitige Absorption von mehreren Photonen erbracht. Je mehr Photonen aber gleichzeitig absorbiert werden müssen, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit für ein solches Ereignis [168]. Dies führt zu hohen Anregungsintensitäten und damit auch zu hohen Strahlenbelastungen der Probe (→ 6.1.5.) [168]. Wir haben uns daher für die Zwei-Photonen-Anregung entschieden. Zu dieser relativ neuen Technik liegen erst wenige Arbeiten vor. Der Nachweis einzelner, künstlicher Fluorophore ist gelungen [133, 137, 138]. Proteine sind über ihre intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz mit dieser Technik bisher nur auf der Ensemble-Ebene nachgewiesen worden [141, 142, 144 – 148].

Zunächst wurde untersucht, ob die Zwei-Photonen-Anregung einen Einfluß auf die Fluoreszenz-Eigenschaften von Tryptophan hat. Hierzu wurden die Fluoreszenz nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung miteinander verglichen (→ 6.3.1.). Untersucht wurde freies Tryptophan in Lösung sowie oxy- und deoxy-Hämocyanin. Durch den Zwei-Photonen-Prozess werden in Proteinen selektiv nur Tryptophane angeregt [142]. Deshalb wurden die Anregungswellenlängen so gewählt, daß auch im Ein-Photonen-Fall nur Tryptophane zur Fluoreszenz angeregt wurden: 295 nm und $2 \times 295 \text{ nm} = 590 \text{ nm}$ [61].

An Lage und Form der Emissionsspektren läßt sich erkennen, ob Änderungen der Energie-Niveaus stattgefunden haben [61]. Bei freiem Tryptophan, oxy- und deoxy-Hämocyanin war dies offensichtlich nicht der Fall, denn die Übereinstimmung der Emissionsspektren bei Ein-Photonen-Anregung mit den entsprechenden Spektren bei Zwei-Photonen-Anregung war für alle drei Proben sehr gut (Abb. 6.4).

Weiterhin wurden zwei prinzipiell verschiedene Prozesse der Fluoreszenz-Löschung untersucht. Bei der Löschung durch Iodid handelt es sich um eine Energie-Übertragung, die durch Stöße (direkter Kontakt) vermittelt wird [61, 64]. Im Gegensatz dazu erfolgt die Löschung im Hämocyanin durch Förster-Transfer (Kapitel 4), der über größere Distanzen wirkt [55, 60]. Unabhängig davon, welcher Art der Löschprozess war, konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Anregungsarten festgestellt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Art der Anregung keinen Einfluß auf die Fluoreszenz-Eigenschaften von Tryptophan hatte. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Tryptophan frei in Lösung oder gebunden in einer Protein-Matrix vorlag. Dies stimmt mit den meisten der bisher publizierten Daten überein [142, 144 – 148].

Unerwartete Unterschiede traten dagegen auf, wenn die Anregungsintensität variiert wurde (Abb. 6.7). Zunächst zeigten die drei Proben in etwa einen quadratischen Zusammenhang von Fluoreszenz- und Anregungsintensität. Dies

bestätigte den Zwei-Photonen-Anregungsprozess [129, 133 – 135]. Während aber beim Tryptophan und deoxy-Hämocyanin die Exponenten kleiner als Zwei ausfielen ($n = 1,95$ bzw. $n = 1,88$), ergab sich beim oxy-Hämocyanin einer, der merklich größer war ($n = 2,30$). Diese Unterschiede ließen sich zunächst nicht erklären.

6.4.2. Photostabilität

Das ungewöhnliche Verhalten des Hämocyanins bei Variation der Anregungsintensität ließ Zweifel an dessen Photostabilität aufkommen. Insofern wäre es wünschenswert gewesen, Stabilitätsuntersuchungen am Hämocyanin mit der Zwei-Photonen-Anregung durchführen zu können. Die Schwierigkeit dabei bestand in dem verschwindend geringen Anregungsvolumen, das im fL-Bereich (μm^3) lag. Die klassischen Methoden zur Protein-Analytik, d.h. solche auf der Ensemble-Ebene, erfordern zumindest μL -Volumina. Somit war das Anregungsvolumen bei der Zwei-Photonen-Anregung neun Größenordnungen kleiner als das zur Analyse benötigte Volumen. Folglich ließen sich Experimente zur Photostabilität von Proteinen mit der Zwei-Photonen-Anregung nicht realisieren. Um dennoch Hinweise auf möglicherweise auftretende Prozesse zu erhalten, wurde die Photostabilität des Hämocyanins mittels Ein-Photonen-Anregung untersucht (\rightarrow 6.3.2.). Hierbei traten keine Probleme mit dem Anregungsvolumen auf, da sich mL-Volumina bestrahlen ließen. Beim Hämocyanin der Vogelspinne konnten vier irreversible Prozesse unterschieden werden:

1. Dissoziation

Als Änderung in der Struktur des Hämocyanins machte sich nach wenigen Minuten die Dissoziation bemerkbar. Dies wurde mittels nativer Gel-Elektrophorese, Zunahme der Fluoreszenz-Intensität und der Rotverschiebung des Fluoreszenz-Maximums nachgewiesen. Nach einer Bestrahlungsdauer von 20 min war das 24-mer vollständig in seine Untereinheiten dissoziiert.

Disulfid-Brücken dienen zur Stabilisierung der Tertiär- und damit auch der Quartär-Struktur von Proteinen. Ihre Spaltung kann zur Dissoziation in Untereinheiten bzw. zur Denaturierung des Proteins führen [162, 163]. Für das Vogelspinnen-Hämocyanin konnte dies gezeigt werden: Alle Untereinheiten enthalten jeweils zwei hoch-konservierte Disulfid-Brücken, die beide die Domäne drei stabilisieren [40]. Die Reduktion der Disulfide durch Dithiothreitol oder Cystein führt zur Dissoziation des 24-mers [34]. Weiterhin ist bekannt, daß Disulfid-Brücken durch UV-Licht gespalten werden können [162 – 165]. Dabei scheint eine Energie-Übertragung von angeregten Tryptophanen oder Tyrosinen auf benachbarte Disulfide notwendig zu sein [163 – 167]. Eine derartige, photolytische Spaltung der Disulfid-Brücken erscheint beim 24-meren *Eurypelma*-Hämocyanin plausibel, da sich in allen Untereinheiten eines der beiden Disulfide in direktem Kontakt mit mehreren Tryptophan- und Tyrosin-Seitenketten befindet. In Abb. 6.16 ist als Beispiel die Untereinheit a dargestellt, bei der das obere Cystin (Cys 538 / 586) von zwei Tryptophanen und zwei Tyrosinen umgeben ist.

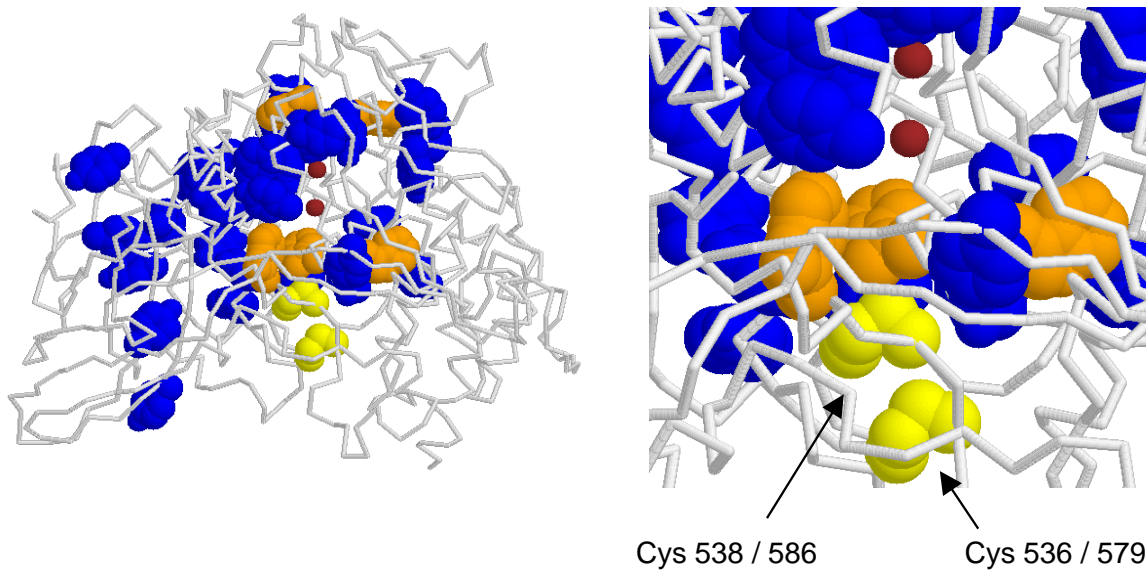


Abb. 6.16: Untereinheit α vom Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum*

Links ist die gesamte Untereinheit zu sehen, rechts ein vergrößertes Detail. Das Peptid-Rückgrat ist grau, die Kupfer-Atome des aktiven Zentrums rot dargestellt. Die Untereinheit enthält zwei Disulfid-Brücken (gelb): Cys 536 / 579 und Cys 538 / 586. Davon befindet sich letztere in direkter Nachbarschaft zu mehreren Tyrosin- (blau) und Tryptophan-Seitenketten (orange): Trp 178, Trp 540, Tyr 182 und Tyr 585. Die Abstände liegen im Bereich 0,37 – 0,80 nm. Abgebildet ist eine berechnete Struktur, der die Röntgenstruktur von *Limulus polyphemus* als Vorlage diente [29, 40].

2. Deoxygenierung

Parallel dazu traten auch funktionelle Änderungen auf: die aktiven Zentren verloren ihre Fähigkeit zur O_2 -Bindung, d.h. sie wurden zerstört. Dieser Prozess wurde über die Absorption bei 340 nm, die Zunahme der Fluoreszenz-Intensität und die Rotverschiebung des Emissionsmaximums detektiert. Auch dieser Prozess begann schon nach wenigen Minuten, war aber erst nach etwa 40 min abgeschlossen.

Bei oxygeniertem Hämocyanin werden etwa 92 % der Tryptophan-Fluoreszenz durch Förster-Transfer gelöscht (Kapitel 4). Dadurch wird ein beträchtlicher Teil der absorbierten Energie zu den aktiven Zentren transportiert. Da ein Hämocyanin-Molekül 148 Tryptophane aber nur 24 Cu-Zentren enthält [40], wirken die aktiven Zentren wie Licht-Sammel-Komplexe und werden entsprechend häufig angeregt. Protein-Komplexe, die von der Natur auf das Einsammeln von Licht optimiert wurden, enthalten Stabilisatoren, die ihre Photostabilität beträchtlich erhöhen [176 – 178]. So enthalten z.B. die Licht-Sammel-Komplexe der Photosynthese Karotinoide. Deren Aufgabe besteht vor allem darin, hoch-reaktiven Singulett-Sauerstoff abzufangen, bevor er die Chlorophylle zerstören kann [176, 179, 180].

Hämocyanine sind nicht auf Photostabilität optimiert, da sie im Körper von Tieren normalerweise keinen hohen Lichtintensitäten ausgesetzt sind. Entsprechend ungünstig liegen die Verhältnisse dort: sie enthalten keine Stabilisatoren, transportieren andererseits aber den potentiell gefährlichen Sauerstoff. Insofern ist es nicht verwunderlich, wenn häufige Anregung des Cu-Sauerstoff-Komplexes zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führte. Dieser würde das Protein bzw. aktive Zentrum angreifen und es dadurch schädigen.

3. Denaturierung (Aggregation)

Spätestens nach 40 min begann die Denaturierung des Hämocyanins und schritt fort, bis alle Protein-Moleküle zerstört waren. Dabei bildeten die entfaltenen Proteinketten große Aggregate, was durch die Gel-Elektrophorese und den zunehmenden Streulicht-Anteil in den Absorptionsspektren gezeigt werden konnte.

Die Denaturierung durch UV-Strahlung ist selbst bei kleinen Proteinen ein sehr komplexer Prozess [162]. Es erscheint daher fast ausgeschlossen, die Entfaltung bei derart riesigen Molekülen wie den Hämocyaninen beschreiben zu können. Anzumerken ist aber, daß beim Hämocyanin die einzelnen Untereinheiten durch die Wechselwirkungen mit benachbarten Untereinheiten im 24-mer stabilisiert werden [47, 49, 94]. D.h., isolierte Untereinheiten denaturieren bei Erhöhung der Temperatur oder Zugabe von Detergenzien leichter als das Oligomer. In den hier durchgeführten Experimenten führte die UV-Bestrahlung durch die Spaltung der Disulfid-Brücken zuerst zur Dissoziation des Oligomers. Dadurch wurde die Stabilität der Untereinheiten herabgesetzt, was sie für weitere Prozesse empfänglicher machen sollte. Dennoch begann die Entfaltung und Aggregation der Untereinheiten nicht gleichzeitig mit der Dissoziation, sondern erst deutlich später (nach 40 min). Die Photostabilität von Untereinheiten ist also größer als die des 24-mers.

4. Bleichen der Tryptophane

Parallel zur Denaturierung, d.h. ab etwa 40 min, trat Bleichen der Tryptophane auf. Dieser Prozess macht sich in einem stetigen Absinken der Fluoreszenz-Intensität, später auch in einer Blauverschiebung des Emissionsmaximums bemerkbar.

In denaturierten Proteinen sind die Tryptophane dem Lösungsmittel zugänglich. Dies ist mit einer Rotverschiebung ihres Emissionsmaximums auf 350 – 355 nm verbunden [61]. Ein derartiger Prozess konnte hier nicht beobachtet werden (Abb. 6.10.c). Vielmehr blieb das Emissionsmaximum über einen weiten Bereich der Bestrahlungsdauer bei dem von Tryptophan in nativem Hämocyanin ($\lambda_{\max} \approx 333$ nm). Dies kann nur so interpretiert werden, daß denaturiertes Hämocyanin nicht zur Fluoreszenz-Intensität beitrug. Da aber mit steigender Bestrahlungsdauer zunehmend mehr Hämocyanin denaturierte, blihen offensichtlich die Tryptophane bei der Denaturierung. Der Zugang zum Lösungsmittel Wasser, einschließlich des darin gelösten Sauerstoffes, scheint entscheidend für das Bleichen zu sein (\rightarrow 6.1.5.). Anders ausgedrückt: das Protein schützte die Tryptophane vor der Zerstörung – auch dann, wenn es sich um ein oxygeniertes Sauerstoff-Transport-Protein handelt.

Zwei-Photonen-Experimente

Bei den Ein-Photonen-Experimenten wurde das Hämocyanin mit dem Licht einer starken UV-Lampe bestrahlt. Es bleibt offen, wie stark die Wirkung dieses Lichtes (450 W, schwach fokussiert, Ein-Photonen-Anregung, polychromatisch, längere Belichtung) im Vergleich zu dem des Lasers (2 mW, stark fokussiert, Zwei-Photonen-Anregung, monochromatisch, kürzere Belichtung) zu bewerten ist. Allerdings erscheint es plausibel, auch bei der Zwei-Photonen-Anregung ähnliche Zerfallsprozesse im Hämocyanin anzunehmen [168] – wenn auch möglicherweise mit anderer Gewichtung oder Reihenfolge.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Intensität von der Anregungsintensität bei Zwei-Photonen-Anregung wurde in Abschnitt 6.3.1. an drei Proben untersucht: freies Tryptophan in Lösung, oxy- und deoxy-Hämocyanin. Als erstes Ergebnis ließ sich festhalten, daß das Fluoreszenz-Verhalten nicht ohne die Berücksichtigung von Bleichprozessen beschrieben werden konnte. In Abschnitt 6.3.3. wurden zwei verschiedene Modelle aufgestellt, die unterschiedliche Bleichprozesse berücksichtigten. Mit diesen Modellen konnten dann in Abschnitt 6.3.4. die Intensitätsabhängigkeiten quantitativ beschrieben werden.

Beim ersten Modell wurde angenommen, daß das Bleichen der Fluorophore mit einer konstanten Rate aus dem angeregten Zustand S_1 erfolgt. Bei freiem Tryptophan in Lösung und deoxy-Hämocyanin reichte die Berücksichtigung dieses Bleichprozesses zur Beschreibung aus. Beim oxy-Hämocyanin mußte dagegen noch die Besetzung eines angeregten Zustandes (O_x^*) postuliert werden, dessen Population mit steigender Anregungsintensität zunehmen sollte. Hierbei wurden zwei Alternativen getestet: die Bildung von O_x^* durch einen Ein- bzw. Zwei-Photonen-Prozess. Die Abhängigkeit von der Anregungsintensität ließ sich am besten durch einen Ein-Photonen-Prozess beschreiben. Als Ursache bietet sich folgende Erklärung an. Oxygeniertes Hämocyanin besitzt bei 560 nm eine schwache Absorptionsbande ($\epsilon = 1.000 / M \text{ cm}$) [5, 33]. Die Bildung des angeregten Zustandes könnte daher auf die Absorption des Anregungslichtes ($\lambda_{\text{ex}} = 590 \text{ nm}$) durch die oxygenierten aktiven Zentren zurückzuführen sein. Der angeregte Zustand kann dann weder absorbieren noch die Tryptophan-Fluoreszenz löschen [96]. Mit steigender Anregungsintensität würde dieser angeregte Zustand immer mehr populiert, was zu einem überproportionalen Anstieg der Fluoreszenz-Intensität beim oxy-Hämocyanin führte (Abb. 6.7).

Die Anpassungen führten in allen Fällen zu hohen Bleichraten k_B (Tab. 6.1), die etwa in der Größenordnung der Fluoreszenz-Raten lagen. Die geringste Bleichrate zeigte deoxy-Hämocyanin, die von Tryptophan in Lösung war viermal so groß und die von oxy-Hämocyanin 33-mal so groß. Die hohe Bleichrate des oxy-Hämocyanins steht jedoch im Widerspruch zu zwei Ergebnissen, die bei Untersuchungen mit der Ein-Photonen-Anregung gefunden wurden: (1) In diesem Abschnitt wurde unter "4. Bleichen der Tryptophane" dargelegt, daß das Hämocyanin die Fluorophore vor dem Bleichen zu schützen vermag. Bei der Zwei-Photonen-Anregung lieferte das erste Modell dagegen Bleichraten, die für oxy-Hämocyanins um eine Größenordnung höher waren als für freies Tryptophan in Lösung (Tab. 6.1). Dies würde bedeuten, daß im Protein die Fluorophore schneller zerstört würden als im Wasser. (2) Der sehr große Unterschied in den Bleichraten der beiden Hämocyanine (Faktor 33) ist nicht verständlich. In Kapitel 4 konnte gezeigt werden, daß die Unterschiede in den Quantenausbeuten von

oxy- und deoxy-Hämocyanin vollständig auf Förster-Transfer zurückzuführen sind. Daher sollten alle anderen Prozesse, die zu einer Entvölkerung des angeregten Zustandes führen können, bei beiden Hämocyaninen weitgehend gleich sein. Dies gilt auch für das Bleichen aus dem angeregten Zustand. Nach dem ersten Modell zur Interpretation der Zwei-Photonen-Ergebnisse unterscheiden sich die Bleichraten jedoch erheblich.

Wegen der Mängel des ersten Modells wurde nach einer alternativen Beschreibung der Meßwerte gesucht. Beim zweiten Modell wurde angenommen, daß das Bleichen der Fluorophore intensitätsabhängig aus dem elektronischen Grundzustand S_0 erfolgt. Auch hier konnten die Meßwerte von freiem Tryptophan in Lösung und deoxy-Hämocyanin durch die Einführung des Bleichprozesses gut beschrieben werden. Beim oxy-Hämocyanin mußte zusätzlich eine licht-induzierte Deoxygenierung angenommen werden. Die Deoxygenierung dürfte auf Absorption des Anregungslichtes bei 590 nm zurückzuführen sein (siehe 1. Modell). Die Absorption durch das aktive Zentrum führt aber zu einer Lockerung der Bindung zwischen dem Sauerstoff und den Cu-Atomen [persönliche Mitteilung von Prof. F. Tuczek, Anorganische Chemie, Universität Kiel]. Eine licht-induzierte Deoxygenierung erscheint daher bei häufiger Anregung der aktiven Zentren plausibel.

Die Anpassungen lieferten intensitätsabhängige Bleichraten k_{Bleich} , die für freies Tryptophan eine Größenordnung über der der Hämocyanine lagen (Tab. 6.2). Dies stimmt mit den Erwartungen aus den Ein-Photonen-Messungen überein, wo festgestellt wurde, daß das Protein die Tryptophane zu schützen vermag. Auch das Verhältnis der Bleichraten k_{Bleich} von oxy- und deoxy-Hämocyanin entspricht ungefähr den Erwartungen: sie sind bis auf einen Faktor von 1,5 gleich.

Abschließend läßt sich sagen, daß beide Modelle geeignete Beschreibungen für die Fluoreszenz-Intensität in Abhängigkeit von der Anregungsintensität bei Zwei-Photonen-Anregung liefern. Das zweite Modell paßt jedoch deutlich besser mit den Ergebnissen der Ein-Photonen-Messungen zusammen. Allerdings erscheint auch eine Mischung beider Modelle denkbar, z.B. Bleichen aus dem Grundzustand S_0 verbunden mit der Bildung des angeregten Zustandes O_x^* beim oxy-Hämocyanin.

6.4.3. Abbildung von Einzel-Molekülen

Der Übergang vom Ensemble zum Einzel-Molekül ist mit zwei Schwierigkeiten verbunden. Zum einen verringert sich die Signal-Intensität. Um dennoch meßbare Signale zu erhalten, ist eine drastische Reduktion des Detektionsvolumens erforderlich [155]. Dies hat zur Folge, daß aufgrund der Diffusion die Verweildauer des Einzel-Moleküls im Meßvolumen sehr gering ist. Diese Zeit reicht für die Abbildung einzelner Moleküle nicht aus und macht deren Immobilisierung erforderlich. Die Optimierung von Immobilisierungsverfahren setzt aber wiederum den Nachweis einzelner Moleküle voraus, so daß im allgemeinen beide Probleme gleichzeitig gelöst werden müssen. Im vorliegenden Fall ließen sich jedoch die beiden Fragestellungen separieren: (1) Die Signal-

Intensität nach Zwei-Photonen-Anregung konnte durch die Verwendung von zwei Modellsystemen schrittweise verringert werden. (2) Durch Einführung einer zusätzlichen Farbstoff-Markierung konnte die Immobilisierung mittels Ein-Photonen-Anregung überprüft werden.

Immobilisierung

Die Farbstoff-Markierung wurde so gewählt, daß sich die Teilchen durch einen Ein-Photonen-Prozess im sichtbaren Spektralbereich leicht nachweisen lassen sollten. Im Falle der FluoSpheres handelt es sich um einen grün-gelben Farbstoff, der sich im Inneren der Kügelchen befindet [62]. Das Hämocyanin wurde zu diesem Zweck mit dem Farbstoff Tetramethyl-Rhodamin kovalent markiert.

Als geeignetes Immobilisierungsverfahren erwies sich die Adsorption der Teilchen an die Deckglas-Oberfläche. Derart ließen sich sowohl die FluoSpheres beider Größen (Abb. 6.12 rechts) als auch das markierte Hämocyanin immobilisieren (Abb. 6.13 rechts). Bei diesem Verfahren beschränkte sich die Immobilisierung auf eine Oberfläche. Die Moleküle in der Lösung blieben weiterhin mobil.

Es wurde auch versucht, die Hämocyanine mit Hilfe von Gelen räumlich zu immobilisieren (→ 6.3.5.). Poly-Acrylamid schied schon bei den Vorversuchen wegen Problemen mit dem Untergrund und Störungen der Tryptophan-Fluoreszenz aus. Agarose-Gele zeigten zwar in dieser Hinsicht keine Probleme, waren aber dennoch nicht zur Immobilisierung geeignet. Es gelang trotz zahlreicher Versuche mit verschiedenen Agarose-Konzentrationen nicht, Hämocyanin-Moleküle zu fixieren (Abb. 6.13 links). Ursache dürfte die zu große Maschenweite des Agarose-Geles sein: bei 1 % Agarose beträgt die Maschenweite etwa 150 nm [170]. Zur Immobilisierung des 24-meren Hämocyanins wäre danach ein 12 – 15 %iges Gel erforderlich, was sich aber nicht herstellen ließ. Insofern ist es überraschend, daß in anderen Arbeiten selbst die Immobilisierung von wesentlich kleineren Proteinen gelungen sein soll: Lu *et al.* (1998) beschreiben die Fixierung der Cholesterin-Oxidase ($\varnothing \approx 5$ nm) durch Verwendung von "low gelling"-Agarose [122]. Daher war zu erwarten, daß sich das etwa 30-mal größere Hämocyanin ($20 \times 20 \times 10$ nm³, → 2.3.2.) ebenfalls immobilisieren lassen sollte. Jedoch brachte auch die Verwendung der von Lu *et al.* benutzten Agarose keine Verbesserung.

Nachweis der Tryptophan-Fluoreszenz

Die Signal-Intensität konnte durch die Verwendung von zwei Modellsystemen schrittweise verringert werden. Neben dem Hämocyanin mit 148 Tryptophanen wurden zwei Sorten von FluoSpheres verwendet, die an ihrer Oberfläche mit dem Protein Avidin quervernetzt waren. Abhängig von der Größe variierte der Tryptophan-Gehalt der FluoSpheres. Die drei Systeme wurden durch Adsorption auf einer Deckglas-Oberfläche immobilisiert. Anschließend wurde versucht, einzelne Moleküle über ihre Tryptophan-Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung abzubilden (→ 6.3.5.). Bei den untersuchten FluoSpheres ließen sich sowohl die größeren Kügelchen mit 24.000 Tryptophanen als auch die kleinen

mit 340 Tryptophanen abbilden. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis einzelner Hämocyanin-Moleküle nicht. Die kleinen FluoSpheres konnten mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von etwa 10:1 nachgewiesen werden. Sie enthielten 340 Tryptophane, und damit 2,3-mal mehr als ein Hämocyanin. Außerdem ist zu beachten, daß die Quantenausbeute von Tryptophan in Avidin bei $\Phi = 0,135$ liegt [169], wohingegen sich beim Hämocyanin im günstigsten Fall (deoxy) $\Phi = 0,0727$ ergibt (Tab. 4.3). Dadurch sollte sich das Signal-Rausch-Verhältnis noch einmal um den Faktor zwei verschlechtern. Insgesamt sollte die Fluoreszenz-Intensität von einem Hämocyanin-Molekül 4,3-mal geringer ausfallen als von einem kleinen FluoSphere. Aufgrund des daraus resultierenden Signal-Rausch-Verhältnisses von 2,3 sollten einzelne Hämocyanine aber immer noch nachweisbar sein. Offensichtlich war die Photostabilität der Hämocyanin-Moleküle zu gering. Die Tryptophane blichen bevor genügend Photonen für ein Bild gesammelt werden konnten. In der Protein-Umgebung des Avidins sind Tryptophane möglicherweise besser geschützt.

6.4.4. Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

Bei einer Abbildung werden je nach Signal-Rausch-Verhältnis etwa 30 – 40 Photonen pro Molekül benötigt. Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie erfaßt die zeitliche Beziehung der von den Fluorophoren emittierten Photonen [181]. Für eine solche Korrelation bedarf es lediglich einiger Moleküle, die beim Transit durch den Laserfokus zwei Photonen aussenden. Dadurch sind die Ansprüche an die Photostabilität der Fluorophore wesentlich geringer.

Mit dieser Technik gelang es, Intensitätsfluktuationen von Hämocyaninen nach Zwei-Photonen-Anregung zu detektieren (Abb. 6.15). Durch Anpassung der Korrelationsfunktion für den Fall der freien Diffusion (Gleichung 6.7) konnte die Diffusionskonstante D bestimmt werden (Tab. 6.3). Daß die Autokorrelation tatsächlich auf Fluktuationen einzelner Hämocyanin-Moleküle zurückzuführen war, läßt sich auf zwei Arten belegen. Der Vergleich mit fluoreszenz-markiertem Hämocyanin nach Ein-Photonen-Anregung liefert das gleiche Ergebnis für die Diffusionskonstante D (Tab. 6.3). Der Wert von D läßt sich aber auch mit einer prinzipiell anderen Technik, der Analytischen Ultrazentrifugation, bestimmen. Aus der Sedimentationskonstante s ergibt sich die Diffusionskonstante zu [182]

$$D = \frac{s R T}{M \left(1 - \frac{\rho_{LM}}{\rho_P}\right)} \quad (6.25)$$

Hierbei ist R die molare Gaskonstante, T die absolute Temperatur, M die Molmasse und ρ die Dichte, wobei sich der Index LM auf das Lösungsmittel bezieht und P auf das Protein. Für das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* liegt die Sedimentationskonstante bei $s = 37$ S [33, 183] und die Molmasse bei $M = 1,72 \times 10^6$ g/mol (\rightarrow 2.2.2.). Bei einer Dichte des Lösungsmittels von $\rho_{LM} = 1$ g/cm³ und einer Dichte des Proteins von $\rho_P = 1,35$ g/cm³ [182]

ergibt sich bei Raumtemperatur (20 °C) ein Diffusionskoeffizient von $D = 2,0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Dieser Wert deckt sich mit den beiden Werten aus Tab. 6.3, die mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung bestimmt worden waren.

Somit war es erstmals gelungen, die Diffusion einzelner Protein-Moleküle über ihre intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz zu beobachten.

6.4.5. Ausblick

Die Abbildung einzelner Hämocyanin-Moleküle erscheint unter physiologischen Bedingungen aufgrund der zu geringen Photostabilität nicht oder nur sehr schwer möglich. Daher scheidet auch die Bestimmung von Beladungsverteilungen mittels Abbildung aus. Allerdings ist es zur Bestimmung von Beladungsverteilungen nicht unbedingt erforderlich, jedes Molekül zuvor abzubilden. Da nur der Beladungszustand interessiert, ist eine räumliche Auflösung der Moleküle nicht notwendig. Mit der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ließen sich zwar einzelne Hämocyanin-Moleküle nachweisen, aber keine Beladungsverteilungen bestimmen. Prinzipiell bietet die 1999 vorgestellte PCH-Technik (*photon counting histogram*) die Möglichkeit, Verteilungen von unterschiedlich hellen Fluorophoren zu ermitteln [184 – 186]. Mit dieser Technik lassen sich Intensitätsverteilungen (Häufigkeit der beobachteten Intensitäten) in Konzentrationsverteilung (Häufigkeit der verschieden hellen Teilchen) umrechnen.

Alternativ ließe sich die licht-induzierte Deoxygenierung nutzen, um Aussagen über die Bindungsvorgänge im Protein machen zu können. Durch einen starken Laserpuls könnte der Sauerstoff vom aktiven Zentrum gelöst werden. Durch einen sehr viel schwächeren Laserstrahl ließe sich dann die Rückbindung zeitlich verfolgen (*pump and probe*).

7. Konformation - Einzel-Moleküle

7.1. Einleitung

Dieses Kapitel behandelt die Untersuchungen bzgl. des Nachweises verschiedener Konformationen auf der Ebene einzelner Hämocyanin-Moleküle. Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Butt (früher Physik. Chemie, Universität Mainz, jetzt Gesamt-Hochschule Siegen), Rühle (früher MPI für Polymerforschung, Mainz, jetzt Universität Freiburg) und Knoll (MPI für Polymerforschung, Mainz) durchgeführt.

7.1.1. Atomare Kraft-Mikroskopie

Die Abbildung einzelner Moleküle war bisher nur mit dem Elektronenmikroskop möglich. Die Abbildung mit Hilfe von Elektronen kann aber nur im Vakuum erfolgen, d.h. unter sehr unphysiologischen Bedingungen. Mit Hilfe der Atomaren Kraft-Mikroskopie (AFM) ist es in letzter Zeit möglich geworden, Biomoleküle in wässriger Lösung abzubilden [187, 188]. Diese Möglichkeit wollen wir für unsere Fragestellung nutzen.

1981 wurde von Binnig und Rohrer das erste Raster-Sonden-Mikroskop entwickelt (Nobelpreis 1986) [64]. Mit diesem Mikroskop wurden Tunnelströme zwischen einer feinen Spitze, die als Sonde fungierte, und einer Oberfläche gemessen. Damit konnte die Oberfläche atomar aufgelöst werden, allerdings waren die Untersuchungen auf elektrisch leitende Flächen beschränkt [64, 189].

Seitdem hat diese Mikroskopie-Technik eine stürmische Entwicklung durchgemacht. 1986 folgte das erste Raster-Kraft-Mikroskop (Binnig, Quate und Gerber), mit dem erstmals die Kräfte zwischen Spitze und Oberfläche gemessen werden konnten [64, 170]. Damit vergrößerte sich das Spektrum der untersuchbaren Oberflächen enorm: ein Strom ist immer auf eine elektrische Potentialdifferenz zurückzuführen, aber eine Kraft kann sehr verschiedene Ursachen haben: elektrisch, magnetisch, chemisch, mechanisch. Werden Kräfte mit sehr kurzer Reichweite untersucht (harte Oberflächen), ist auch mit dieser Methode atomare Auflösung möglich [189, 190]: Atomare Kraft-Mikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM). Bei einem solchen Mikroskop wird eine sehr feine Spitze (Radius = 2 – 10 nm) an einer weichen Blattfeder befestigt (Federkonstante $\approx 0,1$ N/m) [170, 189, 191]. Mit diesem System wird die Oberfläche (Substrat) abgerastert (Abb. 7.1). Auf dem Substrat befindet sich die zu untersuchende Probe.

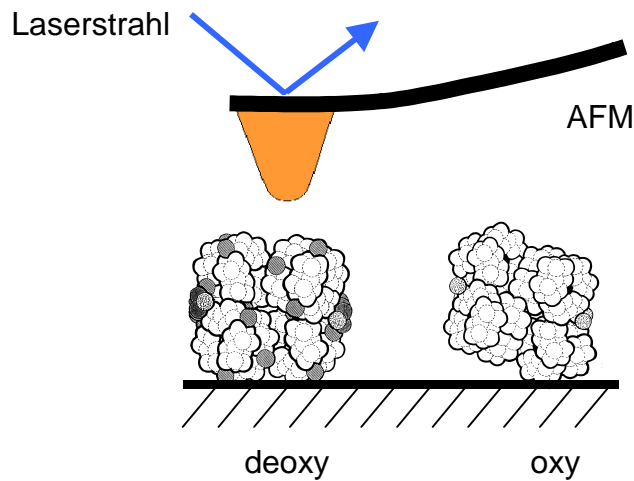


Abb. 7.1: Prinzip eines Atomaren Kraft-Mikroskops (AFM)

Eine feine Spitze befindet sich am Ende einer Blattfeder. Deren Auslenkung wird mit Hilfe eines Laserstrahls detektiert. Schematisch dargestellt sind zwei Hämocyanin-Moleküle mit unterschiedlichen Konformationen, wie sie sich nach einem Modell, basierend auf Untersuchungen mittels Röntgen-Kleinwinkel-Streuung [69], ergeben (→ 5.1.1.).

Trifft die Spitze auf eine Unebenheit, so erzeugt dies eine Kraft (10 pN – 100 nN), die zu einer Auslenkung der Feder führt [170]. Diese Auslenkung wird mit Hilfe eines Laserstrahles und einer Quadrantendiode detektiert [64]. Hierbei spielt es keine Rolle, ob das Substrat mit Wasser bedeckt ist oder sich in Luft befindet [187, 188]. Dadurch werden auch biologische Proben der Messung zugänglich.

7.1.2. Abbildung von Proteinen

Die Raster-Kraft-Mikroskopie setzt starre Oberflächen voraus. Proteine sind aber relativ weiche und flexible Proben. Sie lassen sich mit einer harten Metallspitze nur schwer abbilden, da diese die Moleküle verformt [187, 189, 192, 193]. Um die Störungen so klein wie möglich zu halten, werden zwei grundsätzlich verschiedene Strategien verfolgt.

Tapping-Modus

Das klassische AFM arbeitet im Kontakt-Modus, bei dem sich die Spitze ständig in direktem Kontakt mit der Probe befindet [64]. Die erste Strategie versucht, diesen Kontakt auf ein Minimum zu reduzieren. Eine solche Möglichkeit bietet der Tapping-Modus, bei dem die Feder in resonante Schwingung versetzt wird. Dadurch wird die Probe nur am unteren Umkehrpunkt von der Spitze berührt [188, 189]. Es ergeben sich drei Meßgrößen:

- Der Regler des Mikroskops versucht den Abstand zwischen Probe und Spitze konstant zu halten. Aus den notwendigen Korrekturen ergibt sich ein Höhenbild (Topographie).
- In Abhängigkeit vom Probenmaterial wird die Schwingung unterschiedlich stark gedämpft. Dies führt zu Änderungen der Schwingungsamplitude.
- Die Dämpfung ist außerdem mit einer Phasenverschiebung zwischen Anregung und meßbarer Oszillation verbunden.

2-dimensionale Schichten

Die zweite Strategie versucht, die Beweglichkeit der Moleküle weitestgehend einzuschränken. Dicht gepackte Monolagen, speziell 2-dimensionale Kristalle, sind dafür besonders gut geeignet [188, 189]. Sie verteilen den Druck, der von der Spitze auf ein einzelnes Protein ausgeübt wird, und schränken dessen Beweglichkeit stark ein [187, 191, 192]. Gleichzeitig wird ein weiteres Problem gelöst: die Proteinschicht fixiert das einzelne Molekül auf dem Substrat, so daß dieses nicht von der Spitze weggeschoben werden kann [189].

Bei der Untersuchung von Monolagen bieten sich Membran-Proteine an. Membranen neigen von Natur aus zur Schichtbildung, sind atomar flach, adsorbieren gut an hydrophile Oberflächen und stabilisieren und immobilisieren die Proteine [188, 192]. Als wesentliche Beispiele sind hier Gap Junctions [194], Gramicidin A [191], Cholera Toxin B auf membrangebundenem Rezeptor [195], Bakteriorhodopsin [196 – 198], OmpF [199], Aquaporin [200], α -Hemolysin [201], HPI-Schicht [196] und ein Verbindungstück des Phagen ϕ 29 [196] zu nennen. Beim Bakteriorhodopsin, der HPI-Schicht und dem Verbindungstück des Phagen ϕ 29 konnten auch verschiedene Konformationen nachgewiesen werden.

Lösliche Proteine neigen nicht zur Ausbildung von Monolagen. Daher sind die bisherigen Untersuchungen weniger zahlreich: Ferritin [202], Pertussis Toxin B [203] und GroEL / GroES [204, 205].

Für Proteine liegen die besten bisher erreichten Auflösungen im Bereich von 1 nm [188, 189].

7.1.3. Immobilisierung

Das Hauptproblem bei AFM-Messungen an Proteinen besteht weniger in der eigentlichen Messung als vielmehr in der geeigneten Vorbereitung der Probe. Um Bio-Moleküle gegen ein Verschieben durch die AFM-Spitze zu schützen, sind verschiedene Immobilisierungsverfahren entwickelt worden [187, 189].

- Adsorption
Die einfachste und gebräuchlichste Form der Immobilisierung ist die der Adsorption [187, 191]. Adsorption ist eine unspezifische Form der Anlagerung und beruht auf einer Vielzahl von Wechselwirkung (ionische, van-der-Waals, hydrophobe). Der Vorgang ist komplex und bisher schlecht verstanden [187,

192]. Als Substrat wird meistens Glimmer verwendet, da es atomar glatte Oberflächen besitzt [187, 192].

- kovalente Immobilisierung

Bei der kovalenten Immobilisierung sollen chemische Bindungen zwischen Protein und Substrat ausgebildet werden. Dies ist direkt nicht möglich, weshalb es vermittelnder Reagenzien (Crosslinker) bedarf. NHS-Chlor-Silan ist ein solcher Crosslinker und besteht aus zwei funktionellen Gruppen, die durch einen Abstandshalter getrennt sind (Abb. 7.2). Die NHS-Gruppe (N-Hydroxy-succinimid) reagiert bevorzugt mit den Lysin-Seitenketten (\rightarrow 5.1.3.). Das Chlor-Silan ist in der Lage mit OH-Gruppen von Siliziumoxiden zu reagieren, wie sie z.B. an der Oberfläche von Glas oder Si-Wafern auftreten [206, 207].

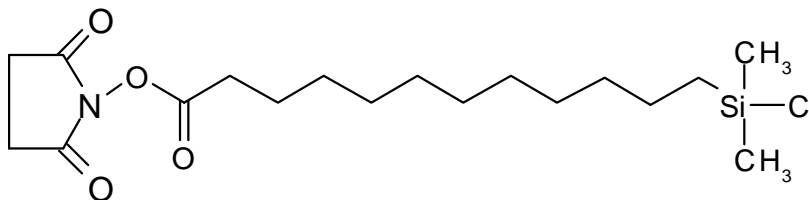


Abb. 7.2: NHS-Chlor-Silan

Die NHS-Gruppe (N-Hydroxy-succinimid) reagiert kovalent mit Aminogruppen unter Ausbildung einer Peptid-Bindung (\rightarrow 5.1.3.). Das Chlor-Silan bindet an OH-Gruppen, die sich z.B. an der Oberfläche von Si-Wafern oder Glas befinden. Die beiden reaktiven Gruppen sind in diesem Fall über einen Abstandshalter von elf C-Atomen getrennt.

Eine Alternative stellen mit Au(111) beschichtete Oberflächen dar. Diese Goldschicht bildet mit Thiolen, wie sie z.B. in Cysteinen vorkommen, kovalente Bindungen aus [187]. Somit fungiert das Gold als Crosslinker zwischen dem Substrat und den Protein-Molekülen.

- *spin coating*

Zur Immobilisierung suspendierter oder gelöster Proben ist *spin coating* ein verbreitetes Verfahren [119, 207]. Das Substrat wird dabei in Rotation versetzt, wobei die Drehachse senkrecht auf der Oberfläche steht. Auf das rotierende Substrat wird die Proben-Lösung gegeben. Durch die Rotation verteilt sich die Suspension bzw. Lösung sehr schnell auf der Oberfläche. Es bildet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm, der sofort eintrocknet.

7.1.4. Ziele

Erster Schritt sollte die Abbildung einzelner Hämocyanin-Moleküle sein. Da es sich bei Hämocyaninen um lösliche Proteine handelt, die nicht zur Schichtbildung neigen, müssen geeignete Bedingungen bzw. Verfahren gefunden werden, die (1) die Immobilisierung der Moleküle auf dem Substrat gewährleisten, (2) die Stabilität der Proteine auch bei Krafteinwirkung durch die AFM-Spitze sicherstellen. Die Abbildung sollte unter physiologischen Bedingungen erfolgen. Fernziel sollte der Nachweis verschiedener Konformationen bei Variation der O₂-Konzentration sein. Aufgrund von Röntgen-Kleinwinkel-Messungen wurden zwischen der oxy- und der deoxy-Form Verschiebungen der Halbmoleküle um 2 nm gegeneinander erwartet [69]. Diese große Veränderung sollte sich mit dem AFM abbilden lassen (Abb. 7.1).

7.2. Methoden

7.2.1. Immobilisierung

Adsorption

Im einfachsten Fall wurde ein Tropfen Hämocyanin-Lösung ($c = 0,1$ mg/mL, Tris-Puffer, → 3.2.1.) auf das Substrat gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 1 min wurde die Hämocyanin-Lösung entfernt und die Oberfläche mit Tris-Puffer gewaschen. Dieses Verfahren wurde mehrfach variiert.

Gold als Crosslinker

Die kovalente Immobilisierung erfolgte in zwei Teilschritten: zuerst wurde die Oberfläche des Substrates beschichtet, anschließend an diese das Protein gekoppelt. Frisch gespaltener Glimmer wurde bei 650 °C unter N₂-Atmosphäre für 1 min aufgeheizt. Anschließend wurde das Substrat auf einem Drehteller im Vakuum-Verdampfer mit Gold bedampft. Dabei bildeten sich etwa 50 nm dicke Goldschichten, die aber noch amorph und rauh waren. Erneutes Aufheizen bei 650 °C unter N₂-Atmosphäre für 30 s lieferte atomar glatte Au(111)-Terrassen. Auf die beschichteten Glimmer-Plättchen wurde Hämocyanin-Lösung ($c = 0,1$ mg/mL in Borat-Puffer, → 5.2.1.) gegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Hämocyanin-Lösung durch Puffer ausgetauscht.

NHS-Chlor-Silan als Crosslinker

Die Immobilisierung durch NHS-Chlor-Silane wurde in Zusammenarbeit mit Martina Knecht und Oswald Prucker (AG Ruhe, früher MPI für Polymerforschung, Mainz, jetzt Universität Freiburg) durchgeführt. Auch hierbei waren zwei

Teilschritte erforderlich. Das Substrat (Glas oder Si-Wafer, Größe etwa $1 \times 1 \text{ cm}^2$) wurde durch Ultraschall in Ethanol für 10 min gereinigt. Die eigentliche Reaktion fand in Schlenkkolben unter Argon-Atmosphäre statt (Wasser-Ausschluß). Zum Substrat wurden 30 mL wasserfreies Toluol, eine Spatelspitze NHS-Chlor-Silan (Abb. 7.2) und 5 Tropfen wasserfreies Triethylamin gegeben. Die Silanisierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Im Anschluß wurde das Substrat mit Chloroform oder Toluol ab gespült und getrocknet. Die Wafer wurden dann in Hämocyanin-Lösung ($c = 0,1 \text{ mg/mL}$ in Borat-Puffer, \rightarrow 5.2.1.) gegeben und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln für einen Tag inkubiert. Anschließend wurden die mit Protein beladenen Wafer gewaschen. Dies geschah, indem die Wafer in Borat-Puffer bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln für einen Tag inkubiert wurden. Der Puffer wurde dabei mehrfach gewechselt.

spin coating

Zur Immobilisierung durch *spin coating* wurde das Substrat auf einem Drehteller befestigt und auf etwa 3.000 U/min beschleunigt. Anschließend wurde ein Tropfen Hämocyanin-Lösung ($c = 0,1 \text{ mg/mL}$; Borat-Puffer, \rightarrow 5.2.1.) auf das rotierende Substrat gegeben.

7.2.2. Mikroskopie

Atomare Kraft-Mikroskopie

Die Messungen wurden zusammen mit Christian Mähner und Simona Loi (AG Butt, früher Physik. Chemie, Universität Mainz, jetzt Gesamt-Hochschule Siegen) bzw. Volker Scheumann (AG Knoll, MPI für Polymerforschung, Mainz) durchgeführt. Bilder wurden sowohl im Kontakt- als auch im Tapping-Modus mit einem Nanoscope III (Digital Instruments) aufgenommen. Für den Tapping-Modus wurden Spitzen mit einer Resonanzfrequenz von 210 kHz (Silizium, Spitzenradius $\leq 10 \text{ nm}$) verwendet.

Elektronen-Mikroskopie

Die elektronen-mikroskopische Abbildung von Hämocyanin-Molekülen ist in Kapitel 5 beschrieben worden (\rightarrow 5.2.5.).

7.3. Ergebnisse

7.3.1. Messungen in Lösung

Um weitestgehend physiologische Bedingungen zu garantieren, wurden die Messungen zunächst in Lösung durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Immobilisierungsverfahren untersucht.

Adsorption

Das erste der getesteten Immobilisierungsverfahren war die Adsorption (→ 7.2.1.). Die anschließenden AFM-Messungen lieferten Rasterbilder, wie sie Abb. 7.3 zeigt. Der dunkle Untergrund gibt das Substrat wieder. Die hellen Flecken sind Hämocyanin-Moleküle, die an der Oberfläche adsorbierten. Es handelt sich hierbei um die dritte Messung, die an diesem Oberflächen-Areal durchgeführt wurde. Bei den beiden vorigen Messungen hatte die AFM-Spitze die Protein-Moleküle zur Seite geschoben. Die zuvor abgerasterten Areale erscheinen als schwarze Rechtecke. Durch die geringe Haftung der Hämocyanin-Moleküle am Substrat ist die Auflösung sehr schlecht. Es ließen sich weder Größe noch Form der Moleküle ermitteln.

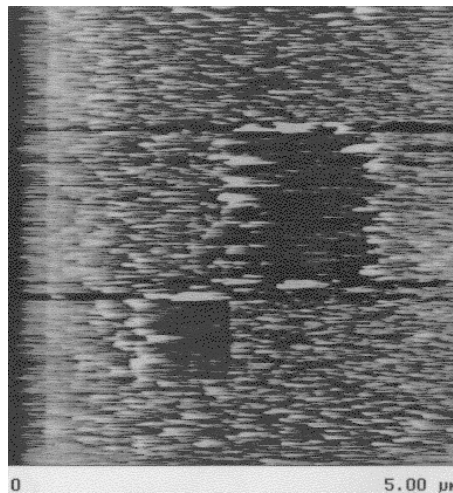


Abb. 7.3: Immobilisierung durch Adsorption

AFM-Abbildung (Kontakt-Modus in Lösung, Topographie, z-Bereich = 5 nm) einer Glimmer-Oberfläche, an die zuvor Hämocyanin adsorbiert wurde ($c(\text{Hc}) = 0,1 \text{ mg/mL}$ in Tris-Puffer, → 3.2.1.). Die Glimmer-Oberfläche ist schwarz dargestellt, das Hämocyanin weiß. Deutlich sind zwei Bereiche zu erkennen, in denen zuvor die Oberfläche abgerastert wurde. Das Protein ist dabei zur Seite geschoben worden.

Um die Haftung der Hämocyanine auf dem Substrat zu verbessern, wurden folgende Parameter der Immobilisierung variiert:

- Die Inkubationsdauer vor dem Waschen wurde in einem Bereich von 1 – 30 min verändert.
- Der pH-Wert wurde variiert: neben Tris-Puffer mit pH = 7,8 wurde auch solcher mit pH = 7,0 verwendet, sowie Borat-Puffer mit pH = 8,5 (→ 5.2.1.) und Acetat-Puffer (c = 50 mM) mit pH = 5,0.
- Die Ionenstärke wurde variiert: zum einen durch Reduzierung der Puffer-Konzentration auf c = 1 mM, zum anderen durch Zugabe von NaCl (c = 1 M).
- Vor Zugabe der Hämocyanin-Lösung wurde die Glimmer-Oberfläche einige Minuten durch Bedeckung mit Lösungen zweiwertiger Kationen umgepolt (50 mM CaCl₂- bzw. MgCl₂-Lösung).
- Als Substrate kamen Glimmer, Graphit und Glas zum Einsatz.
- Es wurden Hämocyanin-Lösungen mit Konzentrationen von c = 0,1 – 6 mg/mL eingesetzt.
- Die adsorbierten Hämocyanine wurden durch Zugabe von 2 % Glutaraldehyd quervernetzt.
- Zu der Hämocyanin-Lösung wurde Trehalose (c = 1,25 %) und Dithiothreitol (c = 0,5 mM) gegeben.

Doch keine der Variationen konnte die Haftung verbessern.

Crosslinking mit Gold

Weiterhin wurde versucht, die Hämocyanin-Moleküle auf mit Au(111) beschichteten Glimmer-Oberflächen kovalent zu immobilisieren (→ 7.2.1.). Abb. 7.4 zeigt ein Ergebnis der durchgeführten AFM-Messungen.

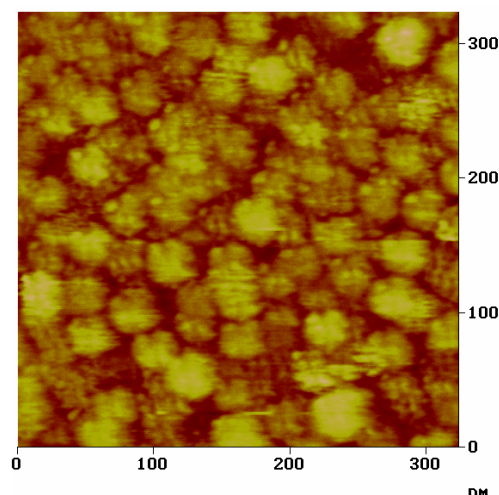


Abb. 7.4: Immobilisierung mit Gold als Crosslinker

Hämocyanine wurden kovalent an eine mit Au(111) beschichtete Glimmer-Oberfläche gebunden (c(Hc) = 0,03 mg/mL in Borat-Puffer, → 5.2.1.). Das AFM-Bild (Tapping-Modus in Lösung, Topographie, z-Bereich = 7,3 nm) zeigt einzelne Hämocyanin-Moleküle, allerdings ohne Feinstruktur und stark deformiert.

Dieses Rasterbild belegt, daß es möglich war, einzelne Hämocyanine mit Gold auf einer Oberfläche zu immobilisieren. Allerdings wiesen die Moleküle gegenüber elektronen-mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 7.7, rechts) starke Deformationen auf: die lateralen Dimensionen waren größer, die Höhe war gering und sie zeigten keine bzw. kaum Feinstruktur.

Crosslinking mit NHS-Chlor-Silan

Als alternatives Verfahren zur kovalenten Immobilisierung mit Gold wurde Crosslinking mit NHS-Chlor-Silanen untersucht (\rightarrow 7.2.1.). Ein typisches Ergebnis der Anheftung an Silizium-Wafer zeigt Abb. 7.5.

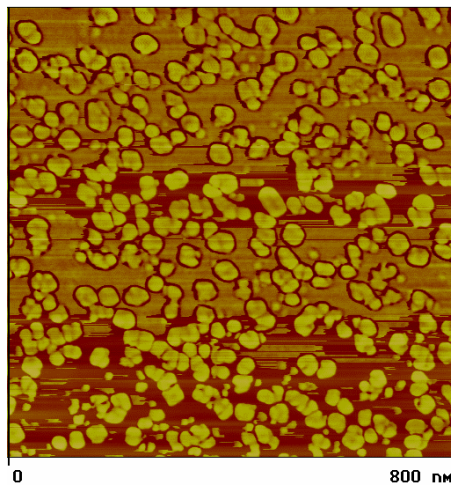


Abb. 7.5: Immobilisierung mit NHS-Chlor-Silan als Crosslinker

Hämocyanine wurden kovalent an einen mit NHS-Silanen beschichteten Si-Wafer gebunden ($c(\text{Hc}) = 0,1 \text{ mg/mL}$ in Borat-Puffer, \rightarrow 5.2.1.). Das AFM-Bild (Tapping-Modus in Lösung, Phasenbild, z-Bereich = 230°) zeigt einzelne Hämocyanin-Moleküle, allerdings ohne Feinstruktur und stark deformiert.

Auch in diesem Fall war es möglich, vereinzelt Hämocyanine auf einer Oberfläche zu immobilisieren. Aber auch hier wiesen die Moleküle starke Deformationen gegenüber den elektronen-mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 7.7, rechts) auf: vergrößerte laterale Dimensionen bei geringerer Höhe und Verlust der Feinstruktur.

7.3.2. Messungen an Luft

Alternativ zu den Messungen in Lösung wurden auch eingetrocknete Proben untersucht. Hierbei wurden zwei verschiedene Immobilisierungsverfahren untersucht.

spin coating

Beim *spin coating* (→ 7.2.1.) trocknet die Probe sehr schnell ein. Ein typisches Ergebnis ist in Abb. 7.6 dargestellt.

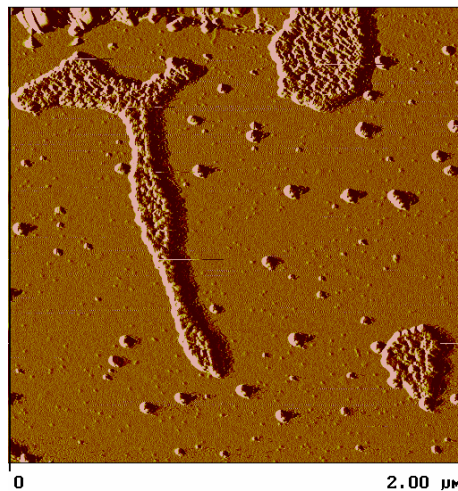


Abb. 7.6: Immobilisierung durch *spin coating*

Es wurde eine Hämocyanin-Lösung mit $c = 0,15 \text{ mg/mL}$ in Borat-Puffer ($\text{pH} = 8,5$) auf Glimmer als Substrat verwendet. Das AFM-Bild (Tapping-Modus an Luft, Amplitudenbild, z-Bereich = $0,274 \text{ nm}$) zeigte unterschiedlich große Inseln, zwischen denen die atomar glatte Glimmer-Oberfläche hervorkam.

Bei diesem Verfahren trat keine homogene Bedeckung der Oberflächen auf: es entstanden große Bereiche, die frei von Protein waren, und daneben Inseln, die aus sehr großen Aggregaten bestanden. Um eine gleichmäßigere Bedeckung der Oberfläche zu erreichen, wurden folgende Parameter variiert:

- Es wurden Hämocyanin-Konzentrationen im Bereich von $c = 0,15 - 3 \text{ mg/mL}$ verwendet.
- Die Puffer-Konzentration wurde im Bereich von $c = 0,1 - 100 \text{ mM}$ variiert.

Jedoch brachte keine der Veränderungen eine Verbesserung der Bilder. In keinem Fall konnten vereinzelte Moleküle oder Monolagen beobachtet werden. Innerhalb der Inseln ließen sich weder einzelnen Hämocyanine noch eine Feinstruktur auflösen.

Adsorption + Trocknung

Oberflächen, an die Hämocyanin-Moleküle adsorbiert waren, wurden mit Puffer gewaschen (\rightarrow 7.2.1.) und anschließend an der Luft getrocknet. Die AFM-Messung einer solchen trockenen Probe ist in Abb. 7.7 (links) zu sehen.

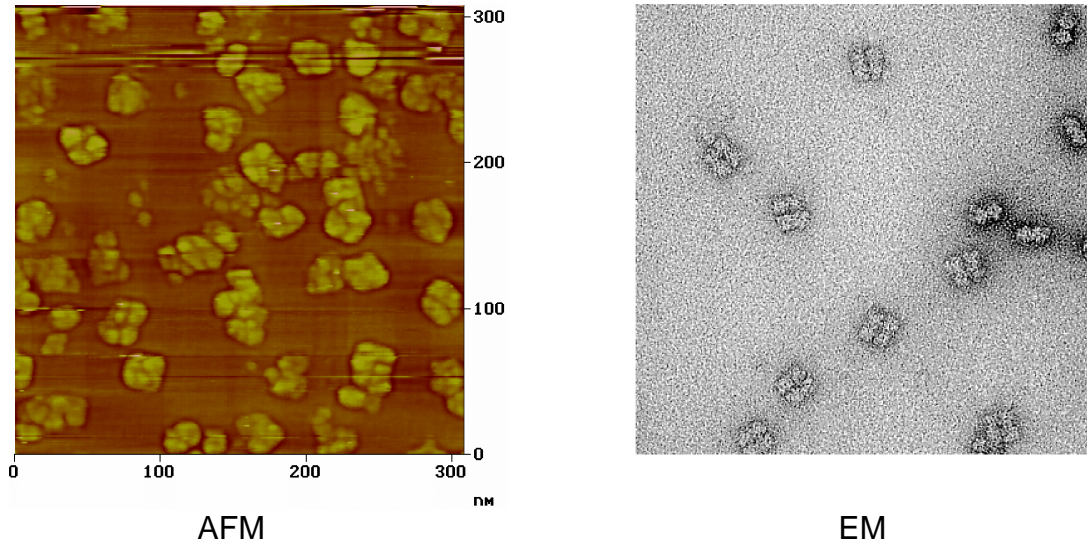


Abb. 7.7: Vergleich von AFM- und EM-Aufnahmen

AFM	Hämocyanin-Moleküle wurden an Glimmer adsorbiert ($c(\text{Hc}) = 0,03 \text{ mg/mL}$ in Borat-Puffer, \rightarrow 5.2.1.), die Oberfläche gewaschen und an der Luft getrocknet. Abbildung mit dem Atomaren Kraft-Mikroskop (Tapping-Modus an Luft, Topographie, z-Bereich = 11,6 nm).
EM	Elektronen-mikroskopische Aufnahme von Hämocyanin-Molekülen, die an einen Kohlefilm adsorbierten. Die Oberfläche wurde gewaschen, mit Uranyl-Acetat negativ gefärbt und in Transmission abgebildet. Es handelt sich um einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 5.10.a.

Die AFM-Aufnahme zeigte einzelne Hämocyanin-Moleküle mit der erwarteten, etwa quadratischen Form. Innerhalb der Moleküle konnte eine Feinstruktur, bestehend aus zwei gekreuzten Furchen, aufgelöst werden. Hierbei handelt es sich um die Grenzen zwischen den Hexameren innerhalb der 4×6 -meren Hämocyanin-Struktur (Abb. 2.6). Der Vergleich mit einer elektronen-mikroskopischen Aufnahme (Abb. 7.7 rechts) zeigt eine gute Übereinstimmung.

7.4. Diskussion

Bei der Raster-Kraft-Mikroskopie von Proteinen müssen diese auf einer Oberfläche immobilisiert werden [64, 170]. Dabei soll die native Struktur soweit wie möglich erhalten bleiben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf prinzipiell verschiedene Varianten der Immobilisierung untersucht. Dabei kamen Oberflächen mit sehr unterschiedlicher Reaktivität zum Einsatz. Die Ergebnisse lassen sich in drei Gruppen einordnen.

7.4.1. Niedrige Reaktivität

Glimmer, Graphit, Si-Wafer und Glas besitzen keine reaktiven Gruppen an ihren Oberflächen. Diese Substrate können daher nur unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen. Die Reaktivität ist niedrig und die Immobilisierung kann lediglich durch Adsorption erfolgen.

Im Falle des 24-meren Vogelspinnen-Hämocyanins ist die Haftung auf dem Substrat, wie Abb. 7.3 zeigt, für Messungen zu gering. Vom biologischen Standpunkt aus erscheint dies plausibel. Hämocyanine liegen frei gelöst in der Hämolymphe vor (\rightarrow 2.2.1.). Sie werden mit dieser durch das gesamte Tier gepumpt und kommen dabei mit verschiedenartigen Geweben und Molekülen in Kontakt. Würden Hämocyanine mit einem dieser Gewebe, Moleküle oder untereinander stärker wechselwirken, käme es zur Aggregation und Verstopfung von Blutgefäßen. Dies hätte den Tod des Tieres zur Folge. In der Hämolymphe gelöste Proteine müssen also von Natur aus darauf optimiert sein, keine oder nur schwache Wechselwirkungen mit anderen Oberflächen einzugehen. Insofern ist es erstaunlich, daß Hämocyanin-Moleküle überhaupt an diverse Oberflächen (Glas, Glimmer, Graphit, Silizium) adsorbieren. Allerdings ist – wie zu erwarten war – die Wechselwirkung mit den Oberflächen nur schwach. Ein ähnliches Verhalten wurde schon früher bei anderen biologischen Proben beobachtet [187, 191, 192].

Glimmer ist bei neutralem pH negativ geladen [187]. Obwohl Hämocyanine ebenfalls negativ geladen sind (iso-elektrischer Punkt $pI = 4,5 - 5,4$), adsorbieren sie an Glimmer [208]. Somit ist die Gesamt-Wechselwirkung zwischen beiden anziehend, wird aber durch die Abstoßung der negativen Ladungen geschwächt [189]. Sollte es gelingen, die elektrostatische Abstoßung zwischen Substrat und Hämocyaninen zu reduzieren, müßte sich die Haftung wesentlich verbessern lassen. Hierzu wurden mehrere Ansätze verfolgt:

- Verringerung der Ladungen
Am iso-elektrischen Punkt pI besitzen Proteine keine Nettoladung. Somit wird eine Annäherung des pH-Wertes an diesen die Nettoladung reduzieren. Ausgehend von $pH = 7,8$ sollte bei Glimmer und Protein eine Erniedrigung des pH-Wertes zu weniger negativen Ladungen führen. Verwendet wurden Puffer bis zu einem pH-Wert von 5,0.

- **Abschirmung**
Durch Zugabe hoher Salzkonzentrationen ergibt sich eine hohe Ionenstärke, die die negativen Ladungen gegeneinander abschirmen sollte [187].
- **Umpolung der Oberflächen-Ladungen**
Glimmer-Oberflächen lassen sich durch Zugabe zweiwertiger Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) umpolen [187]. Bei Benetzung der Oberfläche mit Lösungen dieser Ionen adsorbieren die Kationen an der Oberfläche, so daß sich dort eine positive Nettoladung ausbildet. An diese Schicht sollten die negativ geladenen Proteine leichter und fester binden können.

Aber auch Variationen von pH, Salzgehalt oder Ionen-Zusammensetzung bewirkten keine stärkere Haftung. Dies ist unter physiologischen Gesichtspunkten nicht überraschend: Spinnen sind wechselwarme Tiere, die wachsen, sich häuten, etc.. Dadurch ändern sich die genannten Parameter in Abhängigkeit von Temperatur, Alter, Entwicklungszustand, usw.. Keine dieser Änderungen darf die Blutzirkulation des Tieres beeinträchtigen. D.h., die in der Hämolymphe gelösten Proteine müssen über einen weiten Bereich ihrer Umgebungsbedingungen aggregationsfrei bleiben.

Auch die anderen Variationen (Quervernetzung, Zugabe von Trehalose, Variation des Substrates, der Inkubationsdauer oder der Protein-Konzentration), die durch verschiedene Veröffentlichungen inspiriert wurden, brachten keine Verbesserung [187, 192, 204, 205]. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Haftung der Hämocyanine bei einfacher Adsorption nicht ausreichend ist.

7.4.2. Hohe Reaktivität

Die leichte Verschiebbarkeit der Hämocyanine bei Adsorption machte eine kovalente Immobilisierung erforderlich [187]. Dies geschah einerseits durch Beschichtung des Substrates mit Gold (111), andererseits durch Beschichtung mit NHS-Chlor-Silanen. Diese Crosslinker reagieren spezifisch mit den Thiol- bzw. Aminogruppen von Proteinen. Dadurch wurde die Reaktivität der Oberflächen stark erhöht. Die Bilder von derart immobilisierten Hämocyaninen zeigten immer starke Deformationen an. Die lateralen Dimensionen waren vergrößert, die Höhe war gering und die Oberflächenstruktur verloren gegangen. Hierfür lassen sich zwei mögliche Erklärungen angeben.

Einfluß der Spitze

Die räumliche Ausdehnung der Spitze beeinflusst die von Objekten meßbare Form und Größe (*tip*-Effekt) [187 – 189]. Der Mittelpunkt der Spitze kann zwar von oben in direkten Kontakt mit dem Objekt treten, aber nicht von der Seite. Hier verhindert die Ausdehnung der Spitze, daß sich der Spitzen-Mittelpunkt weiter dem Objekt nähert. In Abb. 7.8 ist die größtmögliche Annäherung der Spitze an die Probe durch eine orange-farbene Kurve dargestellt. Ihr Verlauf hängt im allgemeinen sowohl von der Form der Spitze als auch der des Objektes ab. Bei

den hier durchgeführten Messungen ließen sich mit dem *tip*-Effekt die größeren lateralen Dimensionen erklären, allerdings nicht die geringere Höhe und der Verlust der Feinstruktur. Somit reicht der *tip*-Effekt zur Erklärung der Beobachtungen am Hämocyanin nicht aus.

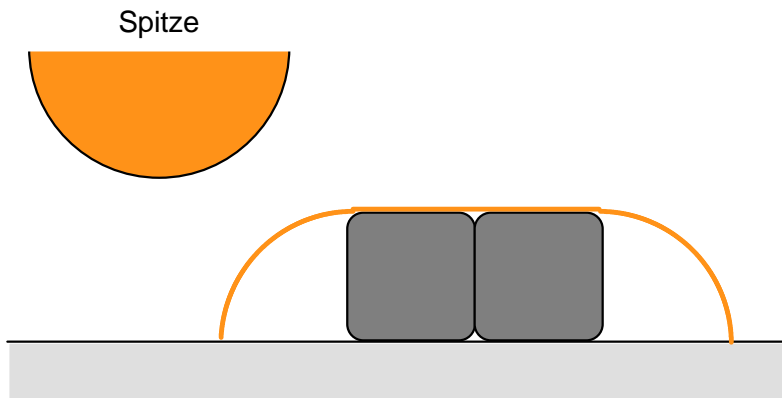


Abb. 7.8: Einfluß der Spitze auf die Abbildung

Aufgrund der räumlichen Ausdehnung der Spitze (orange) werden scharf begrenzte Objekte (grau) größer und weniger scharf abgebildet. Die mit der Spitze meßbare Form ist durch die orange-farbene Kurve dargestellt.

Einfluß der Präparation

Die zweite Erklärungsmöglichkeit beruht auf folgenden drei Fakten: Erstens sind Proteine keine starren Gebilde, sondern fluktuieren: sie führen "Atembewegungen" durch [64, 76, 97]. Zweitens waren die Oberflächen hoch-reaktiv, und drittens ist die Reaktion irreversibel. Als Folge daraus ergab sich, daß jede Strukturänderung des Proteins, die einen potentiellen Reaktionspartner in die Nähe der Oberfläche brachte, kovalent fixiert wurde. Diese Strukturänderung brachte neue Reaktionspartner zur Oberfläche. Dadurch wurde das Protein auseinander gezogen, es „zerfloß“ an der Oberfläche. Dieser Sachverhalt ist schematisch in Abb. 7.9 skizziert.

Im Falle von Gold als Crosslinker könnte noch ein weiterer Punkt hinzukommen: Hämocyanine besitzen, wie die meisten Proteine, relativ wenig freie SH-Gruppen (Cysteine), die zudem fast ausschließlich im Inneren des Proteins liegen (Abb. 5.2 rechts). Dies bedeutet, daß sich nur aufgrund einer größeren Fluktuation eine kovalente Bindung mit der Oberfläche ausbilden kann. Dies könnte ebenfalls ein Grund für die starken Deformationen sein. Im Falle von NHS-Silan spielt dieser Punkt keine Rolle, da Lysin-Seitenketten als Reaktionspartner fungieren. Diese befinden sich in großer Zahl auf der Außenseite der Hämocyanin-Moleküle (Abb. 5.2 links).

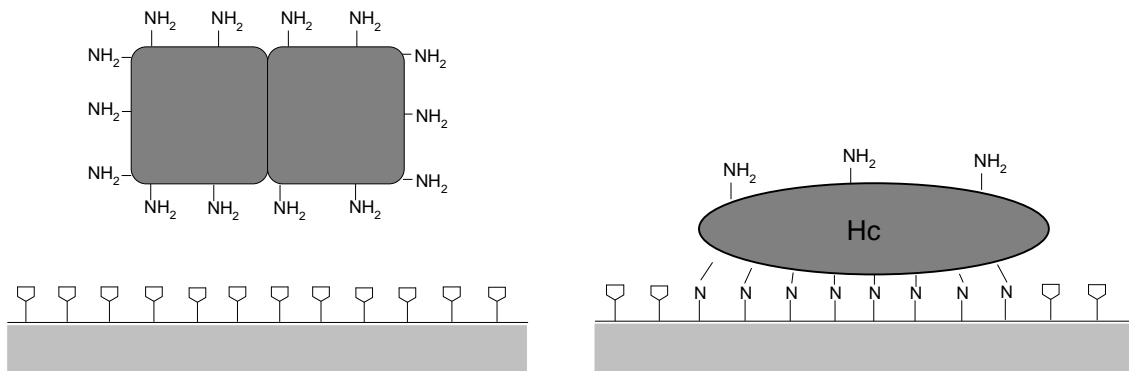


Abb. 7.9: Wirkung hoch-reaktiver Oberflächen auf die Protein-Struktur

- links: Dargestellt ist ein Hämocyanin-Molekül in der Nähe einer mit NHS-Silanen beschichteten Oberfläche. Auf der Außenseite des Proteins befinden sich zahlreiche Aminogruppen, die mit den NHS-Gruppen der Silane reagieren können.
- rechts: Das Hämocyanin-Molekül hat mit den erreichbaren NHS-Gruppen reagiert. Aufgrund der Beweglichkeit des Proteins verbunden mit der hohen Reaktivität der NHS-Gruppen und der Tatsache, daß die Reaktion irreversibel ist, wird das Molekül auseinandergezogen.

7.4.3. Moderate Reaktivität

Bei der Adsorption war die Wechselwirkung zwischen Hämocyaninen und dem Substrat zu schwach, bei der kovalenten Immobilisierung zu stark. Es galt also, einen Kompromiß zwischen den beiden Extremen zu finden. Hierbei blieb zunächst unklar, ob überhaupt ein geeigneter Mittelweg existiert, d.h., ob einerseits die Wechselwirkung mit der Oberfläche stark genug sein kann, daß die Moleküle nicht von der Spitze verschoben werden können, andererseits aber so schwach, daß keine Deformationen auftreten. Als eine Möglichkeit, die Haftung der Hämocyanine zu verbessern, wurde das Eintrocknen der Proben untersucht (→ 7.3.2.). Derartige Bedingungen stellen natürlich keine physiologische Umgebung für Proteine dar. Allerdings konnten Hämocyanine im Hochvakuum durch Elektronen-Mikroskopie sehr gut dargestellt werden, so daß man eine signifikante Beschädigung bzw. Beeinflussung ausschließen kann. Es wurden zwei Methoden getestet.

Zunächst wurde die Immobilisierung mittels *spin coating* durchgeführt. Dieses Verfahren führte jedoch nie zu einer gleichmäßigen Bedeckung der Oberfläche. Es entstanden immer Inseln aus großen Aggregaten ohne Feinstruktur (Abb. 7.6). Es ist daher von einer massiven Störung der Proteinstruktur auszugehen. Beim *spin coating* trocknet die Lösung sehr schnell ein. Möglicherweise verursachte dies die Aggregation. *Spin Coating* erscheint somit für die Immobilisierung von Hämocyaninen ungeeignet.

Alternativ wurde das Wasser einfach durch Verdunstung entfernt. Diese Art der Trocknung ist wesentlich langsamer und schonender als die mechanische

Entfernung durch Rotation. Hiermit ließen sich die besten Ergebnisse erzielen (Abb. 7.7, links): die Größe der Hämocyanine entsprach den Erwartungen (→ 2.2.2.) und die Furchen zwischen den Hexameren ließen sich auflösen. Der Vergleich mit der elektronen-mikroskopischen Aufnahme (Abb. 7.7, rechts) zeigt, daß keine offensichtlichen Deformationen auftraten. Das Ergebnis belegt, daß es einen guten Kompromiß zwischen Haftung und Stabilität der Hämocyanine gibt. Bei den bisher veröffentlichten Protein-Bildern wurde dieses Problem durch 2-dimensionale Monolagen oder Quervernetzung gelöst [187, 191, 192, 194 – 201]. In dieser Arbeit ist es gelungen, einzelne Hämocyanine mit guter Qualität abzubilden (Abb. 7.7, links).

7.4.4. Ausblick

Für AFM-Messungen muß ein Kompromiß bezüglich Haftung und Deformation gefunden werden. Eintrocknen der Protein-Lösung stellt einen solchen Kompromiß dar, schafft aber unphysiologische Bedingungen. Daher sollte in Zukunft nach einer kovalenten Immobilisierung mit moderater Reaktivität gesucht werden, die Messungen in Lösung erlaubt.

Eine Möglichkeit wäre, die Reaktivität der NHS-Silane durch Variation der Kopplungsbedingungen stark zu reduzieren. Dies ließe sich z.B. durch Erniedrigung des pH-Wertes erreichen (→ 5.1.3.). Eine andere Möglichkeit wäre die Zugabe von freiem Lysin, das als kleines Molekül wesentlich schneller mit der Oberfläche reagieren kann. Auf diese Weise sollte sich die Anzahl der reaktiven Silane drastisch reduzieren, wodurch sich ebenfalls Deformationen der Protein-Moleküle verhindern lassen sollten.

8. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* bzgl. Beladung und Konformation charakterisiert. Die Untersuchungen wurden sowohl auf der Ensemble- als auch auf der Einzel-Molekül-Ebene durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den einzelnen Kapiteln bereits ausführlich diskutiert worden. Hier sollen die wichtigsten Punkte in einem Ausblick zusammengefaßt werden.

Beladung

Die O₂-Beladung von Hämocyaninen ist mit einer starken Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz verbunden. Für das 24-mere Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der O₂-Beladung und der Fluoreszenz-Quantenausbeute [42]. Damit stellt die Fluoreszenz-Intensität ein nützliches Werkzeug bei der Analyse von Sauerstoff-Bindungskurven und somit zum Verständnis von Kooperativität dar [19, 20, 44]. In Kapitel 4 konnte durch den Vergleich von theoretischen Betrachtungen mit experimentellen Ergebnissen gezeigt werden, daß die Fluoreszenz-Löschung vollständig durch Förster-Transfer erklärt werden kann. Dabei wird die Energie von den Tryptophanen auf die oxygenierten aktiven Zentren übertragen. Durch das Verständnis des zugrundeliegenden Löschprozesses konnte der Einfluß von Konformation, Tierart und Oligomerisierungsgrad untersucht werden. Der Anwendungsbereich des linearen Signals hat sich dabei in geradezu idealer Weise erweitert. Das Signal ist konformationsunabhängig und damit auch affinitätsunabhängig. Dadurch lassen sich Bindungskurven modellfrei, d.h. frei von Annahmen zum Kooperativitätsmechanismus darstellen. Da kein direkter Einfluß der Oligomerisierung auf die Fluoreszenz-Löschung besteht, lassen sich die Bindungskurven verschiedener Aggregationsstufen eines Hämocyanins direkt miteinander vergleichen. Hinzu kommt, daß die Linearität von O₂-Beladung und Löschung nicht nur für das Hämocyanin der Vogelspinne gültig ist, sondern mit großer Sicherheit auch für alle anderen Arthropoden-Hämocyanine. Für das Hämocyanin der Languste konnte dies erstmals gezeigt werden. Die Ergebnisse rechtfertigen somit im nachhinein Messungen an Hämocyaninen, für die bisher keine Linearität von Fluoreszenz-Löschung und Beladung gezeigt wurde, z.B. das Hämocyanin von *Panulirus interruptus*, dissoziierte Hämocyanine oder isolierte Untereinheiten [82].

Konformation

Bisher wurde bei der Beschreibung von Kooperativität angenommen, daß der Begriff Affinität durch Konformation ersetzt werden darf. Diese Annahme wurde von Monod, Wyman und Changeaux bei der Entwicklung ihres Symmetrie-Modells eingeführt [10]. Es wurde davon ausgegangen, daß verschiedene Affinitäten durch verschiedene Konformationen des aktiven Zentrums realisiert werden. Die Verwendung von Konformation anstelle von Affinität hat seitdem aufgrund ihrer Einfachheit und Anschaulichkeit eine breite Anwendung gefunden [z.B. 13, 14, 20]. Die Ergebnisse aus Kapitel 5 zeigen jedoch, daß diese Vorstellung durch eine neue, dynamischere zu ersetzen ist. Dabei konnten erstmals Hämocyane im oxy- und deoxy-Zustand mit Crosslinkern vollständig fixiert werden. Die fixierten Strukturen zeigten unabhängig vom Ausgangszustand die gleiche, hohe Affinität. Kooperativität bedeutet jedoch eine Änderung der Affinität während der Beladung. Insofern sollten sich die Affinitäten der oxy- und deoxy-Struktur unterscheiden. Offensichtlich handelt es sich bei der Affinität des 24-meren Hämocyanins nicht um eine statische Eigenschaft, sondern wird durch dynamische Prozesse realisiert. Nach einem neuen, hier vorgeschlagenen Modell ist die Affinität des aktiven Zentrums konstant und hoch, wird aber durch die Dynamik der Protein-Matrix moduliert. Durch den Wechsel zwischen verschiedenen Konformationen, die eine gute bzw. schlechte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Sauerstoff besitzen, läßt sich eine niedrige Affinität erzeugen. Das Fixieren der Protein-Struktur verhindert diesen Konformationswechsel, so daß die unmoduliert hohe Affinität des aktiven Zentrums zum Tragen kommt. In dieser dynamischen Vorstellung von Affinität liegt der wichtigste Beitrag dieser Arbeit zum Verständnis von Kooperativität. Diese neue Vorstellung deutet darauf hin, daß bei den bisherigen Versuchen, verschiedene Affinitäten nachzuweisen, die falsche Frage gestellt worden war: nicht verschiedene Konformationen sind zu suchen (statische Vorstellung) sondern verschiedene Dynamiken der Protein-Matrix. Dies könnte erklären, warum es trotz intensiver Forschung in den letzten 30 Jahren nur in wenigen Einzelfällen gelungen war, Konformationsunterschiede bei Hämocyaninen nachzuweisen – und dann meist auch nur indirekt (Tab. 5.1). Insofern ist es nicht überraschend, wenn der Nachweis unterschiedlicher Konformationen auf der Einzel-Molekül-Ebene mittels Atomarer Kraft-Mikroskopie (AFM) für Hämocyane bisher nicht gelang. Fluktuationen der Protein-Matrix spielen sich im ns-Bereich ab [64, 76, 97]. Für die zeitliche Auflösung derartig schneller Prozesse ist das AFM jedoch nicht geeignet [193].

Ensemble und Einzel-Moleküle

Alle Modelle, die Kooperativität beschreiben (→ 2.1.2.), betrachten das Verhalten von Einzel-Molekülen. Die experimentelle Überprüfung erfolgte aber bisher immer am Ensemble. Ensemble-Messungen sind jedoch nicht ausreichend, um zwischen den verschiedenen Modellen unterscheiden zu können. Der Grund liegt darin, daß molekulare Eigenschaften (wie Beladung oder Konformation) im allgemeinen keine scharfen Werte besitzen, sondern im Gegenteil relativ breit verteilt sind. Der Ensemble-Wert repräsentiert lediglich einen Mittelwert. Möchte man die Korrelation zwischen zwei molekularen Eigenschaften verstehen, ist dies

fast unmöglich, wenn man deren Verteilungen nicht kennt. Hierauf zielen die Einzel-Molekül-Experimente, mit deren Hilfe eine größere Anzahl von einzelnen Molekülen bzgl. Beladung und Konformation charakterisiert werden soll. Aus der Gesamtheit der Einzelwerte lassen sich die Verteilungen ermitteln. Somit ist zu erwarten, daß sich letztlich nur auf der Ebene einzelner Moleküle Kooperativität verstehen läßt. Die Ensemble-Messungen sind für Einzel-Molekül-Experimente jedoch eine notwendige Voraussetzung, um Mittelwert zu bestimmen und Artefakt-Messungen zu vermeiden.

Obwohl die Ergebnisse zum Förster-Transfer (Kapitel 4) auf Ensemble-Messungen beruhen, konnten Aussagen zur Beladung auf der Einzel-Molekül-Ebene gemacht werden. Dies war aus drei Gründen möglich: (1) Die Beziehung zwischen Ursache und Ausmaß der Löschung war quantitativ bekannt [55]. (2) Es waren individuelle Donor-Akzeptor-Abstände bekannt. (3) Es konnten definierte Zustände betrachtet werden, die ohne Nebenprodukte auftraten (vollständig oxygeniert bzw. deoxygeniert). Eine entsprechende Ensemble-Analyse des Energie-Transfers (mit individuellen Quantenausbeuten für jedes Tryptophan) scheitert allerdings sobald mehrere Beladungszustände parallel (gleichzeitig) auftreten. Dies ist aber gerade der interessante Bereich, in dem Beladungs- und Konformationsänderungen auftreten. Hier helfen nur Einzel-Molekül-Untersuchungen weiter.

In den hier durchgeführten Einzel-Molekül-Untersuchungen gelang es, einzelne Hämocyane über ihre intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz nachzuweisen (Kapitel 6). Die Fluoreszenz-Intensität pro Molekül war für eine Abbildung jedoch zu gering, dagegen für die Analyse mittels Fluoreszenz-Korrelations-spektroskopie ausreichend. Es gelang aber mit Hilfe der Atomaren Kraft-Mikroskopie, die Struktur einzelner Hämocyanin-Moleküle abzubilden (Kapitel 7). Damit ließen sich Bilder guter Qualität erhalten, bei denen die Hexamere innerhalb der 4x6-meren Struktur aufgelöst werden konnten. In beiden Fällen war es jedoch nicht möglich, Verteilungen von Beladung oder Konformation zu bestimmen. Beladungsverteilungen ließen sich nicht messen, da die Fluoreszenz-Intensität zu gering war und das für die Messung notwendige Anregungslicht die Beladung der Moleküle modifizierte. Die Messung von Konformationsverteilungen dürfte wie oben ausgeführt wurde, aufgrund der fehlenden zeitlichen Auflösung nicht möglich gewesen sein.

Die hier durchgeführten Einzel-Molekül-Untersuchungen sind bisher an noch keinem anderen Atmungsprotein durchgeführt worden. Insbesondere zum Hämoglobin, das als menschliches Protein wegen der medizinischen Relevanz von großem Interesse ist, liegen keine Ergebnisse vor. Der Grund liegt zum einen darin, daß das Hämoglobin ein viel kleineres Molekül ist. Eine direkte Visualisierung ist daher zur Zeit nicht möglich. Zum anderen besitzt das Hämoglobin nur eine Absorptionsbande als intrinsisches Beladungssignal. Prinzipiell ist der Nachweis einzelner Moleküle durch Absorption aber ungleich schwieriger und gelang bisher nur mit synthetischen Chromophoren bei tiefen Temperaturen [209, 210].

9. Literatur

1. van Holde KE
Respiratory proteins of invertebrates: Structure, function and evolution
Zoology 1997, 100(4), 287-297
2. Paul RJ
Rotes, grünes, blaues und rosafarbenes Blut: Funktion von Atmungsproteinen bei wirbellosen Tieren
Biologie in unserer Zeit 1998, 28(5), 304-313
3. Wehner R, Gehring W
Zoologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1990
4. Remane A, Storch V, Welsch U
Kurzes Lehrbuch der Zoologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1989
5. Magnus KA, Ton-That H, Carpenter JE
Recent Structural Work on the Oxygen Transport Protein Hemocyanin
Chem. Rev. 1994, 94(3), 727-735
6. Markl J
Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine
Forschungsmagazin der Johannes Gutenberg Universität 1995
7. Royer WE Jr, Strand K, van Heel M, Hendrickson WA
Structural hierarchy in erythrocrucorin, the giant respiratory assemblage of annelids
Proc Natl Acad Sci 2000, 97(13), 7107-7111
8. Green BN, Kuchumov AR, Walz DA, Moens L, Vinogradov SN.
A hierarchy of disulfide-bonded subunits: the quaternary structure of *Eudistylia* chlorocruorin
Biochemistry 1998, 37(18), 6598-6605
9. Hill AV
The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on the dissociation curves
J. Physiol. (London) 1910, 40, iv-vii
10. Monod J, Wyman J, Changeux JP
On the nature of allosteric transitions: a plausible model
J. Mol. Biol. 1965, 12, 88-118

11. Stryer L
Biochemie
Spektrum-Verlag, Heidelberg 1990
12. Voet D, Voet JG
Biochemie
VCH, Weinheim 1994
13. Henry ER, Jones CM, Hofrichter J, Eaton WA
Can a two-state MWC allosteric model explain hemoglobin kinetics?
Biochemistry 1997, 36(21), 6511-6528
14. Eaton WA, Henry ER, Hofrichter J, Mozzarelli A
Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood ?
Nat Struct Biol 1999, 6(4), 351-357
15. Perutz M
Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins
Cambridge University Press 1989, Cambridge
16. Koshland DE, Némethy G, Filmer D
Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits
Biochemistry 1966, 5(1), 365-385
17. Pauling L
The oxygen equilibrium of hemoglobin and its structural interpretation
Proc Natl Acad Sci 1935, 21, 186-191
18. Decker H, Sterner R
Hierarchies in the structure and function of oxygen-binding proteins
Naturwissenschaften 1990, 77(12), 561-568
19. Decker H, Robert CH, Gill SJ
Nesting – An extension of the allosteric model and its application to tarantula hemocyanin
in Linzen B (Hrsg.): Invertebrate Oxygen Carriers; Springer Verlag, Berlin, 1986, 383-388
20. Robert CH, Decker H, Richey B, Gill SJ, Wyman J
Nesting: hierarchies of allosteric interactions
Proc Natl Acad Sci 1987, 84(7), 1891-1895
21. Markl J, Decker H
Molecular Structure of the Arthropod Hemocyanins
Adv. Comp. Environm. Physiol. 1992, 13, 325-375
22. Salvato B, Beltramini M
Hemocyanins: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site
Life Chem Rep. 1990, 8, 1-47

-
23. van Holde KE, Miller KI
Hemocyanins
Adv Protein Chem 1995, 47, 1-81
 24. Blackburn NJ, Pettingill TM, Seagraves KS, Shigeta RT
Characterization of a carbon monoxide complex of reduced dopamine beta-hydroxylase. Evidence for inequivalence of the Cu(I) centers.
J Biol Chem. 1990, 265(26), 15383-15386
 25. Hirota S, Matsumoto H, Huang HW, Sakurai T, Kitagawa T, Yamauchi O
Observation of Cu-N3- stretching and N3- asymmetric stretching bands for monoazide adduct of *Rhus vernicifera* laccase.
Biochem Biophys Res Commun. 1998, 243(2), 435-437
 26. Gaykema WPJ, Hol WGJ, Vereijken JM, Soeter NM, Bak HJ, Beintema JJ
3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin
Nature 1984, 309(5963), 23-29
 27. Hazes B, Magnus KA, Bonaventura C, Bonaventura J, Dauter Z, Kalk KH, Hol WGJ
Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation.
Protein Sci. 1993, 2(4), 597-619
 28. Volbeda A, Hol WG
Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution.
J. Mol. Biol. 1989, 209(2), 249-279
 29. Magnus KA, Hazes B, Ton-That H, Bonaventura C, Bonaventura J, Hol WG
Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences.
Proteins 1994, 19(4), 302-309
 30. Baldwin MJ, Root DE, Pate JE, Fujisawa K, Kitajima N, Solomon EI
Spectroscopic Studies of a Side-on Peroxide-Bridged Binuclear Copper(II) Model Complex of Relevance to the Active Sites in Oxyhemocyanin and Oxytyrosinase
J. Am. Chem. Soc. 1992, 114(26), 10421-10431
 31. Kitajima N, Fujisawa K, Moro-oka Y
 μ - η^2 : η^2 -Peroxo Binuclear Copper Complex, $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)]_2(\text{O}_2)$
J. Am. Chem. Soc. 1989, 111(24), 8975-8976
 32. Kitajima N, Fujisawa K, Fujimoto C, Moro-oka Y, Hashimoto S, Kitagawa T, Toriumi K, Tatsumi K, Nakamura A
A New Model for Dioxygen Binding in Hemocyanin: Synthesis, Characterization, and Molecular Structure of the μ - η^2 : η^2 -Peroxo Dinuclear Copper(II) Complexes $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-R}_2\text{pz})_3)]_2(\text{O}_2)$ (R= i-Pr and Ph).
J. Am. Chem. Soc. 1992, 114(4), 1277-1291

33. Salvato B, Beltramini M
Hemocyanins: Molecular Structure and Reactivity of the Binuclear Copper Site
Life Chemistry Reports 1987, 5, 249-275
34. Savel-Niemann A, Markl J, Linzen B
Hemocyanins in spiders. XXII. Range of allosteric interaction in a four-hexamer hemocyanin. Co-operativity and Bohr effect in dissociation intermediates.
J Mol Biol 1988, 204(2), 385-395
35. Decker H, Sterner R
Nested allostery of arthropodan hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*). The role of protons.
J Mol Biol 1990, 211(1), 281-293
36. Decker H
Nested allostery in scorpion hemocyanin (*Pandinus imperator*)
Biophys Chem 1990, 37(1-3), 257-263
37. Decker H
Nested Allostery of Arthropod Hemocyanins
aus: Vinogradov SN / Kapp OH: Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers; Springer-Verlag 1991, New York
38. Decker H, Connelly PR, Robert CH, Gill SJ
Nested allosteric interaction in tarantula hemocyanin revealed through the binding of oxygen and carbon monoxide.
Biochemistry 1988, 27(18), 6901-6908
39. Dainese E, Di Muro P, Beltramini M, Salvato B and Decker H
Subunits composition and allosteric control in *Carcinus aestuarii* hemocyanin
Eur J Biochem. 1998, 256(2), 350-358
40. Voit R, Feldmaier-Fuchs G, Schweikardt T, Decker H, Burmester T
Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. Structure and intramolecular evolution of the subunits
J Biol Chem. 2000, 275(50), 39339-39344
41. Markl J, Kempfer B, Linzen B, Bijholt MMC, van Bruggen EFJ
Hemocyanins in spiders, XVI[1]. Subunit topography and a model of the quaternary structure of *Eurypelma* hemocyanin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1981, 362(12), 1631-1641
42. Loewe R
Hemocyanins in Spiders V: Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin
J. comp. Physiol. 1978, 128, 161-168
43. Markl B
Einflüsse von Alterung, EDTA, EGTA, Calcium und Magnesium auf die Sauerstoffbindung des Hämocyanins der Vogelspinne
Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1987

-
44. Decker H, Niemann A
Oxygen-Binding Behavior of the Hemocyanin of the tarantula, *Eurypelma californicum*, in the pH Range from 4,0 to 9,0
aus: Préaux G, Lontie R (editors): Invertebrate Dioxygen Carriers, Leuven University Press, 1990, 393-395
 45. Makino N
An oxygenation-linked dye binding to *Limulus polyphemus* hemocyanin.
Eur J Biochem 1985, 146(3), 563-569
 46. van Driel R, van Bruggen EFJ
Functional Properties of Chemically Modified Hemocyanin. Fixation of Hemocyanin in the Low and the High Oxygen Affinity State by Reaction with a Bifunctional Imido Ester
Biochemistry 1975, 14(4), 730-735
 47. Hübler R
Charakterisierung und Stabilität von Arthropoden-Hämocyanin
Dissertation, Universität Mainz, 2001
 48. van Heel M, Dube P
Quaternary structure of multihexameric arthropod hemocyanins
Micron 1994, 25(4), 387-418
 49. Sterner R, Vogl T, Hinz HJ, Penz F, Hoff R, Föll R, Decker H
Extreme thermostability of tarantula hemocyanin.
FEBS Lett 1995, 364(1), 9-12
 50. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T
How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein
Protein Sci. 1995, 4(11), 2411-2423
 51. Ricchelli F, Beltramini M, Flamigni L, Salvato B
Emission Quenching Mechanisms in *Octopus vulgaris* Hemocyanin: Steady State and Time-Resolved Fluorescence Studies
Biochemistry 1987, 26(22), 6933-6939
 52. Richey B, Decker H, Gill SJ
Binding of oxygen and carbon monoxide to arthropod hemocyanin: an allosteric analysis.
Biochemistry 1985, 24(1), 109-117
 53. Richey B
The Binding of Oxygen and Carbon Monoxide to Arthropod Hemocyanin: An Allosteric Analysis
Dissertation, Universität von Colorado, 1984
 54. Shaklai N, Daniel E
Fluorescence properties of hemocyanin from *Levantina hierosolima*.
Biochemistry 1970, 9(3), 564-568

55. Förster T
Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz
Ann. Phys 1948, 2(6), 55-75
56. Stryer L
Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler
Ann. Rev. Biochem, 1978, 47, 819-846
57. Dos Remedios CG, Moens PDJ
Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor
J Struct Biol. 1995, 115(2), 175-185
58. Fairclough RH, Cantor CR
The Use of Singlet-Singlet Energy Transfer to Study Macromolecular Assemblies
Methods Enzymol. 1978, 48, 347-379
59. Van Der Meer BW, Coker G, Chen SYS
Resonance Energy Transfer
VCH New York, 1994
60. Förster T
Energiewanderung und Fluoreszenz
Die Naturwissenschaften 1946, 6, 166-175
61. Lakowicz JR
Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2. Auflage
Kluwer Academic / Plenum Publisher 1999, New York
62. Haugland R
Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals
Molecular Probes, 6. Edition, 1996
63. Holtzhauer M
Methoden in der Proteinanalytik
Springer-Verlag 1996, Berlin Heidelberg
64. Winter R, Noll F
Methoden der Biophysikalischen Chemie
Teubner Studienbücher Chemie, B. G. Teubner Stuttgart 1998
65. Stryer L, Thomas DD, Meares CF
Diffusion-enhanced fluorescence energy transfer
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1982, 11, 203-222
66. Maksimov MZ, Rosman IM
Zur Energie-Übertragung in fixierten Lösungen (russisch)
Optische Spektroskopie 1962, 12, 606-609

-
67. Steinberg IZ
Nonradiative energy transfer in systems in which rotatory brownian motion is frozen
J. Chem. Phys. 1967, 48(6), 2411-2413
 68. Chen RF
Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine
Anal. Lett 1967, 1(1), 35-42
 69. Decker H, Hartmann H, Sterner R, Schwarz E, Pilz I
Small-angle X-ray scattering reveals differences between the quaternary structures of oxygenated and deoxygenated tarantula hemocyanin.
FEBS Lett 1996, 393(2-3), 226-230
 70. de Haas F, van Bruggen EF
The interhexameric contacts in the four-hexameric hemocyanin from the tarantula *Eurypelma californicum*. A tentative mechanism for cooperative behavior.
J Mol Biol 1994, 237(4), 464-478
 71. Galla HJ
Spektroskopische Methoden in der Biophysik
Thieme Verlag Stuttgart, 1988
 72. Dewey TG, Hammes GG
Calculation of Fluorescence Resonance Energy Transfer on Surfaces
Biophys. J. 1980, 32(3), 1023-1036
 73. Kuchling H
Taschenbuch der Physik
Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt/Main 1986
 74. Boteva R, Ricchelli F, Sartor G, Decker H
Fluorescence properties of hamocyanin from tarantula (*Eurypelma californicum*): a comparison between the whole molecule and isolated subunits
J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1993, 17, 145-153
 75. Haas E, Katchalski-Katzir E, Steinberg IZ
Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization
Biochemistry 1978, 17(23), 5064-5070
 76. Lakowicz JR, Maliwal BP, Cherek H, Balter A
Rotational freedom of tryptophan residues in proteins and peptides
Biochemistry 1983, 22(8), 1741-1752
 77. Lustig A, Sterner R, Decker H
Detection of conformational differences between oxy- and deoxygenated tarantula haemocyanin using difference sedimentation ultracentrifugation
EXPLORATION (Techniques and answers for solution interaction analysis on the Optima XL-A), 1994, 1:4

78. Leidescher T, Decker H
Conformational changes of tarantula (*Eurypelma californicum*) haemocyanin detected with a fluorescent probe, 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.
Eur J Biochem 1990, 187(3), 617-625
79. Leidescher T
Hämocyanin als allosterisches Protein: Nachweis von Konformationsänderungen mittels fluoreszierender Sonden
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1987
80. Brouwer M, Bonaventura C, Bonaventura J
Effect of oxygen and allosteric effects on structural stability of oligomeric hemocyanins of the arthropod, *Limulus polyphemus*, and the mollusc, *Helix pomatia*
Biochemistry 1981, 20(7), 1842-1848
81. Hartmann H, Lohkamp B, Hellmann N, Decker H
The allosteric effector l-lactate induces a conformational change of 2x6-meric lobster hemocyanin in the oxy state as revealed by small angle x-ray scattering
J Biol Chem. 2001, 276(23), 19954-19958
82. Perton FG, Beintema JJ, Decker H
Influence of antibody binding on oxygen binding behavior of *Panulirus interruptus* hemocyanin.
FEBS Lett 1997, 408(2), 124-126
83. Makino N
The oxygenation-linked binding of neutral red to spiny lobster hemocyanin. A structural study of the partially oxygenated protein.
Eur J Biochem. 1987, 163(1), 35-41
84. Sterner R, Decker H
Inversion of the Bohr effect upon oxygen binding to 24-meric tarantula hemocyanin.
Proc Natl Acad Sci 1994, 91(11), 4835-4839
85. Handzettel der Crosslinker
Pierce Chemical Company 1998
86. Pierce Katalog 2001-2002
Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
87. Double-Agents: Cross-Linking Reagents, Selection Guide
Pierce Chemical Company 1998
88. Decker H
Zur Quartärstruktur und Sauerstoffbindung beim Hämocyanin aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1981

-
89. Wäber M
Untersuchungen zu den Konformationsübergängen des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*
Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1990
90. Verschueren LJ, Gielens C, Lontie R
Stabilization of whole molecules of gastropodan haemocyanins by chlorhexidine.
Int J Pept Protein Res 1980, 16(2), 130-134
91. Santagostini L, Gullotti M, Monzani E, Casella L, Dillinger R, Tucek F
Reversible Dioxygen Binding and Phenol Oxygenation in a Tyrosinase Model System
Chem. Eur. J. 2000, 6(1), 2-5
92. Dillinger R
Raman Spectroscopic Investigations on Type3 Copper Proteins and Model Complexes
Dissertation, Universität Mainz, 2000, Cuviller Verlag, Göttingen
93. Harris JR
Negative Staining of Thinly Spread Biological Particulates
Methods Mol Biol 1999, 117, 13-30
94. Hübler R, Fertl B, Hellmann N, Decker H
On the stability of the 24-meric hemocyanin from *Eurypelma californicum*
Biochim Biophys Acta. 1998, 1383(2), 327-339
95. Ling J, Nestor LP, Czernuszewicz RS, Spiro TG, Fraczkiewicz R, Sharma KD, Loehr TM, Sanders-Loehr J
Common oxygen binding site in hemocyanins from arthropods and mollusks. Evidence from Raman spectroscopy and normal coordinate analysis
J. Am. Chem. Soc. 1994, 116(17), 7682-7691
96. Floyd JS, Haralampus-Grynaviski N, Ye T, Zheng B, Simon JD, Edington MD
Time-resolved spectroscopic studies of radiationless decay processes in photoexcited hemocyanins
J Phys Chem B 2001, 105(7), 1478-1483
97. Lakowicz JR, Weber G
Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond timescale.
Biochemistry 1973, 12(21), 4171-4179
98. Coletta M, Zolla L, Decker H, Brunori M
Kinetic control of cooperativity for oxygen binding to arthropodan and molluscan hemocyanins
aus: Préaux G, Lontie R (editors): Invertebrate Dioxygen Carriers, Leuven University Press, 1990, 387-391
99. Kluger R, Lock-O'Brien J, Teytelboym A
Connecting Proteins by Design. Cross-Linked Bis-Hemoglobin
J. Am. Chem. Soc. 1999, 121(29), 6780-6785

100. Zhang Q, Olsen KW
The modification of hemoglobin by a long crosslinking reagent: bis(3,5-dibromosalicyl) sebacate
Biochem Biophys Res Commun. 1994, 203(3), 1463-1467
101. Keipert PE, Chang TM
Pyridoxylated-polyhemoglobin solution: a low viscosity oxygen-delivering blood replacement fluid with normal oncotic pressure and long-term storage feasibility
Biomater Artif Cells Artif Organs. 1988, 16(1-3), 185-96
102. Benesch RE, Kwong S
Hemoglobin tetramers stabilized by a single intramolecular cross-link
J Protein Chem. 1991, 10(5), 503-510
103. Zhao M, Jiang J, Greene M, Andracki ME, Fowler SA, Walder JA, Ferrone FA
Allosteric kinetics and equilibria of triligated, cross-linked hemoglobin
Biophys J. 1993, 64(5), 1520-1532
104. Chatterjee R, Welty EV, Walder RY, Pruitt SL, Rogers PH, Arnone A, Walder JA
Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative cross-linked between the alpha chains (lysine 99 alpha 1----lysine 99 alpha 2)
J Biol Chem. 1986, 261(21), 9929-9937
105. Jones RT, Shih DT, Fujita TS, Song Y, Xiao H, Head C, Kluger R
A doubly cross-linked human hemoglobin. Effects of cross-links between different subunits
J Biol Chem. 1996, 271(2), 675-680
106. Peri SP, Bhadti VS, Hosmane RS, Macdonald VW
Bis[2-(4-carboxyphenoxy)carbonylethyl]phosphinic acid (BCCEP): a new reagent or hemoglobin modification
Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 1997, 25(6), 511-520
107. van der Plas J, de Vries-Van Rossen A, Koorevaar JJ, Buursma A, Zijlstra WG, Bakker JC
Purification and physical characteristics of a hemoglobin solution modified by coupling to 2-nor-2-formylpyridoxal 5'-phosphate (NFPLP)
Transfusion 1988, 28(6), 525-530
108. Hosmane RS, Peri SP, Bhadti VS, Macdonald VW
Bis[2-(4-carboxyphenoxy)carbonylethyl]phosphinic Acid (BCCEP): A Novel Affinity Reagent for the β -Cleft Modification of Human Hemoglobin
Bioorg Med Chem. 1998, 6(6), 767-783
109. Austin RH, Beeson KW, Eisenstein L, Frauenfelder H, Gunsalus IC
Dynamics of ligand binding to myoglobin.
Biochemistry 1975, 14(24), 5355-5373
110. Frauenfelder H, McMahon BH, Austin RH, Chu K, Groves JT
The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin.
Proc Natl Acad Sci 2001, 98(5), 2370-2374

-
111. Rotman B
Measurement of activity of single molecules of β -D-galactosidase
Proc Natl Acad Sci 1961, 47, 1981-1991
 112. Xue Q, Yeung ES
Differences in the chemical reactivity of individual molecules of an enzyme
Nature 1995, 373(6516), 681-683
 113. Uhl G, Pilarczyk G, Greulich KO
Fluorescence Microscopic Observation of Catalysis by Single or Few LDH-1
Enzyme Molecules
Biol. Chem. 1998, 379(8-9), 1175-1180
 114. Schafer B, Nasanshargal B, Monajembashi S, Gemeinhardt H, Greulich KO, Uhl V
Study of single-molecule dynamics and reactions with classic light microscopy
Cytometry 1999, 36(3), 209-216
 115. Tan W, Yeung ES
Monitoring the reactions of single enzyme molecules and single metal ions
Anal. Chem. 1997, 69, 4242-4248
 116. Craig DB, Arriaga EA, Wong JCY, Lu H, Dovichi NJ
Life and Death of a Single Enzyme Molecule
Analytical Chemistry News & Features 1998, 39A-43A
 117. Craig DB, Arriaga EA, Wong JCY, Lu H, Dovichi NJ
Studies on single alkaline phosphatase molecules: reaction rate and activation
energy of a reaction catalyzed by a single molecule and the effect of thermal
denaturation – the death of an enzyme
J Am Chem Soc 1996, 118(22), 5245-5253
 118. Peck K, Stryer L, Glazer AN, Mathies RA
Single-molecule fluorescence detection: autocorrelation criterion and
experimental realization with phycoerythrin
Proc. Natl. Acad. Sci 1989, 86(11), 4087-4091
 119. Jung G, Wiehler J, Göhde W, Tittel J, Basché T, Steipe B, Bräuchle C
Confocal microscopy of single molecules of the Green Fluorescent Protein
Bioimaging 1998, 6(1), 54-61
 120. Dickson RM, Cubitt AB, Tsien RY, Moerner WE
On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent
protein
Nature 1997, 388(6640), 355-358
 121. van Oijen AM, Ketelaars M, Kohler J, Aartsma TJ, Schmidt J
Spectroscopy of Individual Light-Harvesting 2 Complexes of *Rhodospseudomonas
acidophila*: Diagonal Disorder, Intercomplex Heterogeneity, Spectral Diffusion,
and Energy Transfer in the B800 Band
Biophys J. 2000, 78(3), 1570-1577

122. Lu HP, Xun L, Xie XS
Single-Molecule Enzymatic Dynamics
Science 1998, 282(5395), 1877-1882
123. Dickson RM, Norris DJ, Tzeng YL, Moerner WE
Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels
Science 1996, 274(5289), 966-969
124. Funatsu T, Harada Y, Higuchi H, Tokunaga M, Saito K, Ishii Y, Vale RD, Yanagida T
Imaging and nano-manipulation of single biomolecules
Biophys Chem. 1997, 68(1-3), 63-72
125. Harada Y, Sakurada K, Aoki T, Thomas DD, Yanagida T
Mechanochemical Coupling in Actomyosin Energy Transduction Studied by in Vitro Movement Assay
J. Mol. Biol. 1990, 216, 49-68
126. Vale RD, Funatsu T, Pierce DW, Romberg L, Harada Y, Yanagida T
Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules
Nature 1996, 380(6573), 451-453
127. Ha T, Ting AY, Liang J, Caldwell WB, Deniz AA, Chemla DS, Schultz PG, Weiss S
Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism
Proc Natl Acad Sci 1999, 96(3), 893-898
128. Kirsch AK, Subramaniam V, Striker G, Schnetter C, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM
Continuous wave two-photon scanning near-field optical microscopy.
Biophys J. 1998, 75(3), 1513-1521
129. Williams RM, Piston DW, Webb WW
Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry.
FASEB J. 1994, 8(11), 804-813
130. Denk W, Strickler JH, Webb WW
Two-photon laser scanning fluorescence microscopy
Science 1990, 248(4951), 73-76
131. Göppert-Mayer M
Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen
Ann. Phys. 1931, 9, 273-295
132. Callis PR
1La and 1Lb transitions of tryptophan: applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins.
Methods Enzymol. 1997, 278, 113-150

-
133. Mertz J, Xu C, Webb WW
Single-molecule detection by two-photon-excited fluorescence
Opt Lett 1995, 20(24), 2532-2534
134. Demtröder W
Laserspektroskopie
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 3. Auflage, 1993
135. Haken H, Wolf HC
Molekülphysik und Quantenchemie
Springer 1994, Berlin, Heidelberg
136. Xu C, Shear JB, Webb WW
Hyper-Rayleigh and hyper-Raman scattering background of liquid water in two-photon excited fluorescence detection.
Anal Chem. 1997, 69(7), 1285-1287
137. Plakhotnik T, Walser D, Pirotta M, Renn A, Wild UP
Nonlinear Spectroscopy on a Single Quantum System: Two-Photon Absorption of a Single Molecule
Science 1996, 271(5256), 1703-1705
138. Brand L, Eggeling C, Zander C, Drexhage KH, Seidel CAM
Single-molecule identification of coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection: comparison of one- and two-photon excitation in solution
J. Phys. Chem A 1997, 101(24), 4313-4321
139. Haken H, Wolf HC
Atom- und Quantenphysik
Springer 1990, Berlin, Heidelberg
140. Rehms AA, Callis PR
Two-photon fluorescence excitation spectra of aromatic amino acids
Chem Phys Letters 1993, 208(3-4), 276-282
141. Xu YW, Zhang JR, Deng YM, Hui LK, Jiang SP, Lian SH
Fluorescence of proteins induced by two-photon absorption
J Photochem Photobiol B. 1987, 1(2), 223-227
142. Kierdaszuk B, Gryczynski I, Modrak-Wojcik A, Bzowska A, Shugar D, Lakowicz JR
Fluorescence of Tyrosine and Tryptophan in Proteins using One- and Two-Photon-Excitation
Photochem Photobiol 1995, 61(4), 319-324
143. Callis PR
Molecular orbital theory of the 1L_b and 1L_a states of indole
J. Chem. Phys. 1991, 95(6), 4230-4240
144. Zhang JR, Xu YW, Deng YM, Wu CK, Jiang SP, Lian SH
Laser-induced multiphoton fluorescence of hemoglobin
J Photochem Photobiol B 1988, 1(3), 329-335

145. Lakowicz JR, Gryczynski I
Tryptophan fluorescence intensity and anisotropy decays of human serum albumin resulting from one-photon and two-photon excitation
Biophys Chem. 1992, 45(1), 1-6
146. Meshalkin IP, Groshev DE, Makukha VK, Gus'kov LN, Lisitsyn VN
Dual-photon excitation of albumin
Biofizika 1990, 35(5), 739-741
147. Lakowicz JR, Kierdaszuk B, Gryczynski I, Malak H
Fluorescence of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase Using One- and Two-Photon Excitation
J. Fluoresc. 1996, 6(1), 51-59
148. Gryczynski I, Malak H, Lakowicz JR, Cheung HC, Robinson J, Umeda PK
Fluorescence spectral properties of troponin C mutant F22W with one-, two-, and three-photon excitation
Biophys J. 1996, 71(6), 3448-3453
149. Thompson NL
Fluorescence correlation spectroscopy: new methods and applications in Lakowicz JR (editor): Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 1: techniques
Plenum press 1991, New York, 337-378
150. Schwille P, Haupts U, Maiti S, Webb WW
Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation
Biophys J. 1999, 77(4), 2251-65
151. Rigler R, Mets Ü, Wildgren J, Kask P
Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion
Eur Biophys J 1993, 22, 169-175
152. Berland KM, So PT, Gratton E
Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment
Biophys J. 1995, 68(2), 694-701
153. Trautman JK, Ambrose WP
Near-field Optical Imaging and Spectroscopy of Single Molecules
aus: Basché T, Moerner WE, Orrit M, Wild UP: Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy; VCH New York, 1996
154. Chiu DT, Zare RN
Optical Detection and Manipulation of Single Molecules in Room-Temperature Solutions
Chem. Eur. J. 1997, 3(3), 335-339
155. Keller RA, Ambrose WP, Goodwin PM, Jett JH, Martin JC, Wu M
Single-Molecule Fluorescence Analysis in Solution
Appl. Spectr. 1996, 50(7), 12A-32A

-
156. Perkins TT, Quake SR, Smith DE, Chu S
Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy
Science 1994, 264(5160), 822-826
 157. Perkins TT, Smith DE, Chu S
Direct observation of tube-like motion of a single polymer chain
Science 1994, 264(5160), 819-822
 158. Kishino A, Yanagida T
Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles
Nature 1988, 334(6177), 74-76
 159. Chiu DT, Zare RN
Biased Diffusion, Optical Trapping, and Manipulation of Single Molecules in Solution
J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 6512-6513
 160. Lakowicz JR, Weber G
Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules.
Biochemistry 1973, 12(21), 4161-4170
 161. Vaughan WM, Weber G
Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water. A dynamic probe of the microenvironment.
Biochemistry 1970, 9(3), 464-473
 162. Dose K, Risi S
The Action of U.V. Light of various Wavelengths on Papain
Photochem Photobiol. 1972, 15(1), 43-50
 163. Vanhooren A, Vanhee K, Hanssens I
Photo-excitation of tryptophan in goat α -lactalbumin induces rupture of disulfide bridges and causes a conformational change
Protein Sci 2001, 10, suppl. 1, 132
 164. Dose K
The Photolysis of free Cysteine in the Presence of aromatic Amino Acids
Photochem Photobiol. 1968, 8, 331-335
 165. Prompers JJ, Hilbers CW, Pepermans HA
Tryptophan mediated photoreduction of disulfide bond causes unusual fluorescence behaviour of *Fusarium solani pisi* cutinase.
FEBS Lett. 1999, 456(3), 409-416
 166. Sommers PB, Kronman MJ
Comparative fluorescence properties of bovine, goat, human and guinea pig alpha lactalbumin. Characterization of the environments of individual tryptophan residues in partially folded conformers.
Biophys Chem. 1980, 11(2), 217-232

167. Bent DV, Hayon E
Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan.
J Am Chem Soc. 1975, 97(10), 2612-2619
168. Brakenhoff GJ, Müller M, Ghauharali RI
Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects
J. of Microscopy 1996, 183(Pt2), 140-144
169. Kurzban GP, Gitlin G, Bayer EA, Wilchek M, Horowitz PM
Shielding of Tryptophan Residues of Avidin by the Binding of Biotin
Biochemistry 1989, 28(21), 8537-8542
170. Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.)
Bioanalytik
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin, 1998
171. Green NM
Avidin: 5. Quenching of fluorescence by dinitrophenyl groups
Biochem. J. 1964, 90, 564-568
172. Kulzer F, Koberling F, Christ T, Mews A, Basché T
Terrylene in p-terphenyl: single-molecule experiments at room temperature
Chem Phys 1999, 247(1), 23-34
173. Mertz J
Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy
Eur. Phys. J. D 1998, 3(1), 53-66
174. Xu C, Webb WW
Multiphoton excitation of molecular fluorophores and nonlinear laser microscopy in Lakowicz JR (editor): Topics in fluorescence spectroscopy, Vol. 5: nonlinear and two-photon induced fluorescence
Plenum Press 1997, New York, 471-540
175. Xu C, Zipfel W, Shear JB, Williams RM, Webb WW
Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy
Proc Natl Acad Sci 1996, 93(20), 10763-10768
176. Gradinaru CC, Kennis JT, Papagiannakis E, van Stokkum IH, Cogdell RJ, Fleming GR, Niederman RA, van Grondelle R
An unusual pathway of excitation energy deactivation in carotenoids: Singlet-to-triplet conversion on an ultrafast timescale in a photosynthetic antenna.
Proc Natl Acad Sci 2001, 98(5), 2364-2369
177. Gilmore AM
Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves
Physiologia Plantarum 1997, 99, 197-209

-
178. Li XP, Bjorkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK
A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting
Nature 2000, 403(6768), 391-395
 179. Demmig-Adams B, Gilmore AM, Adams WW 3rd
Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants
FASEB J. 1996, 10(4), 403-412
 180. Koyama Y
Structures and functions of carotenoids in photosynthetic systems
J Photochem Photobiol B: Biol. 1991, 9, 265-280
 181. Schmidt W
Optische Spektroskopie
VCH Weinheim, 1994
 182. Cantor CR, Schimmel PR
Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function
Freeman and Company 1980, New York
 183. Markl J, Decker H, Linzen B, Schutter WG, von Bruggen EF
Hemocyanins in spiders, XV. The role of the individual subunits in the assembly of *Eurypelma* hemocyanin.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1982, 363(1), 73-87
 184. Chen Y, Müller JD, So PTC, Gratton E
The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy
Biophys. J 1999, 77(1), 553-567
 185. Kask P, Palo K, Ullmann D, Gall K
Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology
Proc Natl Acad Sci 1999, 96(24), 13756-13761
 186. Müller JD, Chen Y, Gratton E
Resolving heterogeneity on the single molecular level with the photon-counting histogram
Biophys J. 2000, 78(1), 474-486
 187. Wagner P
Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy
FEBS Lett. 1998, 430(1-2), 112-115
 188. Bustamante C, Rivetti C, Keller DJ
Scanning force microscopy under aqueous solutions
Curr Opin Struct Biol. 1997, 7(5), 709-716
 189. Engel A, Schoenenberger CA, Müller DJ
High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy
Curr Opin Struct Biol. 1997, 7(2), 279-284

190. Sarid D
Scanning Force Microscopy
Oxford University Press, New York, Oxford, 1994
191. Shao Z, Yang J, Somlyo AP
Biological Atomic Force Microscopy: From Microns to Nanometers and Beyond
Annu Rev Cell Dev Biol. 1995, 11, 241-265
192. Czajkowsky DM, Shao Z
Submolecular resolution of single macromolecules with atomic force microscopy
FEBS Lett. 1998, 430(1-2), 51-54
193. Wiesendanger R
Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy
Cambridge University Press 1994
194. Hoh JH, Lal R, John SA, Revel JP, Arnsdorf MF
Atomic force microscopy and dissection of gap junctions
Science 1991, 253(5026), 1405-1408
195. Mou J, Yang J, Shao Z
Atomic force microscopy of cholera toxin B-oligomers bound to bilayers of biologically relevant lipids
J. Mol. Biol. 1995, 248(3), 507-512
196. Müller DJ, Fotiadis D, Engel A
Mapping flexible protein domains at subnanometer resolution with the atomic force microscope
FEBS Lett. 1998, 430(1-2), 105-111
197. Müller DJ, Buldt G, Engel A
Force-induced conformational change of bacteriorhodopsin
J. Mol. Biol. 1995, 249(2), 239-243
198. Müller DJ, Schabert FA, Buldt G, Engel A
Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy
Biophys. J. 1995, 68(5), 1681-1686
199. Schabert FA, Henn C, Engel A
Native *Escherichia coli* OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy
Science 1995, 268(5207), 92-94
200. Walz T, Tittmann P, Fuchs KH, Muller DJ, Smith BL, Agre P, Gross H, Engel A
Surface topographies at subnanometer-resolution reveal asymmetry and sidedness of aquaporin-1
J. Mol. Biol. 1996, 264(5), 907-918
201. Czajkowsky DM, Sheng S, Shao Z
Staphylococcal alpha-hemolysin can form hexamers in phospholipid bilayers
J. Mol. Biol. 1998, 276(2), 325-330

-
202. Yang J, Mou J, Shao Z
Molecular resolution atomic force microscopy of soluble proteins in solution
Biochim. Biophys. Acta 1994, 1199(2), 105-114
203. Yang J, Mou J, Shao Z
Structure and stability of pertussis toxin studied by in situ atomic force microscopy
FEBS Lett. 1994, 338(1), 89-92
204. Mou J, Sheng S, Ho R, Shao Z
Chaperonins GroEL and GroES: Views From Atomic Force Microscopy
Biophys J. 1996, 71(4), 2213-2221
205. Mou J, Czajkowsky DM, Sheng SJ, Ho R, Shao Z
High resolution surface structure of *E. coli* GroES oligomer by atomic force microscopy
FEBS Lett. 1996, 381(1-2), 161-164
206. Heibel C
Polymer-Supported Biomembrane Models
aus: „Organic Thin Films“, ACS Symposium Series, American Chemical Society 1998
207. Prucker O, Naumann CA, Rhe J, Knoll W, Frank CW
Photochemical Attachment of Polymer Films to Solid Surfaces via Monolayers of Benzophenone Derivatives
J Am Chem Soc 1999, 121(38), 8766-8770
208. Schneider HJ, Markl J, Schartau W, Linzen B
Hemocyanins in spiders, IV[1]. Subunit heterogeneity of *Eurypelma (Dugesiella)* hemocyanin, and separation of polypeptide chains.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1977, 358(9), 1133-1141
209. Moerner WE, Basché T
Optische Spektroskopie von einzelnen Dotierungsmoleklen in Festkörpern
Angew. Chem. 1993, 105, 537-557
210. Haarer D, Kador L
Optische Spektroskopie einzelner Moleküle in einem Festkörper
Phys. Bl. 1993, 49(4), 291-295
211. Rmcker B
SI-Einheiten - Gesetzliche Einheiten und ihre Anwendungspflicht in der Praxis ab 1978
WEKA-Verlag 1978, Kissing

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

Nicht aufgeführt sind die Einheiten nach dem Internationalen Einheitensystem (SI) sowie dezimale Vielfache von Einheiten [211].

cps	<i>counts per second</i>
h	Stunde
L	Liter (1 L = 1 dm ³)
M	Molar (1 M = 1 mol / dm ³)
min	Minute
S	Svedberg-Einheit (1 S = 10 ⁻¹³ s)
Torr	Torr (1 Torr = 133,322 Pa)
U/min	Umdrehungen pro Minute
°C	Grad Celsius

Konstanten

g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
h	Plancksches Wirkungsquantum ($h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$)
R	molare Gaskonstante ($R = 8,314 \text{ J / mol K}$)

Größen

A	Anzahl der Akzeptoren
AI	Anregungsintensität
c	Konzentration
D	Anzahl der Donoren Diffusionskoeffizient
E	Transfer-Effizienz
f	Pulsfrequenz
FI	Fluoreszenz-Intensität
G	Korrelationsfunktion
J	Überlappungsintegral
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Dissoziationskonstante Löschkonstante
L	Gleichgewichtskonstante im MWC-Modell
M	Molmasse

n	Anzahl der gleichzeitig bindenden Liganden Brechungsindex Anzahl der Photonen pro Übergang
n_{Hill}	Hill-Koeffizient
$p\text{O}_2$	Sauerstoff-Partialdruck
p_{50}	Partialdruck bei Hälbsättigung
r	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
R_0	Förster-Abstand
s	Sedimentationskonstante
t	Zeit
T	absolute Temperatur
V	Volumen
V_{eff}	effektives Fokus-Volumen
z_0	Fokus-Radius in Strahlrichtung
ϵ	Extinktionskoeffizient
Φ	Quantenausbeute
γ	Kontrastfaktor
κ^2	Orientierungsfaktor
λ	Wellenlänge
ν	Frequenz des Anregungslichtes
Θ	Baladungsgrad
ρ	Dichte
σ	Anregungsquerschnitt
τ	Fluoreszenz-Lebensdauer Verschiebe-Parameter
τ_D	Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors
τ_{Fokus}	Verweildauer im Fokus
τ_P	Pulsbreite
ω_0	Fokus-Radius senkrecht zur Strahlrichtung

Abkürzungen

Nicht aufgeführt sind die Symbole für chemische Elemente.

AFM	Atomare Kraft-Mikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
ANS	Anilino-naphthalen-sulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BS^3	Bi-(sulfosuccinimidyl)-suberat
CCD	<i>charged coupled device</i>
CL	Crosslinker
Cys	Cystein
DMP	Di-methyl-pimelimidat
DMS	Di-methyl-subimidat

DSG	Di-succinimidyl-glutarat
DTBP	Di-methyl-3,3'-di-thio-bis-propionimidat
DTSSP	3,3'-Di-thio-bis-(sulfo-succinimidyl-propionat)
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
EM	Elektronen-Mikroskopie
EPR	elektronen-paramagnetische Resonanz
FCS	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie
Hc	Hämocyanin
His	Histidin
KNF-Modell	Modell von Koshland, Némethy und Filmer
L	Ligand
MAI	Methyl-aceto-imidoester
MPI	Max-Planck-Institut
MWC-Modell	Modell von Monod, Wyman und Changeux
NHS	N-hydroxy-succinimid
OPE	Ein-Photonen-Anregung (<i>one photon excitation</i>)
OPO	optisch-parametrischer Oszillator
P	Protein
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
R	hoch-affiner Zustand
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
Sulfo-BSOCOES	Bis-(2-(sulfosuccinimido-oxycarbonyloxy)-ethyl)-sulfon
Sulfo-DST	Disulfosuccinimidyl-tartrat
Sulfo-EGS	Ethylen-glykol-bis-(sulfo-succinimidyl-succinat)
T	nieder-affiner Zustand
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin-succinimid-ester
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethylethylendiamin
Ti-Sa-Laser	Titan-Sapphir-Laser
TPE	Zwei-Photonen-Anregung (<i>two photon excitation</i>)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Trp	Tryptophan
UV	Ultra-Violett

