

**Chlorophyll-Komplexe**  
**mit Apo-Myoglobin und Albumin:**  
**Präparation, Stabilität**  
**und Photochemie**

**Stephanie Pröll**

**2005**







**Chlorophyll-Komplexe**  
**mit Apo-Myoglobin und Albumin:**  
**Präparation, Stabilität und**  
**Photochemie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Stephanie Pröll, geb. Schulz  
aus Windach

8. November 2005

1. Berichterstatter

Prof. Dr. H. Scheer

2. Berichterstatter

Prof. Dr. L. A. Eichacker

Tag der mündlichen Prüfung:

19. Dezember 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanze am Department Biologie I – Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. H. Scheer angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hugo Scheer, für sein großes Interesse an dieser Arbeit und seine vielfältige Unterstützung. Seine immer vorhandene Diskussionsbereitschaft und die mir gewährte Forschungsfreiheit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei,  
Bernhard Granvogl (LMU München) für die massenspektroskopischen Messungen,  
Marcin Krajewski für die Aufnahme der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren am MPI für Biochemie (Martinsried),  
Prof. Dejan Markovic (Faculty of Technology, Leskovac, Serbien) für die Zusammenarbeit bei den Denaturierungsexperimenten,  
Dr. Bruno Robert (DBCM/CEA und URA CNRS 2096, CEA-Saclay, Gif sur Yvette Cedex, Frankreich) für seine Unterstützung bei der Messung der Resonanz-Raman-Spektren und die kollegiale Aufnahme in seine Forschungsgruppe in Paris,  
Dr. Wolfgang Reuter (MPI für Biochemie, Martinsried) für die Einarbeitung in die präparative Gelelektrophorese,  
Dr. Georg Wiegand (MPI für Biochemie, Martinsried) für die Ermöglichung der Untersuchungen an der analytischen Ultrazentrifuge, und  
Brigitte Wilhelm (LMU München) für die Unterstützung bei der Produktion von Unmengen Zn-BPheid *a*.

Ein großes Dankeschön geht schließlich an alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter des Arbeitskreises, die mir mit fachlichem, psychologischem, computertechnischem und sonstigem Rat jederzeit zur Seite standen, sowie an jeden einzelnen Wegbegleiter, der mich persönlich und fachlich unterstützte.

Meinen FreundInnen Veronika Macher und Phil Langer danke ich unter anderem für die endlosen Telefonate, in denen sie mir immer wieder halfen, mit Humor nach vorne oder wenigstens zur Seite zu blicken, und für ihre großartige Freundschaft.

Ich danke

Meiner Familie, für ihren Rat, ihre Weitsicht und ihre Unterstützung.

Meinem Mann Michael mit Melanie, für seine Geduld, sein Verständnis und seine Liebe.



*Dans un brillant tintamarre de ferrailles,  
au tremblement cliquetant de ses vitres,  
et avec de longs cris aigus dans les courbes,  
le prodigieux véhicule s'élança  
vers l'avenir.*

Marcel Pagnol in 'La gloire de mon père'



## Abkürzungsverzeichnis

$\beta$ -Carotin	<i>all-trans</i> - $\beta$ -Carotin
$\lambda_{\max}$	Absorptionsmaximum im NIR
(M-)BPhe <i>a</i>	(M-)Bakteriopheophytin <i>a</i> (M = H,H (BPhe), Cd, Ni)
(M-)BPheid <i>a</i>	(M-)Bakteriopheophorbid <i>a</i> (M = H,H (BPheid), Ni, Pd, Zn)
(M-)Phe <i>a</i>	(M-)Pheophytin <i>a</i> (M = H,H (Phe))
(M-)Pheid <i>a</i>	(M-)Pheophorbid <i>a</i> (M = H,H (Pheid), Fe, Zn)
$^1\text{O}_2$	Singulett-sauerstoff
$^3\text{O}_2$	Triplettsauerstoff
ALA	5-Aminolävulinsäure
Apo-Mb	Apo-Myoglobin
APS	Ammoniumpersulfat
BChl <i>a</i>	Bakteriochlorophyll <i>a</i>
BChlid <i>a</i>	Bakteriochlorophyllid <i>a</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CD	“circular dichroism“ = Zirkulardichroismus
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chlid <i>a</i>	Chlorophyllid <i>a</i>
Da	Dalton
DEAE-Cellulose	Diethyl-Aminoethyl-Cellulose
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
17 <sup>3</sup> -Ethyl-BPheid <i>a</i>	Bakteriopheophorbid- <i>a</i> -17 <sup>3</sup> -Ethylester
FPLC	Fluid Phase Liquid Chromatography
Guanidin	Guanidinium-Hydrochlorid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HPTLC	“high precision“ Dünnschichtchromatographie
HSA	menschliches Serumalbumin
IC	interne Konversion
ISC	“inter system crossing“ = Interkombination
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LDL-Proteine	„low density“-Lipoproteine
Mb	Myoglobin
MeOH	Methanol
MS (ESI)	Massenspektrometrie (Electron Spray Ionisation)

MW	Molekulargewicht
NaPP	Natriumphosphatpuffer
NIR	naher Infrarotbereich
NMR	magnetische Kernresonanzspektroskopie
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBG	Porphobilinogen
PCB	Phycocyanobilin
PDT	Photodynamische Therapie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Dünnschichtchromatographie
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
Vis	sichtbarer Spektralbereich („visible“)
v/v, wt/v	Volumen/Volumen, Gewicht/Volumen
WW	Wechselwirkungen
Zn-17 <sup>3</sup> -Ethyl-BPheid <i>a</i>	Zink-Bakteriopheophorbid- <i>a</i> -17 <sup>3</sup> -Ethylester

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Struktur und Funktion von natürlichen Tetrapyrrolen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine .....	2
1.1.2	Funktionen der natürlichen Tetrapyrrole.....	4
<b>1.2</b>	<b>Photodynamische Therapie (PDT) .....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Definition und physikalische Grundlagen.....	7
1.2.2	Photosensibilisatoren.....	10
1.2.3	Photobleichung.....	12
<b>1.3</b>	<b>Myoglobin und Serum Albumin als Modellsysteme .....</b>	<b>15</b>
1.3.1	Myoglobin .....	15
1.3.2	Serum Albumin .....	17
<b>1.4</b>	<b>Bindung von Tetrapyrrolen in natürlichen Proteinen.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Aufgabenstellung.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Geräte .....	23
2.1.2	Chemikalien .....	24
2.1.3	Lösungsmittel .....	24
2.1.4	Puffer und Lösungen .....	25
2.1.5	Proteine.....	25
<b>2.2</b>	<b>Spektroskopische Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Allgemeine Bedingungen .....	26
2.2.2	UV/Vis-Spektroskopie .....	26
2.2.3	Zirkulardichroismus .....	26
2.2.4	Massenspektroskopie .....	26
2.2.5	Protonen-NMR-Spektroskopie.....	27
2.2.6	Raman-Spektroskopie .....	27
<b>2.3</b>	<b>Chromatographische Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.3.1	Analytische Dünnschicht-Chromatographie .....	27
2.3.2	Präparative Dünnschicht-Chromatographie .....	29
2.3.3	Präparative Säulenchromatographie.....	30
2.3.4	Analyse und Aufreinigung mit HPLC.....	31
2.3.5	Analytische FPLC .....	32
<b>2.4</b>	<b>Proteinbiochemische Arbeiten .....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Dialyse.....	33
2.4.2	Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	33
2.4.3	Native analytische Gelelektrophorese.....	34
<b>2.5</b>	<b>Isolierung und Derivatisierung der Chromophore .....</b>	<b>35</b>
2.5.1	Standardmethoden.....	35
2.5.2	Gewinnung der natürlichen Pigmente und einiger direkter Folgeprodukte .....	36
2.5.3	Herstellung von Pheophorbid-Derivaten.....	39
2.5.4	Enzymatische Synthese von Chlorophyllid <i>a</i> .....	40
2.5.5	Herstellung von Bakteriopheophorbid-Derivaten .....	42
<b>2.6</b>	<b>Herstellung der Pigment-Protein-Komplexe .....</b>	<b>44</b>
2.6.1	Pigment-Myoglobin-Komplexe .....	44
2.6.2	Pigment-Albumin-Komplexe .....	49

<b>2.7</b>	<b>Photooxidationsexperimente .....</b>	<b>51</b>
2.7.1	Probenpräparation .....	51
2.7.2	Lichtquelle und Filter .....	52
2.7.3	Experimentaufbau und Messung.....	53
2.7.4	Extraktion der Pigmente für die analytische HPLC .....	53
<b>2.8</b>	<b>Myoglobin-Denaturierungsexperimente .....</b>	<b>54</b>
2.8.1	Denaturierung mit Guanidin.....	54
2.8.2	Thermische Denaturierung.....	55
<b>2.9</b>	<b>Informatische Methoden.....</b>	<b>55</b>
2.9.1	Datenbanken.....	55
2.9.2	3D-Visualisierung von Proteinen.....	55
2.9.3	Andere informatische Methoden.....	55
<b>3</b>	<b>Charakterisierung der Pigment-Myoglobin-Komplexe.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Selektivität der Pigmentbindung .....</b>	<b>58</b>
3.1.1	Einfluss des Zentralmetalls .....	60
3.1.2	Effekte peripherer Substituenten.....	68
3.1.3	Regioselektivität an Position C-13 <sup>2</sup> .....	70
<b>3.2</b>	<b>Pigment-Protein-Verhältnis .....</b>	<b>75</b>
<b>3.3</b>	<b>Weiterführende spektroskopische Charakterisierung .....</b>	<b>78</b>
3.3.1	Einfluss des Proteins auf die CD-Spektren der Pigmente.....	78
3.3.2	Resonanz-Raman-Spektren von Zn-Pheophorbid- <i>a</i> -Myoglobin und Zn-Bakterio- pheophorbid- <i>a</i> -Myoglobin .....	82
3.3.3	Protonen-NMR-Spektren der rekonstituierten Myoglobine.....	85
<b>3.4</b>	<b>Heterogenität der Komplexe im nativen Gelsystem.....</b>	<b>88</b>
3.4.1	Pigmentzusammensetzung der im nativen Gel aufgetrennten Komplexe.....	91
3.4.2	Größenanalyse der Proteinbanden.....	95
3.4.3	Homogenitätsuntersuchung der einzelnen Komplexe mit analytischer Ultrazentrifugation .....	96
3.4.4	Protonen-NMR-Spektren der im nativen Gel aufgetrennten Komplexe.....	99
<b>3.5</b>	<b>Stabilitätsvergleich der Pigment-Myoglobin-Komplexe gegenüber Denaturierung.....</b>	<b>100</b>
3.5.1	Denaturierung mit Guanidin.....	102
3.5.2	Thermische Denaturierung der Komplexe aus den einzelnen Gelbanden .....	104
<b>3.6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion.....</b>	<b>108</b>
3.6.1	Selektivität der Pigmentbindung .....	108
3.6.2	Bindungssituation des Pigments.....	113
3.6.3	Heterogenität der Pigment-Myoglobin-Komplexe.....	114
3.6.4	Stabilität der Komplexe.....	115
<b>4</b>	<b>Charakterisierung der Pigment-Albumin-Komplexe .....</b>	<b>118</b>
<b>4.1</b>	<b>Präparation und Reinigung.....</b>	<b>118</b>
<b>4.2</b>	<b>Größenanalyse der Komplexe .....</b>	<b>118</b>
<b>4.3</b>	<b>Pigment-Protein-Verhältnis .....</b>	<b>121</b>
<b>4.4</b>	<b>Selektivität der Pigmentbindung .....</b>	<b>122</b>
4.4.1	Einfluss des Zentralmetalls .....	123
4.4.2	Effekte peripherer Substituenten.....	128
<b>4.5</b>	<b>Einfluss des Proteins auf die CD-Spektren der Pigmente .....</b>	<b>131</b>
<b>4.6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion.....</b>	<b>133</b>

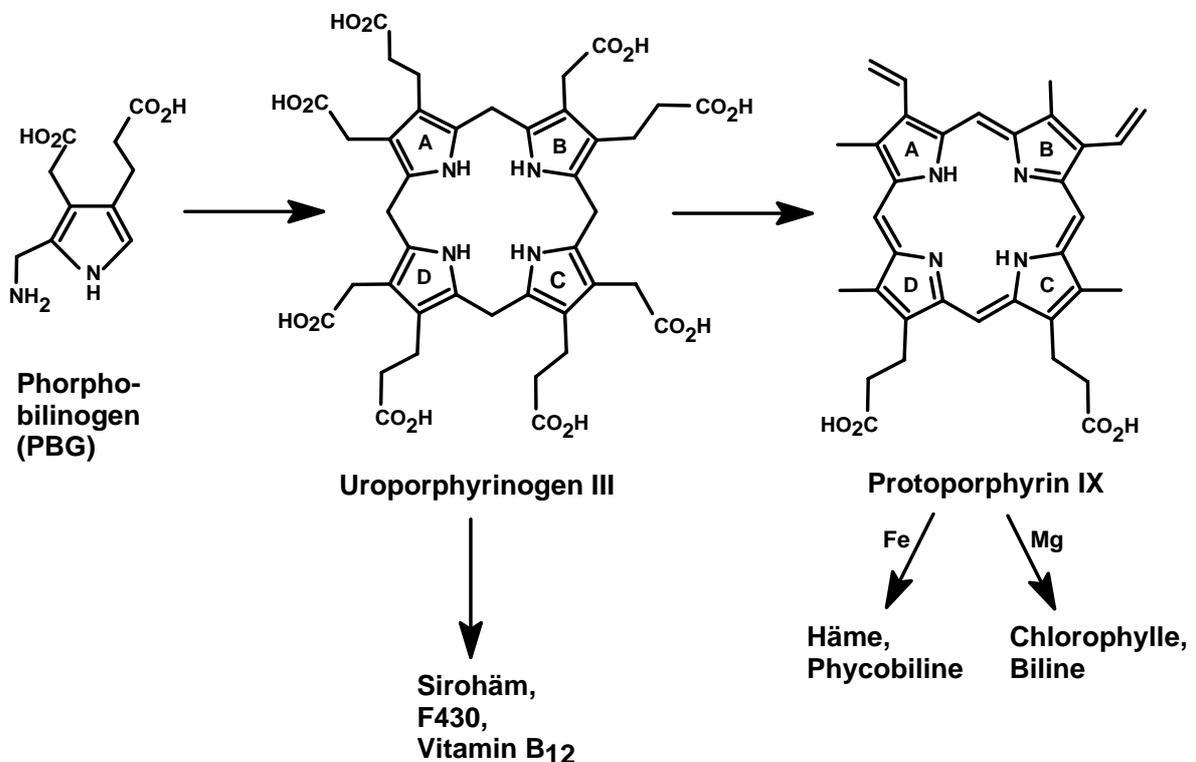
<b>5</b>	<b>Photochemie ausgewählter Chromophore .....</b>	<b>137</b>
<b>5.1</b>	<b>Photostabilität von Zn-Pheophorbid <i>a</i> .....</b>	<b>138</b>
5.1.1	Freies Zn-Pheophorbid <i>a</i> .....	138
5.1.2	Zn-Pheophorbid <i>a</i> im Myoglobin-Komplex .....	143
5.1.3	Zn-Pheophorbid <i>a</i> im Albumin-Komplex .....	146
<b>5.2</b>	<b>Photostabilität von Zn-Bakteriopheophorbid <i>a</i> .....</b>	<b>150</b>
5.2.1	Freies Zn-Bakteriopheophorbid <i>a</i> .....	150
5.2.2	Zn-Bakteriopheophorbid <i>a</i> im Myoglobin-Komplex .....	154
5.2.3	Zn-Bakteriopheophorbid <i>a</i> im Albumin-Komplex .....	157
<b>5.3</b>	<b>Photostabilität von Pd-Bakteriopheophorbid <i>a</i> in Lösungsmittel .....</b>	<b>160</b>
<b>5.4</b>	<b>Photostabilität von Ni-Bakteriopheophorbid-<i>a</i>-Myoglobin .....</b>	<b>162</b>
<b>5.5</b>	<b>Produkte der Photooxidationen .....</b>	<b>163</b>
5.5.1	Photooxidationsprodukte von Zn-Pheophorbid <i>a</i> .....	164
5.5.2	Photooxidationsprodukte von Zn-Bakteriopheophorbid <i>a</i> .....	168
5.5.3	Photooxidationsprodukte von Pd-Bakteriopheophorbid <i>a</i> in Lösungsmittel .....	173
<b>5.6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion .....</b>	<b>175</b>
5.6.1	Produkte der Photoreaktionen .....	176
5.6.2	Stabilität der Pigmente .....	179
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>184</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>187</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>203</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur und Funktion von natürlichen Tetrapyrrolen

Der Biosyntheseweg der Tetrapyrrole ist in nahezu allen Lebewesen hoch konserviert (Beale, 1994). Dies spiegelt die herausragende Bedeutung der Tetrapyrrole für das Leben auf der Erde wider. Sie sind essentielle Faktoren im Metabolismus fast aller lebenden Organismen. Ausgehend von acht Molekülen 5-Aminolävulinsäure (ALA) katalysiert die ALA-Dehydratase die Bildung von vier Molekülen des Pyrrolderivats Porphobilinogen (PBG), die über vier Kohlenstoffbrücken zum zyklischen, aber noch farblosen Tetrapyrrol, Uroporphyrinogen III, verknüpft werden (Leeper, 1991). Ausgehend von Uroporphyrinogen III bzw. seinem Folgeprodukt Protoporphyrin IX, das das für die biologische Funktion der Tetrapyrrole wichtige aromatische  $18\pi$ -Elektronensystem enthält, entstehen dann die funktionellen Kofaktoren wie Häme, Chlorophylle, Corrine (z.B. Vitamin B<sub>12</sub>) und Biline (Warren *et al.*, 1990) (Abbildung 1-1). Durch die Komplexierung unterschiedlicher Zentralmetalle wie Fe, Ni, Co oder Mg, periphere Modifikationen, Reduktionen und Ringöffnung ergibt sich eine Vielfalt von Chromophoren, deren Funktionen zusätzlich durch den Einbau in Proteine modifiziert werden.



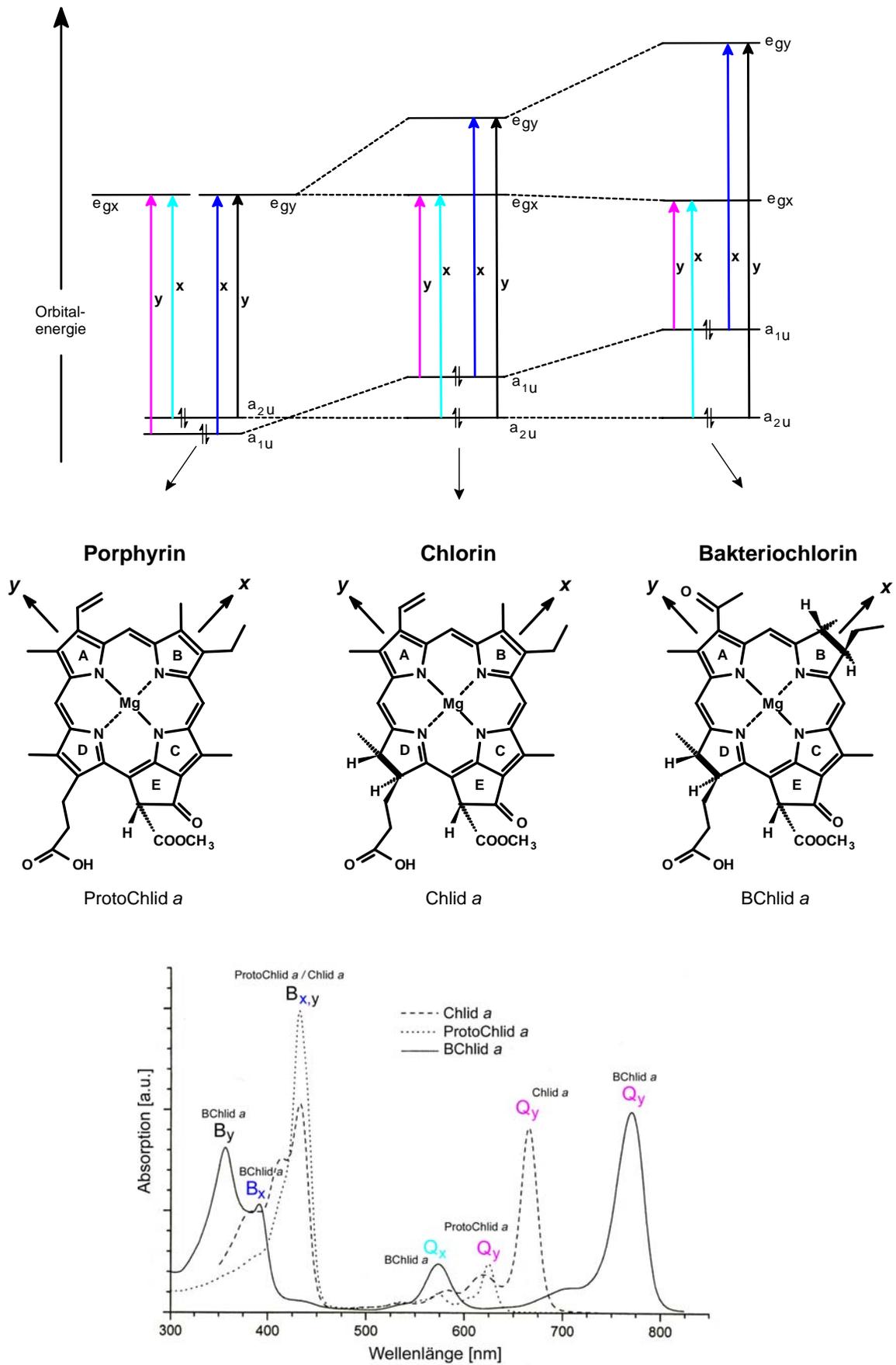
**Abbildung 1-1.** Tetrapyrrolbiosynthese. Schematischer Überblick über wichtige Zwischenprodukte und Verzweigungen des Biosyntheseweges (in Anlehnung an Scheer (2003)).

### 1.1.1 Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine

Der unterschiedliche Sättigungsgrad des Tetrapyrrolmakrozyklus führt zu drei elektronischen Grundstrukturen, die als Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine bezeichnet werden (Scheer, 1991). Porphyrine, z.B. Protohäm oder c-Chlorophylle, besitzen ein ungesättigtes Ringsystem. Bei den Chlorinen, z.B. Chlorophyll *a*, ist Ring D gesättigt, bei den Bakteriochlorinen, z.B. Bakteriochlorophyll *a*, tritt außerdem die Sättigung von Ring B hinzu. Unabhängig vom Grad der Sättigung besitzen Chlorophylle und Bakteriochlorophylle den isozyklischen Ring E, der während der Biosynthese aus der Propionsäure an C-13 entsteht (Leeper, 1991). Abbildung 1-2 zeigt die verschiedenen Sättigungsstufen anhand von Beispielen, sowie die zugehörigen Orbital-Schemata und Spektren. Neben der unterschiedlichen Ringsättigung entstehen Variationen der Chromophore durch unterschiedliche Substituenten und Zentralmetalle. Bei den natürlichen Tetrapyrrolen ist bei den Hämen wie Protohäm das Zentralmetall Eisen, bei den Chlorophyllen und Bakteriochlorophyllen ist es Magnesium, in Ausnahmefällen kann auch Zink eingebaut sein (Kobayashi *et al.*, 1998). Daneben besitzen die Typ-II-Reaktionszentren der Photosysteme die metallfreien Pheophytine als reaktive Chromophore.

Für die spektralen Eigenschaften dieser Pigmente ist in erster Linie das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem verantwortlich. Mit zunehmender Sättigung steigt die Intensität der langwelligsten Bande, die entsprechend dem als  $Q_y$ -Übergang bezeichneten Elektronenübergang zwischen den Orbitalen als  $Q_y$ -Bande bezeichnet wird. Gleichzeitig zeigt diese Bande eine Rotverschiebung, während sich die Soret-Bande, die sich aus den als  $B_y$  und  $B_x$  bezeichneten Elektronenübergängen ergibt, ins Blaue verschiebt (Scheer und Inhoffen, 1978). Periphere Substituenten, sowie unterschiedliche Zentralmetalle in unterschiedlicher Koordination können weitere optische Veränderungen hervorrufen (Weiss, 1972; Hanson, 1991).

Nach dem Vier-Orbital-Modell von Gouterman (Gouterman, 1961; Gouterman *et al.*, 1963) resultieren die Absorptionsbanden im UV/Vis/NIR-Bereich der Porphyrine aus Ein-Elektronen-Übergängen zwischen den beiden höchsten besetzten (HOMO-1 und HOMO) und den beiden niedrigsten unbesetzten (LUMO und LUMO+1)  $\pi$ -Orbitalen. Diese Orbitale werden als  $a_{1u}(\pi)$  und  $a_{2u}(\pi)$  (HOMO und HOMO-1) bzw.  $e_{gx}(\pi^*)$  und  $e_{gy}(\pi^*)$  (LUMO und LUMO+1) bezeichnet. Die Übergänge (s. Abbildung 1-2) zwischen diesen Orbitalen können auf vier unterschiedlichen Wegen, je nach Ausgangs- und Endorbital, von HOMO nach LUMO erfolgen. Die Bezeichnung  $B_y$  bzw.  $B_x$  für hochenergetische Übergänge (Addition der



**Abbildung 1-2.** Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen Molekülorbitalen (oben), Pigmentstrukturen (Mitte) und Absorptionsspektren (unten) (in Anlehnung an Hanson (1991) und Scheer (2003)).

zwei möglichen Übergänge) und  $Q_x$  bzw.  $Q_y$  für Übergänge niedriger Energie (Subtraktion der zwei möglichen Übergänge) sind historisch bedingt.  $X$  und  $y$  beziehen sich dabei auf die paarweise orthogonale Orientierung der Übergangsdipolmomente in der Tetrapyrrol-Ebene. Je nach energetischer Lage und Entartung der Orbitale, die wiederum durch den Sättigungsgrad des Tetrapyrrolrings und damit durch die Symmetrie beeinflusst werden, erfordern diese Übergänge unterschiedliche Anregungsenergien der Elektronen. Bei den Metalloporphyrinen mit  $D_{4h}$ -Symmetrie sind die beiden Orbitale LUMO und LUMO+1 entartet, also von gleicher Energie, da die in der Fläche liegenden  $x$ - und  $y$ -Achsen äquivalent sind. In diesem Fall sind auch die Energieniveaus der Orbitale HOMO und HOMO-1 (nahezu) identisch. Folglich treten hier nur insgesamt zwei elektronische Übergänge auf. Bedingt durch die Reduktion der Symmetrie infolge unsymmetrischer Substitution, und insbesondere infolge zunehmender Sättigung des Tetrapyrrolmakrozyklus und der damit verbundenen Aufhebung der Orbitalentartung, sind bei den Chlorinen (z.B. Chlid  $a$ ) und den Bakteriochlorinen (z.B. BChlid  $a$ ) vier Übergänge möglich. Die zugehörigen Absorptionsspektren sind in Abbildung 1-2 gezeigt, die vier Banden sind insbesondere beim Bakteriochlorophyll deutlich sichtbar.

### 1.1.2 Funktionen der natürlichen Tetrapyrrole

Tetrapyrrole nehmen sehr unterschiedliche Funktionen in der Natur wahr. Neben der chemischen Modifikation ihres Grundgerüsts, wie Variation des Sättigungsgrads und der peripheren Substituenten bis hin zur Ringöffnung, sowie unterschiedlichen Zentralmetallen, hat die Proteinumgebung entscheidenden Einfluss auf die Funktion natürlicher Pigment-Protein-Komplexe. Durch Interaktion mit dem Proteingerüst werden die Chromophore in bestimmte, häufig nicht mehr planare Konformationen gezwungen, wodurch eine Änderung sowohl ihrer physikalischen als auch chemischen Eigenschaften erfolgt (Senge, 1992; Momenteau und Reed, 1994; Ravikanth und Chandrashekar, 1995). Hinzu kommen spezifische Interaktionen zwischen Chromophor und Protein in Form von Wasserstoffbrückenbindungen, Wechselwirkungen mit  $\pi$ -Elektronen und benachbarten Ladungen. Die Ligation des Zentralmetalls durch Aminosäurereste sowie Chromophor-Chromophor-Interaktionen und die Konformation der Seitenketten spielen weitere Rollen beim Feintuning der Pigmenteigenschaften. Identische Chromophore können so unterschiedliche Aufgaben in der Natur erfüllen.

### Fe-Porphyrine

Die Klasse der Häm-Proteine enthält eisenhaltige Porphyrine als Kofaktoren. Proteine wie Myoglobin und Hämoglobin sind für Sauerstofftransport und -speicherung in vielen Organismen zuständig (Hardison, 1998). Ihre Funktion beruht auf der reversiblen Bindung von O<sub>2</sub> an das zentrale Eisenatom des Porphyrins zusammen mit der stabilisierenden Wirkung benachbarter Aminosäurereste. Gebunden an Cytochrome ist der Häm-Chromophor am Aufbau eines elektrochemischen Gradienten in der Atmungskette beteiligt. Reversible Oxidations-Reduktionszyklen des zentralen Eisens führen zum Weitertransport von Elektronen, die letztendlich auf Sauerstoff übertragen werden. Ebenso dienen Cytochrome als Elektronenüberträger der Photosynthese (Trebst, 1999). Viele im Organismus entstehende Sauerstoffverbindungen, wie Wasserstoffperoxid, Superoxid oder Sauerstoffradikale sind hochtoxisch. Ihre Beseitigung übernehmen Katalasen und Peroxidasen, die ebenfalls ein Häm als Kofaktor enthalten (Cadenas, 1989). Peroxidasen sind außerdem, ebenso wie Cytochrom P450, für oxidative Biotransformationen zuständig, wie beispielsweise die Verknüpfung von Ligninkomponenten in Pflanzenzellwänden (Takayuki, 2000; Coon, 2005). Die für die Reduktion von Nitrit zu Ammoniak verantwortlichen Nitritreduktasen in den Plastiden der Pflanzen enthalten sogenanntes Sirohäm als prosthetische Gruppe. Dieses Tetrapyrrol ist im Unterschied zu Protohäm an den Ringen C und D reduziert und enthält noch die peripheren Essig- und Propionsäurereste des Uroporphyrinogen III (vgl. Abbildung 1-1) (Heldt, 1996; Mogi, 2003). Zusätzlich zu den Aufgaben in den Pigment-Protein-Komplexen übernehmen die Häm-Chromophore die Kontrolle ihrer eigenen Biosynthese über positive und negative Rückkopplungsmechanismen (Granick, 1966; Zhang und Guarente, 1995; Vothknecht *et al.*, 1998).

### Mg-Chlorine und -Bakteriochlorine

Neben den Fe-Porphyrinen sind Mg-Porphyrine, -Chlorine und -Bakteriochlorine in Form der Chlorophylle für das Leben auf der Erde von überragender Bedeutung. Sie sind die charakteristischen photoaktiven Chromophore in Pflanzen, Algen, Cyano- und anderen photosynthetischen Bakterien (Scheer, 1991). Ihre hohe Absorption im sichtbaren Spektralbereich und die lange Lebensdauer ihres angeregten S<sub>1</sub>-Zustands sind wesentliche Voraussetzungen für ihre Funktionen in der Photosynthese. Aufgrund ihrer spezifischen Anordnung in den photosynthetischen Proteinkomplexen (Antennen) kann die aus dem Sonnenlicht gewonnene Energie in feinst abgestimmten Schritten in die sogenannten Reaktionszentren übertragen werden. Diese enthalten ebenfalls Chlorophylle und, in den Typ-II-Reaktionszentren, deren Zentralatom-freie Derivate, die Pheophytine, welche dort für die

ersten Schritte der Ladungstrennung verantwortlich sind. Energie- und Elektronentransfer sind dabei bestimmt durch die Anordnung der Chromophore zueinander (Scheer, 2003). Die Strukturaufklärung des photosynthetischen Reaktionszentrums des Purpurbakteriums *Rhodospseudomonas viridis* wurde 1988 mit dem Nobelpreis geehrt (Deisenhofer *et al.*, 1985; Deisenhofer und Michel, 1989). Die wesentlichen Vorgänge bei der Umwandlung der Energie des Sonnenlichts in elektronische Potentiale sind: 1. Die Erzeugung eines elektronisch angeregten Singulettzustands an einem photochemisch aktiven Pigmentkomplex („special pair“ im Reaktionszentrum). 2. Der induzierte Elektronentransfer unter Bildung eines Radikationenpaares (Beteiligung des aktiven Pigments im Reaktionszentrum und des primären Elektronenakzeptors, ebenfalls ein Chlorophyll). 3. Die Stabilisierung durch nachfolgende Redoxreaktionen (Renger, 1999). Zur Verbesserung der Energieaufnahme (Erhöhung des Absorptionsquerschnitts der Reaktionszentren) und der möglichst verlustfreien Weiterleitung der Energie ins Reaktionszentrum – durch die definierte Orientierung der Chromophore zueinander – ist die überwiegende Menge der Chlorophylle in den Lichtsammelkomplexen (Antennenkomplexen) organisiert (Scheer, 2003). Diese sind meist aus einer Kern- und einer peripheren Antenne zusammengesetzt (Scheer, 1999). Neben den Chlorophyllen enthalten die Antennenkomplexe Carotinoide. Dies sind hochungesättigte aliphatische Moleküle, die ebenfalls Licht absorbieren können. Zusätzlich zur Lichtabsorption fungieren sie als Licht- und O<sub>2</sub>-Schutz des photosynthetischen Apparates (Frank *et al.*, 1999).

### Offenkettige Tetrapyrrole

In den Lichtsammelkomplexen von Cyanobakterien, Rotalgen und Cryptophyceen sind offenkettige Tetrapyrrole, die Phycobiline, in den Phycobiliproteinen für die Lichtabsorption verantwortlich (Wehrmeyer, 1983; Gantt, 1986). Die Phycobilisomen der Cyanobakterien und Rotalgen sind membranexterne, hochmolekulare Phycobiliprotein-Komplexe mit apparenten molekularen Massen zwischen 4,5 und 20 Mio. Dalton. In ihnen wird wiederum durch die spezifische Anordnung und Ausrichtung der Chromophore – hochenergetisch absorbierende Phycoerythrine oder Phycoerythrocyanine und Phycocyanine in der Peripherie, sowie niederenergetisch absorbierende Allophycocyanine im Kern – eine effiziente Weiterleitung der Energie bis zu den membranintegralen Photosystemen erreicht (Gantt, 1975; Sidler, 1994; Bald *et al.*, 1996). Eine zweite Gruppe von Biliproteinen sind die Phytochrome, sensorische Photorezeptoren in Pflanzen, Algen und vielen Bakterien. Sie enthalten offenkettige Phycobiline (Phytochromobilin, Phycocyanobilin und Biliverdin) und haben Funktionen beim Registrieren und Analysieren einfallenden Lichts (Rüdiger und Thümmler, 1991; Quail,

2002). In Pflanzen sind sie z.B. an der Steuerung der Samenkeimung, Chloroplastenentwicklung und Blütenbildung beteiligt (Schopfer und Brennicke, 1999).

### Reduzierte Tetrapyrrolsysteme

Tetrapyrrole, bei denen eine oder mehrere Methinbrücken reduziert oder sogar entfernt wurden und die andere Zentralmetalle als Mg oder Fe enthalten, sind weniger häufig, aber essentielle Kofaktoren bestimmter Enzyme. Das wasserlösliche Vitamin B<sub>12</sub> gehört in diese Gruppe. Es enthält ein zentrales Cobalt-Atom und ein zyklisches Tetrapyrrolsystem mit nur drei Methinbrücken (Ludwig und Matthews, 1997). Als für die meisten Organismen essentielles Vitamin ist es Kofaktor der Homocystein-Methyltransferase und Methylmalonyl-CoA-Mutase. Es ist außerdem in vielen Mutasen und Transferasen von Mikroorganismen enthalten.

Der ebenfalls nicht mehr aromatische Kofaktor F<sub>430</sub> enthält Ni als Zentralmetall. Als Kofaktor in der Methyl-Coenzym-M-Reduktase von Methanbakterien ist er in die Methanbildung eingebunden (Ermler *et al.*, 1997).

Tetrapyrrole finden sich nicht nur in natürlichen Systemen, sondern werden vom Menschen immer häufiger in künstlichen Systemen eingesetzt. In der Elektronik finden sie vor allem im Zusammenhang mit der Nutzung von Solarenergie Verwendung. Sie werden aber auch als molekulare Schalter oder Energieleitsysteme benutzt. Über die Löschung ihrer Phosphoreszenz können sie sowohl in Flüssigkeiten als auch in Gasen Sauerstoff detektieren (Hambright, 2000). Auch in der Medizin finden sie Einsatz. Bei Gelbsucht dienen sie exogen verabreicht beispielsweise der Inhibierung des Enzyms Häm-Oxygenase (Bommer und Hambright, 2002). Besonders wichtig sind Tetrapyrrole in den letzten 20 Jahren bei der Krebstherapie geworden. Hier kann ihre Injektion nicht nur helfen, Tumore zu lokalisieren, sondern der Tumor selbst kann durch Licht in Verbindung mit den Chromophoren und mit Sauerstoff zerstört werden. Diese Behandlungsform wird als Photodynamische Diagnose und Therapie bezeichnet. Das folgende Kapitel gibt eine Einführung in dieses Gebiet.

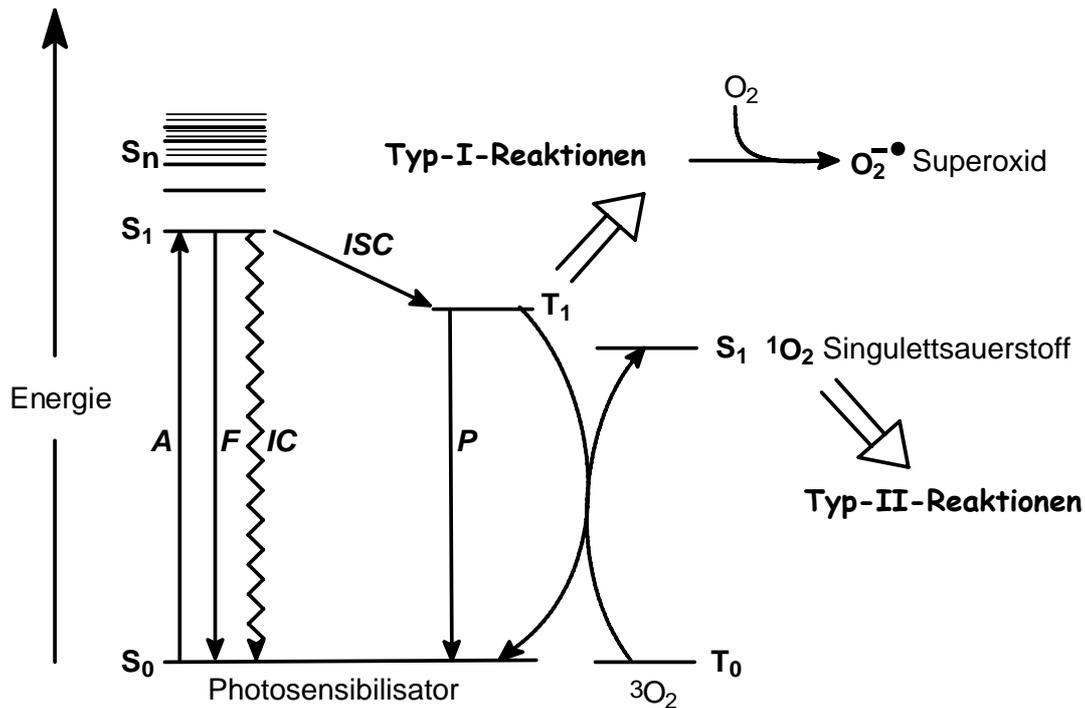
## **1.2 Photodynamische Therapie (PDT)**

### **1.2.1 Definition und physikalische Grundlagen**

Die molekulare Basis der photodynamischen Therapie ist der sogenannte photodynamische Effekt. Dieser wurde 1900 von O. Raab bei der Belichtung von Protozoen in Gegenwart von Acridin oder ähnlichen Farbstoffen entdeckt (Raab, 1900). Während die Farbstoffe im

Dunkeln keinen Effekt auf die Protozoen ausübten, bewirkten sie im Licht ein schnelles Sterben. Die Selbstversuche von Meyer-Betz mit Hämatoporphyrin illustrierten auf spektakuläre Weise die Photosensibilisierung durch exogen verabreichtes Porphyrin auch im Menschen (Meyer-Betz, 1913). Bei diesen Reaktionen ist neben Licht und dem Photosensibilisator die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff nötig, der hierbei verbraucht wird (Blum, 1964). Bei der Photodynamischen Therapie werden somit Licht, O<sub>2</sub> und ein photosensibilisierender Stoff in Kombination verwendet (Henderson und Dougherty, 1992; Bonnett, 1999). Neben dem Einsatz dieser Therapieform bei Hautkrankheiten, ist sie eine vielversprechende Behandlungsalternative bei verschiedenen Formen von Krebserkrankungen (Röder *et al.*, 1987; Trelles, 1990). Im Gegensatz zu den massiven und sehr unangenehmen Nebeneffekten von Strahlen- und Chemotherapie, sind die Nebeneffekte der Photodynamischen Therapie potentiell sehr gering. Die erst in Kombination wirksamen Einzelkomponenten üben allein keine toxischen Effekte auf den Organismus aus.

Die toxische Wirkung der Photodynamischen Therapie beruht auf photosensibilisierten Oxidationen. Ausgangspunkt ist hierbei die Absorption von Licht durch den Sensibilisator, d.h. den eingesetzten Farbstoff. Abbildung 1-3 fasst die bei der PDT auftretenden photophysikalischen Prozesse anhand eines Jablonski-Diagramms zusammen (Spikes und Bommer, 1991; Röder und Näther, 1991; Milgrom und MacRobert, 1998). Der elektronische Grundzustand des Photosensibilisators ist ein Singulettzustand (S<sub>0</sub>). Durch die Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge geht der Sensibilisator in einen angeregten Zustand über (z.B. S<sub>1</sub> oder S<sub>2</sub>). Ausgehend von dem ersten angeregten Singulettzustand (S<sub>1</sub>) mit einer Lebensdauer von <5 ns kann die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz (F) oder interner Konversion (IC = internal conversion) wieder abgegeben werden, wobei der Grundzustand (S<sub>0</sub>) wieder erreicht wird. Der Sensibilisator kann aber auch durch Interkombination (ISC = inter system crossing) in den sehr viel längerlebigen (µs) ersten angeregten Triplettzustand (T<sub>1</sub>) übergehen (Henry und Siebrand, 1973; Siebrand, 1976). Dieser, aufgrund der unterschiedlichen Multiplizitäten eigentlich Spin-verbotene Übergang, ist der erste wichtige Schritt in der Photodynamischen Therapie. Bei zyklischen Tetrapyrrolen können Triplettts in Quantenausbeuten von bis zu 100% gebildet werden. Ausgehend von diesem langlebigen, aber noch immer energiereichen und sehr reaktiven T<sub>1</sub>-Zustand können Ladungs- und Energietransferprozesse stattfinden. Hierbei werden grundsätzlich zwei oxidative Mechanismen unterschieden (Schenck und Koch, 1960; Gollnick, 1968; Foote, 1987; Foote, 1991; Bonnet, 2000).



**Abbildung 1-3.** Photophysikalische Prozesse und Reaktionen bei der PDT: (*A*) Absorption, (*F*) Fluoreszenz, (*IC*) Interne Konversion, (*ISC*) Interkombination und (*P*) Phosphoreszenz. Der aufwärts zeigende Pfeil in Richtung der Typ-I-Reaktionen hat keinen Bezug zur Energieskala. In Anlehnung an Bonnett und Martinez (2001) und Nyman und Hynninen (2004).

In Reaktionen des Typs I interagiert der Sensibilisator mit Biomolekülen oder Sauerstoff unter Transfer von Wasserstoffatomen oder Elektronen. Hierbei werden unter anderem Radikale wie Superoxid, Hydroperoxyl oder Hydroxyl gebildet. Bei Reaktionen des Typs II erfolgt eine Spin-erlaubte Energieübertragung von dem  $T_1$ -Zustand des Sensibilisators auf den im Grundzustand als Triplett vorliegenden molekularen Sauerstoff ( $^3O_2$ ). Hierdurch entsteht hochreaktiver, leicht diffusibler und ebenfalls relativ langlebiger Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ). Die gebildeten reaktiven Spezies bewirken die Oxidation von Biomolekülen im Gewebe, wodurch letztendlich der Tumor zerstört wird. Der Sensibilisator geht wieder in den Grundzustand ( $S_0$ ) über, von wo aus er wieder angeregt und über die beschriebenen Mechanismen neue Oxidantien bilden kann. Da nicht genau bekannt ist, welche der reaktiven Spezies, Sensibilisatorradikale, Sauerstoffradikale oder  $^1O_2$ , schließlich den Zelltod auslösen, wird im Folgenden allgemein von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gesprochen.  $^1O_2$  wird allgemein als Hauptreaktant bei der Photodynamischen Therapie angesehen, es gibt aber auch Hinweise auf radikalische Mechanismen (Kochevar *et al.*, 1994; Kochevar *et al.*, 1996). Diese können auch direkt vom  $S_1$ -Zustand oder sogar ausgehend von höheren angeregten Singulettzuständen (z.B.  $S_2$ , (Kammhuber, 1999)) in Abwesenheit von Sauerstoff erfolgen.

### 1.2.2 **Photosensibilisatoren**

Entscheidenden Einfluss auf den Erfolg einer Photodynamischen Krebsbehandlung hat der eingesetzte Sensibilisator. Er muss an die speziellen Erfordernisse des jeweiligen Tumors angepasst sein. Besonders wichtig ist hierbei die Lage, Größe und die Ausdifferenzierung des Tumors, sowie seine Beschaffenheit, und die Blut- bzw. Sauerstoffversorgung einschließlich des pH-Werts des Gewebes.

Ein guter Sensibilisator sollte grundsätzlich folgende Eigenschaften aufweisen (Berenbaum und Bonnett, 1989):

1. Keine Toxizität im Dunkeln.
2. Hohe Selektivität für das Tumorgewebe und schnelle Exkretion nach der Behandlung.
3. Konstante Zusammensetzung (vorzugsweise eine Einzelsubstanz), verbunden mit guter Zugänglichkeit.
4. Hohe Ausbeute angeregter Zustände, vor allem hohe Triplettquantenausbeute und Triplettenergie  $>94$  kJ/Mol (dies entspricht der Energiedifferenz zwischen  $^3\text{O}_2$  und  $^1\text{O}_2$ ), mit effizienter Energieübertragung auf Triplett-Sauerstoff.
5. Keine Selbstaggregation, da hierdurch die Triplettquantenausbeute und damit die  $^1\text{O}_2$ -Ausbeute verringert wird (MacRobert *et al.*, 1989).
6. Absorptionsmaximum mit hohem molarem Extinktionskoeffizienten zwischen 660 und 860 nm („therapeutisches Fenster“), da hier aufgrund geringer Streueffekte die Eindringtiefe von Licht ins Gewebe am größten ist und die langwellige Strahlung selbst keine Photoschäden des Gewebes verursacht (MacRobert *et al.*, 1989; Jori, 1992; Jori, 1997).
7. Hohe Stabilität verbunden mit guter Löslichkeit (amphiphiler Charakter).

Die Gründe für die im Vergleich zu gesundem Gewebe stark erhöhte Anreicherung der meisten Sensibilisatoren im Tumorgewebe sind nur unvollständig bekannt. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die deutlich erhöhte Zellteilungsrate und der erhöhte Stoffwechselumsatz des Tumors. Dieser kann unter anderem zu einer Erniedrigung des pH-Wertes führen, wodurch kationische Sensibilisatoren besonders gut aufgenommen/gebunden werden (Pottier und Kennedy, 1990). Neoplastische Zellen besitzen zudem eine erhöhte Endozytose-Aktivität für LDL-Proteine („low density lipoproteins“), welche wiederum lipophile Sensibilisatoren binden (Jori und Reddi, 1993; Kohen *et al.*, 1995). Weitere Einflussfaktoren sind möglicherweise die geringe lymphatische Versorgung und der große interstitielle Raum von

Tumorgewebe, die zu unspezifischer Anreicherung der Sensibilisatoren führen (Kohen *et al.*, 1995; Nyman und Hynninen, 2004).

Die ersten bei der Photodynamischen Therapie benutzten Photosensibilisatoren waren Hämatoporphyrin und dessen Derivate (Kessel, 2004). Sie befinden sich heute z.B. unter dem Namen Photofrin® im Handel (Diamond *et al.*, 1972; Spikes und Bommer, 1991; Dougherty, 1993; Levy, 1995; Schuitmaker *et al.*, 1996). Diese Sensibilisatoren der sogenannten ersten Generation besitzen jedoch drei wesentliche Nachteile. Ihre Selektivität ist sehr niedrig, was zur Photosensitivität von gesundem Gewebe führt, die Absorption im langwelligen Bereich (630 nm) ist sehr schwach, und sie stellen eine komplexe Mischung verschiedener aktiver Komponenten dar, was ihre Dosierung und Erforschung sehr schwierig macht. Ihre zudem sehr langsame Exkretion führt zu langanhaltender Lichtempfindlichkeit des Patienten (Nyman und Hynninen, 2004).

Um diese Nachteile zu überwinden, wurden die Sensibilisatoren der zweiten Generation entwickelt. Sie besitzen größtenteils ein intensives Absorptionsmaximum im therapeutischen Fenster (660-860 nm), verbunden mit hoher Triplettquantenausbeute und damit hoher Ausbeute an  $^1\text{O}_2$  (Röder und Näther, 1991; Pandey und Herman, 1998; Bonnett, 1999). Die bereits in klinischen Tests eingesetzten Sensibilisatoren gehören zu den Gruppen der Porphyrine, Phthalocyanine und Texaphyrine, und zu den Chlorinen und Bakteriochlorinen (Pandey und Herman, 1998; Sternberg *et al.*, 1998). Die natürlichen Derivate der Chlorine und Bakteriochlorine sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse. Chl *a* und BChl *a* sind aufgrund ihres lipophilen Phytolrestes wasserunlöslich und zeigen eine starke Tendenz zur Aggregation (Scherz *et al.*, 1991). Aufgrund ihrer für die Photodynamische Therapie besonders geeigneten spektrophysischen Eigenschaften wurden sie dennoch unter Verwendung von Carriersystemen appliziert (Henderson *et al.*, 1991). Modifikationen ihrer peripheren Substituenten, wie Hydrolyse des Phytolrestes und Veresterung der nun freien Propionsäure mit den polaren Aminosäuren Serin oder Tyrosin (Scherz *et al.*, 1994; Eichwurzel *et al.*, 2000) führten zu erhöhter Löslichkeit in wässriger Umgebung. Weiterführende Konjugationen mit Peptiden, Hormonen oder Antikörpern sollten eine sehr spezifische Ausrichtung der Sensibilisatoren auf unterschiedliche Tumorgewebe ermöglichen (Scherz *et al.*, 1994; Fiedor *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 1997). Eine geringe Photostabilität des Sensibilisators ist in den meisten Fällen zwar nicht erwünscht, sie kann aber indirekt zu erhöhter Selektivität beitragen, indem der in gesunden Zellen in nur geringer Konzentration vorhandene Sensibilisator durch Licht schnell zerstört wird (Nyman und Hynninen, 2004). Neben Untersuchungen zur Selektivität stellen Untersuchungen zur Stabilität von Photosensibilisatoren damit ein weiteres wichtiges Forschungsgebiet dar.

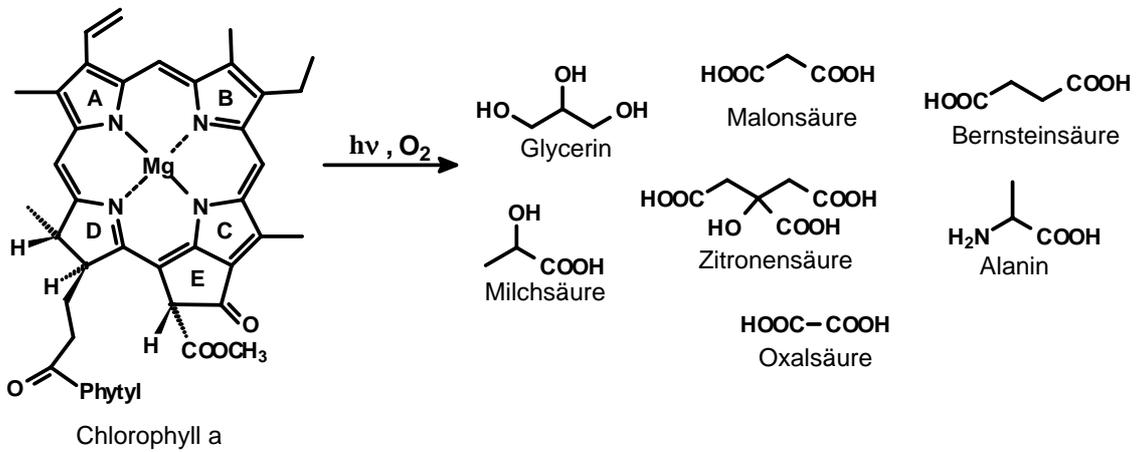
Mögliche toxische Abbauprodukte sollen hier ebenso identifiziert werden wie chemische Reaktionen, die auch *in vivo* zu dessen Zerstörung führen.

### 1.2.3 **Photobleichung**

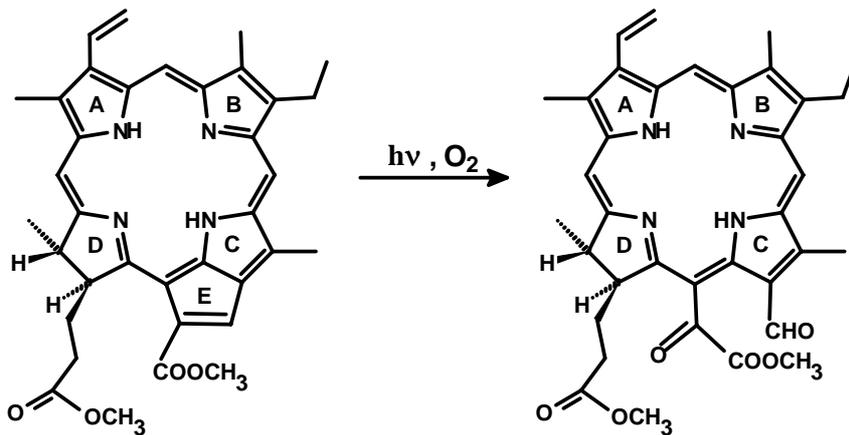
Die Unbeständigkeit von Farbstoffen im Licht wird in der Photobiologie und -chemie mit dem Begriff *Photobleichung* beschrieben. Hierunter versteht man den Verlust an Absorptions- oder Emissionsintensität bei Belichtung (Verhoeven, 1996). Es werden zwei Typen irreversibler Photobleichung unterschieden, die beide auf einer chemischen Veränderung des Chromophors beruhen (Bonnett *et al.*, 1999). Bei der *Photomodifikation* findet der Absorptions- oder Fluoreszenzverlust nur bei bestimmten Wellenlängen statt und der Farbstoff bleibt in modifizierter Form erhalten. Bei der echten *Photobleichung* sind die chemischen Veränderungen tiefgreifender und resultieren in der Regel in der Spaltung des Chromophors in kleine Fragmente, die keine Absorption mehr im sichtbaren Wellenlängenbereich aufweisen. Meist laufen beide Prozesse gleichzeitig in verschieden starker Ausprägung ab. In Anwesenheit reduzierender Stoffe kann es auch zu Photoreduktionen kommen, die z.B. bei Chlorophyllen gut untersucht sind (Krasnovskii, 1948; Seely und Folkmanis, 1964; Scheer und Katz, 1974; Iakovides *et al.*, 1991). Im Zusammenhang mit der Photodynamischen Therapie handelt es sich nach Bonnett und Martinez (2001) jedoch meistens um oxidative Photobleichung, unter Beteiligung von ROS.

Bei den dabei ablaufenden chemischen Reaktionen in Lösung lagert sich Sauerstoff sowohl an Doppelbindungen peripherer Substituenten wie Vinylgruppen als auch an Doppelbindungen des zyklischen Tetrapyrrolringsystems an. Hierdurch kommt es zur Bildung polarer Funktionalitäten wie Hydroxy-, Keto- oder Formyl-Gruppierungen und zu oxidativer Spaltung des Ringsystems. Peroxide treten dabei oft als reaktive Intermediate auf. Es wird allgemein angenommen, dass [4+2] und [2+2]-Cycloadditionen von aktiviertem O<sub>2</sub> einen wesentlichen Bestandteil der ablaufenden Reaktionen darstellen. Die Produkte dieser Photooxidationen variieren mit dem Ausgangspigment (Bonnett und Martinez, 2001). Neben Photoprodukten geringer Größe, die im UV absorbieren, kommt es zur Öffnung des isozyklischen Rings oder zur Bildung von offenkettigen Tetrapyrrolen vom Typ der Biline. Die Abbildungen 1-4, 1-5 und 1-6 zeigen Beispiele von Photooxidationen und den dabei entstehenden Produkten. Die Untersuchung von Photoprodukten der Chlorophylle geschah bislang vor allem im Zusammenhang mit dem Seneszenzvorgang in Pflanzen. Dieser führt ebenfalls zu Bilinen, ist aber nicht unmittelbar lichtabhängig und wird enzymatisch gesteuert

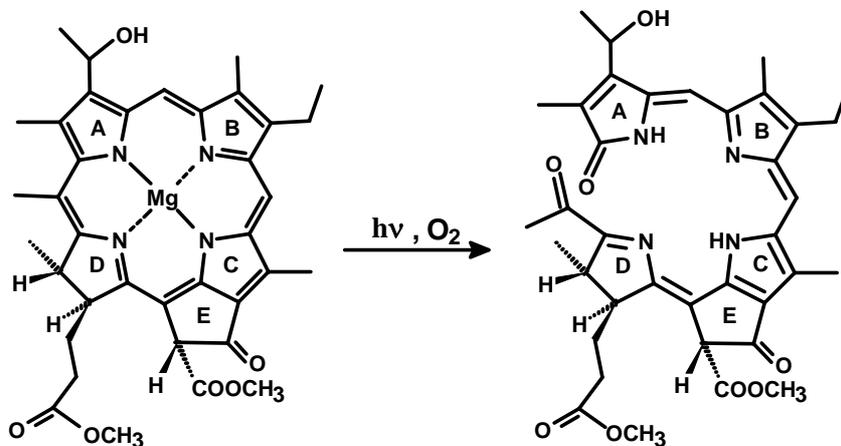
(Kräutler und Matile, 1999). Die bei der PDT von Tetrapyrrolen gebildeten Photoprodukte wurden bis jetzt kaum erforscht.



**Abbildung 1-4.** Photooxidation von Chl *a*, welches an lipophile, von Wasser umgebene Partikel adsorbiert war (Llewellyn *et al.*, 1990).



**Abbildung 1-5.** Spaltung des isozyklischen Rings von 13<sup>1</sup>-Desoxy-17<sup>3</sup>-Methylester-Pheid *a* (Ma und Dolphin, 1995).



**Abbildung 1-6.** Photooxidative Spaltung des Tetrapyrrolringensystems am Beispiel von BChl *c* (Troxler *et al.*, 1978; Brown *et al.*, 1980).

---

Die beschriebenen Vorgänge während der Photobleichung werden wesentlich durch die Pigmentumgebung beeinflusst. Einen wichtigen Faktor stellt die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels dar. Eine Erhöhung der Lösungsmittelpolarität bewirkt nach Bonnett und Martinez (2001) erhöhte Bleichung. Eine Veränderung der *in vitro* Bedingungen in Richtung der Verhältnisse, die in natürlicher Umgebung vorliegen, durch beispielsweise den Zusatz verschiedener Aminosäuren wie Cystein, Histidin oder Methionin zur Reaktionsmischung oder in Anwesenheit sogenannter Erythrocyten-Ghosts, führte unter anderem bei Protoporphyrin und Hämatoporphyrin ebenfalls zu erhöhter Photobleichung (Krieg und Whitten, 1984a; Krieg und Whitten, 1984b). Erythrocyten-Ghosts sind gewaschene natürliche Membransysteme von roten Blutkörperchen, die gesättigte und ungesättigte Lipide und die meisten integralen Membranproteine enthalten. Neben der direkten Oxidation des Photosensibilisators könnte somit eine durch die Biomoleküle initiierte Oxidation stattfinden, indem zunächst Teile von diesen durch die Reaktion mit aktiviertem O<sub>2</sub> in Peroxide, wie Persulfoxide oder Hydroperoxide, umgewandelt werden und dann mit dem Sensibilisator reagieren. Der Zusatz von menschlichem Serum Albumin (HSA) zu Sensibilisatoren (Mono-L-Aspartylchlorin e<sub>6</sub> oder Phthalocyanin-Derivaten) in Lösung bewirkt ebenfalls verstärkte Photobleichung (Roberts *et al.*, 1989; Kogan *et al.*, 1996). Schneckenburger *et al.* (1988) und Rück *et al.* (1990) zeigten zudem, dass Porphyrine unterschiedliche Zerfallscharakteristika in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in Zellen haben. Untersuchungen zur Photobleichung von Mono-L-Aspartylchlorin e<sub>6</sub> *in vivo* haben ergeben, dass hohe Bleichung mit großer Tumorzerstörung und geringe Bleichung mit nur schwacher Tumorzerstörung einhergeht (Katsumi *et al.*, 1996).

An diesen Beispielen wird deutlich, dass insbesondere eine den natürlichen Gegebenheiten ähnliche Umgebung den durch Photoreaktionen bedingten Abbau von Chromophoren wesentlich beeinflusst. Untersuchungen an natürlichen Proteinen, in denen eine Bindung der Pigmente möglich ist, können weitere Hinweise auf die Abhängigkeit der Photoreaktionen von der Pigmentumgebung und zusätzlich Einblick in mögliche Produkte der Photobleichung in ebendieser Umgebung liefern. In der vorliegenden Arbeit werden Myoglobin und Serum Albumin als derartige Modellsysteme untersucht.

## 1.3 Myoglobin und Serum Albumin als Modellsysteme

### 1.3.1 Myoglobin

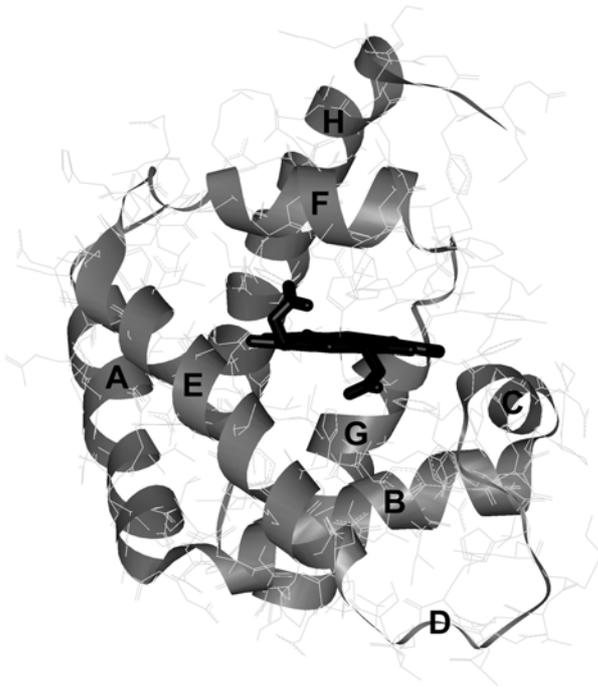
Myoglobin zählt zu den bislang am besten untersuchten Proteinen der Biochemie und -physik. Die Hauptaufgaben des Proteins sind der Sauerstofftransport und die Sauerstoffspeicherung im Muskelgewebe. Es ist das erste Protein, dessen dreidimensionale Struktur durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurde (Kendrew *et al.*, 1960). Seitdem wurden mehrere hochaufgelöste Strukturen ( $\leq 1,7 \text{ \AA}$ ) publiziert (Phillips, 1980; Kuriyan *et al.*, 1986; Bolognesi *et al.*, 1989; Quillin *et al.*, 1993; Rizzi *et al.*, 1993). Myoglobin besteht aus acht rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices (A – H), die durch kurze Peptidsegmente (Loops) miteinander verbunden sind (Abbildung 1-7). Etwa 75% seiner 153 Aminosäuren sind in diese Helices eingebunden. Das in dieser Arbeit verwendete Pferdeherz-Myoglobin besitzt ein Molekulargewicht von 16951 Da und enthält keine Cysteine. Das Innere dieses extrem kompakten, globulären Proteins besteht nahezu ausschließlich aus unpolaren Aminosäureresten. Lediglich die zwei an der Bindung des Kofaktors Fe-Protoporphyrin IX (= Protohäm) und dessen Liganden beteiligten Histidine, das proximale His93 (F8) und das distale His64 (E7), haben einen polaren Charakter. Seine gute Wasserlöslichkeit liegt an der großen Anzahl polarer Reste im Außenbereich.

Die für die Funktion der Sauerstoffbindung des Proteins entscheidende, nicht kovalent gebundene Hämgruppe ist in einer hydrophoben Tasche, die hauptsächlich von der E- und F-Helix gebildet wird, lokalisiert. Die Stabilisierung der Pigment-Protein-Assoziation wird durch drei wesentliche Faktoren erreicht (Hargrove *et al.*, 1996):

1. Hydrophobe Interaktionen zwischen apolaren Aminosäureresten und dem Porphyrin-Ring.
2. Die starke koordinative Bindung zwischen His93 und dem zentralen Eisenion.
3. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen peripheren Resten und koordinierten Wassermolekülen.

Hinzu kommen spezifische elektrostatische Interaktionen zwischen den zwei Propionsäureseitengruppen und den Seitenketten von Lys45, His97 und Ser92 an der Außenseite der Bindungstasche.

Der Kofaktor Fe-Protoporphyrin IX ist so in die Bindungstasche des Proteins eingelagert, dass dessen Ringe A und B tief im hydrophoben Inneren der Tasche verborgen sind. Sein Zentral-



**Abbildung 1-7.** Graphische Darstellung von Pferdeherz-Myoglobin (PDB-Eintrag 1AZI). Die acht Helices sind mit A – H beschriftet.

die zwei Propionsäureseitenketten in charakteristischer Weise aus der Tasche herausragen. Sie sind aus der Ebene des Makrozyklus herausgedreht und zeigen nach oben (C-17) bzw. unten (C-13) (Abbildung 3-7). Diese Seitenkettenkonformation wird auch von dem nicht natürlichen Kofaktor Biliverdin bei der Einlagerung in Myoglobin eingenommen (Wagner *et al.*, 1995).

Der natürliche, Eisen enthaltende Kofaktor in Myoglobin kann gegen eine Vielzahl anderer Tetrapyrroliganden ausgetauscht werden. Es konnten sowohl offenkettige Tetrapyrrole wie Bilinchromophore (Falk *et al.*, 1990b), als auch zyklische Tetrapyrrole mit und ohne Zentralmetall eingelagert werden. Beispiele sind Zentralmetall-freie Protoporphyrine (Breslow und Koehler, 1965; Breslow *et al.*, 1967), Cu-, Mg-, Zn-, Mn- und Co-Protoporphyrine (Alston und Storm, 1979; Choon und Rodley, 1983; Shibata und Kushida, 1998; Taniguchi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000) sowie Chlorophyllin (Davis und Pearlstein, 1979) und Chlorophyllid (Boxer und Wright, 1979).

metall ist an His93 gebunden, eine schwache Interaktion erfolgt mit dem distalen His64, das seine entscheidende stabilisierende Wirkung erst durch polare Interaktionen mit einem O<sub>2</sub>- oder H<sub>2</sub>O-Molekül entfaltet (Olson, 1997). Diese elektrostatische Interaktion ist der wesentliche Faktor für die (relativ) hohe Stabilität von Oxymyoglobin im Vergleich mit CO-Myoglobin. Die bislang angenommenen sterischen Faktoren (Stryer, 1991) im Zusammenhang mit der verringerten Affinität von Myoglobin für CO spielen eine nur untergeordnete Rolle. Die Ringe C und D des Kofaktors sind in der Nähe der Peripherie der Tasche lokalisiert, wobei

### 1.3.2 Serum Albumin



**Abbildung 1-8.** Graphische Darstellung von menschlichem Serum Albumin (HSA) mit gebundenem Protohäm und Myristat-Liganden (PDB-Eintrag 1N5U).

Ähnlich wie Myoglobin gehört Serum Albumin zu den sehr gut untersuchten Proteinen der Biochemie. Seine leichte Zugänglichkeit, große Stabilität und hohe Affinität für kleine Moleküle sehr variabler Struktur begründen seinen Einsatz bei einer Vielzahl unterschiedlicher Experimente. Schon 1839 (Ansell, 1839) wurde es als wesentlicher Bestandteil des Blutes identifiziert. Aufgrund seiner im Verhältnis zu anderen Plasmaproteinen relativ niedrigen molekularen Masse (66.000 Da) und hohen Konzentration (35-40 g/l Plasma) ist es für ca. 80% des kolloid-

osmotischen Drucks des Blutes verantwortlich (Klinke und Silbernagl, 1996). Außerdem trägt es wesentlich zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Blut bei (Figge *et al.*, 1991). Seine Eigenschaft als Transportprotein für Abbauprodukte der roten Blutkörperchen, wie z.B. das beim Abbau von Protohäm entstehende offenkettige Tetrapyrrol Bilirubin (Emerson, 1989), für Fettsäuren (Spector *et al.*, 1969), Stickstoffmonoxid (Stamler *et al.*, 1992) und viele weitere Liganden wie Hematin, Pyridoxal-Phosphat, Cystein, Glutathion, diverse Metallionen (Cu, Ni, Hg, Ag, Au) sowie verschiedene medikamentöse Wirkstoffe (z.B. Ibuprofen, Salicylsäure und Warfarin) impliziert eine hohe Affinität für verschiedenartige Liganden und die damit verbundene Existenz unterschiedlicher Bindungsstellen (Carter und Ho, 1994).

Das gut wasserlösliche Protein besteht aus 585 (menschliches Serum Albumin = HSA) bzw. 583 (Rinderserumalbumin = BSA) Aminosäuren mit einem hohen Anteil an Cysteinen, die unter anderem für die leichte Bildung von Dimeren oder höhermolekularen Aggregaten in Lösung verantwortlich sind (Peters, 1985). Die dreidimensionale Struktur von Albumin setzt sich aus drei homologen Domänen (I, II und III) mit jeweils zwei Subdomänen (IA, IB etc.) zusammen, die hauptsächlich helical organisiert sind und einer starken Quervernetzung durch Disulfidbrücken unterliegen (Carter und Ho, 1994). Insgesamt zeigt das Molekül eine herzförmige Form (Abbildung 1-8). Die Hauptbindungsregionen für Liganden in HSA liegen in hydrophoben Einbuchtungen der Subdomänen IIA und IIIA (He und Carter, 1992). Sie werden auch als Site I und Site II bezeichnet (Pandey *et al.*, 1997). Aufgrund der 76-prozentigen Sequenzhomologie von HSA und BSA (Peters, 1985) ist davon auszugehen, dass

BSA ähnliche Ligandenbindungsstellen besitzt. Eine Kristallstruktur von BSA ist bislang nicht erhältlich.

Eine im Zusammenhang mit der Photodynamischen Tumorthherapie wichtige Entdeckung betrifft die Bindungsstelle II. Pandey *et al.* (1997) stellten fest, dass eine direkte Korrelation zwischen der *in vivo* Photosensibilisierungseffektivität von Bakteriochlorin-Derivaten und deren Affinität für Site II besteht. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen zellulären Rezeptor-/Bindungsstellen und der Site II, die auch als Diazepam-(Valium)-Bindungsstelle bezeichnet wird.

Cytochrom-c-Oxidase scheint eines der Zielproteine bei der zellulären PDT zu sein (Gibson und Hilf, 1993). Es ist an der Innenseite der Mitochondrienmembran lokalisiert. Der mitochondriale Benzodiazepin-Rezeptor auf der Außenseite der Membran wird als „Schleuse“ für Porphyrine angesehen (Verma *et al.*, 1992). Nach Einschleusen der photodynamisch aktiven Chromophore in die Zelle (z.B. über Lipoprotein-Rezeptoren (Jori und Reddi, 1993)), könnten diese über den Benzodiazepin-Rezeptor in die Mitochondrien gelangen und dort den respirativen Apparat zerstören. Die Ähnlichkeit dieses Rezeptors mit der Site II in Albumin erklärt dann die erhöhte PDT-Wirksamkeit der daran bindenden Chromophore. Die Funktion von HSA als endogener Träger für Porphyrin-Chromophore in der PDT wird aufgrund seiner Affinität für Porphyrine ebenfalls diskutiert (Moan *et al.*, 1985). Wardell *et al.* veröffentlichten 2002 die Kristallstruktur von Methämalbumin. Darin ist erstmals die Bindungssituation eines zyklischen Tetrapyrrols in Albumin sichtbar. Der Chromophor ist hier in einer hydrophoben Tasche der Subdomäne IB, einer der Hauptbindungsstellen für langkettige Fettsäuren, gebunden. In Abbildung 1-8 ist dieser Komplex gezeigt.

Albumin bietet somit ebenso wie Myoglobin die Möglichkeit, die Photo-Reaktivität proteingebundener Photosensibilisatoren zu untersuchen. Darüber hinaus können durch Vergleich beider Systeme die spezifischen Interaktionen zwischen Pigmenten und Proteinen studiert werden. Einen Überblick über die spezifischen Eigenschaften der Bindungsstellen ausgewählter Tetrapyrrole in natürlichen Pigment-Protein-Komplexen gibt das folgende Kapitel.

## 1.4 Bindung von Tetrapyrrolen in natürlichen Proteinen

Wie in Kapitel 1.1.2 dargestellt, übernehmen Häm-Proteine sehr viele unterschiedliche Funktionen. Bis auf geringe Modifikationen der Seitenketten, die vor allem dann nötig sind, wenn der Chromophor kovalent gebunden wird, ist die elektronische Grundstruktur des Häm-Chromophors, mit Ausnahme der Häme vom d-Typ und des Sirohäms, konserviert (Mogi,

2003). Die Funktionsvielfalt muss daher zu einem großen Teil durch Interaktionen mit dem umgebenden Proteingerüst stattfinden. Ein wesentlicher Punkt sind hierbei Art und Zahl der das zentrale Eisen koordinierenden Aminosäure(n) (Wilks, 2002). In den meisten Häm-Proteinen wird die fünfte Koordinationsstelle des Eisens in Form einer starken Bindung an ein Histidin besetzt. Hinzu kommen kann ein zweites Histidin, das als sechster Ligand fungiert, z.B. in Cytochrom *c*<sub>6</sub>, Cytochrom *b*<sub>5</sub> oder in der Cytochrom-*c*-Oxidase. Die sechste Koordinationsstelle kann aber auch durch das Schwefelatom eines Methionins gefüllt werden, z.B. in Cytochrom *b*<sub>562</sub>. Diese sechsfach koordinierten Häme spielen vor allem beim Elektronentransport eine Rolle. In Häm-Proteinen, die am Sauerstofftransport beteiligt sind oder als Oxidoreduktasen fungieren, ist der Tetrapyrrolkofaktor nur fünffach ligandiert. Die sechste Koordinationsstelle kann dann von einem Sauerstoffmolekül oder auch von Wasser besetzt werden. Der fünfte Ligand ist hier wiederum sehr häufig ein Histidin, aber auch Tyrosin oder Cystein können diese Funktion übernehmen. All diesen koordinierenden Aminosäuren gemeinsam ist ihre Nukleophilie. Die sowohl bei organisch gebundenem Stickstoff als auch bei Sauerstoff oder Schwefel vorhandenen freien Elektronen können mit dem Fe-Zentralmetall polare Wechselwirkungen aufbauen und so den Kofaktor im Protein stabilisieren. Hinzu kommen hydrophobe Wechselwirkungen an der Peripherie des Chromophors sowie Interaktionen mit aromatischen Aminosäuren, die eine Feintuning der Chromophoreigenschaften ermöglichen. Dies wird zum Beispiel an der durch die Proteinumgebung in Myoglobin induzierten optischen Aktivität des achiralen Protohäms deutlich (Myer und Pande, 1978).

In den Chlorophyll-Proteinen von photosynthetisch aktiven Organismen erfordert die Absorption von Lichtenergie und deren Weiterleitung in den Antennen bis zum Reaktionszentrum eine ebenso durch die Proteinumgebung ermöglichte Feinabstimmung der energetischen Eigenschaften der Chromophore. Sowohl in den Reaktionszentren von Purpurbakterien (Deisenhofer *et al.*, 1985; Ermler *et al.*, 1994) als auch im Lichtsammelkomplex LH1 (Zuber und Cogdell, 1995) wird die fünfte Koordinationsstelle des zentralen Magnesiums aller Bakteriochlorophylle durch ein Histidin besetzt. Im Lichtsammelkomplex LH2 von *Rhodospseudomonas acidophila* sind die 18 BChl, die bei 850 nm absorbieren, ebenfalls durch ein Histidin fünffach koordiniert, die neun, bei 800 nm absorbierenden BChl hingegen werden durch den Carbonylsauerstoff eines N-terminalen N-Formyl-Methionins ligandiert (McDermott *et al.*, 1995). Die gezielte Mutation der die BChl bindenden Aminosäuren in bakteriellen Reaktionszentren machte deutlich, dass die Anwesenheit eines geeigneten Liganden über die Besetzung mit BChl oder dem Zentralmetall-freien BPhe entscheidet (Bylina *et al.*, 1988; Chirino *et al.*, 1994). Hierbei ist

der Ersatz des Histidins durch Glutamin, Asparagin, Serin oder Threonin möglich (Coleman und Youvan, 1990; Bylina und Youvan, 1991; Scheer und Struck, 1993). Die Reste dieser Aminosäuren besitzen alle ein nukleophiles Sauerstoff- oder/und Stickstoffatom. Bindungsstellen, die ausschließlich BPhe binden, weisen anstelle der polaren Aminosäurereste große, unpolare Reste wie Isoleucin auf (Scheer und Hartwich, 1995). Dieser Rest kann weder polar mit einem zentralen Mg-Atom interagieren, noch ist Platz für ein an das Magnesium koordinierendes Wassermolekül. Weitere Pigment-Austauschversuche (Scheer und Hartwich, 1995) in bakteriellen Reaktionszentren zeigten, dass auch in der Peripherie der Kofaktoren selektive Pigment-Protein-Interaktionen stattfinden. Modifikationen am isozyklischen Ring E führen bis auf die Hydroxylierung an C-13<sup>2</sup> zur Inhibition der Pigmentbindung. Darüber hinaus wird nur das S-Epimer von 13<sup>2</sup>-OH-BChl *a* gebunden. Hier weist die Carbomethoxygruppe an C-13<sup>2</sup> auf dieselbe Seite wie in 13<sup>2</sup>R-BChl *a*, das natürlicherweise gebunden wird. Weder Chl *a* noch 3-Acetyl-Chl *a*, die nur in Form eines Acetyl/Vinyl-Substituenten (Chl *a*) bzw. dem Fehlen zweier H-Atome an Ring B (3-Acetyl-Chl *a*) von BChl *a* differieren, konnten inkorporiert werden. Die selektive Interaktion eines Glutamin-Restes mit dem 13<sup>1</sup>-Carbonylsauerstoff eines BPhe im Reaktionszentrum (Allen *et al.*, 1987; Michel und Deisenhofer, 1988; Lutz und Mäntele, 1991; El-Kabbani *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1991) führt zur starken Rotverschiebung der Q<sub>x</sub>-Bande dieses Pigments. Neben der Feintuning der Pigmenteigenschaften im bakteriellen Reaktionszentrum durch das Protein, tragen die Pigmente wesentlich zur Stabilisierung des ganzen Komplexes bei (Scheer und Hartwich, 1995). Dies gilt auch für die Chlorophylle von Photosystem II (Vermaas, 1993).

Die hohe Selektivität der Lichtsammelkomplexe für Chl *a* bzw. Chl *b* an bestimmten Bindungspositionen machten die Mutationsanalysen der Gruppe um R. Bassi deutlich (Remelli *et al.*, 1999; Bassi *et al.*, 1999). Die Selektion von Chl *a* gegenüber Chl *b* wird beispielsweise durch die Reste Glutamat (→ Chl *a*) und Glutamin (→ Chl *b*) erreicht. Hinzu kommt die Bedeutung der Proteinumgebung neben der direkt Chl-bindenden Aminosäure. Die in Chlorophyll-Proteinen neben Histidin wichtigsten direkt bindenden Aminosäuren sind Glutamat und Arginin, welche als Ionenpaar das Chl-Molekül einschließen, sowie Asparagin und Glutamin (Bassi *et al.*, 1997). Wie hochspezifisch Pigment-Protein-Interaktionen sein müssen, zeigt außerdem die stereospezifische Koordination der Kofaktoren (Balaban *et al.*, 2002; Balaban, 2003). Der Ligand tritt entweder „von unten“ ( $\alpha$ ) oder „von oben“ ( $\beta$ ) mit dem Zentralmetall in Kontakt. Dies ist für jede Bindungsstelle einzigartig und evolutiv konserviert. Weitere Hinweise auf die genaue Einpassung der Kofaktoren ins Proteingerüst lieferte die Entdeckung, dass das Photosystem I oxygener Organismen genau ein Molekül des

---

S-Epimers von Chl *a* enthält (Nakamura *et al.*, 2003), und die entsprechenden Epimere von Chl *d* und BChl *g* in anderen Typ-I-Reaktionszentren gefunden wurden (Kobayashi *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 2002).

## 1.5 Aufgabenstellung

Da die chemischen und photophysikalischen Eigenschaften natürlicher Chromophore stark durch ihre jeweilige Mikroumgebung beeinflusst werden und gleichzeitig die natürlichen Systeme aufgrund ihres hohen Grades an Komplexität sehr schwer zu analysieren sind, ist es von besonderem Interesse den einzelnen Chromophor gezielt in einer dem natürlichen System möglichst ähnlichen *in vitro*-Umgebung zu untersuchen. Das bei der Untersuchung natürlicher Chlorophyll-Proteine auftretende Problem der Chlorophyll-Chlorophyll-Interaktionen und die in wässrigen Systemen bei nicht proteingebundenen Chlorophyllen auftretenden Pigment-Aggregationen können durch die Komplexierung von Chlorophyll-Derivaten durch Myoglobin bzw. Albumin vermieden werden. Die nur schwer wasserlöslichen Pigmente sind hier in monomerer Form an hydrophile Proteine gebunden und können so in wässriger, lösungsmittelfreier Umgebung gelöst und analysiert werden. Chlorophyll-Chlorophyll-Interaktionen und Pigment-Aggregationen sind hierdurch ausgeschlossen. Die wechselseitige Beeinflussung von Chromophor und Protein kann auf diese Weise unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht werden. Insbesondere dienen diese künstlichen Pigment-Protein-Komplexe als Modellproteine für die PDT. Daneben fungieren die stark fluoreszierenden Chlorophylle als Sonden bei der Erforschung der Proteindynamik (Schlichter *et al.*, 2000).

Im Vordergrund dieser Arbeit standen folgende Ziele:

1. Rekonstitution: Etablierung und Verbesserung des Rekonstitutionssystems von Apo-Myoglobin mit Chlorophyll-Derivaten.
2. Präparation: Entwicklung eines Präparationssystems monomerer Chlorophyll-Albumin-Komplexe.
3. Photochemie: Untersuchung der Photochemie ausgewählter Chlorophyll-Derivate in den beiden Pigment-Protein-Systemen.
4. Proteinbindung: Charakterisierung wesentlicher die Pigmentbindung beeinflussender Faktoren.
5. Stabilität: Erforschung der Stabilität von Myoglobin im Hinblick auf den Einfluss unterschiedlicher Chromophore in der Bindungstasche.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### Zentrifugation

###### *Tischzentrifugen:*

- Sigma 3K18 C (B. Braun, Melsungen), Rotoren: 12154 und 12155
- Biofuge fresco (Kendro, Hanau)

##### Elektrophorese

###### *Analytische Elektrophoresekammer:*

- Mini-Protean III Dual-Slab Cell (Bio-Rad, München)

###### *Präparative Elektrophoresekammer:*

- Protean II xi / XL Vertical Electrophoresis Cells (Bio-Rad)

###### *Spannungsquelle:*

- Constant Voltage Power Supply 1000/500 (Bio-Rad)

##### Dokumentation

###### *Kamera Fluoreszenzgedetektion:*

- CD KP161 (Hitachi, Maidenhead, GB)

###### *Digitalisierung gefärbter und nativer Proteingele:*

- Camedia Digital Camera C-2000 Z (Olympus, Hamburg)
- hp scanjet 7400 c (Hewlett-Packard, Bad Homburg)

##### Sonstige Geräte

*Rotationsverdampfer:* Rotavapor-R (Büchi, Essen)

*Kryostat:* K20/DC1 (Thermo Haake, Karlsruhe)

*Vakuumpumpe:* Membranvakuumpumpe MZ 2C (Vaccuubrand, Wertheim)

Alle weiteren Geräte und deren Hersteller werden bei der Beschreibung der einzelnen Methoden genannt.

### 2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel in der höchstmöglichen Reinheitsstufe sowie zweifach entionisiertes Wasser verwendet. Im Folgenden wird eine Aufstellung der bei Reaktionen direkt eingesetzten Feststoffe gegeben.

- Cadmiumacetat (Fluka, Buchs)
- Eisen(II)chlorid (Merck, Darmstadt)
- Guanidinium-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumacetat (Merck)
- Natriumascorbat (Sigma-Aldrich)
- Natriumdithionit (Merck)
- Nickelchlorid (Fluka)
- Zinkacetat (Merck)

### 2.1.3 Lösungsmittel

Mit Ausnahme von Diethylether, Ethylmethylketon und Ethylacetat wurden alle Lösungsmittel ohne weitere Aufreinigung verwendet. Diethylether, Ethylmethylketon und Ethylacetat wurden vor ihrem Einsatz destilliert. Es folgt eine Aufstellung der verwendeten Lösungsmittel, die alle von analysenreiner (p.a.) Qualität waren.

- Aceton (AppliChem, Darmstadt)
- Diethylether (Zewa, Harthausen)
- Dimethylformamid (Roth, Karlsruhe)
- Eisessig (konz. Essigsäure) (Roth)
- Ethanol (Roth)
- Ethylacetat (AppliChem)
- Ethylmethylketon (Merck)
- 2-Propanol (Merck)
- Methanol (J.T. Baker, Deventer, NE)
- Methylenchlorid (Fluka)
- Pyridin (Fluka)
- Tetrahydrofuran (Merck)
- Toluol (Scharlau, Barcelona, ES)
- Trifluoressigsäure (Merck)

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 2-1:** In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	10% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Blau-Färbelösung	0,15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg) 40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Elutionspuffer	100 mM Natriumphosphat pH 7,8
FPLC-Laufpuffer	10 mM Natriumphosphat pH 6,3 150 mM NaCl
Native-PAGE-Auftragspuffer	10 mM Natriumphosphat pH 6,3 30% (w/v) Glycerin
Native-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3 192 mM Glycin
Puffer-I	10 mM Natriumphosphat pH 6,3
Puffer-II	10 mM Natriumphosphat pH 6,3 0,1% (v/v) Triton-X-100 2 mM EDTA 1 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
Puffer-III	50 mM Kaliumphosphat pH 7,3
Trispuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,3

### 2.1.5 Proteine

Für die Darstellung der künstlichen Pigment-Protein-Komplexe wurden folgende gefriergetrockneten Proteine verwendet und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt:

- *Pferdeherzmyoglobin* (Mb)  
(90%, lyophilized, PhastGel, M-1882, Sigma-Aldrich)
- *Rinderserumalbumin* (BSA)  
(99%, electrophoresis, A-0281, Sigma-Aldrich)

## 2.2 Spektroskopische Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Bedingungen

Alle Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Spektren der Pigment-Protein-Komplexe wurden in Puffer-I aufgenommen, davon abweichende Aufnahmebedingungen werden bei den jeweiligen Spektren gesondert angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *MicroCal Origin 6.1* (OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA).

### 2.2.2 UV/Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme von UV/Vis-Absorptionsspektren erfolgte entweder mit einem Lambda 25 UV/VIS Spectrometer und der Software *UV Winlab Vers. 2.85.04* von Perkin Elmer (Überlingen) oder mit einem UV 2401 PC Spectrometer der Firma Shimadzu (Überlingen) und der Software *Spectacle (Version 1.55)* von LabControl (Köln). Die Absorptionsspektren während der Belichtungszyklen (s. unten) wurden grundsätzlich am UV 2401 PC Spectrometer aufgenommen.

### 2.2.3 Zirkulardichroismus

Die CD-Spektren der Pigment-Mb-Komplexe und deren Denaturierung mit Guanidin wurden am Dichrograph CD (Jobin-Yvon, Grasbrunn) mit dem Detektor Hamamatsu-Photomultiplier R 374 (300-800 nm) und der firmeneigenen Software *Dichrograph Vers. 1.1* aufgenommen. Die Aufnahme von CD-Spektren der Pigment-BSA-Komplexe sowie die Detektion sämtlicher thermischen Denaturierungsexperimente erfolgte mit einem Jasco 715 Spectropolarimeter (Jasco Corp., Tokyo, Japan) ausgestattet mit einem PFD-350S Temperatur-Controller. Die hierbei verwendete Software war *Spectra Manager* (Jasco Corp.).

### 2.2.4 Massenspektroskopie

Die Massenspektren von Proteinen und Pigmenten wurden von Granvogel (Arbeitsgruppe Eichacker, Department Biologie I – Botanik, LMU München) an einem Q-TOF-I hybrid Massenspektrometer (Micromass, Manchester, GB) ausgestattet mit einer orthogonalen Nano-Elektrospray-Ionisierungsquelle (positiver Elektrospray-Ionisierungsmodus) aufgenommen. Zur Auswertung diente das Programm *MassLynx Version 4.0* (Micromass).

### 2.2.5 Protonen-NMR-Spektroskopie

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren der rekonstituierten Mb-Komplexe wurden in Zusammenarbeit mit Krajewski (Arbeitsgruppe Holak, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) an einem DRX 600 Spectrometer (Bruker, Karlsruhe) bei 300 K in Puffer-I mit 25% D<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software *XWinNMR Software Paket* (Bruker).

### 2.2.6 Raman-Spektroskopie

Die Messung von Resonanz-Raman-Spektren wurde in Zusammenarbeit mit Robert (Section de Biophysique des Protéines et des Membranes, DBCM/CEA und URA CNRS 2096, CEA-Saclay, Gif sur Yvette Cedex, FR) durchgeführt. Die Spektren wurden bei 77 K in einem SMC-TBT flow Kryostat, ausgestattet mit einem N<sub>2</sub>-gekühlten CCD-Detektor (Spectrum One, Longumaeu, FR) unter Verwendung eines U1000 Raman Spektrophotometers (Jobin-Yvon, Longumaeu, FR) gemessen. Angeregt wurde mit einem Innova 100 Argon Laser (457,9 und 488,0 nm, Coherent, Santa Clara, CA, USA), einem Innova 90 Krypton Laser (406,7 und 413,1 nm, Coherent) oder einem Helium-Cadmium-Laser (441,6 nm, Liconix, Santa Clara, CA, USA). Die Pigment-Protein-Komplexe lagen in Puffer-I vor, die freien Pigmente wurden in THF gelöst.

## 2.3 Chromatographische Methoden

Im Folgenden nicht aufgeführte chromatographische Methoden und Materialien werden bei der Beschreibung der jeweiligen Darstellungsverfahren genannt. Alle Angaben der Laufmittelzusammensetzungen erfolgen in Volumenprozent (v/v).

### 2.3.1 Analytische Dünnschicht-Chromatographie

**I. Stationäre Phase:** C-18-*reversed-phase*, HPTLC-Platten, 10x10 cm, Merck  
System-RP-I:

Mobile Phase: 4% H<sub>2</sub>O (mit 0,005% HCl bei Fe-Pheid), 38% Aceton,  
58% Methanol

Anwendung: Kontrolle der enzymatischen Hydrolyse von Chl *a* zu Chlid *a*,  
Reinheitskontrolle von Fe-Pheid *a*

System-RP-II:

Mobile Phase: 100% Methanol

Anwendung: Reinheitskontrolle von Chl *a*, BChl *a* und Cd-BPhe *a*

**II. Stationäre Phase:** C-8-reversed-phase F<sub>254s</sub>, HPTLC-Platten, 10x10 cm, MerckSystem-RP-III:

Mobile Phase: 40% 2-Propanol, 60% 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,1

Anwendung: Reinheitskontrolle von PCB

**III. Stationäre Phase:** Kieselgel-60, HPTLC-Platten, 10x10 cm, MerckSystem-K-I:

Mobile Phase: 5% Aceton, 95% Toluol

Anwendung: Reinheitskontrolle von BPhe *a*

System-K-II:

Mobile Phase: 10% Aceton, 90% Toluol

Anwendung: Reinheitskontrolle von BPheid *a* und Kontrolle der Umesterung von BPhe *a* an Position C-17<sup>3</sup> zu 17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a*

System-K-III:

Mobile Phase: 2% 2-Propanol, 8% Methanol, 10% Aceton, 80% Toluol

Anwendung: Reinheitskontrolle von Pheid *a*, Zn-Pheid *a* und 13<sup>2</sup>-OH-Zn-Pheid *a* und Kontrolle der Zink-Insertion in 17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a*

System-K-IV:

Mobile Phase: 41,5% Toluol, 41,5% Chloroform, 8,5% Methanol, 8,5% Aceton

Anwendung: Reinheitskontrolle von Zn-BPheid *a*

System-K-V:

Mobile Phase: 60% Toluol / Hexan (4:1, v:v), 40% Aceton / Methanol / 2-Propanol (5:4:1, v:v)

Anwendung: Reinheitskontrolle von Ni-BPheid *a*

### 2.3.2 Präparative Dünnschicht-Chromatographie

Die stationäre Phase der präparativen Dünnschicht-Chromatographie bestand in allen Fällen aus Kieselgel 60 H der Firma Merck. Sämtliche Laufmittel wurden vor ihrer Verwendung entgast und mit Argon gesättigt. Die Trennung erfolgte ebenfalls unter Schutzgasatmosphäre.

#### System-D-I:

Mobile Phase: 5% Aceton, 95% Toluol

Anwendung: Aufreinigung von BPhe *a* und  $17^3$ -Ethyl-Zn-BPheid *a*

#### System-D-II:

Mobile Phase: 3% 2-Propanol, 12% Methanol, 15% Aceton, 70% Toluol

Anwendung: Aufreinigung von Pheid *a* und BPheid *a*

#### System-D-III:

Mobile Phase: 1% 2-Propanol, 4% Methanol, 5% Aceton, 90% Toluol

Anwendung: Aufreinigung von Cd-BPhe *a*

#### System-D-IV:

Mobile Phase: 2% 2-Propanol, 8% Methanol, 10% Aceton, 80% Toluol

Anwendung: Aufreinigung von Zn-BPheid *a* und Ni-BPheid *a*

#### System-D-V:

Mobile Phase: 10% Aceton, 90% Toluol

Anwendung: Aufreinigung von  $17^3$ -Ethyl-BPheid *a*

#### Herstellung der präparativen Kieselgelplatten:

300 g Kieselgel wurden mit 750 ml Wasser zu einer homogenen Masse verrührt. Als Oxidationsschutz der Pigmente in der stationären Phase wurden 1,5% (wt/v) Natriumascorbat hinzugefügt. Nach mindestens einstündigem Quellen wurde das Kieselgel auf 20x20 cm Glasplatten in einer Schichtdicke von 0,75 mm aufgetragen. Man erhält ca. 25 Platten, die für 2 Tage an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

#### Aufarbeitung:

Mit Hilfe eines Spatels wurde die gewünschte Pigment-Kieselgelbande von der Glasplatte abgekratzt und in Aceton aufgenommen. Da sich Natriumascorbat und Kieselgel zu einem

geringen Prozentsatz in Aceton lösen, wurde die Suspension mit Ethylacetat bzw. Diethylether, je nachdem ob die freie Säure oder deren Ester vorlagen, und Wasser extrahiert. Das Lösungsmittel wurde nach Entfernen der wässrigen Phase im Scheidetrichter am Rotationsverdampfer abgezogen. Eventuelle Wasserreste wurden im Anschluss durch Kodestillation mit Aceton / Toluol (ca. 1/3) entfernt.

### **2.3.3 Präparative Säulenchromatographie**

#### System-S-I:

Stationäre Phase: DEAE-Sepharose-CL-6B (Amersham-Pharmacia, Freiburg)  
Mobile Phase: 100% Aceton (evtl. Gradient auf 75% Aceton / 25% Methanol)  
Anwendung: Aufreinigung von Chl *a* (Omata und Murata, 1983)

#### System-S-II:

Stationäre Phase: CM-Sepharose-CL 6B (Amersham-Pharmacia)  
Mobile Phase: 1. 100% Aceton  
2. Stufengradient: 2 / 5 / 10 / 15 / 20% Methanol in Aceton  
Anwendung: Aufreinigung von Chlid *a* (Fiedor, 1994)

Die bei den Systemen S-I und S-II aufgefangenen Pigmentfraktionen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und unter Argon bei -20 °C gelagert.

#### System-S-III:

Stationäre Phase: Kieselgel RP 8 (23 – 63 µm) 60 Å (ICN, Eschwege)  
Mobile Phase: 40% Isopropanol, 60% 50 mM KPP pH 2,1 (v/v)  
Anwendung: Aufreinigung von PCB (Storf, 2003)

Nach dem Auffangen der sauberen PCB-Fraktion von der Säule, wurde diese im System Chloroform/Wasser ausgeschüttelt. Der Chromophor geht hierbei in die Chloroformphase über. Das Lösungsmittel wurde dann am Rotationsverdampfer abgezogen und das trockene Pigment unter Argon bei -20 °C gelagert.

### 2.3.4 Analyse und Aufreinigung mit HPLC

Die verwendete HPLC-Einheit bestand aus einer Pumpen- und Kontrollvorrichtung (600E multisolvent/delivery system) der Firma Waters (Milford, USA) in Verbindung mit einem in-line degasser (Waters). Die Aufnahme von Absorptionsspektren während der HPLC erfolgte mit einem Diodenarray-Spectrophotometer (Tidas) der Firma J&M (Aalen). Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm *Spectacle (Version 1.55)* von LabControl. Sämtliche verwendeten Lösungsmittel wurden während der HPLC-Läufe mit Helium gespült. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 2.3.4.1 *Analytische HPLC*

Stationäre Phase: Grom-Sil 120, ODS-4, HE, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm (Grom, Herrenberg-Kayh)

Mobile Phase: Laufmittel A: 100% Aceton;  
Laufmittel B: H<sub>2</sub>O mit 25 mM Ammoniumacetat  
Gradient: 0 min – 50% B; 23 min – 38% B; 29 min – 0% B; 32 min – 50% B, 40 min – 50% B  
Flussrate: 1 ml/min

Anwendung: Reinheitskontrolle und Analyse sämtlicher für die Photoreaktionen verwendeter Pigmente

Die Identifizierung der Pigmente erfolgte durch kochromatographischen Vergleich mit authentischen Substanzen bekannter Struktur (MS, Absorption, <sup>1</sup>H-NMR).

#### 2.3.4.2 *Präparative HPLC*

Stationäre Phase:  $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$  C18, 125 Å 10  $\mu\text{m}$ , 19 x 30 mm (Waters)

Mobile Phase: Laufmittel A: 100% Aceton  
Laufmittel B: H<sub>2</sub>O mit 25 mM Ammoniumacetat  
Gradient: 0 min – 50% B; 10 min – 50% B; 20 min – 46% B; 30 min – 42% B; 50 min – 38% B; 70 min – 20% B; 80 min – 0% B; 120 min – 0% B  
Flussrate: 3 ml/min

Anwendung: Aufreinigung von Zn-Pheid *a* und 13<sup>2</sup>-OH-Zn-Pheid *a*

Aufarbeitung:

Die nach dem fraktionierten Auffangen von der Säule in einem Gemisch aus Aceton und H<sub>2</sub>O mit 25 mM Ammoniumacetat vorliegenden Pigmente wurden im System Ethylacetat/Wasser extrahiert. Wichtig ist hierbei zum einen eine gründliche Extraktion der Ethylacetatphase mit Wasser zur vollständigen Entfernung des Ammoniumacetats, zum anderen ein schnelles Arbeiten, um Oxidationen zu vermeiden. Das Lösungsmittel wurde nach Entfernen der wässrigen Phase am Rotationsverdampfer abgezogen. Eventuelle Wasserreste wurden im Anschluss daran durch Kodestillation mit Aceton/Toluol (ca. 1/3) entfernt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC untersucht und bei Identität vereinigt.

**2.3.5 Analytische FPLC**

Die verwendete FPLC-Einheit bestand aus zwei Pumpen (Pump P-50, Pharmacia, Freiburg) und einer Kontrollvorrichtung (Pharmacia LKB GP-10, Pharmacia). Die Aufnahme von Absorptionsspektren während der FPLC erfolgte mit einem Diodenarray-Spectrophotometer (Tidas) der Firma J&M. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm *Spectacle* (Version 1.55) von LabControl. Die Proteine wurden jeweils in einer Konzentration von 3-5 mg/ml in einem Volumen von 700 µl (Mb-Komplexe) bzw. 120 µl (BSA-Komplexe) eingespritzt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

System-F-I:

Stationäre Phase: Superdex™ 200, Hi Load™ 16/60, prep grade (Amersham-Pharmacia)

Mobile Phase: 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4, 150 mM NaCl

Flussrate: 0,75 ml/min

Anwendung: Größenanalyse der Pigment-Mb-Komplexe

System-F-II:

Stationäre Phase: Superdex™ 200, 10/300 GL Column (Tricorn) (Amersham-Pharmacia)

Mobile Phase: 10 mM Natriumphosphat pH 6,3, 150 mM NaCl

Flussrate: 0,5 ml/min

Anwendung: Größenanalyse der Pigment-BSA-Komplexe

Zur Eichung der Säulen wurden der HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit (Amersham-Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) verwendet. Eine Übersicht

über die darin enthaltenen Eichproteine und deren Molekulargewicht geben die folgenden Tabellen:

<b>HMW</b>	<b>MW (kDa)</b>	<b>LMW</b>	<b>MW (kDa)</b>
Aldolase	158	Ribonuclease A	13,7
Catalase	232	Chymotrypsinogen A	25
Ferritin	440	Ovalbumin	43
Thyroglobulin	669	Albumin	67

## 2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

### 2.4.1 Dialyse

Die zur Entfernung hoher Säurekonzentrationen bzw. Lösungsmittelreste und zur Überführung der Proteine in geeignete Puffer erforderliche Dialyse während der Darstellung der Pigment-Protein-Komplexe wurde mit Dialyseschläuchen (SERVAPOR<sup>®</sup> dialysis tubing, Serva, Heidelberg) mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 12-14 kDa und einem Durchmesser von 6 bzw. 16 mm durchgeführt. Für die Dialyse des Apo-Mbs musste das Ausschlussvolumen auf 7 kDa (Ø 16 mm) reduziert werden, da das Apoprotein andernfalls nicht von der Membran zurückgehalten wurde. Die Dialyse erfolgte in zwei Schritten bei 4 °C gegen das jeweils 300-fache Volumen geeigneter Puffer. Der erste Schritt dauerte 2 h, danach wurde die Dialyselösung gegen frische Lösung ausgetauscht und im zweiten Schritt über Nacht dialysiert.

### 2.4.2 Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrierung der Proteine während und nach der Darstellung der Pigment-Protein-Komplexe erfolgte durch Zentrifugation mit Amicon-Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Millipore, Bedford, MA, USA), die eine Ausschlussgrenze von 10 kDa aufweisen. Hierbei wurde bei 4 °C und 4300 g nach Angaben des Herstellers zentrifugiert. Für die Konzentrierung von Proben im Volumenbereich von 100-500 µl wurden Biomax-10 K Einheiten (Ultrafree 0,5 Centrifugal Filter & Tube) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa des gleichen Herstellers verwendet. Die Konzentrierung erfolgte hierbei ebenfalls bei 4 °C und 4300 g.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Advanced Protein Assay (Fluka) durchgeführt.

### 2.4.3 Native analytische Gelelektrophorese

Im Gegensatz zur denaturierenden SDS-PAGE, bei der die Eigenladung der Proteine durch die Anlagerung von SDS kompensiert wird und die Proteine daraufhin gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden, nutzt die native PAGE eben diese Eigenladung zur Auftrennung aus. Der große Vorteil hierbei ist, dass die Proteine im nativen Zustand separiert werden und im Anschluss in funktionstüchtiger Form aus dem Gel eluiert werden können (s. unten). Wie bei der denaturierenden Elektrophorese erfolgt auch hier die Auftrennung in einer vernetzten Matrix aus Polyacrylamid. Die Laufstrecke einzelner Proteine ist nun aber nicht mehr direkt proportional der Zahl ihrer Aminosäuren, sondern resultiert aus der intrinsischen, größen-spezifischen Ladung, der Größe und der Form der Partikel. Stark geladene große Proteine können somit durchaus schneller wandern als kleine, nahezu ungeladene Proteine.

#### Bedingungen der nativen PAGE:

Die native analytische PAGE erfolgte auf Mini-Gelen mit einer Dicke von 0,75 mm in einer horizontalen Elektrophoresekammer. Die Gele wurden als kontinuierliche Systeme, d.h. ohne den Einsatz eines niederprozentigen Sammelgels, verwendet. Die Acrylamidkonzentration im Gel betrug je nach Trennproblem 8, 10 oder 12%. Die jeweilige prozentuale Zusammensetzung ist bei den Abbildungen mit angegeben. Vor dem Auftragen auf die Gele wurden die Proben zur Beschwerung 1:1 mit Glycerin versetzt. Die angelegte Spannung und die verwendeten Laufzeiten variierten je nach verwendetem Gelsystem, die exakten Werte sind im Folgenden angegeben. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Dokumentation eingescannt bzw. mit einer Digitalkamera abfotografiert. Falls Apo-Mb oder natives BSA aufgetragen worden war oder die Konzentration der aufgetragenen Proben sehr gering war (s. oben), wurden die Gele anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt und nochmals eingescannt.

#### Zusammensetzung und Laufzeiten der Gele:

Trenngel (allgemein):	375 mM	Tris/HCl pH 8,8
	0,1% (wt/v)	APS
	0,1% (v/v)	TEMED

Acrylamidkonzentration im Trenngel bei Verwendung der rotiphorese® Gel 30-Lösung (s. oben):

- Trenngel 8% : 26,7% (v/v) Acrylamid
- Trenngel 10% : 33,3% (v/v) Acrylamid
- Trenngel 12% : 40,2% (v/v) Acrylamid

Laufzeiten der Gele:

- 8% Gel: 0,66 h bei 150 V und 0,94 h bei 100 V
- 10% Gel: 2 h bei 150 V
- 12% Gel: 2 h bei 150 V

Färbung mit Coomassie-Blau:

Um die in geringer Konzentration nicht mehr durch den komplexierten Chromophor detektierbaren Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele im Anschluss an die Elektrophorese in Coomassie-Blau-Färbelösung für 30 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung wurden die mit Wasser abgespülten Gele über Nacht in Coomassie-Blau-Entfärbelösung geschwenkt.

## 2.5 Isolierung und Derivatisierung der Chromophore

Bei der Präparation und Aufreinigung der Chromophore wurde nicht nach Epimeren an Position C-13<sup>2</sup> unterschieden. Im Allgemeinen erhält man ein Gemisch beider Epimere, das über präparative Dünnschichtchromatographie nicht und über präparative HPLC nur unzureichend getrennt werden konnte. Zudem wandeln sich die *a/a'*-Formen (eine Ausnahme hierbei bilden 13<sup>2</sup>-hydroxylierte Pigmente) in Lösung ineinander um, wobei das entstehende Gleichgewicht vom Lösungsmittel abhängt und die *a*-Form den überwiegenden Anteil darstellt (Katz *et al.*, 1968; Hynninen und Lötjönen, 1985; Watanabe *et al.*, 1987; Mazaki und Watanabe, 1990; Mazaki *et al.*, 1992). Die Darstellung der Pigment-Protein-Komplexe erfolgte im Allgemeinen ausgehend von den Epimeren-Gemischen. Für die Untersuchung der möglichen stereospezifischen Bindung des *a*-Epimers im Falle von Myoglobin, wurden Fraktionen der präparativen HPLC mit einem möglichst hohen Anteil der *a'*-Form verwendet (s. Ergebnisse).

### 2.5.1 Standardmethoden

Generelle Arbeitsbedingungen:

- Alle Reaktionen wurden bei Grünlicht unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt.
- Es wurden ausschließlich analysenreine (p.a.) Lösungsmittel (s. oben) verwendet.
- Die Pigmente wurden im trockenen Zustand unter Schutzgasatmosphäre (Argon) bei -20 °C aufbewahrt.

- Die Ausbeuten wurden absorptionsspektroskopisch über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt, wobei für die freien Säuren die Extinktionskoeffizienten der analogen Pheophytine verwendet wurden, sofern für die jeweiligen Pheophorbide noch keine Extinktionskoeffizienten bestimmt worden waren.

#### Standardaufarbeitung von Pigmenten:

Der Reaktionsansatz wurde nach der Umsetzung in einen Scheidetrichter mit gleichen Volumina Wasser und Ethylacetat bzw. Diethylether, je nachdem ob freie Säuren oder deren Ester aufgearbeitet wurden, überführt. Die organische Phase wurde drei bis sechs Mal mit Wasser gewaschen, anschließend wurde das Wasser abgelassen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Eventuell vorhandene Restmengen an Wasser wurden durch azeotrope Trocknung mit Aceton/Toluol (ca. 1/3, v/v) entfernt.

### **2.5.2 Gewinnung der natürlichen Pigmente und einiger direkter Folgeprodukte**

#### Bakteriochlorophyll *a* (BChl *a*):

(Omata und Murata, 1983; Steiner, 1984; Struck, 1990; Svec, 1991; Scheer und Struck, 1993)

BChl *a* wurde aus gefriergetrockneten Zellen der carotinoidfreien Mutante G9 von *Rhodospirillum rubrum* (bezogen von DSM, Nr. 486) mit Methanol extrahiert. Hierzu wurden 100 g feuchte Bakterien in 1 l Methanol 20-30 min gerührt, um die Zellen aufzubrechen. Anschließend wurden jeweils 200 ml der methanolischen Suspension mit gleichem Volumen Diethylether in einem Scheidetrichter vermischt. Danach wurde soviel Wasser zugegeben bis eine Phasentrennung erreicht war. Nach mehrmaliger Extraktion der Etherphase mit Wasser wurde dieses abgelassen und den vereinigten Etherphasen durch Zugabe von NaCl innerhalb von 20 min das restliche Wasser entzogen. Die Trocknung des rohen Pigments erfolgte gemäß der Standardaufarbeitung.

Ausbeute: 110  $\mu$ Mol/100 g feuchte Zellen

R<sub>f</sub>-Wert: 0,53 (System-RP-II)

Bakteriopheophorbid *a* (BPheid *a*):

(in Anlehnung an Helfrich (1995))

5 – 10  $\mu\text{Mol}$  des rohen, trockenen BChl *a* wurden in 2 – 4 ml TFA vollständig gelöst und 10 – 15 min unter Argon bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Säure mit Argon abgeblasen. TFA-Rückstände wurden während der Aufarbeitung nach Standardmethode entfernt.

Das trockene Pigment wurde über präparative Dünnschichtchromatographie aufgereinigt (System-D-II).

Ausbeute: 75 – 80% (nach Aufreinigung)

$R_f$ -Wert: 0,38 (System-K-II)

Bakteriopheophytin *a* (BPhe *a*):

(Rosenbach-Belkin, 1988)

5 – 10  $\mu\text{Mol}$  des rohen, trockenen BChl *a* wurden in 2 – 4 ml Eisessig gelöst und 10 – 15 min unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Säure mit Argon abgeblasen. Säurerückstände wurden während der Aufarbeitung nach Standardmethode entfernt.

Das trockene Pigment wurde über präparative Dünnschichtchromatographie aufgereinigt (System-D-I).

Ausbeute: 75 – 80% (nach Aufreinigung)

$R_f$ -Wert: 0,37 (System-K-I)

Chlorophyll *a* (Chl *a*):

(Omata und Murata, 1983; Storch, 1993)

40 g sprühgetrocknete *Spirulina platensis* (Behr Import, Bonn) wurden mit 500 ml heißem Methanol aufgeschwemmt, 30 min gerührt und abgenutscht. Die abgenutschte Methanolphase, die nun Chlorophyll und Carotinoide enthielt, wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt und im Anschluß über präparative Säulenchromatographie aufgereinigt (System-S-I).

Ausbeute: 100  $\mu\text{Mol}$ /40 g sprühgetrocknete Zellen

$R_f$ -Wert: 0,45 (System-RP-II)

Pheophorbid *a* (Pheid *a*):

(Helfrich, 1995)

5 – 10  $\mu\text{Mol}$  Chl *a* wurden in 2 – 4 ml TFA vollständig gelöst und 10 – 15 min unter Argon bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Säure mit Argon abgeblasen. TFA-Rückstände wurden während der Aufarbeitung nach Standardmethode entfernt. Das trockene Pigment wurde über präparative Dünnschichtchromatographie aufgereinigt (System-D-II).

Ausbeute: 75 – 80% (nach Aufreinigung)

 $R_f$ -Wert: 0,28 (System-K-III)Phycocyanobilin (PCB):

(Storf, 2003)

40 g sprühgetrocknete *Spirulina platensis* (Behr-Import, Bonn) wurden dreimal mit 500 ml heißem Methanol aufgeschwemmt, jeweils 30 min gerührt und abgenutscht. Die abgenutschte Methanolphase diente der Gewinnung von Chl *a* (s. oben). Der Algenrückstand wurde anschließend in 400 ml Methanol/1% Na-Ascorbat (wt/v) aufgenommen und unter Rühren in Schutzgasatmosphäre bei 70 – 80 °C über Nacht in einer Rückflussapparatur gekocht. Hierbei wurde ein Teil des PCBs vom Apoprotein abgespalten und ging in Lösung. Nach Abnutschen des Algenrückstands wurde die blaugrüne methanolische Lösung in einen Scheidetrichter überführt und mit 400 ml 0,1 M HCl versetzt. Dieses Gemisch wurde mehrmals mit Diethylether extrahiert, wobei sich die noch enthaltenen Carotinoide und pheophytinisierten Chlorophylle im Ether lösen und abgetrennt wurden. Die wässrige Phase, die den Bilinchromophor enthält, wurde mehrmals mit Chloroform extrahiert, wobei dieser in die Chloroform-Phase übergeht. Die abgetrennten Chloroformphasen wurden vereinigt, über NaCl getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das erhaltene Pigment wurde anschließend säulenchromatographisch (System-S-III) aufgereinigt.

Ausbeute: 29 mg PCB/40g sprühgetrocknete Zellen (nach Aufreinigung)

 $R_f$ -Wert: 0,26 (System-RP-III)

### 2.5.3 Herstellung von Pheophorbid-Derivaten

#### Zn-Pheophorbid *a* (Zn-Pheid *a*):

(Helfrich, 1995)

#### Vorbereitung der Zink-Insertionslösung:

Um Oxidationen des Pigments während der Metall-Insertion zu vermeiden, wurde eine sauerstofffreie Lösung von Zn-Acetat und Cd-Acetat im Lösungsmittel hergestellt. Hierzu wurden 230 mg  $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 150 mg  $\text{Cd}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 20 ml Methylenchlorid/Methanol (2/1, v/v) gelöst und an einer Hochvakuum-Anlage durch Einfrier-Auftau-Zyklen entgast. Hierbei wurde die Lösung jeweils mit flüssigem Stickstoff eingefroren und auf ca. 0,01 Torr evakuiert. Sodann wurde das Reaktionsgefäß verschlossen und die Probe wieder vollständig aufgetaut. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis zu Beginn der Evakuierung kein Druckunterschied mehr zu erkennen war.

Die so entgaste Lösung wurde nun mit Stickstoff gespült und unter Argon luftdicht in 1,5 ml Einheiten portioniert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur, wobei die Lösung über Jahre ohne Funktionsverlust aufbewahrt werden konnte.

#### Zink-Insertion:

10 – 15  $\mu\text{Mol}$  aufgereinigtes Pheid *a* wurden in einem Schlenkkolben trocken vorgelegt und mit Argon begast. Unter Sauerstoffausschluss wurden nun ca. 5 – 7,5 ml Zinkinsertionslösung zugefügt und unter Rühren und Rückflusskühlung 10 – 15 min erhitzt. Der Grad der Komplexierung wurde währenddessen absorptionspektroskopisch verfolgt. Nach Abkühlen der Lösung unter Argon erfolgte die Aufarbeitung nach Standardmethode. Das erhaltene Pigment wurde anschließend über präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 70 – 90% (ohne Aufreinigung), 50% (nach Aufreinigung über HPLC)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,48 (System-K-III)

13<sup>2</sup>-OH-Zn-Pheophorbid *a* (13<sup>2</sup>-OH-Zn-Pheid *a*):

(Schaber *et al.*, 1984; Struck, 1990; Storch, 1993)

5 µMol aufgereinigtes Zn-Pheid *a* wurden in 10 ml Methanol in einem Rundkolben vorgelegt. Der Kolben wurde mit perforierter Alufolie verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 2 – 4 Tage stehen gelassen. Das Fortschreiten der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC verfolgt.

Nach der Standardaufarbeitung wurde das Pigment über präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 40 – 60% (nach Aufreinigung)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,36 (System-K-III)

Darstellung von Fe-Pheophorbid *a* (Fe-Pheid *a*)

(Snigula, 2003)

18 µMol aufgereinigtes Pheid *a* wurden unter Argon in 20 ml Essigsäure gelöst und die Lösung mit Argon gesättigt. Nach Zugabe von 180 mg FeCl<sub>2</sub> (50-facher Überschuss), 150 mg NaOAc (100-facher Überschuss) und einer Spatelspitze Na-Ascorbat wurde die Lösung unter Rückflusskühlung und Schutzgasatmosphäre auf 40 °C erhitzt und für 15 min gerührt. Das Fortschreiten der Metallkomplexierung wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Nach Abkühlen der Lösung wurde das Pigment nach Standardmethode aufgearbeitet. Auf eine Aufreinigung zur Abtrennung restlichen Pheids wurde verzichtet, da letzteres wie im Folgenden gezeigt wird, unter den gewählten Reaktionsbedingungen weder von Apo-Mb noch von BSA gebunden wird.

Ausbeute: 85 – 95% (ohne Aufreinigung)

R<sub>f</sub>-Wert: 0.91 (System-RP-I)

#### **2.5.4 Enzymatische Synthese von Chlorophyllid *a***

(Fiedor, 1994)

Gewinnung der Chlorophyllase:

Ca. 10 Blätter (à 30 – 40 cm<sup>2</sup>) frischer Mangold wurden von ihren Stielen befreit, grob zerkleinert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Mörser homogenisiert. Das erhaltene Pulver wurde mit Hilfe eines Siebes von groben Rückständen befreit und nach erneuter Zugabe von flüssigem Stickstoff feinst zerrieben. Anschließend wurde es in ein

großes Becherglas überführt, mit einem Überschuss an Aceton versetzt und 5 – 10 min gerührt, um die Pigmente herauszulösen. Das nun grün gefärbte Lösungsmittel wurde sodann abgenutscht. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis das Filtrat nahezu farblos war. Das Pulver wurde nun auf Alufolie in dünner Schicht verteilt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurde es in Aliquots von 5 – 7 cm<sup>3</sup> bei -80 °C eingefroren.

Ausbeute: 50 cm<sup>3</sup> Pulver/Ansatz mit 10 Blättern

#### Enzymatische Esterhydrolyse von Chlorophyll *a* zu Chlorophyllid *a*:

Ca. 10 cm<sup>3</sup> des Chlorophyllase-Pulvers wurden in 40 ml Elutionspuffer gegeben und mit 40 ml Aceton versetzt. Um Oxidationsreaktionen des Pigments zu verhindern, wurden zudem 20 mg Na-Ascorbat zugesetzt. Sodann erfolgte die Zugabe von 4 µMol aufgereinigtem Chl *a* in 2 ml Aceton. Die Suspension wurde für 20 min bei Raumtemperatur gerührt, im Anschluss daran wurde das Pigment durch Aufarbeitung der Lösung nach Standardmethode extrahiert. Auf eine Aufreinigung zur Abtrennung restlichen Chls wurde verzichtet, da letzteres wie im Folgenden gezeigt wird, unter den gewählten Reaktionsbedingungen weder von Apo-Mb noch von BSA gebunden wird.

Die erfolgreiche Umsetzung wurde über analytische Dünnschichtchromatographie kontrolliert.

Ausbeute: 50% (geschätzt nach Analyse der TLC-Platte)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,87 (System-RP-I)

### 2.5.5 Herstellung von Bakteriopheophorbid-Derivaten

#### Zn-Bakteriopheophorbid *a* (Zn-BPheid *a*):

(Fiedor, 1994; Hartwich, 1994a)

10  $\mu\text{Mol}$  BPheid *a* wurden in 10 ml Eisessig mit einem 1000-fachen Überschuss an  $\text{Zn}(\text{OAc})_2$  und katalytischen Mengen (10 mg) Na-Ascorbat versetzt. Die Lösung wurde für ca. 30 min unter Argon und Rückflusskühlung bei 100 °C gerührt. Der Grad der Komplexierung wurde währenddessen absorptionsspektroskopisch verfolgt. Nach Abkühlen der Lösung unter Argon erfolgte die Aufarbeitung nach Standardmethode und die Aufreinigung über präparative Dünnschichtchromatographie (System-D-IV).

Ausbeute: 60 – 80% (ohne Aufreinigung), 50% (nach Aufreinigung über präparative TLC)

$R_f$ -Wert: 0,25 (System-K-IV)

#### Zn-Bakteriopheophorbid-*a*-17<sup>3</sup>-Ethylester:

##### 1. Synthese von Bakteriopheophorbid-*a*-17<sup>3</sup>-Ethylester (17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a*):

(in Anlehnung an Snigula (2003))

18  $\mu\text{Mol}$  BPheid *a* wurden in 20 ml Ethanol/5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst und unter Schutzgasatmosphäre und Rückflusskühlung 30 min auf 80 °C erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer Dünnschichtchromatographie verfolgt (System-K-II), indem dem Reaktionsgemisch in Abständen von 10 min jeweils 0,5 ml entnommen und diese im Reagenzglas gegen Diethylether/Wasser ausgeschüttelt wurden. Auf diese Weise wurde die Säure entfernt und das Pigmentgemisch konnte auf TLC-Platten analysiert werden. Nach beendeter Reaktion erfolgte die Aufarbeitung nach Standardmethode und die Aufreinigung über präparative Dünnschichtchromatographie (System-D-V).

Ausbeute: 80 – 90% (nach Aufreinigung)

$R_f$ -Wert: 0,63 (System-K-II)

##### 2. Zink-Insertion in Bakteriopheophorbid-*a*-17<sup>3</sup>-Ethylester (Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a*):

(nach Urumow (1975) und Snigula (2003))

20  $\mu\text{Mol}$  17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a* wurden in 20 ml Essigsäure gelöst und mit einem 250-fachen molaren Überschuss  $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ , einem 25-fachen molaren Überschuss NaOAc und einer Spatelspitze Na-Ascorbat versetzt. Der Ansatz wurde sodann 30 – 60 min bei Raum-

temperatur gerührt und das Fortschreiten der Komplexbildungsreaktion mittels analytischer Dünnschichtchromatographie verfolgt (System-K-III). Hierzu wurden jeweils 0,5 ml Aliquots aus dem Reaktionsgemisch entnommen und im Reagenzglas zur Entfernung der Säure im System Diethylether/Wasser ausgeschüttelt. Nach vollständiger Reaktion wurde der Reaktionsansatz nach Standardmethode aufgearbeitet und über präparative Dünnschichtchromatographie aufgereinigt (System-D-I).

Ausbeute: 70 – 75% (nach Aufreinigung)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,75 (System-K-III)

#### Ni-Bakteriopheophorbid *a* (Ni-BPheid *a*):

(Hartwich, 1994a; Hartwich *et al.*, 1998)

Da die Synthese von Ni-BPheid *a* ausgehend von Cd-BPhe *a* erfolgt, wird im Folgenden zunächst die Synthese des Ausgangsstoffes beschrieben.

#### Synthese von Cd-Bakteriopheophytin *a* (Cd-BPhe *a*):

Ca. 30 µMol aufgereinigtes BPhe *a* wurden in 30 ml DMF gelöst und 10 min mit einem Argonstrom gespült. Anschließend wurde bis zur Sättigung der Reaktionslösung getrocknetes Cd(OAc)<sub>2</sub> zugefügt und die Lösung dann unter Rückflusskühlung auf 80 °C erhitzt. Während der Reaktion darf die Temperatur von 80 °C nicht überschritten werden, da andernfalls Pyro-Cd-BPhe *a* als schwer abzutrennendes Nebenprodukt gebildet wird. Der Fortgang der Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Nach ca. 2 h wurde die Reaktionsmischung abgekühlt und in Ether aufgenommen. In einem Scheidetrichter wurde die Etherphase zweimal mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch (1/2, v/v) extrahiert und anschließend so lange mit Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Wassers 7 betrug. Vor Trocknung der Etherphase am Rotationsverdampfer wurde ihr mit NaCl restliches Wasser entzogen. Azeotrope Trocknung mit Aceton/Toluol (ca. 1/3, v/v) ergab das trockene Pigment, welches im Anschluss über präparative TLC (System-D-III) aufgereinigt wurde.

Ausbeute: 30 – 50% (nach Aufreinigung; Verluste hauptsächlich durch Entmetallierung)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,30 (System-RP-II)

#### Synthese von Ni-Bakteriopheophorbid *a* aus Cd-Bakteriopheophytin *a*:

Das aufgereinigte Cd-BPhe *a* wurde in 20 ml wasserfreiem Aceton (Trocknung über CaCl<sub>2</sub>) gelöst und die Lösung mit Argon gesättigt. Anschließend wurde unter Argon bis zur Sättigung der Lösung getrocknetes NiCl<sub>2</sub> zugegeben und das Reaktionsgemisch ca. 40 min unter

Rückflusskühlung und Schutzgasatmosphäre gekocht. Die Transmetallierungsreaktion wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Der vollständige Metallaustausch war außerdem an einem Farbumschlag der Lösung von grün-blau nach violett-rosa erkennbar. Nach Aufarbeitung der Lösung nach Standardmethode wurde das erhaltene trockene Ni-BPhe *a* unter Argon sofort in TFA gelöst und 10 – 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Säure mit Argon abgeblasen. TFA-Rückstände wurden während der Aufarbeitung nach Standardmethode entfernt. Das trockene Pigment wurde dann über präparative Dünnschichtchromatographie aufgereinigt (System-D-IV).

Diese Umsetzung eines Metallkomplexes zur freien Säure ist nur bei Ni-BPhe möglich, Zn-(B)Pheide müssen über die entsprechenden (B)Pheide hergestellt werden.

Ausbeute: 90% (nach Aufreinigung)

R<sub>f</sub>-Wert: 0,78 (System-K-V)

#### Pd-Bakteriopheophorbid *a* (Pd-BPheid *a*):

Pd-BPheid *a* musste für diese Arbeit nicht eigens synthetisiert werden, sondern wurde von der Firma Negma (Paris) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Eine ausführliche Darstellung der Synthese dieses Pigments findet sich bei Kamhuber (1999).

## **2.6 Herstellung der Pigment-Protein-Komplexe**

### **2.6.1 Pigment-Myoglobin-Komplexe**

#### **2.6.1.1 *Herstellung von Apo-Myoglobin***

(Teale, 1959; Breslow, 1964)

#### Extraktion des Kofaktors:

100 mg Mb wurden in 7 ml Wasser gelöst und ungelöstes Protein abzentrifugiert. Die wässrige Proteinlösung wurde zur Denaturierung des Proteins mit 0,1 M HCl auf pH 2 angesäuert. Nach Kühlung der Lösung auf Eis wurden 7 ml eisgekühltes Ethylmethylketon zugefügt und beide Phasen gut vermischt. Nach erfolgter Phasentrennung durch Stehenlassen auf Eis, wurde die durch das herausgelöste Häm tief rot gefärbte Ketonphase abgenommen und verworfen. Dieser Extraktionsvorgang wurde in der Regel drei mal wiederholt.

Die das Apo-Mb enthaltende wässrige Phase wurde anschließend gegen Wasser, dann gegen eine 0,6 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und schließlich gegen Trispuffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung durch Zentrifugation von ausgefallenem, denaturiertem Apo-Mb

befreit und im Anschluss daran aufkonzentriert, so dass für die nachfolgende Aufreinigung ca. 10 ml einer ca. 0,5 mM Lösung zur Verfügung standen.

#### Reinigung des Apoproteins:

Die aufkonzentrierte Apo-Mb-Lösung wurde auf eine mit Trispuffer equilibrierte DEAE-Cellulose-Säule ( $V=6$  ml) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer entwickelt. Hierdurch wurden Reste noch Häm enthaltenden Mbs entfernt, da diese unter den geschilderten Bedingungen als roter Ring am Säulenkopf gebunden werden. Die eluierende, farblose Apo-Mb-Lösung wurde fraktioniert ( $V_{\text{Fraktion}}=10$  ml) aufgefangen und die einzelnen Fraktionen wurden absorptionsspektroskopisch auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Sämtliche Fraktionen mit einem Proteingehalt über 2 mg wurden vereinigt, gegen Wasser dialysiert, durch Zentrifugation von ausgefallenem Protein befreit, und anschließend bis zu einer Endkonzentration von 0,05 mM aufkonzentriert. Die erhaltene Lösung wurde in Aliquots von ca. 10 ml in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Die lyophilisierten Proben wurden bei  $-20$  °C gelagert.

Ausbeute: 30 – 50% (nach Aufreinigung)

### **2.6.1.2 Rekonstitution von Apo-Myoglobin mit (Bakterio)Chlorophyll-Derivaten und Phycocyanobilin**

(Boxer und Wright, 1979; Davis und Pearlstein, 1979; Wright und Boxer, 1981; Pearlstein *et al.*, 1982; Choon und Rodley, 1983)

Sämtliche Rekonstitutions- und Reinigungsschritte wurden bei Grünlicht und, soweit experimentell möglich, in Argonatmosphäre durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungsmittel wurden vor ihrem Einsatz entgast und mit Argon gesättigt.

#### 1. Rekonstitution mit (Bakterio)Chlorophyll-Derivaten:

Eine dreiprozentige Lösung (wt/v) von Apo-Mb in Puffer-I wurde auf Eis vorgelegt. Ein 1,5- bis 3-facher Pigmentüberschuss wurde in Pyridin gelöst und mit der gleichen Menge an Puffer-I versetzt. Unter Schutzgasatmosphäre und schnellem Rühren wurde nun die Lösung des Chromophors langsam zur Apoproteinlösung getropft. Die Endkonzentration an Pyridin sollte nicht mehr als 5% (v/v) betragen. Nach Inkubation des Rekonstitutionsansatzes für 15 min auf Eis unter Argon und beständigem Rühren wurde der gebildete Komplex säulenchromatographisch aufgereinigt.

### Reinigung des Pigment-Mb-Komplexes:

Die Rekonstitutionslösung wurde sofort im Anschluss an den Rekonstitutionsvorgang auf eine mit Puffer-I equilibrierte Sephadex-G-25-Säule (Amersham-Pharmacia) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Hierbei werden überschüssiges, nicht komplexiertes Pigment und Pyridin abgetrennt. Die eluierende, je nach Pigment grün bis blaugrün gefärbte Bande wurde unter Schutzgasatmosphäre aufgefangen und zur Entfernung restlicher Pyridinspuren über Nacht gegen Puffer-I bei 4 °C dialysiert.

Am nächsten Tag wurde die Lösung auf eine mit Puffer-I equilibrierte CM-Sepharose-CL-6B-Säule aufgetragen. Der unter diesen Bedingungen dort immobilisierte Pigment-Mb-Komplex eluierte nach Anlegen eines linearen Na-Phosphat-Gradienten (10 – 100 mM, pH 6,3 – 7,8) als homogene Bande. Partiiell denaturierte Pigment-Mb-Komplexe bleiben am Säulenkopf gebunden und werden so abgetrennt. Der aufgefangene Komplex wurde über Nacht bei 4 °C gegen Puffer-I dialysiert und in diesem Puffer bei 4 °C gelagert.

Sollte der Komplex über längere Zeit gelagert werden, so wurde er im Anschluss an die ionenchromatographische Aufreinigung gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Ausbeute: 60 – 95% (nach Aufreinigung der Komplexe von Chlid *a*, Ni-BPheid *a*, Zn-Pheid *a*, 13<sup>2</sup>-OH-Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a*);  
5 – 15% (nach Aufreinigung des Komplexes von Fe-Pheid *a*)

### 2. Rekonstitution mit Phycocyanobilin:

Da es nicht möglich war, PCB nach der oben beschriebenen Vorgehensweise an Apo-Mb zu binden, wurde die Rekonstitutionsmethode wie im Folgenden beschrieben geändert.

Ein 1,5 bis 3 molarer Überschuss an PCB wurde in Pyridin gelöst und mit dem selben Volumen an Wasser, welches einen 10-molaren Überschuss an Zn-Acetat enthielt, versetzt. Diese Lösung wurde für 5 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Sodann wurde die Pigmentlösung tropfenweise einer einprozentigen Lösung von Apo-Mb in Puffer-I zugefügt, wobei diese bei 4 °C gerührt wurde. Nach weiterem Rühren für 15 min auf Eis wurde die blaue Lösung für 10 min bei 5500g zentrifugiert, um ausgefallenes Pigment, Protein und Zn-Phosphat abzutrennen. Das Zentrifugat wurde danach säulenchromatographisch aufgereinigt.

### Reinigung des Phycocyanobilin-Mb-Komplexes:

Sofort im Anschluss an die Zentrifugation wurde die erhaltene, blaue Lösung auf eine mit Puffer-I equilibrierte Sephadex-G-25-Säule (s. oben) aufgetragen. Nach Entwicklung der

Säule mit dem gleichen Puffer wurde der PCB-Mb-Komplex als homogene, grüne Bande aufgefangen und über Nacht bei 4 °C gegen Puffer-I dialysiert. Die Gelfiltrationssäule war nach Auffangen dieser Bande durch überschüssiges PCB massiv blau gefärbt. Dieses wasserlösliche Pigment konnte, im Gegensatz zu den oben beschriebenen (B)Chl-Derivaten, durch Spülen mit Puffer leicht von der Säule gewaschen werden.

Da der erhaltene PCB-Apo-Mb-Komplex unter Ionenaustausch-Bedingungen nicht stabil war, wurde auf einen nachfolgenden Reinigungsschritt über CM-Sepharose-CL-6B verzichtet und der Komplex statt dessen über native PAGE (analytischer Maßstab) weiter aufgereinigt. Auf eine Elution aus der Gelmatrix wurde aufgrund der geringen Mengen verzichtet.

Ausbeute: ca. 5% (geschätzt)

### ***2.6.1.3 Auftrennung der rekonstituierten Pigment-Myoglobin-Komplexe über präparative native Gelelektrophorese***

#### Bedingungen der nativen PAGE:

Die native PAGE erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer. Die verwendeten Gele hatten eine Dicke von 3 mm bei einer Trennstrecke von 18 cm. Da die in Vorversuchen getestete Verwendung eines fünfprozentigen Sammelgels keine wesentlichen Vorteile bot, wurde hierauf gänzlich verzichtet. Die Gele wurden somit als kontinuierliches System mit einer Acrylamid-Konzentration von 8% (wt/v) eingesetzt. Eine optimale Trennleistung ergab sich, wenn das Gel mit ca. 15 mg Protein beladen wurde. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die in Puffer-I vorliegenden konzentrierten Proben (15 mg/1,5 ml) zur Beschwerung mit soviel Glycerin versetzt, dass eine ca. 30 – 40-prozentige (v/v) Lösung entstand. Die Elektrophorese wurde bei Grünlicht 1 h mit einer konstanten Leistung von 15 W und anschließend 14 h mit einer konstanten Leistung von 8 W durchgeführt. Die Laufkammer wurde währenddessen auf 10 °C gekühlt und der Puffer umgewälzt.

#### Zusammensetzung des Trenngels (8%):

26,3% (v/v)	rotiphorese® Gel 30 (Roth) (29,2 : 0,8% wt/wt Acrylamid:Bisacrylamid)
375 mM	Tris/HCl pH 8,8
0,1% (w/v)	APS
0,05% (v/v)	TEMED

### Elution der Proben aus dem Gel:

Die durch den nativen Pigment-Mb-Komplex grün bzw. grünblau gefärbten Gelbanden wurden mittels eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und zwischen 2 Glasplatten homogenisiert. Diese homogenisierte Masse wurde in ein Becherglas überführt und mit soviel Puffer-I (entgast und mit Argon gesättigt) versetzt, dass eine ca. 30-prozentige Lösung entstand. Anschließend wurde dieses Gemisch unter Schutzgasatmosphäre für 2 h bei Raumtemperatur gerührt, um das Protein aus der Gelmatrix zu lösen. Um die Gelmasse abzutrennen, wurde die erhaltene Suspension zunächst über einen Faltenfilter filtriert und danach über einen Bakterienfilter von restlichen Mikrogelpartikeln befreit. Sodann wurde die Lösung aufkonzentriert und über eine mit Puffer-I equilibrierte PD-10-Säule (Sephadex-G 25, Pharmacia) von restlichen Verunreinigungen befreit. Die Aufbewahrung der gereinigten Proben erfolgte bei 4 °C.

### **2.6.1.4 Analyse der Pigment-Myoglobin-Komplexe mit analytischer Ultrazentrifugation**

#### Experimentelle Durchführung

Zur Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation wurde eine Optima XL-I Ultrazentrifuge mit dazugehörigem Equipment der Firma Beckman Coulter (Inc., Fullerton, California) verwendet. Gescannt wurde kontinuierlich im Maximum der  $Q_y$ -Bande, bzw. im Fall von nativem Myoglobin im Maximum der Soret-Bande. Die Proteinproben in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) hatten eine optische Dichte von 0,45 – 0,5 OD. Das Probenvolumen in den 12mm-Epon Standard Doppelsektor-Zellen (charcoal filled) betrug 400  $\mu$ l. Sämtliche Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurden bei Raumtemperatur mit einer Rotationsgeschwindigkeit entsprechend 45000·g durchgeführt.

#### Auswertung der experimentellen Daten:

Die in Gleichung 2 (s. Kapitel 3.4.3) erscheinenden Konstanten, die Dichte des Puffers ( $\rho$ ) und das partialspezifische Volumen ( $v$ ) wurden mit dem Programm *Ultrascan* (Demeler, B. [http:// www.ultrascan.uthscsa.edu/](http://www.ultrascan.uthscsa.edu/)) berechnet. Danach ist das partialspezifische Volumen von Myoglobin 0,741 g/ml, die Pufferdichte 1,0043 g/ml und die Pufferviskosität 0,01002 Poise. Die Sedimentation der Komponenten im Schwerfeld ist durch ihre Masse, ihre äußere Form (ausgedrückt durch den Friktionskoeffizienten  $f$  bzw. Diffusionskoeffizienten  $D$ ) und durch die Charakteristik der Messzelle bestimmt. Sie wird mathematisch durch eine Differentialgleichung, die Lammgleichung  $L(s,D,r,t)$ , beschrieben (Lamm, 1929). In einfacher Form:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left[ rD \frac{dc}{dr} - s\omega^2 r^2 c \right] \quad (1)$$

( $\omega$  = Winkelgeschwindigkeit des Rotors,  
 $r$  = Abstand des Maximums des Konzentrationsgradienten vom Rotorzentrum,  
 $s$  = Sedimentationskoeffizient)

Die Lammgleichung wird durch ein numerisches Verfahren gelöst, das in *Sedfit* (Schuck, P. <http://www.analyticalultracentrifugation.com>) programmiert ist. Das Modell legt nicht-interagierende, ideal sedimentierende Komponenten zu Grunde. Zunächst wird die Verteilung ihrer Sedimentationskonstanten, die Funktion  $c(s)$ , einer Variante der Lammgleichung, bestimmt:

$$\text{Min}_{c(s)} \left\{ \sum_{i,j} \left[ a(r_i t_j) - \int c(s) L(s, D(s), r_i t_j) ds \right]^2 \right\} \quad (2)$$

Die Anpassung des Modells an die Messdaten wird durch Variation der Sedimentationskonstanten  $s$  und des Friktionskoeffizienten  $f$  erreicht. Der Friktionskoeffizient  $f$  steht in direktem Zusammenhang zum Diffusionskoeffizienten  $D$  (s. Kapitel 3.4.3, Gleichung 3). Er ist abhängig von der Form und der Oberfläche des Moleküls. Konformationsänderungen eines Moleküls zeigen sich in einer Verbreiterung der Verteilung oder/und einer Verschiebung seiner Sedimentationskonstanten  $s$ . Aus der Verteilungsfunktion erhält man Information über die Anzahl der im System enthaltenen Komponenten und ihrer Sedimentationskonstanten und Diffusionskoeffizienten (Massen). Die Güte der Anpassung wurde nach dem mittleren quadratischen Fehler und visuell an der Homogenität des Residuen-Plots beurteilt. Die Werte von  $S$  und  $D$  wurden dann als Startwerte für den nichtlinearen Fit der Lammgleichung verwendet. Bei Kenntnis des Molekulargewichts  $M$  konnte unter Berücksichtigung des partialspezifischen Volumens und der Dichte des Lösungsmittels  $M$  festgehalten und  $S$  gefittet werden.

## 2.6.2 Pigment-Albumin-Komplexe

### 2.6.2.1 *Herstellung der Komplexe von Albumin mit (Bakterio)Chlorophyll-Derivaten bzw. Phycocyanobilin*

Sämtliche Rekonstitutions- und Reinigungsschritte wurden bei Grünlicht und, soweit experimentell möglich, in Argonatmosphäre durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungsmittel wurden vor ihrem Einsatz entgast und mit Argon gesättigt.

### Komplexierung von Albumin mit Tetrapyrrolofaktoren:

Eine fünfprozentige Lösung (wt/v) von BSA in Puffer-II wurde auf Eis vorgelegt. Ein zweifacher Überschuss an Pigment wurde in Pyridin gelöst und mit der gleichen Menge an Puffer-II versetzt. Unter Schutzgasatmosphäre und schnellem Rühren wurde nun die Lösung des Chromophors tropfenweise zur Proteinlösung gegeben. Die Endkonzentration an Pyridin sollte nicht mehr als 5% (v/v) betragen. Nach Inkubation der Rekonstitutionslösung für 20 min auf Eis unter Argon und beständigem Rühren, wurde sie auf 20% ihres Ausgangsvolumens eingengt und der gebildete Komplex sodann säulenchromatographisch gereinigt.

### Reinigung des Chromophor-Albumin-Komplexes über Gelfiltration:

Unmittelbar nach der Konzentrierung wurde die Probe auf eine mit Puffer-I equilibrierte Sephadex-G-25-Säule (s. oben) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Hierbei werden überschüssiges, nicht komplexiertes Pigment und Pyridin abgetrennt, die eluierende, je nach Pigment grün bis blaugrün gefärbte Bande wurde unter Schutzgasatmosphäre aufgefangen und zur Entfernung restlicher Mengen an Pyridin über Nacht gegen Puffer-I bei 4 °C dialysiert.

Eine weitere Aufreinigung und Auftrennung erfolgte stets über die im folgenden Kapitel beschriebene native PAGE, da die gebildeten Pigment-Albumin-Komplexe in der nach der Gelfiltration erhaltenen Lösung nicht nur in monomerer Form vorlagen, sondern sich zusätzlich höhermolekulare Proteinaggregate (s. Kapitel 4) bildeten.

Der Komplexierungsvorgang zwischen BSA und Chromophor ist im Fall von Zn-Pheid *a* auch unter Verwendung von Puffer-I möglich, da sich hierbei aber die gleiche Bandenstruktur wie bei Verwendung von Puffer-II in der nativen PAGE zeigt und zudem die Ausbeute von Zn-BPheid-*a*-BSA bei der Rekonstitution in Puffer-I sehr gering ist, wurde in allen Fällen der Puffer-II verwendet.

### ***2.6.2.2 Reinigung und Auftrennung der Pigment-Albumin-Komplexe über präparative native Gelelektrophorese***

#### Bedingungen der nativen PAGE:

Die für die Auftrennung der Pigment-BSA-Komplexe verwendeten Bedingungen waren identisch mit denen für die Auftrennung der Pigment-Mb-Komplexe. Einen Unterschied stellte lediglich die Laufzeit der Elektrophorese dar. Diese wurde im vorliegenden Fall auf

2,5 h bei konstant 15 W verringert, da schon nach dieser Zeit eine ausreichende Trennung der Komplexe erfolgt war.

### Elution der Proben aus dem Gel:

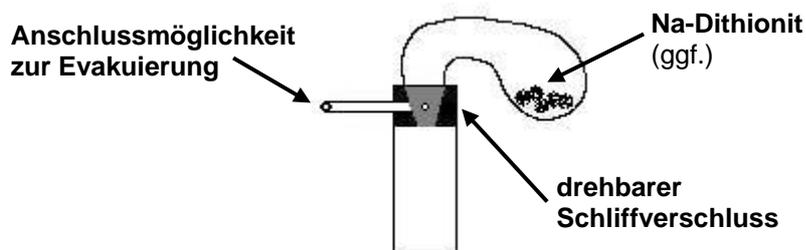
Die in Kapitel 2.6.1 zur Elution der Proben aus dem Gel beschriebene Vorgehensweise konnte aufgrund der Labilität der Pigmente im BSA-Komplex nicht angewandt werden. Es wurde deshalb auf den kompletten Homogenisierungsvorgang der einzelnen Banden verzichtet. Die Banden wurden statt dessen für zwei bis drei Tage unter striktem Sauerstoffausschluss bei 4 °C in Puffer-I inkubiert. Hierbei diffundierte der Pigment-BSA-Komplex langsam aus dem Gel in den Puffer. Die auf diese Weise erhaltene Probenlösung wurde konzentriert und über eine PD-10-Säule (s. oben) von restlichen Verunreinigungen befreit. Sämtliche Arbeiten erfolgten, soweit dies experimentell möglich war, unter Schutzgasatmosphäre. Die Lagerung der erhaltenen Probenlösung erfolgte bei 4 °C.

Ausbeute: 50% (nach kompletter Reinigung, hiervon 50% Monomer)

## 2.7 Photooxidationsexperimente

### 2.7.1 Probenpräparation

Die Präparation aller Proben erfolgte unter Grünlicht. Wenn nicht anders vermerkt, standen alle Proben im Gleichgewicht mit dem Sauerstoff der Luft. Für die Belichtungsexperimente wurde in allen Fällen eine 1x1 cm Thunberg-Küvette (Abbildung 2-1) aus Normalglas verwendet, die bei Bedarf verschlossen und evakuiert werden konnte. Das Probenvolumen betrug jeweils 2 ml. Alle Lösungen wurden direkt vor den jeweiligen Messungen frisch hergestellt.



**Abbildung 2-1.** Schematische Darstellung der Thunberg-Küvette.

### Pigment-Protein-Komplexe:

Die Präparation der Pigment-Protein-Komplex-Lösungen erfolgte ausgehend von einer in Puffer-I vorliegenden konzentrierten Lösung der Komplexe. Im Fall der Albumin-Komplexe waren diese wie oben beschrieben über native Gelelektrophorese aufgereinigt worden, die Myoglobin-Komplexe hingegen wurden ohne letzteren Schritt verwendet. Aus der Stammlösung wurden jeweils Aliquots entnommen und mit Puffer-I auf eine Absorption der  $Q_y$ -Bande von 0,5/cm verdünnt. Um die Vergleichbarkeit mit den Belichtungsexperimenten der freien Pigmente in Puffer zu gewährleisten (s. unten), wurde zusätzlich (wenn nicht anders vermerkt) eine geringe Menge Pyridin zugefügt, so dass die Endkonzentration an Pyridin jeweils 0,15% betrug. Sollte die Pigment-Protein-Komplex-Lösung in Gegenwart von  $\beta$ -Carotin bestrahlt werden, so wurde dieses etwa äquimolar in Pyridin zugesetzt. Die Endkonzentration an Pyridin betrug hierbei zwischen 0,15 und 0,25%.

### Pigmente in Puffer:

Für die Lösungen der freien Pigmente in Puffer-I wurden Aliquots der trockenen Pigmente jeweils sehr konzentriert in Pyridin angelöst und anschließend mit soviel Puffer verdünnt, dass sich wiederum eine OD von 0,5/cm im Maximum der  $Q_y$ -Bande ergab. Die Pyridinkonzentration der erhaltenen Lösung lag hierbei zwischen 0,15 und 0,25%. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Pigmente in wässriger Umgebung kam es hierbei unter Umständen zur Bildung von Aggregaten. Da diese Lösung jedoch zum direkten Vergleich mit den Pigment-Protein-Komplexen diente, wurden die Aggregate in Kauf genommen und nicht durch Zusatz von Detergentien oder Lösungsmittel beseitigt.

### Pigmente in Lösungsmittel:

Die Präparation der Pigment-Lösungsmittel-Gemische erfolgte ausgehend von trockenen Aliquots der Pigmente. Die Pigmente waren hierbei so aliquotiert worden, dass sich beim Anlösen im entsprechenden Lösungsmittel eine OD von 0,5/cm im Maximum der  $Q_y$ -Bande ergab.

## **2.7.2 Lichtquelle und Filter**

In allen Experimenten wurde eine Wolfram-Halogen Kaltlichtquelle (Intralux 150 H Universal, Volpi, Zürich, CH) als Lichtquelle verwendet. Um die ausschließliche Bestrahlung im langwelligen Absorptionsbereich zu gewährleisten, wurde ein 630 nm low-pass-Filter (Schott, Typ RG 630, Kantenlänge 50 mm, Dicke 3,0 mm) mit hoher Durchlässigkeit bei

$\lambda \geq 630$  nm eingesetzt. Die Quantenstromdichte betrug unter diesen Bedingungen 800-900  $\mu\text{Mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### **2.7.3 Experimentaufbau und Messung**

Die Belichtung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur unter Rühren mit einem Abstand von 7,4 cm zwischen Filter und Küvette. Der Filter wurde der Lichtquelle direkt vorgeschaltet. Die Küvette wurde hierbei so platziert, dass das Licht orthogonal auf eine Seitenfläche der allseits gleichmäßig lichtdurchlässigen Küvette fiel und die enthaltene Probe zentral erfasste. Die Lösungen wurden jeweils für 1 min, 3 min, 10 min und 20 min bestrahlt, der Fortgang der Reaktion wurde spektralphotometrisch verfolgt.

Folgende Experimente wurden durchgeführt:

- 1) Bestrahlung bei freiem Luftzutritt
- 2) Bestrahlung in Argonatmosphäre
- 3) Bestrahlung in Argonatmosphäre in Gegenwart eines Reduktionsmittels (Na-Dithionit)

Um den Sauerstoffausschluss zu gewährleisten, wurde der bei der Herstellung der entsprechenden Lösung zur Verdünnung verwendete Puffer-I zuvor entgast und mit Argon gesättigt. Die Thunberg-Küvette wurde sodann verschlossen und in 15 Evakuierungs-Argonflutungszyklen von Sauerstoff befreit. Sollte die Bestrahlung in Gegenwart von Na-Dithionit erfolgen, so wurde dieses vor dem Verschließen der Küvette in Pulverform (ca. 5 mg) in die „Blase“ eingeführt (Abbildung 2-1). Ein Lösen in der in der Küvette vorliegenden Lösung erfolgte erst unmittelbar vor Aufnahme des Dunkelspektrums durch Kippen der Küvette.

### **2.7.4 Extraktion der Pigmente für die analytische HPLC**

Nach erfolgter Belichtung wurde die Probe (2 ml) aus der Küvette entnommen und unter Argon für 10 min auf Eis gestellt. Sodann wurde sie mit dem gleichen Volumen eisgekühlten Ethylmethylketons extrahiert, wobei im Allgemeinen drei Extraktionsschritte durchgeführt wurden. Die Pigmente gingen hierbei in die Lösungsmittelphase über, die extrahierte wässrige Phase wurde verworfen. Die Ketonphase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne einrotiert, eventuelle Wasserreste wurden durch azeotrope Trocknung mit Aceton/Toluol (1/3, v/v) entfernt.

Wurden die Pigmente in Lösungsmittel belichtet, so konnte auf die oben beschriebene Extraktion verzichtet werden. Die belichtete Lösung wurde aus der Küvette entnommen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Die Aufbewahrung der trockenen Pigmente bis zur Analyse erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Argon.

## 2.8 Myoglobin-Denaturierungsexperimente

### 2.8.1 Denaturierung mit Guanidin

#### Vorbereitung der Proben:

Zur Präparation der Messlösung wurde zunächst eine 6 M Lösung von Guanidinium-Hydrochlorid (Guanidin) in Puffer-III/Glycerin (46/54, v/v) hergestellt. Die gleiche Puffer-Glycerin-Mischung wurde für Verdünnungen bereitgehalten. Die in Puffer-III vorliegenden Proteine wurden langsam mit so viel Glycerin\* versetzt, bis die prozentuale Zusammensetzung der Lösung einem Verhältnis von 46/54 (v/v, Puffer/Glycerin) entsprach. Aus dieser Lösung wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  entnommen, mit dem zum Erreichen der gewünschten molaren Endkonzentration entsprechenden Volumen der Guanidin-Lösung versetzt und mit der bereitgehaltenen Puffer-Glycerin-Mischung auf 250  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Proteinkonzentration aller Messlösungen betrug 20  $\mu\text{M}$ .

#### CD-Messparameter:

Die Messungen wurden in einer 1 mm Quarzglas-Küvette bei Raumtemperatur durchgeführt. Detektiert wurden die  $\Delta A$ -Werte im UV-Bereich von 208 bis 250 nm. Die Auswertung erfolgte, indem die Differenz von  $\Delta A$  bei 248 nm und  $\Delta A$  bei 224 nm gegen die Guanidin-Konzentration aufgetragen wurde. Hierdurch kann die Abnahme des  $\alpha$ -Helix-Gehalts im Protein direkt verfolgt werden, da deren Minimum bei 224 nm durch die Denaturierung kontinuierlich an Intensität verliert, während der  $\Delta A$ -Wert bei 248 nm invariant ist.

---

\* Die Verwendung von Glycerin im Reaktionsgemisch beruhte darauf, dass mit den gleichen Proben sowohl im nativen als auch im denaturierten Zustand Lochbrenn- und spektrale Diffusionsexperimente durchgeführt werden sollten, die eine Temperatur von  $\leq 4\text{ K}$  erfordern. Bei dieser Temperatur weisen gefrorene wässrige Lösungen starke Lichtstreuungseffekte auf, während Lösungen mit einem Glycerin-Anteil  $>50\%$  in einen glasartigen Zustand übergehen (Srajer *et al.*, 1986; Cupane *et al.*, 1993).

### **2.8.2 Thermische Denaturierung**

Die Denaturierung der Pigment-Protein-Komplexe bzw. des Apoproteins wurde sowohl im UV-Bereich als auch im sichtbaren Bereich des Spektrums verfolgt. Auf diese Weise war sowohl eine direkte Detektion des Verhaltens des Proteins möglich, als auch indirekt über den Chromophor. Die in Puffer-III vorliegenden Proben wurden hierbei von 20 °C auf 85 °C in einem kontinuierlichen Heizzyklus mit einer Heizrate von 0,8 °C pro Minute aufgeheizt. Währenddessen wurden die CD-Signale des Proteins bei 222 nm und bei 255 nm, und die CD-Signale des Pigments im Maximum der jeweiligen Soret- und Q<sub>y</sub>-Bande (soweit vorhanden) aufgezeichnet. Da die Signalintensität des Proteins im UV-Bereich um ein Vielfaches größer ist als die korrespondierende Signalintensität des Pigments im sichtbaren Bereich, wurde die Denaturierung in den beiden Bereichen in zwei aufeinanderfolgenden Zyklen in unterschiedlichen Küvetten mit jeweils frischer Probe gemessen. Verwendet wurden jeweils Quarzglasküvetten mit einer Weglänge von 1 mm bzw. 1 cm. Die Konzentration der Proben betrug 25 µM.

## **2.9 Informatische Methoden**

### **2.9.1 Datenbanken**

Die Strukturdaten für die dreidimensionale Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten Proteine stammen aus der Brookhaven protein data base (*PDB*) (<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/>).

### **2.9.2 3D-Visualisierung von Proteinen**

Unter Verwendung des Programms *WebLab ViewerPro* (Accelrys Inc., Cambridge, UK) wurden die 3D-Strukturen der in dieser Arbeit beschriebenen Proteine erstellt. Mit diesem Programm ist es möglich, die Proteine in Echtzeit zu bewegen oder in der Größe zu ändern. Durch eine eingebaute Makrosprache können verschiedene Operationen durchgeführt werden, wie z.B. die Berechnung von Atomabständen und Torsionswinkeln.

### **2.9.3 Andere informatische Methoden**

Die Darstellung der Strukturformeln der verwendeten Chromophore erfolgte mit dem frei verfügbaren Programm *ChemWin 3.0* (<http://ftp.unb.br/pub/download/cbsp/Download/>

Visualizadores/ChemWin). Die Originaldaten aller Spektren und Chromatogramme wurden nach deren Umwandlung in ASCII-Files mit den Programmen *MicroCal Origin 6.1* (OriginLab Corporation) und *Excel 2000* (Microsoft Corporation, Redmond, USA) bearbeitet.

### 3 Charakterisierung der Pigment-Myoglobin-Komplexe

Um die Photoreaktivität von Chlorophyll- und Bakteriochlorophyll-Derivaten in Proteinen in wässriger, Detergens-freier Umgebung zu testen, sollten zwei Rekonstitutionssysteme, die eine Bindung der Chromophore an hydrophile Proteine gewährleisten, in unserem Labor etabliert werden. Gleichzeitig sollten die Eigenschaften dieser artifiziellen Pigment-Protein-Komplexe hinsichtlich der Selektivität bei der Pigmentbindung untersucht werden. Die Auswahl der Versuchsproteine erfolgte hinsichtlich der Bindung der Pigmente in monomerer Form. Beabsichtigt war zudem ein Pigment-Protein-Verhältnis von 1:1. Ein weiteres Auswahlkriterium stellte die leichte Zugänglichkeit der Proteine in größeren Mengen dar.

Bereits 1965 gelang Breslow und Koehler der Austausch des natürlichen, Eisen enthaltenden Kofaktors Protohäm in Myoglobin gegen das Eisen-freie Protoporphyrin IX. Pearlstein *et al.* (1982) sowie vor allem Boxer und Wright (Boxer und Wright, 1979; Wright und Boxer, 1981) erweiterten den Austausch von den Protoporphyrinen auf Chlorine und Bakteriochlorine. Die Etablierung, Verbesserung und Erweiterung dieses Rekonstitutionssystems war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit.

Neben Myoglobin wurde Albumin (BSA) als weiteres Protein gewählt. Ein wesentliches Charakteristikum von Albumin ist seine hohe Affinität für eine Vielzahl von relativ hydrophoben Liganden. Monomere Komplexe zwischen BSA bzw. HSA und den offenkettigen Tetrapyrrolen Bilirubin und Biliverdin sind aus der Literatur bekannt (Blauer *et al.*, 1970; Blauer und King, 1970; Blauer und Wagniere, 1975). Komplexe von BSA mit Chlorophyll, die zum Teil größere Aggregate darstellen, wurden ebenfalls beschrieben (Inamura *et al.*, 1983; Shibata *et al.*, 1986). Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein System zur Darstellung monomerer Pigment-Albumin-Komplexe entwickelt werden, um deren Photostabilitäten mit den Photostabilitäten der Pigment-Myoglobin-Komplexe zu vergleichen.

In Kapitel 3 werden zunächst die in dieser Arbeit hergestellten Pigment-Myoglobin-Komplexe beschrieben, anschließend erfolgt in Kapitel 4 die Charakterisierung der hier erstmals konstituierten Pigment-Albumin-Komplexe.



der Vinylsubstituent an C-3 gegen eine Acetylgruppe getauscht und die für Chlorine und Porphyrine charakteristische Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C-7 und C-8 ist durch eine Einfachbindung ersetzt. Zusätzlich tragen auch die Bakteriochlorophylle eine Ethylgruppe anstelle der Vinylgruppe an C-8. Sowohl die Chlorophylle als auch die Bakteriochlorophylle besitzen nur eine Einfachbindung zwischen den Atomen C-17 und C-18, was sie von den Porphyrinen wie Protohäm unterscheidet. Die Chl und BChl koordinieren Magnesium im Zentrum, während Protohäm ein zentrales Eisenatom besitzt.

**Tabelle 3-1.** Übersicht über die Substituenten und Zentralmetalle der (B)Chl-Derivate. Die Abkürzungen beziehen sich auf Abbildung 3-1. Wenn nur die R-Epimere aufgelistet sind, wurde nicht zwischen den Epimeren unterschieden. Das Gleichgewicht der Epimerisierung liegt normalerweise auf der Seite der Epimere, bei denen der C-13<sup>2</sup>-Substituent  $\alpha$ -ständig, d.h. unter der Ringebene, ist (Katz *et al.*, 1968; Hynninen und Lötjönen, 1985; Watanabe *et al.*, 1987; Mazaki und Watanabe, 1990; Mazaki *et al.*, 1992).

Pigment	Formel	Metall	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>13<sup>2</sup>(R)-Zn-Pheid a</b>	a	Zn	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>13<sup>2</sup>(S)-Zn-Pheid a</b>	a	Zn	H	COOCH <sub>3</sub>
<b>13<sup>2</sup>(R)-OH-Zn-Pheid a</b>	a	Zn	OH	COOCH <sub>3</sub>
<b>13<sup>2</sup>(S)-OH-Zn-Pheid a</b>	a	Zn	COOCH <sub>3</sub>	OH
<b>13<sup>2</sup>(R)-Zn-BPheid a</b>	b	Zn	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>13<sup>2</sup>(S)-Zn-BPheid a</b>	b	Zn	H	COOCH <sub>3</sub>
<b>3-Acetyl-13<sup>2</sup>(R)- Zn-Pheid a</b>	a	Zn	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>3-Acetyl-13<sup>2</sup>(S)- Zn-Pheid a</b>	a	Zn	H	COOCH <sub>3</sub>
<b>Zn-Proto-Pheid a<sup>*</sup></b>	a	Zn	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>Zn-Pyro-Pheid a</b>	a	Zn	H	H
<b>Zn-Pyro-BPheid a</b>	b	Zn	H	H
<b>Fe-Pheid a</b>	a	Fe	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>Ni-BPheid a</b>	b	Ni	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>Pd-BPheid a</b>	b	Pd	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>Pheid a</b>	a	-	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>BPheid a</b>	b	-	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>BChl a<sup>#</sup></b>	b	Mg	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>Chl a<sup>#</sup></b>	a	Mg	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>Chlid a</b>	a	Mg	COOCH <sub>3</sub>	H
<b>PCB</b>	c	-	-	-

\* Doppelbindung zwischen C<sub>17</sub> und C<sub>18</sub>      # Phytolrest an C<sub>17</sub><sup>3</sup>

Die bei den Rekonstitutionen von Myoglobin verwendeten Chromophore unterschieden sich von denen in der Literatur (Wright und Boxer, 1981) durch die Substituenten an C-13<sup>2</sup> und durch die eingefügten Zentralmetalle. Während Wright und Boxer hauptsächlich die Pyro-Derivate der Zn- und Mg-Komplexe von Chlid und BChlid in Myoglobin inserierten, wurden

in dieser Arbeit die natürlichen Varianten für die Rekonstitutionen verwendet, die an C-13<sup>2</sup> neben einem Wasserstoffatom eine Carbomethoxy-Gruppe tragen. Zusätzlich wurden die Rekonstitutionseigenschaften von 13<sup>2</sup>-Hydroxy-Derivaten untersucht und die Zentralmetalle auf Eisen, Nickel und Palladium erweitert. Darüber hinaus wurden die Bindungseigenschaften des offenkettigen, zur Gruppe der Bilinchromophore gehörenden Tetrapyrrols Phycocyanobilin (PCB) untersucht. Abbildung 3-1 und Tabelle 3-1 und 3-2 geben einen Überblick über die Strukturen und Absorptionseigenschaften der eingesetzten Chromophore.

**Tabelle 3-2.** Absorptionsmaxima und Relation der Maxima der bei den Rekonstitutionen eingesetzten Tetrapyrrole.

Pigment	Lösungsmittel (Aceton)		
	Q <sub>y</sub> λ <sub>max</sub> [nm]	Soret λ <sub>max</sub> [nm]	Verhältnis A <sub>Q</sub> /A <sub>Soret</sub>
13 <sup>2</sup> (R)-Zn-Pheid <i>a</i>	656	425	0.74
13 <sup>2</sup> (S)-Zn-Pheid <i>a</i>	656	425	0.74
13 <sup>2</sup> (R/S)-OH-Zn-Pheid <i>a</i>	656	425	0.74
13 <sup>2</sup> (R)-Zn-BPheid <i>a</i>	763	354	0.93
13 <sup>2</sup> (S)-Zn-BPheid <i>a</i>	763	354	0.93
3-Acetyl-13 <sup>2</sup> (R)- Zn-Pheid <i>a</i> *	675	429	0.92
3-Acetyl-13 <sup>2</sup> (S)- Zn-Pheid <i>a</i> *	675	429	0.92
Fe-Pheid <i>a</i>	684 <sup>#</sup>	387 <sup>#</sup>	0.25
Ni-BPheid <i>a</i>	778	336	1.05
Pd-BPheid <i>a</i>	754	331	1.56
Pheid <i>a/a'</i>	666	410	0.46
BPheid <i>a/a'</i>	747	358	0.47
BChl <i>a</i>	770	358	1.03
Chl <i>a</i>	663	430	0.74
Chlid <i>a</i>	663	430	0.74
PCB	689 <sup>§</sup>	375 <sup>§</sup>	0.78 <sup>§</sup>

\* Die aufgeführten Absorptionswerte wurden einer Mischung mit Zn-BPheid *a* entnommen.

# breite Banden in Aceton

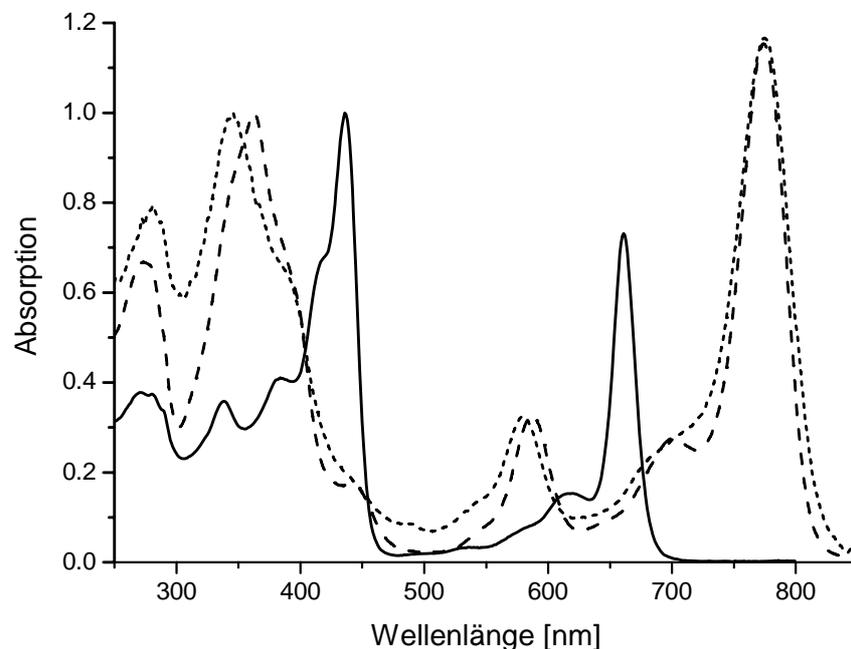
§ in saurem Methanol

### 3.1.1 Einfluss des Zentralmetalls

#### Rekonstitution mit Zn-Pheid *a*, Chlid *a*, Zn-BPheid *a* und Ni-BPheid *a*

In Anlehnung an die Ergebnisse von Boxer und Wright (Boxer und Wright, 1979; Wright und Boxer, 1981) wurde die Rekonstitution von Apo-Mb zunächst mit Zn-Pheid *a* getestet. Abbildung 3-2 zeigt das Spektrum des rekonstituierten Komplexes. Das Maximum der Q<sub>y</sub>-

Bande liegt bei 661 nm, das Maximum im Soret-Bereich bei 436 nm. Verlauf, Lage und Verhältnis der Absorptionsbanden zueinander ( $A_Q/A_{\text{Soret}} = 0,73$ ) stimmen nahezu mit den von Boxer beschriebenen Werten überein. Die beobachteten Abweichungen (Boxer: Soret = 438 nm und  $A_Q/A_{\text{Soret}} = 0,58$ ) gründen sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf Boxer's Verwendung von Pyro-Zn-Pheid *a*, welches sich spektral geringfügig von Zn-Pheid *a* unterscheidet (Helfrich, 1995). Vergleichbare spektrale Differenzen bezogen auf das von Boxer hergestellte Pyro-Chlid-*a*-Mb ergibt die Rekonstitution von Apo-Mb mit Chlid *a* (Abbildung 3-3), welches Magnesium als Zentralmetall enthält. Das Maximum der  $Q_y$ -Bande liegt hier bei 664 nm, das Maximum im Soret-Bereich bei 436 nm ( $A_Q/A_{\text{Soret}} = 0,80$ ).

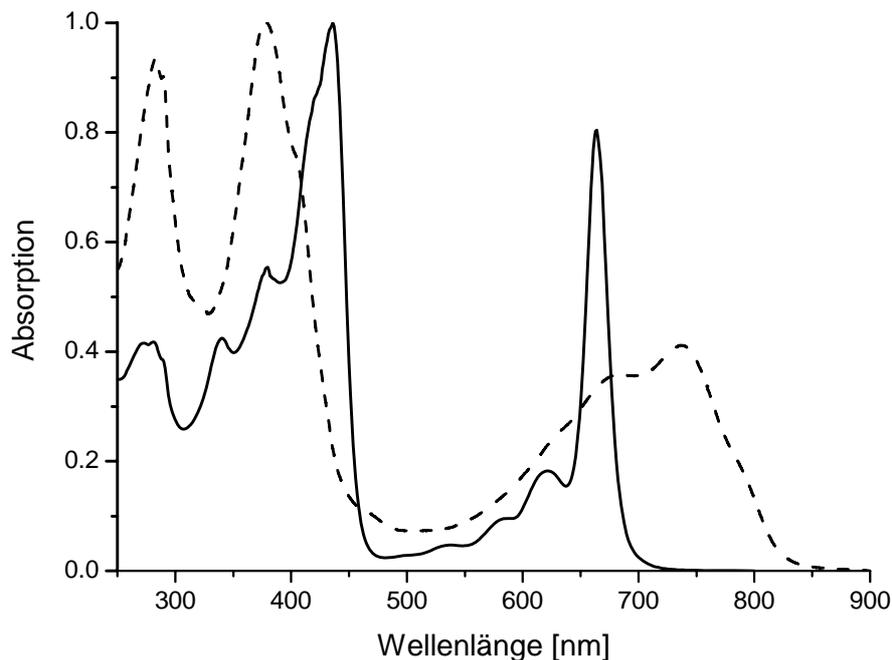


**Abbildung 3-2.** Absorptionsspektren der Komplexe von Zn-Pheid *a* (—), Zn-BPheid *a* (---) und Ni-BPheid *a* (----) mit Apo-Myoglobin. Die Spektren wurden im Maximum der Soret-Bande normiert. In Abbildung 3-13 erfolgt die Darstellung dieser Spektren bezogen auf die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Komplexe.

Neben den beschriebenen Chlorin-Derivaten wurde die Komplexbildung mit Bakteriochlorin-Derivaten untersucht. Auch hier wurden die natürlichen  $13^2$ -Carbomethoxy-Derivate eingesetzt, woraus sich wiederum geringfügige spektrale Abweichungen zu den Pyro-Derivaten ergeben. Abbildung 3-2 zeigt die Absorptionsspektren von Zn-BPheid-*a*-Mb mit Maxima bei 774 und 362 nm ( $A_Q/A_{\text{Soret}}=1,15$ ) und von im Rahmen dieser Arbeit erstmalig hergestelltem Ni-BPheid-*a*-Mb. Die Maxima dieses neuen Komplexes liegen bei 775 und 346

nm, das Verhältnis von Q<sub>y</sub>-Bande zu Soret-Bande errechnet sich zu 1,17 und weicht damit nur wenig von dem des Zn-Komplexes ab.

Die Ausbeuten der vier beschriebenen Rekonstitutionen lagen alle um 80 % (s. Kapitel 2.6.1), es ist allerdings strikt darauf zu achten, möglichst unter Sauerstoffausschluss zu arbeiten, da sowohl die Chlorin-Derivate als auch die Bakteriochlorin-Derivate sehr oxidationsempfindlich sind. Bei den Chlorin-Derivaten ist die dabei auftretende Oxidation zum 13<sup>2</sup>-Hydroxy-Chlorin spektral nicht erkennbar, sondern lässt sich erst durch analytische HPLC aufdecken (s. Kapitel 5). Bei den Bakteriochlorinen äußert sich die Oxidation durch das Auftreten zweier zusätzlicher Banden im Absorptionsspektrum. Diese liegen im Bereich von 695 und 445 nm und sind charakteristisch für die Oxidation an C-7/8, da hierbei der Übergang vom Bakteriochlorin zum Chlorin erfolgt. Selbst unter den hier verwendeten Schutzgas-Bedingungen ließen sich Oxidationen der Pigmente nicht völlig ausschließen, was die Schultern im Spektrum von Zn-BPheid-*a*-Mb (Abbildung 3-2) deutlich machen.

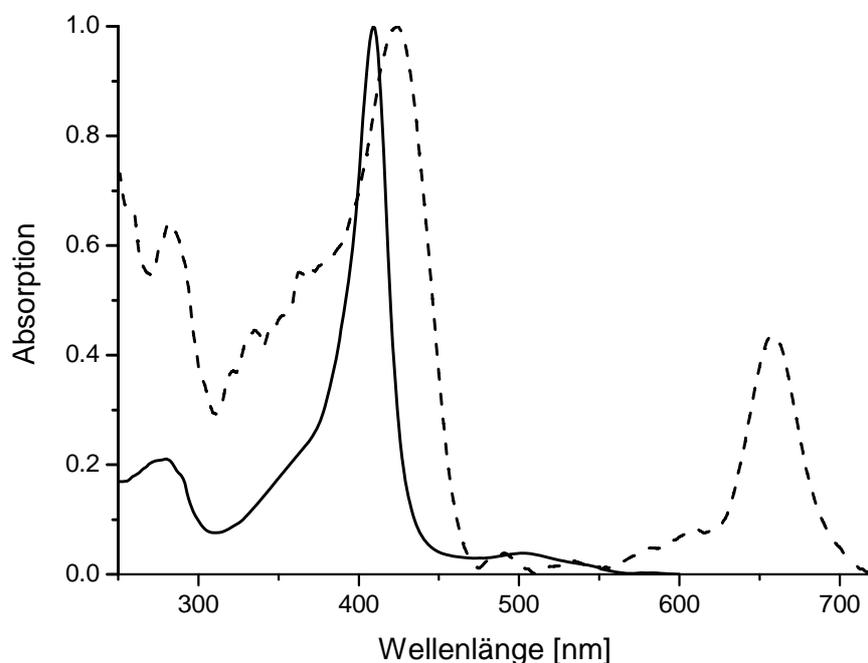


**Abbildung 3-3.** Absorptionsspektren der Komplexe von Chlid *a* (—) und PCB (---) mit Apo-Myoglobin. Die Spektren wurden im Maximum der Soret-Bande normiert.

#### Rekonstitution mit Fe-Pheid *a*

Eine Rekonstitution von Apo-Mb mit Fe-Pheid *a* konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals realisiert werden, wenn auch mit sehr viel geringerer Ausbeute als für die oben beschriebenen

Pigmente. Abbildung 3-4 zeigt das Absorptionsspektrum des Komplexes. Das Maximum der  $Q_y$ -Bande liegt bei 658 nm, das der Soret-Bande bei 424 nm ( $A_Q/A_{\text{Soret}} = 0,43$ ). Der Vergleich mit dem Absorptionsspektrum des nativen Myoglobins zeigt den typischen Spektralverlauf eines Chlorin-Spektrums mit intensiver Absorption im langwelligen Bereich, welche dem Porphyrin-Spektrum gänzlich fehlt. Mit 658 nm liegt die  $Q_y$ -Bande des Fe-Pheid *a* im Mb-Komplex zwischen den in Diethylether beobachteten Werten für monomeres und dimeres Fe-Pheid *a* (Snigula, 2003). Der Einfluss des Proteins trägt also zu einer Intensitätserhöhung der  $Q_y$ -Bande im Verhältnis zur Soret-Bande bei. Die Proteinumgebung führt außerdem zu einer langwelligen Verschiebung der Soret-Bande um ca. 20 bis 35 nm (je nach Lösungsmittel, s. Tabelle 3-2 und Snigula (2003)). Da die Häm-Bindungstasche nur Platz für ein monomeres Pigment bietet, könnte die Komplexierung mit Mb eventuell zur Trennung von  $\mu$ -oxo-Dimer (Snigula, 2003) und monomerem Fe-Pheid *a* dienen. Aufgrund der sehr geringen Ausbeute, bedingt durch die schlechte Löslichkeit des monomeren Pigments unter den verwendeten Bedingungen, ist dieses Konzept aber noch nicht ausgereift. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf den Zn-(B)Pheid-Komplexen lag, wurde auf eine Optimierung der Reaktion verzichtet.



**Abbildung 3-4.** Absorptionsspektren von nativem Myoglobin (—) und des Komplexes von Apo-Myoglobin mit Fe-Pheid *a* (---). Das Spektrum von Fe-Pheid-*a*-Mb wurde direkt dem nativen Gel entnommen und wegen der dabei auftretenden Streuung in der Basislinie korrigiert und geglättet. Die im Bereich von 300 bis 380 nm auftretenden Unregelmäßigkeiten sind eine Folge der Streuung, die Bande um 490 nm stellt ein Artefakt dar.

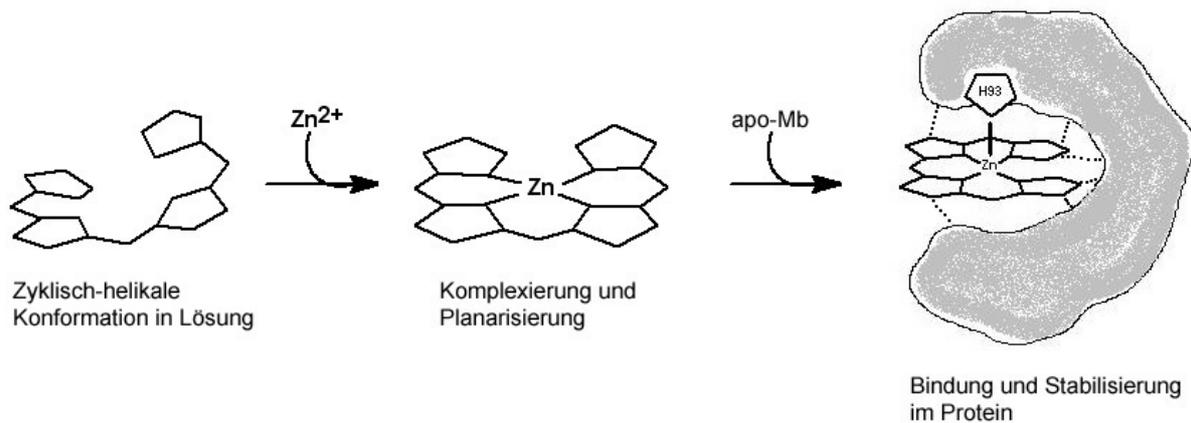
### Rekonstitution mit PCB

Neben der Bindung von zyklischen Tetrapyrrol-Derivaten sollte die Einlagerung eines offenkettigen Tetrapyrrols in die Häm-Bindungstasche untersucht werden. In der Literatur sind Komplexe von Myoglobin mit Bilin-Chromophoren beschrieben (Marko *et al.*, 1989; Falk *et al.*, 1990b) und die Kristallstruktur des Biliverdin-Myoglobin-Komplexes wurde 1995 publiziert (Wagner *et al.*, 1995). Der Unterschied zwischen den Chlorophyll-Derivaten und den Bilin-Pigmenten, die in Lösung ebenfalls eine zyklische Konformation einnehmen (Storf, 2003), besteht im Fehlen einer Methin-Brücke, des von den vier Stickstoffatomen koordinierten Zentralmetalls und des isozyklischen Rings (s. Abbildung 3-1).

Obwohl das in dieser Arbeit eingesetzte PCB sehr gut wasserlöslich ist, scheiterte die Bindung unter den Standardbedingungen. Der freie Chromophor wurde in der Gelfiltration (s. Kapitel 2.6.1) vollständig vom Apo-Mb abgetrennt. Erst die Modifikation der Assoziationsbedingungen durch Zugabe von Zn-Acetat führte zur Bildung eines grün gefärbten  $Zn^{2+}$ -PCB-Mb-Komplexes, welcher während der Aufreinigung über die Sephadex-Säule vom freien blauen Chromophor abgetrennt werden konnte. Der gebildete grüne Komplex ist, ebenso wie die oben beschriebenen Komplexe, im nativen Gelsystem stabil, wo er als grüne, stark orange fluoreszierende Bande detektiert werden kann (s. Abbildung 3-18). Diese durch Anregung mit UV-Licht hervorgerufene starke Fluoreszenz des PCB-Mb-Komplexes ist ein wichtiger Hinweis auf die zyklische Konformation des Chromophors, da PCB nur in seiner zyklischen Konformation unter Komplexbildung eines zentralen  $Zn^{2+}$ -Ions fluoresziert (Berkelman und Lagarias, 1986; Falk, 1989). Die in Lösung vorliegende zyklisch-helikale Konformation des freien Pigments (Scheer, 1981) zeigt keine Fluoreszenz. Der Chromophor kann also erst in seiner zyklischen Konformation mit zentral gebundenem  $Zn^{2+}$  im Myoglobin binden. Die Besetzung der fünften Koordinationsstelle des  $Zn^{2+}$  durch das proximale His93 sorgt dann vermutlich für eine zusätzliche Stabilisierung des Pigments in der Häm-Bindungstasche. In Abbildung 3-5 sind die einzelnen Schritte der PCB-Bindung in Myoglobin modellhaft zusammengefasst.

Das Absorptionsspektrum des  $Zn^{2+}$ -PCB-Mb-Komplexes (Abbildung 3-3) zeigt ein Soret-Maximum bei 379 nm mit einer Schulter im langwelligen Bereich bei 405 nm. Das langwellige Absorptionsmaximum liegt bei 737 nm, eine Nebenbande erscheint bei 684 nm. Der Vergleich mit den Maxima natürlicher PCB-Proteinkomplexe (Storf, 2003) verdeutlicht die starke Rotverschiebung aller Banden im Myoglobin-Komplex. Zudem ist das Verhältnis des langwelligen zum kurzwelligen Absorptionsmaximum ( $A_L/A_K = 0.41$ ) deutlich verändert, da die Intensität der kurzwelligen Bande weitaus größer ist als die der langwelligen. In natürlichen Bilin-Komplexen ist dies umgekehrt (Falk, 1989; Storf, 2003). Das beobachtete

Intensitätsverhältnis der Absorptionsbanden und insbesondere die Lage der langwelligen Bande sind ein deutlicher Hinweis auf die Bindung von PCB als Zn-Komplex im Myoglobin. Von Falk *et al.* (1990a) wurde eine ähnliche Verschiebung des langwelligen Maximums des Biliverdin-Mb-Komplexes nach Chelierung mit  $Zn^{2+}$  beschrieben. In den natürlichen Biliproteinen (Phycobiliproteine, Phytochrome) ist der Chromophor grundsätzlich in einer weitgehend gestreckten Konformation gebunden und die vier Pyrrolstickstoffe unterliegen keiner Wechselwirkung mit einem Zentralmetall (Scheer und Kufer, 1977; Scheer, 1982).

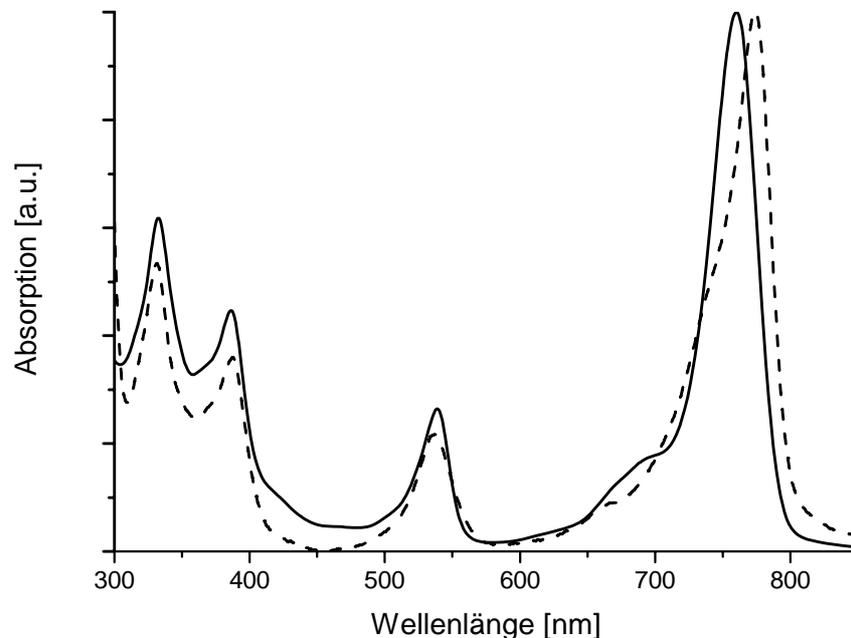


**Abbildung 3-5.** Modell der Bindung von Phycocyanobilin in Myoglobin in Anwesenheit von  $Zn^{2+}$ -Ionen.

#### Rekonstitutionsversuche mit Pd-BPheid *a*, BPheid *a* und Pheid *a*

Im Hinblick auf das für die photodynamische Krebstherapie verwendete Pd-BPheid *a* (Scherz *et al.*, 2000) wurde der Einbau dieses Pigments in die Häm-Bindungstasche ebenfalls untersucht. Der Nachteil dieses Chromophors besteht in seiner schlechten Löslichkeit in wässriger Umgebung, wie auch in vielen Lösungsmitteln. Unter den Standardrekonstitutionsbedingungen löst sich nur ein sehr geringer Teil des Pigments in der wässrigen Umgebung, und dies auch nur unter Bildung von Aggregaten (Abbildung 3-6). Eine Einlagerung des monomeren Pigments in die Bindungstasche konnte unter diesen Bedingungen nicht erreicht werden, der eingesetzte Chromophor wurde durch die Gelfiltration vollständig von der Proteinfraction abgetrennt. Die Modifikation der Rekonstitutionsbedingungen durch Verwendung von Puffer-II, welcher unter anderem das Detergens Triton-X-100 enthält, führte ebenfalls zu keiner Komplexbildung des Pigments durch Myoglobin, obwohl das Pigment hier monomer in der Lösung vorliegt (Abbildung 3-6). Wurde die Rekonstitution zur Kontrolle unter diesen modifizierten Bedingungen mit Zn-BPheid *a*, Ni-BPheid *a* oder Zn-Pheid *a* durchgeführt, so resultierte sie immer in der Bildung der Pigment-Protein-Komplexe in vergleichbarer Ausbeute wie unter Standardbedingungen. Somit liegt der Grund für die Nicht-

Einlagerung von Pd-BPheid *a* nicht in den Rekonstitutionsbedingungen, sondern muss in den speziellen Eigenschaften des Pigments, das keine fünfte Ligandenstelle besitzt (s. unten), gesucht werden.



**Abbildung 3-6.** Absorptionsspektren von Pd-BPheid *a* in Puffer-I (---) und -II (—).

Die Darstellung von Pheid-*a*-Mb oder BPheid-*a*-Mb konnte ebenfalls weder unter den Standardbedingungen noch unter den modifizierten Rekonstitutionsbedingungen erreicht werden.

#### Welche Faktoren beeinflussen Komplexbildung und Stabilität?

Die Tetrapyrrolchromophore natürlich vorkommender (Bakterio)Chlorophyll-Proteine enthalten in den meisten Fällen Magnesium als Zentralmetall. Neben den vier durch die Stickstoffe des Tetrapyrrolrings besetzten Koordinationsstellen stehen dem  $Mg^{2+}$  zwei weitere Koordinationsstellen zur Verfügung, die je nach Basizität vorhandener Liganden besetzt werden (Brereton und Sanders, 1983a). Die Funktion eines basischen Liganden wird in natürlichen Chlorophyll-Proteinen sehr oft von dem Imidazol-Substituenten eines Histidins wahrgenommen (Bylina und Youvan, 1991; Paulsen, 1997). Zusätzlich fungieren auch Glutamin und Asparagin, sowie Carbonyl-Gruppen des Protein-Rückrats und sogar Wasser als zusätzliche Liganden (Scheer, in print). Die in der Häm-Bindungstasche vorhandenen Histidine His93 und His64 (Nummerierung bezogen auf Pottwal-Mb) koordinieren das

zentrale Eisen des Protohäms, wobei sich zwischen das im Gegensatz zu His93 nur schwach koordinierende His64 und Fe ein weiterer Ligand, wie z.B. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> oder CO einschieben kann (Schlichting und Chu, 2000; Churg und Makinen, 1978; Phillips und Schoenborn, 1981; Olson, 1997).

Eine derartige Koordination eines Tetrapyrrol-Zentralmetalls ist möglich, wenn dem Zentralmetall, neben den durch die vier Pyrrolstickstoffe besetzten, freie Koordinationsstellen zur Verfügung stehen. Dies ist sowohl bei Mg als auch bei Zn, Ni und Fe der Fall (Buchler, 1975; Brereton und Sanders, 1983a; Wiberg, 1995; Chen *et al.*, 1995; Hartwich *et al.*, 1998). Die vier möglichen Koordinationsstellen des Pd (Buchler, 1975; Wiberg, 1995) hingegen sind durch die vier Pyrrolstickstoffe abgesättigt, eine Bindungsstelle für His93 steht nicht zur Verfügung. Ebenso wenig besitzen die Zentralmetall-freien (B)Pheide eine Andockungsstelle für das His93 in der Bindungstasche. Daher erfahren weder Pd-BPheid *a* noch die (B)Pheophorbide durch Interaktion mit His93 in der Bindungstasche eine Stabilisierung. Dies wird durch die Ergebnisse von Wright und Boxer (1981) bestätigt. Die erfolgreiche Rekonstitution von Apo-Mb mit Protoporphyrin IX (Breslow und Koehler, 1965), welches ein mit Protohäm identisches Kohlenstoffgerüst besitzt, dem das zentrale Fe fehlt, ist offensichtlich durch mögliche andere Interaktionen des Proteins mit dem Pigment bedingt. Da die Häm-Bindungstasche für genau diese Pigment-Struktur optimiert ist, wirkt das Fehlen des Zentralmetalls wahrscheinlich destabilisierend, führt aber noch nicht zur Dissoziation des Pigment-Myoglobin-Komplexes. Die der Verankerung des Pigments im Protein dienenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Propionsäureresten an den Ringen C und D des Tetrapyrrolmakrozyklus und His97, Ser92 und Lys45 können hier wahrscheinlich gleichermaßen ausgebildet werden. Hinzu kommen die wahrscheinlich spezifischen hydrophoben Wechselwirkungen im Proteininneren. Durch die veränderte Struktur und die unterschiedlichen, zumeist raumerfüllenderen Substituenten an den Ringen C und D der Chlorophyll-Derivate, die eine leicht divergierende Ausrichtung dieser Pigmente verursachen können, sind der Wasserstoffbrückenkontakt und/oder die spezifischen hydrophoben Wechselwirkungen bei (B)Pheid *a* und Pd-BPheid *a* offensichtlich nicht mehr möglich. Dies hat zur Folge, dass diese Pigmente ohne Zentralmetall nicht stabil in der Bindungstasche eingelagert werden können. Die Ausbildung der Pigment-Myoglobin-Komplexe ist somit nicht durch die Zugänglichkeit der Bindungstasche bedingt, sondern wird durch die Stabilisierung des Pigments in der Bindungstasche bestimmt.

Die ausschließliche Einlagerung von PCB in Kombination mit einem Zentralmetall unter den hier verwendeten Rekonstitutionsbedingungen unterstützt diese These eines für eine stabile Bindung notwendigen zentralen Koordinationspunktes. Dies erinnert an die Selektivität von

Häm- und (B)Chl-Bindungsstellen, die durch ortsspezifische Mutagenese verändert werden. Sobald ein guter Ligand, wie z.B. Histidin in der Nähe des Zentralmetalls vorhanden ist, wird die Bindungsstelle durch ein metallhaltiges Tetrapyrrol, z.B. (B)Chl besetzt. Sind hingegen stark raumerfüllende AS-Reste an dieser Position präsent, die keine Koordination ermöglichen, so wird die Bindungsstelle mit (B)Phe gefüllt (Bylina *et al.*, 1988; Coleman und Youvan, 1990; Chirino *et al.*, 1994; Scheer und Hartwich, 1995; Czarnecki *et al.*, 1997).

Die in der Literatur beschriebene Einlagerung verschiedener Bilin-Chromophore ohne Zentralmetall, einschließlich des PCB, in Myoglobin wurde unter Verwendung von Pottwal-Mb erreicht (Marko *et al.*, 1989; Falk *et al.*, 1990b; Wagner *et al.*, 1995). Die Bilin-Chromophore sind hier leicht helikal verdreht in der Bindungstasche gebunden. In der Kristallstruktur des Biliverdin-Mb-Komplexes zeigt sich, dass das Pigment tiefer als der natürliche Chromophor in die Tasche ragt und dort durch drei Wasserstoffbrücken, unter Einbeziehung von zwei zusätzlichen Wassermolekülen, die in der Kristallstruktur des natürlichen Myoglobins nicht zu sehen sind, fixiert wird (Wagner *et al.*, 1995). Die Rekonstitutionsbedingungen weichen nicht wesentlich von den in der vorliegenden Arbeit verwendeten ab, Pigment und Protein wurden lediglich länger inkubiert. Eventuell sind die Art des eingesetzten Apo-Myoglobins und die Dauer der Inkubation für die Komplexbildung ausschlaggebend. Da Wale viel größeren Drücken ausgesetzt sind als terrestrische Organismen, sind auch die physikalischen Eigenschaften der entsprechenden Proteine verändert. Diese haben entscheidenden Einfluss auf derartige Komplexbildungen.

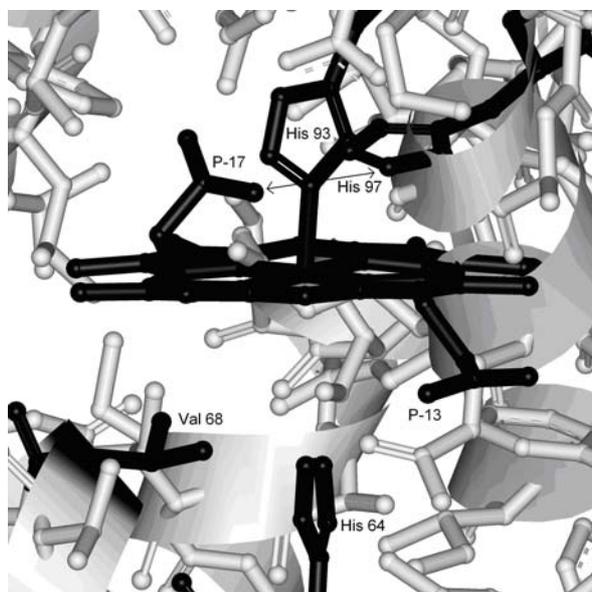
### **3.1.2 Effekte peripherer Substituenten**

Neben dem Zentralatom haben die Substituenten des Tetrapyrrolrings einen Einfluss auf die Bildung des Pigment-Myoglobin-Komplexes. Von besonderem Interesse sind hierbei zum einen Substituenten, die in das hydrophobe Innere der Bindungstasche ragen, zum anderen solche an der der Öffnung der Tasche zugewandten Seite.

#### Einfluss des isozyklischen Rings

Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem natürlichen Kofaktor Protohäm und den (B)Chl-Derivaten ist der isozyklische Ring. Dieser wird im Verlauf der Biosynthese der Chlorophylle aus der C-13-Propionsäure gebildet (Leeper, 1991). Die Asymmetrie des  $13^2$ -Kohlenstoffs bewirkt, dass in den stabileren  $\alpha$ -Epimeren die Carbomethoxygruppe nach unten gerichtet ist (bezogen auf Abbildung 3-1 liegt diese Gruppe unterhalb der Papierebene), während der Propionsäurerest an C-17 nach oben zeigt. Die Orientierung dieser beiden Seitengruppen ist

damit identisch mit der der Propionsäuren des achiralen Protohäms in der Mb-Bindungstasche (Vojtechovsky *et al.*, 1999) (Abbildung 3-7) und des Biliverdins im Mb-Komplex (Wagner *et al.*, 1995). Obwohl bislang keine Struktur eines Chlid-Mb-Komplexes veröffentlicht wurde (Boxer *et al.*, 1982), sprechen somit keine sterischen Faktoren gegen die Einlagerung eines (B)Chlid-Derivates in die Häm-Bindungstasche. Die Orientierung der Seitengruppen an C-17 und C-13<sup>2</sup> entspricht der des natürlichen Kofaktors und die Ausweitung der Ringstruktur durch den isozyklischen Ring führt ebenfalls zu keiner sterischen Beeinträchtigung, da dieser Teil des Chromophors aus der Bindungstasche herausragt. Die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Komplexe mit (B)Chlid-Derivaten und die in der Literatur beschriebenen Pyro-(B)Chlid-Mb-Komplexe bestätigen diese Theorie (Davis und Pearlstein, 1979; Wright und Boxer, 1981).



**Abbildung 3-7.** Illustration der Ausrichtung des Häm-Kofaktors in der Mb-Bindungstasche mit Blick von vorne in die Tasche hinein. Die AS His93, His64 und Val68 sind schwarz hervorgehoben. (Maurus *et al.*, 1998).

### Einfluss des Phytolrestes

Eine Rekonstitution mit (B)Chl *a*, welches an C-17<sup>3</sup> anstelle der freien Säure einen Phytylester trägt, gelang, entsprechend den Ergebnissen der Literatur (Davis und Pearlstein, 1979), nicht. Sämtliches Pigment wurde während der Aufreinigung vom Protein abgetrennt, es hatte sich kein stabiler Komplex gebildet. Grund hierfür ist wahrscheinlich die Größe und damit Raumerfüllung der langen Kohlenstoffkette des Phytolrestes. Sie führt zum einen dazu, dass sich das Pigment während der versuchten Einlagerung an der Öffnung der Bindungstasche verzahnt, zum anderen ist hierdurch keine Wasserstoffbrückenbindung zwischen His97 und der freien Säure mehr möglich.

### Einfluss einer Substitution an Ring A

Der Einfluss einer Veränderung der Substituenten an Ring A, welcher zusammen mit Ring B tief im hydrophoben Inneren der Bindungstasche verborgen ist (Kendrew *et al.*, 1960; Phillips, 1980), wurde durch die Rekonstitutionen mit Chlid- und BChlid-Derivaten untersucht. Diese Pigmentgruppen unterscheiden sich durch den Substituenten an C-3, er ist bei ersteren eine Vinylgruppe, bei letzteren eine Acetyl-Gruppe. Beide Derivat-Gruppen ließen sich in guter Ausbeute in die Mb-Bindungstasche einlagern (s. Kapitel 3.1.1). Die polare Acetyl-Gruppe wurde somit von dem hydrophoben Inneren der Bindungstasche akzeptiert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen der Mb-Komplexe verschiedener Bilin-Chromophore, deren polare Lactam-Gruppen (s. Abbildung 3-1) ebenfalls ins Innere der Bindungstasche eingelagert werden können. Die Bildungskonstanten dieser Komplexe sind allerdings um ca. eine Größenordnung kleiner als die der Komplexe, bei denen die Lactam-Gruppen aus der Tasche herausragen (Falk *et al.*, 1990b).

PCB, welches an C-3-homologer Stelle eine der Vinylgruppe verwandte Ethylgruppe trägt, die durch die  $sp^3$ -hybridisierten Kohlenstoffatome einen größeren Raumbedarf hat, wird in der Bindungstasche toleriert, solange zusätzlich  $Zn^{2+}$ -Ionen vorhanden sind. Durch diese wird wahrscheinlich der chelierte Chromophor über Koordination an His93 in der Tasche fixiert.

Die diese Ergebnisse ergänzenden Stabilitätsuntersuchungen der in dieser Arbeit hergestellten Mb-Komplexe werden in Kapitel 3.5 ausführlich diskutiert.

### **3.1.3 Regioselektivität an Position C-13<sup>2</sup>**

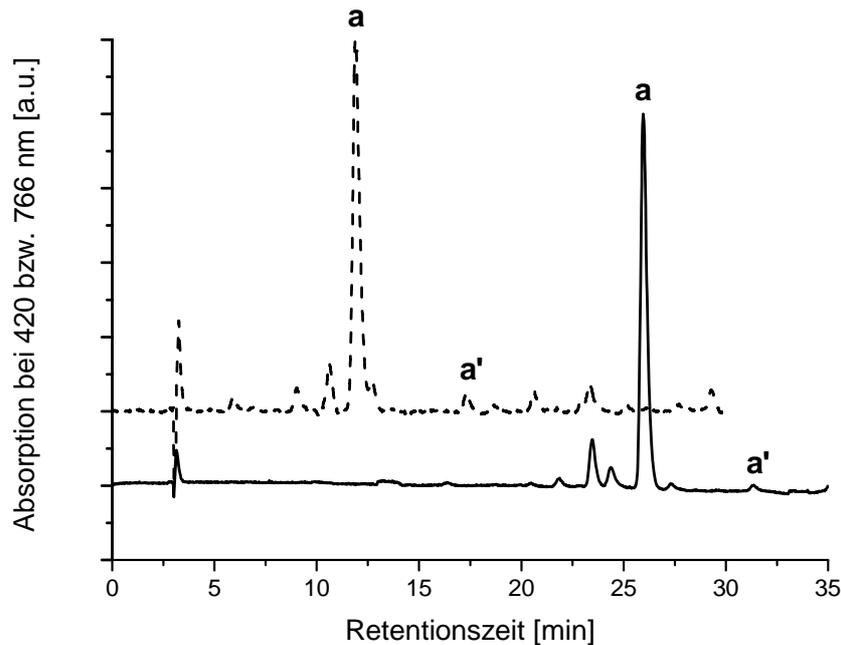
Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Rekonstitutionen von Apo-Mb mit (B)Chlid-Derivaten, die an C-13<sup>2</sup> die auch in der Natur vorhandene  $COOCH_3$ -Gruppe enthielten, ermöglichten die Untersuchung des Einflusses der Stereochemie an Position C-13<sup>2</sup> des isozyklischen Rings auf die Chromophor-Bindung.

#### Rekonstitution mit Pigmentüberschuss

Wurden die Rekonstitutionen mit einem so großen Überschuss einer epimeren Mischung (*a/a'* bzw. R/S = 3/1) von Zn-Pheid *a/a'* bzw. Zn-BPheid *a/a'* durchgeführt, dass das vorhandene R-Epimer zur vollständigen Besetzung aller Bindungstaschen ausreichte, so wurde ausschließlich das jeweilige R-Epimer gebunden. Abbildung 3-8 zeigt die HPLC-Chromatogramme der aus diesen Komplexen extrahierten Chromophore. Die dort sichtbaren

geringen Mengen an S-Epimer (<5%) beruhen auf der langsamen Epimerisierung während der Extraktion und Analyse.

Aus diesen Ergebnissen konnte zunächst auf eine bevorzugte Bindung des jeweiligen R-Epimers geschlossen werden, welches die gleiche Orientierung der Substituenten an C-17 und C-13<sup>2</sup> aufweist, die die Propionsäurereste des natürlichen Kofaktors Protohäm im Myoglobin haben (s. Abbildung 3-7).



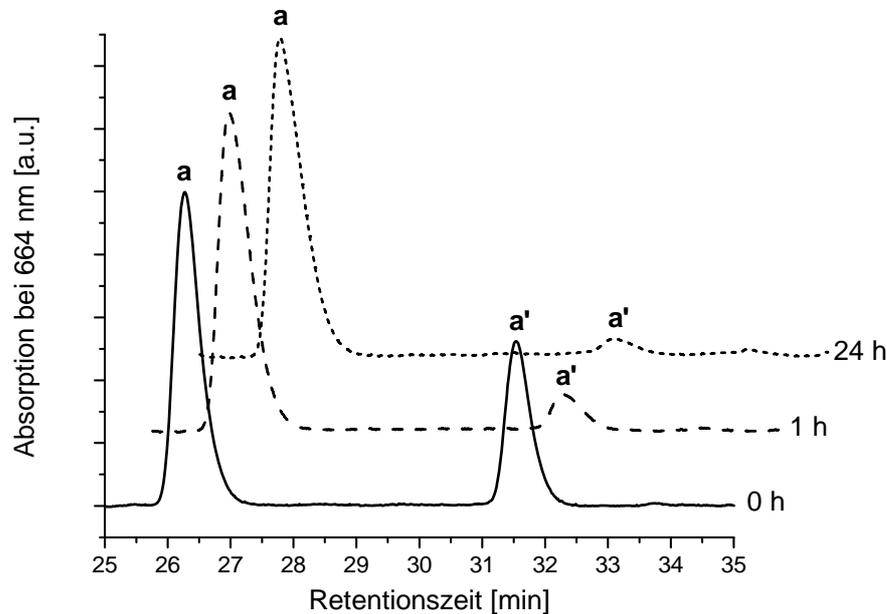
**Abbildung 3-8.** Chromatogramme von extrahiertem Zn-Pheid (—) bei 420 nm und Zn-BPheid (---) bei 766 nm nach der Rekonstitution von Mb mit einem Überschuss an epimerer Pigmentmischung von Zn-(B)Pheid *a/a'* im Verhältnis von 3:1 (*a/a'*).

### Rekonstitution mit Proteinüberschuss

Wurden die Rekonstitutionen mit einem 2-fachen Überschuss an Apo-Mb und einer an S-Epimer angereicherten Pigmentmischung durchgeführt, so wurden zunächst beide Epimere gebunden. Dies wurde unmittelbar dadurch sichtbar, dass bei der Aufreinigung über die Sephadex-Säule, die zur Abtrennung nicht gebundenen Pigments diente, keine Grünfärbung der Säule durch freies Pigment auftrat.

Das gebundene Pigment wurde jeweils unmittelbar nach der Gelfiltration und nach der Aufreinigung über die Ionenaustauschsäule am folgenden Tag aus dem Komplex extrahiert und mit analytischer HPLC untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 3-9 beispielhaft an der Rekonstitution mit Zn-Pheid *a/a'* dargestellt. Tabelle 3-3 fasst die Ergebnisse für Zn-Pheid, Zn-BPheid und 3-Acetyl-Zn-Pheid, welches bei der Aufreinigung

von Zn-BPheid über präparative HPLC durch Oxidation der Kohlenstoffatome C-7 und C-8 entsteht, zusammen.



**Abbildung 3-9.** Chromatogramme des zur Rekonstitution verwendeten Pigmentgemischs aus Zn-Pheid  $a/a'$  (—) und der aus den damit rekonstituierten Mb-Komplexen extrahierten Pigmente nach 1 h (---) und nach 24 h (----). Die Peaks der  $a$ -Epimere wurden zu Vergleichszwecken jeweils auf 1 normiert. Zur besseren Sichtbarkeit der die  $a'$ -Epimere kennzeichnenden Peaks wurden die Chromatogramme leicht gegeneinander versetzt dargestellt, die Retentionszeiten der Pigmente sind identisch.

**Tabelle 3-3.** Prozentuale Zusammensetzung der zur Rekonstitution eingesetzten Pigmentmischung bzw. der aus den jeweiligen Mb-Komplexen extrahierten Pigmente.

Pigment	R-Prozentsatz		
	vorher	1 h	24 h
Zn-Pheid <b>a</b>	66 %	92 %	98 %
Zn-BPheid <b>a</b>	43 %	46 %	63 %
3-Acetyl-Zn-Pheid <b>a</b>	50 %	94 %	95 %

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Komplexbildung beider Epimere in der Mb-Bindungstasche möglich ist. Das S-Epimer bildet allerdings nur übergangsweise einen Komplex mit Mb und wird sukzessive ins R-Epimer umgewandelt. Diese Epimerisierung verläuft bei den Chlorin-Derivaten sehr viel schneller als bei dem Bakteriochlorin-Derivat und folgt damit dem gleichen Trend wie in Lösung (Schaber *et al.*, 1984; Mazaki *et al.*, 1992).

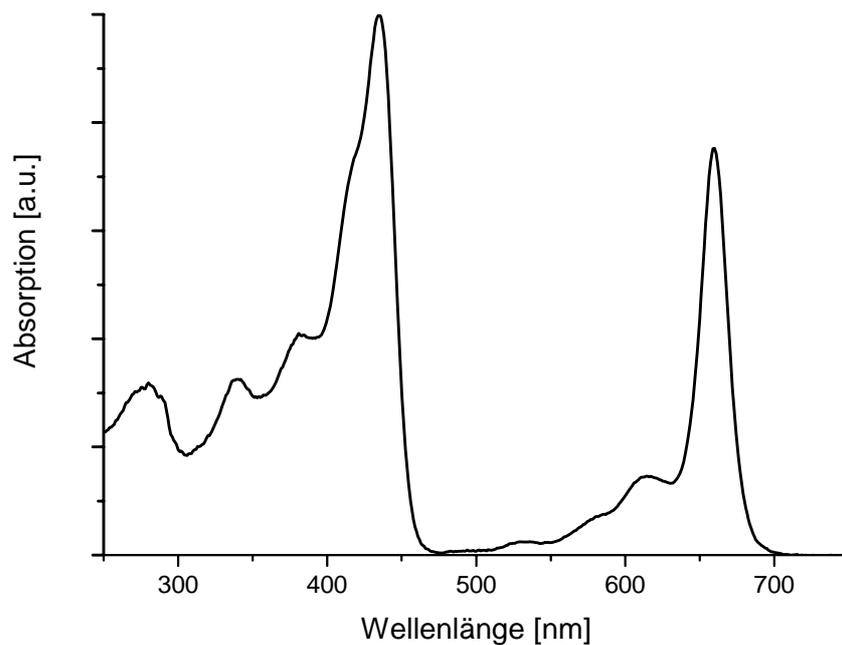
Verglichen mit der Epimerisierungsrate in Lösung, die zudem stark von der Pigmentkonzentration abhängig ist (Mazaki und Watanabe, 1990), verläuft die Umwandlung des  $a'$ -Epimers in das  $a$ -Epimer in der Protein-Bindungstasche mehr als hundertmal schneller. Dies deutet auf eine katalytische Wirkung der Proteinumgebung in der Bindungstasche hin. Natürliche Chlorophyll bindende Proteine selektieren sehr stark im Bezug auf die Substituenten und die Stereochemie am isozyklischen Ring (Fiedor *et al.*, 1992; Helfrich *et al.*, 1994), wobei bis jetzt noch nicht bekannt ist, ob und, wenn ja, welche Enzyme für die Epimerisierung der Chromophore *in vivo* verantwortlich sind. Das strikte Verhältnis von Chl  $a'$  und Photosystem I deutet allerdings auf eine streng kontrollierte Reaktion hin (Watanabe *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 2003). Apo-Mb könnte somit als Modell für eine derartige Epimerase dienen, auch wenn die Richtung der Epimerisierung hier gerade umgekehrt ist.

#### Rekonstitution mit $13^2$ -OH-Zn-Pheid $a$

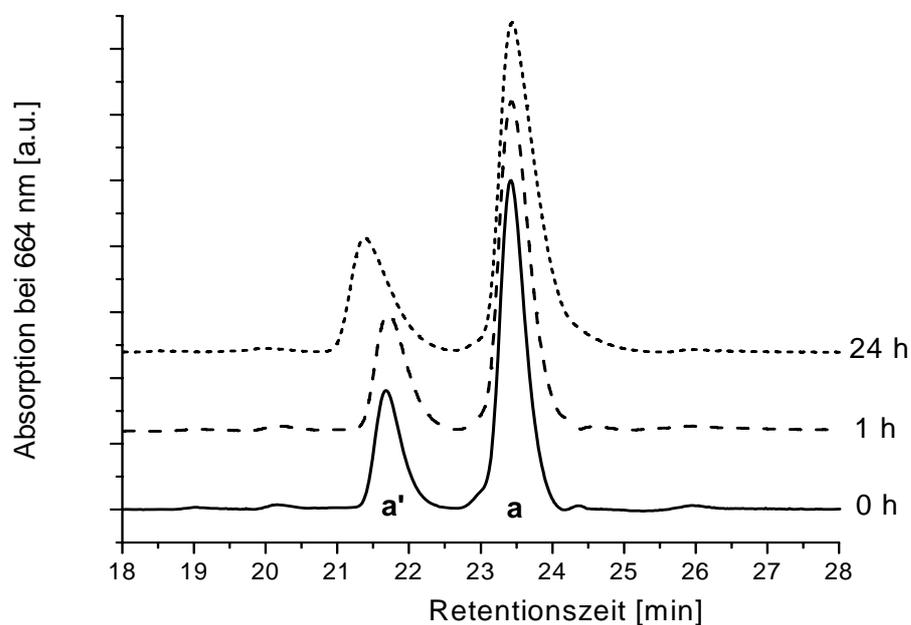
Die Substitution des „sauren“ H-Atoms an Position C- $13^2$  von Zn-Pheid  $a$  durch eine OH-Gruppe hat mehrere Effekte. Zum einen wird hierdurch ein Substituent eingeführt, dessen Größe eine Zwischenstellung zwischen H-Atom und COOCH<sub>3</sub>-Gruppe einnimmt, zum anderen wird durch diesen Substituenten die Keto-Enol-Tautomerie im isozyklischen Ring verhindert, und damit die leichte Epimerisierung, da kein azides Proton mehr zur Abspaltung vorhanden ist. Die Rekonstitution von Apo-Mb mit diesem Chromophor sollte zeigen, inwieweit die Bindungstasche voluminösere Substituenten, wie eine Hydroxy-Gruppe, oberhalb der Ringebene duldet (bezogen auf Abbildung 3-1 liegen alle Substituenten über der Papierebene oberhalb der Tetrapyrrolringebene). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Pigmente, die eine an C- $13^2$  festgelegte Stereochemie aufweisen, an dieser Position also keine Epimerisierungsreaktionen eingehen können, überhaupt eingebaut werden.

Abbildung 3-10 zeigt das Absorptionsspektrum des gebildeten  $13^2$ -OH-Zn-Pheid- $a$ -Mb-Komplexes und Abbildung 3-11 die Chromatogramme des zur Rekonstitution verwendeten Pigmentgemischs bzw. der aus dem Protein-Komplex extrahierten Pigmente. Die Rekonstitution wurde mit einem Überschuss an Apo-Mb durchgeführt, dabei blieb kein ungebundenes Pigment auf der Gelfiltrationssäule zurück.

Das Spektrum des Komplexes mit seinen Maxima bei 435 und 660 nm ( $A_Q/A_{\text{Soret}} = 0.75$ ) war nahezu identisch mit dem Spektrum von Zn-Pheid- $a$ -Mb (s. Kapitel 3.1.1). Im Gegensatz zu letzterem wurden aber beide Epimere dauerhaft von Apo-Mb gebunden. Somit scheint es für das Protein zwar günstiger zu sein, wenn die Stereochemie des Chromophors an Position C- $13^2$  die natürliche Stellung der Propionsäurereste des Protohäm s imitiert, dies stellt aber kein Ausschlusskriterium dar.



**Abbildung 3-10.** Absorptionsspektrum von  $13^2$ -OH-Zn-Pheid-*a*-Mb.



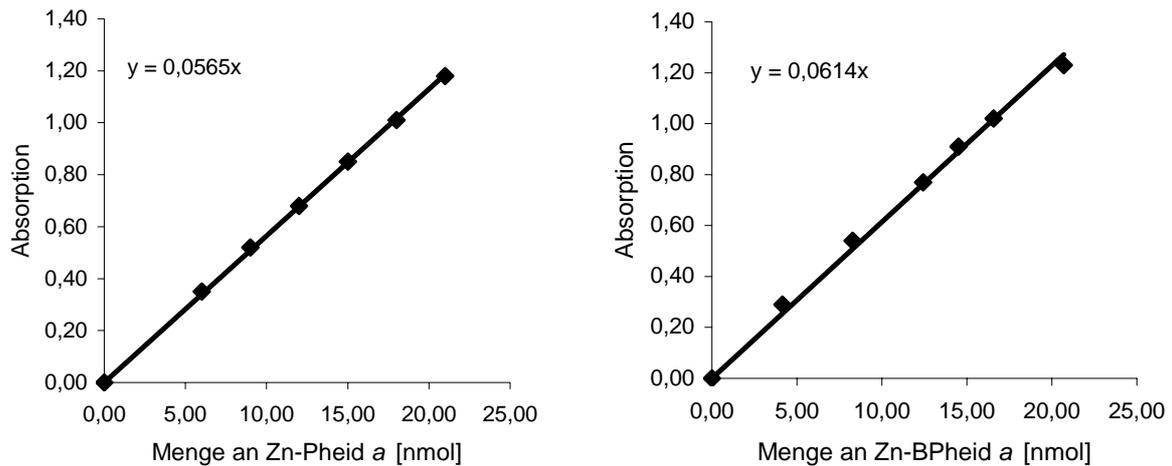
**Abbildung 3-11.** Chromatogramme des zur Rekonstitution verwendeten Pigmentgemischs aus Zn- $13^2$ -OH-Pheid *a/a'* (—) und der aus den damit rekonstituierten Mb-Komplexen extrahierten Pigmente nach 1 h (---) und nach 24 h (····). Die Peaks der *a*-Epimere wurden zu Vergleichszwecken jeweils auf 1 normiert. Aufgrund der nach der Cahn/Ingold/Prelog-Nomenklatur veränderten Prioritätenfolge an C- $13^2$  hat das *a*-Epimer in diesem Fall S-Konfiguration.

### 3.2 Pigment-Protein-Verhältnis

Da die Darstellung der Pigment-Protein-Komplexe dieser Arbeit im Wesentlichen dazu dienen sollte, die Photoreaktionen ausgewählter Pigmente in der Proteinumgebung zu untersuchen, werden im Folgenden vor allem die Zn-Derivate von Chlid und BChlid beschrieben. Die Auswahl dieser Pigmente bietet mehrere Vorteile: Zum einen sind Zn-(B)Pheide im Vergleich zu (B)Chliden relativ leicht zugänglich und durch ihre etwas größere Stabilität leichter zu verarbeiten (Hynninen, 1991), zum anderen eröffnet dieses Pigmentpaar die Möglichkeit eines direkten Vergleichs zwischen den Reaktionen von Chlorinen und Bakteriochlorinen. In ihren Eigenschaften selbst unterscheiden sich diese Chromophore nur geringfügig von den natürlich vorkommenden Mg-Derivaten. Zn-BChl kann sogar BChl in einigen Bakterien ersetzen (Wakao *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1998). Da sich Pd-BPheid *a* aufgrund der fehlenden fünften Koordinationsstelle seines Zentralmetalls nicht in Myoglobin inserieren ließ (s. Kapitel 3.1.1), dient das Verhalten von Zn-BPheid *a* gleichzeitig als Modell für dieses Pigment. Ergänzend wird zum Teil auf Ni-BPheid *a* eingegangen, um die Eigenschaften eines sehr stabilen, oxidationsunempfindlichen und damit dem Pd-BPheid *a* sehr ähnlichen Pigments (Hynninen, 1991; Noy *et al.*, 1998), dem Verhalten der Zn-Derivate gegenüberzustellen.

Vor der weiteren Untersuchung der Zn-Komplexe sollten zunächst die Extinktionskoeffizienten der Pigmente in der Bindungstasche bestimmt werden, um daran anschließend das Pigment/Protein-Verhältnis errechnen zu können.

Hierzu wurde ein Überschuss an Apo-Mb in Puffer vorgelegt und mit dem jeweiligen Chromophor titriert. Da der Chromophor zu 100 % in das Protein eingebaut wird (s. Kapitel 3.1.3), kann man so über die zur Titration verwendete Pigmentmenge den Extinktionskoeffizienten berechnen. Er ergibt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus der Steigung der in Abbildung 3-12 abgebildeten Geraden.



**Abbildung 3-12.** Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Zn-Pheid *a* (links) und Zn-BPheid *a* (rechts) in Myoglobin. Ein Überschuss an Apo-Mb wurde mit den abgebildeten Mengen an Pigment titriert, anschließend wurde die eingesetzte Pigmentmenge gegen die Absorptionsintensität im Maximum der  $Q_y$ -Bande aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet. Die Steigung dieser Geraden ergibt den nanomolaren Extinktionskoeffizienten.

#### Extinktionskoeffizient von Zn-Pheid *a* in Mb

Der für Zn-Pheid *a* in Mb ermittelte Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{661} = 56,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  liegt im Bereich des von Boxer und Wright (1979) für Pyro-Chlid *a* ermittelten Wertes von  $\epsilon_{661} = 57 \pm 2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Berechnet man mit diesem Koeffizienten die Pigmentmengen in Lösungen der entsprechenden Pigment-Mb-Komplexe, deren Proteingehalt separat bestimmt wurde, so ergibt sich für die in dieser Arbeit konstituierten Zn-Pheid-*a*-Mb-Komplexe ein Pigment/Protein-Verhältnis von 1:1. Das bedeutet, dass jedes Mb-Molekül genau ein Pigmentmolekül gebunden hat. Das Verhältnis von  $A_{280}/A_{661} = 0,5 \pm 0,03$  ist somit charakteristisch für diese 1:1-Komplexe.

#### Extinktionskoeffizient von Zn-BPheid *a* in Mb

Der durch Titration (s. oben) für Zn-BPheid *a* in Mb ermittelte Extinktionskoeffizient beträgt  $\epsilon_{774} = 61,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . In der Literatur sind keine Vergleichswerte beschrieben. Berechnet man mit diesem Koeffizienten die Pigmentmengen in Lösungen der entsprechenden Pigment-Mb-Komplexe, deren Proteingehalt separat bestimmt wurde, so ergibt sich für die in dieser Arbeit dargestellten Zn-BPheid-*a*-Mb-Komplexe ein Pigment/Protein-Verhältnis von ca.  $0,9 \pm 0,1 : 1$ . Die (geringe) Varianz bei der Pigment/Protein-Relation im Fall der Komplexe mit Zn-BPheid *a* beruht auf dem in unterschiedlichem Ausmaß vorhandenen Oxidationsprodukt 3-Acetyl-Zn-Pheid *a*. Dieses Pigment müsste konsequenterweise in die Berechnungen mit einbezogen werden, wodurch sich die tatsächlich vorhandene Pigmentmenge erhöhen würde.

Im Mittel hat somit auch hier jedes Mb-Molekül ein Pigmentmolekül gebunden. Das Verhältnis von  $A_{280}/A_{774} = 0,7 \pm 0,05$  ist somit charakteristisch für diese 1:1-Komplexe.

Unter der Annahme, dass für Zn-Pheid  $a$  in Mb und für Zn-BPheid  $a$  in Mb die Oszillatorstärke  $f$ , also die Wahrscheinlichkeit und damit die Intensität der elektronischen Übergänge der Pigmente, unverändert ist, kann nach Gleichung 1

$$S = \int_{-\infty}^{+\infty} \epsilon d\tilde{\nu} \quad (1) \text{ (Hesse } et al., 1995)$$

der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von Zn-BPheid  $a$  in Mb auch über Integration der Fläche  $S$  aller Absorptionsbanden bestimmt werden. Aufgrund der direkten Proportionalität von Energie  $E$  und Wellenzahl  $\tilde{\nu}$  muss diese Integration auf einer Energieskala (=  $\nu$ -Skala) erfolgen. Die Energieachse ist hierbei die x-Achse. Die Normierung der Spektren von Zn-Pheid- $a$ -Mb und Zn-BPheid- $a$ -Mb im Bereich von  $33333 \text{ cm}^{-1}$  (300 nm) bis  $11765 \text{ cm}^{-1}$  (850 nm) ergibt nach entsprechender Berechnung – unter Zugrundelegung des für Zn-Pheid  $a$  in Mb ermittelten Extinktionskoeffizienten (s. oben) – einen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{774} = 58,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für Zn-BPheid  $a$  in Mb. Ein identischer Flächeninhalt ist hierbei gleichbedeutend mit identischer Menge an im Komplex gebundenem Pigment.

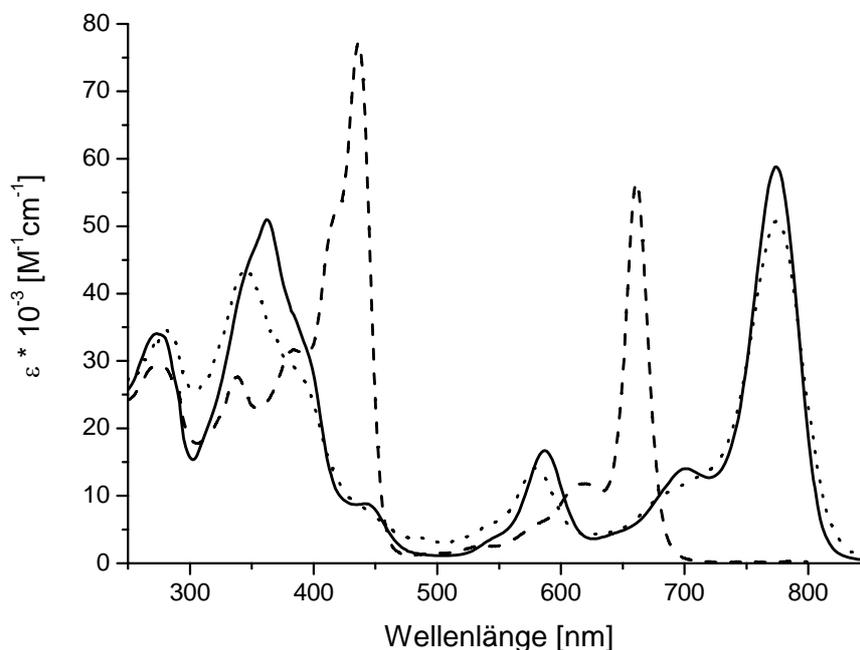
Die Übereinstimmung des durch Titration ermittelten ( $\epsilon_{774} = 61,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) mit dem errechneten ( $\epsilon_{774} = 58,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) Extinktionskoeffizienten für Zn-BPheid  $a$  in Mb ist insgesamt durchaus akzeptabel.

#### Extinktionskoeffizient von Ni-BPheid $a$ in Mb

Ergänzend wurde noch der Extinktionskoeffizient von Ni-BPheid  $a$  im Protein bestimmt. Hierbei wurde wiederum angenommen, dass die Oszillatorstärken  $f$  von Zn-Pheid  $a$  und Ni-BPheid  $a$  in Mb gleich sind und lediglich eine unterschiedliche Verteilung auf die einzelnen Banden und unterschiedliche Bandenbreiten vorliegen. Nach Integration der Spektren von Zn-Pheid- $a$ -Mb und Ni-BPheid- $a$ -Mb auf einer Energieskala (s. oben) im Bereich von  $33333 \text{ cm}^{-1}$  (300 nm) bis  $11765 \text{ cm}^{-1}$  (850 nm) und anschließender Normierung auf gleichen Flächeninhalt errechnet sich – wiederum unter Zugrundelegung des für Zn-Pheid  $a$  in Mb ermittelten Extinktionskoeffizienten (s. oben) – für Ni-BPheid  $a$  in Mb ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{774} = 50,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

In Abbildung 3-13 wurden die Absorptionsspektren der drei Komplexe entsprechend gleichen Flächeninhalts auf der  $\nu$ -Skala normiert. Die geringen Abweichungen im Bereich von 280 nm

sind wahrscheinlich das Resultat der, vor allem bei den bakteriellen Pigmenten, im UV-Bereich vorhandenen Restabsorption der Chromophore.



**Abbildung 3-13.** Absorptionsspektren von Zn-Pheid-*a*-Mb (---), Zn-BPheid-*a*-Mb (—) und Ni-BPheid-*a*-Mb (----). Alle Spektren wurden auf einer  $v$ -Skala auf gleiche Fläche von 300 bis 850 nm normiert.

### 3.3 Weiterführende spektroskopische Charakterisierung

#### 3.3.1 Einfluss des Proteins auf die CD-Spektren der Pigmente

Im Gegensatz zu den Absorptionsspektren wiesen die CD-Spektren der Komplexe von Apo-Mb mit Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* im Vis-NIR-Bereich deutliche Unterschiede zu den Spektren der freien Pigmente in Lösungsmittel auf. Am auffälligsten war hierbei die Umkehr des Vorzeichens im langwelligen Absorptionsbereich bei Zn-Pheid-*a*-Mb (Abbildung 3-14). In Lösungsmittel haben sowohl der  $Q_x(0-0)$ -Übergang als auch der  $Q_y(0-0)$ -Übergang von Chl *a* und Zn-Phe *a*, welche beide nahezu identische spektrochemische Eigenschaften wie Zn-Pheid *a* besitzen, ein negatives Vorzeichen (Houssier und Sauer, 1970; Furukawa *et al.*, 2000). Die Intensität der  $Q_y$ -Bande im CD-Spektrum war zudem halb so groß wie die des Maximums im Soret-Bereich. Dies gleicht den Verhältnissen in Lösung (s. oben), wenn auch mit umgekehrtem Vorzeichen. Der Vergleich mit den von Wright und Boxer (1981) hergestellten Pyro-Komplexen macht deutlich, dass diese Intensitätsverhältnisse ein

Charakteristikum des eingebauten Pigments sind. Die Intensität des  $Q_y(0-0)$ -Übergangs der Pyro-Derivate von Chl *a* und Zn-Phe *a* in Lösung ist der der Soret-Übergänge vergleichbar (Houssier und Sauer, 1970; Furukawa *et al.*, 2000). Die Pyro-Mb-Komplexe von Wright und Boxer (1981) zeigen ebenfalls die gleiche CD-Signal-Intensität im Soret-Bereich und im  $Q_y$ -Bereich, wenn auch wiederum mit, im Gegensatz zu den Verhältnissen in Lösung, umgekehrtem Vorzeichen. Somit werden die Intensitätsverhältnisse der CD-Spektren nicht vom Protein beeinflusst, sondern spiegeln (primär) die Eigenschaften des eingebauten Pigments wider, während das Vorzeichen Protein-bedingt ist.

Die Extrema der Banden des CD-Spektrums von Zn-Pheid-*a*-Mb liegen bei 385, 412, 434, 598 und 662 nm. Bis auf die sehr breite Bande bei 598 nm korrelieren diese Maxima mit denen des Absorptionsspektrums des Komplexes. Auch bei freien Pigmenten in monomerer Lösung gleichen Form und Extrema der CD-Spektren denen der Absorptionsspektren (Sauer, 1978). Der relativ breite und um ca. 12 nm verschobene  $Q_x(0-0)$ -Übergang ist wahrscheinlich dem Einfluss des Proteins zuzuschreiben (s. Wright und Boxer (1981)), zusätzlich könnte er zu einem geringen Prozentsatz durch das Glätten des Spektrums bedingt sein.

Das CD-Spektrum von Zn-BPheid-*a*-Mb (Abbildung 3-14) weist außer bei 377 nm ebenfalls keine Nullübergänge auf, die einzelnen Banden haben durchweg ein positives Vorzeichen. In Lösung zeigt das CD-Spektrum von BChl *a*, dem Analogon zu Zn-BPheid *a*, ein positives Vorzeichen bei den Übergängen von  $B_x(0-0)$  und  $Q_y(0-0)$ . Der  $Q_x(0-0)$ -Übergang hingegen trägt ein negatives Vorzeichen, ebenso der  $B_y(0-0)$ -Übergang, wobei letzteres den Verhältnissen im Mb-Komplex entspricht (Philipson *et al.*, 1971). Abhängig vom Lösungsmittel tritt die  $Q_x$ -Bande zum Teil nahezu gar nicht in Erscheinung (Hartwich *et al.*, 1998), die Intensitäten der Banden sind in Lösungsmittel generell sehr gering.

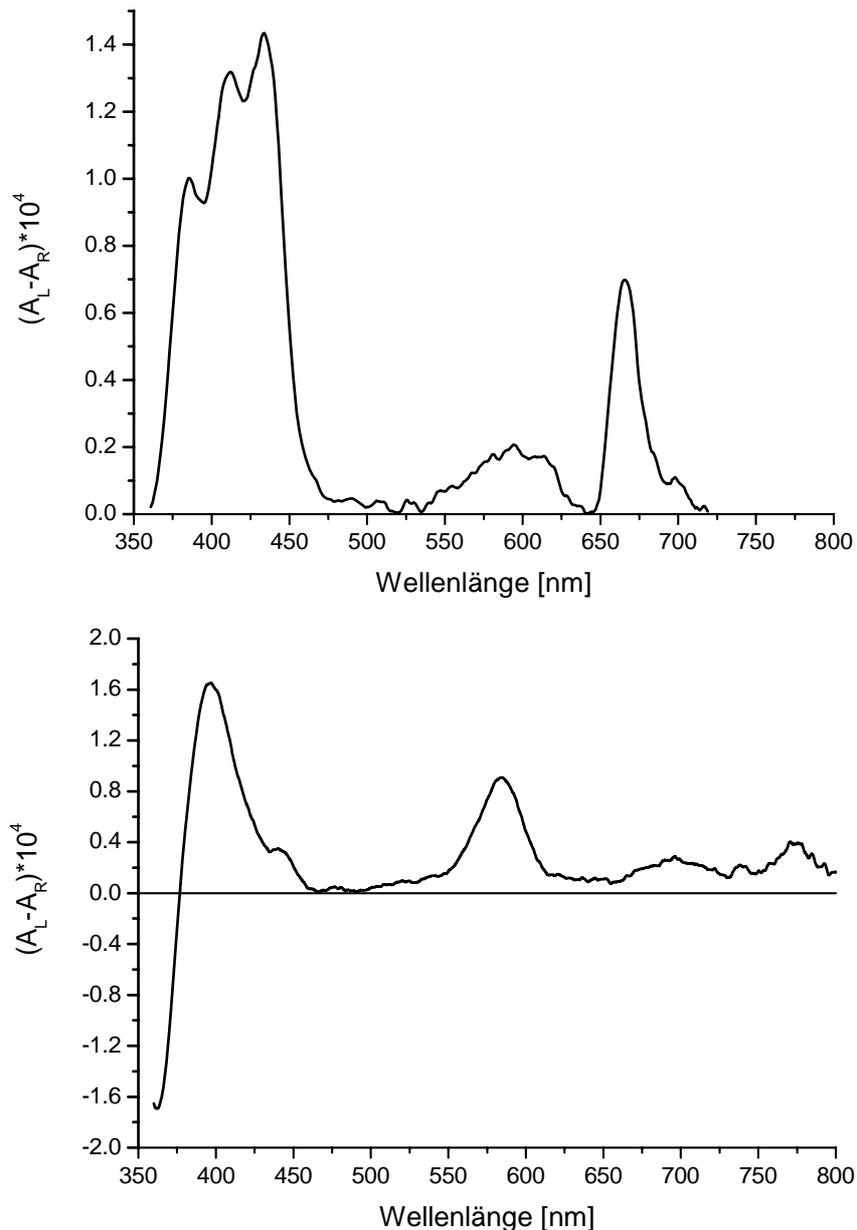
Nach den Modellen von Kirkwood und Tinoco (Kirkwood, 1937; Tinoco, 1960; Tinoco, 1962) kann man die Rotationsstärke der elektronischen Übergänge eines achiralen Chromophors, der durch chirale Substituenten gestört wird, theoretisch vorhersagen. Hierbei werden diese dissymmetrischen Störungen als Oszillatoren behandelt, die mit den erlaubten elektrischen Dipolmomenten des Chromophors koppeln und dadurch magnetische Übergangsmomente erzeugen. Verfeinert man dieses Modell durch die Verwendung von Monopolen anstelle von Dipolen in der theoretischen Kalkulation (Philipson *et al.*, 1971), so erhält man neben dem korrekten Vorzeichen des Übergangs auch den experimentellen Werten entsprechende Rotationsstärken. Hierbei liegt die Annahme zu Grunde, dass jedes der asymmetrischen Zentren unabhängig von den anderen auf die Übergangsmomente des Chromophors Einfluss nimmt. Dies bedeutet im Fall von BChl *a*, dass letztlich nur der Asymmetriefaktor von C-13<sup>2</sup> übrig bleibt, da sich die Effekte von C-7/8 und C-17/18 nahezu gegenseitig auf-

heben (Philipson *et al.*, 1971). Dies erklärt das intensitätsschwache CD-Spektrum von BChl *a* in Lösung. Im Komplex mit Mb wird der  $Q_x(0-0)$ -Übergang stark gefördert und ändert im CD das Vorzeichen, außerdem nimmt die Intensität der einzelnen CD-Banden zu. Dies wird besonders deutlich am Beispiel von Pyro-Zn-BPheid *a*, welches nach der Additivitätstheorie der asymmetrischen Substituenten nahezu kein CD-Spektrum mehr aufweisen dürfte, da mit der Entfernung der  $\text{COOCH}_3$ -Gruppe an C-13<sup>2</sup> deren Einfluss verschwindet. Das CD-Spektrum des freien Pigments in Lösung ist sehr intensitätsschwach, erst der Einbau in Mb ergibt ein Spektrum hoher Intensität (Wright und Boxer, 1981). Form und Lage der Absorptionsbanden sind dabei ähnlich zu denen von Zn-BPheid-*a*-Mb (396, 585, 774 nm). Die auftretenden Differenzen stammen wahrscheinlich von den leicht unterschiedlichen Pigmenten, deren Unterschiede durch den Einfluss des Proteins noch stärker betont werden. Der Proteineinbau kann zum einen zu einer (leichten) Verdrillung des Chromophors führen, wodurch dieser selbst chiral wird oder/und die chirale Umgebung im Protein zeigt unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Chromophor und induziert deshalb unterschiedlichen Zirkulardichroismus.

Der natürliche Kofaktor von Mb ist Fe-Protoporphyrin IX. Dieses unter Vernachlässigung der Seitengruppen gemäß der Gruppentheorie  $D_{4h}$ -symmetrische Pigment zeigt in Lösung kein CD-Signal. Erst der Einbau in Mb verursacht einen intensiven, positiven Cotton-Effekt im Soret-Bereich. Dessen Größe und Vorzeichen sind zudem stark abhängig von Art und Anzahl der Liganden am zentralen Fe-Metall und von dessen Oxidationszustand (Beychok und Blout, 1961; Samejima und Yang, 1964; Beychok, 1967; Willick *et al.*, 1969; Samejima und Kita, 1969). Unter Verwendung des Modells von Kirkwood und Tinoco (Kirkwood, 1937; Tinoco, 1960; Tinoco, 1962) konnten Hsu und Woody (1969; 1971) zeigen, dass der positive Cotton-Effekt des Häms im Soret-Bereich durch einen komplizierten Kopplungsmechanismus mit aromatischen Seitenketten des Myoglobins zustande kommt. Frühere Theorien des Einflusses eines permanenten, durch die AS-Helices verursachten Feldes (Stryer, 1961; Beychok, 1967), oder einer Interaktion mit Alkylseitenketten (Raymonda und Simpson, 1967) konnten damit widerlegt werden.

Der Einfluss der aromatischen Seitenketten auf den Chromophor in der Bindungstasche ist wahrscheinlich auch die Ursache für die beobachteten CD-Signale von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb, und damit ein Hinweis auf die Lokalisation dieser Pigmente in der Tasche. Ein weiterer Hinweis auf die Bindung der Pigmente in der Tasche ist die Form der CD-Spektren im langwelligen Bereich. Lägen lediglich Pigmentaggregate vor, was in wässriger Lösung normalerweise der Fall ist, so würde dies im CD-Spektrum sofort durch ein mehr oder weniger konservatives, S-förmiges Signal mit Nullübergang in diesem Bereich sichtbar (Dratz

*et al.*, 1966; Dratz, 1967; Sauer, 1978). Die hier für Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb beschriebenen CD-Spektren (Abbildung 3-14) deuten somit stark auf die Komplexierung des jeweils monomeren Pigments in der Häm-Bindungstasche hin. Sie zeigen außerdem, dass kein weiteres Pigment an der Proteinoberfläche „klebt“. Dies würde zu einer sichtbaren Überlagerung unterschiedlicher CD-Spektren führen, da die Einflüsse, denen ein Pigment an der Proteinoberfläche ausgesetzt ist, allein schon durch die hydrophile Umgebung stark von denen in der hydrophoben Bindungstasche abweichen.



**Abbildung 3-14.** CD-Spektren von Zn-Pheid-*a*-Mb (oben) und Zn-BPheid-*a*-Mb (unten). Die Konzentration der Proben betrug jeweils 13  $\mu\text{M}$ . Aufgrund der stark nachlassenden Sensitivität des Photomultipliers im langwelligen Bereich, wurden die Spektren geglättet. Hieraus resultieren die Schultern bei 680 nm (oben) und 738 nm (unten). Die Banden bei 440 und 695 nm im Spektrum von Zn-BPheid-*a*-Mb (unten) beruhen auf dem Vorhandensein einer kleinen Menge an 3-Acetyl-Zn-Pheid-*a*-Mb, welches durch Oxidation entsteht.

### **3.3.2 Resonanz-Raman-Spektren von Zn-Pheophorbid-*a*-Myoglobin und Zn-Bakteriopheophorbid-*a*-Myoglobin**

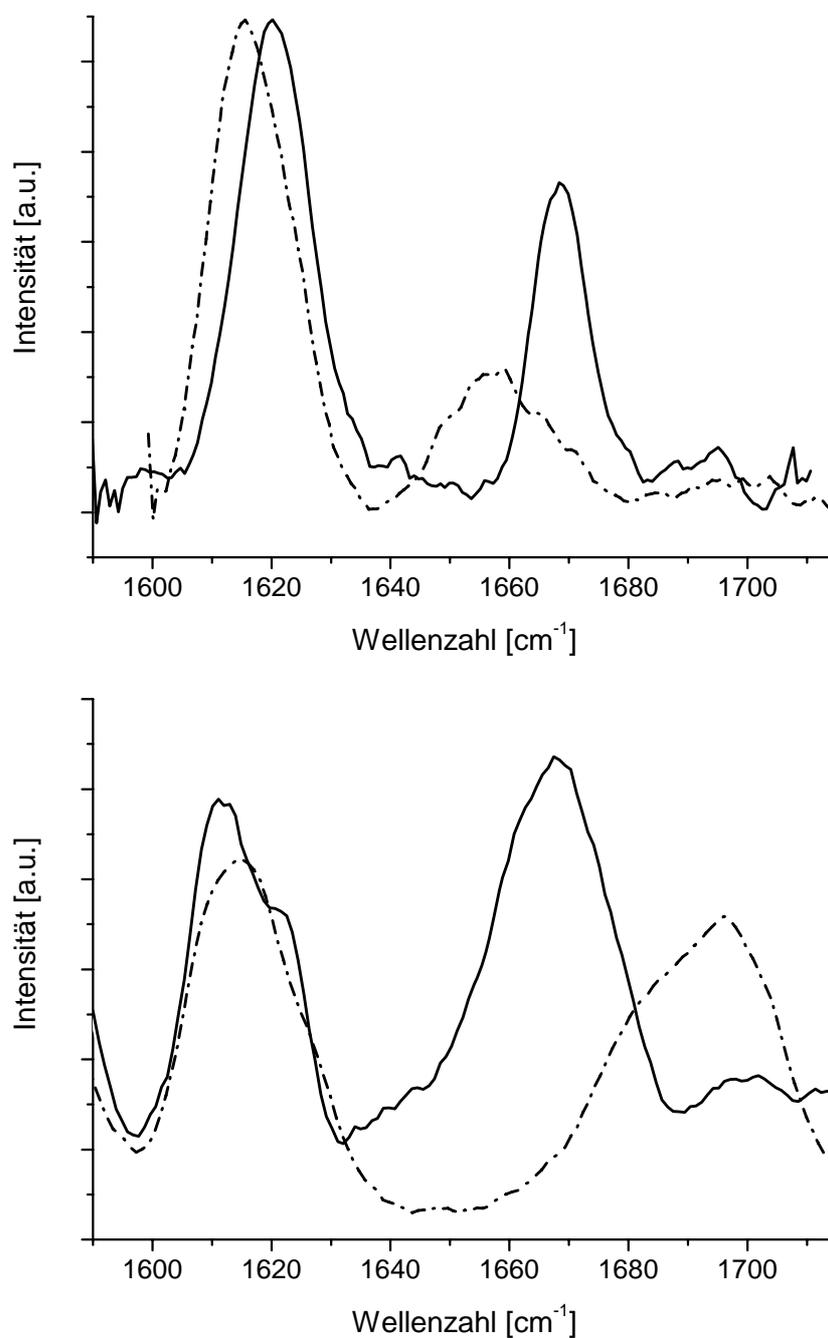
Bei der Raman-Spektroskopie wird die durch Vibrationsübergänge bedingte Frequenzverschiebung von eingestrahltm und dem von der Probe emittierten Streulicht gemessen. Die eingestrahlenen Photonen werden hierbei nicht absorbiert, sondern lediglich durch inelastische Kollision mit dem Probenmolekül spektral und in ihrer Richtung verändert. Die Energiedifferenz muss hierbei dem Übergang zwischen verschiedenen Schwingungsniveaus des Moleküls entsprechen. Molekülschwingungen sind immer dann Raman-aktiv, wenn mit ihnen eine Veränderung der Polarisierbarkeit des Moleküls verbunden ist (Carey, 1982; Lottspeich und Zorbas, 1998). Die Schwingungsniveaus eines Moleküls sind einerseits abhängig von dessen Struktur und Konformation, andererseits von intra- und intermolekularen Interaktionen. Bei sehr großen Molekülen wie beispielsweise Chlorophyllen sind hauptsächlich spezielle chemische Gruppen, wie Carbonyl- oder Vinyl-Gruppierungen, für intensive Raman-Signale verantwortlich (Robert, 1996).

Bei der Resonanz-Raman-Spektroskopie wird die Frequenz des eingestrahlenen Lichts auf die elektronischen Übergänge des jeweiligen Pigments abgestimmt, sodass nur dessen Banden eine Resonanzverstärkung erfahren. Die Intensität der gestreuten Strahlung ist dann um ein Vielfaches höher. Hierdurch ist es möglich, gezielt die Interaktionen dieser Gruppen vor dem Probenhintergrund zu analysieren. Eine wichtige Anwendung dieser Technik ist die Untersuchung von Chromophoren in Proteinen (Robert, 1996).

Zur Aufklärung der Bindungssituation der Pigmente in Myoglobin wurden die Protein-Komplexe von Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* mit Resonanz-Raman-Spektroskopie bei 77 K untersucht. Zum Vergleich wurden die freien Pigmente in THF vermessen. In sehr reinem, wasserfreiem THF besteht keine Möglichkeit, Wasserstoffbrücken auszubilden, dadurch sind die Pigmente frei von Interaktionen.

Die intensiven Banden von Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* in THF bei  $1615\text{ cm}^{-1}$  können den Methinbrücken der Chromophore zugeordnet werden (Abbildung 3-15). Die entsprechenden Signale wurden von Näveke *et al.* (1997) bei Raumtemperatur an geringfügig höherer Position detektiert. Diese Abweichungen können durch Veränderung der Lösungsmiteleigenschaften bei niedrigen Temperaturen bedingt sein. Möglich ist auch, dass der Chromophor bei Raumtemperatur in Lösungsmittel planarer wird. Das Signal der Methinbrücke bei  $1620\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum des Mb-Komplexes von Zn-BPheid *a* (Abbildung 3-15) weist auf eine Koordinierung des zentralen Zn-Metalls durch fünf Liganden hin (Näveke *et al.*, 1997). Im Spektrum von Zn-Pheid-*a*-Mb liegt dieses Signal bei  $1612\text{ cm}^{-1}$ . Dies ist immer

noch kennzeichnend für nur einen zusätzlichen externen Liganden neben den vier Tetrapyrrolstickstoffen. Ursache für die Schulter bei  $1622\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von Zn-Pheid-*a*-Mb ist wahrscheinlich der Vinyl-Substituent an C-3, der in Zn-BPheid *a* durch die Acetyl-Gruppe ersetzt ist (Feiler *et al.*, 1994).



**Abbildung 3-15.** Resonanz-Raman-Spektren von Zn-BPheid *a* (oben) in THF (---) und Mb (—), und von Zn-Pheid *a* (unten) in THF (---) und Mb (—). Die Spektren wurden bei 77 K in Standardpuffer-I aufgenommen.

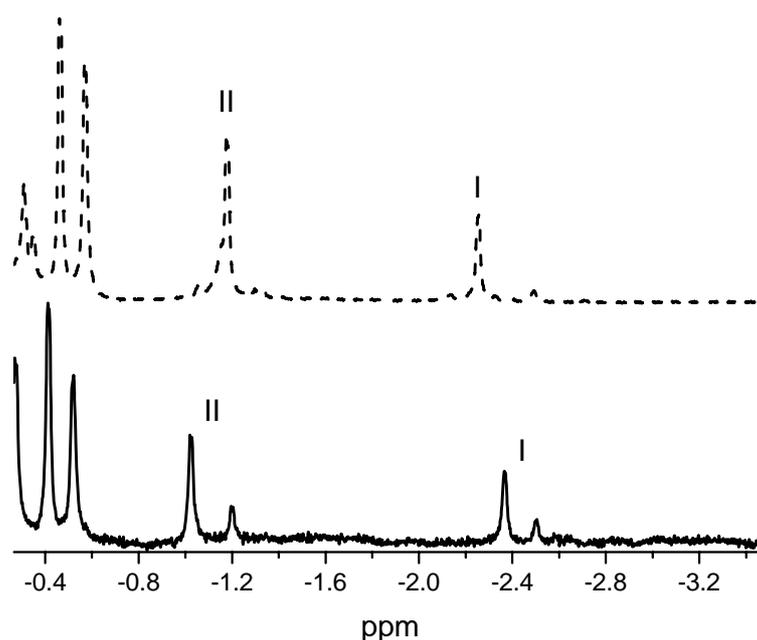
Die Bande bei  $1657\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von Zn-BPheid *a* in THF ist charakteristisch für die Carbonyl-Schwingung der freien Acetyl-Gruppe (Lapouge *et al.*, 1998). Sie fehlt erwartungsgemäß im Spektrum von Zn-Pheid *a* (Abbildung 3-15). Bei Zn-BPheid *a* ist diese Bande relativ breit ( $25\text{ cm}^{-1}$ ), was wahrscheinlich durch Verunreinigungen im Lösungsmittel bedingt ist. Verunreinigungen, wie beispielsweise Wasser, die in Form von Wasserstoffbrücken mit der Carbonyl-Gruppe interagieren können, führen zu derartigen Verbreiterungen. Die sehr intensitätsschwache Bande bei  $1685\text{ cm}^{-1}$  entsteht durch die Streckschwingung der freien Carbonyl-Gruppe an C-13<sup>1</sup>. Das Spektrum des Mb-Komplex von Zn-BPheid *a* zeigt ein sehr intensives Signal bei  $1668\text{ cm}^{-1}$ . Diese Position ist sehr ungewöhnlich für einen Carbonyl-Substituenten. Zwischen  $1620\text{ cm}^{-1}$  und  $1657\text{ cm}^{-1}$ , wo das Signal dieser Gruppe eigentlich erwartet würde, liegen keine Banden. Es wird dennoch angenommen, dass die Bande bei  $1668\text{ cm}^{-1}$  durch den Carbonyl-Substituenten der 3-Acetyl-Gruppe verursacht wird. Dieser Substituent muss dann frei von Interaktionen in einer apolaren Umgebung vorliegen. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf die Einlagerung des Pigments in die Häm-Bindungstasche. Die Einbettung des Chromophors mit den Ringen A und B tief im hydrophoben Inneren der Bindungstasche führt folglich zu einer kompletten Abschirmung der Carbonyl-Gruppe vom umgebenden, wässrigen Milieu. Die Tatsache, dass diese Bande sehr schmal ist, deutet an, dass sich alle Acetyl-Carbonyl-Gruppen in einer, bezogen auf die Dielektrizitätskonstante, ähnlichen Umgebung befinden.

Das Auftreten einer sehr schwachen Bande bei  $1685\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum von Zn-BPheid-*a*-Mb zeigt, dass auch einige der 13<sup>1</sup>-Carbonyl-Substituenten vom wässrigen Lösungsmittel abgeschirmt sind, obwohl dieser Teil des Moleküls eigentlich viel weniger in der Tasche eingeschlossen ist. Wahrscheinlicher ist, dass ein Teil dieser Carbonyl-Gruppen mit dem Lösungsmittel interagiert und dadurch zu der starken Bande bei  $1668\text{ cm}^{-1}$  beiträgt. Unterstützt wird diese Annahme durch das Spektrum von Zn-Pheid-*a*-Mb. Auch hier tritt die sehr intensive Bande bei  $1668\text{ cm}^{-1}$  in Erscheinung. Da bei Bakteriochlorophyllen die Streckschwingung der 13<sup>1</sup>-Ketocarbonylgruppe generell sehr schwach ausgeprägt ist, diese aber bei Chlorophyllen ein sehr intensives Signal hervorruft (Lutz und Mäntele, 1991), ist die Zuordnung der Bande bei  $1668\text{ cm}^{-1}$  zur Acetyl-Carbonyl-Gruppe im Spektrum von Zn-BPheid-*a*-Mb offensichtlich korrekt.

Die in den Raman-Spektren der Mb-Komplexe sichtbare fünffach Koordinierung der Pigmente und das intensive Signal der abgeschirmten Acetyl-Carbonyl-Gruppe von Zn-BPheid-*a*-Mb sind eindeutige Hinweise auf die Einlagerung der Chromophore in die Häm-Bindungstasche. Unterstützt wird dieser Befund durch die im folgenden Kapitel diskutierten <sup>1</sup>H-NMR-Spektren dieser Komplexe.

### 3.3.3 Protonen-NMR-Spektren der rekonstituierten Myoglobine

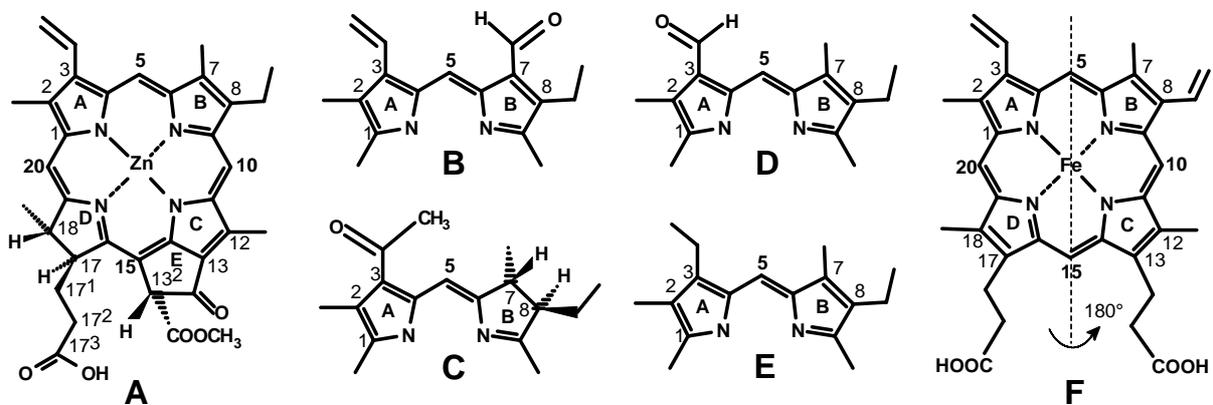
Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in der Hochfeld-Region von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb sind in Abbildung 3-16 gezeigt. Die mit I und II bezeichneten Resonanzen wurden in Anlehnung an Shulman *et al.* (1970), Wright und Boxer (1981) und Sulc *et al.* (2003) den Methylprotonen der Aminosäure Val68, die sich in unmittelbarer Nähe von Ring A auf der distalen Seite des Kofaktors befindet, zugeordnet. Im Gegensatz zum Chlorin-Komplex zeigt das Spektrum des Bakteriochlorin-Komplexes keine Verdopplung der Peaks in dieser Region, es treten lediglich zwei Hauptpeaks bei  $-2,25$  (I) und  $-1,17$  (II) auf.



**Abbildung 3-16.** Ausschnitt aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Zn-Pheid-*a*-Mb (—) und Zn-BPheid-*a*-Mb (---). Die Konzentration der Proben betrug ca.  $0,5 \cdot 10^{-4}$  M.

Im Vergleich mit der gemittelten Position ( $-2,43$ ) von Peak I im Spektrum von Zn-Pheid-*a*-Mb ist Peak I von Zn-BPheid-*a*-Mb deutlich in Richtung tieferen Feldes verschoben. Diese Verschiebung folgt dem abnehmenden Ringstromeffekt im Tetrapyrrolmakrozyklus in der Reihe Porphyrin > Chlorin > Bakteriochlorin (Scheer und Katz, 1975). Der Vergleich mit den von Wright und Boxer (1981) ermittelten Werten für die analogen Pyro-Komplexe bestätigt die allgemeinen Trends der dort beschriebenen Resonanzen und unterstreicht wiederum die Einlagerung der hier untersuchten Kofaktoren Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* in die Häm-Bindungstasche.

Die bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Komplex von Zn-Pheid *a* mit Mb auftretende Verdopplung der Peaks I und II wurde in dieser Form von Wright und Boxer (1981) allerdings nicht beobachtet. Dort wurde lediglich eine Schulter bei Peak I auf der Seite des höheren Feldes bei Zn-Pyro-Pheid-*a*-Mb beschrieben. Eine dem hier beschriebenen Fall vergleichbare Peak-Verdopplung trat nur bei Zn-Pyro-Pheid-*b*-Mb auf. Der Chromophor trägt hier an Ring B anstelle der Methylgruppe an C-7 eine Aldehyd-Gruppe. Die Intensitäten der Doppelpeaks waren dabei nahezu identisch bzw. zeigten im Komplex mit Pottwal-Mb eine starke Temperaturabhängigkeit. Abbildung 3-17 zeigt eine Übersicht über die im Folgenden diskutierten Chromophore.



**Abbildung 3-17.** Übersicht über die Strukturen der in Myoglobin inserierten Chromophore. (A) Zn-Pheid *a*, (B) Zn-Pheid *b*, (C) Zn-BPheid *a*, (D) Zn-Pheid *d*, (E) Meso-Zn-Pheid *a* und (F) Fe-Protoporphyrin IX mit Rotationsachse. Die Pyro-Derivate der abgebildeten Pigmente tragen an C-13<sup>2</sup> anstelle der COOCH<sub>3</sub>-Gruppe ein H-Atom.

Aus der Literatur (La Mar *et al.*, 1978; La Mar *et al.*, 1983; Aojula *et al.*, 1986; Light *et al.*, 1987) ist bekannt, dass Myoglobin in zwei verschiedenen Populationen, die durch Drehung des Kofaktors um dessen C-5/C-15-Achse\* bedingt sind, existiert. Im Gleichgewicht beträgt der Anteil der Hauptfraktion, in welcher Ring A oberhalb der Aminosäure Val68 plaziert ist, 80-95%, abhängig von der untersuchten Mb-Spezies. Eine mögliche Erklärung für die gesplitteten NMR-Signale von Zn-Pheid-*a*-Mb wäre demnach, dass der Chlorin-Chromophor ebenso wie das natürliche Häm in zwei verschiedenen Orientierungen in die Bindungstasche eingelagert wurde und somit entweder Ring A oder Ring B der Aminosäure Val68 gegenüberliegt. Geschieht dies bei der Rekonstitution mit dem natürlichen Kofaktor Häm, so kann ebenfalls ein NMR-Signal-Splitting beobachtet werden, wenn auch in diesem Fall bei dem  $\gamma$ -Methylgruppen-Signal von Thr-E10 (Yamamoto *et al.*, 1998). Da sich die Substituenten an den Ringen A und B von Zn-Pheid *a* bis auf das Fehlen einer

\* In der älteren Literatur wird diese Achse nach der Fischer-Nomenklatur als  $\alpha$ - $\gamma$ -Achse bezeichnet.

Doppelbindung nicht von denen von Fe-Protoporphyrin IX unterscheiden, spielt der Einfluss des isozyklischen Rings mit seinem asymmetrischen C-13<sup>2</sup>-Atom im vorliegenden Fall wohl die entscheidende Rolle. Die Interaktion zwischen den Ringen A und E von zyklischen Tetrapyrrolen ist seit langem bekannt (Struck *et al.*, 1992) und könnte im vorliegenden Fall quasi ein Ungleichgewicht des Ringstroms an den Ringen A und B erzeugen, was sich dann im Kontakt mit den Methylgruppen von Val68 auswirkt. Bei den von Wright und Boxer (1981) dargestellten Komplexen mit den Pyro-Chlorinen wäre dieser Effekt durch das Fehlen der COOCH<sub>3</sub>-Gruppe weniger stark ausgeprägt, so dass sich bei Zn-Pyro-Pheid-*a*-Mb nur eine Schulter bei Peak I ergibt, wohingegen die nahezu intensitätsgleichen Doppelpicks bei Zn-Pyro-Pheid-*b*-Mb durch den Einfluss der Aldehydgruppe an Ring B entstünden.

Rekonstituiert man Mb mit Biliverdin, so wird dieses offenkettige Tetrapyrrol etwas tiefer in die Bindungstasche eingelagert als der natürliche Kofaktor, da der van der Waals Radius der beiden Carbonylsauerstoffatome geringer ist als der der natürlichen, mit Ile107 in van der Waals Kontakt stehenden, Methinbrücke (Wagner *et al.*, 1995). Gleichzeitig ist aber der Mb-Komplex mit dem analogen Pterobilin-Typ-Pigment, in dem die beiden Propionsäuregruppen an der durch die Carbonylsauerstoffe erzeugten offenen Seite des Tetrapyrrols hängen, stabiler, da nun die polaren Carbonylsauerstoffe aus der Bindungstasche heraus ragen und nicht mehr mit dem hydrophoben Inneren der Bindungstasche in Kontakt stehen (Falk *et al.*, 1990a). Der Komplex von Mb mit Zn-BPheid *a* erweist sich bei Denaturierung mit Guanidin ebenfalls als instabiler (s. Kapitel 3.5.1) als der mit Zn-Pheid *a*. Dies wird wahrscheinlich durch die polare und gleichzeitig sehr voluminöse Acetyl-Gruppe an Ring A verursacht, welche in das hydrophobe Proteininnere hineinragt, sowie durch die Reduktion an Ring B, welche durch die sp<sup>3</sup>-Hybridisierung von C-7/8 ebenfalls eine größere Raumerfüllung der Substituenten bewirkt. Aufgrund der voluminösen, polaren Acetyl-Gruppe und der andersartigen sterischen Situation an C-7/8 (s. Abbildung 3-17) sind bei Zn-BPheid-*a*-Mb wahrscheinlich die beiden möglichen, durch Drehung um die C-5/C-15-Achse verursachten Orientierungen des Chromophors nicht möglich, so dass es zu keinem Splitting der NMR-Signale kommen kann. Nicht einsichtig bleibt allerdings das Fehlen von Doppelpicks bei Zn-Pyro-Pheid-*d*-Mb (Wright und Boxer, 1981).

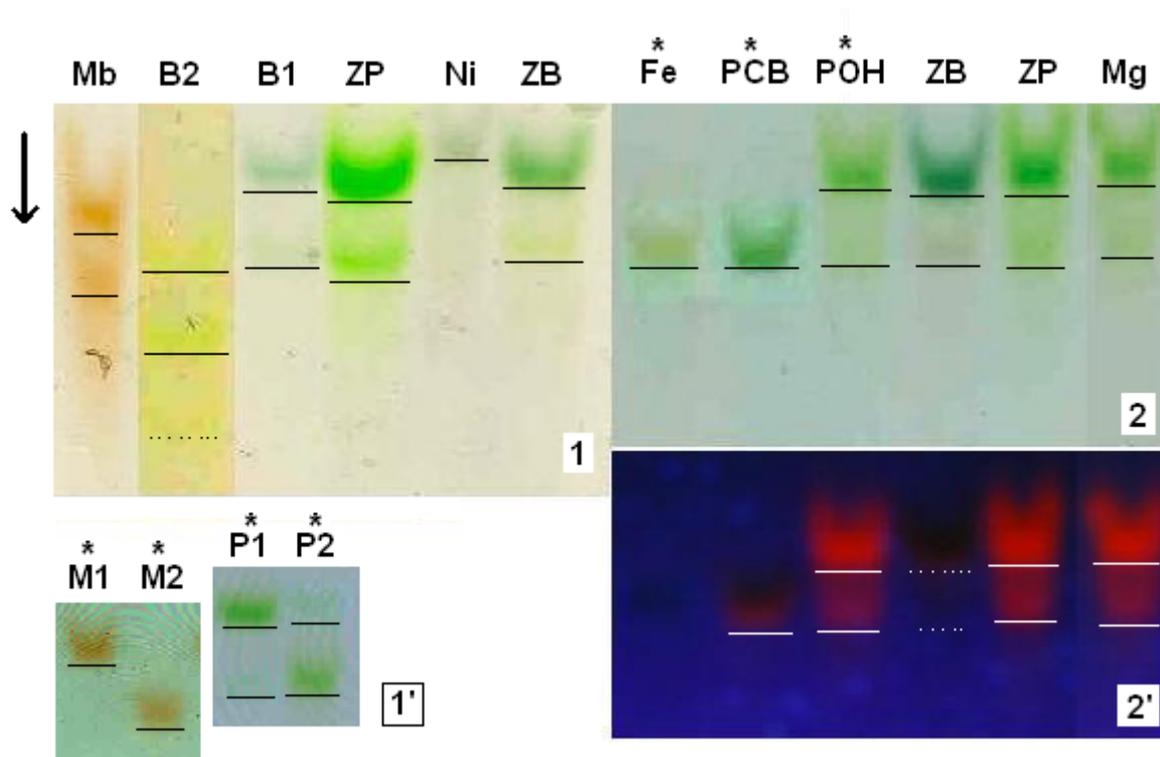
Grundsätzlich wäre auch denkbar, dass das Signal-Splitting durch eine eingeschränkte Rotation von Seitenketten des Chromophors verursacht wird. Sowohl die Vinyl-Gruppe als auch die Aldehyd- bzw. Acetyl-Gruppe stehen in Konjugation mit dem π-System des Tetrapyrrolrings und liegen in unmittelbarer Nachbarschaft von Val68. Unter der Annahme, dass die Rotation der voluminösen Acetyl-Gruppe wiederum aus sterischen Gründen nicht möglich wäre, käme es nur im Fall der Chlorine zu dem beobachteten Signal-Splitting.

Die dritte, von Boxer und Wright (1981) favorisierte Erklärung für die Peak-Verdopplung wäre, dass das Protein in zwei langsam ineinander übergehenden Konformationen vorliegt, deren relative Stabilitäten stark von den Substituenten an den Ringen A und B des Tetrapyrrolrings abhängen. Es erscheint zum einen aber relativ unwahrscheinlich, dass diese beiden Konformationen im Fall von Pyro-Zn-Pheid-*a*-Mb zumindest ansatzweise existieren, im Fall von Meso-Pyro-Zn-Pheid-*a*-Mb aber nicht in Erscheinung treten, wo sich diese beiden Pigmente doch nur im Vorhandensein einer Ethyl- bzw. Vinyl-Gruppierung an Ring A unterscheiden. Andererseits könnte sie als Erklärungsmodell für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Komplexe von Zn-Pheid *a* mit Mb dienen, wenn man die Interaktion zwischen den Ringen A und E (s. oben) in die Überlegungen mit einbezieht. Bei Zn-BPheid-*a*-Mb gäbe es dann aufgrund der spezifischen Eigenschaften der Acetyl-Gruppe wiederum nur eine Konformation.

Zusammenfassend muss angemerkt werden, dass eine in allen Punkten zufriedenstellende Erklärung nicht gefunden wurde.

### **3.4 Heterogenität der Komplexe im nativen Gelsystem**

Obwohl Boxer und Wright (1979) bereits eindeutig zeigten, dass die Chromophore der von ihnen hergestellten substituierten Myoglobine in der Häm-Bindungstasche gebunden waren und dass der – auch in dieser Arbeit verwendete – Reinigungsschritt über die Ionenaustausch-Säule ausreichte, um evtl. an der Proteinoberfläche gebundenes Pigment zu entfernen, wurden die hier konstituierten Pigment-Myoglobin-Komplexe in einem nativen PAGE-System analysiert. Hierdurch sollte zunächst gezeigt werden, dass auch unter diesen stringenten Bedingungen der Chromophor im Protein gebunden ist und nicht lose an der Protein-oberfläche hängt, sowie der Pigment-Protein-Komplex von Resten freien Apo-Mbs abgetrennt werden. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß, dass der Chromophor fest mit dem Protein assoziiert ist, da die Proteinbanden eindeutig entsprechend dem jeweils komplexierten Pigment gefärbt waren und keine sehr viel schneller laufende diskrete Bande erkennbar war, die den freien Pigmenten entspräche (Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18.** Ausschnitte aus nativen 10%-Mini-Gelen der präparierten Pigment-Myoglobin-Komplexe. Die „oberen“ bzw. „unteren“ Banden wurden jeweils aus einem präparativen nativen Gel eluiert und anschließend auf das native Mini-Gel aufgetragen. Die Gele 1 und 2 wurden zum Teil digital aus verschiedenen Gelen zu einem Gel zusammengesetzt (s. bspw. B2 und Mg), die relative Anordnung der Teilstücke zueinander wurde durch ZP als Markierungssubstanz gewährleistet.

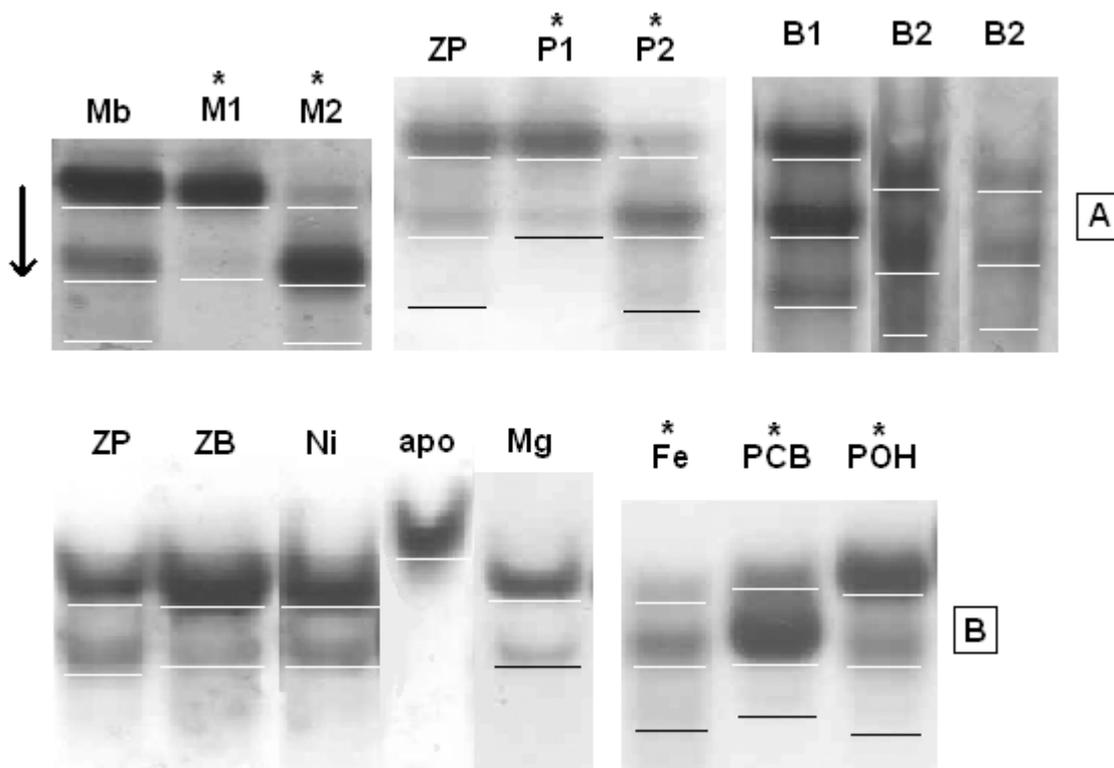
1) Myoglobin (Mb), Bande 2 (= untere Bande) von Zn-BPheid-*a*-Mb (B2), Bande 1 (= obere Bande) von Zn-BPheid-*a*-Mb (B1), Zn-Pheid-*a*-Mb (ZP), Ni-BPheid-*a*-Mb (Ni) und Zn-BPheid-*a*-Mb (ZB). 1') Bande 1 von Myoglobin (M1), Bande 2 von Myoglobin (M2), Bande 1 von Zn-Pheid-*a*-Mb (P1), Bande 2 von Zn-Pheid-*a*-Mb (P2). Die Gelstücke wurden dem Laufverhalten der Banden entsprechend angeordnet.

2) Fe-Pheid-*a*-Mb (Fe), Zn-PCB-Mb (PCB),  $^{132}$ -OH-Zn-Pheid-*a*-Mb (POH), Chlid-*a*-Mb (Mg). 2') Fluoreszenzdarstellung der Komplexe aus Gel 2 in gleicher Reihenfolge.

Bei den mit \* markierten Komplexen entsprechen die in Abbildung 3-19 dargestellten Coomassiegefärbten Gelausschnitte den hier abgebildeten. Erläuterungen zu den einzelnen Banden sind dem Text zu entnehmen. Die Farben der abgebildeten Banden entsprechen weitgehend dem natürlichen Bild. Durch nachträgliche Bildbearbeitung, insbesondere Kontrastverstärkung, sind im Einzelfall Abweichungen möglich; dies war in einigen Fällen unumgänglich, da die mit bloßem Auge relativ gut erkennbaren Banden nach der Digitalisierung an Kontrast verloren hatten. Zur besseren Erkennbarkeit sind alle Banden mit weißen bzw. schwarzen Strichen markiert.

Überraschenderweise waren aber anstelle der erwarteten singulären Proteinbanden schon im nicht mit Coomassie-Blau gefärbten Zustand in den meisten Fällen zwei Banden erkennbar, wobei die langsamer laufende stärker ausgeprägt war. Dies war zudem nicht nur im Fall der rekonstituierten Myoglobine zu beobachten, sondern trat ebenfalls beim nativen Protein auf. Wurden die Komplexe von Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* mit Myoglobin bzw. natives Myoglobin im präparativen Maßstab elektrophoretisch aufgereinigt und die Lösungen der einzelnen Banden wiederum im nativen PAGE-System analysiert, so ergab sich wieder das

Zwei-Banden-Muster, wobei zunächst die jeweils aufgetragene Hauptbande dominierte (Abbildung 3-18, B1, P1 und M1 bzw. B2, P2 und M2) und die jeweils andere Bande nur sehr schwach erkennbar war. Ein Stehenlassen der Lösungen für mehrere Tage bewirkte eine Intensitätszunahme der jeweils schwächeren Banden. Dies ist in Abbildung 3-19 am Beispiel von Zn-BPheid- $\alpha$ -Mb gezeigt (A: B1 und B2), zur besseren Erkennbarkeit wurde hier die Darstellung im gefärbten Zustand gewählt. Gleichzeitig wird beim Vergleich der Abbildung 3-19 mit Abbildung 3-18 deutlich, dass auch bei Ni-BPheid- $\alpha$ -Mb zwei Banden vorhanden sind, wobei aber nur eine das Pigment zu enthalten scheint, da die untere Bande im nativen Zustand nicht erkennbar ist. Umgekehrt ist es bei den Komplexen von PCB und Fe-Pheid  $\alpha$  mit Myoglobin, hier enthalten nur die unteren Banden Pigment.



**Abbildung 3-19.** Ausschnitte aus nachträglich mit Coomassie-Blau gefärbten nativen 10%-Mini-Gelen. Die verwendeten Abkürzungen und Symbole entsprechen denen aus Abbildung 3-18, (apo) bedeutet Apo-Myoglobin. Für die Zusammensetzung der Gelausschnitte gilt das Gleiche wie in Abbildung 3-18.

**A)** Neben den Komplexen vor der präparativen nativen Gelelektrophorese (Mb und ZP, sowie ZB in (B)) wurden vergleichend die aus den Banden 1 und 2 der präparativen PAGE eluierten Proben aufgetragen.

**B)** Überblick über alle in dieser Arbeit hergestellten Pigment-Mb-Komplexe einschließlich des Apo-Proteins.

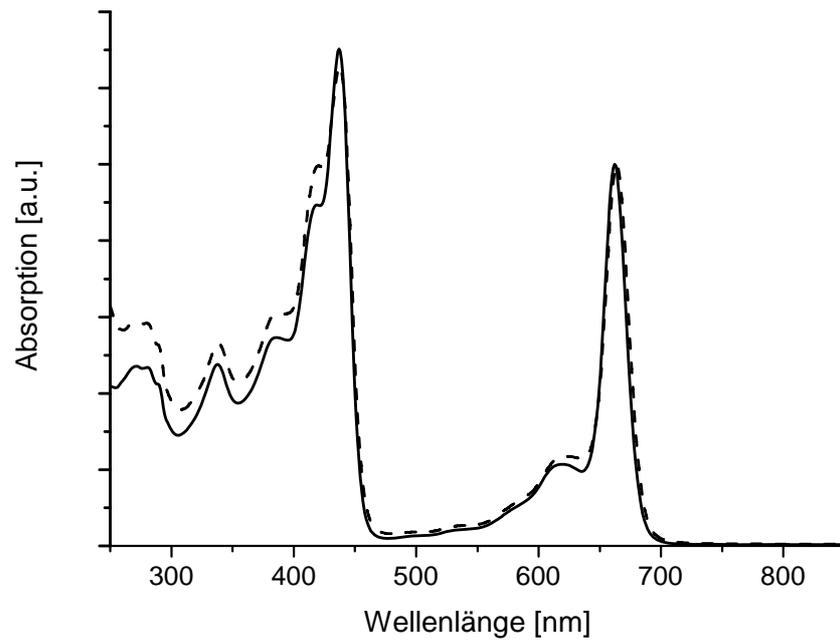
Da bei der nativen PAGE das Laufverhalten der Proteine von ihrer intrinsischen Ladung dominiert wird, zeigt natives Myoglobin aufgrund seines Kofaktors eine etwas höhere

elektrophoretische Beweglichkeit als die mit Chlorophyll-Derivaten rekonstituierten Myoglobine. Das natürliche Fe-Protoporphyrin IX besitzt im Gegensatz zu den verwendeten Chlorophyll-Derivaten zwei freie Säuregruppen und somit im deprotonierten Zustand eine zusätzliche Ladung. Aus dem gleichen Grund besitzt das pigmentfreie Apoprotein die geringste elektrophoretische Wandergeschwindigkeit. Unklar ist, ob sich im Fall von Zn-BPheid-*a*-Mb Bande 2 wie bei Zn-Pheid-*a*-Mb nach dem Stehenlassen teilweise in Bande 1 umwandelt, da die resultierenden Banden nicht auf der gleichen Höhe wie die erwarteten Banden 1 und 2 laufen (s. Abbildung 3-19). Ursache hierfür könnte der eingebaute Chromophor sein (vgl. Kapitel 3.3.3). Eventuell verändert sich aber auch das Protein während dieser Zeit, da dieses Phänomen auch bei Zn-Pheid-*a*-Mb nach längerem Stehen beobachtet werden konnte. Bei letzterem sind aber Ansätze der jeweils komplementären Banden schon früher erkennbar und somit eindeutig zuzuordnen (Abbildung 3-19). Zum Teil ist im gefärbten Zustand eine dritte schwächere Bande erkennbar, da diese aber im ungefärbten Zustand kaum erkennbar war und für eine weitergehende Analyse selbst im präparativen Maßstab nicht in ausreichender Menge gewonnen werden konnte, wird hierauf im Folgenden nicht weiter eingegangen.

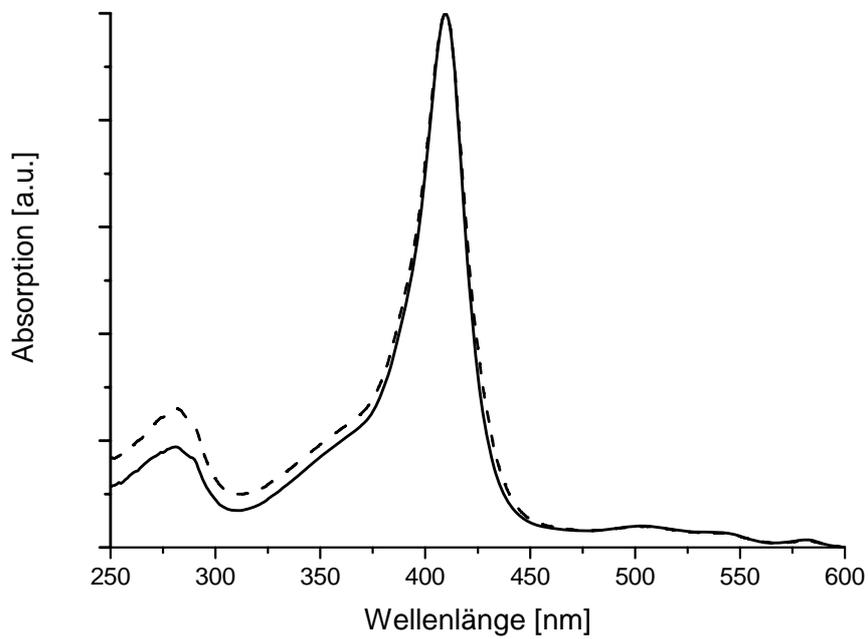
### **3.4.1 Pigmentzusammensetzung der im nativen Gel aufgetrennten Komplexe**

Nach der präparativen Auftrennung der beiden Banden über native Gelelektrophorese wurden die erhaltenen Lösungen der einzelnen Proben im Fall von Zn-Pheid-*a*-Mb, Zn-BPheid-*a*-Mb und nativem Myoglobin spektroskopisch untersucht. Hierbei zeigten sich im Fall von Zn-Pheid-*a*-Mb und nativem Myoglobin nur äußerst geringe spektrale Differenzen (Abbildung 3-20 und Abbildung 3-21).

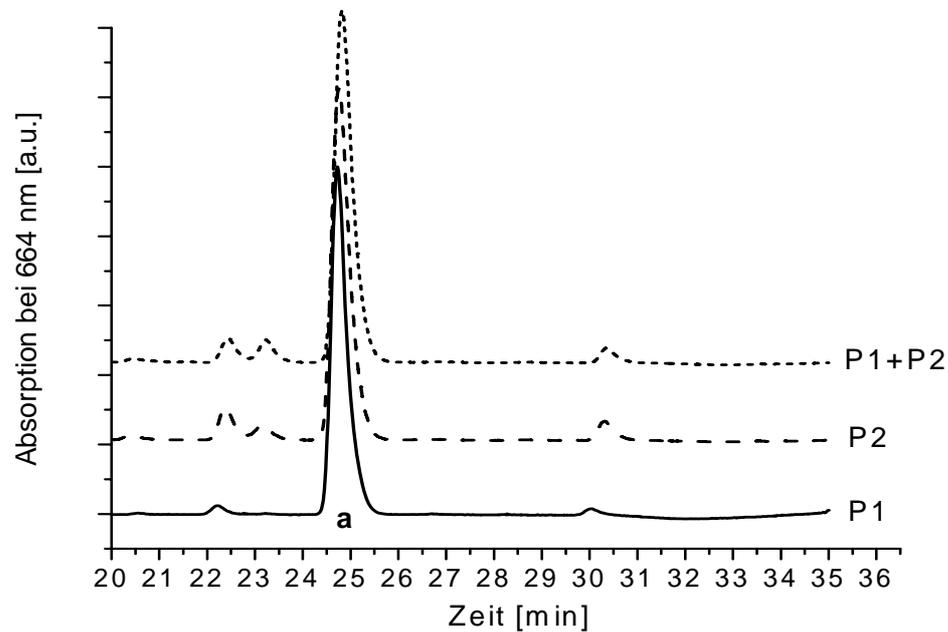
Die Absorptionsmaxima der Banden 1 und 2 lagen bei Zn-Pheid-*a*-Mb bei 437 nm im Soret- und bei 663 bzw. 664 nm im Q<sub>y</sub>-Bereich. Die geringfügig langwellige Verschiebung der Absorptionsmaxima ließ sich auch beobachten, wenn die nicht elektrophoretisch aufgereinigten Zn-Pheid-*a*-Mb-Komplexe für mehr als zwei Wochen gelagert wurden. Aufgrund der identischen Pigmentzusammensetzung der Komplexe aus beiden Banden (Abbildung 3-22) werden diese geringen spektralen Differenzen wahrscheinlich durch das Protein verursacht. Hierauf wird im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen der einzelnen Banden weiter eingegangen (s. Kapitel 3.5.2). Die Absorptionsspektren der Komplexe aus den beiden Banden von nativem Myoglobin wiesen keine Verschiebungen der Maxima auf, das Maximum der Soret-Bande lag wie im nicht elektrophoretisch aufgereinigten Komplex bei 409 nm.



**Abbildung 3-20.** Absorptionsspektren von Zn-Pheid- $\alpha$ -Mb, Bande 1 (—) und Bande 2 (---).

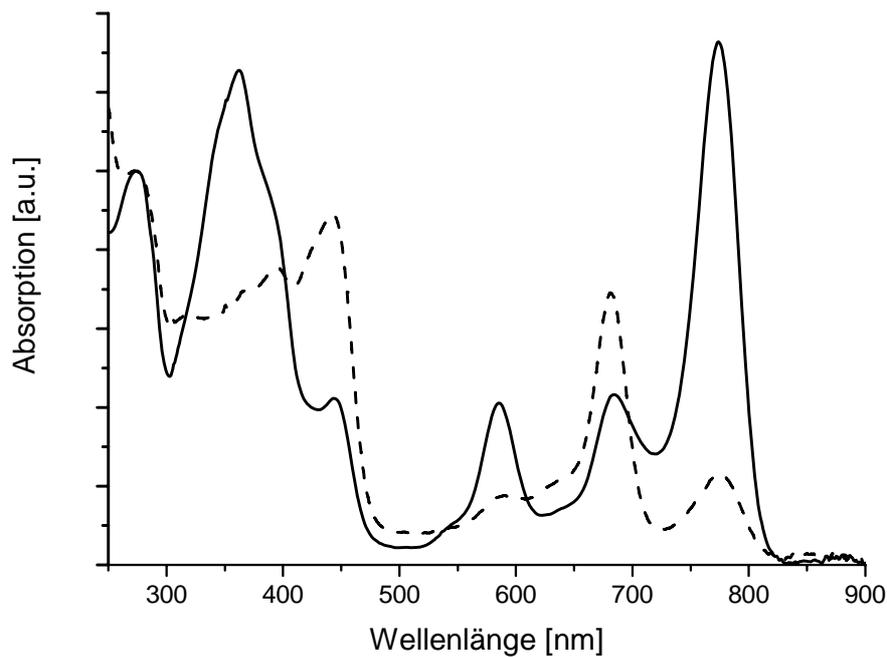


**Abbildung 3-21.** Absorptionsspektren von nativem Myoglobin, Bande 1 (—) und Bande 2 (---).



**Abbildung 3-22.** Chromatogramme der aus den Banden 1 (P1) und 2 (P2) von Zn-Pheid-*a*-Mb isolierten Pigmente bzw. deren Gemischs (P1+P2). Der mit **a** gekennzeichnete Hauptpeak entspricht Zn-Pheid *a*. Die im Vergleich mit Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9 leicht veränderte Retentionszeit dieses Pigments ist ein häufig wiederkehrendes Problem im Zusammenhang mit HPLC-Analysen, da der Equilibrierungszustand der Säulen und die Temperatur von Säulen und Lösungsmitteln an verschiedenen Tagen variieren. Die Eindeutigkeit der Zuordnung wurde mit Standardsubstanzen überprüft.

Im Gegensatz hierzu waren die spektralen Differenzen bei Zn-BPheid-*a*-Mb viel gravierender. Der aus Bande 1 isolierte Komplex wies das Spektrum von Zn-BPheid-*a*-Mb vor dem Gel auf, allerdings mit etwas stärker ausgeprägten Schultern bei 444 und 685 nm (Abbildung 3-23). Diese Absorptionsbanden sind charakteristisch für das an den Kohlenstoffatomen C-7/8 (s. Abbildung 3-1) oxidierte Pigment. Der aus Bande 2 isolierte Komplex war grundsätzlich noch viel stärker oxidiert. Die für das Zn-Bakteriochlorin charakteristischen Absorptionsbanden bei 362 und 774 nm hatten stark an Intensität verloren, wohingegen die für das 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* charakteristischen Banden bei 443 und 682 nm stark zugenommen hatten. Abbildung 3-23 zeigt den Extremfall eines aus Bande 2 von Zn-BPheid-*a*-Mb isolierten Komplexes.



**Abbildung 3-23.** Absorptionsspektren von Zn-BPheid-*a*-Mb, Bande 1 (—) und Bande 2 (---).

Das Ausmaß der Oxidation des Pigments in Bande 2 war sicherlich abhängig von der Güte der Aufarbeitung (konsequenter Sauerstoffausschluss), es ließ sich aber generell festhalten, dass diese Bande immer einen weitaus größeren Anteil an 3-Acetyl-Zn-Pheid-*a*-Mb enthielt als Bande 1. Vermutlich ist die Struktur des Proteins aus Bande 2 weniger starr und dadurch der Zutritt von Sauerstoff in die Bindungstasche erleichtert. Die von Varadarajan *et al.* (1989) im Zusammenhang mit der Rekonstitution von menschlichem Myoglobin aufgestellte Hypothese, dass die auch dort bei der isoelektrischen Fokussierung beobachtete zweite Bande (niedrigerer isoelektrischer Punkt) durch reduziertes (?) Protein, welches im Gel entsteht, verursacht wird, wäre in diesem Zusammenhang eventuell zutreffend. Die Reduktion des Proteins ginge damit mit der Oxidation des enthaltenen Pigments einher. Im Zusammenhang mit Zn-Pheid-*a*-Mb und nativem Myoglobin ist diese Kopplung allerdings nicht zu beobachten (s. oben). Dagegen spricht zudem, dass sich die einzelnen Banden ja wiederum ineinander umwandeln, so dass die Ursache für ihr Auftreten nicht in einer während der Elektrophorese stattfindenden irreversiblen Reduktion liegen kann.

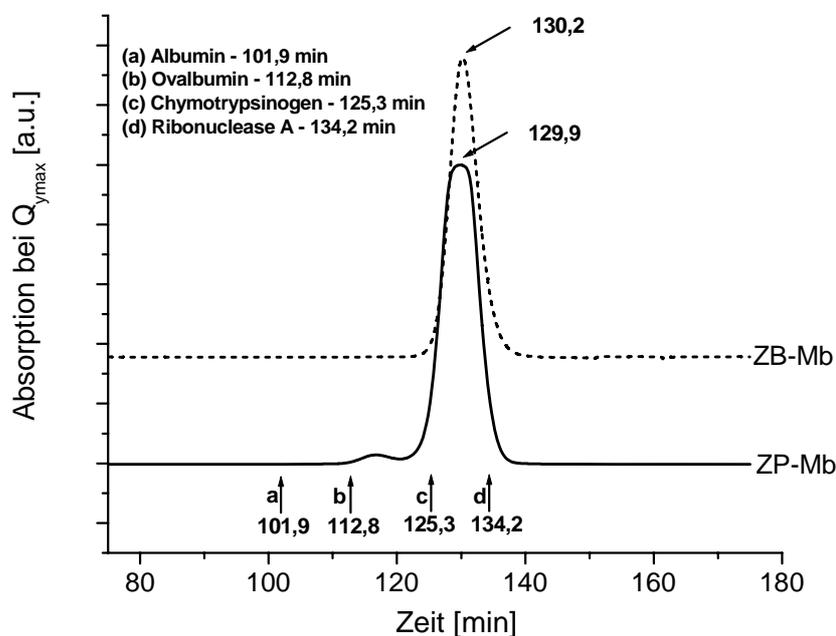
### 3.4.2 Größenanalyse der Proteinbanden

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass es sich bei den in den nativen Gelen auftretenden Banden um unterschiedlich große Proteinaggregate handelte oder kovalente Veränderungen im Protein stattgefunden hatten, wurden die einzelnen Komplexe auf ihre Größe hin untersucht.

#### Gelfiltration und Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der aus den einzelnen Banden isolierten Komplexe ergab in allen Fällen ein Molekulargewicht von  $16951 \pm 2$  Da, was mit der berechneten Masse von 16951 Da für das Apoprotein übereinstimmt. Die AS-Zusammensetzung ist somit identisch und unverändert.

Da durch die bei der Massenspektrometrie vorherrschenden denaturierenden Bedingungen mögliche Proteinaggregate nicht nachweisbar sind, wurden die Lösungen von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb vor der nativen PAGE mittels Gelfiltration analysiert. Hierbei zeigte sich, dass das Protein in monomerer Form in Lösung vorlag und keine Aggregate vorhanden waren (Abbildung 3-24). Das Auftragen von log MW gegen die Elutionszeit ergab für beide Komplexe das erwartete Molekulargewicht von ca. 17,8 kDa.



**Abbildung 3-24.** FPLC-Laufprofile von Zn-Pheid-*a*-Mb (ZP-Mb) und Zn-BPheid-*a*-Mb (ZB-Mb) vor der nativen Gelelektrophorese.

Die Elutionsprofile der beiden Komplexe sind allerdings nicht völlig deckungsgleich. Der Bakteriochlorin-Komplex hat ein deutliches Maximum, während der Chlorin-Komplex einen breiteren Peak ohne deutliches Maximum aufweist. Da beide Proben in identischer Konzentration aufgetragen wurden, handelt es sich hierbei nicht um einen Konzentrationseffekt. Vielmehr sieht es so aus, als ob der Chlorin-Komplex eine etwas diffusere Proteinstruktur als der Bakteriochlorin-Komplex besitzt, die es ihm ermöglicht eine etwas größere Zahl von Konformationen einzunehmen. Dadurch könnte es zu unterschiedlichen Wechselwirkungen auf der Säule und damit zu einer Verbreiterung des Elutionsprofils kommen.

### **3.4.3 Homogenitätsuntersuchung der einzelnen Komplexe mit analytischer Ultrazentrifugation**

#### 1. Theoretische Einführung

(Schachmann, 1959; Schubert und Schuck, 1991; Schuck, 2000)

Die analytische Ultrazentrifugation dient der Untersuchung der Bewegung oder Konzentrationsverteilung biologischer Makromoleküle in Lösung unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte. Mit ihrer Hilfe können die Molekulargewichte von Proteinen, Nukleinsäuren oder supramolekularen Aggregaten dieser Komponenten bestimmt und die Einheitlichkeit dieser Systeme untersucht werden. Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit wichtige Fragestellung der Selbstassoziation eines Proteins kann durch die minimal invasive Technik der Ultrazentrifugation auf elegante Art gelöst werden. Mit Ausnahme des hohen Drucks, dem die Proben während der Zentrifugation ausgesetzt sind, gibt es keine weiteren chemischen oder physikalischen Einflussfaktoren.

Um die Bewegung und Konzentrationsverteilung von Makromolekülen in Lösung verfolgen zu können, muss die Zentrifuge mit einem optischen System ausgestattet sein, das eine Detektion der Absorption und damit einer der Molekülkonzentration proportionalen Größe während der Zentrifugation erlaubt. Hierzu muss die Zentrifuge zum einen über durchsichtige Probenzellen und zum anderen über einen analytischen Zusatz verfügen, der es erlaubt, die lokale Absorption in der Probenzelle zugleich mit der in der Referenzzelle zu messen.

Grundsätzlich werden zwei Typen von analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten unterschieden, die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe und die Sedimentationsgleichgewichtsläufe. Letztere sind im Zusammenhang mit dieser Arbeit nicht relevant, so dass im Folgenden nur auf das Prinzip der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe eingegangen wird.

Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe

Bei den Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wird die stark größenabhängige Wanderung der Partikel während einer bestimmten Zeit untersucht. In diesen Experimenten wird die Geschwindigkeit bestimmt, mit der sich die Makromoleküle einer Spezies unter dem Einfluss von Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegen. Statt der Geschwindigkeit  $u$  wird im Allgemeinen der Sedimentationskoeffizient  $s$  verwendet, der mit ersterer in folgender Beziehung steht:

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} \quad (1)$$

( $\omega$  = Winkelgeschwindigkeit des Rotors,  
 $r$  = Abstand des Maximums des Konzentrationsgradienten vom Rotorzentrum)

$s$  hängt, außer von den Eigenschaften des untersuchten Moleküls, von der Dichte  $\rho$ , der Viskosität  $\eta$  und der Temperatur  $T$  des Lösungsmittels ab. Für ideale Lösungen sind der  $s$ -Wert, der Reibungskoeffizient  $f$ , der Diffusionskoeffizient  $D$  und die Molmasse  $M$  des Makromoleküls durch die Svedberg-Gleichung miteinander verknüpft. Zur Berechnung der Molmasse einheitlicher Makromoleküle sind zusätzlich die Avogadro-Zahl  $N_A$ , das partialspezifische Volumen des Makromoleküls  $v$ , welches in guter Näherung dessen reziproker Dichte entspricht, und die Boltzmann-Konstante  $k$  zu berücksichtigen:

$$s = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A \cdot f} \quad (2) \quad \text{mit} \quad D = kT/f \quad (3)$$

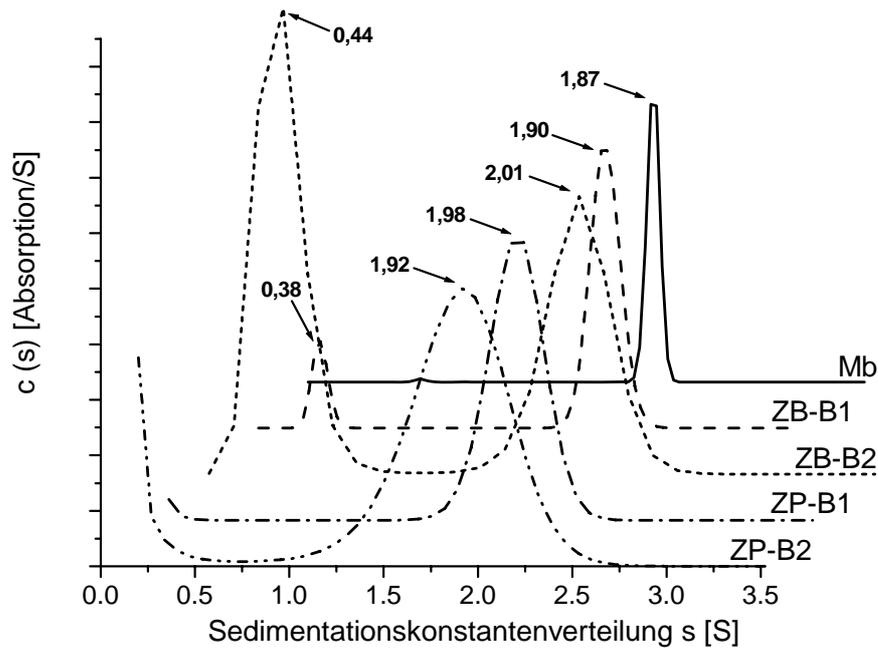
Durch Anlegen eines hohen Zentrifugalfeldes wird erreicht, dass die zu untersuchenden Partikel sedimentieren. Während des Laufs wird in festgelegten Zeitintervallen die radiale Konzentrationsverteilung im Verlauf des Experiments registriert. Im Zuge der Sedimentation bewegt sich die Sedimentationsfront zum Zellboden hin, wo sich die sedimentierten Partikel schließlich ablagern. Die zeitliche Änderung der Wendestelle  $r_{bnd}$  der Sedimentationsfront, also die Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  der Sedimentationsfront, steht nach Gleichung (1) in Beziehung zum Sedimentationskoeffizienten  $s$ :

$$u = \frac{dr_{bnd}}{dt} \quad (4)$$

Die Auswertung aller erhaltenen Konzentrationsprofile in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  über die Umrechnung des gesamten Zellradius in den  $s$ -Raum ergibt die Sedimentationskoeffizientenverteilung der Partikel in der Lösung.

## 2. Messergebnisse

Eine Analyse der aus den einzelnen Banden von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb eluierten Komplexe mittels der gegenüber der Gelfiltration sensitiveren Methode der Sedimentationsgeschwindigkeits-Ultrazentrifugation ergab die in Abbildung 3-25 gezeigten Verteilungen der Sedimentationskoeffizienten nach Analyse der Rohdaten wie in Kapitel 2 beschrieben. Zur Analyse verwendet wurde das Modell der „noninteracting discrete species“.



**Abbildung 3-25.** Errechnete Sedimentationskonstantenverteilung von nativem Myoglobin (Mb) und den aus den Gelbanden 1 und 2 von ZnBPheid-*a*-Mb (ZB-B1 und ZB-B2) bzw. Zn-Pheid-*a*-Mb (ZP-B1 und ZP-B2) eluierten Komplexen.

Die Homogenität der zugehörigen Residuen-Plots zeigte, dass die gefitteten Linien nur sehr wenig von den Datenpunkten abweichen und somit das Modell korrekt gewählt wurde. In der Literatur ist für Myoglobin ein Sedimentationskoeffizient von  $2,2 \pm 0,1$  S angegeben (Schuck und Demeler, 1999). Die in dieser Arbeit errechneten Werte von  $1,94 \pm 0,07$  S liegen damit in dem erwarteten Bereich. Auffällig ist die sukzessive Verbreiterung der Sedimentationskonstantenverteilung (= S-Verteilung) um  $S \approx 2$  in der Reihe Mb < ZB-B1 < ZB-B2 < ZP-B1 < ZP-B2 (Erläuterung der Abkürzungen in Abbildung 3-25). Sie erinnert an die Verbreiterung des Elutionsprofils von Zn-Pheid-*a*-Mb bei der Gelfiltration (s. Kapitel 3.4.2). Natives Mb hat eine sehr schmale, definierte S-Verteilung. Dies lässt sich dadurch erklären, dass im Mb eine für den Kofaktor Fe-Protoporphyrin IX optimierte Proteinstruktur vorliegt. Die Zahl der möglichen Konformationen des Proteins ist hier klein gegenüber der bei den rekonstituierten Komplexen. Hier zeigt ZB-B1 die größte Homogenität, gefolgt von ZP-B1. Die aus den

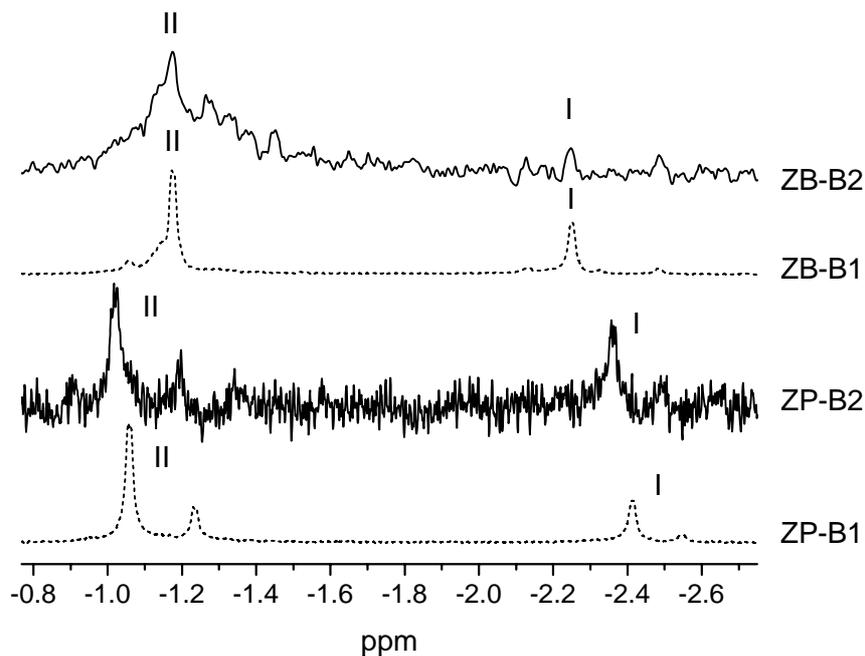
unteren Banden der nativen PAGE eluierten Pigment-Mb-Komplexe weisen jeweils eine diffusere Proteinstruktur als die Komplexe aus den oberen Banden auf, d.h. dass hier eine größere Zahl von Proteinkonformationen eingenommen werden kann. Dies könnte eventuell auch die Ursache für die größere elektrophoretische Beweglichkeit der Komplexe in den unteren Banden sein, indem auf diese Weise zusätzliche Ladungen exponiert werden.

Es wurde angenommen, dass die in Abbildung 3-25 bei ZB-B1 und vor allem ZB-B2 sichtbaren Banden im Bereich von  $S \approx 0,4$  aus dem Vorhandensein von freiem, aggregiertem Pigment resultieren. Dies geht einher mit der im Vergleich zu nativem Mb und Zn-Pheid- $\alpha$ -Mb geringeren Stabilität des Zn-BPheid- $\alpha$ -Mb-Komplexes bei Denaturierung mit Guanidin (s. Kapitel 3.5.1).

#### **3.4.4 Protonen-NMR-Spektren der im nativen Gel aufgetrennten Komplexe**

Im Zusammenhang mit der ungeklärten Peak-Verdopplung im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum rekonstituierter Myoglobine (s. Kapitel 3.3.3) wurde von Boxer und Wright (1981) diskutiert, dass das Protein in zwei unterschiedlichen, langsam ineinander übergehenden Konformationen vorliegt. Da die in dieser Arbeit bei der nativen Gelelektrophorese der rekonstituierten Mb-Komplexe auftretenden Banden ein möglicher Hinweis auf derartige Konformationen sein könnten, wurden die daraus eluierten Komplexe ebenfalls NMR-spektroskopisch untersucht (Abbildung 3-26).

Der Vergleich mit Abbildung 3-16 macht deutlich, dass im Gegensatz zu den Erwartungen die Struktur der Spektren auch bei den aus den einzelnen Banden isolierten Komplexen erhalten geblieben ist. Die Verdopplung der Peaks I und II bei Zn-Pheid- $\alpha$ -Mb ist bei beiden Komplexformen weiterhin vorhanden, auch wenn die Relation der Hauptpeaks zu den jeweiligen Nebenpeaks bei Bande 1 von ehemals 2,5 : 1 auf 4 : 1 angewachsen ist. Im Verhältnis zu Peak II hat die Intensität von Peak I allerdings um ca. 25 % abgenommen. Die Verschiebungen der Signale sind bis auf geringfügige Abweichungen gleich geblieben. Bei beiden Komplexen tritt in den Spektren der Komplexe aus Bande 2 eine starke Bandenverbreiterung auf, dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der analytischen Ultrazentrifugation (s. Kapitel 3.4.3). Aus den erhaltenen Spektren konnten keine weiteren Strukturaussagen die Komplexe betreffend gemacht werden, es konnte aber eindeutig die Annahme widerlegt werden, dass die im nativen Gel in Erscheinung tretenden Banden in Verbindung mit den heterogenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren stehen. Die von Boxer und Wright (1981) diskutierten zwei Konformationen des Proteins stehen somit nicht in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit beobachteten Banden im nativen Gelsystem.



**Abbildung 3-26.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der aus den einzelnen Gelbanden eluierten Komplexe von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb. Von unten nach oben: ZP-B1, ZP-B2, ZB-B1 und ZB-B2. Die Abkürzungen entsprechen den in Abbildung 3-25 verwendeten. Die Konzentration der Proben aus den Banden 1 betrug jeweils ca.  $0,5 \cdot 10^{-4}$  M, die der Proben aus den Banden 2 ca.  $1 \cdot 10^{-6}$  M. Im letzteren Fall war jeweils aufgrund der begrenzten Probenmenge eine weitere Aufkonzentrierung nicht möglich.

### 3.5 Stabilitätsvergleich der Pigment-Myoglobin-Komplexe gegenüber Denaturierung

Die Denaturierung von Proteinen führt zu einem Verlust ihrer Tertiär- und Sekundärstruktur. Dieser Strukturverlust kann spektroskopisch durch CD-Spektroskopie verfolgt werden (Kelly und Price, 1997). Durch die unterschiedliche Wechselwirkung der chromophoren Gruppen in Proteinen mit den beiden Komponenten zirkular polarisierten Lichts werden diese verschieden stark absorbiert. Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen optisch aktiver Verbindungen (Hesse *et al.*, 1995). Das CD-Signal von Proteinen im UV-Bereich beruht auf der räumlichen Anordnung der Amid-Chromophore. Der Amid-Chromophor selbst ist aufgrund seiner Symmetrieebene achiral. Die definierte Anordnung der Amid-Chromophore zueinander in den regelmäßigen Sekundärstrukturelementen von beispielsweise  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt führt zu optischer Aktivität, da in unmittelbarer Nachbarschaft vorhandene Amide und andere polare Gruppen ein chirales elektrostatisches Feld erzeugen (Garab, 1996). Hinzu kommt die exzitonische Interaktion („Exciton Splitting“) der Chromophore, die einen weiteren wesentlichen Bestandteil des CD-Signals liefert (Tinoco, 1962; DeVoe, 1965;

Woody, 1985; Johnson, 1990), indem sie Ausmaß und Frequenz der Absorption maßgeblich beeinflusst.  $\alpha$ -Helices sind zum einen durch eine negative Bande bei 222 nm charakterisiert, zum anderen durch eine exzitonische Aufspaltung bei -208 nm/+192 nm (Woody, 1985). Einen zusätzlichen Einfluss auf das CD-Spektrum hat die Länge der Helix (Garab, 1996).

Enthält ein Protein zusätzlich prosthetische chromophore Gruppen, wie z.B. Tetrapyrrole oder Carotinoide, so ergeben sich dadurch charakteristische CD-Signale im sichtbaren bis nahen Infrarot-Bereich (Pearlstein, 1982; Pearlstein *et al.*, 1982; Frank und Cogdell, 1993). Die zum Teil vorhandene intrinsische Chiralität dieser Moleküle verursacht schon beim isolierten Chromophor ein charakteristisches, wenn auch intensitätsschwaches CD-Spektrum (Dratz *et al.*, 1966; Houssier und Sauer, 1970; Scheer, 1982). Dieses wird aber durch Interaktion mit dem jeweiligen Protein in spezifischer Weise modifiziert (Gregory *et al.*, 1980; Garab *et al.*, 1988a; Garab *et al.*, 1988b; Finzi *et al.*, 1989). Bei achiralen Farbstoffen wird eine zirkular dichroitische Aktivität durch die Wechselwirkung mit dem Protein überhaupt erst generiert (Blauer *et al.*, 1970; Frank *et al.*, 1989; Blauer *et al.*, 1993). Die Bindung des Pigments spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Sekundärstruktur des jeweiligen Kooperationspartners (Paulsen *et al.*, 1993).

Die beschriebenen Einflüsse von Proteinstruktur und Chromophor auf den Zirkulardichroismus wurden dazu benutzt, die Stabilitäten der nativen und künstlichen Myoglobin-Komplexe zu untersuchen und die Differenzen der vorhandenen Subpopulationen näher zu bestimmen.

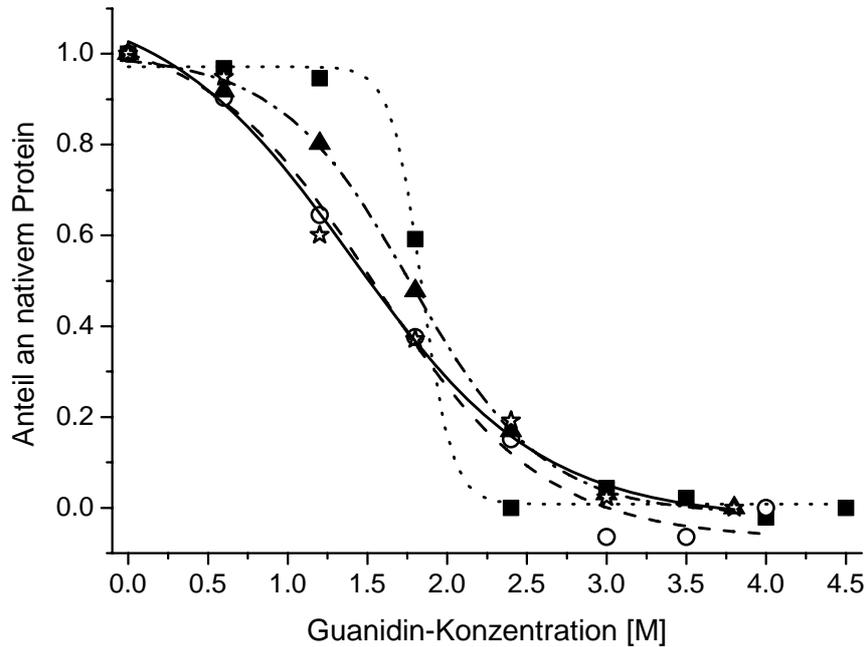
Die Stabilitäten der künstlichen Pigment-Mb-Komplexe im Vergleich mit den Stabilitäten des nativen Mb und des zugehörigen Apoproteins wurden durch Denaturierung mit Guanidin untersucht. Die hier verwendeten Proben wurden nicht durch native PAGE gereinigt, somit wird nicht nach den zwei Banden unterschieden. Guanidin hat die Eigenschaft, in höheren Konzentrationen Proteine zu denaturieren (Ahmad, 1985; Bjork und Pol, 1992). Die Empfindlichkeit von Proteinen gegenüber Guanidin ist individuell verschieden, vollständige Denaturierung erfolgt in der Regel im Konzentrationsbereich von 3,5-6 M. Als chaotropes Agens bindet Guanidin (ebenso wie Harnstoff) sowohl an die polaren, als auch an die unpolaren Gruppen eines Proteins. Diese „Solvatation“, die im Gegensatz zu reinem Wasser bei globulären Proteinen vorhandene hydrophobe Wechselwirkungen im Proteininneren aufbricht, verursacht den Zusammenbruch von Tertiär- und Sekundärstruktur (Lottspeich und Zorbas, 1998). Da der denaturierende Effekt von Guanidin verglichen mit Harnstoff bei nativem Mb unter identischen Bedingungen größer ist (Markovic, 2003), wurde dieses Agens ausgewählt.

Die aus den einzelnen Banden der nativen PAGE eluierten Komplexe wurden durch thermische Denaturierung in ihren Stabilitäten verglichen. Diese Methode bietet den Vorteil, dass durch die kontinuierliche Messweise auch kleinste Stabilitätsunterschiede sichtbar gemacht werden können.

### 3.5.1 Denaturierung mit Guanidin

Aus der Literatur ist bekannt, dass natives Pferdeherzmyoglobin bei einer Guanidin-Konzentration von 3,5 M vollständig denaturiert (Greenfield und Fasman, 1969; Greene und Pace, 1974). Unter der Annahme, dass in Abwesenheit von Guanidin der vollständig gefaltete Zustand existiert (0% Entfaltung) und bei 3,5 M Guanidin das Protein vollständig entfaltet ist, kann der Anteil an nativem Protein direkt der Abbildung 3-27 entnommen werden. Die erhaltenen Werte von  $\Delta A_{248-222 \text{ nm}}$  für die verschiedenen Guanidin-Konzentrationen wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf gleiche Endwerte normiert und mit einer sigmoiden Funktion (Boltzmann, *Origin 6.1*) gefittet. Bei allen untersuchten Proben treten die größten Konformationsveränderungen im Bereich von 1,2 bis 2,2 M Guanidin auf (Abbildung 3-27). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von (Ahmad, 1985). Natives Myoglobin ist bis zu einer Guanidin-Konzentration von 1,5 M stabil. Der graphisch ermittelte Wert, bei dem das Protein zu 50% (=  $E_{50}$ ) entfaltet ist, liegt hier bei etwa 1,8 M. Zn-Pheid-*a*-Mb weist eine zwischen nativem Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb liegende Stabilität auf, die Abnahme des Sekundärstrukturgehalts erfolgt hier weniger schnell als bei Zn-BPheid-*a*-Mb. Der Mittelpunkt der Titration ist bei 1,7 M Guanidin. Bei Zn-BPheid-*a*-Mb liegt der Mittelpunkt der Titration bei ca. 1,5 M Guanidin. Beim Vergleich mit Apo-Mb ist zu beachten, dass dessen  $\alpha$ -Helix-Gehalt von vornherein um 20% niedriger ist als der von nativem Mb, d.h. das Häm ist strukturbildend (Harrison und Blout, 1965). Die in Abbildung 3-27 dargestellte Kurve zeigt somit lediglich den Übergang von dessen Kofaktor-freiem, nativem Zustand in das vollständig denaturierte Protein. Der Wert für 50% Entfaltung dieses Anfangszustandes liegt bei 1,5 M Guanidin und entspricht damit dem Wert von Zn-BPheid-*a*-Mb. Die Reihenfolge der Stabilitäten der untersuchten Proben ist somit natives Mb ( $E_{50}$  bei 1,8 M) > Zn-Pheid-*a*-Mb ( $E_{50}$  bei 1,7 M) > Zn-BPheid-*a*-Mb ( $E_{50}$  bei 1,5 M) = Apo-Mb ( $E_{50}$  bei 1,5 M). Im Gegensatz zu Zn-Pheid *a* und dem natürlichen Kofaktor Protohäm trägt das bakterielle Pigment unter diesen Denaturierungsbedingungen somit nicht zur Stabilisierung des nativen Zustands bei. Die Interaktionen des Proteins mit dem natürlichen Kofaktor, für den die Bindungstasche optimiert ist, stabilisiert das Protein unter den gewählten Bedingungen

offensichtlich am besten, Zn-Pheid *a* hat allerdings ebenfalls einen, wenn auch geringeren, stabilisierenden Effekt.



**Abbildung 3-27.** Guanidin-Denaturierung von Apo-Mb (○, --), Zn-BPheid-*a*-Mb (☆, —), Zn-Pheid-*a*-Mb (▲, ···) und Mb (■, -·-·) in Puffer-III/54% Glycerin\* bei Raumtemperatur. Die Denaturierung wurde durch CD-Spektroskopie im UV-Bereich verfolgt, auf der Ordinate sind die normierten Werte von  $\Delta A_{248-222\text{ nm}}$  aufgetragen (s. Text).

Neben den Werten für 50% Entfaltung, die die Stabilität der Komplexe illustrieren (s. oben), ist die Steilheit der Denaturierungskurven ( $dy/dx$ ) ein Maß für kooperative Wechselwirkungen während des Entfaltungsprozesses. Die stark sigmoide Kurve von nativem Mb ( $dy/dx = -2,4$  im Wendepunkt) deutet auf einen mehr oder weniger direkten Übergang der nativen Konformation in den ungefalteten Zustand hin, dies entspräche einem Zwei-Zustandsmodell. Dieser direkte Übergang verdeutlicht die Bedeutung des Chromophors für die Homogenität des Proteins. Erst wenn durch Guanidin dessen spezifische Wechselwirkungen in der Bindungstasche aufgebrochen werden, erfolgt ein abruptes Zusammenbrechen von Tertiär- und Sekundärstruktur. Möglicherweise verhindern die hohe Homogenität des nativen Mb und die hier kompakte Bindungstasche ein leichtes, frühzeitiges Eindringen des Guanidins in die Tasche, und damit die partielle Entfaltung. Die Abflachung des sigmoiden Kurvenverlaufs bei Zn-Pheid-*a*-Mb ( $dy/dx = -0,6$ ) lässt auf eine geringere Kooperativität schließen, die strukturell möglicherweise einer geringeren Homogenität des Komplexes entspricht. Alternativ kann das Guanidin früher eindringen und führt so

\* s. Kapitel 2.8.1

womöglich zu Intermediaten bei der Denaturierung, die mit der Auflösung der Titration nicht sichtbar sind (vgl. Kiefhaber und Baldwin (1995) und Feng *et al.* (1999)). Dieser Effekt ist bei Zn-BPheid-*a*-Mb ( $dy/dx = -0,5$ ) und Apo-Mb ( $dy/dx = -0,5$ ) noch ausgeprägter. Die Bindungstasche scheint bei Zn-BPheid-*a*-Mb sehr offen zu sein, so dass Guanidin ähnlich gut eindringen kann wie in die leere Tasche des Kofaktor-freien Apo-Mb. Dies ist wahrscheinlich eine Folge der  $sp^3$ -Hybridisierung der Kohlenstoffatome C-7/8 im Inneren der Tasche, die zu einer größeren Raumerfüllung aufgrund fehlender Planarität beiträgt. Hinzu kommt die polare, raumerfüllende Acetyl-Gruppe an Ring A.

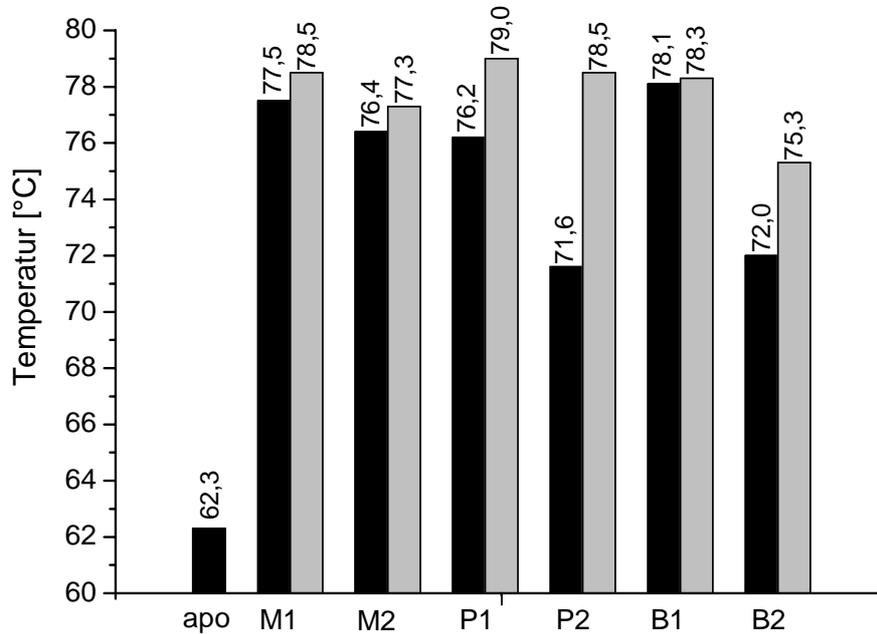
Eine Entscheidung zum Mechanismus der Kooperativitätsänderung der nicht nativen Komplexe im Vergleich mit nativem Mb kann aufgrund der geringen Menge an Datenpunkten nicht getroffen werden. Es können sowohl das vermehrte Auftreten von Zwischenstufen bei der Entfaltung als auch die Heterogenität der Komplexe eine Rolle spielen. Möglich ist auch, dass bei den künstlichen Komplexen während der Entfaltung im Gleichgewicht verschiedene Zustände nebeneinander existieren.

### **3.5.2 Thermische Denaturierung der Komplexe aus den einzelnen Gelbanden**

Die thermische Denaturierung der einzelnen Pigment-Mb-Komplexe bzw. des Apo-Mb ist in Abbildung 3-28 zusammengefasst. Die Denaturierung wurde wiederum CD-spektroskopisch verfolgt. Neben dem für den  $\alpha$ -Helix-Gehalt charakteristischen Signal im UV-Bereich (222 nm) wurde zusätzlich das CD-Signal des jeweiligen Chromophors im Soret-Bereich registriert. In Analogie zu den Denaturierungsversuchen mit Guanidin wurde das CD-Signal nach vollständiger Denaturierung bei  $T = 85\text{ °C}$  gleich Null gesetzt. Der Anfangswert (= 0% Denaturierung) wurde auf 1 normiert.

Abbildung 3-28 zeigt deutlich, dass die thermische Stabilität der Komplexe stark von der Stabilität gegenüber Denaturierung mit Guanidin abweicht. Aufgezeichnet ist hier jeweils der aus den Kurven in Abbildung 3-29 graphisch ermittelte Temperaturwert, der 50% Entfaltung entspricht. Zusätzlich aufgetragen ist der auf die gleiche Weise ermittelte Wert aus den während der Denaturierung aufgezeichneten Signalen der Chromophore. Die aus den oberen Banden der nativen PAGE eluierten Komplexe weisen folgende Reihenfolge der Stabilitäten auf: Zn-BPheid-*a*-Mb > Mb > Zn-Pheid-*a*-Mb. Sie besitzen unter diesen Bedingungen alle eine weitaus höhere Stabilität als Apo-Mb (vgl. auch Abbildung 3-29). Die aus den unteren Banden der nativen PAGE eluierten Pigment-Protein-Komplexe sind alle von geringerer Stabilität als die der zugehörigen oberen Banden. Die mit Abstand größte Stabilität zeigt hier

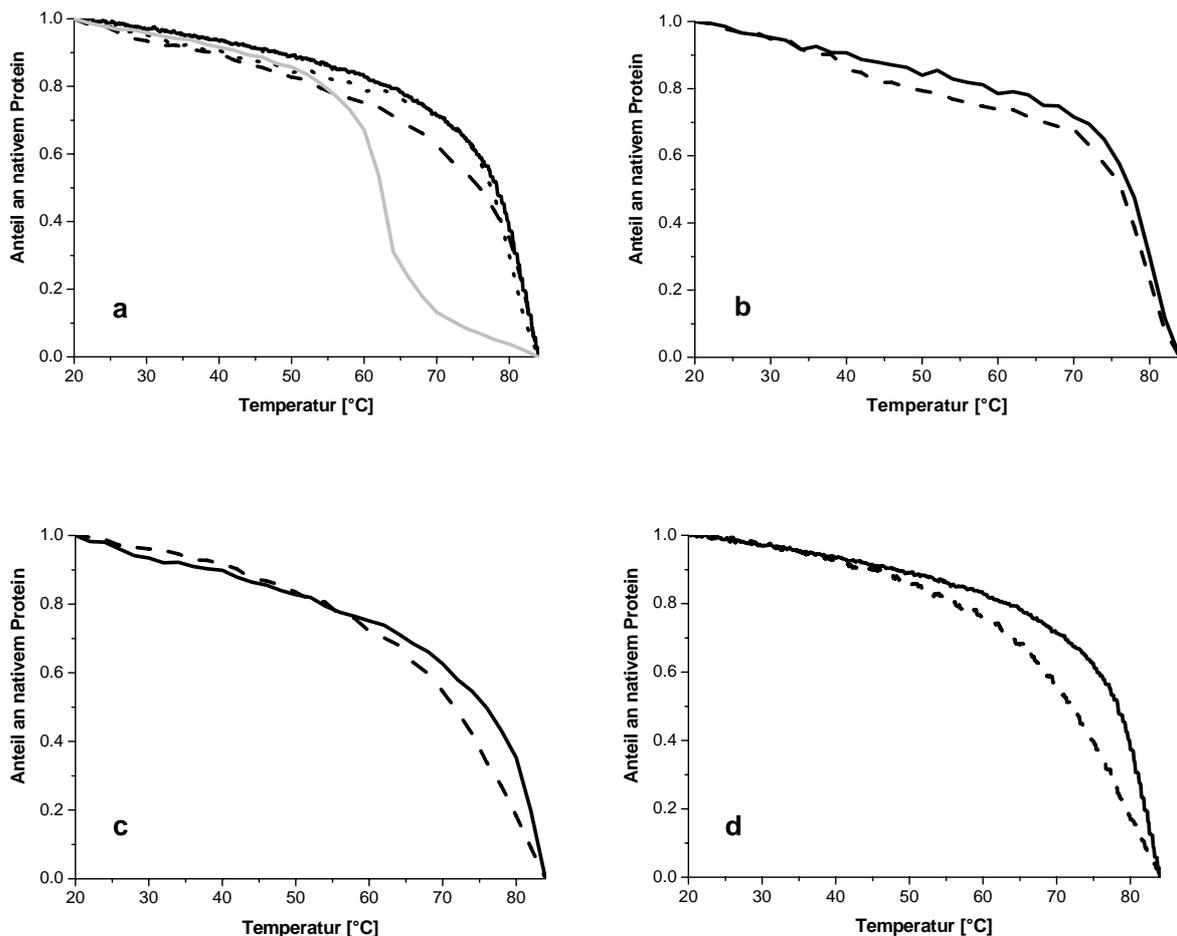
der quasi native Mb-Komplex, gefolgt von Zn-BPheid-*a*-Mb und Zn-Pheid-*a*-Mb. Diese Komplexe sind aber immer noch viel stabiler als das Apoprotein.



**Abbildung 3-28.** Thermische Stabilität von Apo-Mb (apo), Mb-Bande 1 (M1), Mb-Bande 2 (M2), Zn-Pheid-*a*-Mb-Bande 1 (P1), Zn-Pheid-*a*-Mb-Bande 2 (P2), Zn-BPheid-*a*-Mb-Bande 1 (B1) und Zn-BPheid-*a*-Mb-Bande 2 (B2). Die Säulen zeigen die Temperatur, bei der das CD-Signal des Proteins (schwarz) und das des Chromophors (grau) in der Mitte zwischen nativem und denaturiertem Zustand lag. Mit Ausnahme von Apo-Mb waren alle zugehörigen Kurven hyperbolisch (s. Abbildung 3-29 für das UV-Signal).

Die Form der Protein-Denaturierungskurven bei der thermischen Entfaltung lässt auf einen kooperativen Mechanismus schließen, der bei den beiden künstlichen Komplexen schwächer ausgeprägt ist. Hier ist der Übergang zwischen 70° und 80° C weniger abrupt als bei nativem Mb. Yan *et al.* (2003) fanden bei der thermischen Denaturierung von Myoglobin Hinweise auf einen „Vor-Übergangszustand“ des Proteins, neben der Aggregation des Proteins schon vor Erreichen des völlig denaturierten Zustands. Der direkte Übergang der nativen in die entfaltete Form, gemäß einem Zwei-Zustands-Modell, ist folglich nicht gesichert. Auch bei der Denaturierung von Myoglobin mit Guanidin wird das Auftreten von bis zu vier Zuständen diskutiert (Bismuto *et al.*, 1983; Ahmad, 1985). Ebenso werden bei der Säuredenaturierung von Myoglobin Intermediate diskutiert (Koner mann *et al.*, 1997; Sogbein *et al.*, 2000). Grundsätzlich führen unterschiedliche Denaturierungsbedingungen zu unterschiedlichen Entfaltungsmechanismen (Moore und Pettigrew, 1990; Staniforth *et al.*, 1998; Panick *et al.*, 1999). Die Abflachung der Guanidin-Denaturierungskurven von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-

BPheid-*a*-Mb im Vergleich mit nativem Mb könnte darauf hindeuten, dass bei diesen Komplexen mehrere intermediäre Zustände (evtl. >4) während der Entfaltung auftreten, die unter den gewählten Bedingungen nicht aufgelöst werden können. Die Aggregation des Proteins während der Entfaltung bzw. im denaturierten Zustand (vgl. Yan *et al.* (2003)) ist wahrscheinlich für das in dieser Arbeit beobachtete massive Ausfallen des Proteins im Zuge der Temperaturerhöhung verantwortlich.



**Abbildung 3-29.** Thermische Denaturierungskurven der verschiedenen Mb-Komplexe, verfolgt anhand des CD-Signals bei 222 nm. Das CD-Signal wurde bei  $T = 85\text{ °C}$  (= vollständige Denaturierung) gleich Null gesetzt. Der Anfangswert (= 0% Denaturierung) wurde auf 1 normiert.

- a) Apo-Mb (grau), Mb-Bande 1 (.....), Zn-Pheid-*a*-Mb-Bande 1 (---) und Zn-BPheid-*a*-Mb-Bande 1 (—)  
 b) Mb, Bande 1 (—) und Bande 2 (---)  
 c) Zn-Pheid-*a*-Mb, Bande 1 (—) und Bande 2 (---)  
 d) Zn-BPheid-*a*-Mb, Bande 1 (—) und Bande 2 (---)

Bei der thermischen Denaturierung erhöht sich die Anzahl der Rotations- und Schwingungsfreiheitsgrade des Moleküls, so dass durch die zunehmenden Vibrationen spezifische Wechselwirkungen im Proteingerüst und zwischen Protein und Kofaktor aufgebrochen

werden. Hierdurch kann dann vermehrt Wasser in das Protein eindringen und die AS-Reste solvatisieren. Der Chromophor wird so zunächst indirekt aus dem Protein gelöst, hinzu kommt dann der störende Einfluss der Wassermoleküle. Bei der Denaturierung mit Guanidin werden die Interaktionen zwischen Chromophor und Protein von vorneherein direkt durch Wechselwirkungen mit dem Reagens gestört. Der sigmoide Kurvenverlauf ist hier charakteristisch für einen mehr oder weniger plötzlichen Verlust des Kofaktors. Die hyperbolischen Kurven der thermischen Denaturierung sprechen eher dafür, dass die Bindung des Chromophors im Protein durch zunehmende Destabilisierung des Proteingerüsts sukzessive schwächer wird, bis er schließlich vom Protein dissoziiert. Bei Apo-Mb sind die Helices nicht durch einen Kofaktor stabilisiert, der Übergang von dem „nativen“ in einen denaturierten Zustand erfolgt hier unmittelbarer. Daher zeigt das Apoprotein auch bei thermischer Denaturierung einen sigmoiden Verlauf der Denaturierungskurve. Aus der Literatur ist bekannt, dass Apo-Mb bei Raumtemperatur und neutralem pH in einer kompakten, dem nativen Zustand sehr ähnlichen Konformation mit ca. 60% helikalem Anteil vorliegt (Griko *et al.*, 1988; Hughson *et al.*, 1990; Cocco *et al.*, 1992; Kiefhaber und Baldwin, 1995). Irreversible thermische Denaturierung erfolgt bei Temperaturen >50 °C (Mohney *et al.*, 2000). Bei Säuredenaturierung erfolgt die Entfaltung über ein Intermediat, das auch als Molten-Globule-Intermediat bezeichnet wird (Griko und Privalov, 1994; Barrick *et al.*, 1994). Gesicherte Aussagen über Intermediate bei der thermischen Entfaltung von Apo-Mb können durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen nicht gemacht werden.

Die im Gegensatz zur Denaturierung mit Guanidin erhöhte Stabilität von Zn-BPheid-*a*-Mb ist durch den divergierenden Mechanismus erklärbar. Die Zugänglichkeit der Bindungstasche ist bei Temperaturdenaturierung nicht mehr entscheidend. Offensichtlich hält auch dieses etwas sperrigere Pigment das Protein noch ähnlich lange zusammen wie der native Chromophor, wenn auch möglicherweise durch unterschiedliche Wechselwirkungen.

Ob die Denaturierung der Pigment-Protein-Komplexe dieser Arbeit über intermediäre Zustände erfolgt ist nicht geklärt. Ein Hinweis auf Zwischenzustände ist die Beobachtung, dass, vor allem bei den Komplexen der unteren Banden das Signal des Chromophors später abnimmt als das des Proteins. Die Dissoziation des Chromophors vom Protein könnte also nach der Denaturierung erfolgen, was einem Intermediat entspräche. Somit wäre das von (Koneremann *et al.*, 1997) bei der Säuredenaturierung von Myoglobin diskutierte Modell auch hier zutreffend:



Die bei der Hitzedenaturierung beobachtete Reihenfolge der Komplexstabilitäten der oberen und unteren Banden steht in Einklang mit den bei der Gelfiltration (Kapitel 3.4.2) und der analytischen Ultrazentrifugation (Kapitel 3.4.3) erhaltenen Ergebnissen. Die geringere Stabilität der Komplexe aus den unteren Banden ist mit einer zunehmend diffusen Bande verbunden, die als zunehmende Heterogenität interpretiert wird. Die Zahl der Konformationen des Proteins scheint hier erhöht. Dies spricht für geringe energetische Barrieren zwischen verschiedenen Konformationen mit vergleichbarer Energie, wobei die einzelnen Konformationen von unterschiedlicher, insgesamt aber geringerer Stabilität sind. Dies macht das Protein bei thermischer Denaturierung labiler.

### **3.6 Zusammenfassende Diskussion**

Die Charakterisierung der rekonstituierten Pigment-Myoglobin-Komplexe machte deutlich, dass das Protein einerseits eine hohe Selektivität bei der Auswahl der inkorporierten Chromophore zeigt, andererseits aber eine gewisse Heterogenität des Proteins selbst vorliegt, die nur teilweise vom eingelagerten Chromophor abhängt. Die Stabilität der Komplexe wird hauptsächlich durch die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein beeinflusst.

#### **3.6.1 Selektivität der Pigmentbindung**

Der natürliche Kofaktor Protohäm von Myoglobin besitzt ein zyklisches Tetrapyrrolringssystem, das das Konjugationssystem der Porphyrine aufweist (Abbildung 3-1). Der Chromophor ist so in die Bindungstasche eingelagert, dass die Ringe A und B tief im hydrophoben Inneren der Tasche verborgen sind und das zentrale Eisenatom einer starken Ligandierung durch das proximale His93 unterliegt. Das distale His64 koordiniert nur schwach von der gegenüberliegenden Seite an das Zentralmetall und wird in Oxymyoglobin durch O<sub>2</sub> ersetzt (Vojtechovsky *et al.*, 1999). Die Ringe C und D sind an der Peripherie der Tasche lokalisiert. Die zwei Propionsäuresubstituenten an diesen Ringen ragen aus der Tasche heraus und interagieren mit Aminosäureresten am Taschenrand (His97, Ser92 und Lys45). Gleichzeitig sind sie in charakteristischer Weise aus der Ebene des Makrozyklus herausgedreht. Die Propionsäure an C-13 zeigt nach unten ( $\alpha$ )\* und ist über eine Wasserstoffbrücke an Lys45 gebunden. Die Propionsäure an C-17 weist nach oben ( $\beta$ ) und ist durch

---

\* „Unten“ ( $\alpha$ ) und „oben“ ( $\beta$ ) sind definiert bezüglich Abbildung 3-1. „Unten“ ist gleichbedeutend mit „unterhalb der Papierebene“.

Wasserstoffbrücken an His97 und Ser92 gebunden (Abbildung 3-7). Die Ausrichtung der entsprechenden Säurereste von Biliverdin im Komplex mit Mb ist ebenfalls identisch mit der von Protohäm (Wagner *et al.*, 1995).

Während der Biosynthese der Chlorophylle wird die C-13-Propionsäure von Protoporphyrin zunächst methyliert und dann Teil des isozyklischen Rings E (Leeper, 1991). Hierbei entsteht ein Asymmetriezentrum an C-13<sup>2</sup>. Der dort gebundene Carbomethoxy-Substituent zeigt bei den R-Epimeren nach unten, bei den S-Epimeren nach oben. Die benachbarte Propionsäuregruppe der Chlorophylle an Ring D weist, bedingt durch die Chiralität von C-17, nach oben. Bei der Einlagerung in Myoglobin werden die 13<sup>2</sup>R-Epimere bevorzugt, so lange die Keto-Enol-Tautomerie im isozyklischen Ring und damit eine Epimerisierung möglich ist. Unter diesen Bedingungen führt eine Einlagerung der S-Epimere zu deren schneller Umwandlung in die korrespondierenden R-Epimere (Abbildung 3-9 und Tabelle 3-3). Die Orientierung der Seitengruppen an den Ringen D und E der eingelagerten Chl-Derivate entspricht damit der des natürlichen Kofaktors, Protohäm.

Der Großteil der natürlichen Chlorophyll-Proteine bindet die Chromophore in ihrer 13<sup>2</sup>R, 17S-Konfiguration. Nur ein kleiner Teil dieser Komplexe, die Typ-I-Reaktionszentren, hat jeweils ein 13<sup>2</sup>S, 17S-Epimer gebunden (Kobayashi *et al.*, 1991; Maeda *et al.*, 1992; Jordan *et al.*, 2001; Akiyama *et al.*, 2001). Diese sogenannten „Prime“-Chlorophylle (Chl *a'*, Chl *d'*, BChl *g'*) entstehen zudem sehr leicht während der Extraktion und Modifikation der Pigmente (Watanabe *et al.*, 1987). Sowohl die Chlorophyll bindenden Proteine als auch die an der Chlorophyll-Biosynthese beteiligten Enzyme sind sehr selektiv bezogen auf die Substituenten und die Stereochemie an Ring E (Fiedor *et al.*, 1992; Helfrich *et al.*, 1994). Das 1:1-Verhältnis von beispielsweise Chl *a'* und Photosystem I in *Synechococcus elongatus* (Nakamura *et al.*, 2003) deutet auf eine streng kontrollierte Reaktion hin, auch wenn die für die Epimerisierung zum „Prime“-Chl verantwortlichen Enzyme bisher nicht bekannt sind. Im Fall der Epimerisierung im Mb ist die genaue Einflussnahme des Proteins auf die Epimerisierungsreaktion nicht bekannt. Vermutlich ist eine autokatalytische Wirkung der Bindungstasche die Ursache für die schnelle Umwandlung der *a'*-Epimere in die *a*-Epimere. Apo-Mb könnte somit als Modell für eine derartige Epimerase dienen, auch wenn die Richtung der Epimerisierung hier gerade umgekehrt ist.

Bei Chl-Derivaten, die kein azides H-Atom an Position C-13<sup>2</sup> besitzen, ist die zur Epimerisierung erforderliche Keto-Enol-Tautomerie im isozyklischen Ring nicht möglich. Durch die Substitution dieses Wasserstoffatoms durch eine Hydroxy-Gruppe in 13<sup>2</sup>-OH-Zn-Pheid *a* wurde gleichzeitig ein Substituent eingeführt, dessen Größe zwischen der des H-Atoms und der der COOCH<sub>3</sub>-Gruppe liegt. Die Einlagerung beider Epimere dieses Chl-

Derivats in die Häm-Bindungstasche machte deutlich, dass auch raumerfüllendere Substituenten oberhalb der Ringebene geduldet werden. Ebenso eingelagert werden die sogenannten Pyro-Derivate, die lediglich zwei H-Atome an C-13<sup>2</sup> tragen (Wright und Boxer, 1981). Diese mögliche Varianz der Substituenten am Kohlenstoffatom C-13<sup>2</sup> erklärt sich aus der Kristallstruktur von Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1960; Phillips, 1980). Die nach unten gerichtete Propionsäure an C-13 interagiert über eine Wasserstoffbrücke mit Lys45, ein Substituent oberhalb der Ringebene fehlt dem Porphyrin an dieser Stelle. Da diese Position im nativen Protein also unbesetzt ist, wird ein kleiner Substituent oberhalb der Tetrapyrrolringebene, wie z.B. das H-Atom der  $\alpha$ -Epimere von Chl-Derivaten vom Protein bevorzugt und wenn möglich auch erzwungen, größere Substituenten werden aber ebenso akzeptiert.

Zusätzlich zur sterischen Situation am Rand der Bindungstasche wurde durch Variation der Zentralmetalle der Chl-Derivate die Komplexierung innerhalb der Tasche untersucht. Neben Fe-Pheid *a*, das ebenfalls das im Zentrum des natürlichen Kofaktors vorhandene Fe-Atom enthält, wurden Chromophore mit Mg, Zn, Ni und Pd als Zentralmetalle bei der Rekonstitution eingesetzt. Ebenso untersucht wurde die Bindung der Zentralmetall-freien Pheide und BPheide. Fe, Mg, Zn und Ni besitzen jeweils mindestens eine freie Bindungsstelle für zusätzliche Liganden (Buchler, 1975; Brereton und Sanders, 1983a; Wiberg, 1995; Hartwich *et al.*, 1998), wohingegen die Koordinationssphäre des Pd durch die vier Tetrapyrrolstickstoffe vollständig abgesättigt ist (Buchler, 1975). Den Pheophorbiden fehlt das zentrale Koordinationszentrum. Die Rekonstitutionsergebnisse (Kapitel 3.1) zeigten, dass nur solche Mb-Komplexe isoliert werden konnten, in denen die Pigmente die Möglichkeit haben, einen zusätzlichen fünften Liganden zu koordinieren. Es wurden weder die Zentralmetall-freien Pheophorbide in der Tasche komplexiert, noch Pd-BPheid *a*. Die in nativem Mb vorhandene starke Ligandierung des zentralen Fe-Atoms von Protohäm durch His93 ist somit auch bei Mg-, Zn-, Fe- und Ni-Chl-Derivaten möglich und für die Komplexbildung erforderlich. Dies steht im Einklang mit der Selektivität von Häm- und Chlorophyll-Bindungsstellen in natürlichen Pigment-Protein-Komplexen. Durch gerichtete Mutation der Bindungsstellen wurde gezeigt, dass sich Zentralmetall-haltige Tetrapyrrole überall dort einlagern, wo ein guter Ligand wie z.B. Histidin in der Nähe des Zentralmetalls vorhanden ist. Treten an Stelle dieses nukleophilen Liganden stark raumerfüllende hydrophobe Aminosäuren, die erstens das Zentralmetall nicht koordinativ binden können und zweitens einen zusätzlichen kleinen Liganden wie H<sub>2</sub>O nicht tolerieren, so lagern sich die

Zentralmetall-freien Derivate wie (B)Phe an dieser Stelle ein (Coleman und Youvan, 1990; Kirmaier *et al.*, 1991; Shen und Vermaas, 1994; Czarnecki *et al.*, 1997).

Die Komplexierung des offenkettigen Tetrapyrrols PCB durch Mb konnte in dieser Arbeit nur in Anwesenheit von  $Zn^{2+}$  erreicht werden. Der Chromophor wird hier in seiner zyklischen Konformation unter Komplexierung eines zentralen  $Zn^{2+}$ -Ions gebunden. Der grüne Komplex wird mittels seiner starken, orangenen Fluoreszenz im nativen Gel detektiert (Abbildung 3-18). Diese ausschließliche Komplexbildung in Anwesenheit des Zentralmetalls verdeutlicht die hierdurch erreichte zusätzliche Stabilisierung des Pigment-Protein-Komplexes. Dem entgegen stehen die in der Literatur beschriebenen Komplexe von Pottwal-Mb mit Protoporphyrin IX (Breslow und Koehler, 1965), welches kein Zentralmetall enthält, und einer Vielzahl von offenkettigen Tetrapyrrolen, einschließlich PCB (Falk *et al.*, 1990b). Sowohl im Protoporphyrin-IX-Mb-Komplex als auch in den Komplexen mit den Bilinchromophoren ist die Orientierung der Pigmente dieselbe wie im natürlichen Myoglobin. Die beiden Propionsäuregruppen ragen aus der Bindungstasche heraus und nehmen die gleiche Konformation wie im Protohäm ein. Die Säuregruppe an C-13 (bzw. C-8 im Fall der Biline, dies entspricht der Position C-13 des Häms) weist nach unten, die an C-17 (bzw. dem analogen C-12 bei den Bilinen) nach oben. Somit sind die Interaktionen über Wasserstoffbrücken gewährleistet. Möglicherweise ist die Verwendung von Pottwal-Mb in diesen Fällen günstiger als das in dieser Arbeit eingesetzte Pferdeherz-Mb. Selbst bei den Pottwal-Biliverdin-Komplexen führt aber die Chelierung des Chromophors durch zugesetzte  $Zn^{2+}$ -Ionen zu stark erhöhter Stabilität des Pigment-Mb-Komplexes (Falk *et al.*, 1990a). Grundsätzlich ist die Komplexbildung zwischen Protein und Pigment in diesem Zusammenhang keine Frage der Zugänglichkeit der Bindungstasche (= kinetische Kontrolle), sondern steht lediglich in Verbindung mit der Stabilisierung des Pigments in der Tasche (= thermodynamische Kontrolle). Sobald der Chromophor in der Tasche festgehalten werden kann, sei es durch die Ligandierung des Zentralmetalls mit His93 oder/und durch die Verzahnung und Wasserstoffbrückenbindung der Propionsäuregruppen an der Peripherie der Tasche und starke hydrophobe Wechselwirkungen in der Tasche, kann ein stabiler Pigment-Protein-Komplex isoliert werden. Andernfalls wird der freie Chromophor während der Aufreinigung abgetrennt.

Periphere Substituenten wie die Acetyl-Gruppe an C-3 bei den BChl-Derivaten, deren durch die  $sp^3$ -Hybridisierung bedingte starke Raumerfüllung an den Kohlenstoffatomen C-7/8 oder der im Vergleich zum Vinyl-Substituenten des Protohäms ebenfalls sterisch anspruchsvollere Ethylrest an C-8 bei den Chl-Derivaten (s. Abbildung 3-1) haben keinen wesentlichen

Einfluss auf die Bildung der zugehörigen Pigment-Mb-Komplexe. Das stark hydrophobe Innere der Bindungstasche erwies sich im Bezug auf die Substituenten an den Ringen A und B als wenig selektiv und sogar polarere Gruppen wie die 3-Acetyl-Gruppe oder die Carbonyl-Sauerstoffe der Bilin-Chromophore führen zu keiner Inhibition der Komplexbildung. Falk *et al.* (1990b) konnten allerdings beobachten, dass durch die Polarität der Lactam-Gruppen der Bilin-Chromophore die Komplexbildungskonstante dieser Komplexe um eine Größenordnung niedriger ist als die des korrespondierenden Pterobilin-Typ-Komplexes. Bei den Pterobilin-Typ-Pigmenten sind die Lactam-Gruppen in den die Propionsäuren tragenden Ringen lokalisiert und ragen damit aus der Bindungstasche heraus. Verantwortlich für dieses unterschiedliche Komplexbildungsverhalten ist die den Ringen A und B benachbarte stark lipophile Umgebung im Inneren der Bindungstasche (Ile99 und Leu104) (Kendrew *et al.*, 1960; Phillips, 1980). Die im Vergleich mit nativem Mb und Zn-Pheid-*a*-Mb bei der Denaturierung mit Guanidin beobachtete geringere Stabilität des Mb-Komplexes mit Zn-BPheid *a* spricht ebenfalls für einen deutlichen Einfluss der Substituenten an den Ringen A und B auf die Komplexbildung.

Veränderungen der Pigmente an der der Außenseite der Bindungstasche zugewandten Seite beeinflussen die Komplexbildung in unterschiedlicher Weise. Während der Biosynthese der Chlorophylle wird die Propionsäuregruppe an C-13 von Protoporphyrin IX zunächst methyliert und dann Teil des isozyklischen Rings E (Leeper, 1991). Diese Modifikation beeinträchtigt die Komplexbildung nicht. Sowohl Chl- als auch BChl-Derivate konnten in guter Ausbeute in die Bindungstasche eingelagert werden, obwohl im nativen Myoglobin die Propionsäure an C-13 über eine Wasserstoffbrücke mit Lys45 interagiert und diese Interaktion beim isozyklischen Ring nicht mehr vorhanden ist. Eine Substitution der freien Säuregruppe an C-17<sup>3</sup> durch den langkettigen Phytol-ester hingegen führt zur Inhibition der Komplexbildung. Dies steht im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Boxer und Wright, 1979; Wright und Boxer, 1981). Ursache hierfür ist vermutlich die starke Raumerfüllung dieses Substituenten, der ein Eindringen des Pigments in die Bindungstasche durch Verzahnung an der Peripherie der Tasche unmöglich macht. Außerdem würde der stark hydrophobe, unpolare Phytol-Rest bei einer Einlagerung des Pigments in die Tasche nach außen in die wässrige und damit stark hydrophile, polare Umgebung ragen, was thermodynamisch äußerst ungünstig ist.

### 3.6.2 Bindungssituation des Pigments

Da bisher keine Kristallstruktur eines Chlid-Myoglobin-Komplexes existiert (Boxer *et al.*, 1982), kann lediglich aus den spektralen Eigenschaften der Komplexe auf die Bindungssituation der Pigmente in der Häm-Bindungstasche geschlossen werden. Einen wesentlichen Beitrag liefern dabei die CD-Spektren der Komplexe im Vis-NIR-Bereich (Abbildung 3-14). Sowohl die Soret-Übergänge als auch die Q<sub>x</sub>- und Q<sub>y</sub>-Übergänge der Pigmente im Protein-Komplex sind sehr intensitätsstark und haben, im Gegensatz zu den Spektren der freien Pigmente in Lösungsmittel, durchweg ein positives Vorzeichen. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Spektren weisen sehr große Übereinstimmung mit den CD-Spektren der entsprechenden Pyro-Mb-Komplexe auf (Wright und Boxer, 1981). Abweichungen sind offensichtlich durch die unterschiedlichen Pigmente bedingt. Der natürliche Kofaktor von Myoglobin, das Fe-Protoporphyrin IX, zeigt, aufgrund des Fehlens chiraler Zentren, in Lösungsmittel kein CD-Signal. Erst in der Bindungstasche des Proteins ergibt sich für dieses Pigment ein intensiver, positiver Cotton-Effekt im Soret-Bereich. Er wird einem komplizierten Kopplungsmechanismus mit aromatischen Seitenketten des Proteins zugeschrieben (Hsu und Woody, 1971). Dieser Einfluss der aromatischen Seitenketten auf den Chromophor in der Bindungstasche ist offensichtlich auch der Grund für die beobachteten intensiven CD-Signale von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb. Zusammen mit dem Fehlen eines mehr oder weniger konservativen Signals mit Nullübergang vor allem im Bereich der Q<sub>y</sub>-Übergänge, was charakteristisch für Pigmentaggregate ist (Dratz *et al.*, 1966; Dratz, 1967; Sauer, 1978), deutet die Form der CD-Spektren auf 1:1-Komplexe zwischen Protein und Pigment hin, d.h. die Komplexe sind bezüglich des Pigments monomer. Gestützt wird diese Annahme zusätzlich durch die in dieser Arbeit erstmals gemessenen Resonanz-Raman-Spektren der Pigment-Mb-Komplexe (Abbildung 3-15). Die intensiven Signale der Methinbrücken der Chromophore bei 1620 cm<sup>-1</sup> bzw. 1612 cm<sup>-1</sup> sind sowohl bei Zn-BPheid *a* als auch bei Zn-Pheid *a* kennzeichnend für einen zusätzlichen, fünften Liganden am Zentralmetall (Näveke *et al.*, 1997). Das für einen Carbonyl-Substituenten sehr ungewöhnliche Signal bei 1668 cm<sup>-1</sup> im Komplex von Zn-BPheid-*a*-Mb impliziert, dass diese Gruppe frei von Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, in einer apolaren Umgebung vorliegt. Das hydrophobe Innere der Bindungstasche, in das keine Wassermoleküle eindringen, bietet der 3-Acetyl-Gruppe an Ring A eine derartige Abschirmung. Weniger, aber dennoch teilweise abgeschirmt sind auch die Keto-Carbonyle beider Pigmente am isozyklischen Ring. Eine fünffache Koordination der zentralen Zn<sup>2+</sup>-Ionen zusammen mit einer vollständig apolaren Umgebung des 3-Acetyl-Substituenten sind nur möglich, wenn Ring A tief in der Bindungstasche des Proteins lokalisiert ist.

Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Hochfeld-Regionen von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb ergänzen die Ergebnisse der CD- und Raman-Messungen. Wie bei den Mb-Komplexen der entsprechenden Pyro-Derivate (Wright und Boxer, 1981) treten hier zwei Resonanzen um -1,1 und -2,3 ppm auf (Abbildung 3-16). Diese mit II und I bezeichneten Signale wurden in Anlehnung an Shulman *et al.* (1970), Wright und Boxer (1981) und Sulc *et al.* (2003) den Methylprotonen der Aminosäure Val68 zugeordnet. Diese Aminosäure liegt in der Bindungstasche auf der gleichen Seite des Kofaktors wie das distale His64, in unmittelbarer Nähe von Ring A (Abbildung 3-7). Obwohl nicht geklärt werden konnte, woher die Satelliten bei den Signalen des Chlorin-Mb-Komplexes stammen (s. Kapitel 3.3.3), sind die beobachteten Resonanzen ebenfalls ein eindeutiger Hinweis auf die Lokalisation der Chromophore in der Häm-Bindungstasche.

### **3.6.3 Heterogenität der Pigment-Myoglobin-Komplexe**

Neben der hohen Selektivität bei der Auswahl der inkorporierten Chromophore zeigten alle Pigment-Mb-Komplexe, einschließlich des nativen Mb, eine gewisse Heterogenität. Diese wurde durch Auftrennung der Komplexe in einem nativen PAGE-System sichtbar. Die bei der Gelfiltration als homogene Bande erscheinenden Komplexe trennten sich hier in zwei Banden unterschiedlicher Intensität (Abbildung 3-18), wobei die langsamer laufende intensiver war. Ein ähnliches Phänomen wurde von Varadarajan *et al.* (1989) bei der isoelektrischen Fokussierung von rekonstituiertem menschlichem Myoglobin beobachtet. Hier wurde die zweite Bande der Entstehung reduzierten Proteins im Gel zugeschrieben. Das Molekulargewicht beider Banden entspricht dem von Myoglobin (vgl. Kapitel 3.4.2), die enthaltenen Chromophore sind im Fall von Zn-Pheid-*a*-Mb und nativem Mb identisch. Bei Zn-BPheid-*a*-Mb enthält die untere Bande allerdings wesentlich mehr stark oxidierten Chromophor, 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* (Kapitel 3.4.1). Die unterschiedliche Breite der Sedimentationskonstantenverteilungen (Abbildung 3-25) – die aus der intensiveren Bande isolierten Komplexe haben sowohl bei Zn-BPheid-*a*-Mb als auch bei Zn-Pheid-*a*-Mb ein schmaleres Profil als die Komplexe der schwächeren Bande – weist darauf hin, dass die Anzahl der möglichen Konformationen des Proteins in Bande 2 größer ist als in Bande 1. Hierdurch könnte(n) eventuell zusätzliche Ladung(en) exponiert werden, die das schnellere Laufverhalten im Gel verursachen. Gleichzeitig spricht dies für eine größere Diffusivität des Proteins, was im Fall von Zn-BPheid-*a*-Mb den Zutritt von Sauerstoff erleichtert und so zu einer stärkeren Oxidation der tief im Inneren der Bindungstasche verborgenen Kohlenstoffatome C-7/8 führt. Möglicherweise wird diese Strukturveränderung durch

reduktive Prozesse verursacht, die mit einer Oxidation des Pigments einhergehen, wesentlich ist aber vor allem die Exposition zusätzlicher Ladung(en).

Setzt man die Halbwertsbreite der Sedimentationskonstantenverteilungen in Beziehung zur Anzahl der möglichen Konformationen des Myoglobins, so nimmt die Zahl der möglichen Konformationen des Proteins in der Reihe natives Mb < Zn-BPheid-*a*-Mb < Zn-Pheid-*a*-Mb zu (Abbildung 3-25). Somit hat auch das jeweils komplexierte Pigment einen Einfluss auf die Struktur des Proteins. Je optimaler der Chromophor zur Bindungstasche passt, um so weniger flexibel ist das Protein. Dies wirkt sich ebenfalls auf die Stabilität der Komplexe aus, wie im Folgenden diskutiert wird.

### 3.6.4 Stabilität der Komplexe

Wie in Kapitel 3.5 gezeigt, ist die Stabilität der Pigment-Protein-Komplexe entscheidend von dem eingelagerten Pigment abhängig. Hinzu kommt die Art der Denaturierung, die zu unterschiedlichen relativen Stabilitäten im Vergleich mit den Mb-Komplexen führen kann. Die Denaturierung mit Guanidin zeigt, dass natives Myoglobin hier die mit Abstand größte Stabilität besitzt. Der ausgeprägt sigmoide Verlauf seiner Denaturierungskurve ( $dy/dx = -2,4$  im Wendepunkt; 50% Entfaltung bei 1,8 M Guanidin) steht im Kontrast zu den deutlich schwächer sigmoiden Kurvenverläufen der rekonstituierten Komplexe (Abbildung 3-27). Zn-Pheid-*a*-Mb ( $dy/dx = -0,6$  im Wendepunkt; 50% Entfaltung bei 1,7 M Guanidin) besitzt unter diesen Bedingungen eine mittlere Stabilität, wohingegen Zn-BPheid-*a*-Mb ( $dy/dx = -0,5$  im Wendepunkt; 50% Entfaltung bei 1,5 M Guanidin) ähnlich schnell in den entfalteten Zustand übergeht wie Apo-Mb ( $dy/dx = -0,5$  im Wendepunkt; 50% Entfaltung bei 1,5 M Guanidin). Die Steilheit der Denaturierungskurven ist zugleich ein Maß für die kooperativen Wechselwirkungen zwischen Protein und Chromophor. Die für den natürlichen Kofaktor Protohäm optimierte Bindungstasche mit den zugehörigen Wechselwirkungen zwischen Pigment und Protein schützt offensichtlich das Protein vor vorzeitiger Denaturierung. Durch seine kompakte Struktur und die damit geringen molekularen Abstände sind beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen hier besonders stabil, bzw. das native Protein ist für die Ausbildung eben dieser Wasserstoffbrücken optimiert. Zn-Pheid *a* scheint unter diesen Bedingungen das Protein ebenfalls gut zu stabilisieren, wenn auch nicht ganz so gut wie der natürliche Kofaktor. Grund hierfür ist wahrscheinlich der sterisch anspruchsvollere Ethyl-Substituent an Ring B, der bei Protohäm durch einen Vinyl-Substituenten, der zudem  $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen kann, ersetzt ist. Die polare Acetyl-Gruppe am tief im Inneren der lipophilen Bindungstasche verborgenen Ring A zusammen mit der sterisch ungünstigen

Situation an der Einfachbindung zwischen C-7/8 in Ring B von Zn-BPheid *a* ist offensichtlich der Grund für die geringe Stabilität von Zn-BPheid-*a*-Mb gegenüber Guanidin. Die Tasche ist hier verzerrt und deshalb wahrscheinlich zugänglicher als beim nativen Komplex. Dadurch kann Guanidin leichter und damit schneller eindringen und die Pigment-Protein-Wechselwirkungen zerstören.

Bei der Rekonstitution von Apo-Mb mit Bilin-Chromophoren konnte gezeigt werden, dass sich die Komplexbildungskonstante um etwa Faktor 10 erhöht, wenn die polaren Lactam-Gruppen nach außen aus der Bindungstasche heraus ragen (Falk *et al.*, 1990b). Polare Gruppen in der Tasche wirken sich somit ungünstig auf die Stabilität der Mb-Komplexe aus. Dies tritt besonders unter Einfluss eines starken Denaturierungsmittels wie Guanidin hervor, welches sowohl mit unpolaren als auch mit polaren Gruppen in Interaktion tritt. In diesem Zusammenhang könnte diskutiert werden, dass von vorneherein ein Gleichgewicht zwischen intaktem Pigment-Protein-Komplex und Apo-Mb mit freiem Chromophor vorhanden ist und dass während der Denaturierung das Apo-Mb laufend aus dem Gleichgewicht entfernt wird und das Guanidin gleichzeitig den freien Chromophor an einer Einlagerung in die Tasche hindert. Dies würde die starke Ähnlichkeit der Guanidin-Denaturierungskurven von Zn-BPheid-*a*-Mb und Apo-Mb erklären.

Bei der Hitzedenaturierung der Pigment-Mb-Komplexe ist Zn-BPheid-*a*-Mb erstaunlicherweise ebenso stabil wie natives Mb und Zn-Pheid-*a*-Mb ist geringfügig instabiler (Abbildung 3-28). Apo-Mb geht auch hier schon sehr schnell in den entfalteten Zustand über und zeigt den für „normale“ Kofaktor-freie Proteine sigmoiden Verlauf der Denaturierung. Auch die Denaturierungstemperatur von ca. 62 °C ( $E_{50}$ ) entspricht den Werten der Literatur (Mohney *et al.*, 2000). Der stabilisierende Einfluss des Pigments auf das Protein wird durch die schnelle Entfaltung des Kofaktor-freien Apoproteins gegenüber den Pigment-Protein-Komplexen deutlich. Ebenso deutlich wird, dass je nach Art und Weise der Denaturierung unterschiedliche Entfaltungsmechanismen bestehen (Moore und Pettigrew, 1990; Staniforth *et al.*, 1998; Panick *et al.*, 1999). Die erhöhte Beweglichkeit des Proteins unter der Hitzeeinwirkung und die damit verbundene Zerstörung von intramolekularen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen führt bei Apo-Mb trotz seiner kompakten, dem nativen Zustand ähnlichen Struktur (Griko *et al.*, 1988; Hughson *et al.*, 1990; Cocco *et al.*, 1992; Kiefhaber und Baldwin, 1995) zu schneller Entfaltung. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Kofaktor und Protein – die bei thermischer Denaturierung zunächst mit der Temperatur steigen (bis 50 °C) – können bei dem Kofaktor-freien Apo-Mb nicht stabilisierend wirken. Selbst der bei Guanidin-Denaturierung „schlechte“ Kofaktor Zn-BPheid *a* hat unter thermischen Bedingungen eine stark stabilisierende Wirkung auf das

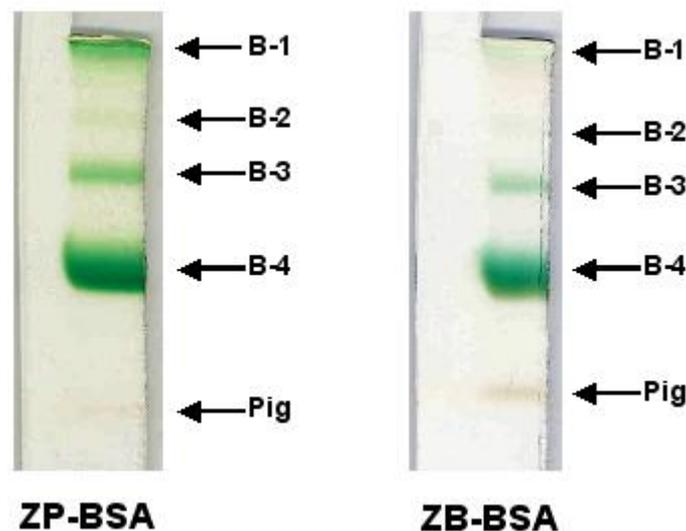
Protein. Womöglich fallen bei hohen Temperaturen kleine Strukturunterschiede nicht mehr so sehr ins Gewicht und es spielen hier vorrangig das  $\pi$ -System und das Zentralmetall eine Rolle. Durch die Temperaturdenaturierung konnte außerdem gezeigt werden, dass die aus den verschiedenen Banden der nativen PAGE eluierten Komplexe eine deutlich unterschiedliche Stabilität aufweisen. Die Komplexe aus den unteren Banden sind in allen Fällen instabiler als die aus den oberen Banden. Besonders stark tritt dies bei den beiden künstlichen Mb-Komplexen in Erscheinung (Abbildung 3-28). Auch wenn nicht endgültig geklärt werden konnte, worin der Unterschied der Komplexe aus den beiden Banden besteht, so sind die unterschiedlichen Stabilitäten ein weiterer Hinweis auf partiell divergierende Konformationen des Proteins. Das Protein der unteren Banden ist offensichtlich diffuser und kann eine größere Anzahl von Konformationen einnehmen, die untereinander nur durch geringe energetische Barrieren getrennt sind. Dies führt dann zu einer größeren Labilität unter den Bedingungen der Hitzedenaturierung.

Die Selektivität der Pigmentbindung sowie die unterschiedliche Stabilität der verschiedenen Pigment-Mb-Komplexe sind ein anschauliches Beispiel für die in der Natur entwickelten spezifischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Kofaktoren. Diese treten nicht nur bei den substratspezifischen Enzymreaktionen sondern auch bei den auf präzise Art und Weise aufeinander abgestimmten Elektronen- und Energieübertragungsmechanismen in den Protein-Kofaktor-Komplexen von Photosynthese und Atmungskette in Erscheinung. Die im folgenden Kapitel beschriebenen Komplexe zwischen Serum Albumin und Chl-Derivaten illustrieren, wie auch bei diesen künstlichen Komplexen kleinste Veränderungen der Kofaktoren deren Bindung beeinflussen.

## 4 Charakterisierung der Pigment-Albumin-Komplexe

### 4.1 Präparation und Reinigung

Die in dieser Arbeit hauptsächlich (s. Kapitel 5) diskutierten Komplexe zwischen Zn-Pheid *a* / Zn-BPheid *a* und BSA wurden wie in Kapitel 2 erläutert hergestellt. Bei der zur Reinigung verwendeten präparativen nativen Gelelektrophorese ergab sich das in Abbildung 4-1 gezeigte Bandenmuster. Neben einem geringen Anteil an vorauslaufendem freiem Pigment (Pig) konnten jeweils vier Banden (B-1 – B-4) unterschieden werden, wobei Bande 2 grundsätzlich sehr schwach ausgebildet war. Versuche, in denen an Stelle von Puffer-II Puffer-I verwendet wurde und somit kein Triton-X-100 im Reaktionsansatz vorhanden war, führten ebenfalls zur Ausbildung der Banden 2 bis 4, Bande 1 war in diesen Fällen nicht sichtbar. Da bei der Verwendung von Puffer-II eine größere Ausbeute erreicht wurde und die Absorptionsspektren beider Rekonstitutionsansätze jeweils identisch waren, wurde das System mit Puffer-II bevorzugt.

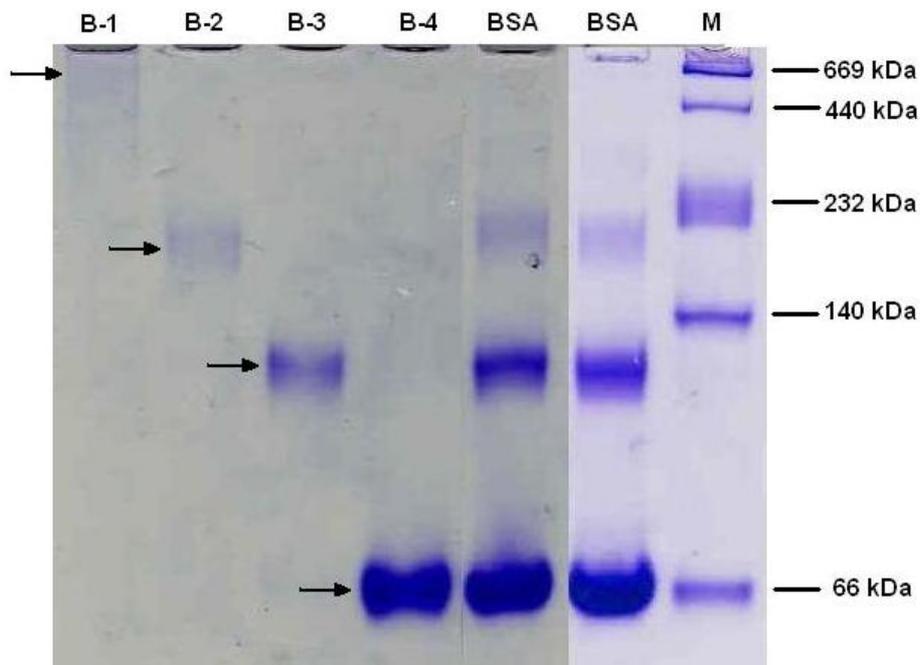


**Abbildung 4-1.** Ausschnitte aus den bei der Aufreinigung von Zn-Pheid-*a*-BSA (ZP-BSA) und Zn-BPheid-*a*-BSA (ZB-BSA) verwendeten präparativen nativen Gelen, weitere Erläuterungen im Text.

### 4.2 Größenanalyse der Komplexe

Zur Charakterisierung der nach der Elution aus den einzelnen Banden erhaltenen Komplexe und um auszuschließen, dass die im nativen Gelsystem beobachteten Banden im Gel selbst entstanden, wurden die eluierten Proben wiederum durch native Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 4-2). Hierbei zeigte sich einerseits, dass die einzelnen Komplexe in Lösung und in

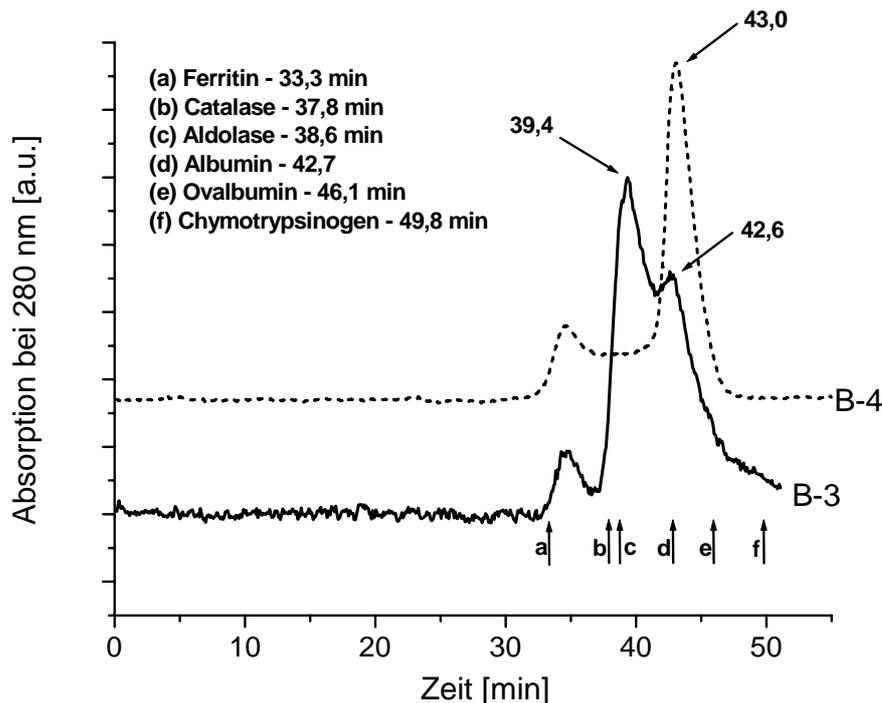
der Gelmatrix stabil waren, andererseits wurde deutlich, dass die Ursache für die Ausbildung der verschiedenen Banden vornehmlich im Protein zu suchen waren, da auch bei nativem BSA die Banden 2-4 auftreten. Lediglich Bande 1 ist bei nativem BSA ebenso wie bei der Rekonstitution unter Verwendung von Puffer-I nicht sichtbar. Der Vergleich mit einem zusätzlich aufgetragenen nativen Marker ließ darauf schließen, dass es sich bei den Banden 2, 3 und 4 jeweils um trimeres (198 kDa), dimeres (132 kDa) und monomeres (66 kDa) Protein handelte.



**Abbildung 4-2.** Native analytische PAGE (8%), gefärbt mit Coomassie-Blau, mit den aus den Banden 1 – 4 aus Abbildung 4-1 eluierten Komplexen von Zn-Pheid-*a*-BSA, nativem BSA und nativem Marker (M).

Zur Größenanalyse der einzelnen Komplexe wurden diese weiterhin durch Gelfiltrationschromatographie untersucht. Abbildung 4-3 zeigt die Elutionsprofile der Komplexe aus den Banden 3 und 4. Trägt man den Logarithmus des Molekulargewichts gegen die Zeit auf, so ergibt sich für Bande 4 eindeutig die Zuordnung zu einem Albumin-Monomer (66 kDa), während Bande 3 eindeutig einem Albumin-Dimer (132 kDa) zugeordnet werden kann. Der im Elutionsprofil von Bande 3 auftretende zweite Peak von geringerer Intensität bei 42,6 Minuten entspricht einem Albumin-Monomer. Dies bedeutet, dass das Dimer auf der Säule weniger stabil ist als im nativen Gel und in Monomere zerfallen kann. Das Elutionsprofil des Komplexes aus Bande 2 (nicht gezeigt) glich bis auf das Überwiegen des für das Monomer charakteristischen Peaks dem von Bande 3. Ein Trimer konnte somit nicht detektiert werden,

vermutlich zerfällt dieses zu leicht. Der „Komplex“ aus Bande 1 zeigte während der Gelfiltration keine messbare Absorption  $>250$  nm und konnte somit in seiner Größe nicht näher bestimmt werden. Da die zugehörige Bande im nativen Gel nur auftritt, wenn Triton-X-100 im Rekonstitutionsansatz vorhanden ist (vgl. Kapitel 4.1), handelte es sich hierbei vermutlich um freies Pigment in Tritonmicellen, welche aufgrund ihrer Apolarität bei der Elektrophorese immobilisiert sind und während der Gelfiltration so stark verdünnt wurden, dass eine Absorption nicht mehr detektiert werden konnte.



**Abbildung 4-3.** Elutionsprofile der aus den Banden 3 (—) und 4 (----) eluierten Zn-Pheid-*a*-BSA-Komplexe während der Gelfiltration. Gezeigt ist jeweils das Chromatogramm mit der Detektionswellenlänge 280 nm. Die Elutionsprofile bei einer Detektion bei 666 nm (nicht gezeigt) entsprechen den hier abgebildeten, es wurden somit jeweils die Pigment-Protein-Komplexe detektiert.

Das Vorhandensein von Aggregaten in Lösungen von Serumalbuminen ist seit langem bekannt. Neben höher aggregierten Formen wurden vor allem Dimere beschrieben, die, wie auch hier beobachtet, zum Teil in Monomere zerfallen (Pedersen, 1962; Squire *et al.*, 1968). Es wird angenommen, dass die Dimerenbildung durch Cys34 verursacht wird, welches die einzige freie Sulfhydrylgruppe in BSA und HSA darstellt (Peters, 1985).

Die bei der Präparation der Pigment-Albumin-Komplexe verwendete präparative native PAGE hatte neben ihrer generellen Aufreinigungsfunktion vor allem den Zweck, das im Puffer vorhandene ungeladene Detergens abzutrennen. Das Auftreten der oben beschriebenen Bande 1 während der Elektrophorese deutet darauf hin, dass das „freie“ Detergens abgetrennt

wurde. Unklar bleibt jedoch, ob im Pigment-Protein-Komplex eventuell einzelne Detergensmoleküle gebunden sind, was aufgrund der hohen Affinität der Serumalbumine für Fettsäuren und ähnliche Kohlenwasserstoffketten (Ray *et al.*, 1966; Reynolds *et al.*, 1967; Spector *et al.*, 1969) durchaus möglich wäre. Da die Bindung dieser Liganden zu geringen Konformationsveränderungen des Proteins führen kann (Reynolds *et al.*, 1967), könnte die, vor allem bei den Zn-BPheid-*a*-BSA-Komplexen beobachtete, deutlich höhere Ausbeute damit zusammenhängen. Durch die Bindung eines oder mehrerer Detergensmoleküle würde somit die Struktur des Proteins in Richtung einer besseren Bindung der BChl-Derivate verändert.

Im Fall der Zn-Pheid-*a*-BSA-Komplexe stimmte das aus den Absorptionsspektren (nicht gezeigt) ermittelte Verhältnis von Protein zu Pigment bei den Präparationen mit und ohne Triton überein. Somit kann hier davon ausgegangen werden, dass dieser Komplex keine zusätzlichen Triton-Moleküle enthält, da diese einen Absorptionsanstieg um 280 nm verursachen und damit einen höheren Proteinanteil vortäuschen würden.

### 4.3 Pigment-Protein-Verhältnis

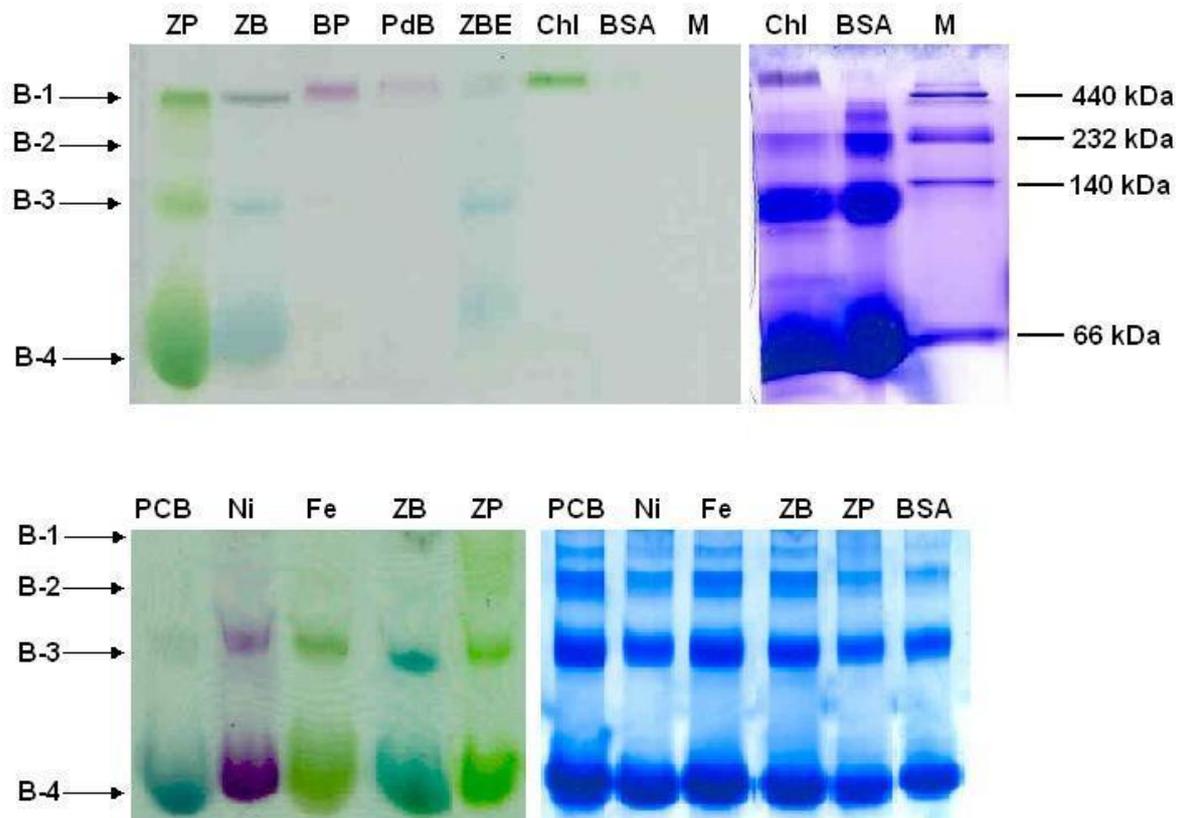
Da die monomeren BSA-Pigment-Komplexe erst nach der Auftrennung über die native PAGE erhalten werden konnten, war es in diesem Fall unmöglich, die Extinktionskoeffizienten der Pigmente im proteingebundenen Zustand durch einfache Titration des Proteins im Überschuss mit dem jeweiligen Pigment, so wie bei den Myoglobin-Komplexen, zu bestimmen. Stattdessen wurde versucht, das Pigment vollständig aus dem monomeren BSA-Komplex zu extrahieren, um im Anschluss daran eine quantitative Bestimmung durchzuführen und diese in Relation zu der getrennt bestimmten Proteinmenge zu setzen. Aufgrund der geringen Mengen an Komplex war bei der Extraktion mit einem relativ großen Fehler zu rechnen. Da auch Proteinbestimmungen im Durchschnitt mit einem ca. 20-prozentigen Fehler behaftet sind, ist der Gesamtfehler relativ groß. Demnach ist das Verhältnis von BSA zu Zn-Pheid *a* ca.  $1,5 (\pm 0,5) : 1$ . Der Vergleich der Intensitäten der für das Protein charakteristischen Absorption um 280 nm in den normierten (s. Legende) Absorptionsspektren von Zn-Pheid-*a*-BSA und Zn-BPheid-*a*-BSA (Abbildung 4-6) macht deutlich, dass das Protein-Pigment-Verhältnis in letzterem Komplex ca. das Doppelte, d.h. ca.  $3 (\pm 1) : 1$  betrug. Dies ist ein Maximalwert, er gilt nur unter der Annahme, dass dieser Komplex keine Detergensmoleküle gebunden hat, welche einen im Vergleich zu Zn-Pheid-*a*-BSA höheren Proteinanteil suggerieren würden (s. oben). Auf eine gesonderte Extraktion des Zn-BPheid-*a*-BSA-

Komplexes wurde aufgrund des relativ hohen Anteils an oxidiertem Pigment, für das kein Extinktionskoeffizient bekannt ist, verzichtet.

#### 4.4 Selektivität der Pigmentbindung

Neben den zur Untersuchung der Photochemie in dieser Arbeit hergestellten Komplexen von BSA mit Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* wurden weitere Tetrapyrrolchromophore auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht. Von vorrangigem Interesse war hierbei vor allem die Bildung monomerer Proteinkomplexe mit den Pigmenten. In Abbildung 4-4 sind die Ergebnisse dieser Rekonstitutionen anhand mehrerer Ausschnitte aus analytischen nativen Gelen zusammengefasst. Monomere Pigment-Protein-Komplexe bildeten demnach die dem Zn-BPheid *a* verwandten Chromophore Ni-BPheid *a* und Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a*. Die diesen ebenfalls stark verwandten Pigmente Pd-BPheid *a* und BPheid *a* konnten nicht an monomeres BSA gebunden werden. Ebenso wenig gelang die Darstellung eines Chl-*a*-BSA-Komplexes in monomerer Form. Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein, wonach Komplexe von Chl *a* mit BSA, HSA und Ovalbumin nur in Form hochaggregierter Polymere dargestellt werden konnten (Tombacz und Vozary, 1980; Inamura *et al.*, 1983; Shibata *et al.*, 1986; Shibata *et al.*, 1987). Die in diesen Komplexen gebundenen Chlorophylle sind zudem überwiegend in aggregierter Form gebunden (Squire *et al.*, 1968; Semichaevskii, 1975b; Tombacz und Vozary, 1980; Inamura *et al.*, 1983; Shibata *et al.*, 1986). Ein Komplex von dem mit Zn-Pheid *a* verwandten Fe-Pheid *a* mit BSA in monomerer Form konnte ebenso beobachtet werden wie die Komplexbildung des offenkettigen Tetrapyrrols PCB durch monomeres BSA. Letzteres steht im Einklang mit den beschriebenen Komplexen von Bilirubin und Biliverdin mit HSA und BSA (Blauer und King, 1970; Blauer und Harmatz, 1972; Blauer und Wagniere, 1975; Jori *et al.*, 1980; Lightner *et al.*, 1986).

In den folgenden Kapiteln sollen die zur Pigmentbindung führenden Eigenschaften der Komplexe anhand ihrer Absorptionsspektren vertiefend diskutiert werden. Mit Ausnahme der Spektren von Zn-Pheid-*a*-BSA und Zn-BPheid-*a*-BSA sind die abgebildeten Spektren direkt den nativen Gelen entnommen und wurden bei Bedarf geglättet. Die Spektren von Zn-Pheid-*a*-BSA und Zn-BPheid-*a*-BSA in Lösung unterschieden sich nicht von den Spektren der Komplexe in der Gelmatrix.



**Abbildung 4-4.** Native PAGE (12%) der untersuchten Pigment-BSA-Komplexe. Gezeigt sind jeweils ungefärbte Ausschnitte (links) im Vergleich mit im Anschluss mit Coomassie-Blau gefärbten Ausschnitten (rechts). (ZP) Zn-Pheid-*a*-BSA, (ZB) Zn-BPheid-*a*-BSA, (BP) BPheid *a* mit BSA, (PdB) Pd-BPheid *a* mit BSA, (Chl) Chl *a* mit BSA, (PCB) PCB-BSA, (Ni) Ni-BPheid-*a*-BSA, (Fe) Fe-Pheid-*a*-BSA, (BSA) natives BSA, (M) nativer Marker.

#### 4.4.1 Einfluss des Zentralmetalls

Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass monomere Komplexe zwischen BSA und Zn-(B)Pheid *a*, Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a*, Ni-BPheid *a* und Fe-Pheid *a* dargestellt werden konnten, erscheint es verwunderlich, dass die verwandten Pigmente Pd-BPheid *a* und BPheid *a* keine Komplexe mit dem Protein bildeten. Im Unterschied zu den erstgenannten Pigmenten besitzen sie allerdings entweder kein Zentralmetall oder das Zentralmetall (Pd), welches nur vierfach koordiniert werden kann (Buchler, 1975; Wiberg, 1995; Hartwich *et al.*, 1998) und somit durch die vier Tetrapyrrolstickstoffe vollständig abgesättigt ist. Zn, Ni und Fe dagegen haben die Möglichkeit, bis zu sechs Liganden in ihre Koordinationssphäre aufzunehmen (Wiberg, 1995; Hartwich *et al.*, 1998). Die von Wardell *et al.* (2002) publizierte Kristallstruktur von Methäm-HSA zeigt eindeutig, dass das in einer hydrophoben Tasche des Proteins gebundene Fe-Protoporphyrin IX durch den Sauerstoff der Hydroxyl-Gruppe von Tyr161 penta-

koordiniert wird. Dies scheint allerdings nur eine von insgesamt fünf wichtigen Interaktionen des Chromophors mit dem Protein zu sein. Die Aminosäuren Ile142, Tyr138, His146 und Lys190 übernehmen unter anderem die Funktionen von Wasserstoffbrückenbildnern zu den Propionsäuregruppen des Chromophors. Hinzu kommen hydrophobe Wechselwirkungen in der Tasche, in die das Pigment eingelagert ist. Der Sequenzvergleich von HSA und BSA (Abbildung 4-5) macht deutlich, dass bis auf Lys190, welches in BSA durch Leu190 ersetzt ist, beide Proteine an diesen Schlüsselpositionen die gleichen Aminosäuren besitzen. Aufgrund der 75-prozentigen Sequenzhomologie beider Proteine (Peters, 1985) bleibt anzunehmen, dass die Ligandenbindungsstellen in ähnlicher Form ausgebildet sind.

	131	141	151	161	171
HSA -	EETFLKK <b>Y</b> LY	E <b>I</b> ARR <b>H</b> PYFY	APELLFFAKR	<b>Y</b> KAAFTECCQ	AADKAACLLP
BSA -	EKKFWGK <b>Y</b> LY	E <b>I</b> ARR <b>H</b> PYFY	APELLYYANK	<b>Y</b> NGVFQECCQ	AEDKGACLLP
	181				
HSA -	KLDEL <b>R</b> DEG <b>K</b>				
BSA -	KIETMREK <b>V</b> L				

**Abbildung 4-5.** Ausschnitt der Aminosäuresequenzen von HSA und BSA im Bereich von Position 131 bis 190 (aus Carter und Ho (1994)). Die im Text diskutierten Reste sind fett hervorgehoben.

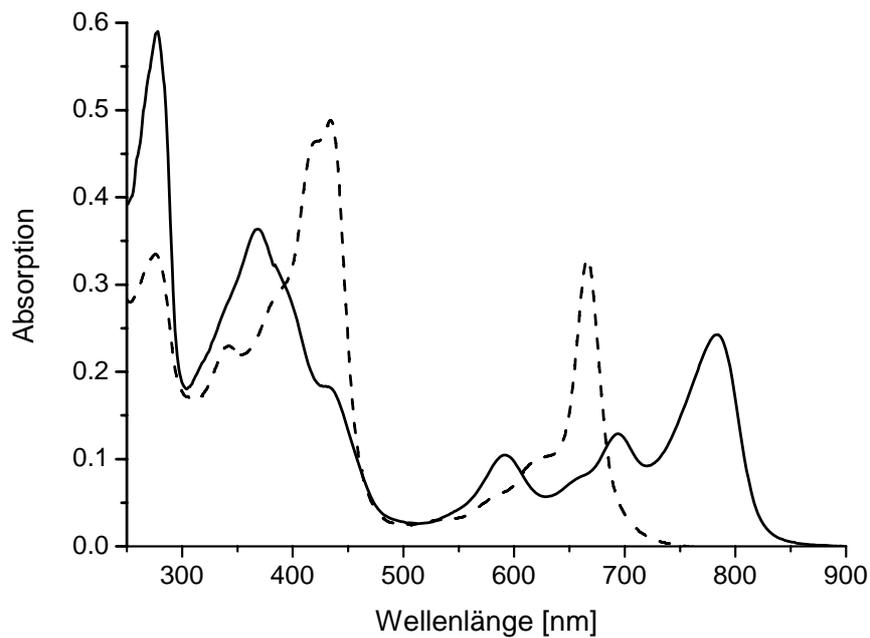
Die von Wardell *et al.* (2002) beschriebene Bindungsstelle für Fe-Protoporphyrin-IX in HSA ist nur eine von zahlreichen Ligandenbindungsstellen (Spector *et al.*, 1969; Carter *et al.*, 2005) und ist nicht identisch mit den Hauptbindungspositionen I and II, die in der von He und Carter (1992) veröffentlichten Kristallstruktur sichtbar waren. Bei der Evaluation photodynamisch aktiver cyclischer Tetrapyrrolfarbstoffe spielen gerade letztere eine entscheidende Rolle, da die Bindung der Farbstoffe sowohl an Position I als auch an Position II erfolgen kann, wobei die Bindung an Position II mit erhöhter photodynamischer Aktivität verbunden ist (Moan *et al.*, 1985; Pandey *et al.*, 1996; Pandey *et al.*, 1997; Tsuchida *et al.*, 1997; Dougherty *et al.*, 2002). Beide Orte weisen neben den die Taschen bildenden hydrophoben Aminosäuren jeweils zwei nukleophile Aminosäuren auf (I: Lys199 und His242, II: Arg410 und Tyr411, aus He und Carter (1992)), die wiederum in der Lage wären, an ein Zentralmetall zu koordinieren. Bis auf den Ersatz von Lys199 durch die funktionell sehr ähnliche, ebenfalls einen zweiten Aminosubstituenten tragende Aminosäure Arg199 in BSA sind diese nukleophilen Aminosäuren in beiden Proteinen konserviert. Neben hydrophoben Wechselwirkungen in den Proteintaschen sind somit vor allem polare Interaktionen des gebundenen Liganden mit den benachbarten funktionellen Gruppen der Aminosäuren für die Bindung erforderlich. Eine besondere Rolle spielt offensichtlich auch im

Fall von BSA die Koordination eines nukleophilen AS-Liganden an das Zentralmetall der Tetrapyrrolchromophore, da Chromophore, bei denen diese Koordinationsmöglichkeit nicht gegeben ist, keine isolierbaren Komplexe mit BSA ergeben.

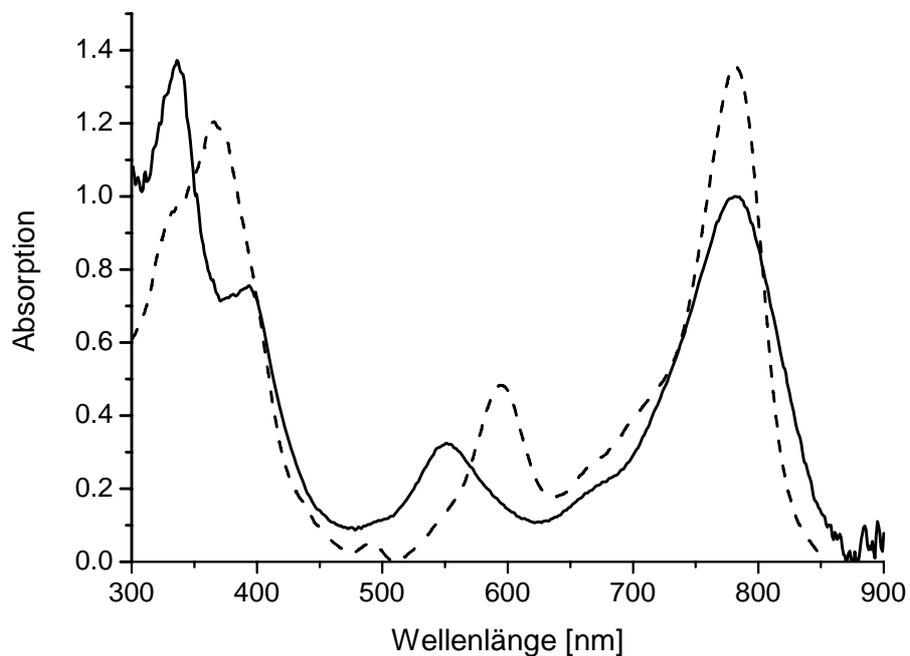
Die Analyse der Absorptionsspektren (Abbildung 4-6, 4-7 und 4-8) der in dieser Arbeit hergestellten BSA-Pigment-Komplexe liefert nur wenig Einblick in eine mögliche Koordination des Zentralmetalls.

Ein Vergleich der Spektren von Zn-BPheid-*a*-, Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid-*a*- und Ni-BPheid-*a*-BSA zeigt den deutlich hypsochromen Shift der Q<sub>x</sub>-Bande des Ni-Komplexes im Vergleich mit den beiden Zn-Komplexen. Bei Ni-Bakteriochlorinen ist die Lage der Q<sub>x</sub>-Bande mit der Koordination des Zentralmetalls korreliert. In Lösungsmittel liegt die Q<sub>x</sub>-Bande bei Tetra-koordination bei 535 nm, bei Pentakoordination bei 573 nm und bei Hexakoordination bei 598 nm (Noy *et al.*, 2000). Die Q<sub>x</sub>-Bande von Zn-BPheid *a* liegt bei Pentakoordination bei 578 nm (Hartwich *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann sich die Q<sub>x</sub>-Bande von Zn-BPheid *a* in Proteinen noch weiter verschieben: bei Pentakoordination im bakteriellen Reaktionszentrum absorbiert sie bei 595 nm (Chen *et al.*, 1995; Hartwich *et al.*, 1998). Aus den hier gezeigten Spektren geht hervor, dass die Zentralmetalle der beiden Zink-Komplexe wohl pentakoordiniert in BSA vorliegen ( $\lambda_{Q_x} = 594$  nm), wohingegen das Maximum des Q<sub>x</sub>-Übergangs von Ni-BPheid *a* in BSA eher auf eine Tetra-koordination hinweist ( $\lambda_{Q_x} = 554$  nm). Der im Vergleich zum Lösungsmittel bei Vierfachkoordination beobachtete Shift von 23 nm könnte hier sowohl durch die Proteinumgebung allgemein, aber auch durch einen Wechsel der Koordination von vier auf fünf verursacht worden sein. Eine Pentakoordination von Ni-BPhe ist grundsätzlich äußerst selten, die bei Pigmentaustausch-Versuchen im bakteriellen Reaktionszentrum beobachtete fünffach Koordinierung stellt eine Ausnahme dar (Hartwich, 1994a; Chen *et al.*, 1995). Ein Vergleich mit den in dieser Arbeit hergestellten pentakoordinierten Komplexen von Ni-BPheid *a* mit Myoglobin ( $\lambda_{Q_x} = 579$  nm) lässt eher den Schluss einer Tetra-koordination des Nickels im BSA-Komplex zu, in dem keine durch das Protein zur Verfügung gestellten Liganden mit dem zentralen Ni<sup>2+</sup> wechselwirken. Dies würde bedeuten, dass die Zn-Bakteriochlorine in BSA anders gebunden sind als die Ni-Bakteriochlorine.

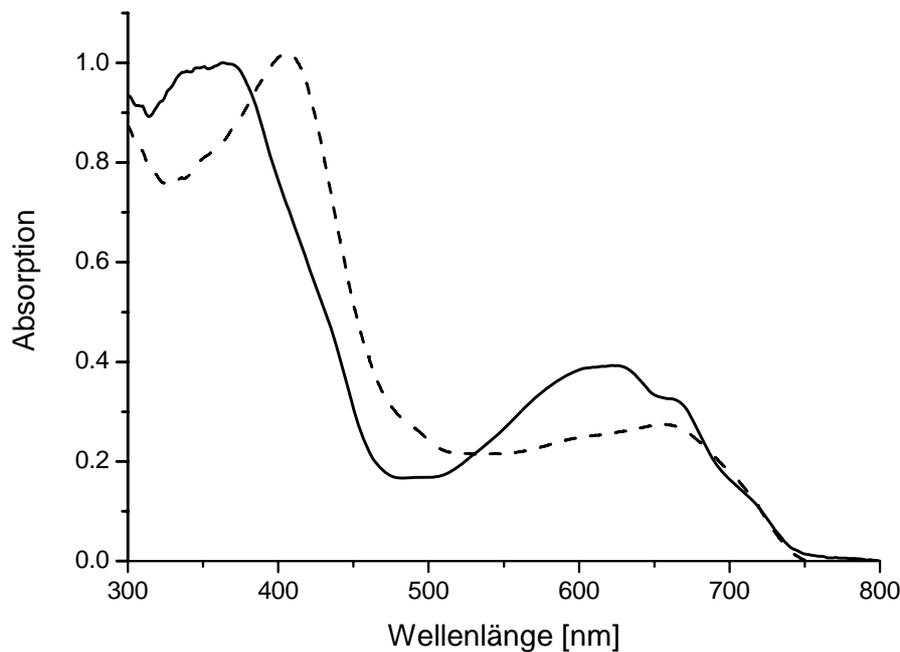
Ein weiterer Hinweis hierauf ist die Struktur der Soret-Bande: im Fall von Ni-BPheid-*a*-BSA sind der B<sub>y</sub>- und der B<sub>x</sub>-Übergang klar getrennt, während bei Zn-BPheid-*a*- und Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid-*a*-BSA diese beiden Übergänge im Spektrum nicht deutlich getrennt sind (Abbildung 4-6 und 4-7).



**Abbildung 4-6.** Absorptionsspektren der monomeren Komplexe von Zn-Pheid-*a*-BSA (----) und Zn-BPheid-*a*-BSA (—). Die Spektren wurden auf einer  $\nu$ -Skala (vgl. Kapitel 3.2) auf die gleiche Fläche von 300-900 nm normiert und dann in die  $\lambda$ -Skala transkribiert.



**Abbildung 4-7.** Absorptionsspektren der monomeren Komplexe von Ni-BPheid-*a*-BSA (—) und Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid-*a*-BSA (----). Die Spektren sind auf die Fläche von 300-900 nm normiert.



**Abbildung 4-8.** Absorptionsspektren der monomeren Komplexe von PCB-BSA (—) und Fe-Pheid-*a*-BSA (---). Die Spektren sind auf die Fläche von 300-800 nm normiert.

Bei den BSA-Komplexen der Zn- und Fe-Chlorine ist durch die Analyse der Absorptionsspektren kein Rückschluss auf die Koordination des Zentralmetalls möglich, da bei diesen Pigmenten der  $Q_x$ -Übergang sehr schwach und nicht ohne Weiteres von Vibrationsbanden längerwelliger Banden unterscheidbar ist (Gouterman *et al.*, 1963; Hanson, 1991). Die Komplexierung im Protein führt hier bei Zn-Pheid *a* vor allem zu einer stark bathochromen Verschiebung des  $Q_y$ -Übergangs im Vergleich mit den Verhältnissen in Lösung und im Mb-Komplex (s. Abbildung 4-6 und Kapitel 3). Fe-Pheid *a* weist ein breites  $Q_y$ -Maximum bei 654 nm auf, was zwischen den beiden Maxima für monomeres (ca. 620 nm in MeOH) und dimeres (ca. 695 nm in MeOH,  $\mu$ -oxo-Dimer) Fe-Pheid *a* liegt (Snigula, 2003). Aus den CD-Spektren der Zn-(B)Pheid-*a*-BSA-Komplexe (Kapitel 4.5) geht hervor, dass die Pigmente trotz der stark bathochromen Verschiebung der  $Q_y$ -Bande in monomerer Form gebunden sind. Obwohl die Herstellung zyklischer Tetrapyrrolkomplexe ohne Zentralmetall mit BSA in dieser Arbeit nicht gelungen ist, sind Beispiele derartiger Pigment-HSA-Komplexe aus der Literatur bekannt (Lamola *et al.*, 1981; Moan *et al.*, 1985; Pandey *et al.*, 1996; Tsuchida *et al.*, 1997). Demnach ist die Komplexierung eines Zentralmetalls durch geeignete Aminosäurereste wohl nicht unbedingt notwendig für die Bindung des Chromophors, so dass Ni-BPheid *a* durchaus in einem vierfach koordinierten Zustand vorliegen könnte. Für eine Pentakoordination des Ni-BPheid *a* in BSA spricht allerdings, dass das ausschließlich

tetrakoordinierte Pd-BPheid *a* nicht von BSA gebunden werden konnte. Diese beiden Pigmente unterscheiden sich lediglich durch ihre Zentralmetalle. Die modellierte Überlagerung der Strukturen von Fe-Protoporphyrin-IX und Myristin in der HSA-Bindungstasche (Wardell *et al.*, 2002) spricht für starke hydrophobe Interaktionen des Proteins mit seinen jeweiligen Liganden, die in hydrophobe Taschen eingelagert werden. Möglicherweise bedingt schon einer kurzkettinge Veresterung der freien Säuregruppe an C-17<sup>3</sup> eine bessere Bindung, dies lässt zumindest der Vergleich der Absorptionsspektren von Zn-BPheid-*a*-BSA und Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid-*a*-BSA vermuten. Die deutlich schmälere Q<sub>y</sub>-Bande des Ethylesters deutet auf eine spezifischere, einheitlichere Bindungsweise dieses Chromophors hin. Grundsätzlich sind verschiedene Bindungsstellen möglich und die endgültige Lokalisation der Liganden im Protein lässt sich erst durch Auswertung einer Kristallstruktur des jeweiligen Komplexes klären.

Die Bindung von PCB an BSA wird im folgenden Kapitel diskutiert, sie kann thematisch weder Kapitel 4.4.1 noch Kapitel 4.4.2 zugeordnet werden.

#### **4.4.2 Effekte peripherer Substituenten**

Wie in Abbildung 4-4 gezeigt, konnte unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen kein monomerer Chl-*a*-BSA-Komplex hergestellt werden. Der in diesem Zusammenhang wesentliche Unterschied zwischen Chl *a* und Zn-Pheid *a* besteht in dem langkettigen Phytol ester an Position C-17<sup>3</sup>, der die freie Säuregruppe in Zn-Pheid *a* ersetzt. Die in der Literatur beschriebenen Chl-*a*-BSA-Komplexe stellen durchweg hochmolekulare Aggregate des Proteins und zumeist auch des Pigments dar (Tombacz und Vozary, 1980; Inamura *et al.*, 1983; Shibata *et al.*, 1986). Das auch in dieser Arbeit verwendete Detergens Triton-X-100 hat einen disaggregierenden Effekt auf die ebenfalls hochmolekularen Komplexe zwischen HSA und Chl *a* (Semichaeveskii, 1975a; Sivaash, 1985). Dies weist darauf hin, dass der Phytolrest durch die Proteinmoleküle eingeschlossen wird, wodurch das Pigment in der wässrigen Umgebung quasi solubilisiert wird, da es andernfalls aufgrund seiner vollständigen Unlösbarkeit in hydrophilem Medium sofort ausfallen müsste. Ist ein amphiphiles Detergens vorhanden, so löst es die Pigmente aus den Proteinenklaven und bildet die wohl stabileren Pigment-Detergens-Micellen. Somit war unter den hier verwendeten Bedingungen die Bildung der polymeren Chl-*a*-BSA-Komplexe erschwert, wobei nicht auszuschließen ist, dass die in Abbildung 4-4 sichtbare grüne Bande einem derartigen Komplex zugeordnet werden kann.

Die Bildung eines monomeren Chl-*a*-BSA-Komplexes in Detergens-freier Umgebung konnte in dieser Arbeit jedenfalls nicht realisiert werden. Grund hierfür ist offensichtlich der sehr sperrige Phytolrest, der die Einlagerung der Tetrapyrrohhälfte in eine hydrophobe Tasche des Proteins ähnlich wie bei Myoglobin sterisch behindert. Gleichzeitig macht seine starke Hydrophobizität eine derartige Bindungsweise in wässriger Umgebung unmöglich, da ja dann der lipophile Phytolrest dem hydrophilen Lösungsmittel ausgesetzt wäre. Umgekehrt scheint es aber auch nicht möglich, das Pigment in der Weise zu binden, dass nur der Phytolrest in einer hydrophoben Bindungsstelle verankert wird, während die Tetrapyrrohhälfte quasi nach außen ragt. Auch hier ist die ebenfalls ausgeprägte Hydrophobizität des zyklischen Systems hinderlich. Eine ausreichend große Tasche mit geeigneter Struktur, die die komplette Einlagerung des Pigments ermöglichte, scheint in BSA nicht vorhanden zu sein.

Allerdings war es möglich, Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a* an monomeres BSA zu binden (s. Abbildung 4-4). Der Ersatz der freien Säure an Position C-17<sup>3</sup> durch einen Ethylester stellte nur eine kleine Veränderung der Pigmenteigenschaften in Richtung zunehmender Hydrophobizität dar, und auch der sterische Einfluss eines Ethylrestes scheint tolerierbar. Das Absorptionsspektrum dieses Komplexes weist einen intensitätsstarken Q<sub>y</sub>-Übergang bei 781 nm auf, der nur geringfügig vom Maximum desselben in Zn-BPheid-*a*-BSA (783 nm) abweicht. Zusätzlich muss beachtet werden, dass diese Bande im Proteinkomplex der freien Säure verbreitert ist und die Relation von Q<sub>y</sub>- zu Soret-Maximum hier kleiner 1 ist. Normalerweise ist bei Bakteriochlorinen das umgekehrte Verhältnis die Regel (Hoff und Ames, 1991). Der Einfluss des Proteins auf die Absorptionsspektren ist demnach sehr stark. Es ist zu vermuten, dass Zn-BPheid *a* und Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a* in unterschiedlicher Weise von BSA gebunden werden und der Ethylrest die Bindungseigenschaften verbessert. Die breite Q<sub>y</sub>-Bande von Zn-BPheid *a* weist in diesem Zusammenhang auf eine heterogene Bindungsweise dieses Pigments hin, die schmale Bande des Ethylesters hingegen ist charakteristisch für eine homogene Bindungsweise. Durch Wechselwirkungen des Proteins mit dem Ethylrest wird das Pigment offensichtlich stärker fixiert und ist so in einer bestimmten Position in der Bindungstasche ausgerichtet.

Vergleicht man die Bindung von Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* durch BSA, so konnte ersteres auch in Rekonstitutionsmedium ohne Detergens gebunden werden (s. oben). Die Relation von Pigment zu Protein ist im Komplex mit dem Bakteriochlorin zudem wesentlich geringer als im Chlorin-Komplex (Abbildung 4-6). Dies deutet auf eine geringere Affinität des Proteins zu Zn-BPheid *a* hin und macht damit den Einfluss der polaren Acetyl-Gruppe an Position C-3 in diesem Chromophor deutlich. Einen weiteren Effekt hat wahrscheinlich die zwischen C-7 und

C-8 vorhandene Einfachbindung im Bakteriochlorin, die durch die zwei  $sp^3$ -hybridisierten Kohlenstoffatome eine, bezogen auf die Tetrapyrrolringebene, trans-Stellung von Methyl- und Ethylsubstituent verursacht (vgl. Abbildung 3-1). Dies hat zur Folge, dass der Raumbedarf des Chromophors an dieser Stelle größer ist.

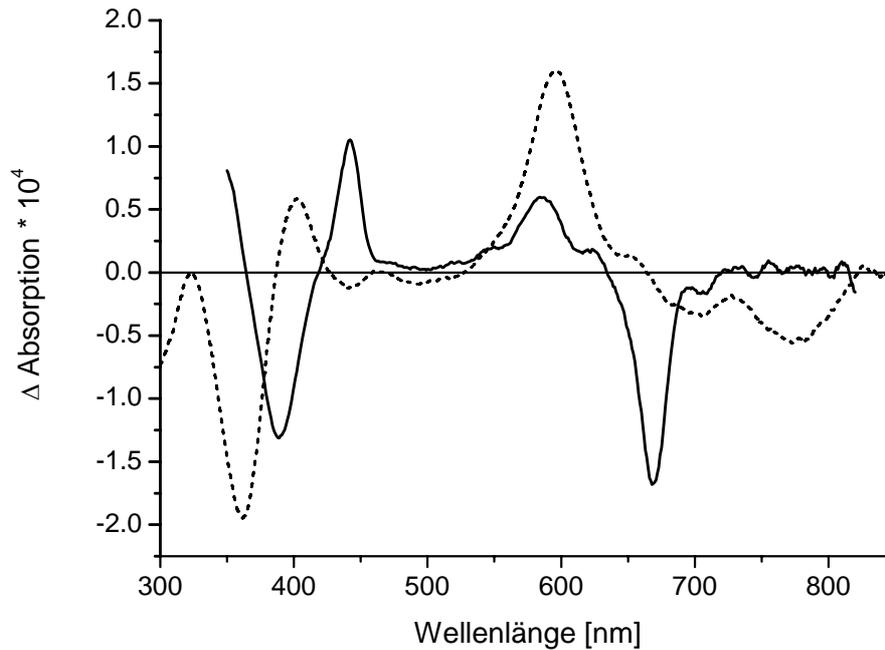
### Phycocyanobilin-BSA

Das Absorptionsspektrum des PCB-BSA-Komplexes (Abbildung 4-8) weist große Ähnlichkeit mit dem Spektrum des von Blauer und Wagniere (1975) beschriebenen Biliverdin-HSA-Komplexes auf. Die beiden Chromophore unterscheiden sich durch eine Vinyl- bzw. Ethylgruppe an C-18, sowie vor allem durch die Hybridisierung und die Substituenten der Kohlenstoffatome C-2/3. Die Maxima des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Komplexes liegen bei 364 und 622 nm, mit einer Schulter im Langwelligen bei 665 nm. Bei dem HSA-Komplex lagen die Maxima bei ca. 390 und 650 nm, auch hier wies die Soret-Bande eine weitaus höhere Intensität auf als die Bande im langwelligen Bereich. Die für den Biliverdin-Komplex diskutierte Bindung des Chromophors bestand in einer sehr spezifischen Interaktion des Proteins mit einem linkshelikal verdrehten Chromophor. Diese Drehung aus der Ebene heraus war aufgrund des durchkonjugierten Systems nicht so massiv wie im Fall von Bilirubin, welches zwei nicht konjugierte Dipyrrromethen-Hälften besitzt, und von HSA vorzugsweise in Form des rechtsgängigen Enantiomers, welches durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert ist, gebunden wird (Lightner *et al.*, 1986). Grundsätzlich unterscheiden sich wohl die Bindungstaschen der zyklischen und offenkettigen Tetrapyrrole. Letztere sind wahrscheinlich wesentlich spezifischer gebunden, da Serumalbumine in erster Linie dazu dienen, offenkettige Abbauprodukte der roten Blutkörperchen zu transportieren (Lightner und McDonagh, 1984). Die Affinität für Bilirubin ist sehr stark, mit einer Bindungskonstante von  $10^7$ - $10^8$  für das erste Bilirubin und ca.  $10^6$  für ein zweites ist die Bindung aber noch reversibel (Blauer und Wagniere, 1975; Brodersen *et al.*, 1988). Da mit dem in dieser Arbeit vorgestellten PCB-BSA-Komplex keine vergleichbaren CD-Messungen durchgeführt wurden, weil der Komplex nur im analytischen Maßstab (Mini-Gel) präpariert wurde, können über die Art der Bindung keine weiteren Aussagen getroffen werden (Blauer und Wagniere, 1975; Lightner *et al.*, 1986).

## 4.5 Einfluss des Proteins auf die CD-Spektren der Pigmente

### Zn-Pheid-*a*-BSA

Das CD-Spektrum von Zn-Pheid-*a*-BSA (Abbildung 4-9) weist intensitätsstarke Banden sowohl im Soret-Bereich als auch im langwelligen Bereich auf. Das Maximum des Q<sub>Y</sub>-Übergangs liegt bei 668 nm, was im Einklang mit dem Maximum im zugehörigen Absorptionsspektrum steht (Abbildung 4-6). Im Gegensatz zum CD-Spektrum von Zn-Phe *a* in Lösung (Furukawa *et al.*, 2000), bei dem im Soret-Bereich kein negatives Signal vorhanden ist, zeigt das Spektrum des Protein-Komplexes im Soret-Bereich sowohl ein negatives Signal (389 nm) als auch ein positives Signal (442 nm) von geringerer Intensität. Zusätzlich ist bei 584 nm eine für den Q<sub>X</sub>-Übergang charakteristische Bande sichtbar, die weder im Absorptionsspektrum des Komplexes noch im CD-Spektrum von Zn-Phe *a* in Lösung auftaucht. Die Q<sub>X</sub>-Bande von Chlorinen ist normalerweise nur im 2-Photonen-Absorptionsspektrum oder im CD-Spektrum deutlich sichtbar (Houssier und Sauer, 1970; Philipson *et al.*, 1971; Shreve und Walla, 1995). Der Vergleich des CD-Spektrums von Zn-Pheid-*a*-BSA mit dem CD-Spektrum von Zn-Phe *a*' in Lösung (Furukawa *et al.*, 2000) zeigt allerdings, bis auf die bathochrome Verschiebung sämtlicher Banden um bis zu 12 nm im Spektrum des Proteinkomplexes, große strukturelle Übereinstimmungen. Der Anteil von Zn-Pheid *a*' im BSA-Komplex beträgt jedoch nur ca. 20% (vgl. Abbildung 5-26). Der Einfluss des Proteins, das möglicherweise eine Deformation des Chromophors Zn-Pheid *a* bei dessen Bindung bedingt, führt somit zu einem ähnlichen Effekt wie die Stereochemie von Zn-Pheid *a*' in Lösung. Nach der Oktantenregel (Hesse *et al.*, 1995) können achirale Chromophore in einer asymmetrischen Umgebung ein CD-Signal aufweisen. Dies wird durch eine durch die Umgebung verursachte Änderung des Brechungsindex hervorgerufen. Einen derartigen, im Zusammenhang mit Zn-Pheid *a*, das ja nicht achiral ist, verstärkenden Effekt hat offensichtlich die Proteinumgebung in BSA. Wie die Interaktion im Einzelnen erfolgt ist nicht bekannt. Im Zusammenhang mit den BSA-Komplexen von Biliverdin und Bilirubin stellte sich heraus, dass der durch die Bindung im Protein induzierte Cotton-Effekt zusätzlich pH-abhängig ist (Blauer und Wagniere, 1975; Lightner *et al.*, 1986), was ebenfalls für einen starken Einfluss des Proteins auf die Eigenschaften der gebundenen Chromophore hinweist. Eine Interaktion aromatischer Seitengruppen des Proteins mit Zn-Pheid *a*, so wie sie im Komplex mit Myoglobin erfolgt (s. Kapitel 3), scheint bei BSA nicht vorzuliegen. Das Spektrum des Pigments im Komplex ähnelt hier viel stärker den Verhältnissen in Lösung.



**Abbildung 4-9.** CD-Spektren der Komplexe von BSA mit Zn-Pheid *a* (—) und Zn-BPheid *a* (----). Die Konzentration der Proben betrug jeweils ca. 15  $\mu\text{M}$ . Aufgrund der geringeren Sensitivität des Photomultipliers im langwelligen Bereich ab ca. 700 nm wurde das Spektrum von Zn-BPheid-*a*-BSA geglättet.

#### Zn-BPheid-*a*-BSA

Im CD-Spektrum von Zn-BPheid-*a*-BSA (Abbildung 4-9) tritt ebenfalls die  $Q_x$ -Bande besonders stark in Erscheinung. Sie liegt hier bei 596 nm, was der Lage der  $Q_x$ -Bande im Absorptionsspektrum des Komplexes nahezu entspricht (Abbildung 4-6). Im Unterschied zu den Verhältnissen in Lösung (Philipson *et al.*, 1971; Hartwich *et al.*, 1998) ist dieser Übergang positiv und von weitaus größerer Intensität als der negative  $Q_y$ -Übergang bei ca. 780 nm, der in Lösung mit positivem Vorzeichen erfolgt. Im Spektrum zusätzlich sichtbar ist eine negative Bande bei ca. 700 nm, die für ein Oxidationsprodukt, das an C-7/8 oxidierte 3-Acetyl-Zn-Pheid *a*, charakteristisch ist. Die CD-Signale im Soret-Bereich sind denen in Lösung ähnlich (Hartwich *et al.*, 1998), wobei die Intensitätsverhältnisse von positiver und negativer Bande in Lösung umgekehrt sind.

Auch aus dem CD-Spektrum von Zn-BPheid-*a*-BSA lässt sich ein deutlicher Einfluss des Proteins auf den Chromophor entnehmen. Inwieweit spezifische Interaktionen mit Aminosäureseitenketten (s. Kapitel 3.3.1) hierfür verantwortlich sind, ist bislang unklar. Die Struktur des CD-Spektrums macht lediglich deutlich, dass die Interaktion von BSA mit dem gebundenen Chromophor in anderer Weise erfolgen muss als im Komplex mit Myoglobin (vgl. Kapitel 3.3.1).

## 4.6 Zusammenfassende Diskussion

Die wichtigsten Funktionen der Serum Albumine sind, neben der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks, die Bindung und der Transport einer Vielzahl kleiner, meist hydrophober Moleküle (Peters, 1985; Carter und Ho, 1994). Hierzu stehen dem Protein verschiedene Bindungsstellen zur Verfügung, wobei die Hauptbindungsstellen in hydrophoben Taschen der Subdomänen IIA und IIIA liegen (He und Carter, 1992). Diese werden auch als Site I und Site II bezeichnet. Site I entspricht der Region in Subdomäne IIA, Site II der in Subdomäne IIIA (Pandey *et al.*, 1997). Site I besitzt die größte Affinität für das offenkettige Tetrapyrrol Bilirubin (Bos *et al.*, 1988; He und Carter, 1992), Site II ist die primäre Bindungsstelle für langkettige Fettsäuren (King, 1973). Darüber hinaus stehen diese beiden Bindungsstellen in direktem Zusammenhang mit der Wirksamkeit der bei der PDT eingesetzten Chl-Derivate. Eine Bindung dieser Chromophore an Site-II von HSA impliziert erhöhte photodynamische Aktivität (Pandey *et al.*, 1996; Tsuchida *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 1997). Das zyklische Tetrapyrrol Fe-Protoporphyrin IX wird von HSA nicht in einer der beiden Hauptbindungsstellen I oder II gebunden, sondern in einer hydrophoben Tasche der Subdomäne IB (Wardell *et al.*, 2002). Das zentrale Eisenatom wird dabei durch den Sauerstoff von Tyr161 pentakoordiniert. Ebenso wie in den Bindungsstellen I und II spielen neben der großen Zahl an hydrophoben Aminosäuren, die die Tasche bilden, spezielle hydrophile Aminosäuren wie Histidin, Tyrosin, Lysin und Arginin eine wichtige Rolle bei der Fixierung des Liganden. Dies geschieht hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den Propionsäureresten an den Kohlenstoffatomen C-13 und C-17.

Obwohl bislang keine Kristallstruktur von BSA veröffentlicht wurde, kann aufgrund der hohen Sequenzhomologie mit HSA angenommen werden, dass die Bindungstaschen in ähnlicher Weise aufgebaut sind. Die Aminosäurezusammensetzung der mit den Liganden in Form polarer Wechselwirkungen interagierenden Schlüssel-Aminosäuren ist hoch konserviert (s. Kapitel 4.4.1).

Die selektive Bindung der unterschiedlichen, in dieser Arbeit eingesetzten Tetrapyrrolchromophore an BSA lässt die im Folgenden diskutierten Rückschlüsse auf die Konstitution der Bindungstasche(n) zu.

Im Gegensatz zu Myoglobin zeigten die BSA-Komplexe keine Auffälligkeiten bei der Bindung der  $\alpha$ - und  $\alpha'$ -Epimere von Zn-Pheid  $\alpha$  und Zn-BPheid  $\alpha$ . Da die Verhältnisse beider Epimere zueinander nach der Extraktion aus den Pigment-Protein-Komplexen denen der jeweils eingesetzten Pigmentmischungen glichen, wurden die Komplexe nicht speziell in diesem Zusammenhang untersucht. BSA bindet jeweils beide Epimere (s. Abbildung 5-26 und

5-30). Die Bindungstasche(n) besitzen in der Region, die den Resten an C-13<sup>2</sup> und C-17 benachbart ist, offensichtlich eine größere Flexibilität bzw. mehr Freiraum als die Mb-Bindungstasche. Die Kristallstruktur von Methämalbumin zeigt, dass die Propionsäurereste von Fe-Protoporphyrin IX bei der Bindung an BSA, im Gegensatz zur Bindungssituation in nativem Myoglobin, auf die gleiche Seite der Tetrapyrrolringebene weisen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Rotation des Chromophors um 180 ° um dessen C-5/C-15-Achse, was die Exposition dieser Reste auf die andere Seite bewirkt (Wardell *et al.*, 2002). Ebenso wie im Fall von Myoglobin werden nur solche Chl-Derivate gebunden, die ein Zentralmetall besitzen, das neben den vier Tetrapyrrolstickstoffen mindestens einen zusätzlichen Liganden in seine Koordinationssphäre aufnehmen kann. Dies deutet auf eine Koordination des Zentralmetalls durch eine nukleophile Aminosäure, wie beispielsweise Histidin, hin. Weder Pd-BPheid *a* noch die Zentralmetall-freien (B)Pheide wurden unter den gewählten Bedingungen von BSA komplexiert. Die Absorptionsspektren von Zn-BPheid-*a*-BSA und Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid-*a*-BSA lassen aufgrund der Lage ihres Q<sub>x</sub>-Übergangs bei 594 nm (Abbildung 4-6 und Abbildung 4-7) den Rückschluss auf Pentakoordination eindeutig zu. Bei Pentakoordination im bakteriellen Reaktionszentrum liegt die Q<sub>x</sub>-Bande von Zn-BPheid *a* bei 595 nm (Chen *et al.*, 1995; Hartwich *et al.*, 1998). Eine Sonderstellung nimmt der Komplex zwischen Ni-BPheid *a* und BSA ein. Gerade bei Ni-Bakteriochlorinen ist der Q<sub>x</sub>-Übergang sehr sensitiv bezogen auf die Zahl der Liganden (Hartwich *et al.*, 1998). Die Bande bei 554 nm im BSA-Komplex liegt zwischen den Werten für Tetra- und Pentakoordination in Lösungsmittel (535 nm) und für Pentakoordination im Mb-Komplex (579 nm). Zusammen mit den im Gegensatz zu den Zn-Komplexen distinkten B<sub>y</sub>- und B<sub>x</sub>-Übergängen weist dies auf eine andere Bindungssituation des Ni-Derivats in BSA hin. Grundsätzlich liegen Ni-BPhe-Derivate nur in Ausnahmefällen, wie bspw. beim Austausch in bakterielle Reaktionszentren (Hartwich, 1994a; Chen *et al.*, 1995), fünffach koordiniert vor. Eine Tetra- und Pentakoordination ist im BSA-Komplex somit nicht auszuschließen. Dagegen spricht allerdings, dass ein stabiler Komplex zwischen dem ausschließlich tetra- und pentakoordinierbaren Pd-BPheid *a* und BSA nicht isoliert werden konnte. Ob die Zn- und Ni-BChl-Derivate die gleiche Bindungsstelle in BSA besetzen und ob diese wiederum mit einer der drei oben diskutierten Bindungsstellen identisch ist, bleibt offen. Gegen die Besetzung der der Häm-Bindungstasche in HSA analogen Tasche in BSA spricht, dass Häm nur zu den Serum Albuminen der Primaten eine hohe Affinität aufweist, wohingegen seine Affinität zu den Albuminen anderer Spezies äußerst gering ist (Peters, 1985).

Die höhere BSA-Affinität zu Zn-Chlorinen im Vergleich zu den Zn-Bakteriochlorinen (Kapitel 4.4) ist wahrscheinlich durch die polare Acetyl-Gruppe der Bakteriochlorine an C-3

bedingt, welche in einer hydrophoben Tasche ungünstig ist. Hinzu kommt der durch die  $sp^3$ -Hybridisierung von C-7/8 bedingte größere Platzbedarf der Substituenten an Ring B. Da der Zn-BPheid-*a*-BSA-Komplex nur dann isoliert werden kann, wenn die Rekonstitution in Anwesenheit von Triton-X-100 durchgeführt wird, kann diskutiert werden, dass das Detergens eine leichte Konformationsveränderung des Proteins hervorruft, wodurch die Bindung des Bakteriochlorins überhaupt erst ermöglicht wird. Eine Bindung des Detergens an das Protein ist hierbei nicht auszuschließen. Es ist bekannt, dass die Bindung von Liganden Konformationsveränderungen des Proteins hervorrufen kann (Reynolds *et al.*, 1967; Shrivastava *et al.*, 1999). Der Vergleich mit Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid-*a*-BSA lässt aufgrund der deutlich schmäleren  $Q_y$ -Absorptionsbande dieses Komplexes darauf schließen, dass der Ethylester an C-17<sup>3</sup> einen weiteren Bindungspartner für das Proteingerüst darstellt und dieses Pigment dadurch homogener, d.h. in definierterer Ausrichtung, gebunden wird. Bei Zn-BPheid *a* spricht die breite  $Q_y$ -Absorptionsbande für eine heterogene Bindung, d.h. es sind offensichtlich mehrere Ausrichtungen des Pigments in der Proteinbindungsregion möglich.

Neben dem Zentralmetall und den Substituenten der Ringe A, B,C und E ist der Substituent am Kohlenstoffatom C-17<sup>3</sup> von Ring D von besonderer Bedeutung. Ein kurzkettiger Alkylester wie in Zn-17<sup>3</sup>-Ethyl-BPheid *a* bewirkt keine Inhibition der Komplexbildung mit BSA, sondern ermöglicht offensichtlich sogar eine homogenere Bindungsweise des Chromophors (s. oben). Wird diese Position allerdings von einem Phytolrest besetzt, so können keine monomeren BSA-Komplexe mehr isoliert werden (Abbildung 4-4). In der Literatur sind Chl-BSA-Komplexe nur in Form hochmolekularer Aggregate beschrieben (Inamura *et al.*, 1983; Shibata *et al.*, 1986). Die starke Hydrophobizität des Phytolrestes und dessen sterischer Einfluss – der langkettige Alkylrest nimmt einen weitaus größeren Raum ein als ein einfaches H-Atom oder ein Ethylrest – wirken sich negativ auf die Komplexbildung aus. Entweder verhindert der langkettige Rest sterisch die Einlagerung des Tetrapyrrolmakrozyklus in eine Bindungstasche, so wie es auch für die Mb-Komplexbildung angenommen wurde (vgl. Kapitel 3), oder die Exposition des lipophilen Restes ins wässrige Lösungsmittel ist so ungünstig, dass das Pigment quasi wieder aus der Tasche herausgezogen wird, um sich in Form großer Aggregate zusammenzulagern. Bei derartigen Aggregaten ist der Lösungsmittelkontakt minimiert, somit ist diese Form für die Pigmente energetisch günstiger.

Die Bindung des offenkettigen Tetrapyrrols PCB durch BSA geschieht, im Gegensatz zur Bindung durch Mb, ohne Zusatz eines Metallsalzes. Da Serumalbumine in erster Linie dazu dienen, die Abbauprodukte – wie Bilirubin – der roten Blutkörperchen zu transportieren, ist

die Bindung wahrscheinlich wesentlich spezifischer als die der zyklischen Tetrapyrrole (Lightner und McDonagh, 1984). Bei den von Blauer und Wagniere (1975) und Lightner *et al.* (1986) beschriebenen Komplexen von HSA mit Bilirubin und Biliverdin werden diese Pigmente helikal verdreht in das Protein eingelagert. Die Bindung zwischen Bilirubin und HSA kann aufgrund der hohen Bindungskonstante von  $10^7$ - $10^8$  als sehr spezifisch eingestuft werden (McDonagh, 1979). Die Bindungsstelle von Bilirubin in HSA ist Site I (s. oben) und damit nicht identisch mit der Bindungsregion für Häm. Aufgrund der Komplexierung ohne Zentralmetall ist auch im BSA-Komplex das offenkettige Tetrapyrrol offensichtlich in anderer Weise und an anderer Position gebunden als die zyklischen Tetrapyrrole. Dies unterscheidet die BSA-Komplexe wesentlich von den Myoglobin-Komplexen, wo genau eine Bindungstasche allen Liganden zur Verfügung steht und unter den verwendeten Bedingungen auch die offenkettigen Tetrapyrrole nur in Form eines zyklischen Komplexes mit einem Zentralmetall gebunden wurden.

Bei der im folgenden Kapitel diskutierten Photoreaktivität beider Pigment-Protein-Komplexe spielt die Art der Chromophorbindung eine entscheidende Rolle. Die Koordination eines fünften, Aminosäure-Liganden an die Zentralmetalle ist für beide Komplexe charakteristisch. Kristallwasser ist allerdings nur in der Häm-Bindungstasche des HSA-Komplexes sichtbar (Wardell *et al.*, 2002). Die große Ähnlichkeit zwischen HSA und BSA lässt darauf schließen, dass auch in den Bindungstaschen von BSA Platz für Wassermoleküle besteht. Die damit verbundene leichtere Zugänglichkeit für Lösungsmittelmoleküle der Bindungstaschen von BSA könnte zu erhöhter Reaktivität bzw. geringerer Stabilität der Pigmente in BSA führen. Dem entgegen steht, dass die BSA-Bindungstasche(n) im Gegensatz zur Häm-Bindungstasche in Myoglobin nicht für den Transport von Sauerstoff optimiert sind. Dies könnte wiederum die Oxidationsempfindlichkeit der Pigmente in den BSA-Bindungstaschen herabsetzen. Grundsätzlich besitzen die Bindungsregionen beider Pigmente eine gewisse Flexibilität, was sich in der Akzeptanz bzw. Akzeptanz und Epimerisierung der  $13^2$ -Epimere äußert. Dies könnte ebenfalls zu erhöhter Reaktivität der proteingebundenen Chromophore führen.

## 5 Photochemie ausgewählter Chromophore

Die vergleichende Untersuchung der Stabilitäten der Pigmente bei Belichtung und der nachfolgend entstehenden Photoprodukte erfolgte im Hinblick auf die Verwendung dieser Pigmente bei der photodynamischen Krebstherapie (PDT). Porphyrine mit effektiver Interkombination (ISC = inter system crossing) zwischen ihrem angeregten Singulettzustand ( $S_1$ ) und dem Triplettzustand ( $T_1$ ) werden durch die im Anschluss daran mögliche Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die die Zerstörung des Krebszellgewebes oder/und der dieses versorgenden Blutgefäßsysteme verursachen, medizinisch u.a. in der Krebstherapie eingesetzt. Chlorophylle und Bakteriochlorophylle bieten hierbei, neben der hohen Ausbeute an ROS infolge ihrer langen  $S_1$ -Lebensdauern (Kraljic *et al.*, 1979; Spikes und Bommer, 1991; Nyman und Hynninen, 2004), Vorteile einer intensiven Absorption im therapeutischen Fenster (600-860 nm) und schneller Biodegradation und/oder Ausscheidung (Rosenbach-Belkin *et al.*, 1996; Moser, 1998; Brandis *et al.*, 2005a; Brandis *et al.*, 2005b). Die Substitution des natürlichen Zentralmetalls Mg mit Zn und vor allem Pd erhöht die ISC-Rate durch den Schweratomeffekt und bewirkt damit eine höhere Ausbeute an ROS (Teuchner *et al.*, 1997). Gleichzeitig bieten diese Derivate den Vorteil erhöhter Stabilität und damit leichter Handhabbarkeit.

Neben Versuchen zur besseren Löslichkeit dieser Pigmente in wässriger und damit dem Körpermilieu entsprechender Umgebung (Fiedor *et al.*, 1996; Rosenbach-Belkin *et al.*, 1996; Eichwurzel *et al.*, 2000), die unter anderem durch den stark hydrophoben Phytholrest eingeschränkt ist, konzentriert sich die Forschung vor allem auf das Verhalten dieser Pigmente in Lösungsmittel und Detergens bzw. deren Effizienz in der Tumorabtötung (Moser, 1998; Dougherty *et al.*, 1998; Kamhuber, 1999; Fiedor *et al.*, 2002). Relativ wenig ist über das Schicksal der Pigmente im Körper bekannt, es wurden weder die Exkretionsprodukte identifiziert, noch der Einfluss von Licht auf diesen Prozess untersucht.

Die in dieser Arbeit präparierten Komplexe zwischen (Bakterio)chlorophyll-Derivaten und Myoglobin bzw. Albumin stellen gut definierte Modellsysteme zur Untersuchung der Pigmente in Lösungsmittel- und Detergens-freier Umgebung dar. Der in diesem Modell erzielte Kontakt des Pigments zum Protein könnte die sehr wahrscheinlich vorhandene Interaktion der Chromophore mit Proteinen des Blutes (z.B. HSA) bzw. der Zelloberfläche (Moan *et al.*, 1985; Gibson und Hilf, 1993; Pandey *et al.*, 1996; Tsuchida *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 1997; Kessel *et al.*, 2001) imitieren. Der Vergleich mit den Verhältnissen in Lösung unter identischen Bedingungen knüpft an die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen sowie noch unveröffentlichte Arbeiten der Arbeitsgruppe von Scheer (Limantara *et al.*, 2005)

an und erlaubt im Falle des nicht proteinbindenden Pd-Komplexes einen zumindest qualitativen Vergleich von Reaktivität und Produkten.

Im Folgenden werden zunächst die Kinetiken der Photooxidationen untersucht, im Anschluss erfolgt eine qualitative Untersuchung der dabei entstehenden Photoprodukte.

## **5.1 Photostabilität von Zn-Pheophorbid *a***

### **5.1.1 Freies Zn-Pheophorbid *a***

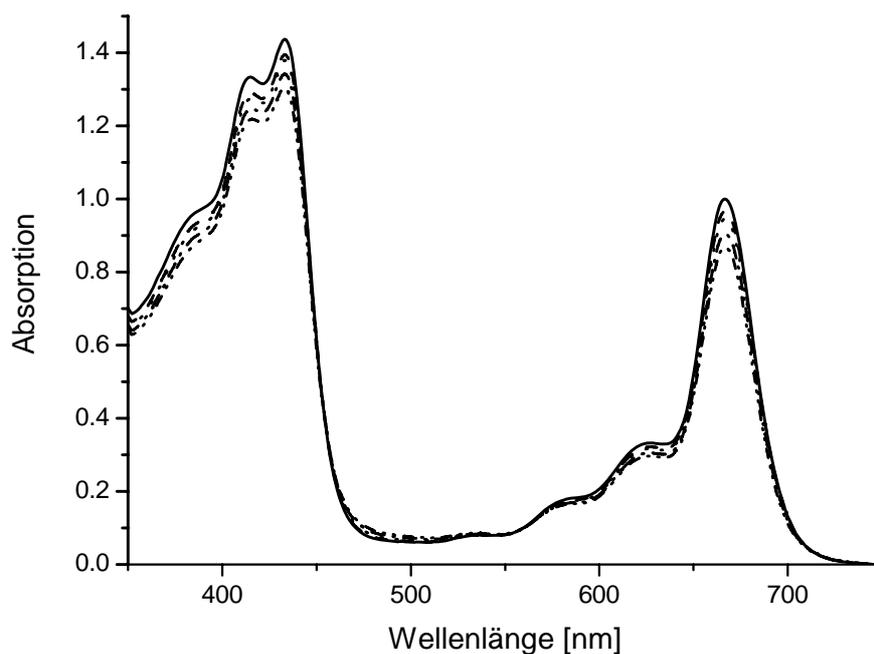
#### **5.1.1.1 *Belichtung von Zn-Pheophorbid *a* in Puffer***

Da das Lösen von reinem Zn-Pheid *a* in wässriger Umgebung trotz der Zugabe von bis zu 0,15% Pyridin zu starker Aggregatbildung führt, konnte eine Einheitlichkeit der Lösungen so nicht gewahrt werden. Es trat mit der Zeit eine Veränderung der Absorptionsspektren ein, die nicht durch die Belichtung, sondern durch zunehmende Aggregatbildung verursacht wurde. Aggregate führen zu stark verminderter Triplettausbeute und damit zu geringer Bildung von ROS (MacRobert *et al.*, 1989). Sie sind daher sehr stabil gegenüber Photobleichung und zur Untersuchung von Photostabilität und Photoprodukten ungeeignet. Da bei Verwendung einer Pigmentmischung mit ca. 15% Pheid *a* verringerte Aggregatbildung beobachtet wurde, wurde diese Mischung für die Belichtungsexperimente in Puffer eingesetzt. Die Veränderung der spektralen Eigenschaften der Pigmentlösung über den Zeitraum der Belichtung konnte so verhindert werden. Da Pheid *a* allerdings selbst als Sensitizer wirkt (Spikes und Bommer, 1991) kann hierdurch eine zusätzliche Generierung von ROS erfolgen, die evtl. ebenfalls zum Ausbleichen des Zn-Pheid *a* beitragen können.

Bei der im Folgenden beschriebenen Belichtung von Zn-Pheid *a* in Puffer ist somit eigentlich die Belichtung des Gemischs Zn-Pheid *a*/Pheid *a* gemeint. Da Zn-Pheid *a* aber den Hauptbestandteil der Mischung darstellt und Pheid *a* aufgrund seiner geringen Konzentration spektral nicht signifikant in Erscheinung tritt, bezieht sich die Diskussion ausschließlich auf Zn-Pheid *a*. Bei den Belichtungsexperimenten in Lösungsmittel wurde reines Zn-Pheid *a* verwendet. Hier tritt die Problematik der Aggregation aufgrund der guten Löslichkeit des Pigments in den verwendeten Lösungsmitteln nicht auf.

### Belichtung an Luft und unter Argon

Im Fall der Belichtung ( $\lambda \geq 630$  nm) von freiem Zn-Pheid *a* in Puffer-I wurde kein Unterschied in der Ausbleichung des Pigments zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen festgestellt. Nach 20 min Belichtung hat die Intensität der  $Q_y$ -Absorption bei 667 nm um nur 13% abgenommen, gleichzeitig erfolgt eine gleichmäßige Abnahme der Soret-Absorption (Abbildung 5-1). Der Absorptionsanstieg im Bereich zwischen 470 und 560 nm ist äußerst gering. Selbst wenn das eingesetzte Pyridin wie bei Zn-Pheid-*a*-Mb (s. Kapitel 5.1.2) eine leichte Verminderung der Photooxidation verursacht, bleicht das freie Pigment in wässriger Umgebung nur in sehr geringem Ausmaß aus. Ursache hierfür sind unter anderem die teilweise immer noch vorhandenen Aggregate, die sich durch die relativ breite langwellige Flanke der  $Q_y$ -Bande bemerkbar machen. Aus den Ergebnissen der Belichtungsexperimente in Lösungsmittel folgt jedoch, dass eine geringe Ausbleichung nicht nur durch Aggregation erklärt werden kann (s. unten).

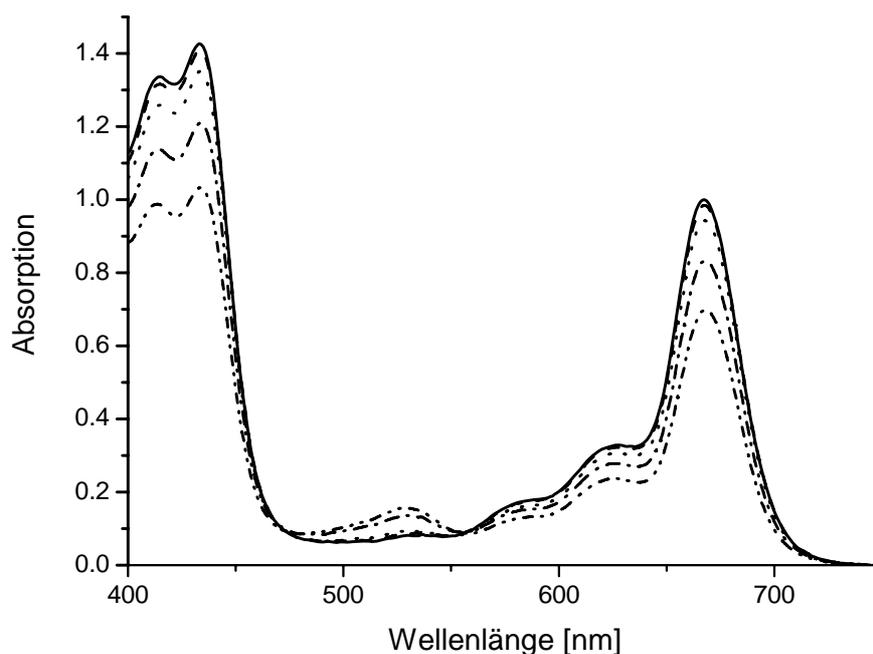


**Abbildung 5-1.** Photooxidation von Zn-Pheid *a* in Puffer-I unter aeroben Bedingungen\*. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (---) und nach 20 min (---) Belichtung.

\* Die genauen Belichtungsbedingungen sind in Kapitel 2.7.2 und 2.7.3 beschrieben. Im Folgenden werden lediglich davon abweichende Bedingungen erwähnt.

### Belichtung unter Zusatz des Reduktionsmittels Na-Dithionit

Die Belichtung von freiem Zn-Pheid *a* in Puffer-I unter anaeroben Bedingungen und in Gegenwart von Na-Dithionit führt zu einem anderen Typ von Photoreaktion. Es entsteht eine neue Bande bei 529 nm, gleichzeitig nimmt die Absorption in der  $Q_y$ -Bande ab (Abbildung 5-2). Die Intensität der neuen Bande beträgt ca. 15% von der der Soret-Bande. Die Absorptionsspektren dieser Photoreduktionsreaktion weisen zwei isosbestische Bereiche bei 469 und 558 nm auf. Neben dieser Produktbildung und der sukzessiven Abnahme der Absorptionsintensitäten von  $Q_y$ - und Soret-Bande treten keine weiteren spektralen Veränderungen auf. Die Farbe der Lösung verändert sich von grün in Richtung eines schmutzigen Rots. Eine 15-minütige Dunkelinkubation der Lösung nach zehn Minuten Belichtung führt zu fortgesetzter Bleichung (4%) der  $Q_y$ -Bande mit begleitender Zunahme der Bande bei 529 nm (nicht gezeigt).



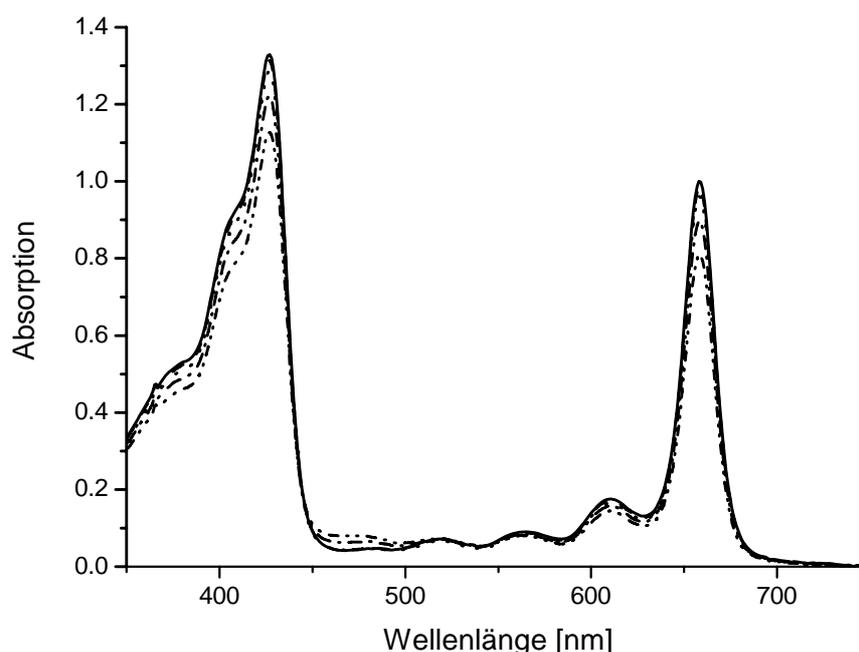
**Abbildung 5-2.** Photoreaktion von Zn-Pheid *a* in Puffer-I unter Argon in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (---) und nach 20 min (---) Belichtung. Aufgrund der starken Absorption von Na-Dithionit im Bereich <400 nm, konnte die Absorption des Pigments dort nicht gemessen werden.

#### **5.1.1.2 Belichtung von Zn-Pheophorbid *a* in Lösungsmittel**

Zur ergänzenden Untersuchung der Photostabilitäten der Pigmente in Lösungsmittel wurden Aceton, Methanol und Toluol ausgewählt. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer Polarität

als auch in ihrer Sauerstofflöslichkeit und der Lebensdauer für Singulett-Sauerstoff (s. Kapitel 5.6).

Die Rate der Ausbleichung ist in Toluol am stärksten (Abbildung 5-4). Nach 20 min Belichtung hat die Intensität der  $Q_y$ -Bande um 19% abgenommen. Neben der sukzessiven Abnahme von  $Q_y$ - und Soret-Absorption tritt eine Absorptionzunahme um 470 nm auf (Abbildung 5-3). Bis auf die leichte Andeutung einer neuen Bande an dieser Stelle bleibt die Form der Spektren unverändert.

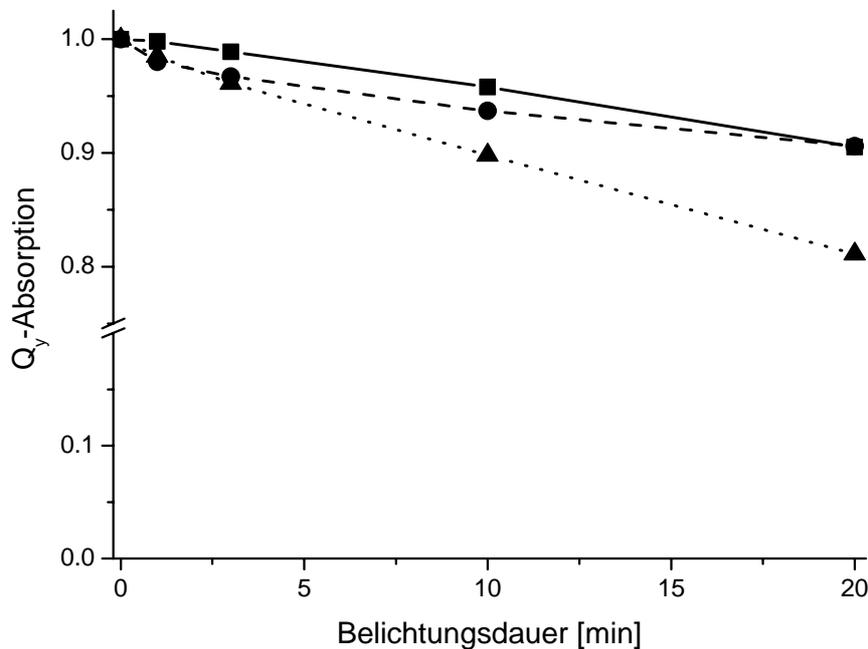


**Abbildung 5-3.** Photooxidation von Zn-Pheid *a* in Toluol unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (-.-.-) und nach 20 min (-.-.-) Belichtung.

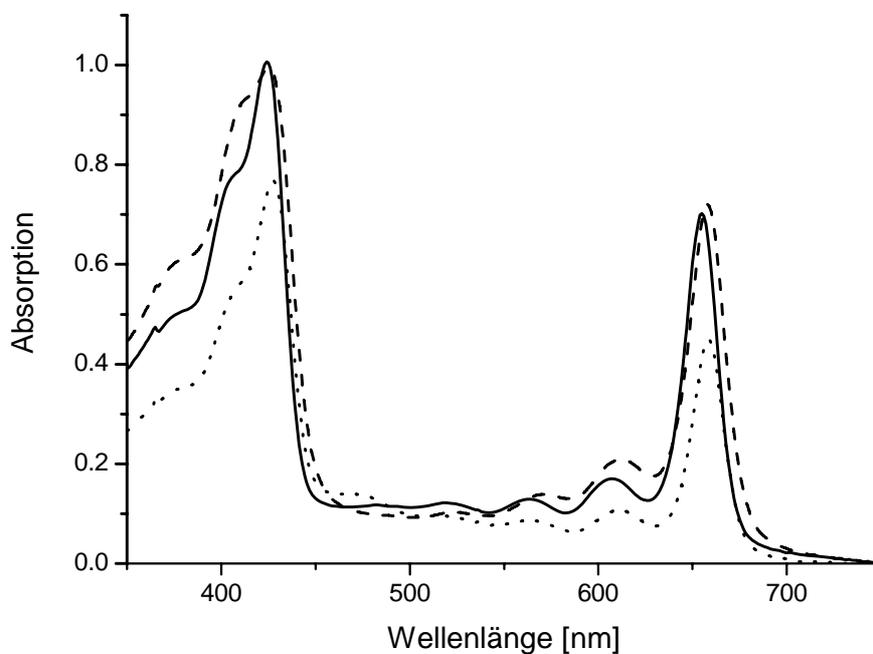
In Aceton und Methanol ist die Ausbleichrate vergleichsweise gering, nach 20 min Belichtung sind dort die  $Q_y$ -Absorptionen um jeweils 10% reduziert (Abbildung 5-4). Parallel nehmen die Intensitäten der Soret-Banden ab, eine Veränderung der Spektrenform tritt nicht ein. Die Ausbleichung verläuft in Methanol zunächst etwas schneller.

Setzt man die Belichtung über eine Dauer von zwei Stunden fort, so bleibt in Toluol eine Restabsorption der  $Q_y$ -Bande von 45% erhalten, die Restabsorptionen dieser Bande in Aceton und Methanol betragen 70 bzw. 72% (Abbildung 5-5). Die Stabilität von freiem Zn-Pheid *a* ist damit selbst nach zweistündiger Belichtung in allen Lösungsmitteln sehr groß und eine Veränderung der Spektrenform oder das Entstehen neuer Banden, ausgenommen die schon nach 20 min Belichtung in Toluol erkennbare Bande um 470 nm, tritt nicht ein.

Unter anaeroben Bedingungen ist die Photooxidation von Zn-Pheid *a* in allen drei Lösungsmitteln um jeweils 3-4% reduziert, weitere spektrale Veränderungen sind nicht erkennbar.



**Abbildung 5-4.** Kinetik der Bleichung der Q<sub>y</sub>-Absorption während der Belichtung von Zn-Pheid *a* in Lösungsmittel (Aceton ■, Methanol ●, Toluol ▲) unter aeroben Bedingungen.



**Abbildung 5-5.** Absorption von Zn-Pheid *a* in Aceton (—), Methanol (---) und Toluol (.....) nach zwei Stunden Belichtung im Gleichgewicht mit Luft.

### 5.1.2 Zn-Pheophorbid *a* im Myoglobin-Komplex

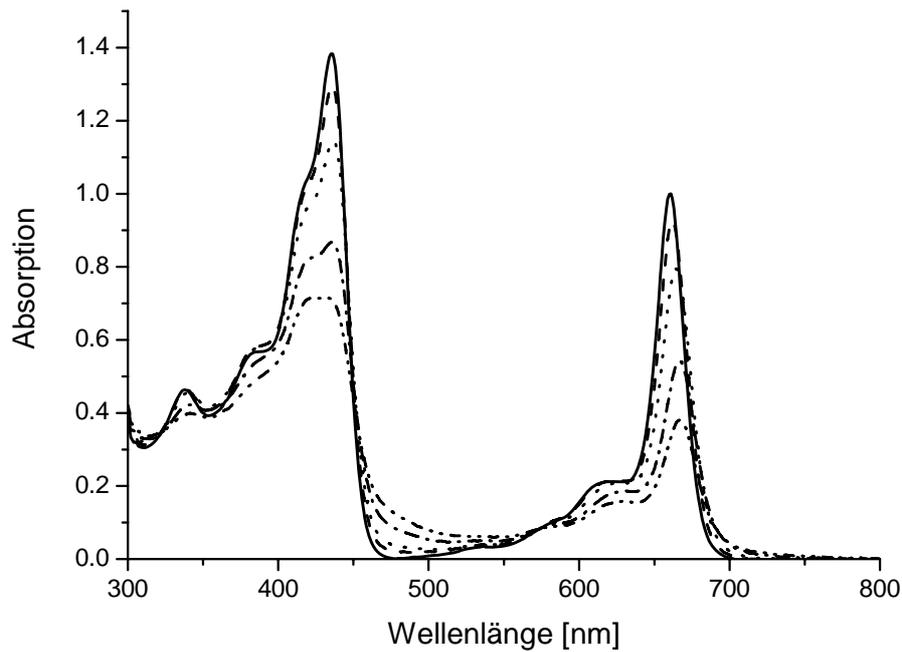
#### Belichtung an Luft und unter Argon

Die Belichtung ( $\lambda \geq 630$  nm) der Lösung des Zn-Pheid-*a*-Mb-Komplexes in Puffer-I\* im Gleichgewicht mit Luft resultiert in einer schnellen Abnahme der Intensitäten von Q<sub>y</sub>- und Soret-Absorption (Abbildung 5-6). Nach 20-minütiger Bestrahlung ist eine Restintensität der Q<sub>y</sub>-Absorption von 38% (bzw. 30% unter Pyridin-freien Bedingungen, Abbildung 5-7) vorhanden. Gleichzeitig tritt eine starke Strukturveränderung des Absorptionsspektrums auf. Die Q<sub>y</sub>-Bande verschiebt sich von 661 auf 667 nm bei gleichzeitiger Verbreiterung ihrer rechten Flanke, während in der Soret-Region die Schulter bei 419 nm langsamer ausbleicht als die Hauptbande. Beide Banden erreichen dort nach 20 min die gleiche Intensität. Es entstehen keine neuen Banden, sondern es erfolgt lediglich eine Zunahme der Absorption im Bereich von 470 bis 560 nm ohne das Auftreten isosbestischer Punkte. Bis auf die Verschiebung des Q<sub>y</sub>-Maximums gleichen die beobachteten spektralen Veränderungen sehr stark denen, die bei elektrochemischer Oxidation von Chl *a* in Acetonitril beobachtet wurden (Watanabe und Kobayashi, 1991). Die Ausbleichung des Pigments im Myoglobin-Komplex übertrifft die Ausbleichung des freien Chromophors in Puffer oder Lösungsmittel stark. Die Bindung des Pigments in Myoglobin resultiert folglich in einer starken Beschleunigung des oxidativen Photobleichens. Da die Fläche unter dem Absorptionsspektrum nach 20 min Belichtung geringer ist als vor Belichtung, entstehen hierbei offensichtlich Produkte, die nur geringe Absorption im sichtbaren spektralen Bereich besitzen. Die Protein-Absorption im UV-Bereich um 280 nm (nicht gezeigt) bleibt bei allen Belichtungsexperimenten der Proteinkomplexe konstant.

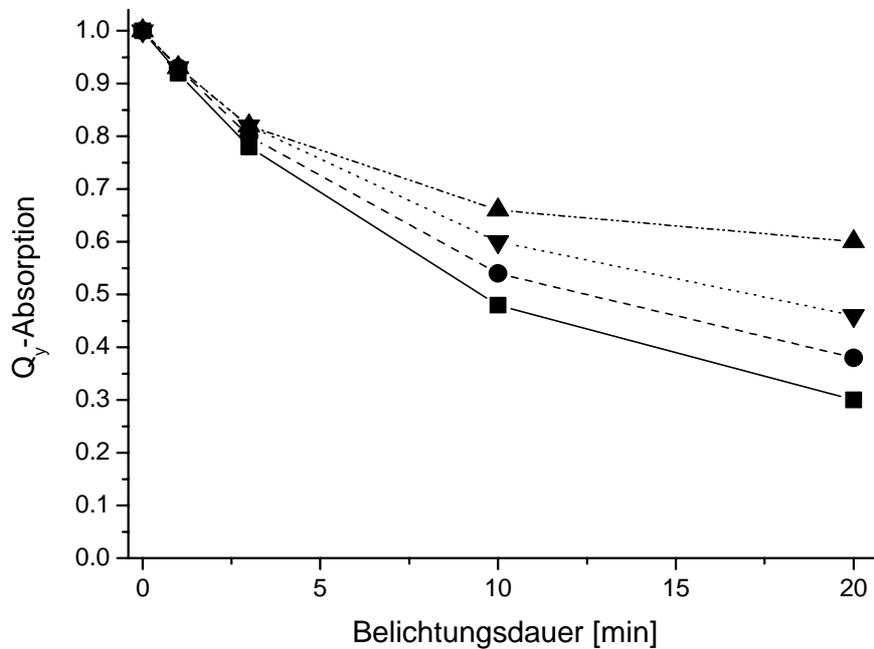
Die Applikation der belichteten Komplexe auf eine kleine Sephadex-G-25-Säule führt zu keiner Grünfärbung der Säule durch freies Pigment. Die Pigmente sind also auch nach ihrer Photooxidation im Protein gebunden und der Pigment-Protein-Komplex eluiert als homogene grüne Bande von der Säule. Ein Stehenlassen der belichteten Komplexe im Dunkeln für 15 min führt zu keiner weiteren Veränderung des Absorptionsspektrums.

---

\* Bei den Belichtungen der Pigment-Myoglobin-Komplexe wurden dem Puffer grundsätzlich 0,15% Pyridin zugesetzt, um identische Bedingungen mit den Belichtungen der freien Pigmente im gleichen Puffer zu gewährleisten. Bis auf eine leichte Reduktion der Bleichung (Abbildung 5-7) hat das zugesetzte Pyridin keinen Einfluss auf die spektralen oder photochemischen Eigenschaften der Proteinkomplexe.



**Abbildung 5-6.** Photooxidation von Zn-Pheid-*a*-Mb unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (---) und nach 20 min (---) Belichtung in Puffer-I.



**Abbildung 5-7.** Kinetik der Bleichung der  $Q_y$ -Absorption während der Belichtung von Zn-Pheid-*a*-Mb in Puffer-I im Gleichgewicht mit Luft (■), in derselben Lösung mit 0,15% Pyridin (●), in derselben Lösung mit 0,15% Pyridin und  $\beta$ -Carotin (▼), in derselben, Ar-gesättigten Lösung mit 0,15% Pyridin (▲).

Belichtet man den Komplex in Ar-gesättigtem Puffer, so erfolgt immer noch ein Ausbleichen der Q<sub>y</sub>-Bande um 40% (Abbildung 5-7). Parallel nimmt die Intensität der Soret-Absorption ab, wobei nach 20-minütiger Bestrahlung die Intensität der Hauptbande noch über die der Nebenbande dominiert. Eine Zunahme der Absorption im Bereich von 470 bis 560 nm ist wie im Fall der Belichtung unter aeroben Bedingungen zu beobachten.

Der äquimolare Zusatz von  $\beta$ -Carotin führte zwar zu einer weiteren Reduktion der Ausbleichung um ca. 8% (Abbildung 5-7), aufgrund der äußerst geringen Löslichkeit der Carotine in wässrigem Medium und der daraus resultierenden starken Streuung wurde dessen Einfluss nur unter starkem Vorbehalt gewertet.

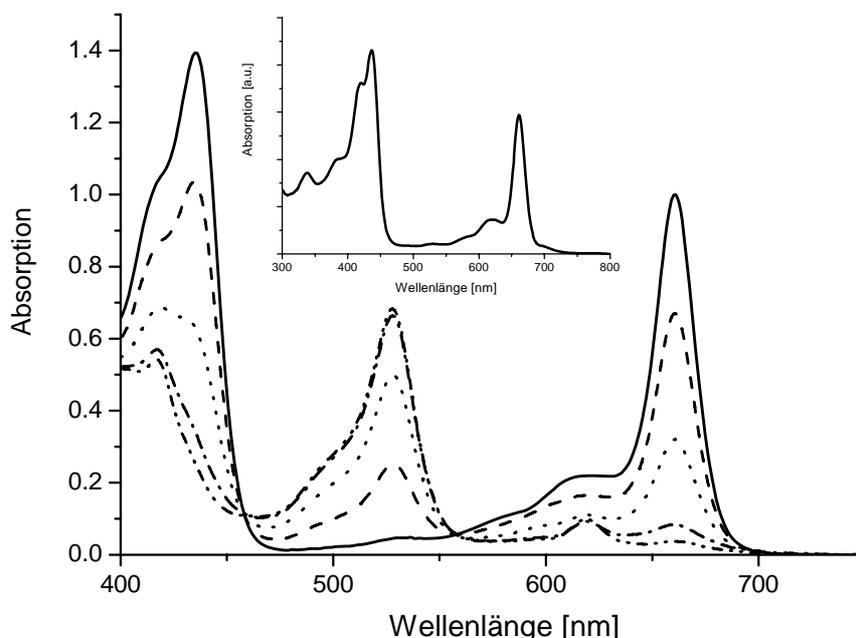
#### Belichtung unter Zusatz des Reduktionsmittels Na-Dithionit

Der Zusatz von Na-Dithionit zu einer Ar-gesättigten Lösung von Zn-Pheid-*a*-Mb in Puffer-I und die folgende Belichtung für insgesamt 20 min führt zu einem gänzlich anderen Typ von Photoreaktion. Dieser wurde ansatzweise schon bei der Belichtung des freien Pigments in Puffer beobachtet (s. Kapitel 5.1.1), hier allerdings in weitaus geringerem Ausmaß. Schon nach 10 min Belichtung hat die Intensität der Q<sub>y</sub>-Bande um 92% abgenommen, während gleichzeitig eine neue Bande bei 528 nm entsteht (Abbildung 5-8). Die Entstehung dieser Bande ist mit dem Auftreten zweier „nahezu isosbestischer“ Punkte bei 458 und 557 nm verbunden. Gleichzeitig schlägt die Farbe der Lösung von grün nach rot um. Nachfolgendes Stehenlassen der belichteten, weiterhin Reduktionsmittel enthaltenden Lösung im Dunkeln für 15 min führt zu einer geringen Zunahme der Q<sub>y</sub>-Absorption um 7% und einer gleichzeitigen Abnahme der Absorption bei 528 nm. Die Regenerierung der Q<sub>y</sub>-Bande bei gleichzeitigem Verschwinden der neuen Bande bei 528 nm wird durch die Applikation der roten, konzentrierten Lösung auf eine kleine Sephadex-G-25-Säule\* erreicht, wodurch das Reduktionsmittel entfernt wird. Die Säule ist nach der Elution der nun wieder grün gefärbten Bande des Pigment-Protein-Komplexes nicht gefärbt, was wiederum beweist, dass das Pigment auch während dieses Oxidations-Reduktions-Zyklus im Protein gebunden bleibt. Das Spektrum des gereinigten Komplexes entspricht qualitativ nahezu dem vor der Belichtung (s. Inset in Abbildung 5-8). Abweichungen entstehen hauptsächlich durch die in geringem Ausmaß erfolgende Bildung eines zweiten Produkts mit Absorptionsmaxima bei 619 und 420 nm, denen wahrscheinlich die Dehydrogenierung an C-17/18 zu Zn-Porphyrin-Derivaten zu Grunde liegt (Helfrich *et al.*, 1996).

---

\* Der Einsatz der kleinen Sephadex-G-25-Säule zur Kontrolle der Pigmentbindung nach Belichtung der Pigment-Protein-Komplexe wird im Folgenden nicht mehr extra erwähnt. Es handelt sich hier um eine Standardprozedur.

Die große Reaktivität des Pigments in der Mb-Bindungstasche gegenüber Na-Dithionit macht deutlich, dass diese den Chromophor nicht vollständig abschirmt, sondern den Zutritt von Reaktanden ermöglicht und den Kontakt zwischen Reaktand und Pigment womöglich sogar intensiviert.



**Abbildung 5-8.** Photoreaktion von Zn-Pheid-*a*-Mb unter Argon in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (····), nach 10 min (---) und nach 20 min (---) Belichtung in Puffer-I. Der Reaktionsverlauf folgt dem gleichen Schema, unabhängig davon, ob 0,15% Pyridin der Lösung zugesetzt wurden oder nicht. Aufgrund der starken Absorption von Na-Dithionit im Bereich <400 nm, konnte die Absorption des Pigments dort nicht gemessen werden.

*Inset.* Absorptionsspektrum des Produkts nach Abtrennung des Reduktionsmittels auf der Sephadex-Säule.

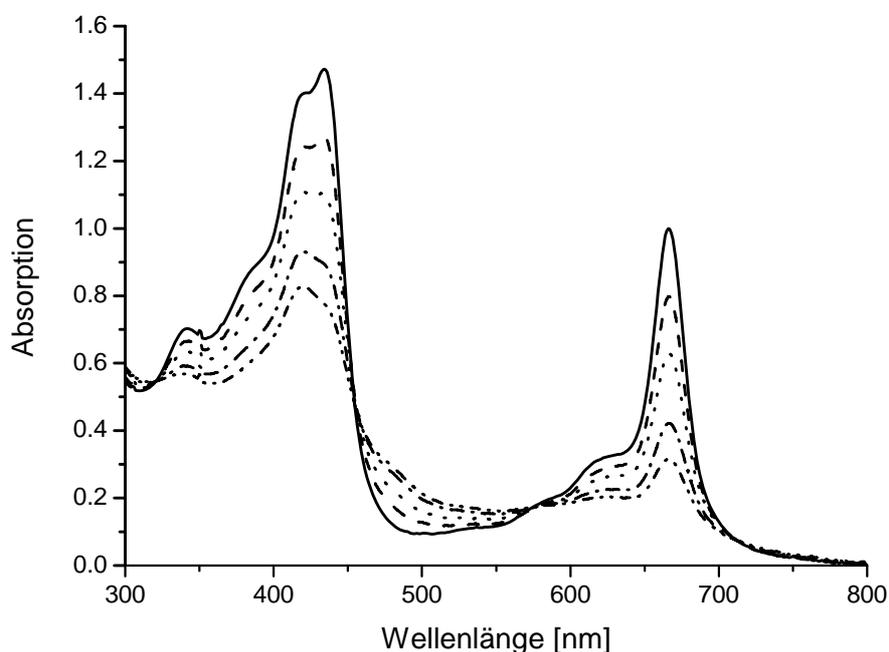
### 5.1.3 Zn-Pheophorbid *a* im Albumin-Komplex

#### Belichtung an Luft und unter Argon

Die Belichtung ( $\lambda \geq 630$  nm) der Lösung des Zn-Pheid-*a*-BSA-Komplexes in Puffer-I\* im Gleichgewicht mit Luft resultiert wie bei den Myoglobin-Komplexen in einer schnellen Abnahme der Intensitäten von Q<sub>y</sub>- und Soret-Absorption (Abbildung 5-9). Nach 20-minütiger

\* Bei den Belichtungen der Pigment-Albumin-Komplexe wurde dem Puffer kein Pyridin zugesetzt, da der Zusatz von 0,15% Pyridin bei Zn-BPheid-*a*-BSA zu einer hypsochromen Verschiebung der Q<sub>y</sub>-Bande führte. Eine leichte Reduktion der Photobleichung in Anwesenheit von Pyridin wurde bei den Zn-Pheid-*a*-BSA-Komplexen ebenfalls beobachtet. Sie lag im Rahmen der bei den Mb-Komplexen beobachteten Reduktion.

Belichtung hat die  $Q_y$ -Absorption 69% ihrer ursprünglichen Intensität verloren, dies entspricht (im Rahmen einer Messgenauigkeit von 5%) dem Intensitätsverlust dieser Bande im Myoglobin-Komplex unter identischen Bedingungen (vgl. Abbildung 5-7). Die bei Belichtung des analogen Myoglobin-Komplexes beobachtete Verschiebung des  $Q_y$ -Maximums tritt bei Zn-Pheid- $\alpha$ -BSA allerdings nicht auf, die hier bei 666 nm auftretende  $Q_y$ -Bande verliert lediglich zunehmend an Intensität. Das Ausbleichen der Soret-Bande folgt den gleichen Trends wie im Myoglobin-Komplex, die Schulter bei 419 nm bleicht langsamer als die Hauptbande und weist nach 20 minütiger Belichtung sogar eine etwas höhere Restintensität als letztere auf. Während der Belichtungsreaktion bilden sich keine neuen Banden, es findet lediglich eine Zunahme der Absorption im Bereich zwischen 470 und 560 nm statt. Diese ist der in diesem Bereich erfolgenden Absorptionszunahme des Myoglobin-Komplexes vergleichbar. Möglicherweise sind diese Zunahme und das langsamere Ausbleichen der Schulter um 419 nm sowohl im Albumin- als auch im Myoglobin-Komplex ein Hinweis auf Entmetallierung und damit die Entstehung von Pheophorbid-Derivaten. Bei der Analyse der aus den belichteten Komplexen extrahierten Pigmente konnten allerdings keine Pheophorbide nachgewiesen werden.



**Abbildung 5-9.** Photooxidation von Zn-Pheid- $\alpha$ -BSA unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (-.-.-) und nach 20 min (-.-.-) Belichtung in Puffer-I.

Die Belichtung von Zn-Pheid-*a*-BSA in entgastem und mit Argon gesättigtem Puffer-I führt nur zu marginaler Reduktion der Ausbleichung. Nach 20-minütiger Belichtung weist die Q<sub>y</sub>-Bande eine Restintensität von 34% auf, dies sind nur 3% mehr als bei aerober Belichtung. Der Wert von 3% liegt zudem im Rahmen der Meßgenauigkeit.

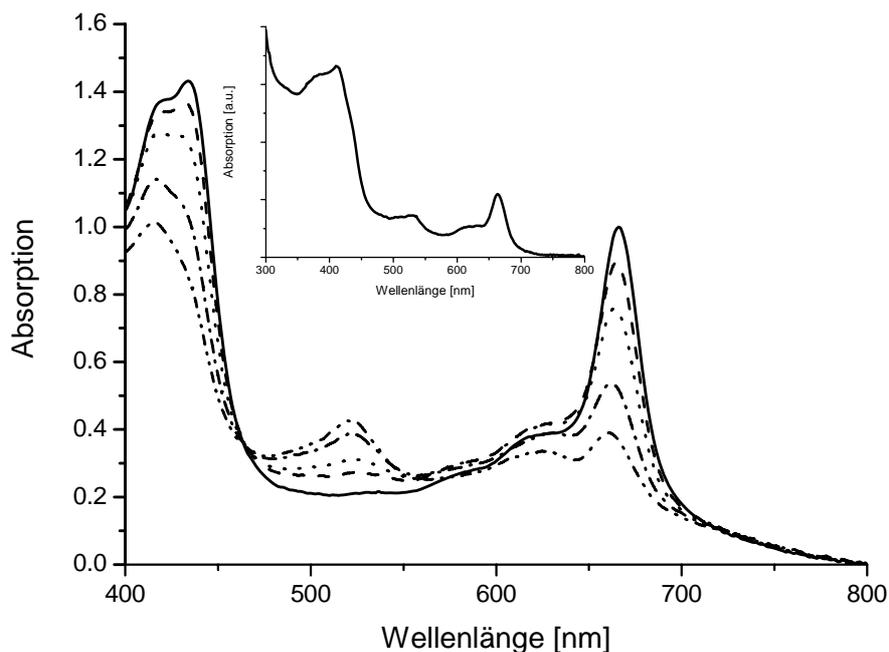
Wie bei den Mb-Komplexen führt die Bindung des Pigments im Protein-Komplex zu einer starken Sensitivitätserhöhung gegenüber oxidativem Photobleichen. Gleichzeitig nimmt die Fläche unter dem Absorptionsspektrum nach 20 min Belichtung stark ab, die Zunahme der Absorption im Bereich zwischen 470 und 560 nm gleicht die Abnahme der Intensitäten im Soret- und Q<sub>y</sub>-Bereich nicht aus. Somit kann wiederum davon ausgegangen werden, dass beim Photobleichen Produkte entstehen, die nur geringe Absorption im sichtbaren spektralen Bereich besitzen. Alle Pigmente mit Absorption im sichtbaren Spektralbereich sind auch nach der Belichtung im Protein gebunden.

#### Belichtung unter Zusatz des Reduktionsmittels Na-Dithionit

Die Belichtung von Zn-Pheid-*a*-BSA in Gegenwart von Na-Dithionit führt, wie für den Myoglobin-Komplex beschrieben, zum Auftreten einer neuen Bande. Deren Absorptionsmaximum ist hier allerdings um 6 nm auf 522 nm hypsochrom verschoben (Abbildung 5-10). Außerdem entsteht diese Bande sehr viel langsamer und weist nach 20-minütiger Belichtung eine im Vergleich zum Myoglobin-Komplex weitaus geringere Intensität auf. Diese liegt bei einem Viertel der Intensität der zugehörigen Soret-Bande, wohingegen die Bande bei 528 nm im Myoglobin-Komplex letztere um ein Viertel überragt (Abbildung 5-8). Die Intensität dieser Bande bei der Belichtung des freien Pigments in Puffer ist im Vergleich mit der bei Zn-Pheid-*a*-BSA jedoch gering. Eine Farbveränderung der Lösung von grün nach rot ist ebenfalls zu beobachten. Die Absorptionsspektren der photochemischen Reduktion von Zn-Pheid *a* im BSA-Komplex zeigen nur einen isobestischen Punkt bei 465 nm, die Entstehung der Bande bei 522 nm ist im langwelligen Bereich nicht mit dem Auftreten eines isobestischen Punktes verbunden. Eine Absorptionzunahme bei 619 und 420 nm, wie bei Myoglobin, tritt in den Spektren von Zn-Pheid-*a*-BSA unter diesen Bedingungen nicht auf. Das Pigment bleibt auch bei dieser Photoreaktion im Protein gebunden. Nach Abtrennung des Reduktionsmittels ist die Lösung zwar wieder schmutzig grün gefärbt, das Absorptionsspektrum des Komplexes weist aber immer noch eine, wenn auch nicht mehr so intensive, Bande bei 528 nm auf (s. Inset in Abbildung 5-10). Die starke Affinität von BSA für Liganden führt offensichtlich zur Bindung eines Teils des Reduktionsmittels in der Nähe des Pigments, wodurch eine vollständige Rückreaktion wie bei

Zn-Pheid-*a*-Mb verhindert wird. Ebenfalls möglich ist auch, dass das reduzierte Produkt durch das Protein stabilisiert wird.

Aufgrund der äußerst geringen Ausbeuten der Pigment-BSA-Komplexe und ihrer sehr viel größeren Oxidationsempfindlichkeit (s. Kapitel 4), wurde auf eine weitergehende Untersuchung der belichteten Komplexe verzichtet, diese wurden sofort der Pigmentextraktion unterworfen.



**Abbildung 5-10.** Photoreaktion von Zn-Pheid-*a*-BSA unter Argon in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (····), nach 10 min (---) und nach 20 min (---) Belichtung in Puffer-I.

*Inset.* Absorptionsspektrum des Produkts nach Abtrennung des Reduktionsmittels auf der Sephadex-Säule.

## 5.2 Photostabilität von Zn-Bakteriopheophorbid *a*

### 5.2.1 Freies Zn-Bakteriopheophorbid *a*

#### 5.2.1.1 *Belichtung von Zn-Bakteriopheophorbid *a* in Puffer*

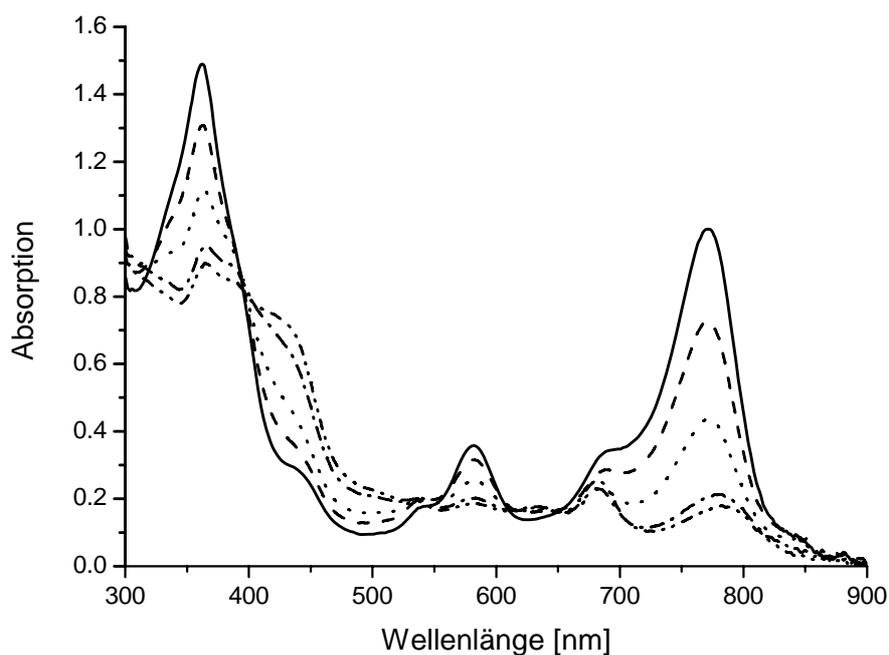
Aufgrund der starken Aggregatbildung bei Verwendung von reinem Zn-BPheid *a* (vgl. Kapitel 5.1.1) wurde auch hier ein Gemisch mit einem prozentualen Anteil von 15% BPheid *a* für die Belichtungsversuche in Puffer verwendet. Dies führt zu den gleichen Nebeneffekten wie für Zn-Pheid *a* beschrieben. Das verwendete Pigmentgemisch enthält zudem einen geringen Anteil an Chlorin, das bei der Herstellung von Zn-BPheid *a* sehr leicht gebildet wird.

#### Belichtung an Luft und unter Argon

Die Belichtung von Zn-BPheid *a* in Puffer-I unter aeroben Bedingungen führt, im Gegensatz zur Belichtung von Zn-Pheid *a*, zu großen spektralen Veränderungen (Abbildung 5-11). Die Absorption der Q<sub>y</sub>-Bande geht nach 20 min Belichtung auf 17% ihres Ausgangswertes zurück, die Q<sub>x</sub>-Bande ist nicht mehr detektierbar. Gleichzeitig entstehen zwei neue Absorptionsbanden im Bereich von 440 und 680 nm. Diese neuen Banden sind charakteristisch für Chlorine wie 3-Acetyl-Chl *a*, welche sehr leicht durch Dehydrogenierung der Kohlenstoffatome C-7 und C-8 in Ring B von Bakteriochlorinen gebildet werden (Smith und Calvin, 1966). Andeutungen dieser Banden sind schon vor Belichtung vorhanden, sie entstehen während der Herstellung von Zn-BPheid *a*. Zusätzlich zur Entstehung dieser Banden erfolgt eine Absorptionzunahme um 500 nm. Isosbestische Punkte sind nicht sichtbar.

Die Belichtung unter anaeroben Bedingungen führt zu einer geringfügigen Reduktion der Bleichung um ca. 4%.

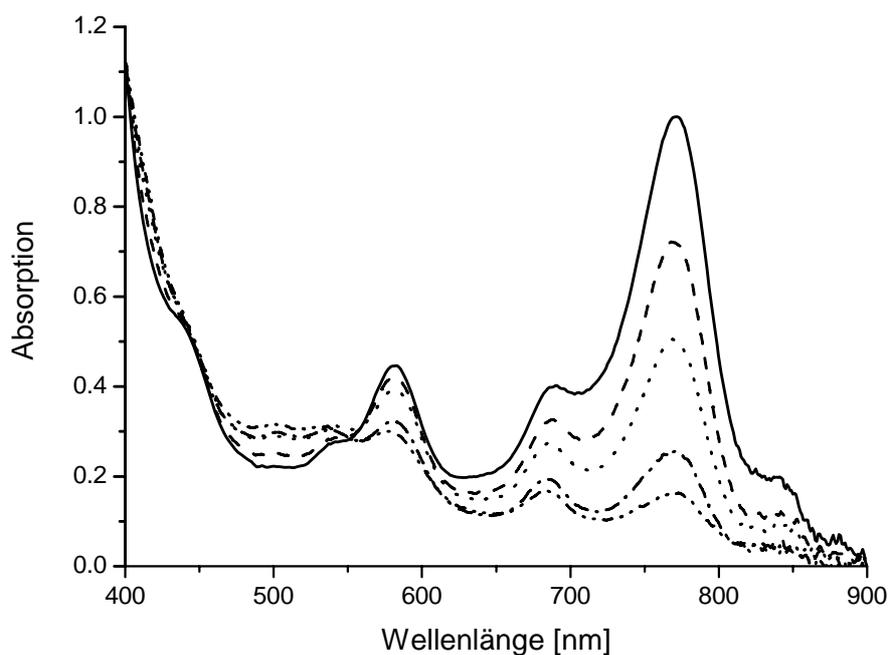
Ein Unterbrechen der Belichtung nach 3 oder 10 min und anschließendes Stehenlassen der Lösung im Dunkeln führt zu fortgesetzter Oxidation zum entsprechenden Chlorin (vgl. Abbildung 5-17). Eine Erhöhung der Viskosität des Lösungsmittels (Belichtung in 2/3 Glycerin, 1/3 Puffer-I) resultiert in stark erhöhter Photooxidation, schon nach 10 min Belichtung sind über 90% der Q<sub>y</sub>-Bande ausgebleicht. Offensichtlich schränkt das Lösungsmittel die Beweglichkeit der Reaktanden so stark ein, dass die Kontakte zwischen Pigment und ROS viel öfter zu Photoreaktionen führen.



**Abbildung 5-11.** Photooxidation von Zn-BPheid *a* in Puffer-I unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (-·-·-) und nach 20 min (- - -) Belichtung.

#### Belichtung unter Zusatz des Reduktionsmittels Na-Dithionit

Die Belichtung von Zn-BPheid *a* unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Na-Dithionit führt zu einem starken Absorptionsrückgang im gesamten spektralen Bereich >400 nm. Eine Absorptionzunahme findet nahezu ausschließlich in der Region zwischen 460 und 560 nm statt. Hier ist eine schwache Andeutung zweier neuer Banden sichtbar, wobei die langwellige dieser beiden Banden nach 20 min Belichtung nur noch schwach erkennbar ist. Eine Farbveränderung der Lösung von Grün nach Rot wie bei Zn-Pheid *a* ist nicht beobachtbar. Die für das Chlorin-Oxidationsprodukt charakteristische Bande bei ca. 680 nm bleicht deutlich langsamer aus. Das Reduktionsmittel bewirkt folglich keine Rückreaktion zum Bakteriochlorin, ein Fortschreiten der Oxidation zum Chlorin ist nun bei Belichtung aber nicht zu beobachten.



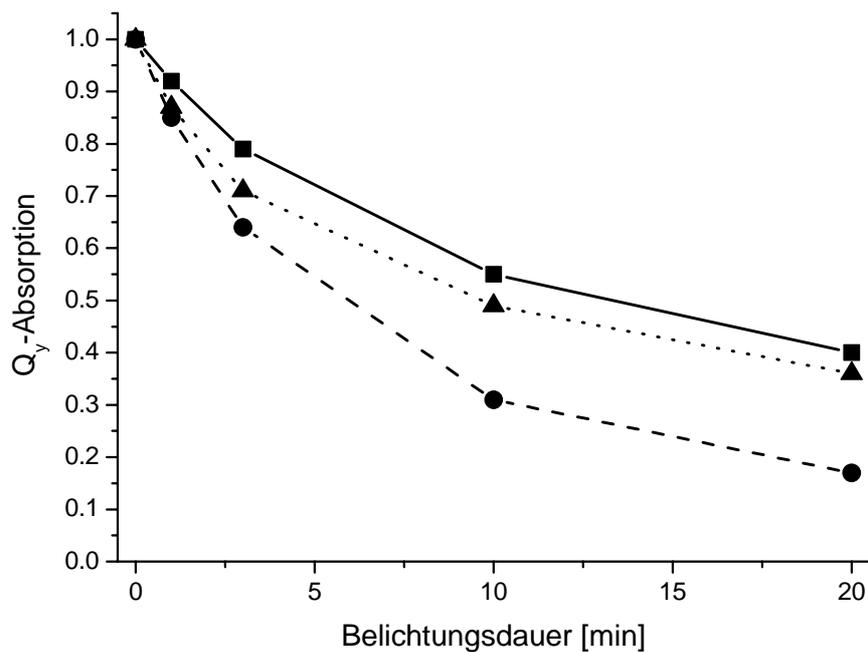
**Abbildung 5-12.** Photoreaktion von Zn-BPheid *a* in Puffer-I unter Argon in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (·····), nach 10 min (---) und nach 20 min (---) Belichtung.

### 5.2.1.2 Belichtung von Zn-Bakteriopheophorbid *a* in Lösungsmittel

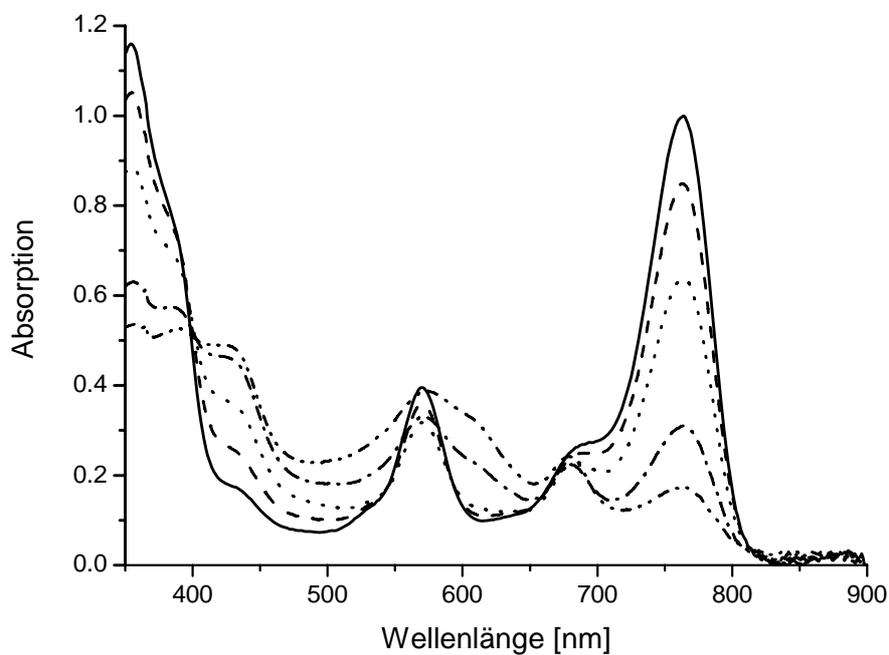
Die vergleichende Untersuchung der Stabilität von Zn-BPheid *a* in Lösungsmittel wurde wiederum in Aceton, Methanol und Toluol durchgeführt.

Die Stabilität des Pigments ist hierbei in Aceton am größten, gefolgt von Toluol. Die Ausbleichung der  $Q_y$ -Bande beträgt in Aceton 60% und in Toluol 64% (Abbildung 5-13). In beiden Lösungsmitteln entstehen während der Belichtung die für Chlorin charakteristischen Banden um 430 und 680 nm. Unter anaeroben Bedingungen reduziert sich die Photooxidation um 5 (Aceton) bzw. 10% (Toluol).

In Methanol ist das Pigment am labilsten (Abbildung 5-14). Hier beträgt die Restintensität der  $Q_y$ -Absorption nach 20 min Belichtung nur noch 17%. Gleichzeitig entstehen die für das Chlorin charakteristischen Absorptionsbanden bei 440 und 678 nm. Außerdem nimmt die Absorption zwischen 460 und 530 nm stark zu und es entsteht eine breite Bande zwischen 550 und 650 nm mit einer Schulter in der langwelligen Flanke bei 610 nm. Ein dem Absorptionsspektrum nach 20-minütiger Belichtung vergleichbares Spektrum wurde von Kammhuber (1999) nach 25-minütiger Belichtung von Zn-BPhe *a* in Methanol beobachtet. Zn-BPhe *a* unterscheidet sich von Zn-BPheid *a* nur durch den Phytolrest an C-17<sup>3</sup>.



**Abbildung 5-13.** Kinetik der Bleichung der Q<sub>y</sub>-Absorption während der Belichtung von Zn-BPheid *a* in Lösungsmittel (Aceton ■, Methanol ●, Toluol ▲) unter aeroben Bedingungen.



**Abbildung 5-14.** Photooxidation von Zn-BPheid *a* in Methanol unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (-.-) und nach 20 min (- - -) Belichtung.

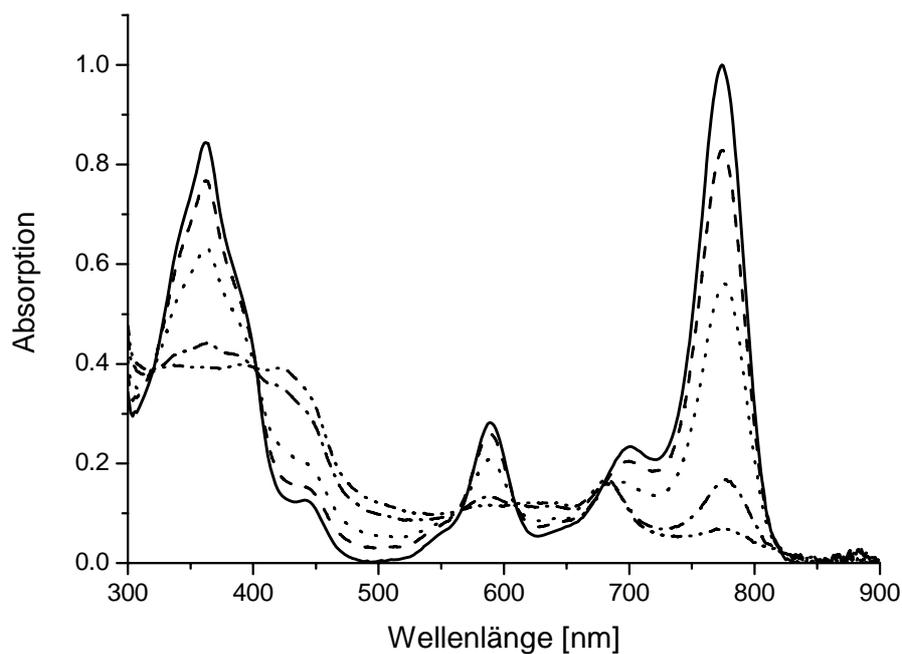
Zn-BPheid *a* in Lösung ist insgesamt wesentlich empfindlicher gegenüber Photobleichung als Zn-Pheid *a*. Der für die PDT günstigen Lage der langwelligen Absorption um 760 nm, die es möglich macht, den Photosensibilisator auch in tieferen Gewebeschichten einzusetzen (Jori, 1992; Jori, 1997), steht die hohe Empfindlichkeit und damit einhergehende Photodegradation des Sensibilisators selbst bei Bestrahlung entgegen. Über die Toxizität der Produkte ist bisher nichts bekannt.

### **5.2.2 Zn-Bakteriopheophorbid *a* im Myoglobin-Komplex**

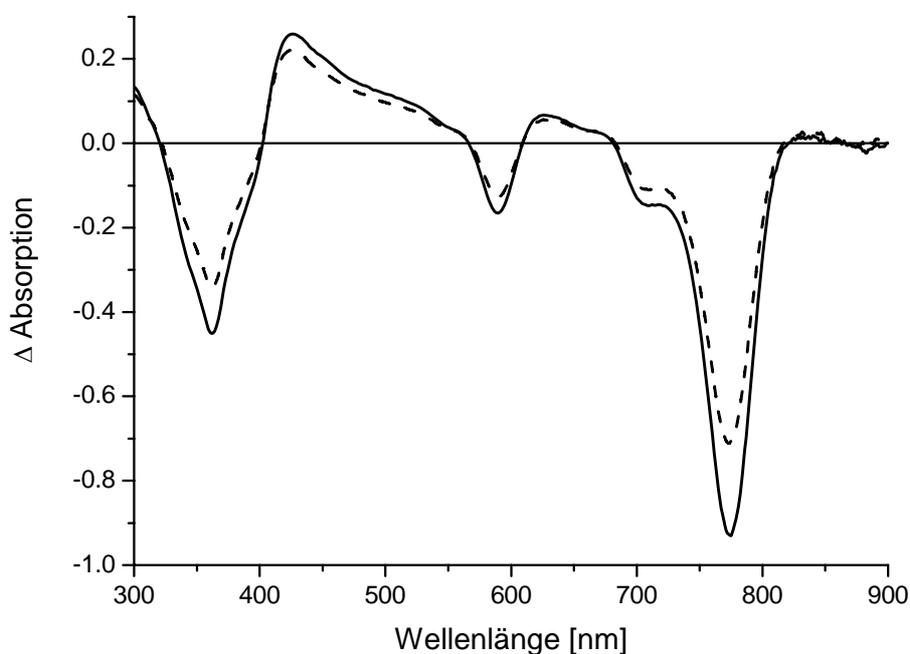
#### Belichtung an Luft und unter Argon

Wenn eine Lösung von Zn-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter aeroben Bedingungen mit rotem Licht ( $\lambda \geq 630$  nm) bestrahlt wird, führt dies zu qualitativ vergleichbaren, aber deutlich schnelleren spektralen Veränderungen wie die Belichtung des freien Pigments in Lösung. Nach 20 min Belichtung hat die Absorption der Q<sub>y</sub>-Bande eine Restintensität von 7% erreicht, die Q<sub>x</sub>-Bande ist nicht mehr sichtbar (Abbildung 5-15). Gleichzeitig entstehen zwei neue Absorptionsbanden im Bereich von 680 und 440 nm. Diese sind wiederum charakteristisch für das entsprechende Chlorin. Andeutungen dieser Banden sind schon vor Belichtung vorhanden, sie entstehen während der Rekonstitution. Zusätzlich zu diesen Banden ist eine breite, strukturlose Absorptionszunahme über den größten Teil des Spektrums zu verzeichnen, „isosbestische Bereiche“ treten bei 402, 566 und 609 nm auf.

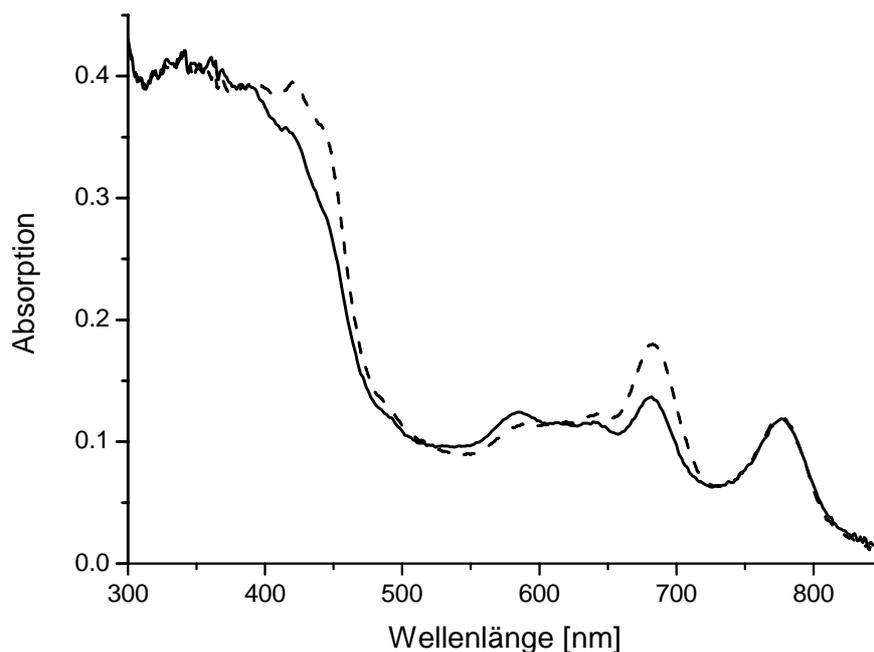
Die Belichtung unter anaeroben Bedingungen führt wie bei Zn-Pheid-*a*-Mb zu einer Reduktion der Ausbleichung. Nach 20 min Belichtung besitzt die Q<sub>y</sub>-Bande eine Restintensität von 30% (Abbildung 5-16). Die spektralen Veränderungen gleichen denen unter aeroben Bedingungen. Belässt man die belichteten Komplexe im Dunkeln, so finden in beiden Fällen keine Rückreaktionen statt, vielmehr bewirkt eine Unterbrechung nach 3 bzw. 10 min Belichtung sogar eine Weiterreaktion der Probe: Die Ausbildung der beiden neuen Banden setzt sich hierbei auch im Dunkeln fort (Abbildung 5-17). Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein langlebiges Produkt gebildet wurde, welches ein fortschreitendes Bleichen im Dunkeln bewirkt. Das gleiche Phänomen wurde bei der Reaktion von freiem Zn-BPheid *a* in Puffer beobachtet (s. Kapitel 5.2.1).



**Abbildung 5-15.** Photooxidation von Zn-BPheid-*a*-Mb unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (-·-·-) und nach 20 min (-·-·-) Belichtung in Puffer-I.



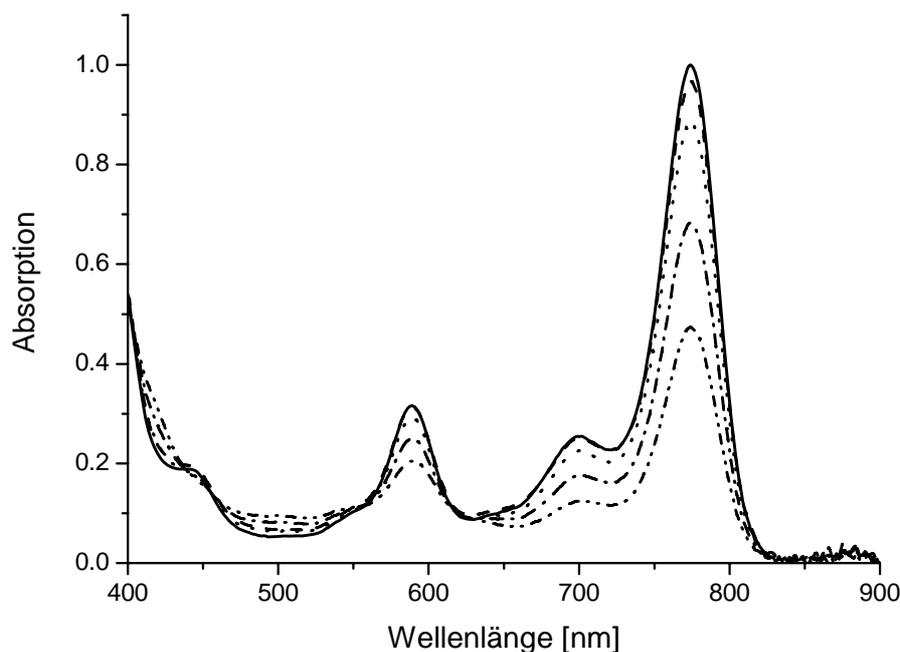
**Abbildung 5-16.** Differenzspektren der Belichtung von Zn-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter aeroben (—) und anaeroben (---) Bedingungen. Die Differenzspektren wurden jeweils aus der Absorption vor und nach der Belichtung gebildet:  $A_{\text{nach 20 min Belichtung}} - A_{\text{vor 20 min Belichtung}}$ .



**Abbildung 5-17.** Absorptionsspektren von Zn-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter aeroben Bedingungen nach 10 min Belichtung (—) und weiteren 15 min im Dunkeln (--).

#### Belichtung unter Zusatz des Reduktionsmittels Na-Dithionit

Die Belichtung von Zn-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter anaeroben Bedingungen und in Gegenwart von Na-Dithionit führt zu weiterer Reduktion der Bleichung (Abbildung 5-18). Nach 20 min Belichtung ist die Absorptionsintensität der  $Q_y$ -Bande um nur 53% zurückgegangen. Neue Banden treten nicht auf und die für das Chlorin charakteristischen Absorptionen um 700 und 440 nm, die im ursprünglichen Spektrum zu sehen sind, nehmen im Zuge der Belichtung ab. Dies unterscheidet die Reaktion des Pigments im Mb-Komplex von der in Lösung, wo unter diesen Bedingungen die Absorptionsbanden von 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* erhalten bleiben. Ein leichter Absorptionsanstieg ist zwischen 405 und 440 nm und zwischen 460 und 560 nm zu beobachten. Letzterer deutet auf das bei 528 nm absorbierende Reduktionsprodukt hin (vgl. Kapitel 5.1), das evtl. in sehr geringem Ausmaß als Nebenprodukt entsteht. Gleichzeitig nimmt die Intensität der  $Q_x$ -Bande ab. Durch die starke Absorption von Na-Dithionit bei Wellenlängen <400 nm können Absorptionsveränderungen im Soret-Bereich nicht detektiert werden. Die Pigmente bleiben während sämtlicher Belichtungszyklen im Protein gebunden.



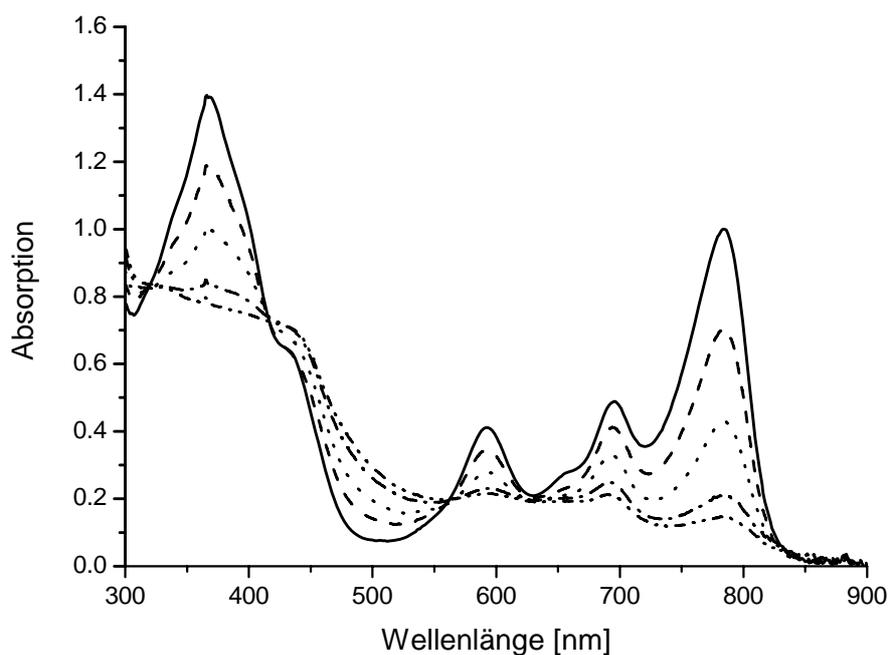
**Abbildung 5-18.** Photoreaktion der Belichtung von Zn-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (-.-) und nach 20 min (-.-) Belichtung.

### 5.2.3 Zn-Bakteriopheophorbid *a* im Albumin-Komplex

#### Belichtung an Luft und unter Argon

Die Belichtung des Komplexes von Zn-BPheid *a* mit BSA in Puffer-I unter aeroben Bedingungen führt wie bei Zn-BPheid-*a*-Mb zu einer starken Bleichung der Q<sub>y</sub>-Bande. Nach 20 min Belichtung ist die Bande um 85% ausgebleicht, gleichzeitig nimmt die Absorption der Soret-Bande stark ab, ebenso die der Q<sub>x</sub>-Bande (Abbildung 5-19). Ein Absorptionsanstieg ist in der Region zwischen 415 und 563 nm zu verzeichnen. Auch die schon im Originalspektrum vorhandene Bande bei 700 nm, die für das Oxidationsprodukt an C-7/8 charakteristisch ist, welches hier in stärkerem Ausmaß als bei Myoglobin während der Präparation des Komplexes entsteht, geht sukzessive zurück.

Unter anaeroben Bedingungen reduziert sich das Ausbleichen des Komplexes um ca. 5% und die qualitativen Veränderungen des Spektrums während der Belichtung sind gleich.



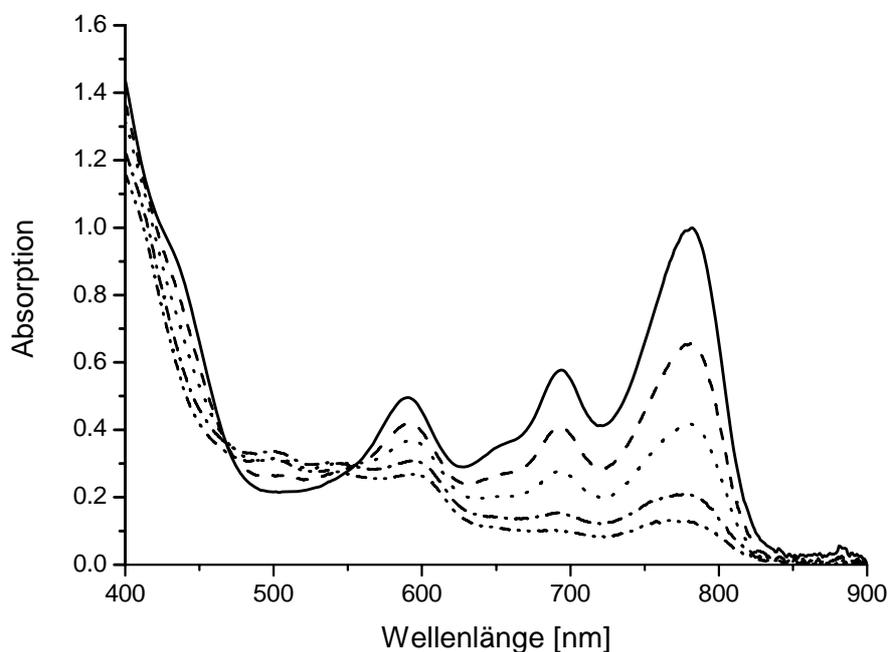
**Abbildung 5-19.** Photooxidation von Zn-BPheid-*a*-BSA unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (---) und nach 20 min (---) Belichtung in Puffer-I.

#### Belichtung unter Zusatz des Reduktionsmittels Na-Dithionit

Die Photoreaktion von Zn-BPheid-*a*-BSA unter anaeroben Bedingungen und in Gegenwart von Na-Dithionit resultiert in einer starken Abnahme der Absorptionsintensität der  $Q_y$ -Bande (Abbildung 5-20). Gleichzeitig geht auch die Absorption der für das Chlorin charakteristischen Banden bei 700 und 440 nm nahezu vollständig zurück. Dieses Verhalten ähnelt dem von Zn-BPheid-*a*-Mb, ist aber weitaus stärker ausgeprägt. Es steht jedoch im Gegensatz zu den Veränderungen, die bei Belichtung des freien Pigments in Puffer unter diesen Bedingungen beobachtet werden, wo das Chlorin auch nach der Belichtung vorhanden ist. Offensichtlich fördert die Proteinumgebung oxidative und reduktive Photoreaktionen. Dies deutete sich ja schon bei den Komplexen mit Zn-Pheid *a* an (vgl. Kapitel 5.1.3).

Die  $Q_x$ -Bande verliert ebenfalls an Intensität, jedoch weniger stark als die anderen Banden. Ein Absorptionsanstieg findet in der Region um 500 nm statt, hier ist die Andeutung einer neuen Bande erkennbar. Eine klare, für das Reduktionsprodukt charakteristische Produktbande um 528 nm (vgl. Kapitel 5.1) ist nicht sichtbar, diese könnte unter der breiten Absorption in diesem Bereich, ähnlich wie bei Zn-BPheid-*a*-Mb, verborgen sein. Insgesamt findet unter diesen Belichtungsbedingungen ein sehr starker Absorptionsrückgang im ganzen spektralen Bereich statt, der außer in der Region um 500 nm kaum durch

Absorptionszunahme ausgeglichen wird. Die Pigmente mit Absorptionen im sichtbaren spektralen Bereich bleiben während sämtlicher Belichtungszyklen im Protein gebunden.



**Abbildung 5-20.** Photoreaktion der Belichtung von Zn-BPheid-*a*-BSA in Puffer-I unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (-.-) und nach 20 min (-.-) Belichtung.

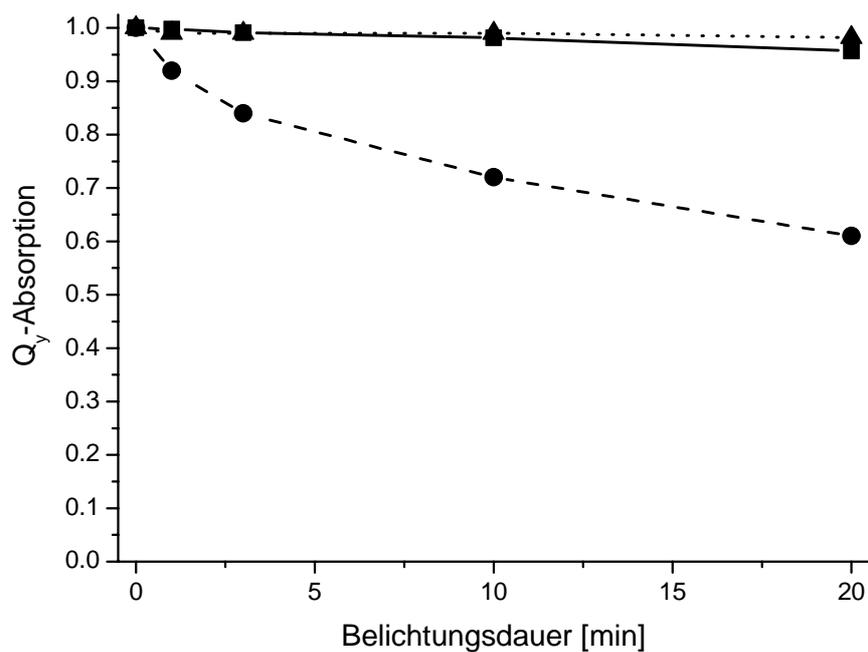
Zusammenfassend zeigt sich, dass Zn-BPheid *a* wesentlich empfindlicher gegenüber oxidativer Photobleichung ist als Zn-Pheid *a*, unabhängig davon, ob das Bakteriochlorin im Proteinkomplex vorliegt oder frei in Lösung. Wie bei der Belichtung von Zn-Pheid *a* in den Proteinkomplexen bilden sich während der oxidativen Photobleichung hauptsächlich Produkte, die keine Absorptionen im farbigen Spektralbereich besitzen. Dies folgt aus der starken Abnahme der Fläche unter den Absorptionsspektren nach Belichtung. Bei reduktiver Photobleichung bildet Zn-Pheid *a* ein Reduktionsprodukt mit charakteristischer Absorptionsbande um 528 nm, dieses Produkt tritt bei Zn-BPheid *a* wenn überhaupt nur in äußerst geringem Ausmaß auf.

Wesentlich stabiler sind die Ni- und Pd-Derivate von BChl *a*, wie in den folgenden zwei Kapiteln gezeigt wird.

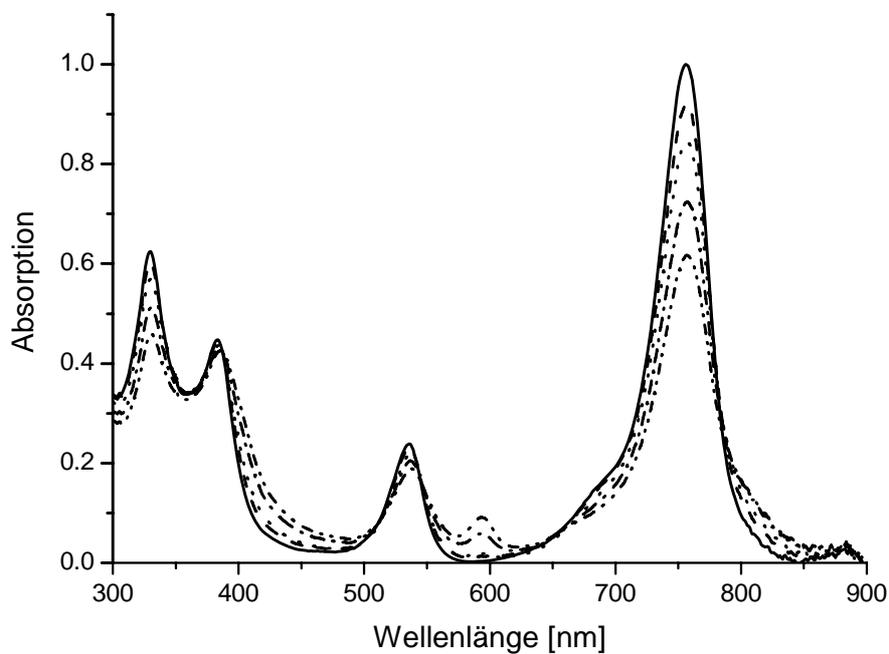
### 5.3 Photostabilität von Pd-Bakteriopheophorbid *a* in Lösungsmittel

Pd-BPheid *a* geht von seinem angeregten  $S_1$ -Zustand mit fast 100-prozentiger Ausbeute in den angeregten  $T_1$ -Zustand über, von dem aus die Bildung der ROS erfolgt. Substituiert man das Zentralmetall durch Zn, so reduziert sich diese Ausbeute auf 83% (Teuchner *et al.*, 1997). Die Zn-Derivate haben zusätzlich ein wesentlich geringeres Oxidationspotential, was ihre Labilität gegenüber Photooxidationen begründet (Noy *et al.*, 1998). Pd-BPheid ist somit ein äußerst stabiles Chl-Derivat mit gleichzeitig hoher Effizienz in der Generierung von ROS und damit in der Abtötung von Krebszellen (Scherz *et al.*, 2000). Die Unfähigkeit des zentralen Pd, mehr als die vier Liganden des Tetrapyrrols koordinativ zu binden (Buchler, 1975; Wiberg, 1995), ist offensichtlich der Grund dafür, dass dieser Chromophor weder durch Myoglobin komplexiert noch an Albumin gebunden werden konnte (s. Kapitel 3 und 4). Aufgrund seiner zudem äußerst geringen Löslichkeit in wässriger Umgebung beschränkt sich die Stabilitätsuntersuchung von Pd-BPheid *a* in dieser Arbeit auf die Lösungsmittel Aceton, Methanol und Toluol.

Wie bei vergleichbaren Experimenten mit Pd-BPhe *a* (Fiedor *et al.*, 2002) ist Pd-BPheid *a* in Aceton und Toluol nahezu inert gegenüber Photobleichung (Abbildung 5-21). Lediglich in Methanol findet ein Ausbleichen der  $Q_y$ -Bande statt, diese erreicht nach 20 min Belichtung eine Restintensität von 62% (Abbildung 5-22). Gleichzeitig findet eine Absorptionzunahme in den Bereichen zwischen 400 und 500 nm und zwischen 790 und 860 nm statt. Eine neue Bande entsteht bei 593 nm, während die  $B_x$ -Bande bei 400 nm nahezu unverändert bleibt. Der Vergleich mit Abbildung 1-2 macht deutlich, dass diese beiden Banden charakteristisch für Porphyrine sind. Die für die Bildung des oxidierten Pigments charakteristischen Chlorinbanden um 680 und ca. 420 nm treten im Absorptionsspektrum nicht in Erscheinung. Dies ist konträr zu den Ergebnissen von Kammhuber (1999), wo nach 25-minütiger Bestrahlung in Methanol sowohl eine Bande um 590 nm als auch die Chlorinbande bei ca. 670 nm entstanden waren. Unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen kommt es bei Pd-BPheid *a* in Methanol somit zur Oxidation bis zum Porphyrin (Oxidation an C-7/8 und C-17/18), wohingegen Zn-BPheid *a* nur bis zum Chlorin (Oxidation an C-7/8) oxidiert. Außerdem spricht die nur bei Pd-BPheid *a* zu beobachtende Absorptionzunahme  $>800$  nm für die Entstehung von Kationradikalen beim oxidativen Photobleichen. Diese sind durch eine breite Absorption in diesem nahen Infrarot Bereich (NIR) charakterisiert (Felton, 1978). Kammhuber (1999) hingegen beschreibt die Bildung von Kationradikalen bei der Belichtung von BChl *a* und Zn-BPhe *a*, nicht aber bei Pd-BPhe *a*.



**Abbildung 5-21.** Kinetik der Bleichung der Q<sub>y</sub>-Absorption während der Belichtung von Pd-BPheid *a* in Lösungsmittel (Aceton ■, Methanol ●, Toluol ▲) unter aeroben Bedingungen.

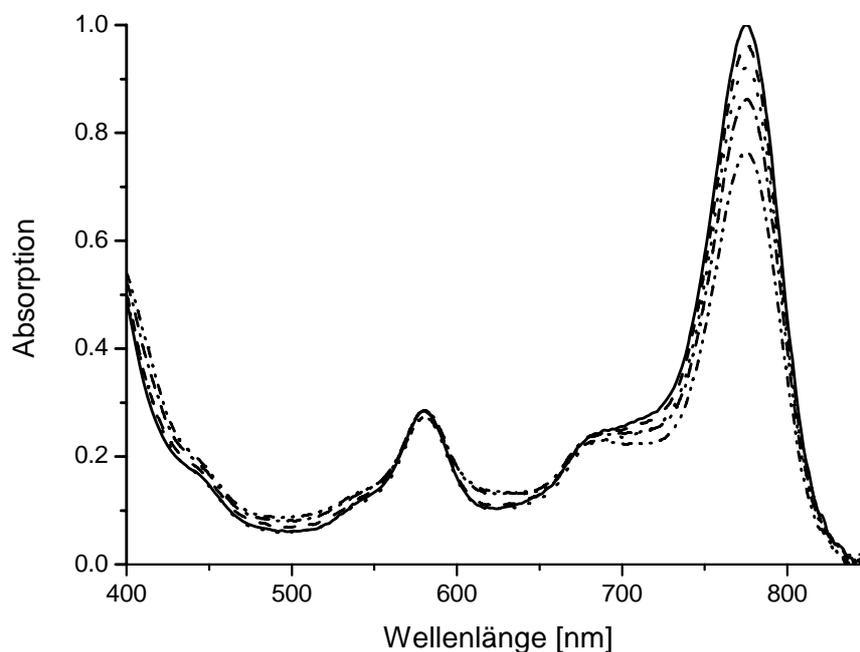


**Abbildung 5-22.** Photooxidation von Pd-BPheid *a* in Methanol unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (-.-) und nach 20 min (-.-.-) Belichtung.

## 5.4 Photostabilität von Ni-Bakteriopheophorbid-*a*-Myoglobin

Ni-BPheid *a* zeigt im Gegensatz zu den Zn- und Pd-(B)Chlorinen weder Fluoreszenz noch Phosphoreszenz. Dies liegt an der sehr schnellen internen Konversion des angeregten  $S_1$ -Zustandes in einen niederenergetischen angeregten Singulett-d-d-Zustand des Zentralmetalls, die Lebenszeit des angeregten  $S_1$ -Zustandes von Ni-BPheid *a* ist extrem kurz (100 fs) (Musewald *et al.*, 1987; Fiedor *et al.*, 2000) und eine Generierung von ROS somit äußerst unwahrscheinlich (Rodriguez und Holten, 1989; Rodriguez und Holten, 1990; Hartwich *et al.*, 1995). Redoxprozesse von Ni-(Bakterio)Chlorinen erfolgen zudem vorwiegend am Zentralmetall, ebenso wie beispielsweise bei Fe- oder Co-Tetrapyrrolen, wohingegen Tetrapyrrole mit Mg, Zn oder Pd als Zentralmetall am Tetrapyrrolring oxidiert oder reduziert werden (Watanabe und Kobayashi, 1991).

Da der Einbau von Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* in die Protein-Komplexe deren Photostabilität wesentlich beeinträchtigt, sollte kurz untersucht werden, ob die Proteinumgebung bei Belichtung ebenfalls Einfluss auf die Stabilität von Ni-BPheid *a* nimmt.



**Abbildung 5-23.** Photoreaktion der Belichtung von Ni-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (---), nach 3 min (.....), nach 10 min (---) und nach 20 min (---) Belichtung.

Die Belichtung von Ni-BPheid-*a*-Mb resultiert jedoch weder unter aeroben noch unter anaeroben Verhältnissen in einer wesentlichen Bleichung des Pigments. Lediglich der Zusatz

des Reduktionsmittels Na-Dithionit und anschließende Belichtung führen zur Reduktion der  $Q_y$ -Absorption um 13% bei einer gleichzeitigen leichten Absorptionszunahme in den Bereichen von 400 bis 560 nm und 600 bis 650 nm (Abbildung 5-23). Photoreduktion in Gegenwart eines starken Reduktionsmittels ist folglich auch bei dem ansonsten stabilen Komplex zwischen Ni-BPheid *a* und Myoglobin möglich.

## 5.5 Produkte der Photooxidationen

Die Pigmente wurden jeweils direkt nach den Belichtungszyklen aus den Protein-Pigment-Lösungen wie in Kapitel 2 beschrieben extrahiert, im Fall der Belichtung in Lösungsmittel wurde das Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne des Pigments entfernt. Außerdem wurden die Chromophore aus den Pigment-Protein-Komplexen zusätzlich im unbelichteten Zustand extrahiert, um diese mit den belichteten Proben zu vergleichen. Die Analyse beschränkte sich hierbei auf die Belichtungen unter aeroben Bedingungen. Die im Folgenden abgebildeten Chromatogramme geben eine qualitative Darstellung der entstandenen Degradationsprodukte, sie wurden – wenn nicht anders vermerkt – jeweils auf das Ursprungspigment normiert, dies dient der besseren Vergleichbarkeit. Abgebildet sind jeweils die Wellenlängen, die die Absorptionsmaxima der Chromophore repräsentieren, wenn mehrere Produkte mit unterschiedlichen Spektren entstanden, wurden alle den jeweiligen Maxima entsprechenden Chromatogramme abgebildet. Die Zuordnung der verschiedenen Peaks erfolgte durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten. Die Absorptionsspektren der unbekanntenen Produkte wurden direkt den Chromatogrammen entnommen, dies kann dazu führen, dass eine leichte Verschiebung der Maxima gegenüber den Verhältnissen in reinem Lösungsmittel erfolgt, da während der HPLC Wasser anteilig im Laufmittel vorhanden war. Aufgrund des divergierenden Laufverhaltens der Säule bei Analysen an verschiedenen Tagen – wahrscheinlich bedingt durch Variation der Lösungsmittel- und Säulentemperatur – oder des Einsatzes einer identischen, aber neuen Säule, waren die Elutionszeiten des gleichen Pigments zum Teil verschoben. Beim direkten Vergleich von derartigen Chromatogrammen wurden diese Verschiebungen manuell\* ausgeglichen.

Da die Photobleichung der Pigmente in den Proteinkomplexen zu größeren spektralen Veränderungen führte als die der freien Pigmente, werden im Folgenden zunächst die Photoprodukte aus den Proteinkomplexen beschrieben, im Anschluss erfolgt die Analyse der Produkte aus der Belichtung der freien Pigmente in Lösungsmittel. Die Produkte der Photoreaktionen von Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* in Puffer werden nicht eigens diskutiert, da

---

\* Hierbei wurde die Zeit-Achse entsprechend der Zeitverschiebung eines Pigmentstandards verschoben.

sie im Fall von Zn-Pheid *a* mit denen in Lösungsmittel übereinstimmen und im Fall von Zn-BPheid *a* keine eindeutigen Resultate erzielt wurden.

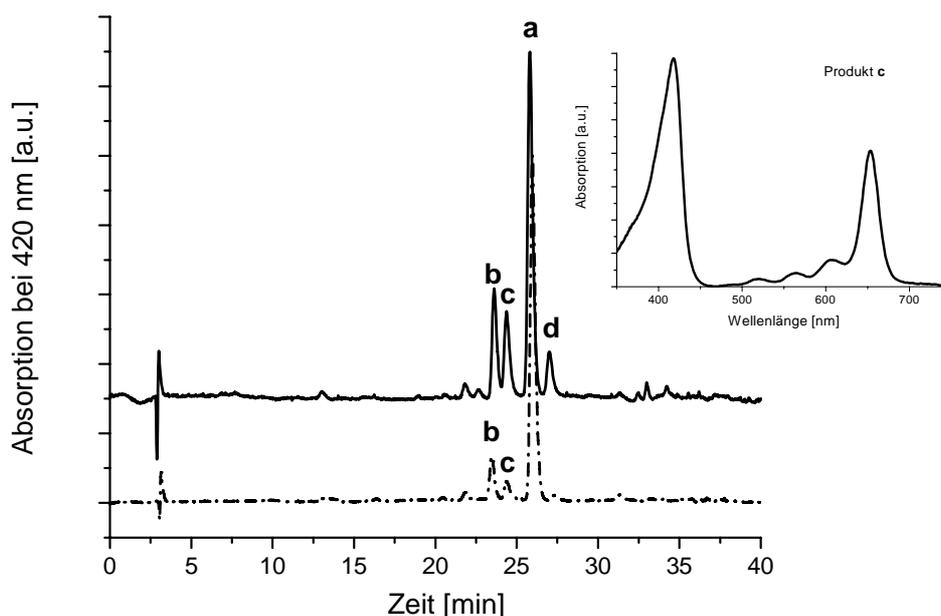
### 5.5.1 Photooxidationsprodukte von Zn-Pheophorbid *a*

#### 5.5.1.1 *Analyse der Produkte aus der Belichtung des Pigment-Myoglobin-Komplexes*

##### Belichtung für 20 Minuten

Sowohl vor als auch nach Belichtung des Komplexes wird der Hauptpeak **a** ( $t_r = 25,8$  min) im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 5-24) durch  $^{13}\text{C}$ -Zn-Pheid *a* verursacht. Dieses Pigment stellt das Hauptprodukt im sichtbaren Wellenlängenbereich dar. Schon vor Belichtung wird dieser Peak von zwei weiteren Peaks geringer Intensität begleitet (**b**,  $t_r = 23,5$  min und **c**,  $t_r = 24,4$  min). Pigment **b** wurde spektral und durch Kochromatographie als  $^{13}\text{C}$ -OH-Zn-Pheid *a* identifiziert. Aufgrund seiner höheren Polarität zeigt es auf der RP-Säule ein etwas schnelleres Laufverhalten als das Edukt Zn-Pheid *a*. Die Präsenz dieses Pigments im Protein-Komplex schon vor der Belichtung beruht auf der sehr leichten Bildung dieses Produkts, die schon bei der Rekonstitution oder während des Extraktionsprozesses geschieht. Die Struktur des Pigments **c** konnte aufgrund seiner geringen Verfügbarkeit nicht aufgeklärt werden. Sein Absorptionsspektrum (Abbildung 5-24) mit Maxima bei 418 und 653 nm und einem Intensitätsverhältnis  $A_{\text{Soret}}/A_{\text{Qy}} = 1,7$  weist eindeutig darauf hin, dass es sich um ein Chlorin handelt. Das Molekulargewicht dieses Produkts wurde massenspektroskopisch zu 686 g/mol bestimmt. Damit beträgt die Massendifferenz zu Zn-Pheid *a* 32 g/mol. Dies entspricht der Masse eines  $\text{O}_2$ -Moleküls. Die Retentionszeit von Produkt **c** liegt zwischen der von  $^{13}\text{C}$ -OH-Zn-Pheid *a* und Zn-Pheid *a* auf der RP-Säule, was in Übereinstimmung mit einer sauerstoffreichen Verbindung steht.

Nach der 20-minütigen Belichtung von Zn-Pheid-*a*-Mb unter aeroben Bedingungen nehmen die Intensitäten der Peaks **b** und **c** relativ zu Peak **a** stark zu, außerdem wird ein weiteres Produkt gebildet (**d**,  $t_r = 27,0$  min). Dieses wurde anhand seines Spektrums und durch Kochromatographie als Zn-Proto-Pheid *a* identifiziert. Es besitzt eine zusätzliche Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C-17/C-18 und wurde demnach während der Belichtung an dieser Position oxidiert. Der korrespondierende Mg-Komplex, Proto-Chlid *a*, ist ein spätes Intermediat der Chl-Biosynthese (Griffiths, 1991).

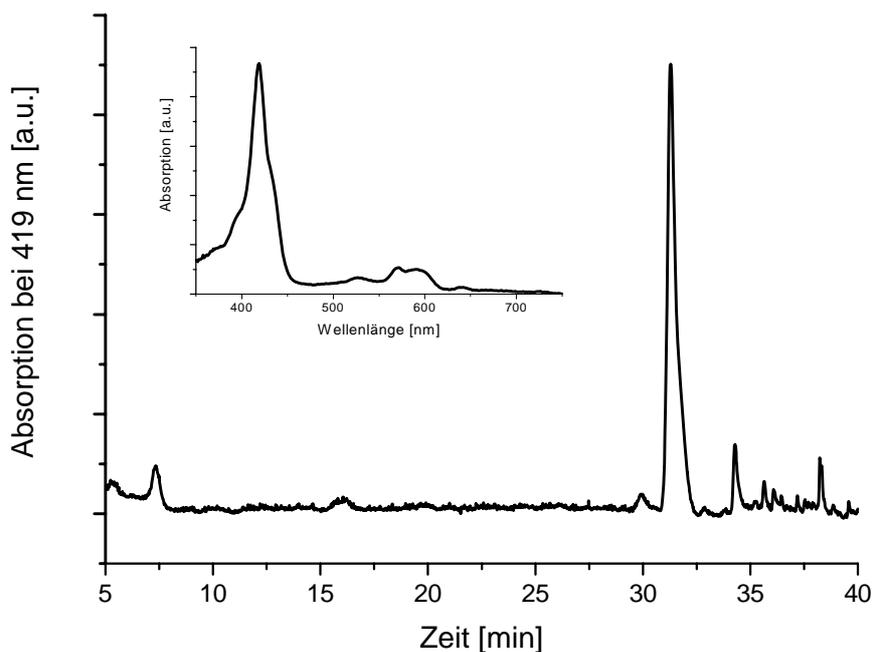


**Abbildung 5-24.** HPLC-Chromatogramme von Zn-Pheid *a* und Derivaten nach der Extraktion aus Zn-Pheid-*a*-Mb vor (---) und nach (—) Belichtung des Pigment-Protein-Komplexes für 20 min unter aeroben Bedingungen in Puffer-I. Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: **a** =  $13^2\text{R-Zn-Pheid } a$ , **b** =  $13^2\text{S-OH-Zn-Pheid } a$ , **d** = Proto-Zn-Pheid *a*. Die Struktur von Produkt **c** ( $M_c = 686 \text{ g/Mol}$ ) ist nicht bekannt.

*Inset:* Absorptionsspektrum von Produkt **c**, entnommen aus dem Chromatogramm.

### Belichtung für zwei Stunden

Aufgrund der viel besseren Verfügbarkeit und geringen Labilität der Pigment-Myoglobin-Komplexe wurden diese, im Gegensatz zu den Pigment-Albumin-Komplexen, zusätzlich einer zweistündigen Bestrahlung mit rotem Licht ( $\lambda \geq 630 \text{ nm}$ ) unter aeroben Bedingungen ausgesetzt. Hierbei entsteht bei Zn-Pheid-*a*-Mb ein Hauptprodukt mit einer Retentionszeit  $t_r = 31,3 \text{ min}$  auf der RP-Säule (Abbildung 5-25). Das Spektrum dieser Komponente (Abbildung 5-25) besitzt eine intensive Soret-Absorption bei 419 nm gefolgt von relativ schwacher Absorption im Bereich der Q-Übergänge (571 nm und 590 nm). Die nahezu vollständige Übereinstimmung mit dem Spektrum des von Schulz (1999) synthetisierten  $7^1$ -Aminophenyl-Protopheophorbid *a* zeigt, dass es sich bei diesem Produkt um ein Porphyrin (Oxidation an C-7/C-8 und C-17/C-18) ohne Zentralmetall handelt. Da die Wahrscheinlichkeit einer Entmetallierung in der Reihe Porphyrin > Chlorin > Bakteriochlorin abnimmt (Scheer, 2005), findet der Verlust des Zentralmetalls wahrscheinlich erst nach der Oxidation des Chlorins, Zn-Pheid *a*, zum Porphyrin, Zn-Proto-Pheid *a*, statt. Die im gezeigten Chromatogramm sichtbaren Peaks mit einer Retentionszeit  $t_r \geq 34 \text{ min}$  wurden nicht analysiert, da die Säule nach dieser Zeit starke Schwankungen zeigte und sich in der Reequilibrierungsphase befindet.

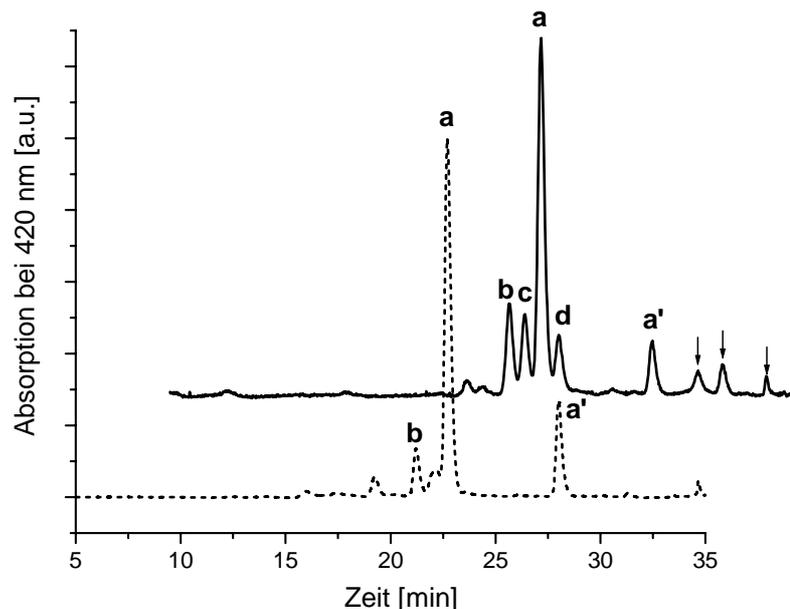


**Abbildung 5-25.** HPLC-Chromatogramm des Extrakts der Belichtung von Zn-Pheid-*a*-Mb für zwei Stunden unter aeroben Bedingungen in Puffer-I.

*Inset:* Absorptionsspektrum des Produkts bei 31,3 min, entnommen aus dem Chromatogramm.

### 5.5.1.2 Analyse der Produkte aus der Belichtung des Pigment-Albumin-Komplexes

Die Produktanalyse der Zn-Pheid-*a*-BSA-Komplexe nach 20 min Belichtung in Puffer-I unter aeroben Bedingungen ergab im Wesentlichen das gleiche Ergebnis wie bei den Myoglobin-Komplexen (Abbildung 5-26). Die größte relative Häufigkeit besitzt wiederum  $13^2\text{R}$ -Zn-Pheid *a* (Peak **a**), gefolgt von  $13^2\text{S-OH}$ -Zn-Pheid *a* (Peak **b**), dem unbekanntem Produkt **c** und Zn-Proto-Pheid *a* (Peak **d**). Überprüft wurde diese Zuordnung wiederum anhand der Absorptionsspektren dieser Produkte und durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten. Im Gegensatz zu den Myoglobin-Komplexen bindet BSA auch das  $13^2\text{S}$ -Epimer (Zn-Pheid *a'*) von Zn-Pheid *a*, dieses hat eine um 5,3 min längere Retentionszeit auf der RP-Säule (Peak **a'**). Die im Vergleich zu Abbildung 5-24 kürzeren Retentionszeiten aller Pigmente sind durch die Verwendung einer identischen, aber neuen RP-Säule bedingt. Die zuvor verwendete Säule hatte stark an Trennleistung verloren.

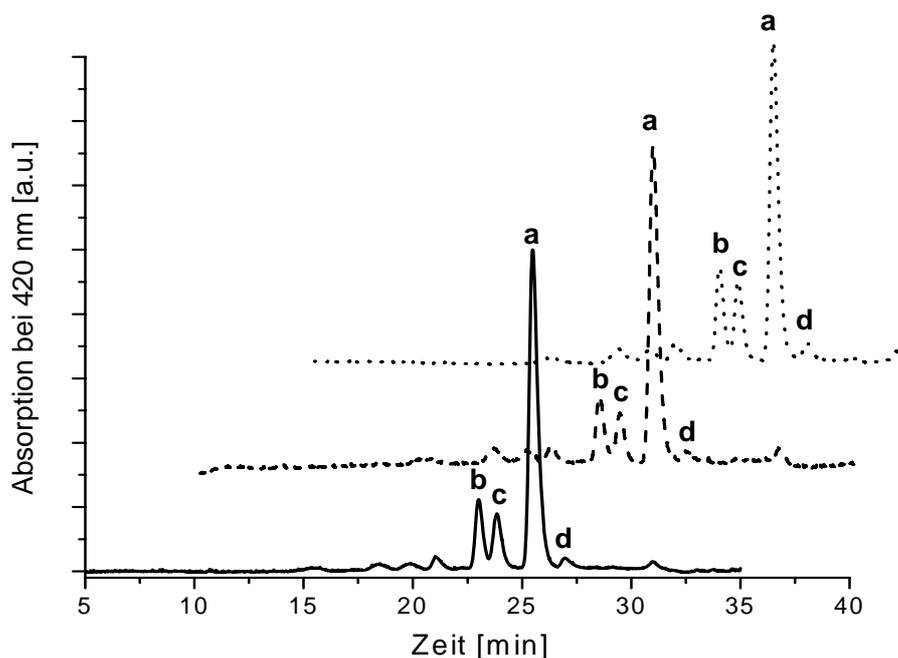


**Abbildung 5-26.** HPLC-Chromatogramme von Zn-Pheid *a* und Derivaten nach der Extraktion aus Zn-Pheid-*a*-BSA vor (---) und nach (—) Belichtung des Pigment-Protein-Komplexes für 20 min unter aeroben Bedingungen in Puffer-I. Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: **a** =  $13^2\text{R-Zn-Pheid } a$ , **a'** =  $13^2\text{S-Zn-Pheid } a$ , **b** =  $13^2\text{S-OH-Zn-Pheid } a$ , **d** = Proto-Zn-Pheid *a*. Die Struktur von Produkt **c** ( $M_c = 686 \text{ g/Mol}$ ) ist nicht bekannt. Die Absorptionsspektren der mit einem Pfeil gekennzeichneten Peaks waren von äußerst geringer Intensität und zeigten starke Streuung. Es handelt sich hierbei offensichtlich um Chlorine ohne Zentralmetall, der Verlust des  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions spiegelte sich in den zwei für Pheophorbide charakteristischen Banden im  $Q_x$ -Bereich wider.

Die Untersuchung der Photoprodukte der Zn-Pheid-*a*-BSA-Komplexe gestaltete sich aufgrund der Labilität und geringen Verfügbarkeit dieser Komplexe als äußerst schwierig, da während des Aufreinigungsprozesses das Pigment sehr leicht zu seinem  $13^2\text{-OH-Derivat}$  oxidierte. Gezeigt ist in Abbildung 5-26 somit eine optimale Präparation.

### 5.5.1.3 Analyse der Produkte aus der Belichtung des Pigments in Lösungsmittel

Bei der 20-minütigen Belichtung von Zn-Pheid *a* in den Lösungsmitteln Aceton, Methanol und Toluol unter aeroben Bedingungen treten in den Chromatogrammen neben dem Hauptpeak **a** ebenfalls die Peaks **b** und **c** auf (Abbildung 5-27). Die Zuordnung der einzelnen Peaks erfolgte wie zuvor beschrieben. Zn-Pheid *a* macht wieder den größten Anteil an Pigment aus, gefolgt von  $13^2\text{S-OH-Zn-Pheid } a$  und dem unbekanntem Produkt **c**. Proto-Zn-Pheid *a* (Peak **d**) wird nur in Spuren gebildet. Die Belichtung in Puffer führt zu den gleichen Produkten.



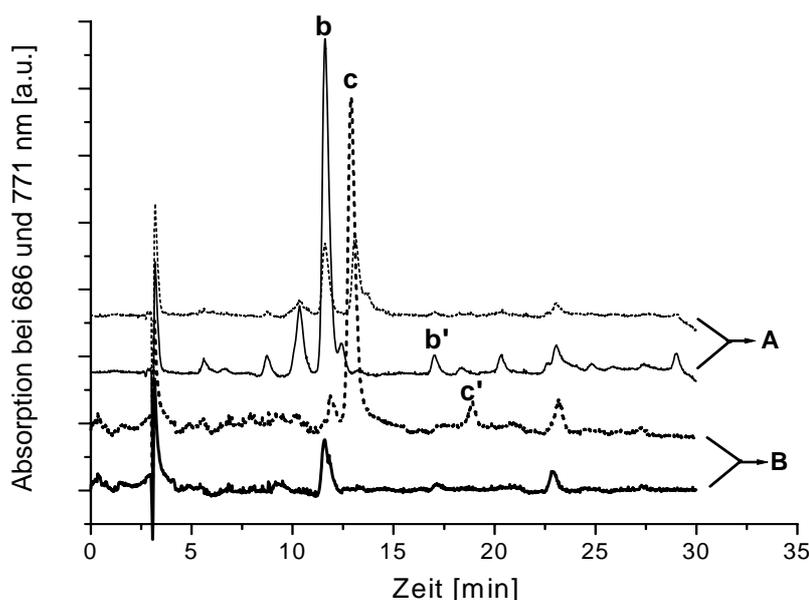
**Abbildung 5-27.** HPLC-Chromatogramme von Zn-Pheid *a* und Derivaten nach 20-minütiger Belichtung in Aceton (—), Methanol (---) und Toluol (.....) unter aeroben Bedingungen. Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: **a** =  $13^2R$ -Zn-Pheid *a*, **b** =  $13^2S$ -OH-Zn-Pheid *a*, **d** = Proto-Zn-Pheid *a*. Die Struktur von Produkt **c** ( $M_c = 686$  g/Mol) ist nicht bekannt.

## 5.5.2 Photooxidationsprodukte von Zn-Bakteriopheophorbid *a*

### 5.5.2.1 Analyse der Produkte aus der Belichtung des Pigment-Myoglobin-Komplexes

#### Belichtung für 20 Minuten

Die HPLC-Analyse der Photoprodukte von Zn-BPheid-*a*-Mb nach 20 min Belichtung mit rotem Licht ( $\lambda \geq 630$  nm) unter aeroben Bedingungen ergab nur ein farbiges Produkt (**c**,  $t_r = 12,8$  min) neben dem Edukt  $13^2R$ -Zn-BPheid *a* (Peak **b**,  $t_r = 11,7$  min). Anhand seines Spektrums, das ein typisches Chlorin-Spektrum ist, und durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten, wurde Produkt **c** als 3-Acetyl- $13^2R$ -Zn-Pheid *a* identifiziert. Wie bei der Oxidation von BChl *a* entsteht es durch Dehydrogenierung der Kohlenstoffatome C-7/C-8 (Smith und Calvin, 1966). Ähnlich der Dehydrogenierung an C-17/C-18 (s. oben) hat dieses Produkt eine erhöhte Retentionszeit auf der RP-Säule, entsprechend einer geringeren Polarität. Die zu den beiden Pigmenten korrespondierenden S-Epimere (Peak **b'** und **c'**) sind vor und nach Belichtung nur in Spuren vorhanden.



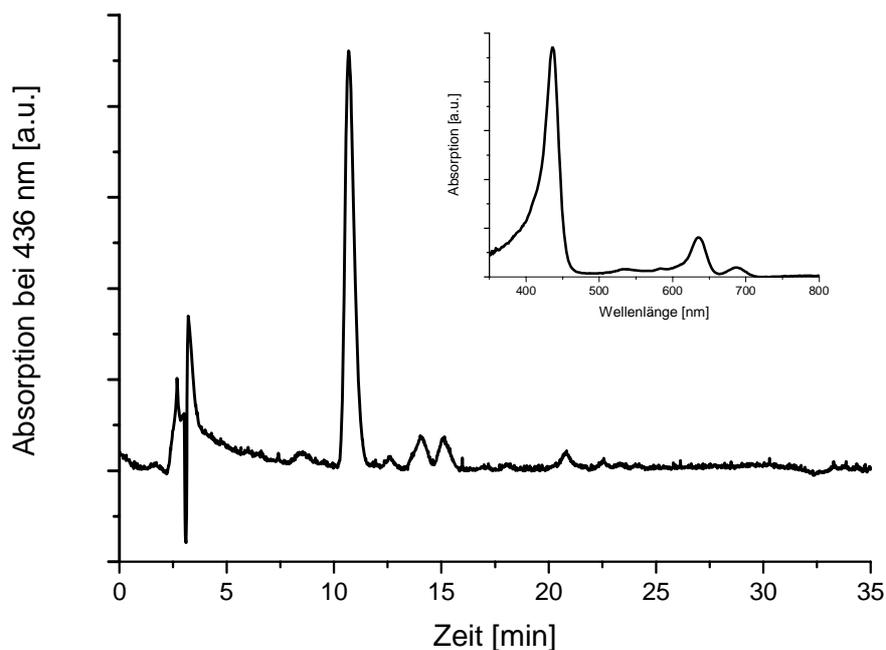
**Abbildung 5-28.** HPLC-Chromatogramme von Zn-BPheid *a* und Derivaten nach der Extraktion aus Zn-BPheid-*a*-Mb vor (A) und nach (B) Belichtung des Pigment-Protein-Komplexes für 20 min unter aeroben Bedingungen in Puffer-I. Durch Kochchromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: **b** =  $^{13^2}\text{R}$ -Zn-BPheid *a*, **b'** =  $^{13^2}\text{S}$ -Zn-BPheid *a*, **c** = 3-Acetyl- $^{13^2}\text{R}$ -Zn-BPheid *a*, **c'** = 3-Acetyl- $^{13^2}\text{S}$ -Zn-BPheid *a*.

Die Chromatogramme wurden auf den jeweiligen Hauptpeak normiert, relativ dazu erfolgte die Normierung des jeweils begleitenden Chromatogramms. Extrahiert wurden die vier Chromatogramme bei 686 nm (---) und 771 nm (—), was jeweils den Absorptionsmaxima von Bakteriochlorin und Chlorin entspricht.

### Belichtung für zwei Stunden

Die Belichtung von Zn-BPheid-*a*-Mb für zwei Stunden unter aeroben Bedingungen ergibt in geringer Ausbeute ein farbiges Produkt mit einer Retentionszeit von  $t_r = 10,7$  min (Abbildung 5-29). Das Absorptionsspektrum dieses Pigments zeigt einen intensiven Übergang im Soret-Bereich bei 436 nm und einen Übergang im Q-Bereich bei 635 nm. Das Verhältnis dieser Übergänge beträgt  $A_{\text{Soret}}/A_{\text{Q}} = 5,8$ . Zusätzlich ist eine schwache Bande bei 687 nm sichtbar. Die ausgeprägte Soret-Bande und die relativ niedrige Absorption im Q-Bereich ähneln den Verhältnissen im Absorptionsspektrum des Pigments, das nach zweistündiger Belichtung des Zn-Pheid-*a*-Mb-Komplexes entsteht. Die Einheitlichkeit der Soret-Bande und die scharfe Bande bei 635 nm, die im Gegensatz zu der dort beobachteten Bandenstruktur zwischen 500 und 620 nm steht (vgl. auch Schulz (1999)), widersprechen allerdings dem Verlust des Zentralmetalls. Somit handelt es sich bei diesem Photooxidationsprodukt von Zn-BPheid *a* um ein Zn-Porphyrin. Die Tatsache, dass im Fall des Chlorin-Komplexes zusätzlich zu den Oxidationsreaktionen eine Entmetallierung stattgefunden hat, diese beim Bakteriochlorin-Komplex aber nicht eingetreten ist, steht im Einklang damit, dass die Wahrscheinlichkeit

einer Entmetallierung in der Reihe Porphyrin > Chlorin > Bakteriochlorin abnimmt (Scheer, 2005). Der isozyklische Ring bleibt offensichtlich sowohl bei Zn-Pheid *a* als auch bei Zn-BPheid *a* auch nach zweistündiger Belichtung im Mb-Komplex erhalten. Die Spektren beider Produkte haben im langwelligen Bereich >500 nm nicht den Charakter von M-Proto-porphyrin-IX-Spektren (vgl. Smith (1975) und Adar (1978)).



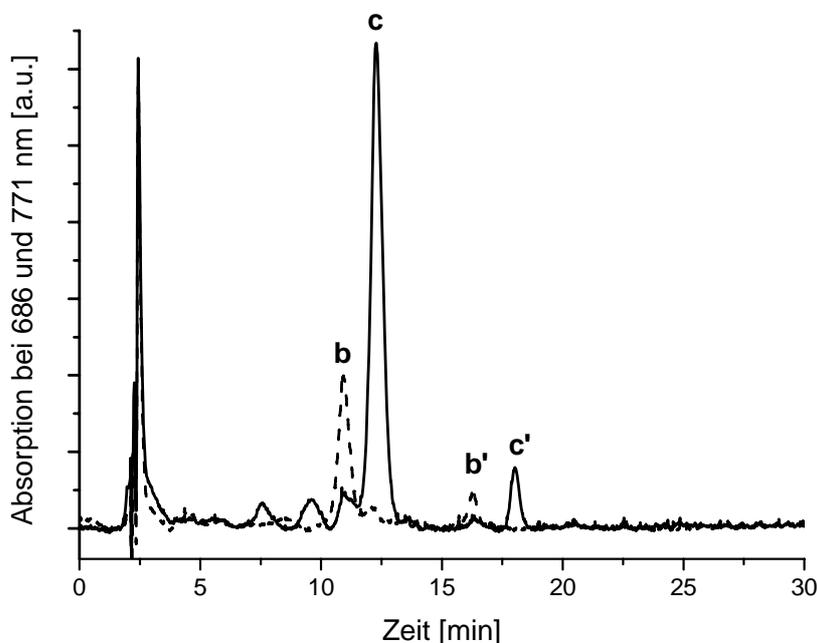
**Abbildung 5-29.** HPLC-Chromatogramm des Extrakts der Belichtung von Zn-BPheid-*a*-Mb für zwei Stunden unter aeroben Bedingungen in Puffer-I.

*Inset:* Absorptionsspektrum des Produkts bei 10,7 min, entnommen aus dem Chromatogramm.

### 5.5.2.2 Analyse der Produkte aus der Belichtung des Pigment-Albumin-Komplexes

Wie schon in den Absorptionsspektren (Abbildung 4-6) erkennbar war, enthalten die Präparationen der Zn-BPheid-*a*-BSA-Komplexe neben Zn-BPheid *a* (und Zn-BPheid *a'*) nach dem Darstellungs- und Aufreinigungsprozess relativ viel Oxidationsprodukt, 3-Acetyl-Zn-Pheid *a*. Nach 20-minütiger Belichtung des Komplexes unter aeroben Bedingungen stellt dieses das farbige Hauptprodukt (Peak **c**) neben dem Edukt (Peak **b**) dar (Abbildung 5-30). Außerdem sind geringe Mengen der jeweiligen S-Epimere enthalten (Peak **b'** und **c'**). Die im Vergleich zu Abbildung 5-28 größere relative Intensität von Peak **b** zu Peak **c** bedeutet nicht, dass Zn-BPheid *a* im Komplex mit BSA stabiler ist als im Komplex mit Mb. Dies widerspricht den während der Belichtung aufgenommenen Absorptionsspektren (Abbildung

5-15 und 5-19). Sie basiert wahrscheinlich auf der vermehrten Bildung farbloser Photo-  
 produkte im BSA-Komplex, wodurch sich die Relation von 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* zu Zn-  
 BPheid *a* verschiebt.

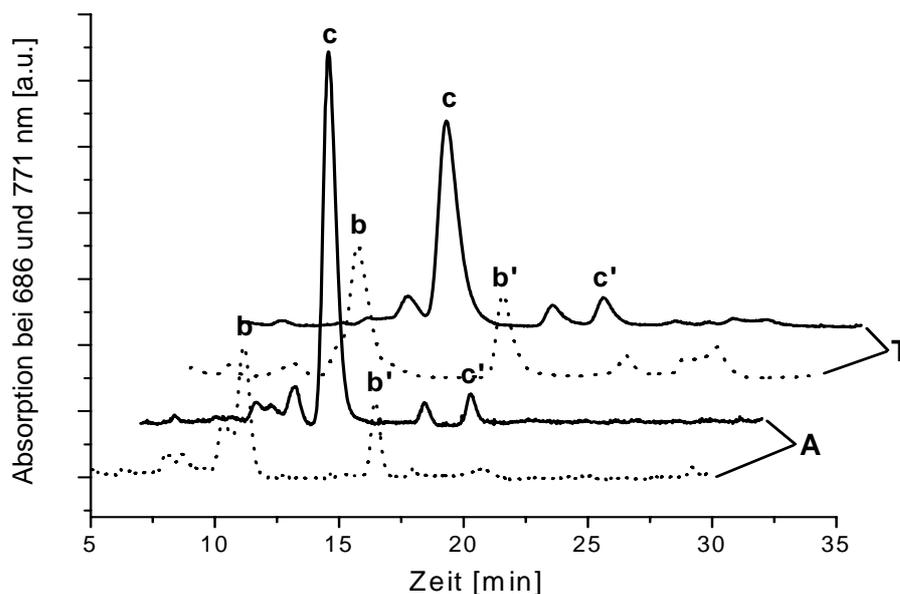


**Abbildung 5-30.** HPLC-Chromatogramme von Zn-BPheid *a* und Derivaten nach der Extraktion aus dem 20 min belichteten Zn-BPheid-*a*-BSA-Komplex in Puffer-I unter aeroben Bedingungen, bei 686 nm (—) und 771 nm (---). Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: **b** =  $^{132}\text{R}$ -Zn-BPheid *a*, **b'** =  $^{132}\text{S}$ -Zn-BPheid *a*, **c** = 3-Acetyl- $^{132}\text{R}$ -Zn-BPheid *a*, **c'** = 3-Acetyl- $^{132}\text{S}$ -Zn-BPheid *a*.

### 5.5.2.3 Analyse der Produkte aus der Belichtung des Pigments in Lösungsmittel

#### Belichtung in Aceton und Toluol

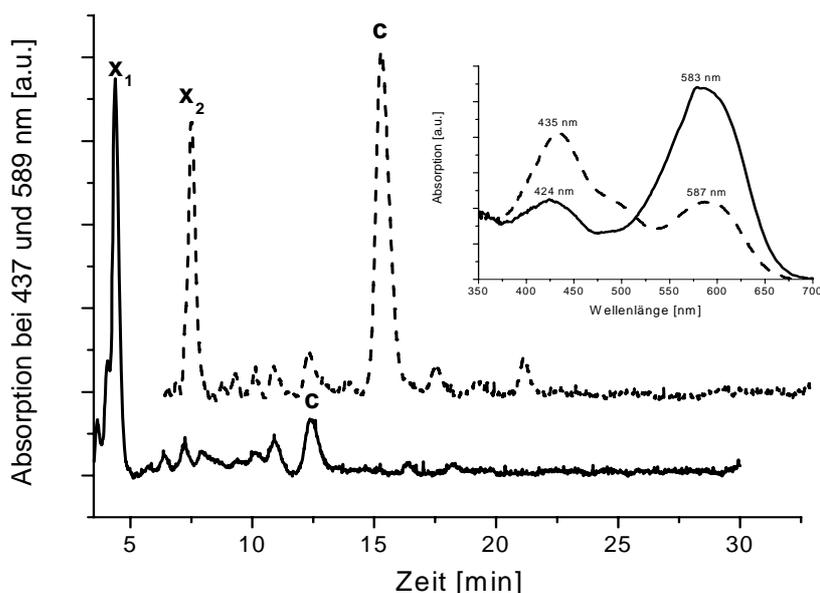
Die 20-minütige Belichtung von Zn-BPheid *a* (mit geringen Mengen an Zn-BPheid *a'*, welches sich im präparativen Maßstab nicht abtrennen ließ) unter aeroben Bedingungen in Aceton und Toluol führt in beiden Fällen zu dem schon bekannten Hauptprodukt **c**, 3-Acetyl-Zn-BPheid *a*, sowie in geringem Mengen zu dessen S-Epimer (Peak **c'**) (Abbildung 5-31). Gleichzeitig treten die zu den Edukten gehörenden Peaks **b** und **b'** auf. Das Verhältnis von Bakteriochlorin zum entsprechenden Chlorin ist in den Chromatogrammen des Toluolversuchs größer als bei denen des Acetonversuchs. Die geringere Menge an gebildetem Chlorin im Fall von Toluol stimmt mit den absorptionsspektroskopischen Daten überein.



**Abbildung 5-31.** HPLC-Chromatogramme von Zn-BPheid *a* und Derivaten nach 20-minütiger Belichtung in Aceton (A) und Toluol (T) unter aeroben Bedingungen, bei 686 nm (—) und 771 nm (····). Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: **b** = 13<sup>2</sup>R-Zn-BPheid *a*, **b'** = 13<sup>2</sup>S-Zn-BPheid *a*, **c** = 3-Acetyl-13<sup>2</sup>R-Zn-BPheid *a*, **c'** = 3-Acetyl-13<sup>2</sup>S-Zn-BPheid *a*. Die bei 771 nm registrierten Chromatogramme wurden jeweils auf Peak **b** normiert, die bei 686 nm wurden jeweils relativ dazu normiert.

### Belichtung in Methanol

Die Belichtung von Zn-BPheid *a* (mit geringen Mengen an Zn-BPheid *a'*, s. oben) in Methanol unter aeroben Bedingungen führt neben der Bildung von 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* (Peak **c**) zum Auftreten zweier weiterer Produkte (Peak **x**<sub>1</sub> und Peak **x**<sub>2</sub>) mit Retentionszeiten von  $t_{r-x_1} = 4,4$  min und  $t_{r-x_2} = 4,6$  min (Abbildung 5-32). Die Absorptionsspektren dieser Pigmente besitzen nicht mehr die Charakteristika der Spektren zyklischer Tetrapyrrole mit intensiven Soret-Übergängen und mehr oder weniger intensiven Q-Übergängen, sie ähneln vielmehr den Spektren offenkettiger Tetrapyrrole, der Biline. Gleichzeitig sprechen die sehr kurzen Retentionszeiten auf der RP-Säule für stark polare Produkte, wie sie beispielsweise durch oxidative Spaltung einer Methinbrücke entstehen (vgl. Bonnett und Martinez (2001)).



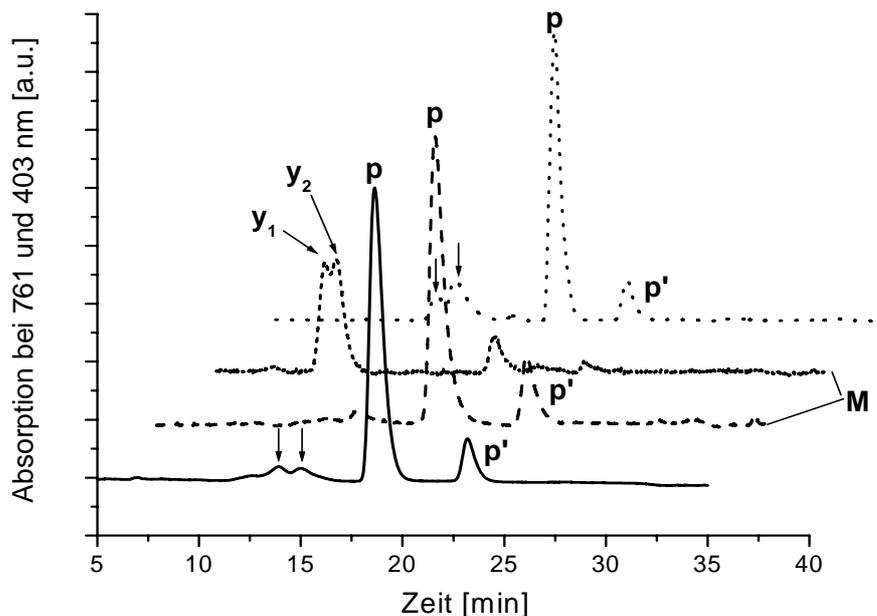
**Abbildung 5-32.** HPLC-Chromatogramm von Zn-BPheid *a* und Derivaten nach 20-minütiger Belichtung in Methanol unter aeroben Bedingungen, bei 437 nm (---) und 589 nm (—).

*Inset:* Absorptionsspektren der Produkte  $x_1$  (—) und  $x_2$  (---), entnommen aus dem Chromatogramm.

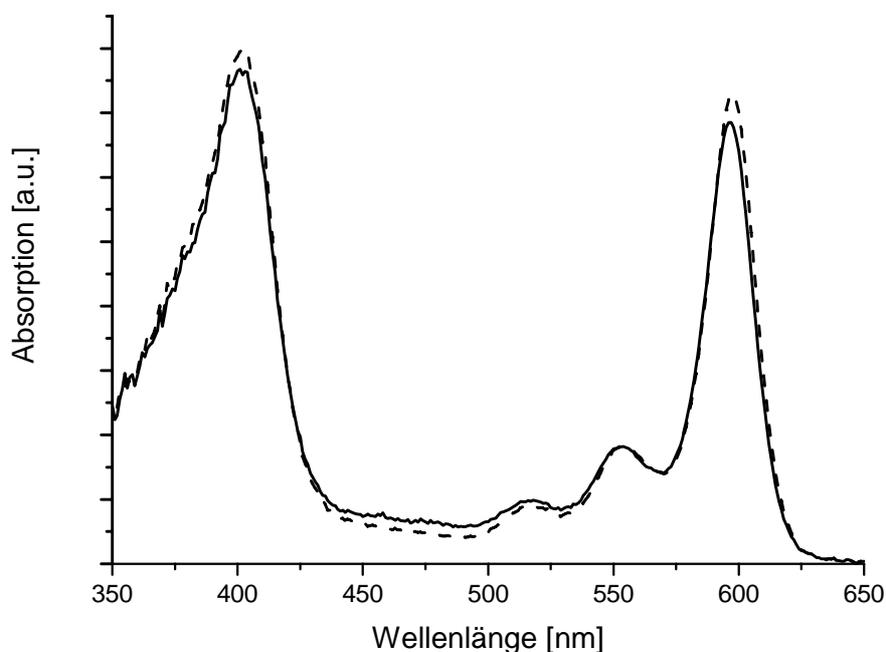
Da die Belichtung von Zn-BPheid *a* in Puffer-I keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, wurde auf eine Darstellung an dieser Stelle verzichtet. Es lässt sich lediglich festhalten, dass unter diesen Bedingungen Chlorine in wechselnden Anteilen gebildet werden.

### 5.5.3 Photooxidationsprodukte von Pd-Bakteriopheophorbid *a* in Lösungsmittel

Bei der 20-minütigen Belichtung von Pd-BPheid *a* mit rotem Licht ( $\lambda \geq 630$  nm) unter aeroben Bedingungen in Aceton, Methanol oder Toluol entstehen nur in sehr geringem Ausmaß Photooxidationsprodukte (vgl. Kapitel 5.3). Dies spiegelt sich in den Chromatogrammen der Belichtungsreaktionen in Lösungsmittel wider (Abbildung 5-33). Der Hauptpeak **p** ( $t_r = 18,7$  min) entspricht jeweils dem Edukt, Produkt **p'** wurde aufgrund seines mit Pd-BPheid *a* identischen Absorptionsspektrums dessen S-Epimer zugeordnet. Eine Vergleichssubstanz für die Kochromatographie war nicht vorhanden, daher ist diese Zuordnung nicht gesichert. In Aceton und Toluol bildeten sich zudem in geringem Ausmaß Produkte, die alle ein fast identisches, Bakteriochlorin-typisches Absorptionsspektrum mit Banden bei 761, 525 und 390 nm besitzen. Die Intensität der  $Q_y$ -Banden war jeweils dreimal so hoch wie die der Soret-Banden. Produkte mit für 3-Acetyl-Pd-Pheid *a* – dem zu 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* analogen Oxidationsprodukt – charakteristischen Chlorin-Spektren wurden nicht gebildet.



**Abbildung 5-33.** HPLC-Chromatogramme von Pd-BPheid *a* und Derivaten nach 20-minütiger Belichtung unter aeroben Bedingungen in Aceton (—), Methanol (M: --/761 nm, ----/403 nm) und Toluol (.....). Peak **p** entspricht Pd-BPheid *a*, die Zuordnung von Peak **p'** zu Pd-BPheid *a'* geschah aufgrund des Fehlens einer Vergleichssubstanz allein durch die Identität der Absorptionsspektren. Die Peaks **y**<sub>1</sub> und **y**<sub>2</sub> konnten nicht zugeordnet werden, die zugehörigen Absorptionsspektren sind in Abbildung 5-34 abgebildet. Alle Peaks, die mit einem Pfeil gekennzeichnet sind, besitzen typische Bakteriochlorinspektren mit intensiver Q<sub>y</sub>-Absorption bei 761 nm und schwacher Soret-Absorption bei ca. 390 nm. Die Q<sub>x</sub>-Banden befinden sich bei ca. 525 nm.



**Abbildung 5-34.** Absorptionsspektren der Produkte **y**<sub>1</sub> (—) und **y**<sub>2</sub> (---) aus Abbildung 5-33, die Spektren wurden direkt dem HPLC-Chromatogramm entnommen.

Einzig in Methanol entstehen 2 Produkte,  $y_1$  ( $t_r = 10,4$  min) und  $y_2$  ( $t_r = 10,9$  min), die Chlorin-typische Absorptionsspektren haben (Abbildung 5-34). Die Maxima dieser Spektren liegen bei beiden Produkten bei 403 und 597 nm, das Verhältnis von Soret-Bande zu Q<sub>y</sub>-Bande liegt bei 1,1 (Abbildung 5-34).

Die Untersuchung der Photoprodukte von Pd-BPheid *a* wird derzeit detailliert von Limantara bearbeitet, aufgrund dessen wird darauf in dieser Arbeit nicht vertiefend eingegangen.

## 5.6 Zusammenfassende Diskussion

In der Photobiologie der Chlorophylle und verwandter Chromophore werden drei Haupttypen von Photoreaktionen unterschieden, die als Photooxidation, Photoreduktion und Photopheophytinisierung bezeichnet werden.

Bei Photooxidationsprozessen können Ein- oder Zwei-Elektronen-Reaktionen stattfinden. Die Ein-Elektronen-Reaktionen führen sowohl in Lösung (Chauvet *et al.*, 1981; Tollin, 1991) als auch bei der Ladungstrennung in den photosynthetischen Reaktionszentren (Parson, 1991) zur Bildung von Kationradikalen, z.B. (B)Chl<sup>•+</sup>, die unter anderem durch ihre Absorption im nahen Infrarotbereich >800 nm (NIR) nachgewiesen werden können (Felton, 1978). Bei den Zwei-Elektronen-Oxidationen, die auch über radikalische Zwischenstufen verlaufen können (Seely, 1966), kommt es zur Bildung stabiler Oxidationsendprodukte, wobei sich meist die Zahl der Doppelbindungen im Molekül erhöht. Aus den Bakteriochlorinen, z.B. BChl *a*, entstehen hierbei durch Oxidation der Kohlenstoffatome C-7/C-8 Chlorine, wie z.B. 3-Acetyl-Chl *a* (Smith und Calvin, 1966). Diese können weiter zu Porphyrinen, wie z.B. Proto-Chl *a*, oxidieren, wobei zusätzlich an den Kohlenstoffatomen C-17/C-18 eine Doppelbindung entsteht (Seely, 1966). Die sich hierdurch ergebenden Veränderungen im Absorptionsspektrum dieser Pigmente sind in Abbildung 1-2 zusammengefasst. Beim Einbau von Sauerstoff in die Pigmente handelt es sich ebenfalls um eine Zwei-Elektronen-Oxidation.

Photoreduktionen können ebenfalls nach Ein- und Zwei-Elektronen-Reaktionen unterschieden werden. Ein-Elektronen-Reduktionen sind im photosynthetischen Reaktionszentrum die Folge des Elektronenübergangs vom angeregten Elektronendonator, meist einem Chl- oder BChl-Dimer, auf den Elektronenakzeptor, meist ebenfalls ein (B)Chl, wodurch ein Anionradikal, z.B. BChl<sup>•-</sup>, gebildet wird (Parson, 1991). Nach Weitergabe des Elektrons auf die nachfolgenden Akzeptoren liegt der Elektronenakzeptor wieder unverändert vor. Bei den Zwei-Elektronen-Reduktionen kommt es, ähnlich wie bei den Oxidationen (s. oben), zur Bildung isolierbarer Produkte, die aber auch wieder rückoxidiert werden können. Der während der Chl-Biosynthese durch das Enzym NADPH-Protochlorophyllid-Oxidoreduktase

katalysierte Schritt vom Proto-Chlid, einem Porphyrin, zum Chlid, einem Chlorin, ist ein faszinierendes Beispiel für eine derartige, unter aeroben Bedingungen im Licht ablaufende Reduktion (Griffiths, 1991). *In vitro* hat schon 1948 Krasnovskii die Photoreduktion von Chl *a* zu einem roten Produkt beobachtet (Krasnovskii, 1948), dessen Struktur später als 10,20-Dihydro-Chl *a* bestimmt wurde (Scheer und Katz, 1974).

Neben Oxidations- und Reduktionsreaktionen können auch Entmetallierungsreaktionen von Chlorophyllen durch Licht beschleunigt werden (Seely, 1966). Dies wird als Photopheophytinisierung bezeichnet. In Gegenwart schwacher Säuren wurden diese für Chlorophylle schon 1963 beschrieben (Krasnovskii und Pakshina, 1963).

Die folgende Diskussion der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Photoreaktionen bzw. der dabei entstehenden Photoprodukte und Intermediate erfolgt in Bezugnahme auf diese drei bzw. fünf Reaktionstypen.

### 5.6.1 Produkte der Photoreaktionen

#### Photooxidation

Die isolierten Photooxidationsprodukte von Zn-Pheid *a* und Zn-BPheid *a* sprechen dafür, dass sowohl in organischen Lösungsmitteln als auch in Myoglobin und Albumin der Reaktionsablauf ähnlich ist. Unter oxidierenden Bedingungen finden Dehydrogenierungsreaktionen statt, die aus Bakteriochlorophylliden wie Zn-BPheid *a* Chlorophyllide formen und aus Chlorophylliden wie Zn-Pheid *a* Protochlorophyllide bilden. Einmal werden formal zwei Wasserstoffatome an Ring B abstrahiert, hierdurch erfolgt der Übergang vom Bakteriochlorin zum Chlorin, das andere Mal erfolgt die Abstraktion an Ring D, während Ring B schon oxidiert ist, wodurch Zn-Proto-Pheid entsteht. Außerdem oxidiert Zn-Pheid *a* zu 13<sup>2</sup>-OH-Zn-Pheid *a*. Gleichzeitig findet ein Bleichen zu Produkten statt, die nur eine geringe oder gar keine Absorption im sichtbaren Bereich des Spektrums besitzen. Das Auftreten derartiger farbloser Produkte (Smith und Calvin, 1966; Brown *et al.*, 1991; Kräutler und Matile, 1999) und die Photooxidation des Bakteriochlorins zum entsprechenden Chlorin (Kim, 1966; Smith und Calvin, 1966; Brereton und Sanders, 1983b; Marsh und Connolly, 1984; Marsh und Connolly, 1984; Kammhuber, 1999) sind vor allem für die Photooxidation von BChl vielfach beschrieben. Die auch in dieser Arbeit beobachtete größere Stabilität der Chlorophyll-Derivate im Vergleich zu den Bakteriochlorophyll-Derivaten wurde für Chl *a* und BChl *a* ebenfalls beschrieben (Marsh und Connolly, 1984; Krasnovskii *et al.*, 1985; Borland *et al.*, 1987; Borland *et al.*, 1989).

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass im Fall von Zn-BPheid *a* die Oxidation im Dunkeln fortschreitet. Derartige Reaktionen wurden kürzlich bei Carotinoiden beobachtet, wo sie der Bildung von Carotinoid-Peroxiden zugeschrieben wurden (Fiedor *et al.*, 2005). Das Auffinden eines Photoprodukts mit einer Masse, die um genau 32 g/Mol, der Masse eines O<sub>2</sub>-Moleküls, höher ist als die des Edukts, Zn-Pheid *a*, lässt die Vermutung zu, dass auch Chlorophylle bei Belichtung unter aeroben Bedingungen Peroxide bilden, die wiederum dafür verantwortlich sind, dass die Oxidationsreaktionen im Dunkeln weitergehen. Die im Dunkeln fortschreitende Oxidation von Zn-BPheid *a* in Mb könnte darüber hinaus durch die photoiniziierte Bildung von Peroxiden der Aminosäurereste des Proteins verursacht werden, indem diese mit einem Teil der entstehenden ROS unter Bildung von z.B. Hydroperoxiden reagieren, die dann wiederum den Photosensibilisator oxidieren (vgl. Bonnett und Martinez (2001)).

Obwohl es sich bei den oben beschriebenen Photodegradationsprozessen um oxidative Prozesse handelt, spielt die Eigenschaft des Lösungsmittels, Sauerstoff in großem Ausmaß zu lösen oder die Lebenszeit von Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) zu verlängern, hierbei allerdings keine große Rolle (Fiedor *et al.*, 2002). Entscheidender sind Polarität und Protonenazidität des Lösungsmittels. Hierdurch wird die Koordination der Zentralmetalle der Pigmente beeinflusst. Es wird diskutiert, dass dadurch die Aufenthaltsdauer von ROS in der Nähe des Pigments verlängert wird. Außerdem besteht so die Möglichkeit der Stabilisierung radikalischer Zwischenstufen (Kammhuber, 1999), welche sowohl bei Ein- als auch bei formalen Zwei-Elektronen-Oxidationsreaktionen auftreten können. Dies ist besonders im Hinblick auf Typ-I-Photoreaktionen, in denen Radikale eine wichtige Rolle spielen (Foote, 1987; Foote, 1991), von Bedeutung. Die Entstehung von Pigmentradikalen bei Belichtung in Gegenwart von Sauerstoff wurde mehrfach beobachtet (Smith und Calvin, 1966; Connolly *et al.*, 1973; Teuchner *et al.*, 1997), ein Hinweis auf radikalische Mechanismen ist die in dieser Arbeit beobachtete Produktvielfalt und Varianz bei der Belichtung von Zn-BPheid *a* in Puffer, welcher die höchste Polarität und Protonenazidität der verwendeten Lösungsmittel besitzt. Die Entstehung von Kationradikalen bei der Belichtung von Pd-BPheid *a* in Methanol, das ebenfalls eine im Vergleich zu Toluol und Aceton hohe Polarität und Protonenazidität aufweist, kann aufgrund der entstehenden breiten, langwelligen Flanke der Q<sub>y</sub>-Bande angenommen werden.

### Photoreduktion

Bei der sog. Krasnovskii-Reduktion (Krasnovskii, 1948) entsteht aus Chl im Licht unter reduzierenden Bedingungen und in Gegenwart eines Nukleophils wie Pyridin, NH<sub>3</sub> oder

Histidin 10,20-Dihydro-Chl, das eine Absorption in der Region um 530 nm besitzt (Scheer und Katz, 1974). Diese Reaktion ist im Dunkeln nach Entfernung des Reduktionsmittels reversibel. Die Belichtung von Zn-Pheid *a* in den Proteinkomplexen bzw. in Pyridin-haltigem Puffer in Gegenwart von Na-Dithionit als Reduktionsmittel führt ebenfalls zur Entstehung einer Absorptionsbande im Bereich um 530 nm. Da zudem die Intensität dieser Bande nach Entfernung des Dithionits abnimmt (BSA) bzw. die Bande wieder ganz verschwindet (Mb), handelt es sich hier offensichtlich ebenfalls um diese Zwei-Elektronen-Reduktionsreaktion. Die Tatsache, dass diese Reduktionsreaktion in beiden Proteinkomplexen in Abwesenheit von Pyridin verläuft, spricht nicht nur für die korrekte Bindung des Chromophors in der Häm-Bindungstasche, wo eines der beiden Histidine als Nukleophil agieren kann. Sie ist auch ein Hinweis darauf, dass in der unmittelbaren Umgebung des an BSA gebundenen Pigments ebenfalls basische AS vorhanden sind, wenn nicht sogar eine ähnliche Zentralmetallkoordination wie im Mb-Komplex vorliegt. Hiergegen spricht allerdings die unterschiedliche Lage der Q<sub>x</sub>-Banden von Zn-BPheid-*a*-Mb (579 nm) und Zn-BPheid-*a*-BSA (594 nm), welche im Fall von BSA unter Umständen sogar auf einen sechsten Liganden hinweist.

Bei der Belichtung des Bakteriochlorins unter reduktiven Bedingungen entsteht offensichtlich kein dem Krasnovskii-Produkt vergleichbares Produkt. Die Zugabe des Reduktionsmittels mit anschließender Belichtung führt in beiden Proteinkomplexen dazu, dass die während der Rekonstitution entstandene Chlorinbande des Oxidationsprodukts 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* stark zurückgeht. Dies ist bei der Belichtung des freien Pigments in Puffer unter identischen Bedingungen in viel schwächerem Ausmaß der Fall. Aufgrund der fehlenden Aromatizität der Pyrrolringe B und D des Bakteriochlorins ist die Elektronendichte hier an allen vier Methinbrücken erhöht (vgl. Scheer und Inhoffen (1978)), wodurch eine Reduktion an diesen Positionen erschwert ist. Beim Chlorin ist die Elektronendichte nur an den Methinbrücken C-15 und C-20 erhöht (Woodward und Skaric, 1961; Scheer und Inhoffen, 1978), so dass z.B. C-10 leichter reduziert werden kann. Folglich ist die Bildung des Dihydrochlorins bei Zn-Pheid *a* erleichtert. Bei dem im Zn-BPheid *a* enthaltenen 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* scheint die Rückreaktion zum Bakteriochlorin durch Reduktion an C-7/C-8 gegenüber der Bildung des Dihydrochlorins bevorzugt abzulaufen. Beide Reaktionen werden durch die Proteinumgebung begünstigt. Dies spricht für eine katalytische Wirkung der Proteinumgebung auch im Fall der Photoreduktionen.

#### Photopheophytinisierung

Die 20-minütige Belichtung der freien Pigmente bzw. der Pigment-Protein-Komplexe unter den gewählten Bedingungen war in keinem Fall ausreichend, um neben den Photooxidationen

eine Entmetallierung zu bewirken. Diese tritt erst nach zweistündiger Belichtung von Zn-Pheid-*a*-Mb ein. Es entsteht hierbei aus dem Zn-Chlorin neben den jeweils farblosen Produkten ein Zentralmetall-freies Porphyrin. Bei Zn-BPheid-*a*-Mb kommt es unter identischen Bedingungen nur zur Bildung eines Zn-Porphyrins. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit von Entmetallierungsreaktionen in der Reihe Porphyrin > Chlorin > Bakteriochlorin abnimmt (Scheer, 2005). Die Zn-Derivate von Chlorophyllen sind außerdem stabiler als die natürlichen Mg-Derivate (Buchler, 1975; Hynninen, 1991), so dass Entmetallierungsreaktionen hier grundsätzlich mit geringerer Häufigkeit eintreten.

### 5.6.2 Stabilität der Pigmente

#### Photostabilität der freien Pigmente

Die Stabilität der Pigmente wird entscheidend durch deren Umgebung beeinflusst. Das Lösungsmittel nimmt dabei großen Einfluss auf Geschwindigkeit und Grad der Photooxidation der Chromophore (Brereton und Sanders, 1982; Brereton und Sanders, 1983b; Hynninen, 1991). Untersuchungen der Photobleichung verschiedener Bakteriochlorophylle (einschließlich Zn- und Pd-BPhe) in Lösungsmittel und Detergens beschreiben im Detail diese Abhängigkeit (Kammhuber, 1999; Fiedor *et al.*, 2002). Die Bleichung von Zn-BPhe *a* und BChl *a* nimmt dabei in folgender Reihenfolge ab: Puffer mit 1% Triton-X-100 > Methanol >> Toluol  $\approx$  Aceton. Pd-BPhe *a* wird hingegen in Methanol am stärksten gebleicht. Beide Ergebnisse wurden in dieser Arbeit für Zn-BPheid *a* und Pd-BPheid *a* bestätigt. Die Bestrahlung in 1%-Triton-Lösung wurde hier allerdings durch die Bestrahlung in Detergens-freiem Puffer ersetzt, was durch die bessere Löslichkeit der freien Säure möglich ist. Ein gewisser Anteil an Aggregaten ist hierbei allerdings immer noch vorhanden. Dies erklärt vielleicht, warum Zn-BPheid *a* in Puffer nicht stärker photooxidierte als in Methanol: Aggregate können keine ROS generieren (MacRobert *et al.*, 1989).

Die Photostabilität des Chlorins Zn-Pheid *a* war unter den gleichen Bedingungen sehr viel größer, außerdem veränderte sich seine Stabilität in anderer Reihenfolge: Aceton > Methanol > Puffer >> Toluol. Dieses Verhalten ist wahrscheinlich durch das im Vergleich zum Zn-Bakteriochlorin höhere Oxidationspotential des Zn-Chlorins bedingt (Watanabe und Kobayashi, 1991). Es ist bislang allerdings nicht beschrieben, ob sich die Oxidationspotentiale der Chlorine abhängig vom Lösungsmittel anders verhalten als die der Bakteriochlorine. Die große Stabilität von Pd-BPheid *a*, das gleichzeitig die höchste Effizienz in der ROS-Generierung aufweist (Fiedor *et al.*, 2002), liegt offensichtlich an dessen hohem

Oxidationspotential ( $E^1_{\text{Ox}} = 0.23 \text{ V}$ ), welches um 0.23 V höher ist als das von Zn-BPheid *a* ( $E^1_{\text{Ox}} = 0.00 \text{ V}$ ) (gemessen in Acetonitril/DMF (Noy *et al.*, 1998)).

### Photostabilität der Pigmente im Protein-Komplex

Die Rolle der Pigmentumgebung in der Photochemie der Chlorophyll-Derivate wurde besonders deutlich bei der Bestrahlung der in dieser Arbeit dargestellten künstlichen Pigment-Protein-Modellsysteme. Vor allem bei Zn-Pheid *a* erfolgte eine deutlich schnellere Photodegradation im Komplex mit Myoglobin oder Albumin als in Lösung. Die Degradation des analogen Bakteriochlorins in den Proteinkomplexen war ebenfalls schneller als die des freien Chromophors, wobei die Differenzen hier geringer waren.

Die Häm-Bindungstasche von Myoglobin stellt dem Chromophor zwei Liganden zur Verfügung: das proximale His93, welches von oben an das zentrale Eisen koordiniert (zur Topologie von „oben“ vgl. Abbildung 3-7) und das distale His64, das schwach von unten an das Zentralmetall koordiniert. Zwischen His64 und dem Eisen ist eine Lücke, die für kleine Moleküle von außen zugänglich ist. In dieser mäßig hydrophoben Umgebung findet natürlicherweise die Sauerstoffbindung von Myoglobin statt. Die Erfordernisse zur Sauerstoffbindung an Häm sind Gegenstand vieler Studien (Collman und Zhang, 1996). Es ist jedoch sehr wenig über die Bindung von Sauerstoff an das zentrale Mg-Atom von Tetrapyrrolen bekannt. Hinweise auf die Bildung derartiger Komplexe in Lösung, zumindest übergangsweise, wurden kürzlich gefunden (Limantara *et al.*, 2005). Die Koordination von O<sub>2</sub> an das zentrale Metall in Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb könnte im Myoglobin-Komplex durch die Proteinumgebung stabilisiert werden. Damit wäre der Kontakt zwischen Pigment und Sauerstoff im Vergleich zum Lösungsmittel verlängert, wodurch erhöhte Photooxidation sehr wahrscheinlich ist. Die reduzierte Photobleichung nach Zusatz von Pyridin, sowohl bei Zn-Pheid-*a*-Mb als auch bei Zn-Pheid-*a*-BSA (nicht gezeigt), spricht ebenfalls für einen derartigen Koordinationsmechanismus; das starke Nukleophil Pyridin tritt nun mit O<sub>2</sub> in Konkurrenz um die Ligandenposition.

Erstaunlicherweise ist die Oxidation der Chromophore unter anaeroben Bedingungen nur im Mb-Komplex deutlich verringert. Im Albumin-Komplex erfolgt, wie in Lösungsmittel bzw. Puffer, nur eine geringe Reduktion der oxidativen Bleichung. Dies deutet darauf hin, dass die Pigmente im Albumin-Komplex für den in der Lösung vorhandenen Restsauerstoff zugänglicher und folglich durch das Protein weniger gut abgeschirmt sind.

Die unterschiedliche Rate der Photobleichung von Mb- und Albumin-Komplexen unter anaeroben Bedingungen könnte allerdings auch durch einen divergierenden (Sauerstoff-unabhängigen ?) Mechanismus bei der Photooxidation der Pigmente im Albumin-Komplex

erklärt werden. Hinweise dafür liefert der Vergleich der Absorptionsspektren während der Bestrahlung von Zn-BPheid-*a*-BSA und Zn-BPheid-*a*-Mb (Abbildung 5-15 und Abbildung 5-19). Bei letzterem ist ein den direkten Übergang vom Bakteriochlorin zum Chlorin kennzeichnender isosbestischer Punkt vorhanden der in den Spektren des BSA-Komplexes fehlt. Wenn dort die Photoreaktion hauptsächlich über radikalische Mechanismen abläuft, ist die Sauerstoffverfügbarkeit nicht mehr der limitierende Faktor. Die unterschiedliche Relation von Chlorin zu Bakteriochlorin bei den Photoprodukten von BSA- und Mb-Komplex deutet ebenfalls auf divergierende Mechanismen hin. Die Photooxidation in BSA würde damit schneller zu farblosen Produkten führen, wie sie generell bei der Photodegradation von Chlorophyllen und deren Derivaten beobachtet wurden (Smith und Calvin, 1966; Brown *et al.*, 1991). Die sicherlich andere, unbekannte Proteinumgebung in BSA wird auch für die erhöhte Labilität der gebundenen Pigmente verantwortlich sein. Diese oxidieren bereits in erheblichem Umfang während der Aufarbeitung der Komplexe, wohingegen die gleiche Aufarbeitung bei den Mb-Komplexen zu viel geringerer Pigmentoxidation führt. Das Pigment in Myoglobin ist durch die Einlagerung in eine mehr oder weniger passende Tasche von dem Lösungsmittel weitgehend abgeschirmt, während ein an der Oberfläche von BSA gebundenes Pigmentmolekül in direkten Kontakt mit dem Lösungsmittel und dem dort gelösten O<sub>2</sub> treten kann.

Die stark erhöhte Photooxidation der Pigmente in beiden Proteinkomplexen erinnert nicht zuletzt an die Experimente von Krieg und Whitten (1984a; 1984b). Hier führte der Zusatz von Aminosäuren wie Cystein, Histidin oder Methionin oder die Anwesenheit von leeren Erythrocyten (sog. Ghosts) zu erhöhter Photobleichung von Porphyrinen (s. Kapitel 1.2.3.). Es wird vermutet, dass neben der direkten Oxidation des Photosensibilisators eine durch die Biomoleküle initiierte Oxidation stattfindet. Teile der Biomoleküle reagieren mit den ROS, woraus Peroxide wie Persulfoxide oder Hydroperoxide entstehen, welche dann mit dem Sensibilisator reagieren (Bonnett und Martinez, 2001). Derartige Reaktionen könnten auch bei der Photobleichung der in dieser Arbeit untersuchten Pigment-Protein-Komplexe eine Rolle spielen. Die erhöhte Sensitivität der Photosensibilisatoren in den Proteinen würde damit nicht nur durch eine durch die Proteinumgebung vermittelte O<sub>2</sub>-Bindung verursacht, sondern die umgebenden Aminosäuren selbst wären aktive Reaktionspartner, unter anderem bei der beobachteten fortgesetzten Bleichung von Zn-BPheid *a* in Mb im Dunkeln (s. oben). Es ist beispielsweise bekannt, dass der Zusatz von HSA zu Sensibilisatoren in Lösung eine verstärkte Photobleichung bewirkt (Roberts *et al.*, 1989; Kogan *et al.*, 1996), wobei der Mechanismus unbekannt ist. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des Screenings von Sensibilisatoren unter Bedingungen, die denen *in vivo* gleichen. Das Verhalten der

Sensibilisatoren in Lösungsmittel liefert nur erste Ansatzpunkte hinsichtlich ihres Verhaltens *in vivo*.

Bei der Diskussion außen vor gelassen wurde bisher der mögliche Einfluss der Viskosität von Lösungsmittel und Protein. Wasser besitzt mit Abstand die höchste Viskosität der verwendeten Lösungsmittel ( $\text{H}_2\text{O}$ :  $\eta=1,002$  cP; MeOH:  $\eta=0,597$  cP; Toluol:  $\eta=0,590$  cP; Aceton:  $\eta=0,325$  cP, aus Kohen *et al.* (1995)). Die Viskosität von Proteinen ist jedoch noch viel höher. Die Diffusion kleiner Moleküle durch beispielsweise Myoglobin wird aber vor allem von der Viskosität des umgebenden Lösungsmittels beeinflusst (Austin und Chan, 1978; Beece *et al.*, 1980; Gavish, 1986), konformelle Fluktuationen des Proteins, abhängig vom Lösungsmittel, agieren quasi als „gating“-Mechanismus, der es kleinen Substraten erlaubt in die Proteinstruktur einzudringen (Northrup und McCammon, 1984). Barboy und Feitelson (1989) stellten fest, dass das Quenchen des Triplettzustandes von Zn-Protoporphyrin-IX in Apo-Mb durch  $\text{O}_2$  langsamer verläuft als das des freien Pigments im gleichen Lösungsmittel. Die  $\text{O}_2$ -Zugänglichkeit des Chromophors in Myoglobin ist damit eingeschränkt im Vergleich zur Zugänglichkeit in Lösungsmittel, oder eben im Vergleich mit der Zugänglichkeit des Chromophors in Albumin. Andererseits begünstigt eine erhöhte Lösungsmittelviskosität, wie sie z.B. bei Belichtung von Zn-BPheid *a* in 2/1 Glycerin/Puffer-I vorhanden war, eine starke Erhöhung der Photooxidation. Offenbar existiert in diesem Zusammenhang eine kinetische Kontrolle auf mindestens zweierlei Weise: Die Zugänglichkeit der Chromophore steht dem Verbleib der reaktiven Spezies gegenüber. Hinzu kommt, dass sich durch diese zwei kinetischen Kontrollmechanismen die Produktverteilung ändern kann, was beispielsweise in den divergierenden relativen Intensitäten von gebildetem 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* zu Zn-BPheid *a* bei Mb und BSA (vgl. Abbildung 5-28 und Abbildung 5-30) zum Ausdruck kommt. Das beobachtete komplexe Verhalten der Photooxidationen in Mb, BSA und hochviskosem (durch Zusatz von 66% Glycerin) Puffer lässt sich somit nur durch eine Balance dieser Mechanismen erklären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Photoprodukte in Lösungsmittel und Proteinumgebung bis auf wenige Ausnahmen identisch sind, in den Proteinen aber schneller gebildet werden. Letzteres ist ein Hinweis auf die bevorzugte Bildung von Pigment-Sauerstoff-Komplexen in der Proteinumgebung. Hinsichtlich der Photodegradation ist der Bakteriochlorin-Chromophor wesentlich instabiler als der Chlorin-Chromophor. Der Einbau der Pigmente in die Proteine führt zu erhöhter Photobleichung, sowohl oxidativ als auch reduktiv. Diese Ergebnisse zeigen, dass in der Photodynamischen Therapie auch die

---

Photoprodukte in Betracht gezogen werden müssen. Sie sollten einerseits pharmakologisch untersucht werden, um eine mögliche Toxizität auszuschließen, andererseits ist hinsichtlich der Wahl der Belichtungsbedingungen die Absorption der Photoprodukte nicht vernachlässigbar. Die erhöhte Aktivität der Pigmente in der Proteinumgebung muss bei der Auswahl der Sensibilisatoren ebenfalls berücksichtigt werden. Weiterführende Untersuchungen in diesem Zusammenhang sollten hydrophobe Proteine einschließen, da hier möglicherweise eine ganz andere Sensibilisatoreffektivität vorliegen könnte.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Präparation von zwei künstlichen, hydrophilen Pigment-Protein-Komplexen, die die Chromophore in monomerer Form enthalten, um damit die Photochemie und Proteinbindung von Chlorophyll-Derivaten zu untersuchen. Gleichzeitig sollte geprüft werden, inwieweit diese nicht nativen Chromophore die Stabilität des Häm-Proteins Myoglobin beeinflussen.

### Rekonstitution von Apo-Myoglobin

Das schon in den 80er Jahren (Boxer und Wright, 1979; Davis und Pearlstein, 1979; Wright und Boxer, 1981) entwickelte Rekonstitutionssystem von Apo-Myoglobin und Chlorophyll-Derivaten wurde erfolgreich etabliert und hinsichtlich verminderter Pigmentoxidation während des Rekonstitutionsvorgangs verbessert. Der erfolgreiche Chromophor-Einbau wurde durch Resonanz-Raman-Spektroskopie und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestätigt. Erstmals wurden auch Ni- und Fe-Derivate von Chlorophyllen in die Häm-Bindungstasche eingelagert. Die neu eingeführte Aufreinigungsmethode der Komplexe über präparative native Gelelektrophorese zeigte gleichzeitig deren Heterogenität. Die Pigment-Protein-Komplexe, einschließlich des nativen Myoglobins, ergeben, im Gegensatz zum Apoprotein, bei der Gelelektrophorese zwei Banden unterschiedlicher Stabilität aber gleicher Masse. Die Ursache dieser Heterogenität ist bislang noch unklar, sicher ist nur, dass es sich nicht um unterschiedlich aggregierte Formen des Proteins handelt.

### Präparation von Pigment-Albumin-Komplexen

Erstmals konnten in dieser Arbeit monomere Komplexe zwischen Rinderserumalbumin und Chlorophyll-Derivaten präpariert und durch native Gelelektrophorese von höhermolekularen Aggregaten abgetrennt werden. Die Verwendung des Detergens Triton-X-100 verbessert hierbei die Ausbeute deutlich. CD- und Absorptionsspektren zeigten eindeutig, dass die Pigmente in monomerer Form gebunden sind.

### Photochemie

Die Stabilität der Pigmente gegenüber Photooxidation ist in beiden Protein-Komplexen vergleichbar, und deutlich geringer als in Lösungsmittel. Mittels HPLC-Analyse wurden 13<sup>2</sup>-OH-Zn-Pheid *a*, Zn-Proto-Pheid *a* und ein unbekanntes Pigment als Photoprodukte von Zn-Pheid *a* identifiziert. Die Masse des unbekanntes Produkts ist um 32 g/Mol – dies entspricht der Masse eines O<sub>2</sub>-Moleküls – größer als die des Edukts Zn-Pheid *a*. Als Photoprodukt von Zn-BPheid *a* wurde 3-Acetyl-Zn-Pheid *a* ermittelt. Zusätzlich zu diesen Photooxidationen

können bei längerer Belichtung Entmetallierungsreaktionen, sog. Photopheophytinisierung, eintreten. Die Belichtung von Zn-Pheid *a* unter reduktiven Bedingungen führt in beiden Protein-Komplexen zur, größtenteils reversiblen, Bildung des Krasnovskii-Photoreduktionsprodukts, einem 10,20-Dihydro-Chlorin.

### Proteinbindung

Beide Protein-Systeme selektieren sehr stark hinsichtlich der zu komplexierenden Pigmente. Es stellte sich heraus, dass sowohl ein Zentralmetall, das mindestens einen zusätzlichen Liganden neben den vier Tetrapyrrol-Stickstoffen koordinieren kann, als auch die Abwesenheit des langkettigen Phytolesters an Position C-17<sup>3</sup> für die Bildung eines stabilen Pigment-Protein-Komplexes erforderlich sind. Albumin toleriert in diesem Zusammenhang einen Ethylester an C-17<sup>3</sup>. Das offenkettige Tetrapyrrol Phycocyanobilin wird von Apo-Myoglobin nur in Form seines Zn<sup>2+</sup>-Chelats komplexiert, wohingegen eine Bindung an Albumin in nicht chelierter Form erfolgt.

In den künstlichen Myoglobin-Komplexen wird die Bindung zusätzlich durch die Stereochemie der Pigmente an Position C-13<sup>2</sup> moduliert. Die *a*-Epimere werden gegenüber den *a'*-Epimeren bevorzugt in die Bindungstasche eingelagert. Gleichzeitig kann die Tasche als Reaktionsraum fungieren: Bei enolisierbaren Substraten agiert Apo-Myoglobin als 13<sup>2</sup>-Epimerase und wandelt beispielsweise Zn-Pheid *a'* (13<sup>2</sup>S) in Zn-Pheid *a* (13<sup>2</sup>R) um.

### Stabilität der Myoglobin-Komplexe

Es konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der Myoglobin-Komplexe, einschließlich des nativen Myoglobins, gegenüber Denaturierung von zwei Faktoren abhängt: Entscheidend ist einerseits die Art der Denaturierung (thermisch oder mit Guanidin), andererseits der eingebaute Chromophor. Die Stabilität gegenüber Guanidin nimmt in folgender Reihenfolge ab: natives Mb >> Zn-Pheid-*a*-Mb > Zn-BPheid-*a*-Mb ≈ Apo-Mb. Bei thermischer Denaturierung ergibt sich folgender Stabilitätsverlauf: Zn-BPheid-*a*-Mb ≈ natives Mb > Zn-Pheid-*a*-Mb >> Apo-Mb. Die spezifischen Interaktionen zwischen Chromophor und Protein sind folglich in unterschiedlicher Weise ausschlaggebend für den Zeitpunkt des Strukturzusammenbruchs des Proteingerüsts.



## 7 Literaturverzeichnis

1. **Adar, F.** 1978. Electronic absorption spectra of hemes and hemoproteins. In: The Porphyrins Vol. 3, D. Dolphin (Hrsg.). 167-209, Academic Press, New York.
2. **Ahmad, F.** 1985. Complexities in the denaturation of horse metmyoglobin by guanidine hydrochloride. *J. Biol. Chem.* **260**:10458-10460.
3. **Akiyama, M., Miyashita, H., Kise, H., Watanabe, T., Miyachi, S. und Kobayashi, M.** 2001. Detection of chlorophyll *d'* and pheophytin *a* in a chlorophyll *d* -dominating oxygenic photosynthetic prokaryote *Acaryochloris marina*. *Anal. Sci.* **17**:205-208.
4. **Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H. und Rees, D.C.** 1987. Structure from the bacterial reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R26. The cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5730-5734.
5. **Alston, K. und Storm, C.B.** 1979. Copper (II) protoporphyrin IX as a reporter group for the heme environment in myoglobin. *Biochemistry* **18**:4292-300.
6. **Ancell, H.** 1839. Composition of the blood. Gases in the blood. The properties of albumen. Fibrine in the blood. *The Lancet*:222-231.
7. **Aojula, H.S., Wilson, M.T. und Drake, A.** 1986. Characterization of heme disorder by circular dichroism. *Biochem. J.* **237**:613-616.
8. **Austin, R.H. und Chan, Sh.S.** 1978. The rate of entry of dioxygen and carbon-monoxide into myoglobin. *Biophys. J.* **24**:175-186.
9. **Balaban, T.S.** 2003. Are syn-ligated (bacterio)chlorophyll dimers energetic traps in light-harvesting systems? *FEBS Lett.* **545**:97-102.
10. **Balaban, T.S., Fromme, P., Holzwarth, A.R., Krauß, N. und Prokhorenko, V.I.** 2002. Relevance of the diastereotopic ligation of magnesium atoms of chlorophylls in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1556**:197-207.
11. **Bald, D., Kruip, J. und Rögner, M.** 1996. Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems? *Photosyn. Res.* **49**:103-118.
12. **Barboy, N. und Feitelson, J.** 1989. Diffusion of small molecules through the structure of myoglobin. Environmental effects. *Biochemistry* **28**:5450-5456.
13. **Barrick, D., Hughson, F.M. und Baldwin, R.L.** 1994. Molecular mechanisms of acid denaturation. The role of histidine residues in the partial unfolding of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **237**:588-601.
14. **Bassi, R., Croce, R., Cugini, D. und Sandona, D.** 1999. Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:10056-10061.
15. **Bassi, R., Sandona, D. und Croce, R.** 1997. Novel aspects of chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Physiol. Plant.* **100**:769-779.
16. **Beale, S.I.** 1994. Biosynthesis of cyanobacterial tetrapyrrole pigments: hemes, chlorophylls and phycobilins. In: *The molecular biology of cyanobacteria*, Bryant, D.A. (Hrsg.). 519-558, Kluwer Academic Publications, Dordrecht.
17. **Beece, D., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Good, D., Marden, M.C., Reinisch, L., Reynolds, A.H., Sorensen, L.B. und Yue, K.T.** 1980. Solvent viscosity and protein dynamics. *Biochemistry* **19**:5147-5157.
18. **Berenbaum, M.C. und Bonnett, R.** 1989. Porphyrins as photosensitizers. In: *Ciba Symposium 146. Photosensitising Compounds: Their Chemistry, Biology, and Clinical Use*, G. Bock, S. Harnett (Hrsg.). 40-53, Wiley, Chichester.
19. **Berkelman, T.R. und Lagarias, J.C.** 1986. Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **156**:194-201.
20. **Beychok, S.** 1967. In: *Poly- $\alpha$ -Amino acids*, Fasman, G.D. (Hrsg.), 293-337, Marcel Dekker, New York.
21. **Beychok, S. und Blout, E.R.** 1961. Optical rotatory dispersion of sperm whale ferrimyoglobin and horse ferrimyoglobin. *J. Mol. Biol.* **3**:769-777.
22. **Bismuto, E., Colonna, G. und Irace, G.** 1983. Unfolding pathway of myoglobin. Evidence for a multistate process. *Biochemistry* **22**:4165-4170.

23. **Bjork, I. und Pol, E.** 1992. Biphasic transition curve on denaturation of chicken cystatin by guanidinium chloride. Evidence of an independently unfolding structural region. *FEBS Lett.* **299**:66-68.
24. **Blauer, G. und Harmatz, D.** 1972. Optical properties of bilirubin-serum albumin complexes in aqueous solution II. Effects of electrolytes and of concentration. *Biochim. Biophys. Acta* **278**:89-100.
25. **Blauer, G., Harmatz, D. und Naparstek, A.** 1970. Circular dichroism of bilirubin-human serum albumin complexes in aqueous solution. *FEBS Lett.* **9**:53-55.
26. **Blauer, G. und King, T.E.** 1970. Interactions of bilirubin with bovine serum albumin in aqueous solution. *J. Biol. Chem.* **245**:372-381.
27. **Blauer, G., Sreerama, N. und Woody, R.W.** 1993. Optical activity of hemoproteins in the solet region. Circular dichroism of the heme undecapeptide of cytochrome c in aqueous solution. *Biochemistry* **32**:6674-6679.
28. **Blauer, G. und Wagniere, G.** 1975. Conformation of bilirubin and biliverdin in their complexes with serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.* **97**:49-54.
29. **Blum, F.H.** 1964. Photodynamic action and diseases caused by light. Hafner Publ., New York.
30. **Bolognesi, M., Onesti, S., Gatti, G., Coda, A., Ascenzi, P. und Bruoni, M.** 1989. Aplysia limacina myoglobin. Crystallographic analysis at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **205**:529-544.
31. **Bommer, J.C. und Hambright, P.** 2002. General laboratory methods for tetrapyrroles. In: *Heme, Chlorophyll, and Bilins: Methods and Protocols*, A.G. Smith, M. Witty (Hrsg.). 39-67, Humana Press, Totowa, NJ.
32. **Bonnet, R.** 2000. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Gordon and Breach Science, Amsterdam.
33. **Bonnett, R.** 1999. Photodynamic therapy in historical perspective. *Rev. Contemp. Pharmacother.* **10**:1-17.
34. **Bonnett, R., Djelal, B.D., Hamilton, P.A., Martinez, G. und Wierrani, F.** 1999. Photobleaching of 5, 10, 15, 20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (M-THPC) and bacteriochlorin (M-THPBC). A comparative study. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **53**:136-143.
35. **Bonnett, R. und Martinez, G.** 2001. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **57**:9513-9547.
36. **Borland, C.F., Cogdell, R.J., Land, E.J. und Truscott, T.G.** 1989. Bacteriochlorophyll *a* triplet state and its interactions with bacterial carotenoids and oxygen. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **3**:237-245.
37. **Borland, C.F., McGarvey, D.J. und Truscott, T.G.** 1987. Photophysical studies of bacteriochlorophyll *a* and bacteriopheophytin *a* - singlet oxygen generation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1**:93-101.
38. **Bos, O.J.M., Remijn, J.P.M., Fischer, J.E., Witing, J.E. und Janssen, L.H.M.** 1988. Location and characterization of the warfarin binding site of human serum albumin. A comparative study of two large fragments. *Biochem. Pharmacol.* **37**:3905-3909.
39. **Boxer, S.G., Kuki, A., Wright, K.A., Katz, B.A. und Xuong, N.** 1982. Oriented properties of the chlorophylls - electronic absorption-spectroscopy of orthorhombic pyrochlorophyllide alpha-apomyoglobin single-crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:1121-1125.
40. **Boxer, S.G. und Wright, K.A.** 1979. Preparation and properties of a chlorophyllide-apomyoglobin complex. *J. Am. Chem. Soc.* **101**:6791-4.
41. **Brandis, A., Salomon, Y. und Scherz, A.** 2005a. Bacteriochlorophyll sensitizers in photodynamic therapy. In: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger und H. Scheer (Hrsg.), Kluwer, Dordrecht.
42. **Brandis, A., Salomon, Y. und Scherz, A.** 2005b. Chlorophyll sensitizers in photodynamic therapy. In: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger und H. Scheer (Hrsg.), Kluwer, Dordrecht.
43. **Breton, R.G. und Sanders, J.K.M.** 1982. <sup>1</sup>H-NMR study of bacteriochlorophyll *a* radical-anion - use of difference spectra. *Org. Magn. Res.* **19**:150-152.
44. **Breton, R.G. und Sanders, J.K.M.** 1983a. Coordination and aggregation of bacteriochlorophyll *a*: An N.M.R. and electronic absorption study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**:423-430.
45. **Breton, R.G. und Sanders, J.K.M.** 1983b. Radical-anion and radical-cation of bacteriochlorophyll *a*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**:431-434.

46. **Breslow, E.** 1964. Changes in side chain reactivity accompanying the binding of heme to sperm whale apomyoglobin. *J. Biol. Chem.* **239**:486-496.
47. **Breslow, E. und Koehler, R.** 1965. Combination of protoporphyrin IX with sperm whale apomyoglobin. *J. Biol. Chem.* **240**:PC2266-PC2268.
48. **Breslow, E., Koehler, R. und Girotti, A.W.** 1967. Properties of protoporphyrin-apomyoglobin complexes and related compounds. *J. Biol. Chem.* **242**:4149-56.
49. **Brodersen, R., Honore, B., Pedersen, A.O. und Klotz, I.M.** 1988. Binding constants for ligand-carrier complexes. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**:252-257.
50. **Brown, S.B., Houghton, J.D. und Hendry, G.A.F.** 1991. Chlorophyll breakdown. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 465-489, CRC Press, Boca Raton.
51. **Brown, S.B., Smith, K.M., Bisset, G.M.F. und Troxler, R.F.** 1980. Mechanism of photooxidation of bacteriochlorophyll-*c* derivatives. A possible model for natural chlorophyll breakdown. *J. Biol. Chem.* **255**:8063.
52. **Buchler, J.W.** 1975. Static coordination chemistry of metalloporphyrins. In: *Porphyrins and Metalloporphyrins*, K.M. Smith (Hrsg.). 157-232, Elsevier, New York.
53. **Bylina, E.J., Kirmaier, C., McDowell, L., Holten, D. und Youvan, D.C.** 1988. Influence of an amino-acid residue on the optical properties and electron transfer dynamics of a photosynthetic reaction centre complex. *Nature* **336**:182-185.
54. **Bylina, E.J. und Youvan, D.C.** 1991. Protein-chromophore interactions in the reaction center of *Rhodobacter Capsulatus*. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 705-719, CRC Press, Boca Raton.
55. **Cadenas, E.** 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:79-100.
56. **Carey, P.R.** 1982. Biochemical applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. Academic Press, New York.
57. **Carter, D.C., Ho, J. und Wang, Z.** 2005. Albumin binding sites for evaluating drug interactions and methods of evaluating or designing drugs based on their albumin binding properties. WO 2005041895 .
58. **Carter, D.C. und Ho, J.X.** 1994. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* **45**:153-203.
59. **Chang, C.H., El-Kabbani, O., Tiede D., Norris, J. und Schiffer, M.** 1991. Structure of the membrane bound protein photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* . *Biochemistry* **30**:5352-5360.
60. **Chauvet, J.P., Viovy, R., Santus, R. und Land, E.J.** 1981. One-electron oxidation of photosynthetic pigments in micelles. Bacteriochlorophyll *a*, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and pheophytin *a*. *J. Phys. Chem.* **85**:3449.
61. **Chen, L. , Wang, Z., Hartwich, G., Katheder, I., Scheer, H., Tiede, D.M., Scherz, A., Montano, P.A. und Norris, J.R.** 1995. An X-ray absorption study of chemically modified bacterial photosynthetic reaction centers. *Chem. Phys. Lett.* **234**:437-444.
62. **Chirino, A.J., Lous, E.J., Huber, M., Allen, J.P., Schenck, C.C., Paddock, M.L., Fehér, G. und Rees, D.C.** 1994. Crystallographic analyses of site-directed mutants of the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **33**:4584-4593.
63. **Choon, O.C. und Rodley, G.A.** 1983. Spectral studies of magnesium porphyrin-apomyoglobin and apohemoglobin complexes. *J. Inorg. Biochem.* **19**:189-202.
64. **Churg, A.K. und Makinen, M.W.** 1978. The electronic structure and coordination geometry of the oxyheme complex in myoglobin. *J. Chem. Phys.* **68**:1913-25.
65. **Cocco, M.J., Kao, Y.H., Phillips, A.T. und Lecomte, J.T.J.** 1992. A structural comparison of apomyoglobin and metaquomyoglobin: pH titration of histidines by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **31**:6481-6491.
66. **Coleman, W.J. und Youvan, D.C.** 1990. Spectroscopic analysis of genetically modified photosynthetic reaction centers. *Ann. Rev. Biophys.* **19**:333-367.
67. **Collman, J.P. und Zhang, X.** 1996. Functional analogs of the oxygen binding and activating heme proteins. *Comprehensive Supramolecular Chemistry* **5**:1-32.
68. **Connolly, J.S., Gorman, D.S. und Seely, G.R.** 1973. Laser flash photolysis studies of chlorin and porphyrin systems. I. Energetics of the triplet state of bacteriochlorophyll. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **206**:649.

- 
69. **Coon, M.J.** 2005. Cytochrome P 450: Nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**:1-25.
  70. **Cupane, A., Leone, E. und Vitrano, E.** 1993. Protein dynamics: Conformational disorder, vibrational coupling and anharmonicity in deoxy-hemoglobin and myoglobin. *Eur. Biophys. J.* **21**:385-390.
  71. **Czarnecki, K., Schenck, C.C. und Bocian, D.F.** 1997. Resonance Raman characterization of reaction centers in which bacteriochlorophyll replaces the photoreactive bacteriopheophytin. *Biochemistry* **36**:14697-14704.
  72. **Davis, R.C. und Pearlstein, R.M.** 1979. Chlorophyllin-apomyoglobin complexes. *Nature* **280 (5721)**:413-415.
  73. **Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, H. und Michel, H.** 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* **318**:618-624.
  74. **Deisenhofer, J. und Michel, H.** 1989. The photosynthetic reaction center of the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis* (Nobel report). *Angew. Chem.* **101**:872-892.
  75. **DeVoe, H.** 1965. Optical properties of molecular aggregates. II. Classical theory of refraction, absorption and optical activity of solutions and crystals. *J. Chem. Phys.* **43**:3199-3208.
  76. **Diamond, I., Granelli, S.L., McDonagh, A.F., Nielsen, S., Wilson, C.B. und Jaenicke, R.** 1972. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet.* **2** :1175-1177.
  77. **Dougherty, T.J.** 1993. Photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **58**:895-900.
  78. **Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, M., Korbelik, J., Moan, J. und Peng, Q.** 1998. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**:889-905.
  79. **Dougherty, T.J., Sumlin, A.B., Greco, W.R., Weishaupt, K.R., Vaughan, L.A. und Pandey, R.K.** 2002. The role of the peripheral benzodiazepine receptor in photodynamic activity of certain pyropheophorbide ether photosensitizers: albumin site II as a surrogate marker for activity. *Photochem. Photobiol.* **76**:91-97.
  80. **Dratz, E.A.** 1967. Geometry and electronic structure of biologically significant molecules as observed by natural and magnetic optical activity. Protein conformation and plasticity. Chlorophyll-chlorophyll interactions. Electronic structure of metal porphyrins. *Nucl. Sci. Abstr.* **21**:22242.
  81. **Dratz, E.A., Schultz, A.J. und Sauer, K.** 1966. Chlorophyll-chlorophyll interactions. *Brookhaven Symp. Biol.* **19**:303-318.
  82. **Eichwurz, I., Stiel, H., Teuchner, K., Leupold, D., Scheer, H., Salomon, Y. und Scherz, A.** 2000. Photophysical consequences of coupling bacteriochlorophyll a with serine and its resulting solubility in water. *Photochem. Photobiol.* **72(2)**:204-209.
  83. **El-Kabbani, O., Chang, C.H., Tiede, D., Norris, J. und Schiffer, M.** 1991. Comparison of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter viridis*: Overall architecture and protein-pigment interactions. *Biochemistry* **30**:5361-5369.
  84. **Emerson, T.E.Jr.** 1989. Unique features of albumin: a brief review. *Crit. Care Med.* **17**:690-694.
  85. **Ermler, U., Fritsch, G., Buchanan, S.K. und Michel, H.** 1994. Structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: Cofactors and protein-cofactor interaction. *Structure* **2**:925-936.
  86. **Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M. und Thauer, R.K.** 1997. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science* **278**: 1457.
  87. **Falk, H.** 1989. *The Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments.* Springer-Verlag, Wien.
  88. **Falk, H., Marko, H., Müller, N. und Schmitzberger, W.** 1990a. On the chemistry of pyrrole pigments, LXXXVII [1]: The apomyoglobin heme pocket as a reaction vessel in bile pigment chemistry. *Monatsh. Chem.* **121**:903-908.
  89. **Falk, H., Marko, H., Müller, N., Schmitzberger, W. und Stumpe, H.** 1990b. Reconstitution of apomyoglobin with bile pigments. *Monatsh. Chem.* **121**:893-901.
  90. **Feiler, U., Mattioli, T.A., Katheder, I., Scheer, H., Lutz, M. und Robert, B.** 1994. Effects of vinyl substitutions on Resonance Raman spectra of (bacterio)chlorophylls. *J. Raman Spectrosc.* **25**:365-370.
  91. **Felton, R.H.** 1978. Primary redox reactions of metalloporphyrins. In: *The Porphyrins Vol. V*, D. Dolphin (Hrsg.), Academic Press, New York 53-125.

92. **Feng, Z. , Ha, J.-H. und Loh, S.N.** 1999. Identifying the site of initial tertiary structure disruption during apomyoglobin unfolding. *Biochemistry* **38**:14433-14439.
93. **Fiedor, J., Fiedor, L., Haessner, R. und Scheer, H.** 2005. Cyclic endoperoxidases of  $\beta$ -carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. *Biochim. Biophys. Acta* **1709**:1-4.
94. **Fiedor, J., Fiedor, L., Kammhuber, N., Scherz, A. und Scheer, H.** 2002. Photodynamics of the bacteriochlorophyll-carotenoid system. 2. Influence of central metal, solvent and  $\beta$ -carotene on photobleaching of bacteriochlorophyll derivatives. *Photochem. Photobiol.* **76**:145-152.
95. **Fiedor, L.** 1994. Modified chlorophylls as models for primary photosynthesis and photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. Dissertation, Weizman Institute of Science, Rehovot .
96. **Fiedor, L., Rosenbach-Belkin, V., Sai, M. und Scherz, A.** 1996. Preparation of tetrapyrrole-amino acid covalent complexes. *Plant Physiol. Biochem.* **34**:393-398.
97. **Fiedor, L., Rosenbach-Belkin, V. und Scherz, A.** 1992. The stereospecific interaction between chlorophylls and chlorophyllase. *J. Biol. Chem.* **267**:22043-22047.
98. **Fiedor, L., Scheer, H., Hunter, C.N., Tschirschwitz, F., Voigt, B., Ehlert, J., Nibbering, E., Leopold, D. und Elsaesser, T.** 2000. Introduction of a 60 fs deactivation channel in the photosynthetic antenna LH I by Ni-bacteriopheophytin *a*. *Chem. Phys. Lett.* **319**:145-152.
99. **Figge, J., Rossing, T.H. und Fencel, V.** 1991. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J. Lab. Clin. Med.* **117**:453-467.
100. **Finzi, L., Bustamante, C., Garab, G. und Juang C.-B.** 1989. Direct observation of large chiral domains in chloroplast thylakoid membranes by differential polarization microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:8748-8752.
101. **Foote, C.S.** 1987. Type I and type II mechanisms in photodynamic action. In: *Light-activated Pesticides*, J.R. Heitz (Hrsg.), Am. Chem. Soc. 339, Washington D.C.22-38.
102. **Foote, C.S.** 1991. Definition of type-I and type-II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **54**:659.
103. **Frank, H.A. und Cogdell, R.J.** 1993. Photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. In: *Carotenoids in Photosynthesis*, A. Young, G. Britton (Hrsg.). 253-326, Chapman and Hall, London.
104. **Frank, H.A., Violette, C.A., Taremi, S.S. und Budil, D.E.** 1989. Linear dichroism of single crystal of the reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* wild type strain 2.4.1. *Photosyn. Res.* **21** :107-116.
105. **Frank, H.A., Young, A.J., Britton, G. und Cogdell, R.J.** 1999. *The photochemistry of carotenoids.* Kluwer Academic Press, Dordrecht.
106. **Furukawa, H., Oba, T., Tamiaki, H. und Watanabe, T.** 2000. Effect of C13(2)-Stereochemistry on the molecular properties of chlorophylls. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **73**:1341-1351.
107. **Gantt, E.** 1975. Phycobilisomes: Light-harvesting pigment complexes. *BioScience* **25**:781-788.
108. **Gantt, E.** 1986. Phycobilisomes. In: *Photosynthesis III*, L.A. Staehlin, C.J. Arntzen (Hrsg.). 327-337, Springer-Verlag, Berlin.
109. **Garab, G.** 1996. Linear and Circular Dichroism. In: *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, J. Amesz, A.J. Hoff (Hrsg.). 11-35, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
110. **Garab, G., Faludi-Dániel, A., Sutherland, J.C. und Hind, G.** 1988a. Macroorganization of chlorophyll *a/b* light-harvesting complex in thylakoids and aggregates: Information from circular differential scattering. *Biochemistry* **27**:2425-2430.
111. **Garab, G., Wells, K.S., Finzi, L. und Bustamante C.** 1988b. Helically organized macroaggregates of pigment-protein complexes in chloroplasts: Evidence from circular intensity differential scattering. *Biochemistry* **27**:5839-5843.
112. **Gavish, B.** 1986. Molecular dynamics and the transient strain model of enzyme catalysis. In: *The Fluctuating Enzyme*, G.R. Welch (Hrsg.). 263-339, Wiley-Interscience, New York.
113. **Gibson, S.L. und Hilf, R.** 1993. Photosensitization of mitochondrial cytochrome-c oxidised by hematoporphyrin derivatives. *Cancer Res.* **43**:4191-4197.
114. **Gollnick, K.** 1968. Type II photooxygenation reactions in solution. *Adv. Photochem.* **6**:1-122.
115. **Gouterman, M.** 1961. Spectra of porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **6**:138.
116. **Gouterman, M., Wagniere, G.H. und Snyder, L.C.** 1963. Spectra of porphyrins, Part II. Four orbital model. *J. Mol. Spectrosc.* **11**:108-127.

117. **Granick, S.** 1966. The induction *in vitro* of the synthesis of  $\alpha$ -aminolevulinic acid synthase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. *J. Biol. Chem.* **241**:1359-1375.
118. **Greene, R.F. und Pace, C.N.** 1974. Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsin, and  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.* **249**:5388-5393.
119. **Greenfield, N. und Fasman, G.D.** 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**:4108-4116.
120. **Gregory, R.P.F., Demeter, S. und Faludi-Dániel, A.** 1980. Macromolecular organization of chlorophyll *a* in aggregated chlorophyll *a/b* protein complex as shown by circular dichroism at room and cryogenic temperatures. *Biochim. Biophys. Acta* **591**:356-360.
121. **Griffiths, W.T.** 1991. Protochlorophyllide photoreduction. In: Chlorophylls, H. Scheer (Hrsg.). 433-449, CRC Press, Boca Raton.
122. **Griko, Y.V. und Privalov, P.L.** 1994. Thermodynamic puzzle of apomyoglobin unfolding. *J. Mol. Biol.* **235**:1318-1325.
123. **Griko, Y.V., Privalov, P.L., Venyaminov, S.Y. und Kutysenko, V.P.** 1988. Thermodynamic study of the apomyoglobin structure. *J. Mol. Biol.* **202**:127-138.
124. **Gross, S., Brandis, A., Chen, L., Rosenbach-Belkin, V., Roehrs, S., Scherz, A. und Salomon, Y.** 1997. Protein-A-mediated targeting of bacteriochlorophyll-IgG to *Staphylococcus aureus*: A model for enhanced site-specific photocytotoxicity. *Photochem. Photobiol.* **66**:872-878.
125. **Hambright, P.** 2000. The chemistry of water-soluble porphyrins. In: The Porphyrin Handbook, Kap. 18, K. Kadish, K.M. Smith und R. Guilard (Hrsg.). Academic Press, New York.
126. **Hanson, L.K.** 1991. Molecular orbital theory of monomer pigments. In: Chlorophylls, H. Scheer (Hrsg.). 993-1014, CRC Press, Boca Raton.
127. **Hardison, R.** 1998. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.* **201**:1099-1117.
128. **Hargrove, M.S., Wilkinson, A.J. und Olson, J.S.** 1996. Structural factors governing hemin dissociation from metmyoglobin. *Biochemistry* **35**:11300-11309.
129. **Harrison, S.C. und Blout, E.R.** 1965. Reversible conformational changes of myoglobin and apomyoglobin. *J. Biol. Chem.* **240**:299-303.
130. **Hartwich, G.** 1994a. Dynamik des Elektronentransfers in Reaktionszentren photosynthetischer Bakterien. Dissertation, TU München.
131. **Hartwich, G., Fiedor, L., Simonin, I., Cmiel, E., Schäfer, W., Noy, D., Scherz, A. und Scheer, H.** 1998. Metal-substituted bacteriochlorophylls. 1. Preparation and influence of metal and coordination on spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **120**:3675-3683.
132. **Hartwich, G., Friese, M., Scheer, H., Ogrodnik, A. und Michel-Beyerle, M.E.** 1995. Ultrafast internal conversion in  $^{132}\text{OH-Ni}$ -bacteriochlorophyll in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26. *Chem. Phys.* **197**:423-434.
133. **He, X.M. und Carter, D.C.** 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**:209-215.
134. **Heldt, H.W.** 1996. Pflanzenbiochemie. Spektrum-Verlag, Heidelberg.
135. **Helfrich, M.** 1995. Chemische Modifikation von Chlorophyll-Vorstufen und deren Verwendung zur Charakterisierung von Enzymen der Chlorophyll-Biosynthese. Dissertation, LMU München.
136. **Helfrich, M., Schoch, S., Lempert, U., Cmiel, E. und Rüdiger, W.** 1994. Chlorophyll synthetase cannot synthesize chlorophyll *a'*. *Eur. J. Biochem.* **219**:267-275.
137. **Helfrich, M., Schoch, S., Schaefer, W., Ryberg, M. und Ruediger, W.** 1996. Absolute configuration of protochlorophyllide *a* and substrate specificity of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* **118**:2606-11.
138. **Henderson, B.W. und Dougherty, T.J.** 1992. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **55**:145-157.
139. **Henderson, B.W., Sumlin, A.B., Owczarcak, B.L. und Dougherty, T.J.** 1991. Bacteriochlorophyll-*a* as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **10**:303-313.

140. **Henry, B.R. und Siebrand, W.** 1973. Radiationless Transitions. In: Organic Molecular Photophysics Vol. 1, J.B. Birks (Hrsg.). 153-179, Wiley, London.
141. **Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B.** 1995. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Thieme Verlag, Stuttgart.
142. **Hoff, A.J. und Amesz, J.** 1991. Visible absorption spectroscopy of chlorophylls. In: Chlorophylls, H. Scheer (Hrsg.). 723-734, CRC Press, Boca Raton.
143. **Houssier, C. und Sauer, K.** 1970. Circular dichroism and magnetic circular dichroism of the chlorophyll and protochlorophyll pigments. *J. Am. Chem. Soc.* **92**:779-791.
144. **Hsu, M. und Woody, R.W.** 1969. Origin of rotational strength of heme transitions of myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **91**:3679-81.
145. **Hsu, M. und Woody, R.W.** 1971. Origin of the heme Cotton effects in myoglobin and hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**:3515-25.
146. **Hughson, F.M., Wright, P.E. und Baldwin, R.L.** 1990. Structural characterization of the partly folded apomyoglobin intermediate. *Science* **249**:1544-1548.
147. **Hynninen, P.H.** 1991. Chemistry of Chlorophylls: Modifications. In: Chlorophylls, H. Scheer (Hrsg.). 145-209, CRC Press, Boca Raton.
148. **Hynninen, P.H. und Lötjönen, S.** 1985. Steric interactions between the peripheral substituents of 10(S)-chlorophyll derivatives and its conformational consequences, a proton magnetic resonance study. *Magn. Reson. Chem.* **23**:605.
149. **Iakovides, P., Simpson, D.J. und Smith, K.M.** 1991. Regioselective photoreduction of zinc (II) porphyrins to give chlorins. *Photochem. Photobiol.* **54**:335-343.
150. **Inamura, I., Ochiai, H., Toki, K., Watanabe, S., Hikino, S. und Araki, T.** 1983. Preparation and properties of chlorophyll/water-soluble macromolecular complexes in water. Stabilization of chlorophyll aggregates in the water-soluble macromolecule. *Photochem. Photobiol.* **38**:37-44.
151. **Johnson, W.J.C.** 1990. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins: Struct. Funct. Gen.* **7**:205-214.
152. **Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Seanger, W. und Krauss, N.** 2001. Three dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**:909-917.
153. **Jori, G.** 1992. Far-red absorbing photosensitizers: their use in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **62**:371-378.
154. **Jori, G.** 1997. Novel therapeutic modalities based on photosensitized processes. *EPA Newslett.* **60**:12-18.
155. **Jori, G. und Reddi, E.** 1993. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int. J. Biochem.* **25**:1369-1375.
156. **Jori, G., Rossi E. und Rubaltelli, F.F.** 1980. Phototherapy-induced covalent binding of bilirubin to serum albumin. *Pediatr. Res.* **14**:1363-1366.
157. **Kammhuber, N.** 1999. Bakteriochlorophyll-Derivate als neuartige Sensibilisatoren für die Photodynamische Therapie von Tumoren: Darstellung und Screening. Dissertation, LMU München.
158. **Katsumi, T.A., Aizawa, K., Kuroiwa, Y., Saito, K., Kurata, Y., Li, Y., Okunata, T., Konaka, C. und Kato, H.** 1996. Photodynamic therapy with a diode laser for implanted fibrosarcoma in mice employing mono-L-aspartyl chlorin e6. *Photochem. Photobiol.* **64**:671-675.
159. **Katz, J.J., Norman, G.D., Svec, W.A. und Strain, H.H.** 1968. Chlorophyll diastereomers. The nature of chlorophylls *a'* and *b'* and evidence for bacteriochlorophyll epimers from proton magnetic resonance studies. *J. Am. Chem. Soc.* **90**:6841.
160. **Kelly, S.M. und Price, N.C.** 1997. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **1338**:161-185.
161. **Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies, D.R., Phillips, D.C. und Shore, V.C.** 1960. Structure of myoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* **185**:422-427.
162. **Kessel, D.** 2004. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**:3-7.
163. **Kessel, D., Antolovich, M. und Smith, K.M.** 2001. The role of the peripheral benzodiazepine receptor in the apoptotic response to photodynamic activity. *Photochem. Photobiol.* **74**:346-349.

164. **Kiefhaber, T. und Baldwin, R.L.** 1995. Intrinsic stability of individual  $\alpha$ - helices modulates structure and stability of the apomyoglobin molten globule form. *J. Mol. Biol.* **252**:122-132.
165. **Kim, W.S.** 1966. Complete fractionation of bacteriochlorophyll and its degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* **112**:392-402.
166. **King, T.P.** 1973. Limited pepsin digestion of bovine plasma albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* **156**:509-520.
167. **Kirkwood, J.G.** 1937. The theory of optical rotatory power. *J. Chem. Phys.* **5**:479.
168. **Kirmaier, C., Gaul, D., Debex, R., Holten, D. und Schenck, C.C.** 1991. Charge separation in a reaction center incorporating bacteriochlorophyll for photoactive bacteriopheophytin. *Science* **251**:922-927.
169. **Klinke, R. und Silbernagl, S.** 1996. Lehrbuch der Physiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart.
170. **Kobayashi, M., Akiyama, M., Yamamura, M., Kise, H., Takaichi, S., Watanabe, T., Shimada, K., Iwaki, M., Itoh, S., Ishida, N., Koizumi, M., Kano, H., Wakao, N. und Hiraishi, A.** 1998. Structural determination of the novel Zn-containing bacteriochlorophyll in *Acidophilium Rubrum*. *Photochem. Photobiol.* **20**:75-80.
171. **Kobayashi, M., Vandemeent, E.J., Erkelens, C., Amesz, J., Ikegami, I. und Watanabe, T.** 1991. Bacteriochlorophyll *g* epimer as a possible reaction center component of Heliobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1057**:89-96.
172. **Kochevar, I.E., Bouvier, J., Lynch, M. und Lin, C.-W.** 1994. Influence of dye and protein location on photosensitization of the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1196**:172-180.
173. **Kochevar, I.E., Lambert, C.R., Lynch, M.C. und Tedesco, A.C.** 1996. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. *Biochim. Biophys. Acta* **1280**:223-230.
174. **Kogan, B.Y., Butenin, A.V., Kaliya, O.L.E.A. und Luk'yanets, E.A.** 1996. The kinetics of self-sensitized oxidation of dye for photodynamic therapy and of sensitized protein oxidation in aqueous solution. *Proc. SPIE* **2924**:69-74.
175. **Kohen, E., Santus, R. und Hirschberg, J.G.** 1995. Photobiology. Academic Press, New York.
176. **Konermann, L., Rosell, F.I., Mauk, A.G. und Douglas, D.J.** 1997. Acid-induced denaturation of myoglobin studied by time-resolved electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* **36**:6448-6464.
177. **Kraljic, I., Barboy, N. und Leicknam, J.-P.** 1979. Photosensitized formation of singlet oxygen by chlorophyll *a* in neutral aqueous micellar solution with Triton-X-100. *Photochem. Photobiol.* **30**:631.
178. **Krasnovskii, A.A.** 1948. Reversible photochemical reduction of chlorophyll by ascorbic acid. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **60**:421-424.
179. **Krasnovskii, A.A. und Pakshina, E.V.** 1963. A comparative study of formation of pheophytin from chlorophyll and its analogs in the dark and in the light. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **148**:935.
180. **Krasnovskii, A.A.Jr., Vichegzhana, I.V., Drozdova, N.N. und Krasnovskii, A.A.** 1985. Generation and quenching of singlet molecular oxygen by bacteriochlorophyll and bacteriopheophytin *a* and *b*. *Proc. Acad. Sci. U.S.S.R. Biochem. Sect.* **283**: 161.
181. **Krieg, M. und Whitten, D.G.** 1984a. Self-sensitized photooxidation of protoporphyrin IX and related free-base porphyrins in natural and model membrane systems. Evidence for novel photooxidation pathways involving amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **106**:2477-2479.
182. **Krieg, M. und Whitten, D.G.** 1984b. Self-sensitized photooxidation of protoporphyrin IX and related porphyrins in erythrocyte ghosts and microemulsions: a novel photooxidation pathway involving singlet oxygen. *J. Photochem.* **25**:235-252.
183. **Krätler, B. und Matile, P.** 1999. Solving the riddle of chlorophyll breakdown. *Acc. Chem. Res.* **32**:35-43.
184. **Kuriyan, J., Wilz, S., Karplus, M. und Petsko, G.A.** 1986. X-ray structure and refinement of carbon-monooxy (FeII)-myoglobin at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **192**:133-154.
185. **La Mar, G.N., Budd, D.L., Viscio, D.B., Smith, K.M. und Langry, K.C.** 1978. Proton nuclear magnetic resonance characterization of heme disorder in hemoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:5755-5759.

186. **La Mar, G.N., Davis, N.L., Parish, D.W. und Smith, K.M.** 1983. Heme orientational disorder in reconstituted and native sperm whale myoglobin. Proton nuclear magnetic resonance characterization by heme methyl deuterium labeling in the met-cyano protein. *J. Mol. Biol.* **168**:887-896.
187. **Lamm, O.** 1929. Theory and method of ultracentrifuging. *Z. physik. Chem.* **143**:177-190.
188. **Lamola, A.A., Asher, I., Muller-Eberhard, U. und Poh-Fitzpatrick, M.** 1981. Fluorometric study of the binding of protoporphyrin to hemopexin and albumin. *Biochem. J.* **196**:693-698.
189. **Lapouge, K., Näveke, A., Sturgis, J.N., Hartwich, G., Renaud, D., Simonin, I., Lutz, M., Scheer, H. und Robert, B.** 1998. Non-bonding molecular factors influencing the stretching wavenumbers of the conjugated carbonyl groups of bacteriochlorophyll *a*. *J. Raman Spectrosc.* **29**:977-981.
190. **Leeper, F.J.** 1991. Intermediate steps in the biosynthesis of chlorophylls. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 407-431, CRC Press, Boca Raton.
191. **Levy, J.G.** 1995. Photodynamic therapy. *Trends Biotechnol.* **13**:14-18.
192. **Li, C., Nishiyama, K. und Taniguchi, I.** 2000. Electrochemical and spectroelectrochemical studies on cobalt myoglobin. *Electrochim. Acta* **45**:2883-2888.
193. **Light, W.R., Rohlf, R.J., Palmer, G. und Olson, J.S.** 1987. Functional effects of heme orientational disorder in sperm whale myoglobin. *J. Biol. Chem.* **262**:46-52.
194. **Lightner, D.A. und McDonagh, A.F.** 1984. Molecular mechanisms of phototherapy for neonatal jaundice. *Accts. Chem. Res.* **17**:417-424.
195. **Lightner, D.A., Reisinger, M. und Landen, G.L.** 1986. On the structure of albumin-bound bilirubin. *J. Biol. Chem.* **261**:6034-6038.
196. **Limantara, L., Köhler, P., Wilhelm, B., Porra, R.J. und Scheer, H.** 2005. Photostability of bacteriochlorophyll *a* and derivatives of potential use for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* eingereicht.
197. **Llewellyn, C.A., Mantoura, R.F.C. und Brereton, R.G.** 1990. Products of chlorophyll photodegradation -2. Structural identification. *Photochem. Photobiol.* **52**:1043-1047.
198. **Lottspeich, F. und Zorbas, H.** 1998. *Bioanalytik. Spektrum-Verlag, Heidelberg.*
199. **Ludwig, M.L. und Matthews, R.G.** 1997. Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **66**:269.
200. **Lutz, M. und Mäntele, W.** 1991. Vibrational spectroscopy of chlorophylls. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 855-902, CRC Press, Boca Raton.
201. **Ma, L. und Dolphin, D.** 1995. A novel and convenient conversion of chlorins to phytoporphyrins during modification of chlorophyll derivatives. *Tetrahedron Lett.* **36**:7791-7794.
202. **MacRobert, A.J., Brown, S.G. und Phillips, D.** 1989. What are the ideal photoproperties for a sensitizer? In: *Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology, and Clinical Use*, Ciba Foundation Symposium, Vol. 146, G. Bock, S. Harnett (Hrsg.). 4-16, Wiley, Chichester.
203. **Maeda, H., Watanabe, T., Kobayashi, M. und Ikegami, I.** 1992. Presence of two chlorophyll *a'* molecules at the core of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1099**:74-80.
204. **Marko, H., Müller, N. und Falk, H.** 1989. Complex formation between biliverdin and apomyoglobin. *Monatsh. Chem.* **120**:591-595.
205. **Markovic, D.** 2003. persönliche Mitteilung.
206. **Marsh, K. und Connolly, J.S.** 1984. Effects of solvent on the rate of bacteriochlorophyll *a* photooxidation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **25**:183-195.
207. **Maurus, R., Bogumil, R., Nguyen, N.T., Mauk, A.G. und Brayer, G.** 1998. Structural and spectroscopic studies of azide complexes of horse heart myoglobin and the His-64→Thr variant. *Biochem. J.* **332**:67.
208. **Mazaki, H. und Watanabe, T.** 1990. Self-catalyzed epimerization of chlorophyll *a/a'* in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta* **1016**:190-196.
209. **Mazaki, H., Watanabe, T., Takahashi, T., Struck, A. und Scheer, H.** 1992. Epimerization of chlorophyll derivatives. V. Effects of the central magnesium and ring substituents on the epimerization of chlorophyll derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **65**:3080-3087.
210. **McDermott, G., Prince, S.M., Freer, A.A., Hawthornthwaitelawless, A.M., Papiz, M.Z., Cogdell, R.J. und Isaacs, N.W.** 1995. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* **374**:517-521.

211. **McDonagh, A.F.** 1979. Bile pigments: Bilatrienes and 5,15-biladienes. In: The Porphyrins Vol. 6, D. Dolphin (Hrsg.). 293-491, Academic Press, New York.
212. **Meyer-Betz, F.** 1913. Investigations on the biological (photodynamic) action of haematoporphyrin and other derivatives of blood and bile pigments. Dtsch. Arch. Klin. Med. **112**:476-503.
213. **Michel, H. und Deisenhofer, J.** 1988. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. Biochemistry **27**:1-7.
214. **Milgrom, L. und MacRobert, S.** 1998. Light years ahead. Chem Br. **34**:45-50.
215. **Moan, J., Rimington, C. und Western, A.** 1985. The binding of dihaematoporphyrin ether (photofrin II) to human serum albumin. Clin. Chim. Acta **145**:227-236.
216. **Mogi, T.** 2003. Biosynthesis and role of heme O and heme A. In: The Porphyrin Handbook, Kap. 74, K. Kadish, K.M. Smith und R. Guilard (Hrsg.), 157-181, Academic Press, New York.
217. **Mohney, B.K., Petri, E.T., Uvarova, V. und Walker, G.C.** 2000. Infrared absorption and ultraviolet-circular dichroism spectral studies of thermally induced unfolding of apomyoglobin. Appl. Spectrosc. **54**:9-14.
218. **Momenteau, M. und Reed, C.A.** 1994. Synthetic heme-dioxygen complexes. Chem. Rev. **94**:659.
219. **Moore, G.R. und Pettigrew, G.W.** 1990. Cytochromes c: Evolutionary, structural and physicochemical aspects. Springer-Verlag, Heidelberg.
220. **Moser, J.G.** 1998. Photodynamic tumor therapy : 2nd and 3rd generation photosensitizers. OPA, Amsterdam.
221. **Musewald, C., Hartwich, G., Lossau, H., Gicl, P., Pöllinger-Dammer, F., Scheer, H. und Michel-Beyerle, M.E.** 1987. Ultrafast photophysics and photochemistry of [Ni]-bacteriochlorophyll *a*. J. Phys. Chem. **103**:7055-7060.
222. **Myer, Y.P. und Pande, A.** 1978. Circular dichroism studies of hemoproteins and heme Models. In: The Porphyrins Vol. 3, D. Dolphin (Hrsg.). 271-322, Academic Press, New York.
223. **Nakamura, A., Akai, M., Yoshida, E., Taki, T. und Watanabe, T.** 2003. Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll *a'* and phylloquinone in photosystem I of oxygenic photosynthetic organisms. Universal existence of one chlorophyll *a'* molecule in photosystem I. Eur. J. Biochem. **270**:2446-2458.
224. **Northrup, S.H. und McCammon, J.A.** 1984. Gated reactions. J. Am. Chem. Soc. **106**:930-934.
225. **Noy, D., Fiedor, L., Hartwich, G., Scheer, H. und Scherz, A.** 1998. Metal-substituted bacteriochlorophylls. 2. Changes in redox potentials and electronic transition energies are dominated by intramolecular electrostatic interactions. J. Am. Chem. Soc. **120**:3684-3693.
226. **Noy, D., Yerushalmi, R., Brumfeld, V., Ashur, I., Scheer, H., Baldrige, K.K. und Scherz, A.** 2000. Optical absorption and computational studies of [Ni]-bacteriochlorophyll-*a*. New insight into charge distribution between metal and ligands. J. Am. Chem. Soc. **122**:3937-3944.
227. **Nyman, E. und Hynninen, P.H.** 2004. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **73**:1-28.
228. **Näveke, A., Lapouge, K., Sturgis, J.N., Hartwich, G., Simonin, I., Scheer, H. und Robert, B.** 1997. Resonance Raman spectroscopy of metal-substituted bacteriochlorophylls: Characterization of Raman bands sensitive to bacteriochlorin conformation. J. Raman Spectrosc. **28**:599-604.
229. **Olson, J.S.** 1997. Myoglobin discriminates between O<sub>2</sub>, NO and CO by electrostatic interactions with the bound ligand. JBIC **2**:544-552.
230. **Omata, T. und Murata, N.** 1983. Preparation of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and bacteriochlorophyll *a* by column chromatography with DEAE-Sepharose CL-6B and Sepharose CL-6B. Plant and Cell Physiol. **24**:1093-1100.
231. **Pandey, R.K., Constantine, S., Tsuchida, T., Zheng, G., Medforth, C.J., Aoudia, M., Kozyrev, A.N., Rodgers, M.A.J., Kato, H., Smith, K.M. und Dougherty, T.J.** 1997. Synthesis, photophysical properties, in vivo photosensitizing efficacy, and human serum albumin binding properties of some novel bacteriochlorins. J. Med. Chem. **40**:2770-2779.
232. **Pandey, R.K. und Herman, C.K.** 1998. Shedding some light on tumors. Chem. Ind. **739**-743.
233. **Pandey, R.K., Sumlin, A.B., Constantine, S., Aoudia, M., Potter, W.R., Bellnier, D.A., Henderson, B.W., Rodgers, M.A., Smith, K.M. und Dougherty, T.J.** 1996. Alkyl ether analogues of chlorophyll *a* derivatives: Part I. Synthesis, photophysical properties and photodynamic efficacy. Photochem. Photobiol. **64**:194-204.

- 
234. **Panick, G., Malessa, R. und Winter, R.** 1999. Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of beta-lactoglobulin A, B, and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small angle X-ray scattering. *Biochemistry* **38**:6512-6519.
235. **Parson, W.W.** 1991. Electron transfer in reaction centers. In: Chlorophylls, H. Scheer (Hrsg.). 1153-1180, CRC Press, Boca Raton.
236. **Paulsen, H.** 1997. Pigment ligation to proteins of the photosynthetic apparatus in higher plants. *Physiol. Plant.* **100**:760-768.
237. **Paulsen, H., Finkenzeller, B. und Kuhlein, N.** 1993. Pigments induced folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **215**:809-816.
238. **Pearlstein, R.M.** 1982. Chlorophyll singlet excitons. In: Photosynthesis Vol. 1, Govindjee (Hrsg.). 293-330, Academic Press, New York.
239. **Pearlstein, R.M., Davis, R.C. und Ditson, S.L.** 1982. Giant circular dichroism of high molecular-weight chlorophyllide-apomyoglobin complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:400-402.
240. **Pedersen, K.O.** 1962. Exclusion chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* **1**:157-168.
241. **Peters, T.Jr.** 1985. Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* **37**:161-245.
242. **Philipson, K.D., Tsai, S.C. und Sauer, K.** 1971. Circular dichroism of chlorophyll and related molecules calculated using a point monopole model for the electronic transition. *J. Phys. Chem.* **75**:1440-1445.
243. **Phillips, S.E.V.** 1980. Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **142**:531-554.
244. **Phillips, S.E.V. und Schoenborn, B.P.** 1981. Neutron diffraction reveals oxygen-histidine hydrogen bond in oxymyoglobin. *Nature* **292**:81-2.
245. **Pottier, R. und Kennedy, J.C.** 1990. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **8**:1-16.
246. **Quail, P.H.** 2002. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:85-93.
247. **Quillin, M.L., Arduini, R.M., Olson, J.S. und Phillips, G.N.Jr.** 1993. High-resolution crystal structures of distal histidine mutants of sperm whale myoglobin. *J. Mol. Biol.* **234**:140-155.
248. **Raab, O.** 1900. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. *Z. Biol.* **39**:524-546.
249. **Ravikanth, M. und Chandrashekar, T.K.** 1995. Nonplanar porphyrins and their biological relevance: ground and excited state dynamics. *Struct. Bonding* **82**:105.
250. **Ray, A., Reynolds, J.A., Polet, H. und Steinhardt, J.** 1966. Binding of large organic anions and neutral molecules by native bovine serum albumin. *Biochemistry* **5**:2606-2616.
251. **Raymonda, J.W. und Simpson, W.T.** 1967. Experimental and theoretical study of sigma-bond electronic transitions in alkanes. *J. Chem. Phys.* **47**:430.
252. **Remelli, R., Varotto, C., Sandona, D., Croce, R. und Bassi, R.** 1999. Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. *J. Biol. Chem.* **274**:33510-33521.
253. **Renger, G.** 1999. Photosysteme und Reaktionszentren. In: Photosynthese, D.P. Häder (Hrsg.). 90-114, Thieme-Verlag, Stuttgart.
254. **Reynolds, J.A., Herbert, S., Polet, H. und Steinhardt, J.** 1967. The binding of diverse detergent anions to bovine serum albumin. *Biochemistry* **6**:937-947.
255. **Rizzi, M., Bolognesi, M., Coda, A., Cutruzzola, F., Travaglini Allocatelli, C., Brancoccio, A. und Brunori, M.** 1993. Crystal structure of a distal site double mutant of sperm whale myoglobin at 1,6 Å resolution. *FEBS Letters* **320**:13-16.
256. **Robert, B.** 1996. Resonance Raman studies in photosynthesis - Chlorophyll and carotenoid molecules. In: Biophysical Techniques in Photosynthesis, J. Amesz, A.J. Hoff (Hrsg.). 161-176, Kluwer Academic Press, Dordrecht.
257. **Roberts, W.G., Smith, K.M., McCulloch, J.L. und Berns, M.W.** 1989. Skin photosensitivity and photodestruction of several potential photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* **49**:431-438.
258. **Rodriguez, J. und Holten, D.** 1989. Ultrafast vibrational dynamics of a photoexcited metalloporphyrin. *J. Phys. Chem.* **91**:3525-3531.
259. **Rodriguez, J. und Holten, D.** 1990. Ultrafast photodissociation of a metalloporphyrin in the condensed phase. *J. Phys. Chem.* **92**:5944-5950.

- 
260. **Rosenbach-Belkin, V.** 1988. The Primary Reactants in Bacterial Photosynthesis Modeling by *in vitro* Preparation. Dissertation, Weizmann Institute of Science, Rehovot.
261. **Rosenbach-Belkin, V., Chen, L., Fiedor, L., Tregub, I., Pavlotsky, F., Brumfeld, V., Salomon, Y. und Scherz, A.** 1996. Serine conjugates of chlorophyll and bacteriochlorophyll: Photocytotoxicity *in vitro* and tissue distribution in mice bearing melanoma tumors. *Photochem. Photobiol.* **64**:174-181.
262. **Röder, B. und Näther, D.** 1991. Characterization of photobiophysical properties of sensitizers used in photodynamic therapy. *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.* **1525**:377-384.
263. **Röder, B., Wischnewsky, G., Nicklisch, S., Meffert, H. und Slawatycki, E.** 1987. Pheophorbide *a* or *b* in treatment of skin diseases and various tumors. DD 248 282 .
264. **Rück, A., Hildebrandt, C., Köllner, T., Schneckenburger, H. und Steiner, R.** 1990. Competition between photobleaching and fluorescence increase of photosensitizing porphyrins and tetrasulphonated chloroaluminium-phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **5**:311-319.
265. **Rüdiger, W. und Thümmler, F.** 1991. Phytochrom, das Sehpigment der Pflanzen. *Angew. Chem.* **103**:1242-1254.
266. **Samejima, T. und Kita, M.** 1969. Optical rotatory dispersion and circular dichroism of horse myoglobin and its derivatives. *J. Biochem.* **65**:759.
267. **Samejima, T. und Yang, J.T.** 1964. Optical rotatory dispersion of sperm whale myoglobin and its derivatives. *J. Mol. Biol.* **8**:863 .
268. **Sauer, K.** 1978. Photosynthetic Membranes. *Acc. Chem. Res.* **11**:257-64.
269. **Schaber, P.M., Hunt, J.E., Fries, R. und Katz, J.J.** 1984. High performance liquid chromatographic study of the chlorophyll allomerization reaction. *J. Chromatogr.* **316**:25-41.
270. **Schachmann, H.K.** 1959. Ultracentrifugation in Biochemistry. Academic Press, New York .
271. **Scheer, H.** 1981. Biliproteine. *Angew. Chemie* **93**:230-250.
272. **Scheer, H.** 1982. Phycobiliproteins: molecular aspects of photosynthetic antenna systems. In: *Light Reaction Path of Photosynthesis*, F.K. Fong (Hrsg.). 7-45, Springer-Verlag, Berlin.
273. **Scheer, H.** 1991. Structure and occurrence of chlorophylls. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 3-30, CRC Press, Boca Raton.
274. **Scheer, H.** 1999. Pigmente und Antennenkomplexe. In: *Photosynthese*, D.P. Häder (Hrsg.). 65-89, Thieme-Verlag, Stuttgart.
275. **Scheer, H.** 2003. The pigments. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration Vol. 13. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*, B.R. Green, W.W. Parson (Hrsg.). 29-81, Springer-Verlag, Berlin.
276. **Scheer, H.** 2005. persönliche Mitteilung.
277. **Scheer, H.** in print. Biochemistry, biophysics and biological functions of chlorophylls: Overview. In: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, B. Grimm, R.J. Porra, W. Rüdiger und H. Scheer (Hrsg.), Kluwer, Dordrecht.
278. **Scheer, H. und Hartwich, G.** 1995. Bacterial reaction centers with modified tetrapyrrole chromophores. In: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, R.E. Blankenship, M.T. Madigan und C.E. Bauer (Hrsg.). 649-663, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
279. **Scheer, H. und Inhoffen, H.H.** 1978. Hydroporphyrins: Reactivity, spectroscopy and hydroporphyrin analogues. In: *The Porphyrins Vol. 2*, D. Dolphin (Hrsg.). 45-90, Academic Press, New York.
280. **Scheer, H. und Katz, J.J.** 1974. Structure of the Krasnovskii photoreduction product of chlorophyll *a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:1626-1629.
281. **Scheer, H. und Katz, J.J.** 1975. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of porphyrins and metalloporphyrins. In: *Porphyrins and Metalloporphyrins*, K.M. Smith (Hrsg.). 399-524, Elsevier, New York.
282. **Scheer, H. und Kufer, W.** 1977. Studies on plant bile pigments. IV. Conformational studies on C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* . *Z. Naturforsch.* **32c**:513-519.
283. **Scheer, H. und Struck, A.** 1993. Bacterial reaction centers with modified tetrapyrrole chromophores. In: *The Photosynthetic reaction center*, J. Deisenhofer, J.R. Norris (Hrsg.). 157-193, Academic Press, San Diego.
284. **Schenck, G.O. und Koch, E.** 1960. Zwischenreaktionen bei photosensibilisierten Prozessen in Lösungen. *Z. Elektrochem.* **64**:170-174.

285. **Scherz, A., Rosenbach-Belkin, V. und Fisher, J.R.E.** 1991. Chlorophyll aggregates in aqueous solution. In: Chlorophylls, H. Scheer (Hrsg.). 237-268, CRC Press, Boca Raton 237-268.
286. **Scherz, A., Salomon, Y., Brandis, A. und Scheer, H.** 2000. Palladium-substituted bacteriochlorophyll derivatives and use thereof. WO 00/33833.
287. **Scherz, A., Salomon, Y. und Fiedor, L.** 1994. Chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives, preparation and pharmaceutical compositions comprising them as photosensitizers for photodynamic therapy. Chem. Abs. **120**:386.
288. **Schlichter, J., Friedrich, J., Parbel, M. und Scheer, H.** 2000. New concepts in spectral diffusion physics of proteins. Photo. Sci. News **6**:100-111.
289. **Schlichting, I. und Chu, K.** 2000. Trapping intermediates in the crystal: ligand binding to myoglobin. Curr. Op. Struct. Biol. **10**:744-752.
290. **Schneckenburger, H., Rück, A., Bartos, B. und Steiner, R.** 1988. Intracellular distribution of photosensitizing porphyrins measured by video-enhanced fluorescence microscopy. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **2**:355-363.
291. **Schopfer, P. und Brennicke, A.** 1999. Pflanzenphysiologie. Springer-Verlag, Berlin.
292. **Schubert, D. und Schuck, P.** 1991. Analytical ultracentrifugation as a tool for studying membrane proteins. Prog. Colloid Polym. Sci. **86** :12-22.
293. **Schuck, P.** 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. Biophys. J. **78**:1606-1619.
294. **Schuck, P. und Demeler, B.** 1999. Direct sedimentation analysis of interference optical data in analytical ultracentrifugation. Biophys. J. **76**:2288-2296.
295. **Schuitmaker, J.J., Baas, P., van Leengoed, H.L.L.M., van der Meulen, F.W., Star, W.M. und van Zandwijk, N.** 1996. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **34**:3-12.
296. **Schulz, S.** 1999. Synthese von Protochlorophyllid-Derivaten zur Untersuchung der enzymatischen Photoreduktionsreaktion der NADPH-Protochlorophyllid-Oxidoreduktase. Zulassungsarbeit, LMU München.
297. **Seely, G.R.** 1966. Photochemistry of chlorophylls *in vitro*. In: The Chlorophylls, L.P. Vernon, G.R. Seely (Hrsg.). 523-568, Academic Press, New York.
298. **Seely, G.R. und Folkmanis, A.** 1964. Photoreduction of ethyl chlorophyllide *a* by ascorbic acid in ethanol-pyridine solutions. J. Am. Chem. Soc. **86**:2763-2770.
299. **Semichaevskii, V.D.** 1975a. Effect of Triton-X-100 on the spectrophotometric properties of artificial chlorophyll-protein complexes. Fiziol. Biokhim. Kul't. Rast. **7**:18-24.
300. **Semichaevskii, V.D.** 1975b. Principles of formation of chlorophyll-human serum albumin functionally active complexes in aqueous medium. Molekulyarnaya Biologiya **9**:351-360.
301. **Senge, M.O.** 1992. The conformational flexibility of tetrapyrroles - current model studies and photobiological relevance. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **16**:3-36.
302. **Shen, G.Z. und Vermaas, W.F.** 1994. Mutation of chlorophyll ligands in the chlorophyll-binding CP47 protein as studied in a *Synechocystis Sp.* PCC 6803. Biochemistry **33**:7379-7388.
303. **Shibata, H., Kurosaki, C., Kawashima, T. und Ochiai, H.** 1987. Preparation of water-soluble and stable chlorophylls and  $\beta$ -carotene by forming complexes with egg-albumin. Agric. Biol. Chem. **51**:3261-3266.
304. **Shibata, H., Ochiai, H., Kawashima, T., Okamoto, T. und Inamura, I.** 1986. Preparation and properties of the water-soluble chlorophyll-bovine serum albumin complexes. Biochim. Biophys. Acta **852**:175-182.
305. **Shibata, Y. und Kushida, T.** 1998. Determination of  $Q_x$ - and  $Q_y$ - absorption bands of Zn-porphyrin derivatives contained in proteins by hole-burning spectroscopy. Chem. Phys. Lett. **284**:115-120.
306. **Shreve, A. und Walla, P.** 1995. persönliche Mitteilung.
307. **Shrivastava, H.Y., Kanthimathi, M. und Nair, B.U.** 1999. Interaction of Schiff base with bovine serum albumin: site-specific photocleavage. Biochem. Biophys. Res. Commun. **265**:311-314.
308. **Shulman, R.G., Wuethrich, K., Yamane, T., Patel, D.J. und Blumberg, W.E.** 1970. Nuclear magnetic resonance determination of ligand-induced conformational changes in myoglobin. J. Mol. Biol. **53**:143-157.

309. **Sidler, W.** 1994. Phycobilisomes and phycobiliprotein structures. In: *Advances in Photosynthesis: The molecular biology of cyanobacteria*, D.A. Bryant (Hrsg.). 139-216, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
310. **Siebrand, W.** 1976. Nonradiative processes in molecular systems. In: *Modern Theoretical Chemistry Vol. 1, Part A, Dynamics of Molecular Collisions*, W.H. Miller (Hrsg.). 249-302, Plenum, New York.
311. **Sivaash, A.A.** 1985. Specificity of chlorophyll and chlorophyllide complexing with protein. *Ukrains'kii Botanichnii Zhurnal* **42**:41-44.
312. **Smith, J.R.L. und Calvin, M.** 1966. Studies on the chemical and photochemical oxidation of bacteriochlorophyll. *J. Am. Chem. Soc.* **88**:4500-4506.
313. **Smith, K.M.** 1975. General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds. In: *Porphyrins and Metalloporphyrins*, K.M. Smith (Hrsg.). 3-28, Elsevier, Amsterdam.
314. **Snigula, H.** 2003. (Bakterio-)Chlorophyll-Modifikationen zur Einlagerung in synthetische Peptide. Darstellung und Bindungsstudien von (Bakterio-)Chlorophyll-Derivaten an synthetische, modulare Proteine und den LH1-Komplex von *Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, LMU München.
315. **Sogbein, O.O., Simmons D.A. und Konermann, L.** 2000. Effects of pH on the kinetic reaction mechanism of myoglobin unfolding studied by time-resolved electrospray ionization mass spectroscopy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**:312-319.
316. **Spector, A.A., John, K. und Fletcher, J.E.** 1969. Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. *J. Lipid Res.* **10**:56-67.
317. **Spikes, J.D. und Bommer, J.C.** 1991. Chlorophyll and related pigments as photosensitizers in biology and medicine. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 1181-1195, CRC Press, Boca Raton.
318. **Squire, P.G., Moser, P. und O'Konski, C.T.** 1968. The hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer. *Biochemistry* **7**:4261-4272.
319. **Srajer, V., Schomacker, K.T. und Champion, P.M.** 1986. Spectral broadening in biomolecules. *Phys. Rev. Lett.* **57**:1267-1305.
320. **Stamler, J.S., Singel, D.J. und Loscalzo, J.** 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**:1898-1902.
321. **Staniforth, R.A., Bigotti, M.G., Allocatelli, F.C.C. und Brunori, M.** 1998. Unfolding of apomyoglobin from *Aplysia limacina*: The effect of salts and pH on the cooperativity of folding. *J. Mol. Biol.* **275**:133-148.
322. **Steiner, R.** 1984. Bakteriochlorophyll *b* aus *Ectothiorhodospiraltalochloris*. Dissertation, LMU München.
323. **Sternberg, E.D., Dolphin, D. und Brückner, C.** 1998. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **54**:4151-4202.
324. **Storch, K.F.** 1993. Stereospezifität des Austausches  $13^2$ -hydroxylierter Pigmente in photosynthetische Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides* R 26.1. Diplomarbeit, LMU München.
325. **Storf, M.** 2003. Chromophorbinding und Photochemie der  $\alpha$ -Untereinheit des Phycoerythrocyanins aus *Mastigocladus laminosus*. Dissertation, LMU München.
326. **Struck, A.** 1990. Chemisch modifizierte Bakteriochlorophylle und Bakteriopheophytin in den Bindungsstellen BA,B und HA,B von photosynthetischen Reaktionszentren aus *Rhb. sphaeroides* R26. Dissertation, LMU München.
327. **Struck, A., Cmiel, E., Katheder, I., Schäfer, W. und Scheer, H.** 1992. Bakteriochlorophylls modified at position C-3: long-range intramolecular interaction with position C- $13^2$ . *Biochim. Biophys. Acta* **1101**:321-328.
328. **Stryer, L.** 1961. Conformation-dependent Cotton effect in the Soret band of hemin: poly-L-lysine. *Biochim. Biophys. Acta* **54**:395-397.
329. **Stryer, L.** 1991. *Biochemie*. Spektrum-Verlag, Heidelberg.
330. **Sulc, F., Fleischer, E., Farmer, P.J., Ma, D. und La Mar, G.N.** 2003.  $^1\text{H}$ -NMR structure of the heme pocket of HNO-myoglobin. *JBIC* **8**:348-352.
331. **Svec, W.** 1991. The Distribution and Extraction of the Chlorophylls. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 89-102, CRC Press, Boca Raton.
332. **Takayuki, H.** 2000. Peroxidases. In: *Glykoenzymes*, O. Masatake (Hrsg.). 137-147, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

333. **Taniguchi, I., Li, C., Ishida, M. und Yao, Q.** 1999. Electrochemical and spectroelectrochemical properties of manganese reconstituted myoglobin. *Electroanal. Chem.* **460**:245-250.
334. **Teale, F.W.J.** 1959. Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone. *Biochim. Biophys. Acta* **35**:543.
335. **Teuchner, K., Stiel, H., Leupold, D., Scherz, A., Noy, D., Simonin, I., Hartwich, G. und Scheer, H.** 1997. Fluorescence and excited state absorption in modified pigments of bacterial photosynthesis: a comparative study of metal-substituted bacteriochlorophylls *a*. *J. Lumin.* **72-74**:612-614.
336. **Tinoco, I.J.** 1962. Theoretical aspects of optical activity. Part Two: Polymers. *Adv. Chem. Phys.* **4**:113-160.
337. **Tinoco, I.Jr.** 1960. Optical and other electronic properties of polymers. *J. Chem. Phys.* **33**:1332.
338. **Tollin, G.** 1991. Chlorophyll photochemistry in microheterogeneous media. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 317-337, CRC Press, Boca Raton.
339. **Tombacz, E. und Vozary, E.** 1980. Preparation and spectroscopic properties of an albumin-chlorophyll-*a* complex. *Acta Biologica Szeged.* **26**:33-39.
340. **Trebst, A.** 1999. Linearer und zyklischer Elektronentransport. In: *Photosynthese*, D.P. Häder (Hrsg.). 115-131, Thieme-Verlag, Stuttgart.
341. **Trelles, M.** 1990. Laser Tumor Therapy. II. *Col. Of. Medicos.*, Madrid.
342. **Troxler, R.F., Smith, K.M. und Brown, S.B.** 1978. Mechanism of photooxidation of bacteriochlorophyll-*c* derivatives. *Tetrahedron Lett.* **21**:491.
343. **Tsuchida, T., Zheng, G., Pandey, R.K., Potter, W.R., Bellnier, D.A., Henderson, B.W., Kato, H. und Dougherty, T.J.** 1997. Correlation between site II-specific human serum albumin (HSA) binding affinity and murine in vivo photosensitizing efficacy of some Photofrin components. *Photochem. Photobiol.* **66**:224-228.
344. **Urumow, T.** 1975. Metallkomplexe von Chlorophyllderivaten. Dissertation, TU München.
345. **Varadarajan, R., Lambright, D.G. und Boxer, S.G.** 1989. Electrostatic interactions in wild-type and mutant recombinant human myoglobins. *Biochemistry* **28**:3771-3781.
346. **Verhoeven, J.W.** 1996. Glossary of terms used in photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **68**:2223-2286.
347. **Verma, A., Nye, J.S. und Suyder, S.H.** 1992. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral type) benzodiazepine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:2256-2260.
348. **Vermaas, W.** 1993. Molecular-biological approaches to analyze photosystem-II structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **44**:457-481.
349. **Vojtechovsky, J., Chu, K., Berendzen, J., Sweet, R.M. und Schlichting, I.** 1999. Crystal structures of myoglobin-ligand complexes at near atomic resolution. *Biophys. J.* **77**:2153-2174.
350. **Vothknecht, U.C., Kannangara, C.G. und Wettstein, D.** 1998. Barley glutamyl tRNA (Glu) reductase: mutation affecting heme inhibition and enzyme activity. *Phytochemistry* **47**:513-519.
351. **Wagner, U.G., Müller, N., Schmitzberger, W., Falk, H. und Kratky, C.** 1995. Structure determination of the biliverdin apomyoglobin complex: Crystal structure analysis of two crystal forms at 1.4 and 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **247**:326-337.
352. **Wakao, N., Yokoi, N., Isoyama, N., Hiraishi, A., Shimada, K., Kobayashi, M., Kise, H., Iwaki, M., Itoh, S., Takaichi, S. und Sakurai, Y.** 1996. Discovery of natural photosynthesis using Zn containing bacteriochlorophyll in an aerobic bacterium *Acidophilium rubrum*. *Plant Cell Physiol.* **37**:889-893.
353. **Wardell, M., Wang, Z., Ho, J.X., Robert, J., Ruker, F., Ruble, J. und Carter, D.C.** 2002. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**:813-819.
354. **Warren, M.J., MacKay, J.J. und Sedoroff, R.R.** 1990. Tetrapyrrole assembly and modification into the ligands of biologically functional cofactors. *Trends Biochem. Sci.* **15**:486-491.
355. **Watanabe, T. und Kobayashi, M.** 1991. Electrochemistry of Chlorophylls. In: *Chlorophylls*, H. Scheer (Hrsg.). 287-309, CRC Press, Boca Raton.
356. **Watanabe, T., Kobayashi, M., Hongu, A., Nakazato, M., Hiyama, T. und Murata, N.** 1985. Evidence that a chlorophyll *a'* dimer constitutes the photochemical reaction center 1 (P700) in photosynthetic apparatus. *FEBS Lett.* **191**:252-256.
357. **Watanabe, T., Mazaki, H. und Nakazato, M.** 1987. Epimerization of chlorophyll derivatives. III. Chlorophyll-alpha-alpha' epimerization in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta* **892**:197.

- 
358. **Watanabe, T., Nakamura, A. und Kobayashi, M.** 2002. Chemical analytical approach to the molecular machinery of photosynthesis. Quest for exotic chlorophylls in the reaction centers. *Nippon Kagaku Kaishi* **2**:117-128.
  359. **Wehrmeyer, W.** 1983. Phycobiliproteins and phycobiliprotein organization in the photosynthetic apparatus of cyanobacteria, red algae, and cryptophytes. In: *Proteins and nucleic acids in plant systematics*, U. Jensen, D.E. Fairbrothers (Hrsg.). 144-167, Springer-Verlag, Berlin.
  360. **Weiss, C.Jr.** 1972. The  $\pi$ -electronic structure and absorption spectra of chlorophylls in solution. *J. Mol. Spec.* **44**:37-80.
  361. **Wiberg, N.** 1995. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter, New York.
  362. **Wilks, A.** 2002. Analysis of Heme and Hemoproteins. In: *Heme, Chlorophyll, and Bilins*, A.G. Smith, M. Witty (Hrsg.). 157-184, Humana Press Inc., Totowa, N.J.
  363. **Willick, G.E., Schonbaum, G.R. und Kay, C.M.** 1969. Circular dichroism and absorption spectra of horse radish peroxidase and sperm whale myoglobin in the Soret-region. *Biochemistry* **8**:3729.
  364. **Woodward, R.B. und Skaric, V.** 1961. A new aspect of the chemistry of chlorins. *J. Am. Chem. Soc.* **83**:4676-4678.
  365. **Woody, R.W.** 1985. Circular Dichroism of Peptides . In: *The Peptides*, V.J. Hruby (Hrsg.). 15-114, Academic Press, New York.
  366. **Wright, K.A. und Boxer, S.G.** 1981. Solution properties of synthetic chlorophyllide-apomyoglobin and bacteriochlorophyllide-apomyoglobin complexes. *Biochemistry* **20**:7546-7556.
  367. **Yamamoto, Y., Nakashima, T., Kawano, E. und Chujo, R.** 1998.  $^1\text{H}$ -NMR investigation of the influence of the heme orientation on functional properties of myoglobin. *Biochim. Biophys. Acta* **1388**:349-362.
  368. **Yan, Y. , Wang, Q., He, H., Hu, X., Zhang, R. und Zhou, H.** 2003. Two-dimensional infrared correlation spectroscopy study of sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation process of myoglobin. *Biophys. J.* **85**:1959-1967.
  369. **Zhang, L. und Guarente, L.** 1995. Heme binds to a short sequence that serves as regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* **14**:313-320.
  370. **Zuber, H. und Cogdell, R.J.** 1995. Structure and organisation of purple bacteria antenna complexes. In: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, R.E. Blankenship, M.T. Madigan und C.E. Bauer (Hrsg.). 315-318, Kluwer, Dordrecht.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Tetrapyrrolbiosynthese. Schematischer Überblick über wichtige Zwischenprodukte und Verzweigungen des Biosyntheseweges (in Anlehnung an Scheer (2003)).....	1
Abbildung 1-2. Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen Molekülorbitalen (oben), Pigmentstrukturen (Mitte) und Absorptionsspektren (unten) (in Anlehnung an Hanson (1991) und Scheer (2003)). .....	3
Abbildung 1-3. Photophysikalische Prozesse und Reaktionen bei der PDT: (A) Absorption, (F) Fluoreszenz, (IC) Interne Konversion, (ISC) Interkombination und (P) Phosphoreszenz. Der aufwärts zeigende Pfeil in Richtung der Typ-I-Reaktionen hat keinen Bezug zur Energieskala. In Anlehnung an Bonnett und Martinez (2001) und Nyman und Hynninen (2004). .....	9
Abbildung 1-4. Photooxidation von Chl <i>a</i> , welches an lipophile, von Wasser umgebene Partikel adsorbiert war (Llewellyn <i>et al.</i> , 1990). .....	13
Abbildung 1-5. Spaltung des isozyklischen Rings von 13 <sup>1</sup> -Desoxy-17 <sup>3</sup> -Methylester-Pheid <i>a</i> (Ma und Dolphin, 1995).....	13
Abbildung 1-6. Photooxidative Spaltung des Tetrapyrrolringsystems am Beispiel von BChl <i>c</i> (Troxler <i>et al.</i> , 1978; Brown <i>et al.</i> , 1980). .....	13
Abbildung 1-7. Graphische Darstellung von Pferdeherz-Myoglobin (PDB-Eintrag 1AZI). Die acht Helices sind mit A - H beschriftet.....	16
Abbildung 1-8. Graphische Darstellung von menschlichem Serum Albumin (HSA) mit gebundenem Protohäm und Myristat-Liganden (PDB-Eintrag 1N5U).....	17
Abbildung 2-1. Schematische Darstellung der Thunberg-Küvette. ....	51
Abbildung 3-1. Übersicht über die Strukturen der bei den Rekonstitutionen untersuchten Chromophore. In Tabelle 3-1 sind die Charakteristika der einzelnen Pigmente sowie die jeweiligen Substituenten R <sub>1</sub> und R <sub>2</sub> aufgelistet. (a) Chlorophyllid <i>a</i> (Chlid <i>a</i> ), (b) Bakteriochlorophyllid <i>a</i> (BChlid <i>a</i> ), (c) 3,3 <sup>1</sup> -E-sZsZsZ-Phycocyanobilin (PCB), dargestellt in zyklischer Konformation.....	58
Abbildung 3-2. Absorptionsspektren der Komplexe von Zn-Pheid <i>a</i> (—), Zn-BPheid <i>a</i> (—) und Ni-BPheid <i>a</i> (—) mit Apo-Myoglobin. Die Spektren wurden im Maximum der Soret-Bande normiert. In Abbildung 3-13 erfolgt die Darstellung dieser Spektren bezogen auf die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Komplexe. ....	61
Abbildung 3-3. Absorptionsspektren der Komplexe von Chlid <i>a</i> (—) und PCB (—) mit Apo-Myoglobin. Die Spektren wurden im Maximum der Soret-Bande normiert.....	62
Abbildung 3-4. Absorptionsspektren von nativem Myoglobin (—) und des Komplexes von Apo-Myoglobin mit Fe-Pheid <i>a</i> (—). Das Spektrum von Fe-Pheid- <i>a</i> -Mb wurde direkt dem nativen Gel entnommen und wegen der dabei auftretenden Streuung in der Basislinie korrigiert und geglättet. Die im Bereich von 300 bis 380 nm auftretenden Unregelmäßigkeiten sind eine Folge der Streuung, die Bande um 490 nm stellt ein Artefakt dar.....	63
Abbildung 3-5. Modell der Bindung von Phycocyanobilin in Myoglobin in Anwesenheit von Zn <sup>2+</sup> -Ionen. ....	65
Abbildung 3-6. Absorptionsspektren von Pd-BPheid <i>a</i> in Puffer-I (—) und -II (—). .....	66
Abbildung 3-7. Illustration der Ausrichtung des Häm-Kofaktors in der Mb-Bindungstasche mit Blick von vorne in die Tasche hinein. Die AS His93, His64 und Val68 sind schwarz hervorgehoben. (Maurus <i>et al.</i> , 1998). .....	69
Abbildung 3-8. Chromatogramme von extrahiertem Zn-Pheid (—) bei 420 nm und Zn-BPheid (—) bei 766 nm nach der Rekonstitution von Mb mit einem Überschuss an epimerer Pigmentmischung von Zn-(B)Pheid <i>a/a'</i> im Verhältnis von 3:1 ( <i>a/a'</i> ).....	71
Abbildung 3-9. Chromatogramme des zur Rekonstitution verwendeten Pigmentgemischs aus Zn-Pheid <i>a/a'</i> (—) und der aus den damit rekonstituierten Mb-Komplexen extrahierten Pigmente nach 1 h (—) und nach 24 h (—). Die Peaks der <i>a</i> -Epimere wurden zu Vergleichszwecken jeweils auf 1 normiert. Zur besseren Sichtbarkeit der die <i>a'</i> -Epimere kennzeichnenden Peaks wurden die Chromatogramme leicht gegeneinander versetzt dargestellt, die Retentionszeiten der Pigmente sind identisch.....	72
Abbildung 3-10. Absorptionsspektrum von 13 <sup>2</sup> -OH-Zn-Pheid- <i>a</i> -Mb.....	74
Abbildung 3-11. Chromatogramme des zur Rekonstitution verwendeten Pigmentgemischs aus Zn-13 <sup>2</sup> -OH-Pheid <i>a/a'</i> (—) und der aus den damit rekonstituierten Mb-Komplexen extrahierten Pigmente nach 1 h (—) und nach 24 h (—). Die Peaks der <i>a</i> -Epimere wurden zu Vergleichszwecken jeweils auf 1 normiert. Aufgrund der nach der Cahn/Ingold/Prelog-Nomenklatur veränderten Prioritätenfolge an C-13 <sup>2</sup> hat das <i>a</i> -Epimer in diesem Fall S-Konfiguration. ....	74

- Abbildung 3-12. Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Zn-Pheid *a* (links) und Zn-BPheid *a* (rechts) in Myoglobin. Ein Überschuss an Apo-Mb wurde mit den abgebildeten Mengen an Pigment titriert, anschließend wurde die eingesetzte Pigmentmenge gegen die Absorptionsintensität im Maximum der Q<sub>y</sub>-Bande aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet. Die Steigung dieser Geraden ergibt den nanomolaren Extinktionskoeffizienten. .... 76
- Abbildung 3-13. Absorptionsspektren von Zn-Pheid-*a*-Mb (—), Zn-BPheid-*a*-Mb (—) und Ni-BPheid-*a*-Mb (—). Alle Spektren wurden auf einer v-Skala auf gleiche Fläche von 300 bis 850 nm normiert. .... 78
- Abbildung 3-14. CD-Spektren von Zn-Pheid-*a*-Mb (oben) und Zn-BPheid-*a*-Mb (unten). Die Konzentration der Proben betrug jeweils 13 μM. Aufgrund der stark nachlassenden Sensitivität des Photomultipliers im langwelligen Bereich, wurden die Spektren geglättet. Hieraus resultieren die Schultern bei 680 nm (oben) und 738 nm (unten). Die Banden bei 440 und 695 nm im Spektrum von Zn-BPheid-*a*-Mb (unten) beruhen auf dem Vorhandensein einer kleinen Menge an 3-Acetyl-Zn-Pheid-*a*-Mb, welches durch Oxidation entsteht. .... 81
- Abbildung 3-15. Resonanz-Raman-Spektren von Zn-BPheid *a* (oben) in THF (—) und Mb (—), und von Zn-Pheid *a* (unten) in THF (—) und Mb (—). Die Spektren wurden bei 77 K in Standardpuffer-I aufgenommen. .... 83
- Abbildung 3-16. Ausschnitt aus den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von Zn-Pheid-*a*-Mb (—) und Zn-BPheid-*a*-Mb (—). Die Konzentration der Proben betrug ca. 0,5\*10<sup>-4</sup> M. .... 85
- Abbildung 3-17. Übersicht über die Strukturen der in Myoglobin inserierten Chromophore. (A) Zn-Pheid *a*, (B) Zn-Pheid *b*, (C) Zn-BPheid *a*, (D) Zn-Pheid *d*, (E) Meso-Zn-Pheid *a* und (F) Fe-Protoporphyrin IX mit Rotationsachse. Die Pyro-Derivate der abgebildeten Pigmente tragen an C-13<sup>2</sup> anstelle der COOCH<sub>3</sub>-Gruppe ein H-Atom. .... 86
- Abbildung 3-18. Ausschnitte aus nativen 10%-Mini-Gelen der präparierten Pigment-Myoglobin-Komplexe. Die „oberen“ bzw. „unteren“ Banden wurden jeweils aus einem präparativen nativen Gel eluiert und anschließend auf das native Mini-Gel aufgetragen. Die Gele 1 und 2 wurden zum Teil digital aus verschiedenen Gelen zu einem Gel zusammengesetzt (s. bspw. B2 und Mg), die relative Anordnung der Teilstücke zueinander wurde durch ZP als Markierungssubstanz gewährleistet. .... 89
- Abbildung 3-19. Ausschnitte aus nachträglich mit Coomassie-Blau gefärbten nativen 10%-Mini-Gelen. Die verwendeten Abkürzungen und Symbole entsprechen denen aus Abbildung 3-18, (apo) bedeutet Apo-Myoglobin. Für die Zusammensetzung der Gelausschnitte gilt das Gleiche wie in Abbildung 3-18. .... 90
- Abbildung 3-20. Absorptionsspektren von Zn-Pheid-*a*-Mb, Bande 1 (—) und Bande 2 (—). .... 92
- Abbildung 3-21. Absorptionsspektren von nativem Myoglobin, Bande 1 (—) und Bande 2 (—). .... 92
- Abbildung 3-22. Chromatogramme der aus den Banden 1 (P1) und 2 (P2) von Zn-Pheid-*a*-Mb isolierten Pigmente bzw. deren Gemischs (P1+P2). Der mit  $\star$  gekennzeichnete Hauptpeak entspricht Zn-Pheid *a*. Die im Vergleich mit Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9 leicht veränderte Retentionszeit dieses Pigments ist ein häufig wiederkehrendes Problem im Zusammenhang mit HPLC-Analysen, da der Equilibrierungszustand der Säulen und die Temperatur von Säulen und Lösungsmitteln an verschiedenen Tagen variieren. Die Eindeutigkeit der Zuordnung wurde mit Standardsubstanzen überprüft. .... 93
- Abbildung 3-23. Absorptionsspektren von Zn-BPheid-*a*-Mb, Bande 1 (—) und Bande 2 (—). .... 94
- Abbildung 3-24. FPLC-Laufprofile von Zn-Pheid-*a*-Mb (ZP-Mb) und Zn-BPheid-*a*-Mb (ZB-Mb) vor der nativen Gelelektrophorese. .... 95
- Abbildung 3-25. Errechnete Sedimentationskonstantenverteilung von nativem Myoglobin (Mb) und den aus den Gelbanden 1 und 2 von ZnBPheid-*a*-Mb (ZB-B1 und ZB-B2) bzw. Zn-Pheid-*a*-Mb (ZP-B1 und ZP-B2) eluierten Komplexen. .... 98
- Abbildung 3-26. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der aus den einzelnen Gelbanden eluierten Komplexe von Zn-Pheid-*a*-Mb und Zn-BPheid-*a*-Mb. Von unten nach oben: ZP-B1, ZP-B2, ZB-B1 und ZB-B2. Die Abkürzungen entsprechen den in Abbildung 3-25 verwendeten. Die Konzentration der Proben aus den Banden 1 betrug jeweils ca. 0,5 \*10<sup>-4</sup> M, die der Proben aus den Banden 2 ca. 1\*10<sup>-6</sup> M. Im letzteren Fall war jeweils aufgrund der begrenzten Probenmenge eine weitere Aufkonzentrierung nicht möglich. .... 100
- Abbildung 3-27. Guanidin-Denaturierung von Apo-Mb (○, —), Zn-BPheid-*a*-Mb (☆, —), Zn-Pheid-*a*-Mb (▲, —) und Mb (■, —) in Puffer-III/54% Glycerin bei Raumtemperatur. Die Denaturierung wurde durch CD-Spektroskopie im UV-Bereich verfolgt, auf der Ordinate sind die normierten Werte von  $\Delta A_{248-222 \text{ nm}}$  aufgetragen (s. Text). .... 103
- Abbildung 3-28. Thermische Stabilität von Apo-Mb (apo), Mb-Bande 1 (M1), Mb-Bande 2 (M2), Zn-Pheid-*a*-Mb-Bande 1 (P1), Zn-Pheid-*a*-Mb-Bande 2 (P2), Zn-BPheid-*a*-Mb-Bande 1 (B1) und Zn-BPheid-*a*-Mb-Bande 2 (B2). Die Säulen zeigen die Temperatur, bei der das CD-Signal des Proteins (schwarz) und das des Chromophors (grau) in der Mitte zwischen nativem und denaturiertem Zustand lag. Mit Ausnahme von Apo-Mb waren alle zugehörigen Kurven hyperbolisch (s. Abbildung 3-29 für das UV-Signal). .... 105
- Abbildung 3-29. Thermische Denaturierungskurven der verschiedenen Mb-Komplexe, verfolgt anhand des CD-Signals bei 222 nm. Das CD-Signal wurde bei T = 85 °C (= vollständige Denaturierung) gleich Null gesetzt. Der Anfangswert (= 0% Denaturierung) wurde auf 1 normiert. .... 106

Abbildung 4-1. Ausschnitte aus den bei der Aufreinigung von Zn-Pheid- <i>a</i> -BSA (ZP-BSA) und Zn-BPheid- <i>a</i> -BSA (ZB-BSA) verwendeten präparativen nativen Gelen, weitere Erläuterungen im Text.....	118
Abbildung 4-2. Native analytische PAGE (8%), gefärbt mit Coomassie-Blau, mit den aus den Banden 1 – 4 aus Abbildung 4-1 eluierten Komplexen von Zn-Pheid- <i>a</i> -BSA, nativem BSA und nativem Marker (M). ....	119
Abbildung 4-3. Elutionsprofile der aus den Banden 3 (—) und 4 (----) eluierten Zn-Pheid- <i>a</i> -BSA-Komplexe während der Gelfiltration. Gezeigt ist jeweils das Chromatogramm mit der Detektionswellenlänge 280 nm. Die Elutionsprofile bei einer Detektion bei 666 nm (nicht gezeigt) entsprechen den hier abgebildeten, es wurden somit jeweils die Pigment-Protein-Komplexe detektiert. ....	120
Abbildung 4-4. Native PAGE (12%) der untersuchten Pigment-BSA-Komplexe. Gezeigt sind jeweils ungefärbte Ausschnitte (links) im Vergleich mit im Anschluss mit Coomassie-Blau gefärbten Ausschnitten (rechts). (ZP) Zn-Pheid- <i>a</i> -BSA, (ZB) Zn-BPheid- <i>a</i> -BSA, (BP) BPheid <i>a</i> mit BSA, (PdB) Pd-BPheid <i>a</i> mit BSA, (Chl) Chl <i>a</i> mit BSA, (PCB) PCB-BSA, (Ni) Ni-BPheid- <i>a</i> -BSA, (Fe) Fe-Pheid- <i>a</i> -BSA, (BSA) natives BSA, (M) nativer Marker. ....	123
Abbildung 4-5. Ausschnitt der Aminosäuresequenzen von HSA und BSA im Bereich von Position 131 bis 190 (aus Carter und Ho (1994)). Die im Text diskutierten Reste sind fett hervorgehoben. ....	124
Abbildung 4-6. Absorptionsspektren der monomeren Komplexe von Zn-Pheid- <i>a</i> -BSA (----) und Zn-BPheid- <i>a</i> -BSA (—). Die Spektren wurden auf einer $\nu$ -Skala (vgl. Kapitel 3.2) auf die gleiche Fläche von 300-900 nm normiert und dann in die $\lambda$ -Skala transkribiert. ....	126
Abbildung 4-7. Absorptionsspektren der monomeren Komplexe von Ni-BPheid- <i>a</i> -BSA (—) und Zn-17 <sup>3</sup> -Ethyl-BPheid- <i>a</i> -BSA (—). Die Spektren sind auf die Fläche von 300-900 nm normiert. ....	126
Abbildung 4-8. Absorptionsspektren der monomeren Komplexe von PCB-BSA (—) und Fe-Pheid- <i>a</i> -BSA (—). Die Spektren sind auf die Fläche von 300-800 nm normiert. ....	127
Abbildung 4-9. CD-Spektren der Komplexe von BSA mit Zn-Pheid <i>a</i> (—) und Zn-BPheid <i>a</i> (----). Die Konzentration der Proben betrug jeweils ca. 15 $\mu$ M. Aufgrund der geringeren Sensitivität des Photomultipliers im langwelligen Bereich ab ca. 700 nm wurde das Spektrum von Zn-BPheid- <i>a</i> -BSA geglättet. ....	132
Abbildung 5-1. Photooxidation von Zn-Pheid <i>a</i> in Puffer-I unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. ....	139
Abbildung 5-2. Photoreaktion von Zn-Pheid <i>a</i> in Puffer-I unter Argon in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. Aufgrund der starken Absorption von Na-Dithionit im Bereich <400 nm, konnte die Absorption des Pigments dort nicht gemessen werden.....	140
Abbildung 5-3. Photooxidation von Zn-Pheid <i>a</i> in Toluol unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. ....	141
Abbildung 5-4. Kinetik der Bleichung der Q <sub>y</sub> -Absorption während der Belichtung von Zn-Pheid <i>a</i> in Lösungsmittel (Aceton ■, Methanol ●, Toluol ▲) unter aeroben Bedingungen.....	142
Abbildung 5-5. Absorption von Zn-Pheid <i>a</i> in Aceton (—), Methanol (—) und Toluol (----) nach zwei Stunden Belichtung im Gleichgewicht mit Luft. ....	142
Abbildung 5-6. Photooxidation von Zn-Pheid- <i>a</i> -Mb unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung in Puffer-I.....	144
Abbildung 5-7. Kinetik der Bleichung der Q <sub>y</sub> -Absorption während der Belichtung von Zn-Pheid- <i>a</i> -Mb in Puffer-I im Gleichgewicht mit Luft (■), in derselben Lösung mit 0,15% Pyridin (●), in derselben Lösung mit 0,15% Pyridin und $\beta$ -Carotin (▼), in derselben, Ar-gesättigten Lösung mit 0,15% Pyridin (▲).....	144
Abbildung 5-8. Photoreaktion von Zn-Pheid- <i>a</i> -Mb unter Argon in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung in Puffer-I. Der Reaktionsverlauf folgt dem gleichen Schema, unabhängig davon, ob 0,15% Pyridin der Lösung zugesetzt wurden oder nicht. Aufgrund der starken Absorption von Na-Dithionit im Bereich <400 nm, konnte die Absorption des Pigments dort nicht gemessen werden. ....	146
Abbildung 5-9. Photooxidation von Zn-Pheid- <i>a</i> -BSA unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung in Puffer-I.....	147
Abbildung 5-10. Photoreaktion von Zn-Pheid- <i>a</i> -BSA unter Argon in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung in Puffer-I.....	149
Abbildung 5-11. Photooxidation von Zn-BPheid <i>a</i> in Puffer-I unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. ....	151
Abbildung 5-12. Photoreaktion von Zn-BPheid <i>a</i> in Puffer-I unter Argon in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (----), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. ....	152
Abbildung 5-13. Kinetik der Bleichung der Q <sub>y</sub> -Absorption während der Belichtung von Zn-BPheid <i>a</i> in Lösungsmittel (Aceton ■, Methanol ●, Toluol ▲) unter aeroben Bedingungen.....	153

- Abbildung 5-14. Photooxidation von Zn-BPheid *a* in Methanol unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (—), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. .... 153
- Abbildung 5-15. Photooxidation von Zn-BPheid-*a*-Mb unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (—), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung in Puffer-I. .... 155
- Abbildung 5-16. Differenzspektren der Belichtung von Zn-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter aeroben (—) und anaeroben (—) Bedingungen. Die Differenzspektren wurden jeweils aus der Absorption vor und nach der Belichtung gebildet:  $A_{\text{nach 20 min Belichtung}} - A_{\text{vor 20 min Belichtung}}$ . .... 155
- Abbildung 5-17. Absorptionsspektren von Zn-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter aeroben Bedingungen nach 10 min Belichtung (—) und weiteren 15 min im Dunkeln (—). .... 156
- Abbildung 5-18. Photoreaktion der Belichtung von Zn-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (—), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. .... 157
- Abbildung 5-19. Photooxidation von Zn-BPheid-*a*-BSA unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (—), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung in Puffer-I. .... 158
- Abbildung 5-20. Photoreaktion der Belichtung von Zn-BPheid-*a*-BSA in Puffer-I unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (—), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. .... 159
- Abbildung 5-21. Kinetik der Bleichung der  $Q_y$ -Absorption während der Belichtung von Pd-BPheid *a* in Lösungsmittel (Aceton ■, Methanol ●, Toluol ▲) unter aeroben Bedingungen. .... 161
- Abbildung 5-22. Photooxidation von Pd-BPheid *a* in Methanol unter aeroben Bedingungen. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (—), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. .... 161
- Abbildung 5-23. Photoreaktion der Belichtung von Ni-BPheid-*a*-Mb in Puffer-I unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Na-Dithionit. Absorptionsspektren vor (—) und nach 1 min (—), nach 3 min (—), nach 10 min (—) und nach 20 min (—) Belichtung. .... 162
- Abbildung 5-24. HPLC-Chromatogramme von Zn-Pheid *a* und Derivaten nach der Extraktion aus Zn-Pheid-*a*-Mb vor (—) und nach (—) Belichtung des Pigment-Protein-Komplexes für 20 min unter aeroben Bedingungen in Puffer-I. Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: a =  $^{13}R$ -Zn-Pheid *a*, b =  $^{13}S$ -OH-Zn-Pheid *a*, d = Proto-Zn-Pheid *a*. Die Struktur von Produkt c ( $M_c = 686$  g/Mol) ist nicht bekannt. .... 165
- Abbildung 5-25. HPLC-Chromatogramm des Extrakts der Belichtung von Zn-Pheid-*a*-Mb für zwei Stunden unter aeroben Bedingungen in Puffer-I. .... 166
- Abbildung 5-26. HPLC-Chromatogramme von Zn-Pheid *a* und Derivaten nach der Extraktion aus Zn-Pheid-*a*-BSA vor (—) und nach (—) Belichtung des Pigment-Protein-Komplexes für 20 min unter aeroben Bedingungen in Puffer-I. Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: a =  $^{13}R$ -Zn-Pheid *a*, a' =  $^{13}S$ -Zn-Pheid *a*, b =  $^{13}S$ -OH-Zn-Pheid *a*, d = Proto-Zn-Pheid *a*. Die Struktur von Produkt c ( $M_c = 686$  g/Mol) ist nicht bekannt. Die Absorptionsspektren der mit einem Pfeil gekennzeichneten Peaks waren von äußerst geringer Intensität und zeigten starke Streuung. Es handelt sich hierbei offensichtlich um Chlorine ohne Zentralmetall, der Verlust des  $Zn^{2+}$ -Ions spiegelte sich in den zwei für Pheophorbide charakteristischen Banden im  $Q_x$ -Bereich wider. .... 167
- Abbildung 5-27. HPLC-Chromatogramme von Zn-Pheid *a* und Derivaten nach 20-minütiger Belichtung in Aceton (—), Methanol (—) und Toluol (—) unter aeroben Bedingungen. Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: a =  $^{13}R$ -Zn-Pheid *a*, b =  $^{13}S$ -OH-Zn-Pheid *a*, d = Proto-Zn-Pheid *a*. Die Struktur von Produkt c ( $M_c = 686$  g/Mol) ist nicht bekannt. .... 168
- Abbildung 5-28. HPLC-Chromatogramme von Zn-BPheid *a* und Derivaten nach der Extraktion aus Zn-BPheid-*a*-Mb vor (A) und nach (B) Belichtung des Pigment-Protein-Komplexes für 20 min unter aeroben Bedingungen in Puffer-I. Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: b =  $^{13}R$ -Zn-BPheid *a*, b' =  $^{13}S$ -Zn-BPheid *a*, c = 3-Acetyl- $^{13}R$ -Zn-BPheid *a*, c' = 3-Acetyl- $^{13}S$ -Zn-BPheid *a*. Die Chromatogramme wurden auf den jeweiligen Hauptpeak normiert, relativ dazu erfolgte die Normierung des jeweils begleitenden Chromatogramms. Extrahiert wurden die vier Chromatogramme bei 686 nm (—) und 771 nm (—), was jeweils den Absorptionsmaxima von Bakteriochlorin und Chlorin entspricht. .... 169
- Abbildung 5-29. HPLC-Chromatogramm des Extrakts der Belichtung von Zn-BPheid-*a*-Mb für zwei Stunden unter aeroben Bedingungen in Puffer-I. .... 170
- Abbildung 5-30. HPLC-Chromatogramme von Zn-BPheid *a* und Derivaten nach der Extraktion aus dem 20 min belichteten Zn-BPheid-*a*-BSA-Komplex in Puffer-I unter aeroben Bedingungen, bei 686 nm (—) und 771 nm (—). Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet: b =  $^{13}R$ -Zn-BPheid *a*, b' =  $^{13}S$ -Zn-BPheid *a*, c = 3-Acetyl- $^{13}R$ -Zn-BPheid *a*, c' = 3-Acetyl- $^{13}S$ -Zn-BPheid *a*. .... 171

- Abbildung 5-31. HPLC-Chromatogramme von Zn-BPheid *a* und Derivaten nach 20-minütiger Belichtung in Aceton (A) und Toluol (T) unter aeroben Bedingungen, bei 686 nm (—) und 771 nm (----). Durch Kochromatographie mit bekannten Pigmenten wurden den einzelnen Peaks folgende Produkte zugeordnet:  $b = 13^2\text{R-Zn-BPheid } a$ ,  $b' = 13^2\text{S-Zn-BPheid } a$ ,  $c = 3\text{-Acetyl-}13^2\text{R-Zn-BPheid } a$ ,  $c' = 3\text{-Acetyl-}13^2\text{S-Zn-BPheid } a$ . Die bei 771 nm registrierten Chromatogramme wurden jeweils auf Peak b normiert, die bei 686 nm wurden jeweils relativ dazu normiert. .... 172
- Abbildung 5-32. HPLC-Chromatogramm von Zn-BPheid *a* und Derivaten nach 20-minütiger Belichtung in Methanol unter aeroben Bedingungen, bei 437 nm (--) und 589 nm (—)..... 173
- Abbildung 5-33. HPLC-Chromatogramme von Pd-BPheid *a* und Derivaten nach 20-minütiger Belichtung unter aeroben Bedingungen in Aceton (—), Methanol (M: --/761 nm, ---/403 nm) und Toluol (----). Peak p entspricht Pd-BPheid *a*, die Zuordnung von Peak p' zu Pd-BPheid *a'* geschah aufgrund des Fehlens einer Vergleichssubstanz allein durch die Identität der Absorptionsspektren. Die Peaks  $y_1$  und  $y_2$  konnten nicht zugeordnet werden, die zugehörigen Absorptionsspektren sind in Abbildung 5-34 abgebildet. Alle Peaks, die mit einem Pfeil gekennzeichnet sind, besitzen typische Bakteriochlorinspektren mit intensiver  $Q_y$ -Absorption bei 761 nm und schwacher Soret-Absorption bei ca. 390 nm. Die  $Q_x$ -Banden befinden sich bei ca. 525 nm. .... 174
- Abbildung 5-34. Absorptionsspektren der Produkte  $y_1$  (—) und  $y_2$  (--) aus Abbildung 5-33, die Spektren wurden direkt dem HPLC-Chromatogramm entnommen..... 174



## Lebenslauf

Name	Stephanie Pröll (geb. Schulz)
Geburtstag	4. Februar 1975
Geburtsort	München
Familienstand	verheiratet
Sep. 1981 – Feb. 1984	Grundschule Seefeld-Hechendorf, Bayern
Feb. 1984 – Aug. 1985	Grundschule March-Hugstetten, Baden-Württemberg
1985 – 1986	St. Ursula-Gymnasium, Freiburg, Baden-Württemberg
1986 – 1994	Max-Born-Gymnasium, Germering, Bayern
Nov. 1994 – Aug. 1997	Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Sep. 1997 – Apr. 1998	Studium der “Lettres Modernes“ an der Université Paul Valéry, Montpellier, Frankreich
Mai 1998 – Apr. 2001	Fortsetzung und Abschluss des Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München (1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in Biologie, Chemie und Französisch)
Mai 2001	Beginn der Promotion am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanze (Department Biologie I – Botanik, LMU München) unter der Leitung von Prof. Dr. Hugo Scheer