1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

Erst die Untersuchung biologischer Moleküle mit physikalisch-chemischen Techniken erlaubte die Charakterisierung biologischer Prozesse auf molekularer Ebene und hat somit wesentlich das moderne Bild physiologischer Prozesse geprägt. Zu den heute angewendeten modernen Techniken gehören unter anderem Fluoreszenzspektroskopie [1;2], Absorptionsmessungen [3-5], Elektronen- und Lichtmikroskopie [6-8], Lichtstreuung [9], Elektrophorese [10;11], CD-Messungen [12], Kalorimetrie [13;14], Röntgenstrukturuntersuchungen [15;16] sowie NMR- und ESR-Spektroskopie [17-21]. In ihrer Aussagekraft sind alle genannten Methoden für sich allein genommen relativ begrenzt. So kann z.B. mit der Röntgenstrukturanalyse die dreidimensionale Struktur kristallin vorliegender Stoffe bestimmt werden; sie liefert aber keine Informationen über Dynamik und Beweglichkeit unter physiologischen Bedingungen. Aus diesem Grund ist gerade die Kombination mehrerer komplementärer Techniken zur Aufklärung der Wirkungsweise komplexer Systeme essentiell.

Die Fluoreszenzspektroskopie erweist sich hierbei als eine leistungsfähige und vielseitige Methode zur Erforschung von Systemen auf der molekularen oder supramolekularen Ebene. Ihre wesentlichen Vorteile sind insbesondere ihre hohe Sensitivität und Selektivität, die es erlaubt, auch geringe Probemengen zerstörungsfrei zu untersuchen. Die Fluoreszenzspektroskopie hat deshalb in den letzten Jahren einen immer höheren Stellenwert in der Erforschung biologischer und chemischer Systeme erhalten und ist mittlerweile auch in vielen anwendungsbezogenen Bereichen, wie der klinischen Medizin, der Prozessüberwachung und der Umweltanalytik etabliert. So gehört sie z.B. zu den wichtigsten Verfahren in der Spurenanalytik. Die herausragende Empfindlichkeit wird insbesondere zur Bestimmung von Rückständen genutzt. Sie hat in der DNA-Sequenzierung die gefährliche radioaktive Markierung fast vollständig abgelöst [22;23]. In der molekularen Genetik stellt die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ein wichtiges Markierungsverfahren dar, das für viele Untersuchungen benutzt wird [24]. So kann man mit Hilfe von FISH die Anzahl, Lage und Aktivität von Genen studieren oder auch gesamte Chromosomen mittels chromosomaler *in situ* Suppressions-Hybridisierung [25;26] markieren. Sie wird in der Zellidentifizierung und -sortierung durch Durchflusszytometrie, FACS (fluorescence activated cell sorter) [27;28] und im quantitativen Nachweis spezifischer Substanzen mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) angewendet.

Fluoreszenzmikroskope ermöglichen Zellbestandteile und deren Migration örtlich aufzulösen. Ihre Empfindlichkeit ermöglicht es sogar einzelne Moleküle zu untersuchen. Hierbei hat sich

die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) [29-31] hinsichtlich biologisch-chemischer Fragestellungen auf Einzelmolekülniveau als besonders leistungsfähiges Werkzeug herausgestellt und ein ganz neues Feld biologischer Forschung eröffnet.

Nach dem praktisch instantanen Prozess der Absorption eines Photons findet Fluoreszenz typischerweise auf der Zeitskala von Nanosekunden statt. In dieser Zeitspanne kann das elektronisch angeregte Molekül mit der Umgebung wechselwirken oder seine Lage im Raum ändern. Aus diesem Grund enthält das emittierte Licht (Intensität, Lage und Form des Spektrums, Polarisation) zusätzliche Informationen über die Molekülumgebung und die dynamischen Eigenschaften des Makromoleküls. Insbesondere zeitaufgelöste spektroskopische Methoden erlauben es, Aussagen über die Eigenschaften des angeregten Fluorophors und seiner Umgebung innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer zu treffen. Dabei können verschiedenste Prozesse eine Rolle spielen, wie z.B. Lösungsmittelrelaxation, Stoßprozesse, chemische Reaktionen (Protonierung, Ligandenbindung), Energietransfer und Änderungen in der Molekülorientierung. Veränderungen in den Spektren bilden hierbei die Grundlage verschiedener Fluoreszenzmethoden. Im Rahmen dieser Arbeit ist insbesondere der Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET), die zeitaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenz und die Untersuchung der Anisotropie von Interesse.

Beim Förster-Resonanz-Energietransfer wird die Anregungsenergie strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkung von einem Donor-Fluorophor auf einen Akzeptor-Chromophor übertragen. Die Energieübertragung ist dabei stark abstandsabhängig. Seine überragende analytische Bedeutung beruht darauf, dass er über Reichweiten beobachtet wird, die die Dimensionen von Makromolekülen haben, wie den Durchmesser von Proteinen oder die Dicke von biologischen Membranen. Seine Quantifizierung ermöglicht es, absolute Abstände in Makromolekülen zu messen. Er wird deshalb auch als „spektroskopisches Lineal“ bezeichnet [32]. FRET eignet sich somit gut für die Analyse von Konformationsänderungen und Assoziationsreaktionen, da gerade biochemische Interaktionen häufig mit einer Veränderung von Abständen einhergehen.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen sind besonders für Untersuchungen biologischer Makromoleküle weit verbreitet [1], da man aus ihnen weit mehr Informationen als aus konventionellen statischen Messdaten erhalten kann. So ermöglichen sie die Separation verschiedener Fluorophore nach ihrer Lebenszeit, die Unterscheidung zwischen dynamischen und statischem Quenching und die einfache Quantifizierung des Förster-Resonanz-Energietransfers. Ein großer Vorteil dieser Messungen ist, dass die Fluoreszenzlebenszeiten unabhängig von den absoluten Signalintensitäten sind, die durch äußere Faktoren wie Absorption, Konzentrationsänderungen und Streuung beeinflusst werden.

Aus der Abhängigkeit der Fluoreszenzanisotropie von der Rotationsbewegung resultieren vielfältige Anwendungen in der biochemischen Forschung. Mit ihr ist es möglich Proteindenaturierung zu quantifizieren, Assoziationen mit anderen Makromolekülen zu beobachten und interne Dynamik von Proteinen zu bestimmen. Weiterhin ermöglicht sie die Bestimmung der

Viskosität von Membranen. Mit zeitaufgelösten Messungen können zusätzlich die Größe von Molekülen und deren Flexibilität bestimmt werden.
Die Art der durchführbaren Experimente wird wesentlich von der Wahl geeigneter Fluorophore beeinflusst. Dabei sind grundsätzlich zwei verschiedene Gruppen zu unterscheiden: Intrinsische Fluorophore sind bereits natürlich in den zu analysierenden Substanzen vorhanden, extrinsische Fluorophore hingegen werden den Proben von außen zugegeben.
Die weite Verbreitung fluoreszenzspektroskopischer Untersuchungen von Proteinen liegt sicher auch darin begründet, dass viele Proteine bereits intrinsische Fluorophore enthalten. Eine zusätzliche Farbstoff-Markierung ist daher häufig nicht erforderlich. Von den 20 essentiellen Aminosäuren, aus denen Proteine aufgebaut sind, fluoreszieren die drei aromatischen Aminosäuren: Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Dabei wird die Fluoreszenz der Proteine von Tryptophan dominiert. Da Tryptophan jedoch nur mit ca. 1,1% [33] in Proteinen vertreten ist, bleibt die Anzahl der Tryptophan-Fluorophore in einem Protein überschaubar. Eine wertvolle Eigenschaft der intrinsischen Proteinfluoreszenz ist die hohe Sensitivität der Tryptophanfluoreszenz auf seine lokale Umgebung. In vielen Fällen werden Änderungen im Emissionsverhalten als Reaktion auf Konformationsänderungen oder -übergänge, Domänenassoziationen, Substratbindung oder Denaturierung beobachtet. Weiterhin zeigen Tyrosin und Tryptophan eine hohe Anisotropie und erlauben somit die Untersuchung der Beweglichkeit von Seitenketten im Protein über die Beobachtung des zeitlichen Polarisationsverlaufs.
Ein besonders interessanter intrinsischer Fluorophor ist das Protein GFP (green fluorescent protein), das eine stark fluoreszierende Gruppe enthält. Es wurde in der grün fluoreszierenden Qualle *Aequorea victoria* entdeckt [34]. Durch Übertragung des Gens in andere Zellen ist es möglich, Fusionsproteine und sogar fluoreszierende Zellen zu erzeugen. Das Gen wurde inzwischen vielfach modifiziert, so dass Proteine mit anderen spektroskopischen Eigenschaften (Farben) oder verbesserter Exprimierung in bestimmten Wirtsorganismen erzeugt wurden. Auf diese Weise kann man z.B. erreichen, dass verschiedene Organellen in einer Zelle mit verschiedenen Farben markiert werden.
Heutzutage gibt es eine mannigfaltige Auswahl an extrinsischen Fluorophoren mit verschiedensten Eigenschaften, die eine spektroskopische Anwendung immer mehr erleichtern. So konnte das zugängliche Beobachtungszeitfenster, welches durch die Lebenszeit der Fluorophore begrenzt wird, durch die Entwicklung von Substanzen mit extrem langer Lebenszeit vergrößert werden [35]. Eine weitere besondere Klasse von Fluorophoren, die intensiv entwickelt werden, sind die Fluoreszenzsensoren. Ihre spektroskopischen Eigenschaften reagieren sensitiv auf äußere Einflüsse, wie den pH-Wert oder die Bindung von Ionen.

1.2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Anwendung moderner fluoreszenzspektroskopischer Methoden zur Untersuchung von biologischen Makromolekülen. Dazu sollten mehrere Techniken angepasst und miteinander kombiniert werden, die in unserer Arbeitsgruppe bereits seit einiger Zeit insbesondere für die Analyse kleiner Moleküle angewendet werden. Mit Hilfe eines Kurzpulslasersystems und der dazugehörigen Detektionseinheit sollten photophysikalische Prozesse in ausgewählten Zielsystemen auf einer Pikosekunden-Zeitskala studiert werden. Geplant war hier der Umbau der Anlage, um zeitabhängige Polarisationseffekte untersuchen zu können. Damit sollen Informationen über die Beweglichkeit von Proteinen bzw. von Seitenketten im Protein erhalten werden.

Bei der Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES) werden nahezu simultan alle Anregungs- und Emissionsspektren einer Substanz aufgenommen und man erhält einen „spektroskopischen Fingerabdruck“ der Probe. Die bisherige Anlage war auf den Nachweis von Radikalen mittels gepulster Laser optimiert und war bzgl. Durchstimmbereich und Nachweisempfindlichkeit nur bedingt für die Analyse von Makromolekülen in Lösung geeignet. Durch Neubeschaffungen (Spiegeloptik, back-illuminated CCD-Kamera) sollten der zugängliche Anregungs- und Detektionsbereich wesentlich vergrößert und bisher auftretende Kalibrationsprobleme vermindert werden.

Die Leistungsfähigkeit dieser Kombination statischer und dynamischer Techniken zur spektroskopischen Charakterisierung von Makromolekülen sollte an mehreren unterschiedlichen Systemen demonstriert werden.

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Ch. Herrmann (MPI Dortmund, jetzt Uni Bochum) sollten Strukturänderungen und Reaktionen des Ras-Proteins fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert werden. Ras fungiert als molekularer Schalter in vielen Signaltransduktionskaskaden und ist unter anderem an der Tumorentstehung beteiligt; das Forschungsinteresse an diesem System ist deshalb besonders groß. Im Rahmen weiterer Kooperationen sollten die hier gewonnen Ergebnisse auch auf die Untersuchung weiterer Proteine angewendet werden. In Zusammenarbeit mit Prof. H. Ragg (Universität Bielefeld) sollen die Zink- und Heparinbindung an den Heparinkofaktor II (HCII) untersucht werden.

Kurze Peptide eignen sich gut zur grundlegenden Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten intrinsischen Fluorophore. Darüber hinaus gibt es bei biologisch relevanten Peptiden einige interessante wissenschaftliche Fragestellungen, die sich gut mit spektroskopischen Methoden untersuchen lassen. So soll am Beispiel des Neuropeptid Y (NPY) in Kooperation mit Prof. A. Beck-Sickinger (ETH Zürich, jetzt Universität Leipzig) die Konformationsdynamik sowie die Dimerisierung unter physiologischen Bedingungen analysiert werden. Diese Punkte werden zur Zeit in der Literatur kontrovers diskutiert. Geeignete Untersuchungsmethoden sind hier insbesondere die zeitaufgelöste Anisotropie

sowie die Analyse des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) zwischen den beiden Enden des Peptids.

FRET ist eine Methode, die sich ausgezeichnet für Untersuchungen zur molekularen Erkennung (molecular recognition) eignet. In Zusammenarbeit mit PD Th. Schmitt-John (Universität Bielefeld) sollen Messungen zur Entwicklung einer neuartigen Methode zur Zellerkennung durchgeführt werden. Die Grundidee ist hier, zellartspezifische mRNA durch Hybridisierung an zwei fluoreszenzmarkierte DNA-Primer nachzuweisen, die als FRET-Paar wirken können.

Darüber hinaus sollte gezeigt werden, dass mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden auch nicht-biologische Fragestellungen untersucht werden können. Dazu sollten spezielle Ruthenium-Pyridin-Komplexe spektroskopisch charakterisiert werden, die im Hinblick auf eine mögliche Verwendung in speziellen Solarzellen, den sogenannten *photosensitized cells* synthetisiert wurden. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Prof. U. Siemeling (Universität Kassel) durchgeführt. Ziel war hier die Identifizierung von Übergängen mit speziellen Eigenschaften sowie die Untersuchung der wellenlängenabhängigen Quanteneffizienz.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel wird zunächst auf die elementaren Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie eingegangen. Danach werden die theoretischen Aspekte der in dieser Arbeit verwendeten Methoden (Förster-Resonanz-Energietransfer und Anisotropie) genauer beschrieben. Nach dieser Einführung werden die speziellen spektroskopischen Eigenschaften der untersuchten Makromoleküle dargestellt.

2.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

2.1.1 Absorption

Durch Absorption von Strahlung gelangt ein Molekül innerhalb von Femtosekunden (10^{-15} s) von einem Zustand niedriger Energie E in einen Zustand höherer Energie E^*. Die Energie der eingestrahlten Photonen muss dabei dem Abstand der Energieniveaus $h\tau = E^* - E$ entsprechen. Diese Energie kann im Molekül zu Elektronenübergängen und Änderungen des Schwingungs- und Rotationszustandes führen. Für die Abnahme der Intensität I des auf eine absorbierende Probe eingestrahlten Lichtes gilt das Lambert-Beersche-Gesetz:

$$4\, dI \mid c \; \kappa \; I \; dx \tag{2.1}$$

$$A \mid \lg\frac{I_0}{I} \mid c \; \kappa \; d \tag{2.2}$$

Hierbei ist A die Absorption, I_0 die Intensität des eingestrahlten Lichts, c die Konzentration, κ der molare Absorptionskoeffizient und d die Dicke der Probe. Das Verhältnis der Intensität nach und vor dem Probendurchgang I / I_0 wird als Transmission T bezeichnet. Schematisch lassen sich solche Übergänge in einem Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.1) darstellen. Die Intensität der einzelnen Übergänge wird durch das Franck-Condon-Prinzip bestimmt. Es besagt, dass sich die Lage der Atomkerne beim Strahlungsübergang praktisch nicht ändern, da die Änderung des Elektronenzustands erheblich schneller erfolgt, als die Änderung des Kernabstands.

2.1.2 Lumineszenz

Das Molekül im angeregten Zustand kann seine Energie auf verschiedene Arten wieder abgeben. Einige der dabei möglichen Prozesse sind in Abbildung 2.1 grafisch dargestellt. Große Moleküle in Lösung geben ihre Schwingungsenergie zunächst innerhalb einiger Picosekunden (10^{-12} s) durch Stöße an die Moleküle in der Umgebung ab (*internal conversion*) und gelangen dadurch in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten