

**Einlagerung von Häm, Chlorophyll- und
Bakteriochlorophyllderivaten in *de novo*
synthetisierte Peptide als Modellsysteme
natürlicher Protein-Kofaktor-Komplexe**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anke Mennenga

aus Norden

Januar 2007

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2003 bis Januar 2007 am Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Lubitz und Herrn Prof. Dr. W. Gärtner angefertigt.

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. W. Lubitz

Koreferent: Prof. Dr. R. Weinkauff

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2007

*Holzhacken ist deshalb so beliebt,
weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.*

Albert Einstein

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits teilweise veröffentlicht oder auf Tagungen vorgestellt.

Veröffentlichungen:

1. A. Mennenga, W. Gärtner, W. Lubitz und H. Görner
Effects of Noncovalently Bound Quinones on the Ground and Triplet States of Zinc Chlorins in Solution and Bound to *De Novo* Synthesized Peptides
Phys. Chem. Chem. Phys., 2006, 8: 5444-5453.
2. A. Mennenga, M. van Gastel, H. Görner, I. Heise, W. Gärtner und W. Lubitz
Interaction of Heme- and Chlorophyll-based Cofactors with *De Novo* Synthesized Peptides
J. Pept. Sci., **2006**, 12:179-179 Suppl. S.
3. A. Mennenga, W. Gärtner und W. Lubitz
Interaction of Heme- and Chlorophyll-based Cofactors with *De Novo* Synthesized Peptides eingereicht für *Proceedings of the European Peptide Symposium 2006*.

Tagungen:

1. A. Mennenga, I. Heise, W. Gärtner, W. Lubitz
Protein *de novo* Synthesis of Heme Binding Peptides as Models for Cytochromes (Poster),
Probing the Molecular Basis of Protein Function through Chemistry, 13.05. - 15.05.2004,
Schloß Ringberg, Rottach-Egern.
2. A. Mennenga, M. van Gastel, I. Heise, W. Gärtner, W. Lubitz
Interactions of Chlorins with *de novo* Synthesized Peptides (Poster),
7th German Peptide Symposium, 27.02. - 02.03.2005, GBF Braunschweig.
3. A. Mennenga, M. van Gastel, I. Heise, W. Gärtner, W. Lubitz
De novo Synthesized Peptides: Light-induced Electron Transfer between Metallo-Chlorins
and a Noncovalently Bound Quinone (Poster),
15th IUPAP, 5th EBSA International Biophysics Congress, 27.08. - 01.09.2005,
Montpellier, Frankreich.
4. A. Mennenga, M. van Gastel, I. Heise, W. Gärtner, W. Lubitz
Interactions of Chlorins with *de novo* Synthesized Peptides (Poster),
GDCh-Jahrestagung, 11.09. - 14.09.2005, Düsseldorf.
5. A. Mennenga, W. Gärtner, W. Lubitz
Characterization of *de novo* Synthesized Pigment-Peptide Complexes (Vortrag),
SFB 663-Tagung, 12.04.06, Düsseldorf.
6. A. Mennenga, M. van Gastel, H. Görner, I. Heise, W. Gärtner, W. Lubitz
Interaction of Heme- and Chlorophyll-based Cofactors with *de novo* Synthesized Peptides
(Poster), 29th European Peptide Symposium, 03.09. - 08.09.2006, Gdansk, Polen.
7. A. Mennenga, M. van Gastel, H. Görner, I. Heise, W. Gärtner, W. Lubitz
Spectroscopic Investigations of Zinc Chlorin Triplet States in Solution and Bound to *De
Novo* Synthesized Proteins (Poster),
1. SFB663-Workshop, 02.10. - 03.10.2006, Bad Honnef.

Abstract

Incorporation of Heme, Chlorophyll and Bacteriochlorophyll Derivatives in *De Novo* Synthesized Peptides as Model Systems for Native Protein-Cofactor-Complexes

The light harvesting complexes of higher plants or photosynthetic bacteria absorb and transport light energy to the reaction center, where it is converted into an electrochemical potential. This process involves multiple electron-transfer steps between pigment molecules ((bacterio)chlorophylls or hemes) and quinones. Some of these electron transfer steps should allow the detection of radical species and e.g. EPR spectroscopy can be used as a valuable tool to understand these processes in greater detail. As a synthetic approach for these investigations, peptides were synthesized with their sequences based on naturally occurring proteins which allow the incorporation of cofactors from complexes of photosynthesis or the respiratory chain. These synthetic peptides, so called *maquettes*, were used in this thesis to address several topics:

A small peptide segment, in particular, a four-helix bundle was designed based on the cytochrome *b* subunit of the cytochrome *bc*₁ complex from *Rhodobacter capsulatus* (Robertson et al., Nature, 1994, 368:425-432), in order to study its interactions with heme- and various derivatives of (bacterio)chlorophyll cofactors. The chemical peptide synthesis was performed with a multiple peptide synthesizer using the Fmoc-strategy on a PAL-PEG-PS resin. The peptides were purified by high performance liquid chromatography (HPLC) and identified by MALDI-TOF and ESI mass spectrometry. The heme bound four-helix bundle could even be detected by ESI-MS, indicating the high binding affinity of the peptide. The two hemes in the four-helix bundle, which consists of two identical peptide subunits with a helix-turn-helix binding motif have redox potentials separated by 100 mV, indicating a cooperative electrochemistry of the two cofactors. In the native protein fragment two histidine residues ligate the heme group. In another synthesized peptide one of the histidines was replaced by methionine, following the sequence motif of cytochrome *c*. Besides this amino acid exchange, also peptides of different length were used for heme incorporation and interaction studies.

The second part of the thesis was about the incorporation of zinc chlorins into four-helix bundles as a first step towards the creation of an artificial photosynthetic reaction center. As cofactor chlorophyll *a* was isolated from *Spirulina platensis* and converted into a more hydrophilic zinc chlorin derivative. After incorporation of this cofactor and also of zinc

chlorin e_6 , respectively, into the peptides and characterization of their ground-state, the triplet state of these metalloproteins was generated by irradiation and investigated by transient-EPR and time resolved absorption spectroscopy. The addition of an exogenously located and noncovalently bound quinone as an electron acceptor for the excited zinc chlorin *maquettes* generated a radical pair signal in the triplet spectra, indicative of a light-induced electron transfer process. The quenching rate constants of the zinc chlorin triplet states by *p*-benzoquinone (BQ) in a buffered solution were four times faster in comparison with those of the peptide bound zinc chlorins. A ground-state interaction of zinc chlorins in aqueous solution with BQ was demonstrated using UV-visible and fluorescence spectroscopy. In contrast, such interaction could be prevented when the zinc chlorins were bound to the *maquettes*.

Finally, the interactions of pigment molecules with chemically synthesized transmembrane peptides from the light-harvesting (LH) complexes of *Rhodobacter sphaeroides* were investigated. The peptides adopt an α -helical structure in the presence of small amounts of detergent (0.66 % of n-octyl- β -D-glucopyranoside), which in one case could even be confirmed by 2D-NMR spectroscopy. The pigment molecules for this part, bacteriochlorophyll *a* and lutein, were isolated from *Allochromatium vinosum* and *Spinacia oleracea*, respectively. The excited state fluorescence spectrum of the artificial LH complex gave evidence for an energy transfer process between the pigment molecules, which took not place in the absence of the peptide environment.

The presented work provides a promising basis for the development of various model systems, which may yield detailed information on the structure-function relationship of naturally-occurring protein complexes found in respiration and photosynthesis.

Abkürzungen

a	absorptive Übergänge
A	Absorption
Abb.	Abbildung
analyt.	analytisch
BChla	Bakteriochlorophyll <i>a</i>
BOP	(Benzotriazol-1-yl-oxy)-tris-(dimethylamino)- phosphonium-hexafluorophosphat
BPhea	Bakteriopheophytin <i>a</i>
BPheida	Bakteriopheophorbid <i>a</i>
BQ	Benzochinon
<i>t</i> -Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
<i>t</i> -But	<i>tert.</i> -Butyl
<i>c</i>	Konzentration
Cbz	Carbobenzyloxy
CD	<i>Circular Dichroism</i>
Chla	Chlorophyll <i>a</i>
cw	<i>continuous wave</i>
Cytc	Cytochrom <i>c</i>
Da	Dalton
DA	Donator-Akzeptor
DAF	<i>delay after flash</i>
DE	Diethylether
DEAE	Diethylaminoethylzellulose
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNP	2,2'-Dithiobis-5-nitropyridin
e	emissive Übergänge
ϵ	Extinktionskoeffizient
$E_{m,pH}$	Halbstufenpotential bei einem bestimmten pH-Wert
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
ESEEM	<i>Electron Spin Echo Envelope Modulation</i>
ESI-MS	Elektrospray Ionisierungs-Massenspektrometrie
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
F	Fluoreszenz
FePPIX	Eisen-Protoporphyrin IX
fMet	Formyl-Methionin
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
ΔG_{H_2O}	freie Entfaltungsenthalpie in wässriger Lösung
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl- uronium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HFA	Hexafluoraceton
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ic	<i>internal conversion</i>
isc	<i>intersystem crossing</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
$K_3[Fe(CN)_6]$	Kaliumhexacyanoferrat
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
LDAO	N-Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid
LH1,2	Lichtsammelkomplex 1, 2 aus Purpurbakterien
LHC	<i>light harvesting complex</i> , pflanzlicher Lichtsammelkomplex
LPLC	<i>Low Pressure Liquid Chromatography</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry</i>
<i>m</i>	Kooperativitätsmaß
me-1	Peptid me-1
MES	Morpholinoethansulfonsäure
M	Molekulargewicht
MO	Molekülorbital
MV	Methylviologen
NaAc	Natriumacetat
$Na_2S_2O_4$	Natriumdithionit
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHE	Normal-Wasserstoff-Elektrode
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OD	Optische Dichte
β -OG	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
OPO	<i>Optical Parametric Oscillator</i>
PAL-PEG-PS TM	Polyamidlinker-Polyethylenglycol-Polystyrol
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydroxybenzofuran-5-sulfonyl
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
phBQ	Phenyl- <i>p</i> -benzochinon
Phea	Pheophytin <i>a</i>
Pheida	Pheophorbid <i>a</i>
PPIX	Protoporphyrin IX
präp.	präparativ
PSI, PSII	Photosystem I, Photosystem II
PyBOP	(Benzotriazol-1-yl-oxy)-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
<i>Rb.</i>	<i>Rhodobacter</i>
RC	Reaktionszentrum
R_F	<i>retention factor, ratio to front</i>
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
RR	Resonanz-Raman
RT	Raumtemperatur
SHO	Spin-Hamilton-Operator
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
Tab.	Tabelle

TASP	<i>Template-Assembled Synthetic Protein</i>
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCTU	O-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
Tm	Transmission
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Trt	Trityl
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-Vis	Ultraviolett- <i>visible</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
WT	Wildtyp
ZnCe ₆	Zink-Chlorin <i>e</i> ₆
ZnPheida	Zink-Pheophorbid <i>a</i>

Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierten Aminosäuren und ihre Strukturformeln (Abb. aus: Doolittle, 1995).



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einführung in die Thematik.....	1
1.2 Struktur und Funktion von Proteinen	3
1.3 Peptidsynthese	7
1.4 <i>De novo</i> Peptidsynthese	11
1.5 Vier-Helix-Bündel-Proteine	11
1.6 Pflanzliche Photosynthese	14
1.7 Bakterielle Photosynthese	16
1.8 Bakterielle Lichtsammelkomplexe.....	18
1.9 Photosynthetische Pigmente.....	20
1.9.1 Zyklische Tetrapyrrole: Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine	21
1.9.2 Carotinoide	25
1.10 Natürliche Pigment-Proteine	26
1.11 Artificielle photosynthetische Reaktionszentren.....	27
1.12 Verwendete Peptidmodelle	29
2. Ziele und Motivation	32
3. Grundlagen	35
3.1 Spektroskopische Techniken.....	35
3.1.1 Absorptionsspektroskopie	35
3.1.2 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie	39
3.1.3 Fluoreszenzspektroskopie	41
3.1.3.1 Fluoreszenz von Proteinen	43

3.1.3.2	Fluoreszenz von Pigmenten	43
3.1.4	Zirkulardichroismus	43
3.1.4.1	Zirkulardichroismus von Peptiden	44
3.1.4.2	Zirkulardichroismus von Pigmenten	45
3.1.5	Resonanz-Raman-Spektroskopie	46
3.1.6	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz-Spektroskopie.....	48
3.1.6.1	EPR-Spektroskopie an gefrorenen Lösungen	52
3.1.6.2	EPR-Spektroskopie an Triplettzuständen.....	53
3.1.6.3	ESEEM-Spektroskopie.....	55
3.1.7	NMR-Spektroskopie.....	57
3.2	Elektrochemie - Chemische Redoxtitration und Zykovoltammetrie.....	60
3.3	Elektronische Struktur von FePPIX-Komplexen	63
3.4	Lichtinduzierter Elektronentransfer und spinkorreliertes Radikalpaar	65

4. Experimenteller Teil - Material und Methoden **67**

4.1	Synthese, Aufreinigung und Identifizierung der Peptide	68
4.1.1	Chemische Peptidsynthese	68
4.1.2	HPLC.....	71
4.1.2.1	<i>De novo</i> synthetisierte Peptide me-1 bis me-9	71
4.1.2.2	<i>De novo</i> synthetisierte Peptide sph α 31, sph β 31, sph α 54 und sph β 50	72
4.1.3	MALDI-TOF- und ESI-Massenspektrometrie	73
4.2	Darstellung der Kofaktoren	75
4.2.1	Chlorophyll <i>a</i>	75
4.2.2	Pheophytin <i>a</i>	76
4.2.3	Zink-Pheophytin <i>a</i>	77
4.2.4	Pheophorbid <i>a</i>	77
4.2.5	Zink-Pheophorbid <i>a</i>	78
4.2.6	Zink-Chlorin <i>e</i> ₆	78
4.2.7	Bakteriochlorophyll <i>a</i>	79
4.2.8	Bakteriopheophorbid <i>a</i>	80
4.2.9	Zink-Bakteriopheophorbid <i>a</i>	80
4.2.10	Lutein	80

4.3	Biochemische Versuchsvorschriften	82
4.3.1	Einbau von Kofaktoren in die Peptide	82
4.3.1.1	Hämin	82
4.3.1.2	Chlorin- und Bakteriochlorinderivate	82
4.3.2	Konzentrationsbestimmungen der Peptide und Kofaktoren.....	83
4.3.3	Gelfiltration	84
4.3.4	Bestimmung der pH-Abhängigkeit von FePPIX-me-1	85
4.3.5	Denaturierung der Apo- und Holopeptide.....	85
4.3.6	Isolierung des natürlichen LH2-Komplexes aus <i>Rb. sphaeroides</i> WT	88
4.3.7	Rekonstitution der synthetischen Lichtsammelkomplexe.....	88
4.4	Spektroskopische Methoden	89
4.4.1	Absorptionsspektroskopie	89
4.4.2	Transiente Absorptionspektroskopie.....	90
4.4.3	Fluoreszenzspektroskopie	91
4.4.4	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	91
4.4.5	Zirkulardichroismus	92
4.4.6	Resonanz-Raman-Spektroskopie	92
4.4.7	EPR-Spektroskopie	93
4.4.8	NMR-Spektroskopie.....	94
4.5	Elektrochemische Methoden	95
4.5.1	Elektrochemische Redoxtitration	95
4.5.2	Zyklovoltammetrie	97
5.	Ergebnisse und Diskussion	98
5.1	Wechselwirkung von Hämin mit <i>de novo</i> synthetisierten Peptiden.....	98
5.1.1	Charakterisierung von FePPIX-me-1	98
5.1.1.1	Einbau von FePPIX in me-1.....	100
5.1.1.2	Struktur des FePPIX-me-1-Komplexes.....	102
5.1.1.3	Stabilität von FePPIX-me-1	107
5.1.1.4	Redoxverhalten von FePPIX-me-1	110
5.1.2	Darstellung von [FePPIX-me-1]CN.....	113

5.1.3	Auswirkungen verkürzter Peptide im Vergleich zu me-1	115
5.1.4	<i>Bis</i> -His vs. His-Met-Koordination von FePPIX.....	120
5.1.4.1	Einbau von FePPIX in me-2.....	120
5.1.4.2	Struktur des FePPIX-me-2-Komplexes.....	123
5.1.4.3	Stabilität von FePPIX-me-2	123
5.1.4.4	Redoxverhalten von FePPIX-me-2	123
5.1.4.5	Spinzustand des Eisens im FePPIX-me-2-Komplex.....	125
5.2	Wechselwirkung von Chlorophyllderivaten mit <i>de novo</i> synthetisierten Peptiden ...	132
5.2.1	Darstellung der photosynthetischen Pigmente	133
5.2.2	Einbau der Kofaktoren	137
5.2.2.1	Einbaukontrolle durch Absorptionsspektroskopie	137
5.2.2.2	Einbaukontrolle durch Fluoreszenzspektroskopie und Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute	140
5.2.2.3	Einbaukontrolle über den Zirkulardichroismus der Pigmente	144
5.2.2.4	Einbaukontrolle durch ESEEM-Spektroskopie am Pigment- Triplettzustand.....	146
5.2.3	Strukturen der Zinkchlorin- <i>maquettes</i>	150
5.2.4	Stabilität der Zinkchlorin- <i>maquettes</i>	156
5.2.5	Triplettzustände der Zinkchlorine und deren Peptid-Komplexe	158
5.2.5.1	Bestimmung der Nullfeldparameter	158
5.2.5.2	Bestimmung der Triplettquantenausbeute.....	163
5.2.5.3	Abhängigkeit der Chlorin-Triplettlebensdauer vom Lösungsmittel	164
5.2.6	Grundzustandswechselwirkung von Zinkchlorinen mit Chinonen	164
5.2.7	Lichtinduzierter Elektronentransfer von freien und peptidgebundenen Zinkchlorinen zu Chinonen.....	169
5.2.7.1	Redoxpotentiale ausgewählter Chinone	169
5.2.7.2	Herkunft des Radikalpaares und dessen Charakterisierung durch transiente Absorptionsspektroskopie.....	170
5.2.7.3	Einfluss der Peptidmatrix auf den Elektronentransferprozess	174
5.2.7.4	Abhängigkeit der Triplettlebensdauer der $ZnCe_6$ - <i>maquettes</i> von der Temperatur	176
5.2.7.5	Charakterisierung des Radikalpaares durch transiente EPR- Spektroskopie	177

5.3	Artifizielle Peptide und ihre Wechselwirkung mit Kofaktoren als Modell	
	natürlicher bakterieller Lichtsammelkomplexe.....	187
5.3.1	NMR-Spektroskopie an einem <i>de novo</i> synthetisierten LH-Peptid	188
5.3.2	Sekundärstruktur der artifiziellen LH-Peptide in einer Detergenzlösung	191
5.3.3	Darstellung der Kofaktoren und Isolierung des natürlichen LH2-Komplexes aus <i>Rb. sphaeroides</i> WT.....	192
5.3.4	Spektroskopische Untersuchungen zur Wechselwirkung artifizieller LH-Peptide mit BChl <i>a</i> und Lutein	193
5.3.5	Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration und MALDI-TOF-MS	196
6.	Zusammenfassung und Ausblick	198
7.	Anhang	204
8.	Literaturverzeichnis.....	207

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung in die Thematik

Die vorliegende Arbeit beschreibt spektroskopische Untersuchungen an *de novo* synthetisierten Peptiden nach dem Einbau verschiedener Pigmente. Die Peptide wurden durch automatisierte, chemische Synthese an einer festen Phase hergestellt. Als Modell der untersuchten Peptide dienten zum einen die Häm-bindenden Helices der Cytochrom *b* (Cyt*b*)-Untereinheit des Cyt*b*_c₁-Komplexes von *Rhodobacter (Rb.) capsulatus* und zum anderen die Peptide in den Lichtsammelkomplexen von *Rb. sphaeroides*. Beide Bakterien gehören zur Klasse der schwefelfreien Purpurbakterien und betreiben anoxygene Photosynthese.

Die verwendete Hämverbindung ist ein Eisenprotoporphyrin IX (FePPIX) und als roter Blutfarbstoff des Hämoglobins bekannt. Im Cyt*b* sind die Hämgruppen in einem Vier-Helix-Bündel eingelagert. Dieses Strukturmotiv, das in den Kapiteln 1.2 und 1.5 näher beschrieben wird, stellt eine gute Methode zur Synthese eines stabilen *de novo* Komplexes dar, der aus kurzen Peptidketten besteht. Durch hydrophobe Wechselwirkung können auch andere Kofaktoren wie (Bakterio)Chlorophyllderivate in das Vier-Helix-Bündel eingelagert werden, das in dieser Arbeit aus zwei homodimeren Peptiden mit Helix-*turn*-Helix-Motiv aufgebaut wurde (Kap. 1.12). Die minimalistische Form der Nachbildung eines natürlichen Systems, das dennoch die gleichen Funktionen und Eigenschaften aufweist, wurde laut eines interessanten Reviews über *de novo* synthetisierte Proteine mit spezifischen Funktionen 1994 erstmalig als *maquette* bezeichnet (Koder und Dutton, 2006). Es bietet die Möglichkeit, durch Änderung der Aminosäuresequenz, Austausch von natürlichen mit nicht-natürlichen, isotopen- oder fluoreszenzmarkierten Aminosäuren oder auch durch Variation des eingelagerten Kofaktors, die Wechselwirkung verschiedener Peptid-Kofaktor-Beziehungen im Detail zu untersuchen und Aussagen über die Funktion einzelner Aminosäuren zu treffen.

Im Allgemeinen ermöglicht die *de novo* Peptidsynthese Modellsysteme herzustellen, die auf der Grundlage natürlicher Protein-(Pigment)-Komplexe entworfen werden, um deren Faltung, Funktion und Eigenschaften zu charakterisieren. Die Rolle des Peptids besteht dabei darin, eine spezifische Umgebung für die eingebundenen Kofaktoren zu generieren, um z. B.

enzymatische Aktivität oder Elektronentransportprozesse zu erzeugen. Somit können kleine, artifizielle Peptid-Kofaktor-Systeme dazu dienen, an ihnen spezifische Funktionen, wie sie in biologischen Systemen vorliegen, zu studieren und auszuüben, indem z. B. ein synthetisches, katalytisch aktives Zentrum in einer Proteinmatrix generiert wird. Des Weiteren ist die chemische Peptidsynthese wichtiger Bestandteil der Naturstoffsynthese zur Darstellung sogenannter Targets (Wirkstoff-Zielverbindungen). Der Einbau von Porphyrinen, Chlorinen und Bakteriochlorinen bietet die Möglichkeit zur Synthese verschiedener Modellsysteme für Proteine, die z. B. an der Atmungskette oder am Photosyntheseprozess beteiligt sind. Folglich soll diese Arbeit als Ausgangspunkt für die Synthese artifizieller Reaktionszentren und Lichtsammelkomplexe dienen und die komplexen Anforderungen derartiger Systeme aufzeigen. Sie leistet damit einen weiteren Beitrag zur Grundlagenforschung durch Nachbildung natürlicher Proteinkomplexe und der Untersuchung verschiedener Kofaktor-Peptid-Systeme. Zur Charakterisierung dieser Komplexe als auch der *de novo* synthetisierten Apo-peptide wurden verschiedene spektroskopische, elektrochemische und biochemische Methoden wie UV-Vis-, Fluoreszenz-, Resonanz-Raman-, transiente Absorptions-, Elektronenspinresonanz (ESR)- und Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie, Zirkulardichroismus, elektrochemische Redox Titration, Zyklovoltammetrie, *Electrospray Ionisation* (ESI)- und *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF)-Massenspektrometrie und Gelfiltration eingesetzt.

1.2 Struktur und Funktion von Proteinen

„Betrachtet man die DNA als den Bauplan des Lebens, so sind die Proteine Ziegel und Mörtel“ (Doolittle, 1995). Die elementaren Strukturuntereinheiten der Proteine sind die Aminosäuren. Das Wort Protein stammt aus dem Griechischen und wurde im Jahre 1838 von Berzelius von *proteios* („erstarrig“) abgeleitet, um die Wichtigkeit jener Stoffgruppe zu betonen. Durch die Proteinbiosynthese entstehen aus den 20 proteinogenen oder codierten Aminosäuren eine Vielzahl von Proteinen, deren Struktur und Funktion häufig vom gebundenen Kofaktor abhängt. Im Fall enzymatischer Aktivität bilden die Kofaktoren dabei das eigentlich katalytisch aktive Zentrum. Jede Enzymart ist hochspezifisch und katalysiert im Allgemeinen nur einen einzigen Reaktionstyp. Das aktive Zentrum des Enzyms kann z. B. einen oder mehrere Liganden, die sogenannten Substrate binden und katalysiert dann das Öffnen und Schließen von kovalenten Bindungen. In der Atmungskette oder Photosynthese sind Enzymproteine häufig an Redoxprozessen oder an der Energieerzeugung (z. B. ATP-Synthase) beteiligt.

Proteine können des Weiteren dem Transport vieler kleiner Moleküle und Ionen durch die Biomembranen dienen oder haben als Speicherproteine die Funktion einer Reserve für organische Stickstoff-Verbindungen. Manche Proteine sind zuständig für die koordinierte Bewegung (z. B. Muskelkontraktion), wieder andere agieren als Antikörper in der Immunabwehr. Zudem haben manche Proteine wie das Kollagen eine mechanische Stützfunktion, andere sind für die Erzeugung und Übertragung von Nervenimpulsen zuständig oder dienen der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung (Lüttge et al., 1994; Stryer, 1999).

Bei der Strukturbetrachtung eines Proteins sind verschiedene Organisationsebenen zu unterscheiden. Die Aminosäuresequenz bezeichnet man als Primärstruktur eines Proteins. Die sich wiederholende Folge des Elements $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$ in dieser Aminosäurekette ist das Polypeptidgerüst (oder die Polypeptidkette). Die Sekundärstruktur stellt die Bereiche der Polypeptidkette dar, die α -Helices oder β -Faltblätter bilden. Die dreidimensionale Konformation einer Polypeptidkette, in der die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente wiedergegeben wird, bezeichnet man als Tertiärstruktur. Besteht ein Peptid aus mehr als einer Polypeptidkette oder zeigt es eine ausgeprägte Domänenstruktur, die sich definiert zueinander anordnen, so spricht man von der Quartärstruktur.

Das für diese Arbeit wichtige Sekundärelement, die α -Helix, entsteht, wenn eine einzelne Polypeptidkette sich um die eigene Achse dreht und somit einen starren Zylinder ausbildet. Die rechtsgedrehte α -Helix, die sogenannte 3.6_{13} -Helix, ist die am besten bekannte

Polypeptidstruktur. In dieser Sekundärstruktur liegt jeweils eine Wasserstoffbrücke zwischen der C=O-Gruppe des Restes n und der NH-Gruppe des Restes $(n + 4)$ vor. Diese Wasserstoffbrückenbindung, die fast parallel zur Helixachse verläuft, hat eine Länge von 0,286 nm (vom Sauerstoff- zum Stickstoffatom). Es entsteht eine gleichmäßige Helix mit 3,6 Aminosäuren pro Windung. Benachbarte C_α -Atome sind 0,15 nm voneinander entfernt. Daraus ergibt sich eine Ganghöhe von 0,54 nm (Abb. 1a).

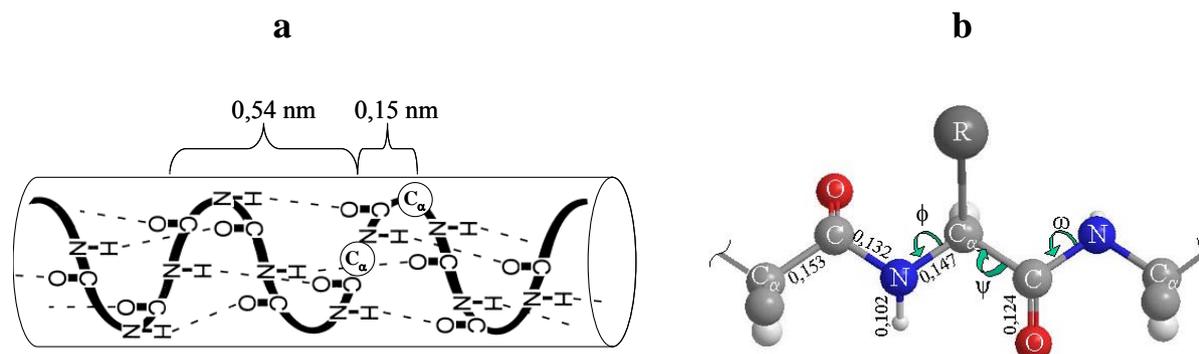


Abbildung 1: (a) Rechtsdrehende Helix mit einer Ganghöhe von 0,54 nm pro Windung. (b) Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren mit den eingezeichneten Diederwinkeln ϕ und ψ . Der Torsionswinkel ω , der die Drehung zwischen der C=O- und NH-Bindung beschreibt, beträgt $\omega = 180^\circ$.

Die Rotationen um die Einfachbindung zwischen der Aminogruppe bzw. Carboxylgruppe und dem C_α -Atom werden durch die Diederwinkel phi (ϕ) und psi (ψ) beschrieben (Abb. 1b). Diese Winkel legen den Verlauf einer Polypeptidkette fest. Die ϕ - und ψ -Winkel einer rechtsdrehenden α -Helix betragen in der Regel -57° und -47° .

Sogenannte Ramachandran-Diagramme zeigen die erlaubten ϕ - und ψ -Winkel in einer Sekundärstruktur (Ramachandran et al., 1963), (Abb. 2).

Das Sekundärstrukturelement einer α -Helix findet man in vielen natürlichen Proteinen wie z. B. in Myoglobin, Hämoglobin oder in Proteinen, die in Zellmembranen lokalisiert sind.

Neben der bekannten $\alpha(3.6_{13})$ -Helix gibt es noch die 3_{10} -Helix (3,2 Aminosäuren pro Windung) mit Torsionswinkeln von $\phi = -49^\circ$ und $\psi = -26^\circ$ und die äußerst seltene vorkommende π -Helix (4,4 Aminosäuren pro Windung) mit $\phi = -57^\circ$ und $\psi = -70^\circ$ (Creighton, 1993; Whitford, 2005). Die rechtsdrehende α -Helix kann z. B. durch Zirkulardichroismus (CD)-Messungen von der 3_{10} -Helix unterschieden werden (Kap. 3.1.4.1).

Viele der kovalenten Bindungen in einer langen Aminosäurekette erlauben eine relativ freie Drehbarkeit der Atome, die sie verknüpfen, so dass die Polypeptidkette prinzipiell in eine Vielzahl von verschiedenen Formen falten kann. Allerdings wird diese Formenvielfalt durch

sterische Hinderung oder nicht-kovalente Wechselwirkungen eingeschränkt, die sowohl zwischen Atomen des Polypeptidgerüsts als auch den Aminosäureseitenketten auftreten können. Zu diesen Wechselwirkungen zählen Wasserstoffbrücken, ionische und hydrophobe Wechselwirkungen oder van-der-Waals-Kräfte. Für eine Helixbildungstendenz der einzelnen Aminosäuren ist folgende Reihenfolge bekannt (Creighton, 1993):

Ala > Arg > Lys > Leu > Met > Trp > Phe > Ser > Gln > Glu > Cys \approx Ile > Tyr > Asp > Val > Thr > Asn > His > Gly \gg Pro.

An dieser Reihenfolge ist zu erkennen, dass Glycin und Prolin geeignete Aminosäuren sind, um Helixstrukturen zu unterbrechen und sogenannte *reverse turns* ausbilden.

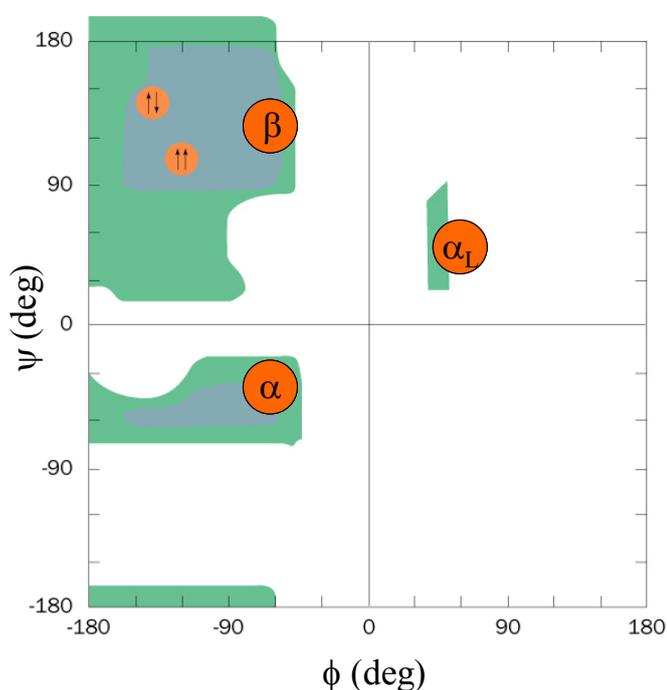


Abbildung 2: Ramachandran-Diagramm, das die sterisch erlaubten Konformationswinkel (ϕ , ψ) für die entsprechenden Sekundärstrukturen angibt: α = α -Helix; α_L = linksdrehende α -Helix; β = β -Faltblatt ($\uparrow\uparrow$ = paralleles β -Faltblatt und $\uparrow\downarrow$ antiparalleles β -Faltblatt). Die in grün gekennzeichneten Bereiche stellen Konformationen dar, die die äußerste Grenze für van-der-Waals-Abstände aufweisen (nach Voet und Voet, 1992).

In einer α -Helix weisen alle C=O- bzw. NH-Gruppen jeweils in dieselbe Richtung, weshalb entlang der Helixachse ein Makrodipol entsteht. Der positive Pol befindet sich am N-Terminus. Positiv geladene Aminosäurereste am N-Terminus und negativ geladene Seitengruppen am C-Terminus würden den Makrodipol verstärken. Eine Acetylierung der Aminogruppe und Amidbildung der Carboxylgruppe führt dabei zu einer Stabilisierung einer einzelnen Helix (Munoz und Serrano, 1995; Fairman et al., 1989).

Die bereits erwähnten hydrophoben Wechselwirkungen zeichnen sich dadurch aus, dass sich die unpolaren Seitenketten von Aminosäuren (Leucin, Phenylalanin, Tryptophan, Valin, u. a.)

in wässriger Umgebung zusammenlagern, um das Netz von Wasserstoffbrücken am wenigsten zu stören. Die sogenannten „hydrophoben Kräfte“, die zwischen den zusammengelagerten Gruppen bestehen, entstehen dabei eigentlich durch die Abstoßung der hydrophoben Gruppen aus dem Wasser. Durch die Zusammenlagerung kann sich bei geeigneter Aminosäuresequenz im Inneren eines Proteins ein hydrophober Bereich ausbilden (Abb. 3).

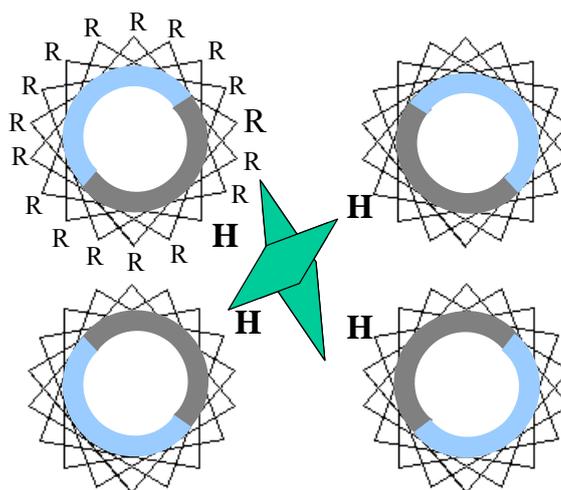


Abbildung 3: Helixrad (*Helical Wheel*)-Darstellung entlang von vier α -Helixachsen, die das Strukturelement eines Vier-Helix-Bündels ausbilden. Die Aminosäurereste R sind nach außen gedreht. Die hydrophoben Bereiche sind in grau gekennzeichnet. In diesem Bereich befinden sich auch die Kofaktor-koordinierenden Bindungsstellen (H für Histidin). Die Kofaktoren sind in grün dargestellt. In den blauen Bereichen liegen die hydrophilen Aminosäuren.

Die Kenntnisse über die Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren und deren Faltung in einer Peptidsequenz waren die Grundvoraussetzungen zur Entwicklung der Peptidsynthese, die in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben wird und einen Hauptbestandteil dieser Arbeit darstellt.

1.3 Peptidsynthese

Synthetische Peptide sind in den medizinisch-chemischen oder biologischen Forschungsbereichen unerlässliche Hilfsmittel zur Aufklärung der Struktur und Funktion natürlicher Proteinkomplexe. Die Darstellung der Peptide kann mit Hilfe der Molekularbiologie (*Protein Engineering*) oder durch die chemische Peptidsynthese (*De novo* Peptidsynthese; Kapitel 1.4) erfolgen. Mit Hilfe der Molekularbiologie ist es möglich, durch ortsgerichtete Mutagenese der DNA einzelne Aminosäuren mit anderen codierten Aminosäuren auszutauschen, um Informationen über deren Funktion zu erhalten. Auch kann der Proteinsyntheseapparat von Bakterien wie *Escherichia coli* eingesetzt werden, um in zellfreier Synthese nichtcodierte Aminosäuren in Proteine einzubauen (Cornish und Schultz, 1994). Allerdings liegen bei diesem Verfahren die Ausbeuten an Protein im ng- bis µg-Bereich. Die chemische Peptidsynthese hat dagegen den Vorteil, codierte Aminosäuren gegen nicht-natürliche Aminosäuren zu ersetzen und gleichzeitig eine hohe Ausbeute an Protein im mg-Bereich zu erhalten. Ein wichtiger Aspekt ist dabei u. a. der gezielte Einbau von Fluoreszenzmarkern, der Aufschlüsse über die Faltung und Struktur der Proteine geben kann. Die chemische Verknüpfung von Aminosäuren in Lösung geht auf die Arbeiten von Fischer und Curtius zurück (Fischer und Fourneau, 1901; Curtius, 1904). Die Einführung der Carbobenzyloxy (Cbz)-Schutzgruppe erleichterte die Peptidsynthese erheblich (Bergmann und Zervas, 1932). Als großer Durchbruch in der Entwicklung der Peptidsynthese kann die von Merrifield eingeführte Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) bezeichnet werden (Merrifield, 1963). Mit dieser Methode ist es möglich, Peptide mit bis zu 60 – 70 Aminosäuren herzustellen. Die Entwicklung des ersten Peptidsyntheseautomaten durch Merrifield erfolgte 1966. Im gleichen Jahr gelang auch die Synthese von Insulin als erstes synthetisch dargestelltes Protein (Zahn, 1967).

Die Prinzipien und praktischen Aspekte der SPPS-Methode wurden durch Kent ausführlich beschrieben (Kent, 1988). Nach der Einführung der basenlabilen 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Gruppe zum Schutz der α -Amino-Gruppen (Carpino und Han, 1970; Fields und Noble, 1990) wurde erstmalig 1978 die Fmoc/t-Butyl-Strategie der SPPS (Chang und Meienhofer, 1978) als Alternative zur Standard-Butyloxycarbonyl (Boc)-Methode (Carpino, 1957; McKay und Albertson, 1957) beschrieben. Die Abbildung 4 zeigt schematisch den Ablauf einer Festphasenpeptidsynthese auf, wie er in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

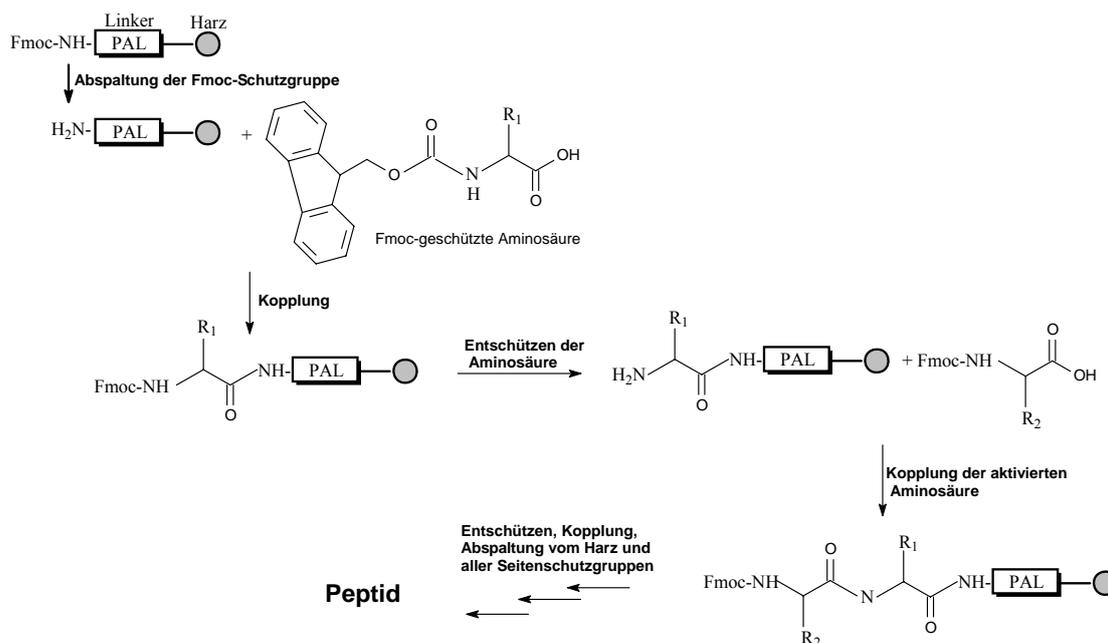


Abbildung 4: Ablauf einer Festphasenpeptidsynthese mit Fmoc-geschützten Aminosäuren an einem Polyamidlinker-Polyethylenglycol-Polystyrol (PAL-PEG-PS)-Harz.

Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom PAL-PEG-PS-Harz mit Piperidin, deren Reaktion in Abbildung 5 beschrieben wird, kann die erste Aminosäure an die Festphase gekoppelt werden.

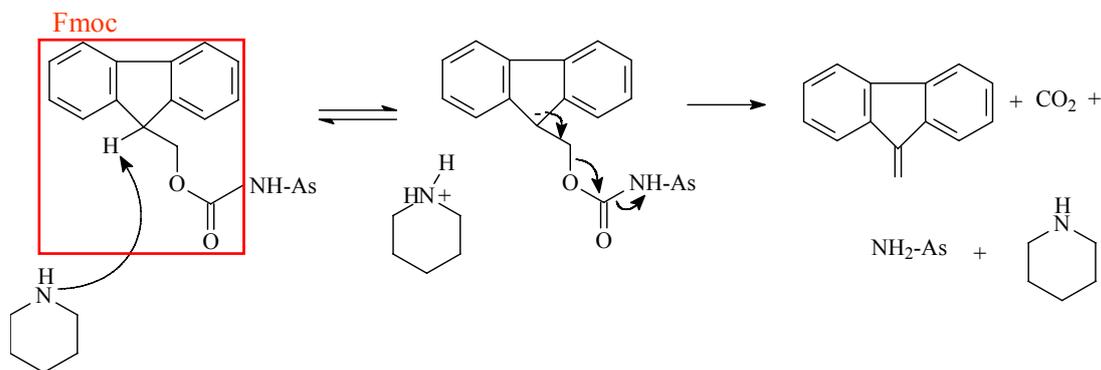


Abbildung 5: Mechanismus der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin.

Die Peptidsynthese wurde durch die Entwicklung neuer Phosphonium- und Uronium-Verbindungen als Kuppelungsreagenzien und durch Zusatz eines Kuppelungsadditives wie HOBT zur Verminderung der Racemisierung zunehmend effizienter (Review: Han und Kim, 2004), (Abb. 6).

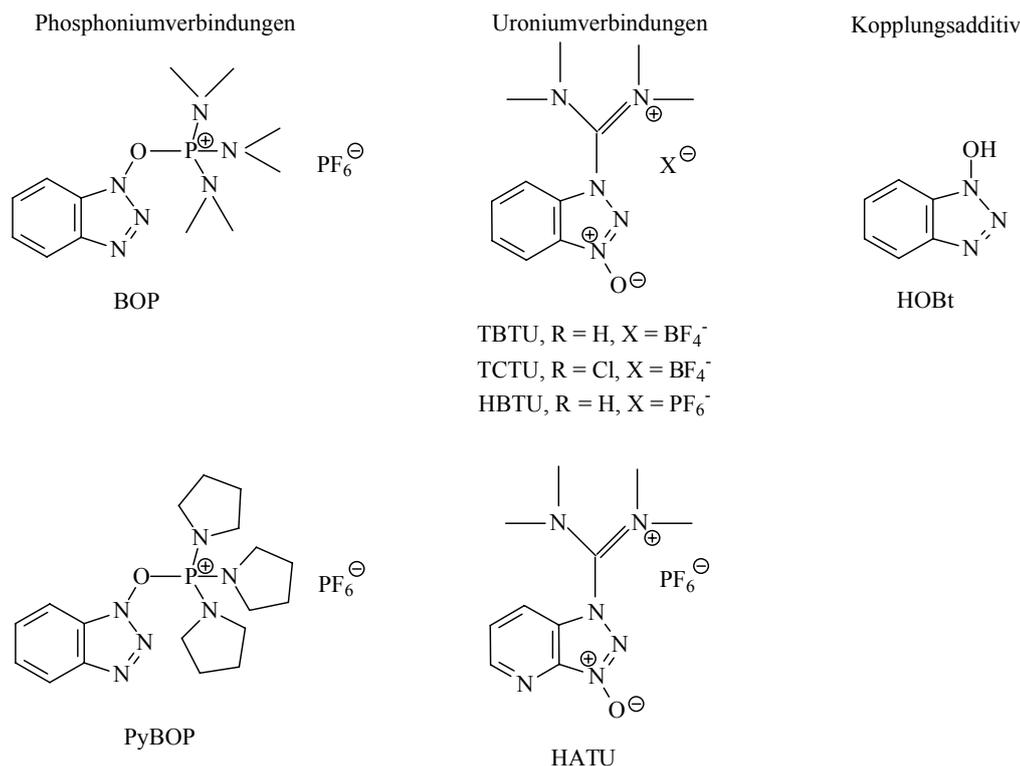


Abbildung 6: Strukturen ausgewählter Kopplungsreagenzien (Benzotriazol-1-yl-oxy)-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat (BOP), (Benzotriazol-1-yl-oxy)-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP), O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU), O-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TCTU), O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU), O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) und des Kopplungsadditivs 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt).

Die Kopplungsreagenzien sorgen für eine Aktivierung der Aminosäuren durch einen *in situ* erzeugten Aktivester mit einer guten Abgangsgruppe (Abb. 7).

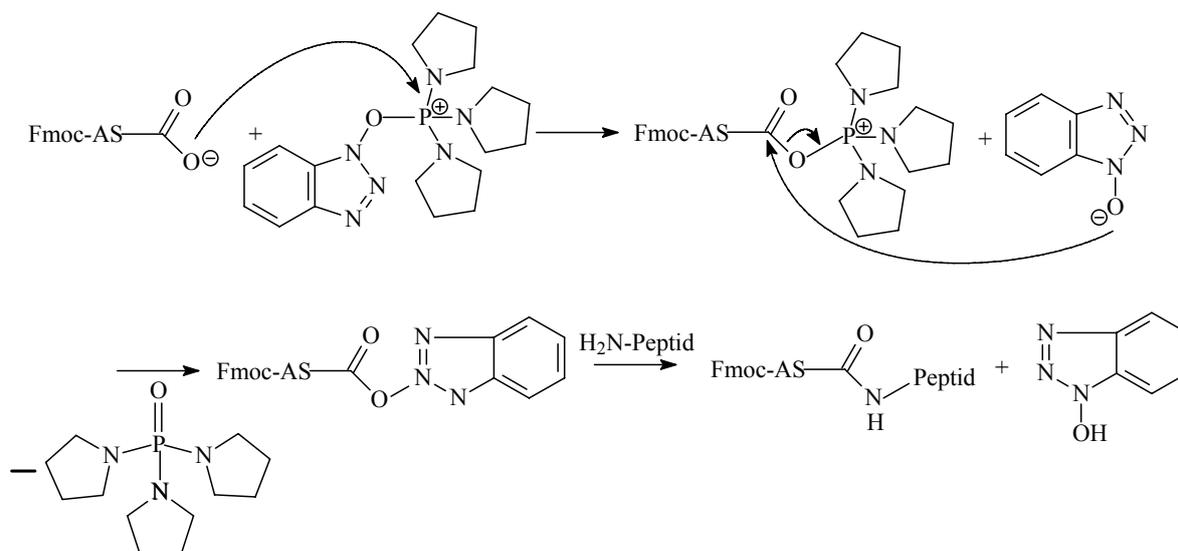
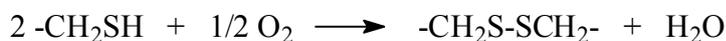


Abbildung 7: Mechanismus der Aminosäurenaktivierung am Beispiel von PyBOP.

Zur Gewinnung längerer Peptide besteht die Möglichkeit der Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen, die sich jeweils an einem Ende einer Helix befinden. Die Reaktion erfolgt durch Luftoxidation in einer basischen Pufferlösung (Creighton, 1993):



Eine andere Darstellungsmöglichkeit längerer Peptidketten ist durch die Einführung einer Ligationsmethode (*thiol capture*) gegeben (Kemp et al., 1981; Kemp und Kerkman, 1981). Die spätere chemische Peptidligation (*chemical ligation*; Schnölzer und Kent, 1992) und die native chemische Peptidligation (*native chemical ligation*; Dawson et al., 1994) beruhen auf Entdeckungen, die bereits ca. 40 Jahre vorher von Wieland gemacht wurden (Wieland et al., 1953). Wie die Abbildung 8 zeigt, war es damit erstmals möglich, große Proteine synthetisch herzustellen. Auf der Grundlage dieser Peptidligation sind bis heute eine Vielzahl weiterer Methoden entwickelt worden: Imin-Ligation, Oxim- und Hydrazon-Ligation und die Staudinger-Ligation (Review: Kimmerlin und Seebach, 2005). Als Alternative zur chemischen Peptidligation besteht die Möglichkeit der enzymatischen Ligation kurzer synthetischer Peptidsegmente mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (Chang et al., 1994).

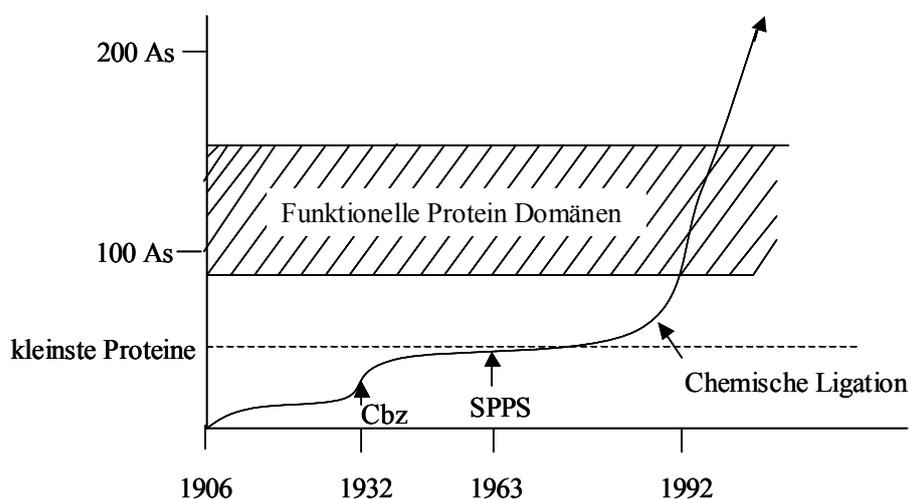


Abbildung 8: Entwicklung der chemischen Peptidsynthese. Die Einführungen der Carbobenzyloxy (Cbz)-Schutzgruppe, der SPPS-Methode und der chemischen Peptidligation zählen zu den Entwicklungssprüngen der chemischen Peptidsynthese; adaptiert aus Dawson und Kent, 2000.

1.4 *De novo* Peptidsynthese

Unter Berücksichtigung der Kenntnisse der Sequenz-Struktur-Beziehung werden beim *de novo*-Design von Peptiden Sekundärstrukturelemente „von Neuem“ entworfen, deren Sequenzen eine geringe oder auch keine Homologie zu natürlichen Proteinen aufweisen. Diese *de novo* synthetisierten Peptide dienen sowohl zur Aufklärung der Faltung, Stabilität und Peptid-Peptid-Wechselwirkung als auch zur Aufklärung der Substrat-Peptid-Wechselwirkung natürlicher Systeme. Durch computerunterstütztes *de novo* Design gelang es der Forschergruppe DeGrado zum ersten Mal, ein stabiles Peptid zu entwickeln (Regan und DeGrado, 1988). Nachfolgend wurden bis heute zahlreiche derartige Modellsysteme, die sogenannten und bereits zu Anfang erwähnten *maquettes*, entwickelt, die verschiedene Kofaktoren wie Metallionen, Flavine, Eisen-Schwefelcluster, Chlorophylle, ATP, Chlorine, redoxaktive Tyrosine und Tryptophanreste oder auch Peroxometall-Komplexe und Hämgruppen einlagern (Review: Koder und Dutton, 2006). Im Allgemeinen bietet das *de novo*-Design darüber hinaus die Möglichkeit, natürliche Kofaktoren gegen chemisch modifizierte zu ersetzen. In dieser Arbeit werden durch den Einbau von Metalloporphyrinen, -chlorinen und -bakteriochlorinen mit den Zentralmetallen Eisen und Zink in verschiedene *de novo* synthetisierte Peptide deren funktionelle Eigenschaften untersucht. Diese *maquettes* bilden in wässriger Lösung ein Vier-Helix-Bündel aus, das im nachfolgenden Kapitel vorgestellt werden soll.

1.5 Vier-Helix-Bündel-Proteine

Das Strukturelement eines Vier-Helix-Bündels wird als Supersekundärstruktur bezeichnet, ein Intermediat der Sekundärstruktur und mit Ansätzen einer Tertiärstruktur. Natürliche Beispiele von Vier-Helix-Bündeln finden sich u. a. in Cytochrom b_{562} , Cytochrom c' , Hämyerithrin oder Apoferritin (Mathews, 2001). Auch im bakteriellen Reaktionszentrum (RC) wird das Bakteriochlorophyll a (BChl a)-Dimer als *special pair* zwischen vier gegeneinander verdrillten α -Helices in seiner Position gehalten. Im Cyt b_{562} hat das zylindrische Vier-Helix-Bündel eine Länge von ca. 50 Å und der Durchmesser beträgt ca. 20 Å. Die geringste Distanz zweier benachbarter Helixachsen ist 8,7 – 9,3 Å (Kamtekar und Hecht, 1995).

Artifizielle Vier-Helix-Bündel können auf unterschiedliche Weise erzeugt werden. Sie entstehen z. B. durch Zusammenlagerung von amphiphilen Helices, die durch schwache, nicht kovalente Kräfte assoziieren (*self-assembly*), (DeGrado et al., 1986). Es konnten bereits eine Reihe solcher Vier-Helix-Bündel synthetisiert und ihre Wechselwirkung mit verschiedenen Kofaktoren untersucht werden (z. B. Choma et al., 1994; Robertson et al., 1994; Sharp et al., 1998a; Sharp et al., 1998b). Die hydrophoben Seitenketten der Helices sind ins Innere des Bündels gedreht, während die hydrophilen Seitenketten dem wässrigen Medium zugewandt sind. Dadurch entsteht im Inneren des Peptidbündels eine hydrophobe Tasche, in der die Kofaktoren gebunden werden (Abb. 3). Die relative Anordnung der Helices innerhalb des Vier-Helix-Bündels ist aufgrund fehlender spezifischer Wechselwirkungen nicht steuerbar. So zeigen diese wie auch andere *de novo* entworfene Vier-Helix-Bündel Ansätze von *molten globules* (Hecht et al., 1990; Sasaki und Lieberman, 1993). Diese *molten globule*-Zustände bezeichnen stabile Intermediärprodukte bei der Faltung und entstehen durch schlecht gepackte Seitenketten im hydrophoben Kern. Dadurch können mehrere, im dynamischen Gleichgewicht stehende Konformationen angenommen werden, aus denen z. B. sehr breite ¹H-NMR-Signale und ein unkooperativer Übergang bei der Denaturierung resultieren. Da artifizielle FePPIX-bindende Vier-Helix-Bündel aufgrund von Kofaktor-Kofaktor- und Kofaktor-Peptid-Wechselwirkung dynamische Eigenschaften aufweisen, ist es bislang noch nicht gelungen, deren Struktur in Lösung durch NMR-Spektroskopie zu bestimmen oder Kristalle zur Röntgenstrukturanalyse zu erzeugen (DeGrado et al., 1999; Gibney et al., 2001). Dagegen konnte bereits eine Kristallstruktur eines artifiziellen Vier-Helix-Bündels ohne Kofaktoren mit einer Auflösung von 2,8 Å gezeigt werden (Abb. 9b). In dieser Kristallstruktur weist das nicht-kovalente Dimer von Disulfid-verbrückten di- α -Helices eine antiparallele Topologie auf (Huang et al., 2003).

Ein zweiter Ansatz zur Herstellung eines Vier-Helix-Bündels basiert auf der Verwendung eines Templots, auf das durch kovalente oder koordinierende Bindungen helikale Peptide aufgesetzt werden (Mutter et al., 1988; Mutter und Vuilleumier, 1989). Dieses TASP (*template-assembled synthetic protein*)-Prinzip, bei dem ein zyklisches Peptid als Templat dient, hat den Vorteil, dass die relative Anordnung der Peptide bekannt ist. Das von Mutter vorgeschlagene zyklische Peptid bildet in Lösung eine durch zwei β -turns verbundene β -Faltblattstruktur aus. An die Amino- und Thiolgruppen der in der Sequenz enthaltenen Lysine und Cysteine kann durch kovalente Verknüpfung die Anbindung der Helices erfolgen. Als Template können neben dem zyklischen Peptid u. a. auch lineare Peptide (Futaki et al., 1997; Dawson und Kent, 1993), Übergangsmetallionen wie Eisen(II) (Lieberman und Sasaki,

1991) oder Ruthenium (Ghadiri und Choi, 1990; Ghadiri et al., 1992; Ghadiri und Case, 1993), Porphyrine (Åkerfeldt et al., 1992; Choma et al., 1994; Sasaki und Kaiser, 1989) oder Zyklohexane (Åkerfeldt und DeGrado, 1994) dienen.

Die Bindung von Chromophoren in Vier-Helix-Bündeln kann zum einen nicht-kovalent über Koordination des Zentralmetalls mit ligandierenden Aminosäuren wie Histidin oder zum anderen durch kovalente Verknüpfung des Chromophors an das Peptid erfolgen (Nastri et al., 1997; Rau et al., 2001).

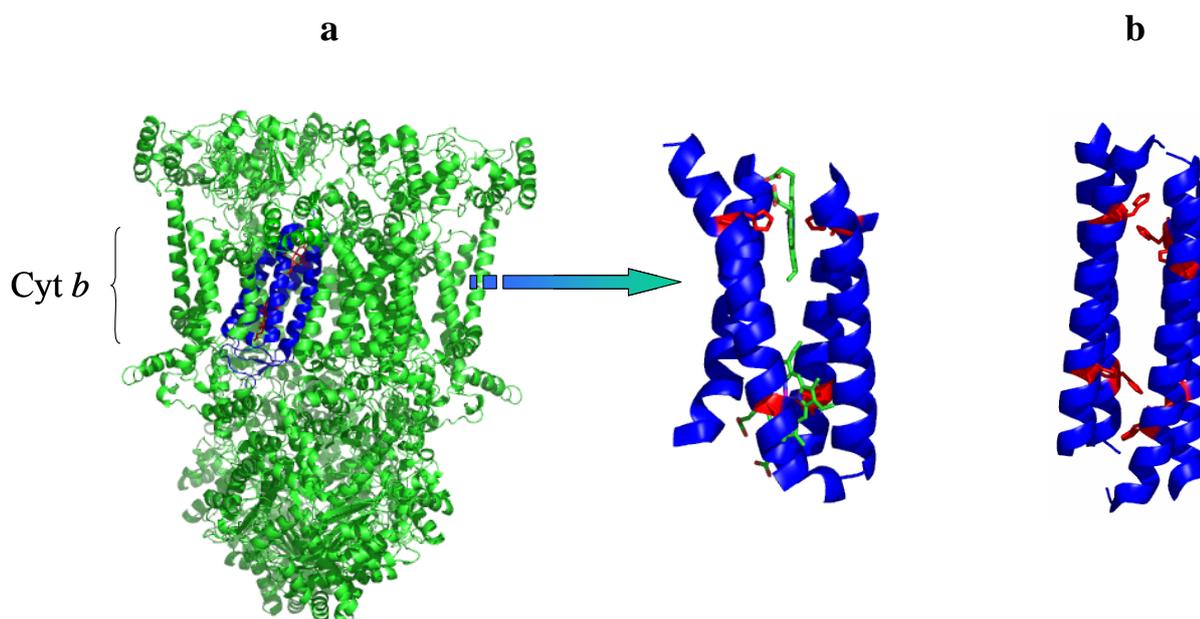


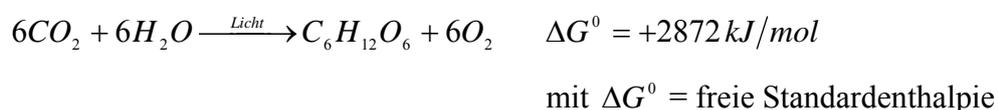
Abbildung 9: (a) Cytbc₁-Komplex (Iwata et al., 1998; PDB: 1BGY) mit der Cytb-Untereinheit, aus dem ein natives Vier-Helix-Bündel mit zwei eingelagerten Häm-Molekülen gesondert dargestellt wird; (b) Kristallstruktur eines Vier-Helix-Bündel-*maquettes* (Huang et al., 2003; PDB: 1M3W). Alle Abbildungen wurden mit PyMOL (DeLano Scientific Software, Version 0.97) erstellt.

Durch den Austausch von FePPIX durch (Bakterio)Chlorophyllderivate können nach erfolgreichem Einbau in das Peptid bestimmte photosynthetische Abläufe in einem Modellsystem simuliert werden. Die zur Grundlage des Bearbeitungsthemas dienenden Prozesse der pflanzlichen und bakteriellen Photosynthese sollen nachfolgend kurz erläutert und die einzelnen photosynthetischen Pigmente, die für diese Arbeit von Bedeutung sind, vorgestellt werden.

1.6 Pflanzliche Photosynthese

Der Begriff Photosynthese stammt aus dem Griechischen und bedeutet wörtlich: *Zusammensetzung durch Licht*. Es bezeichnet die Umwandlung der Lichtenergie in biochemisch verwertbare Energie (ATP) und Reduktionskraft (NADPH) in den Zellen phototropher Organismen und die damit betriebene Synthese von Zellbestandteilen. Früheste fossile Funde bakterienähnlicher Strukturen ergaben, dass die Photosynthese vor mehr als 3,5 Milliarden Jahren entstanden sein muss. Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keinen Sauerstoff in der Atmosphäre und die Organismen, die diese anoxygene Photosynthese betrieben, bezogen die für diesen Prozess notwendigen Reduktionsäquivalente aus leicht oxidierbaren Substanzen wie H_2 , H_2S , Acetat oder anderen einfachen organischen Verbindungen. Diese Organismen waren die heutigen Vorläufer der Purpurbakterien und Grünen Bakterien. Zur Nutzung von Elektronen-Donatoren mit einem negativeren Redoxpotential als Wasser ist nur eine Lichtreaktion für die Gewinnung von ATP und NADPH notwendig. Die oxygene Photosynthese und die damit verbundene photosynthetische Sauerstoffproduktion haben sich wahrscheinlich vor etwa drei Milliarden Jahren aus der früher etablierten anoxygenen Photosynthese entwickelt. Sie begann mit der Entwicklung von Organismen, die die Fähigkeit besaßen, unter Lichtaufnahme Wasser zu spalten und Sauerstoff freizusetzen. Durch den Übergang von einer reduzierenden zu einer oxidierenden Atmosphäre und durch Ausbildung einer schützenden Ozonschicht in der Stratosphäre kam es schließlich zur Entwicklung höherer Pflanzen und Lebewesen auf der Erde.

Der Nachweis, dass Chlorophyll an der Photosynthese beteiligt ist, wurde erstmalig von dem Würzburger Pflanzenphysiologen J. v. Sachs (1832 – 1897) erbracht. Im Einklang mit dem ersten Hauptsatz der Thermodynamik, der von J. R. Mayer bereits 1842 postuliert wurde, wurde die Grundgleichung der Photosynthese formuliert:



R. Hill und F. Bendall postulierten 1960, dass bei der oxygenen Photosynthese zwei hintereinandergeschaltete Photoreaktionen der sogenannten Photosysteme I und II (PSI und PSII) ablaufen, die nach ihrem Absorptionsmaximum auch als P700 und P680 bezeichnet werden. Durch die bestehende Potentialdifferenz zwischen den beiden Photosystemen ist das PSII ein starkes Oxidationsmittel und PSI ein sehr starkes Reduktionsmittel. Absorbierte Strahlung löst im PSII die Wasserspaltung unter Freisetzung von Sauerstoff aus. Über den

Cytochrom b_6/f -Komplex und bewegliche Komponenten in der Membran (Plastochinon, Plastocyanin und Ferredoxin) gelangen die im PSII angeregten und „freigesetzten“ Elektronen schließlich zum RC des PSI. In diesem Photosystem werden die Elektronen so weit energetisch angehoben, dass zum einen Ferredoxin und NADP^+ reduziert und zum anderen freigesetzte Elektronen zum Cytochrom b_6/f -Komplex zyklisch zurücktransferiert werden. In Folge des Elektronentransports wird ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut, der von der ATP-Synthase zur Gewinnung von ATP genutzt wird. Durch die Absorption von zwei Mol Lichtquanten pro Mol nicht-zyklisch transportierter Elektronen können auf diese Weise ATP und NADPH für die CO_2 -Assimilation gewonnen werden. Dabei werden pro produziertem NADPH gleichzeitig 1,3 bis 1,5 Moleküle ATP gebildet. Für die Aufklärung der zweiten Reaktionsklasse der Photosynthese, der Dunkelreaktion, erhielt M. Calvin 1961 den Nobelpreis für Chemie. Sie wird daher nach ihrem Entdecker auch als Calvin-Zyklus bezeichnet. In der Dunkelreaktion erfolgt die chemische Umsetzung der zweiten Ausgangssubstanz der Photosynthese: des CO_2 . Der Mechanismus dieser photosynthetischen CO_2 -Assimilation lässt sich in drei Phasen gliedern: die Carboxylierung des C_5 -Zuckers Ribulose-1,5-bisphosphat und seine nachfolgende Spaltung unter Bildung von zwei Molekülen 3-Phosphoglycerat, die Reduktion des 3-Phosphoglycerats zu Triosephosphat und schließlich die Regeneration des CO_2 -Akzeptors Ribulose-1,5-bisphosphat. Dieser gesamte Prozess ist mit der Lichtreaktion nicht zwangsläufig gekoppelt, sondern kann unabhängig von den pigmenttragenden Strukturen ablaufen, wenn ATP und NADPH zur Verfügung stehen. Beide Prozesse sind auch räumlich voneinander getrennt. Während die Lichtreaktion in und an den Thylakoidmembranen der Chloroplasten abläuft, erfolgt die CO_2 -Fixierung im Chloroplastenstroma.

Die im Laufe der Evolution entwickelte und optimierte Energiegewinnung ist sowohl für den Grundlagenforscher als auch für den anwendungsorientierten Wissenschaftler von großem Interesse, da aus den erworbenen Grundlagenkenntnissen effiziente künstliche Photosysteme zur Speicherung und Umwandlung der unbegrenzt zur Verfügung stehenden Sonnenenergie entwickelt werden können.

1.7 Bakterielle Photosynthese

Zwei Gruppen von Bakterien besitzen die Fähigkeit, Licht als Energiequelle zu nutzen: die erste Gruppe umfasst die Purpurbakterien, die grünen Schwefelbakterien und die Heliobakterien, die anoxygene Photosynthese betreiben. Die zweite Gruppe bilden die aeroben und oxygenen Cyanobakterien. Alle Vertreter dieser Gruppen unterscheiden sich voneinander durch ihre cytologischen und physiologischen Eigenschaften sowie durch die verwendeten Pigmente. Die Purpurbakterien setzen sich aus den Schwefelpurpurbakterien (*Chromatiaceae*) und den schwefelfreien Purpurbakterien (*Rhodospirillaceae*) zusammen. Letzteren werden fünf Gattungen zugeordnet. Die spirillenförmigen Arten gehören zur Gattung *Rhodospirillum* (*Rs.*) und die stäbchenförmigen Arten werden zur Gattung *Rhodopseudomonas* (*Rps.*) und *Rhodobacter* zusammengefasst. Gekrümmte Stäbchen werden als *Rhodocyclus* und die annähernd kugelförmigen, beweglichen Zellen, zu der nur eine Art zählt, gehören der Gattung *Rhodopila* an. Zu den *Chromatiaceae* gehört u. a. die Gattung *Chromatium vinosum*, zu der auch *Allochromatium vinosum* zählt. Dieses Bakterium wurde in der vorliegenden Arbeit zur BChla-Isolierung genutzt, da es einen hohen Gehalt dieses Pigments enthält.

Da der Prozess der Photosynthese der Cyanobakterien dem der grünen Pflanzen grundsätzlich ähnelt, gilt für diese Organismen die Überblicksbeschreibung der natürlichen Photosynthese, die in Kapitel 1.6 präsentiert wurde. Die anoxygene Photosynthese der Purpurbakterien, die einen zyklischen Elektronentransport betreiben, soll im Nachfolgenden anhand der Abbildung 10 am Beispiel von *Rb. sphaeroides* beschrieben werden. Der gesamte Photosyntheseapparat ist auf den Thylakoiden lokalisiert. Diese gehen durch Einstülpungen aus der Cytoplasmamembran hervor. Durch Weiterleitung der von den Antennenkomplexen (Lichtsammelkomplex 1 und 2, engl. *light harvesting complexes* (LH1 und LH2), Kap. 1.8) absorbierten Energie oder durch direkte Absorption eines Photons erfolgt die Anregung des BChla-Dimers (P865), des sogenannten *special pairs*, im RC als Startpunkt des lichtgetriebenen Elektronentransfers. Dieser erste angeregte Singulettzustand P865* liegt etwa 1,4 eV über dem Grundzustand und hat eine Lebensdauer von 200 ps (Kirmaier und Holton, 1993; Laporte et al., 1996). Das Elektron wird innerhalb von 3 ps über ein monomeres BChla zum Bakteriopheophytin *a* (BPhea) weitergeleitet. Der dadurch entstehende primäre ladungstrennte Zustand des Ionenpaars P865⁺BPhea⁻ liegt etwa 0,17 eV unterhalb des Energieniveaus von P865*. Im nachfolgenden Schritt wird das Elektron innerhalb von 200 ps auf Q_A transferiert. Der daraus resultierende ladungstrennte Zustand befindet sich ca.

0,6 eV oberhalb des Grundzustands von P865. Die Elektronenübertragung vom Q_A zum Q_B (beide Ubichinon-10) ist mit einer Zeitkonstante von 200 μs im Vergleich zu den vorangegangenen Reaktionen deutlich langsamer. Die Redoxpotentiale dieser beiden Spezies sind nur 100 mV getrennt. Im Unterschied dazu sind die Redoxpotentiale von P^+/P^* mit -760 mV, $BPhe^a/BPhe^a^-$ mit -400 mV und Q_A/Q_A^- mit -110 mV stark in die Richtung des Chinons getrieben (Parson und Cogdell, 1975). Vom Ubichinon werden die Elektronen an frei diffusible Chinone abgegeben, von denen sie über den $Cytc_1$ -Komplex, $Cytc_2$ und $Cytc$ zum *special pair* zurückgelangen. Die Distanz zwischen dem monomeren BChla und dem BPhe^a beträgt 12,9 Å und monomeres BChla und Q_A sind 26 Å voneinander entfernt. Der photosynthetische Elektronentransport hat die Erzeugung eines Protonenpotentials zur Folge, das die Voraussetzung für die Energieumwandlung durch Phosphorylierung ist: die Gewinnung von biochemisch verwertbarem ATP aus ADP durch die ATP-Synthase. Durch Abfluss einiger Elektronen aus dem zyklischen Elektronentransport erfolgt unter Verbrauch von ATP die Reduktion von NAD^+ zu NADH. Dabei sorgen äußere Elektronendonatoren wie H_2 , H_2S , S oder organische Verbindungen wie Malat oder Succinat für die Aufrechterhaltung der Elektronenbilanz. Das gebildete NADH dient zusammen mit ATP der Synthese von Biomasse.

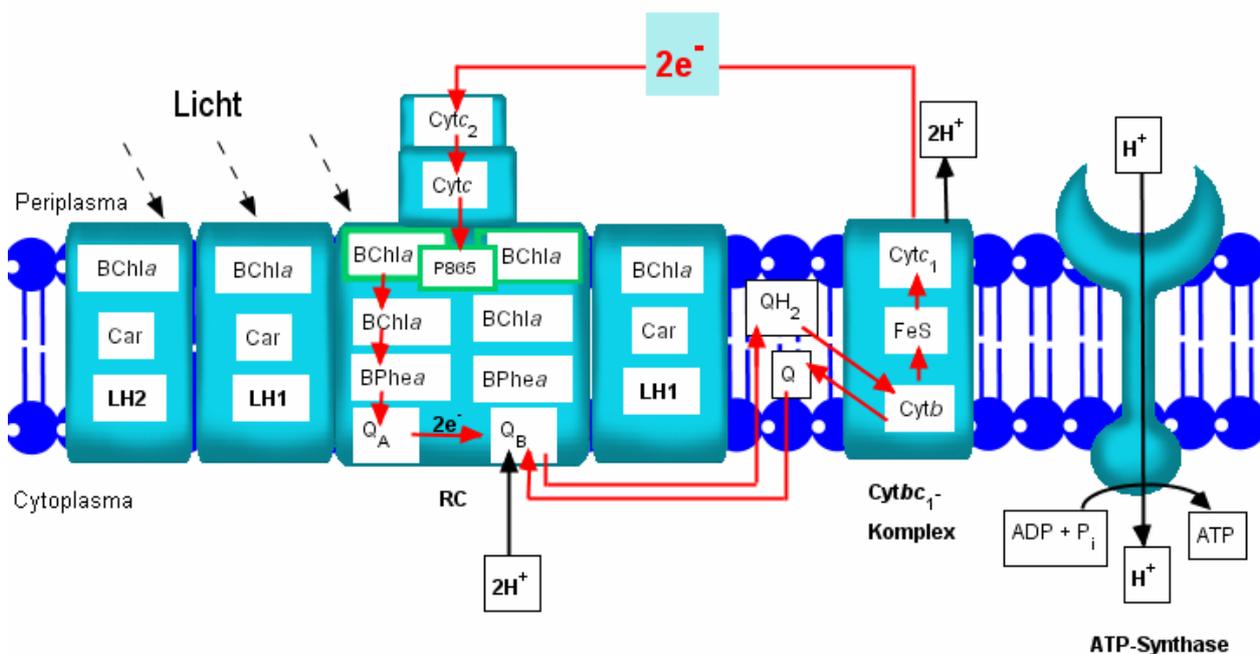


Abbildung 10: Photosynthetische Membran der Purpurbakterien (Car = Carotinoid, FeS = Eisen-Schwefel-Zentrum, RC = Reaktionszentrum); adaptiert aus Schlegel, 1992 und modifiziert nach Lancaster und Michel, 2001. Der Elektronentransport ist in roten Pfeilen dargestellt.

1.8 Bakterielle Lichtsammelkomplexe

Für die Untersuchung der *de novo* synthetisierten Peptide, deren Sequenzen den Peptiden der Lichtsammelkomplexe aus *Rb. sphaeroides* entnommen sind, soll an dieser Stelle der strukturelle Aufbau natürlicher bakterieller Lichtsammelkomplexe dargestellt werden. *Rb. sphaeroides* besitzt wie die meisten Purpurbakterien zwei Typen von Lichtsammelkomplexen. Die bakteriellen LH1- und LH2-Komplexe wurden bereits in Kapitel 1.7 im Zusammenhang mit der Lichtaufnahme und der Weiterleitung der absorbierten Energie zum RC erwähnt. Mit der Kristallisation und der Röntgenstrukturanalyse des LH2-Komplexes von *Rps. acidophila* (McDermott et al., 1995; Papiz et al., 2003) und *Rs. molischianum* (Koepeke et al., 1996) war es erstmals möglich, ein solches Transmembranprotein bis in atomare Details zu beschreiben. Der LH1-Komplex wird aufgrund seines Absorptionsmaximums bei 875 nm auch B875 genannt. Entsprechend wird der LH2-Komplex mit Absorptionsmaxima im nahen IR-Bereich bei 800 und 850 nm als (B800-850)-Komplex bezeichnet. LH1 ist dem RC direkt benachbart, während LH2 keinen direkten Kontakt zum RC hat (siehe Abb. 10). Bei manchen Mikroorganismen wie *Rb. sphaeroides* und *Rs. rubrum* kann der LH1-Komplex vom RC getrennt und isoliert werden (Boonstra et al., 1993; Hu und Schulten, 1998; Loach und Parkes-Loach, 1995).

In allen bekannten Antennenkomplexen der Purpurbakterien ist der strukturelle Aufbau vergleichbar. Die Grundeinheit bildet ein Heterodimer, das aus den α - und β -Apopeptiden besteht. Die Antennenpigmente BChla und Carotinoide werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen an das System gebunden. Diese Untereinheiten assoziieren zu einem Ringsystem, dessen Größe von der Gattung der Purpurbakterien abhängt. So besteht der LH2-Komplex von *Rs. molischianum* aus acht α -, β -Heterodimeren, während dieser in *Rps. acidophila* aus neun Untereinheiten zusammengesetzt ist. Pro Untereinheit sind zwei Carotinoide und drei BChla an die Peptide gebunden, wovon zwei BChla-Moleküle ein Dimer ausbilden, das bei 850 nm absorbiert (Abb. 11), (Review: Law et al., 2004). Die Bakteriochlorophylle dieses Dimers sind über das Histidin an das System gekoppelt, haben einen Mg-Mg-Abstand von 10 Å (*Rps. acidophila*) und liegen senkrecht zur Membran. Ein weiteres BChla ist über Methionin an das β -Peptid der Untereinheit gebunden. Obgleich die Aminosäuresequenz mit Methionin am N-Terminus publiziert wurde (Zuber und Brunisholz, 1993), belegen Elektronendichteberechnungen die Koordination des Magnesiums mit dem Formyl-Sauerstoff einer Formyl-Methionin (fMet)-Aminosäure (McDermott et al., 1995). Der Chromophor-Grundkörper dieses monomeren BChla befindet sich parallel zur

Membranebene, während der Phytylrest in die Mitte des Gesamt-LH-Komplexes gerichtet ist. Der Abstand des Zentralatoms zum Magnesium-Atom eines benachbarten monomeren BChla beträgt 21 Å.

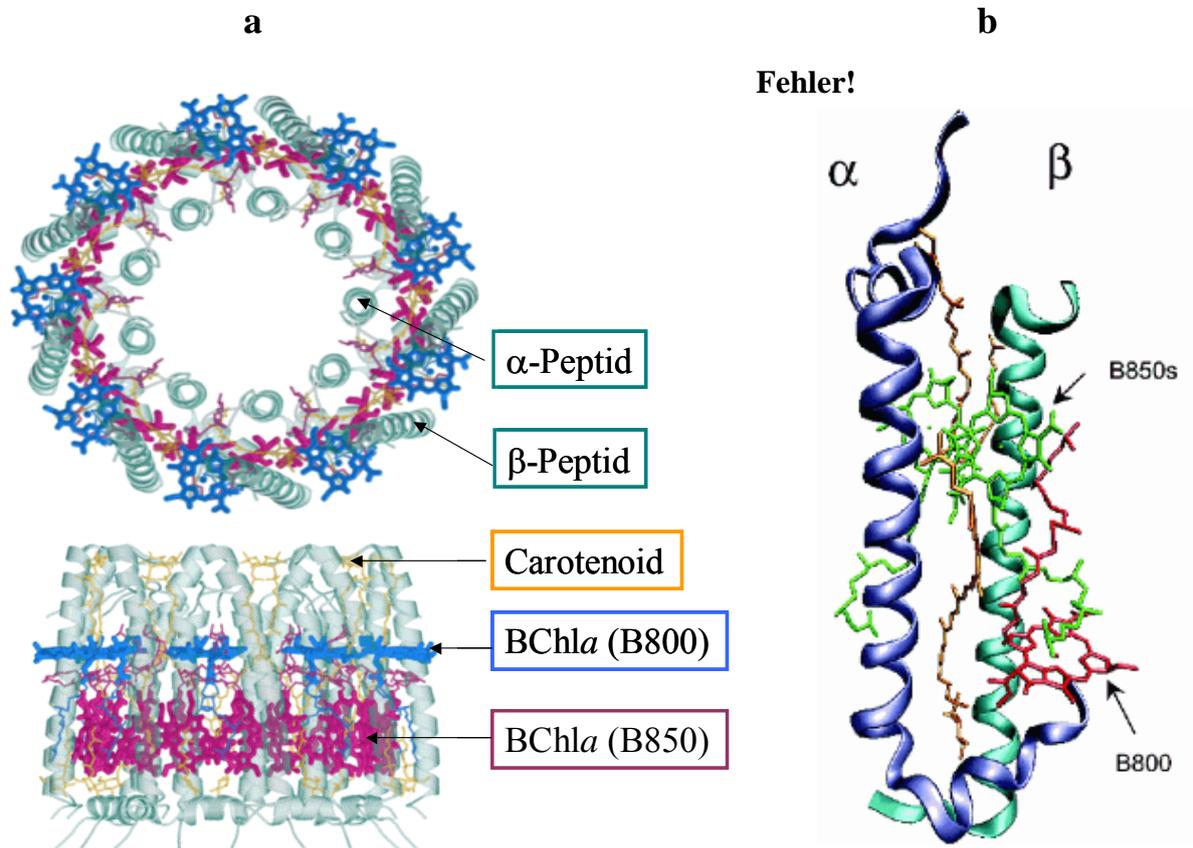


Abbildung 11: (a) Schematische Darstellung des zyklischen LH2-Komplexes von *Rps. acidophila*, adaptiert aus Groenen und Orrit, 2006. (b) α -, β -heterodimere Untereinheit des LH2 von *Rps. acidophila*; adaptiert aus Law et al., 2004.

Eine Kristallstruktur des LH1-Komplexes mit einer Auflösung von 4,8 Å ist bereits von *Rps. palustris* bekannt. Sie wurde zusammen mit dem Reaktionszentrum isoliert (Roszak et al., 2003). Dieser Komplex besteht aus 15 α -, β -heterodimeren Untereinheiten und der Innendurchmesser beträgt 78 Å. Das Ringsystem ist nicht vollständig geschlossen, sondern durch eine transmembrane Helix unterbrochen. Dadurch kann das Ubichinol (UQ_BH_2) aus dem Reaktionszentrum austreten und die Elektronen und Protonen zum *Cytc₁*-Komplex weiterleiten.

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme an zweidimensionalen Kristallen des LH1 von *Rs. rubrum* mit einer Auflösung von 8,5 Å deutet auf einen Ringkomplex eines Hexadecamers von α -, β -Heterodimeren mit 32 BChla-Molekülen hin und zeigt somit erneut die

Abhängigkeit der Ringgröße von der Gattung der Purpurbakterien (Karrasch et al., 1995). Von den Arten *Rb. sphaeroides* und *Rb. capsulatus* ist bekannt, dass das PufX-Protein ein oder mehrere α -, β -Heterodimere ersetzt und damit einen Ausgang im LH1-Ringsystem bietet, durch den die oxidierte und reduzierte Form des Chinons ein- und austreten kann (McGlynn et al., 1994; Frese et al., 2000; Francia et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Lichtsammelkomplex aus *Rb. sphaeroides* 2.4.1 (WT) isoliert. Er diente als Vorlage für die spektroskopischen Charakterisierungen der Wechselwirkung zwischen den chemisch synthetisierten Peptiden nach dem Modell der nativen LH-Peptide und den Pigmenten BChl a und Lutein.

1.9 Photosynthetische Pigmente

Hinsichtlich der Aufnahme von Strahlung besteht für Lebewesen und Pflanzen die gemeinsame Notwendigkeit, Photorezeptoren oder Pigmente zu entwickeln, die Licht definierter Wellenlängen absorbieren und für die bereits in den Kapiteln 1.6 bis 1.8 dargestellten photochemischen Prozesse nutzbar machen. In der Regel handelt es sich bei diesen Substanzen um komplexe organische Verbindungen, die zur Lichtabsorption ein System konjugierter Doppelbindungen aufweisen. Zu den photosynthetischen Pigmenten gehören die Chlorophylle und Bakteriochlorophylle, die Carotinoide und Biline. Die Pigmentkomponenten lassen sich bereits an den Absorptionsspektren intakter Zellen erkennen. Für die Absorptionsmaxima im blauen (<450 nm) und im roten sowie infraroten Spektralbereich (650 – 1100 nm) sind die Bakteriochlorophylle verantwortlich. Die oft vorgefundene verschobene Lage der Absorptionsbande desselben Pigments beruht auf der Art der Bindung und der Lage der (B)Chl-Moleküle in den Pigment-Protein-Komplexen. So kann z. B. das BChl a der Purpurbakterien vier verschiedene Lagen der Absorptionen (B800, B820, B850 oder B870-890) aufweisen. Absorptionen im Bereich von 400 – 550 nm resultieren hauptsächlich von den Carotinoiden und bei Cyanobakterien im Bereich von 550 – 650 nm von den Phycobilinen.

Zu den Primärschritten der Photosynthese, die in den Reaktionszentren ablaufen, gehören im Wesentlichen Elektronentransferreaktionen, die von einem photophysikalisch angeregten (B)Chl a -Dimer ihren Ausgang nehmen (Kap. 1.6 und 1.7). In aller Regel wird jedoch das *special pair* nicht unmittelbar durch das einfallende Licht angeregt, sondern übernimmt die

Anregungsenergie über einen Förster-Energie-Transfermechanismus von sogenannten Antennenchlorophyllen, die in großer Zahl entweder im RC eingebettet sind (pflanzliches Photosystem I) oder in speziellen Proteinen, den Lichtsammelkomplexen in pflanzlichen (LHC) und bakteriellen Organismen untergebracht sind.

Neben der Lichtaufnahme und dem Energietransfer als Antenne fungiert (B)Chl auch als primärer Elektronen-Donator und -Akzeptor im PSI und PSII und in dem bakteriellen RC. Die unterschiedlichen Funktionen der Pigmente werden durch ihren Aggregationszustand und durch die lokale Proteinumgebung hervorgerufen, aus denen eine veränderte Lage der Molekülorbitale resultiert. Die Wechselwirkung der Pigmente mit den Proteinen ist abhängig von der Stereochemie des Pigments, von dessen Substituenten, von der Hydrophobizität der Umgebung, von der Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und der Anzahl und Art von zusätzlichen Liganden und Pigmenten.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kofaktoren haben als Grundgerüst ein zyklisches Tetrapyrrolysystem. Dieses wird im nachfolgenden Kapitel 1.9.1 beschrieben und die Nomenklatur der Pigmente vorgestellt. Das Kapitel 1.9.2 beschreibt die Struktur und Funktion von Carotinoiden als weitere Verbindungen photosynthetischer Pigmente.

1.9.1 Zyklische Tetrapyrrole: Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine

Der einfachste Vertreter zyklischer Tetrapyrrolysysteme ist das Porphyrin, das sich aus vier Pyrrol-Strukturen, den stickstoffhaltigen Grundbausteinen, zusammensetzt, die über Methinbrücken verknüpft sind. Das Protoporphyrin vom Typ IX (PPIX), das das Substitutionsmuster aller natürlich vorkommenden Porphyrine besitzt, ist eine Vorstufe in der Biosynthese von Chl_a. Die elf konjugierten Doppelbindungen im Porphyringrundkörper ergeben ein planares und zyklisch konjugiertes System mit $(4n + 2)\pi$ -Elektronen (Hückel-Aromat). Ein allgemein bekanntes und in dieser Arbeit als redoxaktiver Kofaktor eingesetztes Eisen-Porphyrin ist das FePPIX, das in der oxidierten Form als Hämin (Fe^{3+}) und in der reduzierten Form als Häm (Fe^{2+}) bezeichnet wird (Abb. 13a).

Im Gegensatz zum Porphyrin weist der Chlorophyllgrundkörper eine Reduktion einer Doppelbindung im Pyrrolring D zwischen den Kohlenstoffatomen C₁₇–C₁₈ auf (Ausnahme Chl_c). Des Weiteren ist dem Pyrrolring C eine isozyklische Struktur benachbart: der Cyclopentanonring E. Chlorophylle gehören damit zur Klasse der Chlorine und haben seit langem das Interesse zahlreicher Forschungsgruppen erregt (Aronoff, 1966; Scheer, 1991). Die Struktur des Chl_a wurde 1930 von Fischer aufgeklärt. Das quadratisch planare Molekül

weist einen Durchmesser von ca. 10 Å auf. Die Abbildung 12 zeigt die *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)-Nomenklatur von Chla.

Neben Chla liegt auch häufig die stereoisomere Form Chla' vor, die sich in der Stellung der Ester-Gruppe an der C₁₃²-Position voneinander unterscheiden.

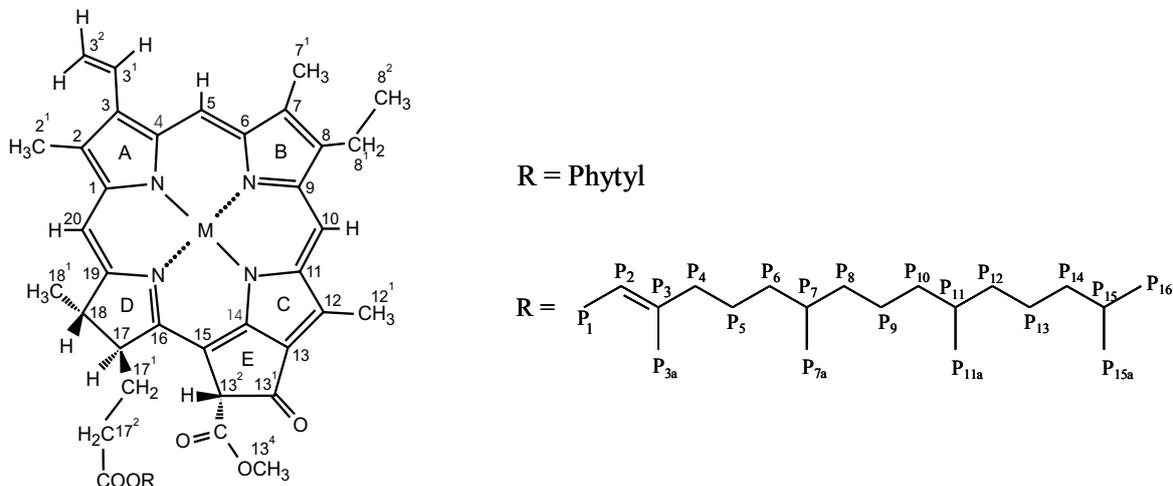


Abbildung 12: IUPAC-Nomenklatur für Chlorophyll *a* (ausgenommen des Phytylrestes).

Bei den Bakteriochlorophyllen *a*, *b* und *d* entfällt im tetrapyrrolischen Grundgerüst eine weitere Doppelbindung im Ring B (C₇–C₈). Des Weiteren liegt im BChla anstelle einer Vinylgruppe am Ring A (beim Chla) eine Acetylgruppe vor. Die Bakteriochlorophylle werden der Klasse der Bakteriochlorine zugeordnet.

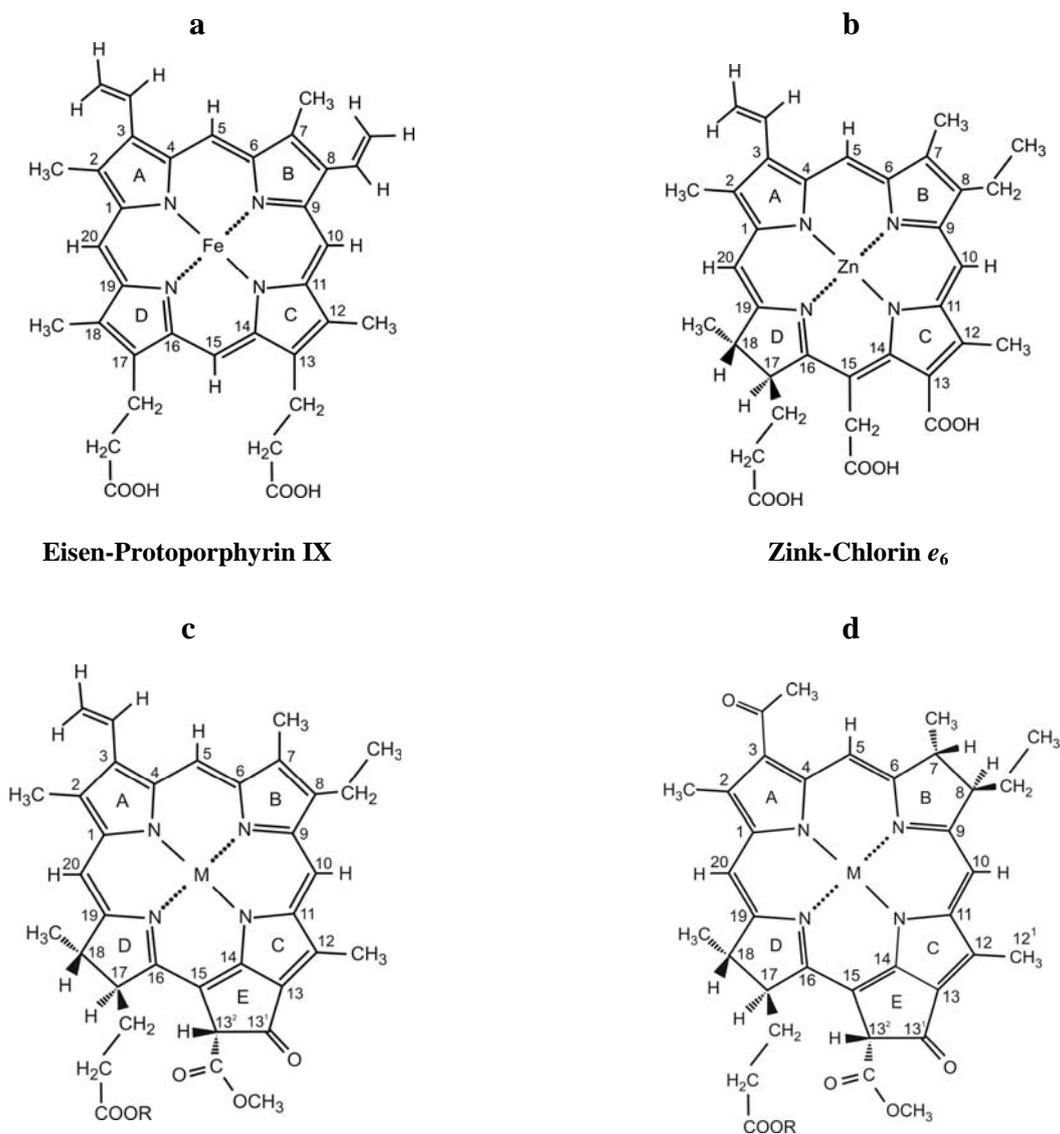
Die Bezeichnung der Chlorophylle *a* – *d* und die der Bakteriochlorophylle *a* – *g* beruht auf der Reihenfolge ihrer Entdeckung. Sie unterscheiden sich durch unterschiedliche Substituenten des jeweiligen Grundgerüsts. Dabei ist zu beachten, dass sich die in den Chlorosomen befindenden Bakteriochlorophylle *c*, *d* und *e* aus chemischer Sicht aufgrund der vorhandenen Doppelbindung zwischen C₇ und C₈ eigentlich zur Substanzklasse der Chlorine zählen und nur in Folge ihrer Herkunft in die Klasse der Bakteriochlorophylle eingeordnet werden.

Für die Nomenklatur der Chlorophyllderivate gelten folgende Bezeichnungen: Die magnesiumfreie Verbindung des (Bakterio)Chlorophylls ist das (Bakterio)Pheophytin ((B)Phe). In diesem System ist das Zentralmetall durch zwei Wasserstoffe ersetzt. Chlorophyllstrukturen, die an der C₁₇³-Position anstelle des Phytylrestes eine freie Propionsäure tragen, werden als (Bakterio)Chlorophyllide bezeichnet. Die korrespondierende magnesiumfreie Verbindung nennt man dagegen (Bakterio)Pheophorbid ((B)Pheid).

Das in dieser Arbeit ebenfalls verwendete Zink-Chlorin *e*₆ (ZnCe₆) und seine metallfreie Form Chlorin *e*₆ (Ce₆) gehören zur Substanzklasse der Chlorine. Im Vergleich zu den

Chlorophyllderivaten existiert bei diesem Molekül keine Bindung zwischen den Kohlenstoffatomen C_{13}^1 und C_{13}^2 im Cyclopentanonring E. Anstelle dieses Ringes mit dem Methylester als Seitengruppe liegen neben der Carboxylgruppe an C_{17}^2 zwei weitere Säuregruppen vor, die dem Molekül einen hydrophilen Charakter verleihen. In der Totalsynthese von Chla ist der Trimethylester des C_{e6} eine Vorstufe vom Pheid, das über die Stufe des Pheophytins das Chla ergibt (Woodward et al., 1960).

Die Abbildung 13 stellt die bereits beschriebenen und in dieser Arbeit verwendeten Kofaktoren zusammenfassend dar, deren Wechselwirkung mit den *de novo* synthetisierten Peptiden untersucht wurde.



Eisen-Protoporphyrin IX

Zink-Chlorin e_6

R = Phytol, M = Mg: **Chlorophyll a**

R = Phytol, M = Zn: **Zink-Pheophytin a**

R = H; M = Zn: **Zink-Pheophorbid a**

R = Phytol, M = Mg: **Bakteriochlorophyll a**

R = H; M = Zn: **Zink-Bakteriopheophorbid a**

Abbildung 13: Strukturen der verwendeten Pigmente mit IUPAC-Nomenklatur.

Alle Pflanzen und die meisten photosynthetisch arbeitenden Bakterien besitzen Magnesium als Zentralmetall im (Bakterio)Chlorophyll. Eine Ausnahme stellt das Purpurbakterium *Acidiphilium rubrum* dar, das Zink anstelle von Magnesium als Zentralmetall des Bakteriochlorophylls enthält (Kobayashi et al., 1998; Shimada et al., 1998). Diese Organismen wurden in Umgebungen mit niedrigen pH-Werten gefunden. Unter diesen Bedingungen würde das Magnesium durch Wasserstoff ausgetauscht werden. Die zwei genannten Metalle sind die bislang einzigen in natürlichen Chlorophyllen und Bakteriochlorophyllen gefundenen Zentralatome, obwohl zahlreiche andere Metalle synthetisch in metallfreie Pigmente eingebaut werden können. Dabei ist zu beachten, dass Mg(II) und Zn(II) zu groß sind, um exakt mit dem Porphyringerüst eine planare Ebene zu bilden. Eine quadratisch-pyramidale Struktur ist die Folge. Die Mg²⁺-Ionen haben mit 0,72 Å einen vergleichbaren Ionenradius mit den Zn²⁺-Ionen (0,74 Å). Die Zn(II)-Komplexe der Chlorine bzw. Chlorinderivate sind aufgrund der höheren Elektronegativität von Zink ($\chi_{\text{Zn(II)}} = 1,81$; $\chi_{\text{Mg(II)}} = 1,31$) geringfügig stabiler als ihre korrespondierenden Magnesiumverbindungen (Scheer, 1991). Der Einbau von Zink durch Einwirkung von Zinkacetat in Essigsäure in die metallfreien Porphyrine und Chlorine ist zudem wesentlich einfacher als der Wiedereinbau von Magnesium oder die Einlagerung von Eisen, zudem erst 2003 ein optimierteres Verfahren gefunden wurde (Snigula, 2003). Der Austausch von Magnesium gegen Zink zeigt darüber hinaus keine signifikanten Änderungen bezüglich der Reaktivität und der Eigenschaften des (B)Chla (Lapouge et al., 2000; Scheer und Hartwich, 1995).

Hinsichtlich der Löslichkeit zeigen BChla und Chla aufgrund des Phytylrestes (C₂₀-Terpen-Alkohol) hydrophobe Eigenschaften. In organischen Lösungsmitteln wie Aceton oder Ethanol liegen diese Pigmente vorwiegend in monomerer Form vor, während in wässriger Umgebung eine Aggregation besteht (Scheer, 1991; Chibisov et al., 2003). Durch Verlust des Phytyls und des Vorliegens einer freien Propionsäure am C₁₇-Atom wie beim Pheida entstehen wasserlöslichere Chlorinstrukturen. So liegt Pheida in wässriger Umgebung in einem Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Form vor (Eichwurz et al., 2000). Die Existenz zusätzlicher funktioneller Gruppen am Chlorin-Grundkörper mit einem hydrophilen Charakter, wie man es beim Ce₆ vorfindet, macht diese Verbindung vollständig wasserlöslich. Da Ce₆ in wässriger Lösung als Monomer vorliegt (Roeder und Wabnitz, 1987), ist diese Verbindung besonders gut zur Charakterisierung von Peptid-Kofaktor-Wechselwirkungen in Modellsystemen geeignet, deren Peptide ebenfalls hydrophile Eigenschaften besitzen.

1.9.2 Carotinoide

Die Carotinoide sind die sogenannten accessorischen Pigmente in phototrophen Organismen. Sie absorbieren Licht im Spektralbereich von 400 – 550 nm. Als Antennenpigmente haben sie die Aufgabe, dem Chlorophyll die Energie zuzuleiten und die Chlorophylle vor destruktiver Photooxidation zu schützen (Frank und Cogdell, 1995). Des Weiteren nehmen sie eine strukturelle Rolle in der Proteinfaltung ein. Photosysteme enthalten β -Carotin und die Antennenkomplexe vor allem Lutein, aber auch Neoxanthin und Violaxanthin. In Purpurbakterien sind die Carotinoide meistens aliphatische C_{40} -Verbindungen mit tertiären Hydroxyl- und Methoxygruppen (Lycopin, Rhodopin, Spirilloxanthin, Spheroidin). Die Strukturen ausgewählter Carotinoide sind in der Abbildung 14 gezeigt.

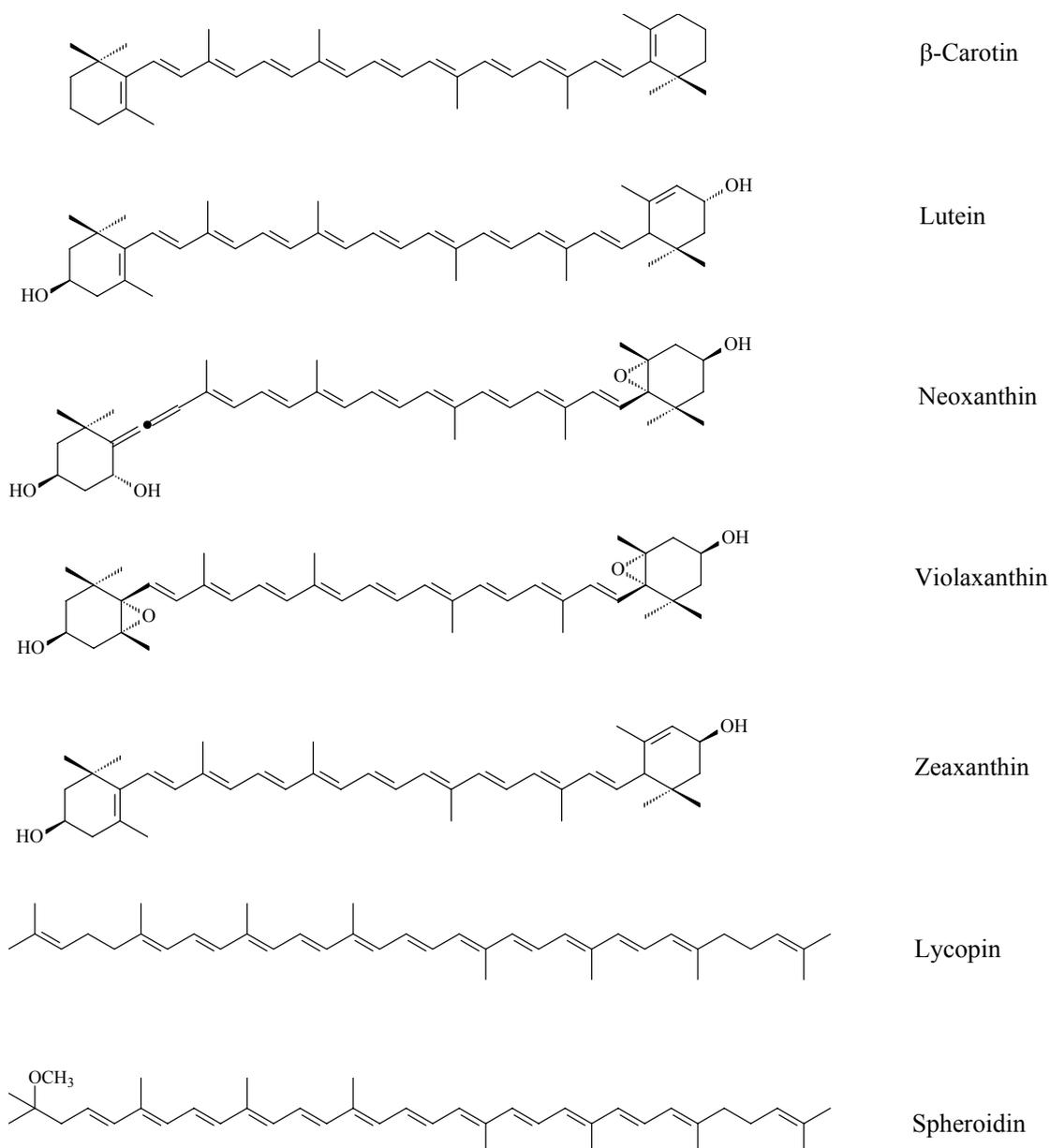


Abbildung 14: Strukturen ausgewählter Carotinoide

1.10 Natürliche Pigment-Proteine

Wie bereits im Kapitel 1.6 vorgestellt, gibt es Chlorophyll-Protein-Wechselwirkungen in allen pflanzlichen Organismen mit oxygener Photosynthese in den Reaktionszentren von PSI und PSII und in den Lichtsammelkomplexen. Bakteriochlorophyll-Protein-Wechselwirkung findet man im LH1, LH2 und in den Reaktionszentren phototropher bakterieller Organismen vor (Kap. 1.7 und 1.8). Bei den natürlichen (B)Chl-Proteinen, die sich in den Antennensystemen oder Reaktionszentren befinden, liegt in der Regel eine fünffache Koordination des Magnesiums vor. Die sechste Koordinationsstelle ist entweder durch den Phytylrest oder durch ein anderes Pigmentmolekül sterisch abgeschirmt (Senge, 1992). Eine sechsfach koordinierte Spezies liegt nur in konzentrierten Ligandenlösungen oder in stark ligandierenden Lösungsmitteln wie Pyridin vor (Evans und Katz, 1975; Callahan und Cotton, 1987; Gammeren et al., 2004). Allerdings wurde vor kurzem sowohl im nativen als auch im rekonstruierten LH1-Komplex von *Rs. rubrum* neben dem bislang bekannten fünffach koordinierten BChl a auch eine sechsfach koordinierte Spezies entdeckt (Fiedor, 2006).

Nach der Verseifung des Phytylrestes von (B)Chl ähnelt das Derivat der Struktur eines Porphyrins und lässt sich z. B. in die Apofornen von Myoglobin oder Hämoglobin einbauen (Boxer et al., 1982; Kuki und Boxer, 1983; Moog et al., 1984). Die Substitution des Eisens im Porphyrin bzw. des Magnesiums im Chlorin-System mit Zink oder Nickel kann eine andere Koordinationszahl des Zentralmetalls hervorrufen, die neben der elektronischen Struktur des Metalls auch von der Umgebung des Chromophors abhängt.

Die Cytochrome stellen einen weiteren natürlich vorkommenden Pigment-Protein-Komplex dar. Während die Chlorophylle Mg $^{2+}$ als Zentralatom im Tetrapyrrolosystem enthalten, besitzen Cytochrome an dieser Stelle ein Eisenatom. Sie wirken als Redoxkatalysatoren bei der Zellatmung, der Energiekonservierung, der Photosynthese und in einigen anaeroben Prozessen. Cytochrome fungieren als Elektronenüberträger, indem das zentrale Eisenatom reversibel seine Oxidationsstufe von Fe $^{3+}$ zu Fe $^{2+}$ ändert. Die Cytochrome werden nach der Struktur des gebundenen Eisen-Porphyrins in drei Hauptgruppen eingeteilt: Cytochrom a , b und c . Die entsprechend zugeordneten Häme (Häm a , b und c) können mit dem Peptid in verschiedener Form verbunden sein. Im Cyt b_6 sind zwei Häm b -Moleküle über ihr Zentralmetall nicht-kovalent über jeweils zwei Histidine an das Protein koordiniert. Aufgrund von unterschiedlichen Positionen (Lumen- und Matrix-Seite) weisen die beiden Hämgruppen im Cyt b_6 zwei verschiedene Redoxpotentiale auf. Im Vergleich dazu ist im Cyt c nur ein Häm vorhanden, das mit den zwei Vinylgruppen kovalent durch Cysteine und Ausbildung von

Thioether-Bindungen an die umgebende Proteinmatrix gebunden ist. Das Eisenatom wird im Cyt_c über Methionin (Met 80) und Histidin (His 18) an das Protein koordiniert und diente damit als Vergleichskomplex zu dem in dieser Arbeit zu charakterisierenden FePPIX-*maquette*, bei dem eine mögliche His-Met-Koordination untersucht wurde.

1.11 Artificielle photosynthetische Reaktionszentren

Zu den Bedingungen eines lichtinduzierten Elektronentransfers, wie er in photosynthetischen Reaktionszentren abläuft, zählen ein schneller Ablauf und hohe Effizienz, so dass der Elektronentransfer vor dem Zerfall des angeregten Zustands durch Depopulation stattfinden kann. Porphyrin-Chinon-Systeme (Connolly und Bolton, 1988) oder eine Porphyrin-Fulleren-Dyade (Review: Imahori, 2004) stellen einfachste Beispiele von Donator-Akzeptor-Systemen dar, die diese Bedingungen erfüllen. Um bei diesen Verbindungen die Lebenszeit der ladungsseparierten Radikalzustände zu erhöhen und den schnellen Elektronentransferprozess aufrecht zu erhalten, ist es notwendig, das Radikalkation durch eine Reihe von Elektronentransfervorgängen vom Radikalanion zu separieren. Durch einen mehrschrittigen Elektronentransfervorgang, wie er auch in natürlichen Reaktionszentren vorkommt, entsteht ein Zustand, in dem die Ladungen räumlich und elektronisch weit voneinander entfernt sind und somit der Prozess der Ladungsrekombination verlangsamt wird (Gust et al., 1998). Ein Beispiel eines solchen Systems ist eine Triade bestehend aus einem Porphyrin-Fulleren-System und einem am Porphyrin-System kovalent gebundenen Carotinoid, das als zweiter Elektronendonator wirkt (Liddell et al., 1997). Triaden aus redoxaktiven Kofaktoren ohne Peptidumgebung, bestehend aus einem primären Chromophor, einem Elektronen-Donator und einem -Akzeptor, die miteinander kovalent verbunden sind, können folglich als einfachstes Beispiel eines artifiziellen Reaktionszentrums genutzt werden (Gust und Moore, 1989; Steinberg-Yfrach et al., 1997; Collings und Critchley, 2005).

FePPIX-*maquettes*, die Vier-Helix-Bündel ausbilden, waren die ersten artifiziell synthetisierten redoxaktiven Proteine, die ein künstliches RC mit Peptidumgebung darstellten (Robertson et al., 1994; Gibney und Dutton, 2001). Es wurden bereits zahlreiche Modellierungen an FePPIX-Bindungstaschen vorgenommen, um die Ligationsbedingungen zu charakterisieren (Rau et al., 2000; Rau und Haehnel, 1998; Shifman et al., 2000). Des Weiteren folgten Nachbildungen von artifiziellen Metalloprotein-Komplexen, an denen

Untersuchungen zu lichtinduzierten Elektronentransferprozessen stattfanden. So konnte z. B. ein lichtinduzierter Elektronentransfer zwischen einem Ruthenium-Bipyridin-Komplex und einem FePPIX-Molekül entlang einer Helix charakterisiert werden (Rau et al., 1998) oder es wurden zwei peptidgebundene Ruthenium-Komplexe verwendet, um den Elektronentransferprozess über eine nicht-kovalent gebundene Protein-Matrix zu charakterisieren (Kozlov und Ogawa, 1997). Sharp et al. gelang es, einen Elektronentransferprozess zwischen einem peptidgebundenen Flavin und einem FePPIX, das durch zwei Histidine in der hydrophoben Tasche eines *de novo* synthetisierten Peptids eingebunden war, zu beobachten (Sharp et al., 1998b).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Lubitz wurde bereits ein lichtinduzierter Triplett-Elektronentransfer von einem Zink-Protoporphyrin, das in einem Templat-gebundenen Vier-Helix-Bündel über Histidine ligandiert war, zu einem von außen zugesetzten Anthrachinon als Elektronenakzeptor untersucht (Fahnenschmidt et al., 2001). Des Weiteren haben Jones et al. gezeigt, dass ein Tryptophanrest als redoxaktive Verbindung agieren kann, indem es als Donatormolekül Elektronen zu einem peptidgebundenen Pyren transferiert, das wiederum die Elektronen an ein ebenfalls peptidgebundenen Methylviologen weitergibt (Jones et al., 2000). Damit konnte ein aus mehreren Schritten bestehender, lichtinduzierter Elektronentransfer in einem artifiziellen Peptidmodell gezeigt werden. An einem artifiziellen Drei-Helix-Bündel-Peptid mit zwei eingelagerten Rutheniumkomplexen wurde bereits beobachtet, dass die Ratenkonstanten des Elektronentransfers stark abhängig von der Distanz der beiden Donator- und Akzeptormoleküle sind (Mutz et al., 1999). Analog zu den oberhalb dargestellten Beispielen zur Darstellung und Untersuchung artifizieller Reaktionszentren soll in dieser Arbeit ein lichtinduzierter Elektronentransfer von freien bzw. peptidgebundenen Zinkchlorinen zu Chinonen untersucht werden und damit eine erste Elektronentransferabfolge, wie sie in natürlichen Reaktionszentren abläuft, simuliert werden. Die dazu und in den weiteren Experimenten verwendeten Peptide werden im nachfolgenden Kapitel 1.12 vorgestellt.

1.12 Verwendete Peptidmodelle

Der Vorteil von Modellsystemen mit kleinen Molekulargewichten liegt darin, dass gezielt nur ein bis zwei Kofaktoren in die Peptide eingebaut werden. Die Peptidmatrix verhindert damit unerwünschte Pigment-Pigment-Wechselwirkungen und die Pigment-Protein-Wechselwirkung kann getrennt untersucht werden. In natürlichen Systemen befinden sich dagegen mehrere Kofaktoren in näherer Umgebung, so dass eine Pigment-Pigment-Wechselwirkung in die Untersuchungsergebnisse einzubeziehen ist und die Auswertung der Messdaten erschwert. Die in dieser Arbeit synthetisierten Peptide basieren zum einen auf den B- und D-Helices in der *Cytb* Untereinheit des *Cytc₁*-Komplexes von *Rb. capsulatus* (Robertson et al., 1994; Sharp et al., 1998b), zum anderen auf den Aminosäuresequenzen der transmembranen Peptide aus den Lichtsammelkomplexen LH1 und LH2 von *Rb. sphaeroides*. Die Untersuchungen zur Charakterisierung dieser verschiedenen Peptide mit unterschiedlichen Kofaktoren werden im Kapitel 5 aufgrund der unterschiedlichen Themenstellung und Zielsetzung getrennt voneinander dargestellt.

Dem Strukturelement der amphiphilen, artifiziellen Peptide nach dem Modell des FePPIX-bindenden Vier-Helix-Bündels in *Cytb* liegt ein Helix-turn-Helix-Bindungsmotiv zugrunde, das sich in wässriger Lösung spontan zu Dimeren zusammenlagert und damit das gewünschte Strukturelement des natürlichen Systems nachbildet. In der Arbeitsgruppe Dutton wurde der Prototyp, das sogenannte [H10H24]₂ *maquette* entwickelt (Abb. 15). Das in wässriger Lösung entstehende Vier-Helix-Bündel mit einer parallelen Anordnung der beiden Helix-turn-Helix-Motive und mit acht Histidin-Bindungsstellen sollte vier Häminmoleküle binden können.

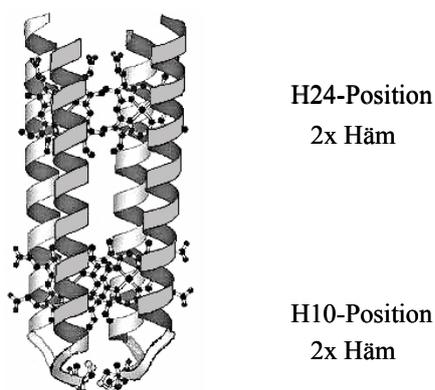


Abbildung 15: Modell der *Cytb*-Untereinheit, der Prototyp [H10H24]₂ (Robertson et al., 1994). Die Ziffern 10 und 24 kennzeichnen ausgehend vom N-Terminus die Histidinpositionen (entnommen aus Kalsbeck et al., 1996). Analog zur natürlichen *Cytb*-Untereinheit beträgt der Abstand der Histidine 14 Aminosäuren.

Eine Helix des Modellsystems besteht aus 27 Aminosäuren. Die *loop*-Region, der sogenannte *turn*, kann zum einen aus drei Glycinresten und einem Cystein bestehen, wobei das Cystein durch Oxidation mit Luftsauerstoff mit einem anderen Cystein einer gleichen, benachbarten Helix eine Disulfidbrücke erzeugt (in me-1, me-5, me-7, me-8 und me-9) oder zum anderen können acht hintereinander gekoppelte Glycine (wie in me-2 und me-6) einen *turn* ausbilden. Die Standardpeptidsequenz eines Helix-*turn*-Helix-Motivs besteht damit aus 62 Aminosäuren. Die Bezeichnung „me-*n*“ für die Peptide in dieser Arbeit ist frei gewählt. Durch Einzelmutationen konnte die Sequenz des *maquettes* [H10H24]₂ bereits so verbessert werden, dass keine *molten globule* Strukturen mehr auftraten, sondern eine gut strukturierte Faltung entstand, die durch NMR-Studien nachgewiesen wurde (Gibney et al., 1999). Es konnte bislang gezeigt werden, dass sich die Topologie des Dimers durch Einlagerung der Hämingruppe ändert und ein dynamischer Wechsel zwischen beiden Konformeren besteht. Die Erfahrungen in der Praxis haben gezeigt, dass die bislang angenommenen Hohlräume für die Hämingruppen nicht in dem Maße vorliegen, wie sie für den Prototypen ursprünglich berechnet wurden (Lombardi et al., 2001 (Review); Huang et al., 2003). Das Fehlen einer eindeutigen Struktur und Konformation beim Holopeptid trägt dazu bei, dass bislang keine strukturauflösenden NMR-Daten und Kristalle erhalten wurden, obgleich das gewünschte Strukturmotiv eines Vier-Helix-Bündels vorliegt, Hämingruppen koordiniert werden und das System sich damit hervorragend zur Charakterisierung verschiedener Kofaktor-Peptid-Wechselwirkungen eignet. Es sind lediglich von zwei verschiedenen Holopeptiden, die aus Einzelmutationen aus dem Prototypen entstanden sind, ¹H-NMR-Spektren mit geringen Linienbreiten bekannt, die allerdings keine Aussage über die vorliegende Struktur zulassen (Gibney et al., 2001).

Eine Variation in der Anzahl der Histidine im Peptid gibt eine Information über die Menge und Lage der peptidgebundenen Kofaktoren. So enthält das Peptid me-1 vier Histidine, während beim Peptid me-5 bei sonst gleicher Sequenz zwei Histidine gegen Alanin ausgetauscht sind. Im Fall des Peptids me-2 wurde gegenüber me-6 ein Histidin gegen Methionin ausgetauscht. Durch diesen Austausch gelang die Untersuchung, ob eine Histidin-Methionin-Ligation des Hämins gegenüber einer, aufgrund des Peptidmodells weiterhin nicht ausgeschlossenen Histidin-Histidin-Koordination, bestehen kann oder nicht. Die nachfolgende Abbildung 16 stellt die in dieser Arbeit verwendeten Peptide dar. Die Peptide me-7, me-8 und me-9 beziehen sich auf die gleiche Sequenz und gezeigte Strukturbildung des Peptids me-1 und werden folglich in Abbildung 16 nicht gesondert dargestellt. Im Vergleich zum Peptid me-1 sind ihre Helices auf nur 20 Aminosäuren verkürzt (anstelle von 27 Aminosäuren pro α -

Helix in me-1) und sie unterscheiden sich untereinander durch Substitution einzelner Aminosäuren. Die Sequenzen der jeweiligen Peptide sind im Kapitel 4.1.1 im Detail angegeben.

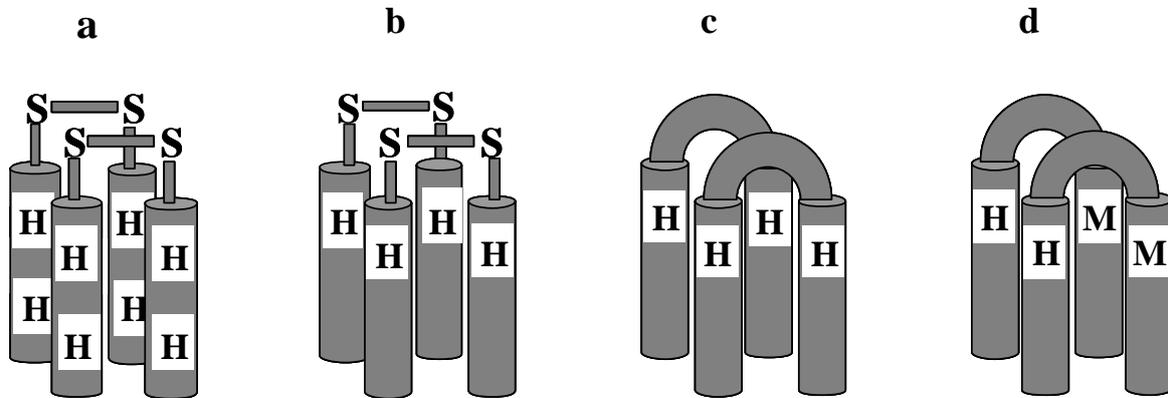


Abbildung 16: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit synthetisierten und verwendeten Peptidstrukturen als Vier-Helix-Bündel. Die zur Ligation wichtigen Histidinreste (H) sind vergrößert hervorgehoben. (a) Peptid me-1 mit vier Histidinen pro Helix-turn-Helix-Motif und einer Disulfidbrücke (mit „S-S“ gekennzeichnet) als turn, (b) Peptid me-5 mit zwei Histidinen pro Helix-turn-Helix-Motif und einer Disulfidbrücke als turn, (c) Peptid me-6 mit zwei Histidinen pro Helix-turn-Helix-Motif und acht Glycinen als turn, (d) Peptid me-2 mit einem Histidin- und Methioninrest pro Helix-turn-Helix-Motif und acht Glycinen als turn.

Nach der Einlagerung der Zinkchloride $ZnCe_6$ und $ZnPheida$ (Strukturen in Abb. 13) in die *maquettes* und der Charakterisierung der entstandenen Komplexe können lichtinduzierte Elektronentransferprozesse zu einem nicht-kovalent gebundenen Akzeptormolekül (Chinon oder Methylviologen) untersucht werden. Somit handelt es sich bei diesem Prozess um die Charakterisierung von intermolekularen Elektronenübergängen, wie sie auch in natürlichen Photosystemen vorkommen (Kap. 1.6 und 1.7).

Die Sequenzen der *de novo* synthetisierten Peptide $sph\alpha 31$ und $sph\beta 31$ bzw. $sph\alpha 54$ und $sph\beta 50$ sind direkt dem natürlichen LH1- bzw. LH2-Komplex von *Rb. sphaeroides* entnommen. Die Peptide $sph\alpha 31$ und $sph\beta 31$ des LH1-Systems entsprechen Teilsequenzen der nativen α - und β -Peptide einer LH1-Untereinheit (Kapitel 1.8), während die Peptide $sph\alpha 54$ und $sph\beta 50$ des LH2-Komplexes die vollständige Sequenz der entsprechenden natürlichen Systeme darstellen. An diesen Peptiden, deren Bezeichnung an der von der Arbeitsgruppe Parkes-Loach und Loach angelehnt ist ($sphz = sphaeroides$, $z =$ Zahl der Aminosäuren; Meadows et al., 1998; Kehoe et al., 1998), können Experimente bezüglich der Wechselwirkung mit den Kofaktoren BChl a und Lutein durchgeführt und Ansätze zur Rekonstruktion eines LH-Komplexes aus artifiziellen Peptiden und isolierten Pigmenten gegeben werden.

2. Ziele und Motivation

Wie im Kapitel 1 beschrieben wurde, ist die Protein-Kofaktor-Wechselwirkung in der Natur die Grundlage für eine Vielzahl von biologischen Prozessen. Da viele Aspekte zur Faltung, Funktion und zu den Eigenschaften der an diesen Prozessen beteiligten Proteine noch nicht aufgeklärt sind, beinhaltet die vorliegende Arbeit verschiedene Untersuchungen zur Wechselwirkung von *de novo* synthetisierten Peptiden mit unterschiedlichen Kofaktoren. Der Vorteil dieser kleinen strukturellen Peptideinheiten, sogenannter *maquettes*, in denen nur ein bis zwei Kofaktoren eingebunden sind, gegenüber den natürlichen Proteinkomplexen liegt in der gezielten Anordnung dieser Pigmente im Peptid, die durch das Modell vorgegeben ist. Dies stellt eine deutliche Erleichterung für die Auswertung und das Verständnis der spektroskopischen Messdaten dar. Durch den synthetischen Nachbau von Proteinen können deren Struktur und Eigenschaften überprüft und mit entsprechenden natürlichen Proteinkomplexen aus der Atmungskette oder Photosynthese verglichen werden. Dadurch können Aufschlüsse über bislang ungeklärte Struktur- und Funktionsbeziehungen erhalten und gleichzeitig aber auch die Grenzen eines solchen chemisch-synthetischen Ansatzes aufgezeigt werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die zu verwendenden Peptide durch automatisierte chemische Peptidsynthese herzustellen. Durch diese Methode können parallel verschiedene kurze Peptidstränge, deren Sequenzen sich nur wenig unterscheiden, in kurzer Zeit synthetisiert werden. Das Ziel war es, amphiphile Helices herzustellen, die sich in das stabile Strukturmotiv eines Vier-Helix-Bündels mit einem hydrophoben Kern und einem hydrophilen Äußeren anordnen. Ein solches Vier-Helix-Bündel, bestehend aus kurzen Peptidsträngen, hat den Vorteil, nur ein bis zwei Kofaktoren pro Helix-turn-Helix-Motiv zu binden.

Auf der Grundlage eines literaturbekannten Modells für die Nachbildung einer Vier-Helix-Struktur aus der *Cytb*-Untereinheit des Cytochrom *bc₁*-Komplexes (Robertson et al., 1994) und der in der Arbeitsgruppe von Prof. Lubitz bereits untersuchten Häm-in-*maquettes* (Fahnenschmidt, 2000) war es von Interesse, ergänzende Charakterisierungen an einem derartigen System durchzuführen, um die Struktur dieses Modellkomplexes weiter aufzuklären. Daher sollten weitere Informationen z. B. über das Molekulargewicht, die Halbstufen-

potentiale der peptidgebundenen Hämingruppen oder über die Bindungsaffinität zu kleinen Molekülen, wie z. B. zu Cyanid-Ionen, erhalten werden. Zudem sollten durch Variation der Anzahl an Histidinen, die als Bindungspositionen für das Hämin dienen, durch Verkürzung der Peptidstränge oder durch den Austausch einzelner Aminosäuren deren Auswirkungen sowohl auf die Struktur und Stabilität der Peptide als auch auf die Bindungsaffinität der Kofaktoren geprüft werden. Des Weiteren bestand die Aufgabenstellung darin, durch Austausch eines Histidins gegen Methionin in der bereits verwendeten Peptidsequenz, die Möglichkeit zur Ausbildung einer Histidin-Methionin-Koordination der Hämgruppe zu untersuchen, wie sie auch in natürlichem Cytochrom *c* vorliegt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Einlagerung von (Bakterio)Chlorophyllen zum Nachbau einer minimalistischen, photosynthetischen Struktureinheit, um grundlegende Funktionen aufzuklären, wie z. B. die Lichtaufnahme, den Energietransfer und die Ladungstrennung, die durch natürliche Protein-Kofaktor-Komplexe ermöglicht werden. Bislang liegt keine Information darüber vor, warum ein dimeres Pigment einmal dem Elektronentransfer (z. B. BChl_a-Dimer als *special pair* im Reaktionszentrum) und ein anderes Mal der Lichtaufnahme (BChl_a-Dimer in den bakteriellen und pflanzlichen Lichtsammelkomplexen) dient. Zur Bearbeitung des Themas erfolgte die Isolation der als Kofaktoren dienenden pflanzlichen Pigmente, Chl_a und BChl_a, aus natürlichen pflanzlichen und bakteriellen Systemen. Diese Kofaktoren sollten gegebenenfalls so modifiziert werden, dass ihr Einbau in das Vier-Helix-Bündel durch geeignete spektroskopische Methoden nachgewiesen werden kann. Nach der Kofaktor-Einlagerung in das Peptid sollte zum einen die Fragestellung zur Koordinationszahl des Kofaktors im Peptid und zum anderen zur Abschirmungsmöglichkeit der Pigmente untereinander durch die Peptidmatrix und den damit verbundenen Ausschluss einer unerwünschten Kofaktor-Kofaktor-Wechselwirkung beantwortet werden. Nach einer erfolgreichen Peptideinlagerung eines Chlorophyllderivats war es das Ziel zu untersuchen, ob dieser Komplex nach Lichtanregung als Elektronendonator für ein geeignetes Akzeptormolekül fungieren kann. Dieser Elektronentransferprozess sollte mit gleichen Donator- und Akzeptormolekülen ohne Peptidhülle verglichen werden, um damit den Einfluss der *de novo* synthetisierten Peptide auf den Elektronentransfer zu überprüfen. Die Modellsysteme dieser (Bakterio)Chlorophyll-*maquettes* dienen somit als Ausgangspunkt für die Synthese artifizieller photosynthetischer Reaktionszentren.

Eine weitere Aufgabenstellung, die sich aus der Möglichkeit der Anwendung der chemischen Peptidsynthese ergab, war die Darstellung von *de novo* synthetisierten Peptiden, deren Sequenzen auf den Peptiden der Lichtsammelkomplexe eines Purpurbakteriums beruhen und

die Untersuchung ihrer Wechselwirkung mit Kofaktoren wie BChl a und Lutein. Da bislang noch nicht alle Strukturen der natürlichen Lichtsammelkomplexe bekannt sind, sollte dieses Teilprojekt dazu dienen, die Wechselwirkung bzw. Bindungseigenschaften zwischen den einzeln vorliegenden Komponenten (aus natürlichen Systemen isolierte Kofaktoren und *de novo* synthetisierte Peptide) zu untersuchen und Ansätze zur Herstellung eines künstlichen Lichtsammelkomplexes aufzuzeigen.

3. Grundlagen

3.1 Spektroskopische Techniken

3.1.1 Absorptionsspektroskopie

Bei der Absorption elektromagnetischer Strahlung kann ein Molekül von seinem Grundzustand in einen angeregten Zustand übergehen, wenn die Energie der eingestrahnten Lichtquanten gerade der Differenz der Energien der beiden elektronischen Energieniveaus entspricht, zwischen denen der Übergang erfolgt. Die möglichen energetischen Zustände ergeben sich quantenmechanisch als Eigenwerte aus der Lösung der Schrödinger-Gleichung. Die elektronischen Energieniveaus sind in Schwingungsniveaus unterteilt, die aus verschiedenen Molekülschwingungen resultieren. Durch die Rotation des Moleküls ergibt sich eine weitere Unterteilung der Energieniveaus, die allerdings für die Absorptionsspektroskopie in Lösungen nicht von Bedeutung ist. Die Breite der elektronischen Absorptionsbanden einer flüssigen Probe hängt somit allein von der Schwingungsstruktur ab. Die Schwingungsfeinstruktur liegt nur in gasförmigen Proben oder schwach wechselwirkenden Lösungsmitteln aufgelöst vor.

Nach der Boltzmann-Statistik befinden sich bei Raumtemperatur fast alle Moleküle im niedrigsten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands, aus dem die Lichtabsorption erfolgt. Da der Absorptionsprozess mit 10^{-15} s schnell im Vergleich zur Molekülschwingung (10^{-13} s) ist, erfolgt der Übergang nach dem Franck-Condon-Prinzip bei fester Kernlage vertikal zwischen den Potentialkurven des Grund- und angeregten Zustands. Bei diesem Übergang ist die Intensität der Absorption am größten. Er ist jedoch nicht der einzige Übergang, da sich Kerne von benachbarten Schwingungszuständen ebenfalls noch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit im Gleichgewichtskernabstand aufhalten und somit zur Absorption beitragen. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz lässt sich aus der Stärke der Absorption, also der Lichtschwächung beim Durchstrahlen der Probe, die Teilchenzahldichte bzw. die Konzentration der untersuchten Spezies bestimmen.

Im Allgemeinen gilt sowohl für die Absorptions- als auch Fluoreszenzspektroskopie, dass ein Molekül zumindest temporär einen schwingenden Dipol besitzen muss und damit das

Übergangsmoment von Null verschieden ist, um mit einem Photon mit gleicher Frequenz zu wechselwirken. Der Betrag des Übergangsdipolmoments gilt als Maß für die Ladungsverteilung während des Übergangs. Eine detaillierte Beschreibung über die Absorptionsspektroskopie ist in zahlreichen Lehrbüchern wie z. B. Atkins, 2001; Galla, 1988; Hesse et al., 1995 nachzulesen.

Absorptionsspektroskopie an zyklischen Tetrapyrrolosystemen

Die tiefer liegenden elektronischen Zustände von Porphyrinen sind seit den Pionierarbeiten von M. Gouterman bekannt. Sein entwickeltes *four orbital* Modell (Gouterman, 1959; Gouterman 1961; Gouterman et al., 1963; Weiss et al., 1965) ist bis heute das gängige Modell zur Interpretation von UV-Vis-Spektren von Porphyrinen und kann auch zur Erklärung der Absorptionsbanden von Chlorinen und Bakteriochlorinen herangezogen werden. Das Modell ist vor allem aus der Theorie der Molekülorbitale (MO) zyklischer Polyene entstanden.

Aufgrund der zwei Gruppen von Stickstoffatomen, denjenigen mit sowie denen ohne H-Atom, bestehen im Porphyrin zwei Vorzugsrichtungen, die darüber hinaus orthogonal zueinander stehen. Diese beiden Orientierungen finden sich in den spektroskopischen Eigenschaften der elektronischen Übergänge wieder. Übergänge, die sich entlang der Achse der inneren H-Atome befinden, bezeichnet man als x-polarisiert. Liegt das Übergangsmoment eines elektrischen Übergangs orthogonal dazu an der Verbindungsachse der Pyrrolstickstoffe ohne H-Atome, so gehört es zu den y-polarisierten Übergängen (Abb. 17a).

Zur Beschreibung der Absorptionsbanden werden die vier Grenzorbitale des Porphyrins betrachtet, d. h., die zwei vollständig besetzten Orbitale $a_{2u}(\pi)$ (*highest occupied molecular orbital* (HOMO-1)) und $a_{1u}(\pi)$ (HOMO) und die beiden unbesetzten Orbitale $e_{gx}(\pi^*)$ (*lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO)) und $e_{gy}(\pi^*)$ (LUMO+1) (Suslick und Watson, 1992; Vannelli und Karpishin, 2000). Daraus ergeben sich insgesamt vier mögliche Übergänge: $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$, $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$, $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$, $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$ mit den dazugehörigen Übergangsdipolmomenten M1 und M2. Diese Übergänge ergeben durch Linearkombination die vier Absorptionsbanden Q_y , Q_x , B_x und B_y .

Aus der Abbildung 17a geht hervor, dass der Singulettzustand b_{1c_1} , der aus dem Übergang b_1 nach c_1 resultiert, die gleiche Symmetrie wie der Zustand b_{2c_2} besitzt. Analog weist der Singulettzustand b_{1c_2} die gleiche Symmetrie wie b_{2c_1} auf. Als Linearkombinationen erhält man:

$$\frac{1}{\sqrt{2}} (b_1c_1 + b_2c_2) = B_y \quad \frac{1}{\sqrt{2}} (b_1c_2 + b_2c_1) = B_x$$

$$\frac{1}{\sqrt{2}} (b_1c_1 - b_2c_2) = Q_y \quad \frac{1}{\sqrt{2}} (b_1c_2 - b_2c_1) = Q_x$$

Die Indizes x und y geben die Richtungen des Übergangsdipolmoments an.

Bei einer freien Porphyrinbase mit einer D_{2h} -Symmetrie sind die B-Banden erlaubt, während die Q-Banden eigentlich verboten sind. Der Grund für die Beobachtung der Q-Banden im Absorptionsspektrum liegt in den konformellen Schwingungen des Porphyrinsystems begründet, die die Entartung der HOMOs geringfügig aufheben.

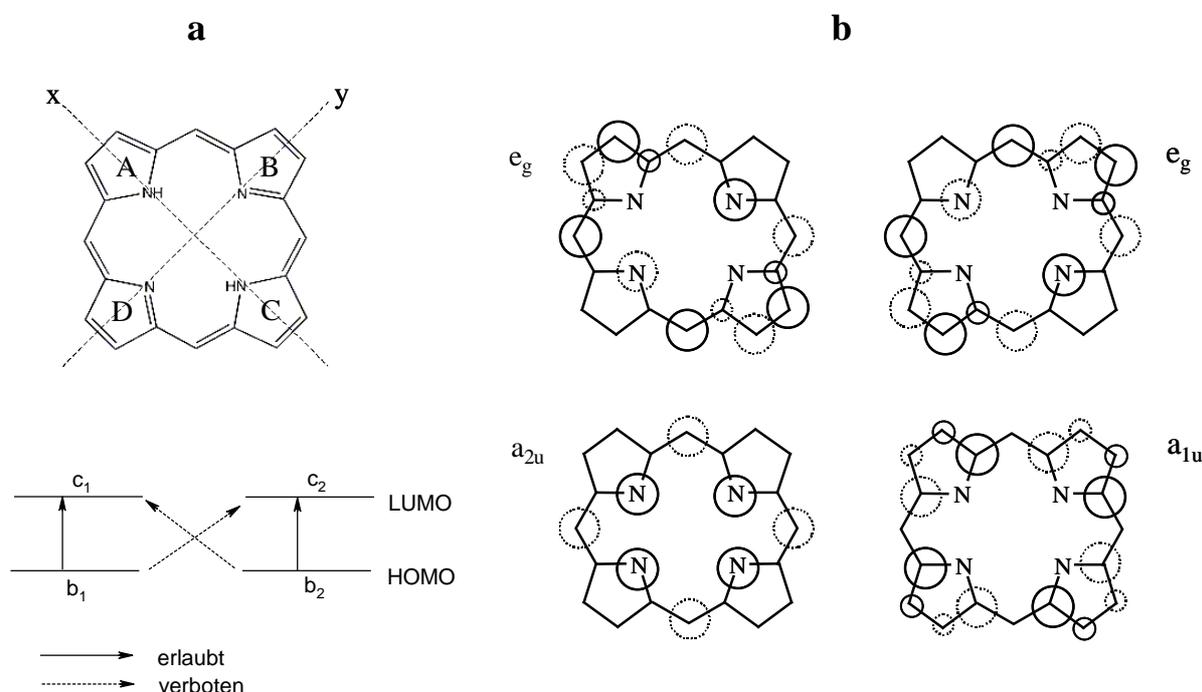


Abbildung 17: (a) Richtungen der Übergangsdipolmomente und erlaubte und verbotene Übergänge zwischen entarteten HOMOs und LUMOs einer freien Porphyrinbase mit D_{2h} -Symmetrie und (b) deren berechnete Elektronendichte in den HOMOs (a_{1u} und a_{2u}) und LUMOs (e_g). Gestrichelte Kreise besitzen ein anderes Vorzeichen als die geschlossenen Kreise. Die Abbildung (b) ist adaptiert aus Milgrom, 1997.

Die Intensitätsunterschiede zwischen der B- und Q-Bande für Porphyrine können durch die konstruktive Interferenz der Übergangsmomente für die B-Bande ($M1 + M2$) und der destruktiven Interferenz für die Übergangsmomente der Q-Bande ($M1 - M2$) erklärt werden.

Bei Metalloporphyrinen mit einer D_{4h} -Symmetrie sind die Richtungen des Übergangsdipolmoments x und y äquivalent. Die Aufspaltung der Molekülorbitale hängt von der elektronischen Struktur des Zentralmetalls ab, die im verschiedenen Maße mit dem

Tetrapyrrolysystem wechselwirken kann. Ein typisches Absorptionsspektrum eines Metalloporphyrins weist Absorptionsbanden bei 410 nm (Soretbande) und um ca. eine Größenordnung kleinere Q-Banden bei 560 (α -Bande) und 530 nm (β -Bande) auf. Im Vergleich dazu zeigen Metallionen mit einer $d^1 - d^5$ -Elektronenkonfiguration im Porphyrinsystem häufig ein rotverschobenes (bathochromes) und Metallionen mit einer $d^6 - d^9$ -Elektronenkonfiguration ein blauverschobenes (hypsochromes) Spektrum. Aus Berechnungen der Elektronendichte einer freien Porphyrinbase geht hervor, dass das HOMO a_{1u} keine Elektronendichte auf den Pyrrol-Stickstoffatomen enthält und somit seine energetische Lage auch bei einer Metallisierung nicht ändert (Abb. 17b). Das a_{2u} -Orbital und die e_g -Orbitale werden dagegen durch elektronische Abstoßung mit den Molekülorbitalen des Metalls energetisch angehoben, so dass die Q-Bande bei gleichbleibender Entartung der LUMOs an Intensität gewinnt.

Übergänge der beiden äußerst intensiven B-Banden liegen energetisch sehr dicht beieinander, so dass sie als eine Bande im UV-Vis-Spektrum erscheinen (Rimington et al., 1958; Serrano-Andrés et al., 1998). Die beiden elektronischen Übergänge B und Q werden von Schwingungsnebenbanden begleitet, die durch Vibrationen in der Ebene des Porphyringerüsts entstehen. Die vibronische Seitenbande der B-Bande hat eine so geringe Intensität, dass sie in der Regel nicht aufzulösen ist. Im Gegensatz dazu ist die vibronische Seitenbande der Q-Bande (Q (0,1)) detektierbar und befindet sich zur Q (0,0)-Bande hypsochrom verschoben.

Bei den Chlorinen und Bakteriochlorinen ist die Symmetrie aufgrund der Hydrierungen der C=C-Doppelbindung zu C-C-Einfachbindungen im D-Ring (Chla, Chlb und Chld) bzw. im B- und D-Ring (BChla, BChlb und BChlg) verringert und folglich liegen die LUMOs nicht mehr entartet vor. Die e_{gy} - und a_{1u} -Orbitale sind destabilisiert und somit energetisch angehoben (Abb. 18). Diese Änderung der Energieniveaus in den Molekülorbitalen führt zu unterschiedlichen Absorptionen. Mit zunehmender Hydrierung, d. h., in der Reihe Porphyrin, Chlorin und Bakteriochlorin, verstärkt sich im gleichen Lösungsmittel die Intensität der zunehmend bathochrom verschobenen Q_y -Bande. Die Soretbande erfährt dagegen eine Blauverschiebung (Scheer und Inhoffen, 1978).

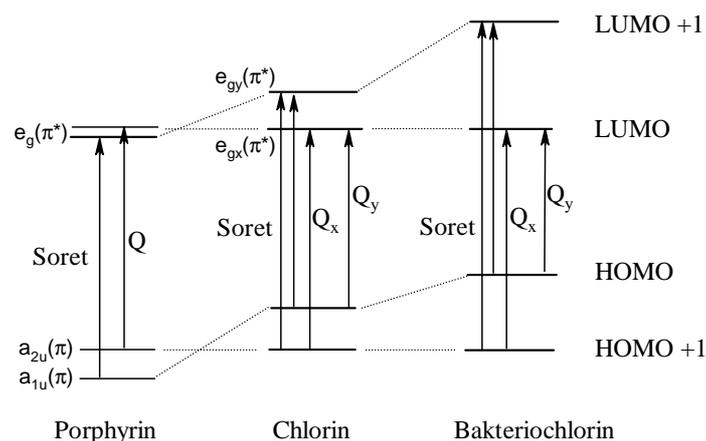


Abbildung 18: MO-Energiediagramm von Porphyrin, Chlorin und Bakteriochlorin und deren verschiedene elektronische Übergänge, adaptiert aus Blankenship, 2002.

3.1.2 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie

Die transiente Absorptionsspektroskopie dient zur Untersuchung des Verhaltens angeregter Molekülzustände und wurde in dieser Arbeit für die Aufnahme der Zinkchlorin-Triplettzustände, deren Quantenausbeutebestimmung und zur Ermittlung der Triplettlebensdauer angewendet.

Nach optischer Anregung gelangt ein Molekül nach dem Franck-Condon-Prinzip mit gleicher Geometrie des Grundzustands S_0 in angeregte Singulett-Zustände (S_1, S_2, S_3, \dots), wo es nach nur wenigen Pikosekunden ein Minimum auf der zum ersten Singulettzustand S_1 gehörigen Energiehyperfläche einnimmt (Abb. 19). Die Rückkehr zu S_0 kann von S_1 durch Übertragung der Anregungsenergie des Moleküls durch Stöße mit seiner Umgebung (*strahlungslose Desaktivierung, internal conversion, ic*) oder durch spontane Emission (Fluoreszenz, Kap. 3.1.3) erfolgen. Alternativ gelangt das System von dem angeregten S_1 -Zustand durch strahlungslose Spin-Umkehr (*intersystem crossing, isc*) in den Triplettzustand T_1 . Durch hohe Lichtintensitäten können dabei auch Populationen von elektronisch höher angeregten Zuständen erreicht werden, die eine weitere Anregung wie z. B. eine Triplett-Triplett-Absorption $T_1 \rightarrow T_2$ ermöglichen. Aus dem energetisch niedrigsten Triplettzustand T_1 erfolgt durch Phosphoreszenz oder erneutes *intersystem crossing* die Rückkehr in den Grundzustand. Alternativ können aus dem T_1 -Zustand Radikale oder andere Intermediate gebildet werden.

Aus dem S_1 -Zustand kann das Molekül auch Photoreaktionen (Umlagerungen, Isomerisierung von Bindungen, Photofragmentierungen, Cycloadditionen, etc.) eingehen, die in der vorliegenden Arbeit aber nicht von Bedeutung sind oder es findet ein Excitonen-Transfer (wie

in Lichtsammelkomplexen) statt. Sowohl aus dem S_1 - als auch T_1 -Zustand können Elektronen an geeignete Akzeptormoleküle abgegeben und damit ein Elektronentransfer generiert werden.

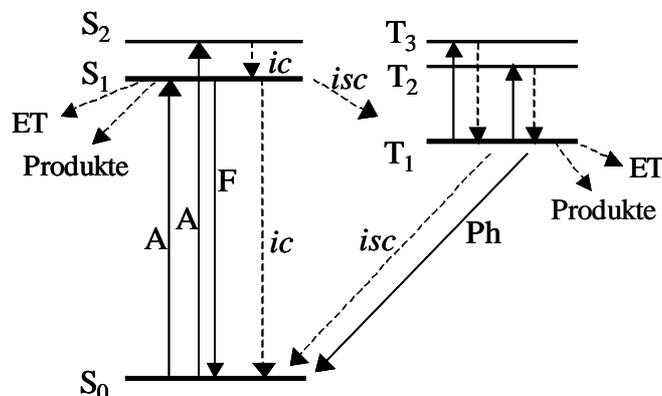


Abbildung 19: Energiediagramm von Elektronenübergängen in einem Molekül nach Absorption (A) aus dem Grundzustand (S_0) in den ersten angeregten Singulettzustand (S_1) oder in höher angeregte Singulettzustände (hier als S_2 dargestellt). Durch Fluoreszenz (F) oder *internal conversion* gelangt das System zurück in den Grundzustand oder geht durch *intersystem crossing* vom S_1 -Zustand in den Triplettzustand T_1 über. Aus diesem erfolgt die Rückkehr in den S_0 -Zustand durch erneutes *isc* oder Phosphoreszenz (Ph).

Das Messprinzip der transienten Absorptionsspektroskopie beruht auf der Blitzlichtphotolyse (Norrish und Porter, 1949; Porter, 1950). Die zu untersuchende Probe wird durch einen Lichtblitz zum Zeitpunkt t_0 in einen angeregten Zustand versetzt, aus dem z. B. der Triplettzustand und Folgeprodukte (Intermediate der Reaktion) resultieren, deren Absorptionsspektren durch eine zweite Anregung durch die spektroskopische Lichtquelle auf einen Empfänger abgebildet werden. Am Beispiel der Erzeugung des Triplettzustands einer Probe nach Lichtanregung wird zu einem definierten Zeitpunkt t die Transmission der Probe im angeregten Zustand (Tm_{Tr}) zusammen mit der Grundzustandstransmission (Tm_{Gr}) gemessen. Man erhält die sogenannten Triplett-Singulett-Absorptionsdifferenzspektren mit der Absorption ΔA :

$$\Delta A(\lambda, t) = -\log \frac{Tm_{Tr}}{Tm_{Gr}} = A_{Tr}(\lambda, t) - A_{Gr}(\lambda, t) \quad (3.1.2.1)$$

Wenn die Grundzustandsabsorption der Messprobe größer ist als die Triplett-Triplett-Absorption, so erhält man im Differenzspektrum eine negative Bande. Ist dagegen die Grundzustandsabsorption im Vergleich zur Triplett-Triplett-Absorption klein oder an der Detektionswellenlänge gar nicht vorhanden resultieren positive Banden.

Durch die Aufnahme der Absorption zu verschiedenen Zeiten nach dem Lichtblitz kann bei einer geeigneten Wellenlänge die Kinetik bestimmt werden. Aus den erhaltenen Abklingkurven lassen sich durch Anpassung eines kinetischen Modells Aussagen über die Zerfallsprozesse machen (Kavarnos und Turro, 1986; Turro, 1991).

Des Weiteren kann die zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie zur Untersuchung eines Elektronentransfers zwischen einem angeregten Zinkchlorin, das sowohl frei als auch peptidgebunden in einer Pufferlösung vorliegt, und einem Chinon als Akzeptormolekül dienen, indem die daraus resultierenden Radikalzustände charakterisiert werden.

3.1.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz bezeichnet einen emissiven Übergang zwischen Zuständen gleicher Spinmultiplizität. Wegen der sehr schnellen strahlungslosen Desaktivierung von höher angeregten Singulettzuständen (S_2, S_3, \dots) in den S_1 -Zustand und der nachfolgenden schnellen Schwingungsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten Singulettzustands, tritt die Fluoreszenz in der Regel aus dem Schwingungsgrundzustand des angeregten S_1 -Zustands in den S_0 -Zustand auf (Regel von Kasha; Kasha, 1950). Neben der spontanen Emission kann die Fluoreszenzlöschung durch Prozesse wie:

- *internal conversion*,
- *intersystem crossing*,
- Übertragung der Anregungsenergie des Fluorophors auf Löschermoleküle oder
- Ladungstrennung und Elektronentransferreaktionen durch Anwesenheit von Akzeptormolekülen

erfolgen (Turro, 1991). Die Fluoreszenzlebensdauer τ_F ist ein Maß für die Zeit, die ein Molekül im Mittel im angeregten Zustand verweilt, ehe die Emission erfolgt und die angeregten Moleküle wieder in den Grundzustand übergehen. Befinden sich N_0 Moleküle im angeregten Zustand, so ist die Zahl N an Molekülen, die pro Zeiteinheit durch Fluoreszenz in

den Grundzustand übergehen, gegeben durch:
$$-\frac{dN}{dt} = k_F \cdot N_0 \quad (3.1.3.1)$$

Nach Integration ergibt sich somit
$$N(t) = N_0 \cdot \exp(-k_F \cdot t) \quad (3.1.3.2)$$

Die Konstante k_F ist die Übergangsrate und deren Kehrwert die Fluoreszenzlebensdauer:
$$\tau_F = 1/k_F .$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F bezeichnet den Anteil an angeregten Molekülen im S_1 -Zustand, der durch Emission in den Grundzustand S_0 zurückkehrt und gilt damit als Maß für die Wirksamkeit des Emissionsprozesses. Der Begriff der Fluoreszenzquantenausbeute wird auch häufig als Verhältnis der Anzahl emittierter Photonen zur Anzahl der absorbierten Photonen definiert (Valeur, 2002). Die Fluoreszenzquantenausbeute ist in der Regel proportional zur Fluoreszenzlebensdauer. Kleine Werte für die Quantenausbeute und eine kurze Lebensdauer können auf schnelle strahlungslose Prozesse zurückgeführt werden. Hohe Temperaturen verstärken die Schwingungs- und Rotationsvorgänge im Molekül, was zu schnelleren strahlungslosen Prozessen führt und infolgedessen zu einer kürzeren Fluoreszenzlebensdauer. Des Weiteren erhöht sich mit ansteigender Temperatur die Anzahl der Kollisionen (Molekül-Molekül und Molekül-Lösungsmittel) aufgrund schnellerer molekularer Bewegungen, woraus eine schnellere Fluoreszenzlöschung resultiert (Cantor und Schimmel, 1980). Eine hohe Fluorophorkonzentration führt ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl an Kollisionen und damit zu einer schnelleren Fluoreszenzlöschung. Eine hohe Viskosität des Lösungsmittels kann aufgrund der Einschränkungen der molekularen Bewegung des Fluorophors dagegen die Lebensdauer und die Quantenausbeute der Fluoreszenz erhöhen. Auch starre Moleküle führen zu einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute, da sie in ihren Schwingungs- und Rotationsprozessen eingeschränkt sind und somit ihre Energie langsamer abgeben können. Bei der Bildung von Grundzustandskomplexen oder Dimeren ist die Fluoreszenzquantenausbeute nicht proportional zur Fluoreszenzlebensdauer. In diesen Fällen ist die Quantenausbeute sehr klein, während die Lebensdauer der Fluoreszenz die gleiche wie vor der Komplex- bzw. Dimerbildung sein kann (Valeur, 2002).

Fluoreszenzbanden sind in Flüssigkeiten gegenüber den Absorptionsbanden bathochrom verschoben. Das Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum überschneiden sich nach Normierung beim sogenannten 0-0-Übergang zwischen dem Grundzustand S_0 und dem schwingungsfreien ersten angeregten Zustand S_1 . Der Abstand zwischen dem Absorptions- und Fluoreszenzmaximum, der als Stokes-Verschiebung bezeichnet wird, hängt vom Unterschied der Gleichgewichtsgeometrie des S_0 - und des S_1 -Zustands ab: Je geringer der Unterschied ist, desto kleiner ist die Stokes-Verschiebung. Aufgrund des Franck-Condon-Prinzips, dessen Berechnungen auf einer schnelleren Elektronenbewegung im Vergleich zur Kernbewegung beruhen und den damit sich nicht ändernden Kernabständen während des Elektronensprungs, gibt es eine gleichbleibende Intensitätsverteilung zwischen Absorption und Fluoreszenz. Diese gleichbleibende Intensitätsverteilung und die vergleichbar großen Abstände der

Schwingungsniveaus des S_1 -Zustands sind darauf zurückzuführen, dass das Spektrum der Fluoreszenz häufig das charakteristische „Spiegelbild“ zu dem der Absorption zeigt.

Neben dem klassischen Emissionsspektrum bezeichnet man die Aufnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bei konstanter Emissionswellenlänge als Anregungsspektrum.

3.1.3.1 Fluoreszenz von Proteinen

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin zeigen eine Fluoreszenz. Dabei überwiegt in Proteinen die Fluoreszenz von Tryptophan gegenüber der von Phenylalanin und Tyrosin, da sowohl der Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm mit $\epsilon_{280} = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ im Vergleich zu dem von Tyrosin ($\epsilon_{280} \approx 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Phenylalanin ($\epsilon_{280} \approx 1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) als auch die Fluoreszenzquantenausbeute größer ist (Creighton, 1989 und 1993). Tryptophan besitzt in wässrigem Medium ($\lambda_{\text{em}} \approx 350$ nm) gegenüber einer apolaren Umgebung ($\lambda_{\text{em}} \approx 340$ nm) eine rotverschobene Fluoreszenz (Galla, 1988).

3.1.3.2 Fluoreszenz von Pigmenten

Die Fluoreszenz von Pigmenten kann z. B. durch Lichtanregung in der Soretbande und Beobachtung der Emission im Wellenlängenbereich der Q_y -Bande untersucht werden. Bei einer Dimerbildung oder Aggregation, wie sie beim Lösen von hydrophoben Pigmenten in wässrigem Milieu stattfindet, wird ein Teil der einfallenden Strahlung absorbiert. Dadurch wird die Konzentration und Intensität des monomeren Fluorophors verringert oder ist nicht mehr detektierbar. Die Lage der Fluoreszenzbande bleibt dabei allerdings unverändert, während eine Zusammenlagerung von Molekülen zu Dimeren oder Oligomeren im Absorptionsspektrum häufig zu einer bathochromen Verschiebung führt.

3.1.4 Zirkulardichroismus

Zirkulardichroismus (*circular dichroism*, CD) kann nur an optisch aktiven Systemen beobachtet werden, da in diesem Fall die Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht verschieden ist (Cotton-Effekt). Die Definition des Zirkulardichroismus ist folgende: Nach dem Durchgang des linear polarisierten Lichts durch die optisch aktive Probe liegen zwei zirkular polarisierte Komponenten (links und rechts polarisiert) vor, deren

jeweilige Vektoren der elektrischen Feldstärke verschieden sind (Cantor und Schimmel, 1980). Die Summe der beiden unterschiedlich polarisierten Wellen ergibt elliptisch polarisiertes Licht, da die Amplituden der Wellen verschieden sind. Damit ist der Zirkulardichroismus äquivalent zur Elliptizität (θ). Der Unterschied der Extinktionskoeffizienten der links- (L) und rechtsdrehenden (R) Komponenten, ε_L und ε_R , mit $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ ist die eigentliche Messgröße, wobei in der angewandten CD-Spektroskopie die Elliptizität angegeben wird. Die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge des Lichts ergibt somit das CD-Spektrum. Es hat die Form einer Absorptionsbande, wobei ein positiver bzw. negativer Zirkulardichroismus unterschieden wird, je nachdem ob die rechts oder links zirkular polarisierte Komponente stärker absorbiert wird.

Der Zirkulardichroismus wurde in dieser Arbeit zum einen zur Bestimmung der Sekundärstruktur einer Polypeptidkette und zum anderen zur Untersuchung der peptidgebundenen Pigmente eingesetzt.

3.1.4.1 Zirkulardichroismus von Peptiden

Die Abbildung 20 zeigt die typischen CD-Spektren einer α -Helix, eines β -Faltblatts und eines Peptids, das nur eine "zufällige" Struktur aufweist, die keinem Sekundärstrukturelement zugeordnet werden kann (*random coil*). Das Spektrum einer α -Helix zeigt einen parallelen und senkrecht polarisierten $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 208 und 192 nm sowie einen $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 222 nm.

Für die Bestimmung der Elliptizität der in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurde folgende Formel verwendet:

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{(\lambda)obsd.}}{10 \cdot d \cdot c \cdot n} \quad \left(\frac{mdeg}{cm \cdot M} \right) \quad (\text{Maglio et al., 2003}) \quad (3.1.4.1)$$

Für $\theta_{(\lambda)obsd.}$ wird die gemessene Elliptizität aus dem entsprechenden Datensatz bei der Wellenlänge von 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang) entnommen und in die Gleichung 3.1.4.1 eingesetzt. Die Parameter d , c und n bezeichnen in dieser Reihenfolge die Schichtdicke in cm, die Konzentration in mol/l und die Anzahl der Aminosäuren im Peptid. Als Referenzwert für einen 100 % Anteil an α -Helix gilt $[\theta]_{222} = -32000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ (Pace et al., 1989).

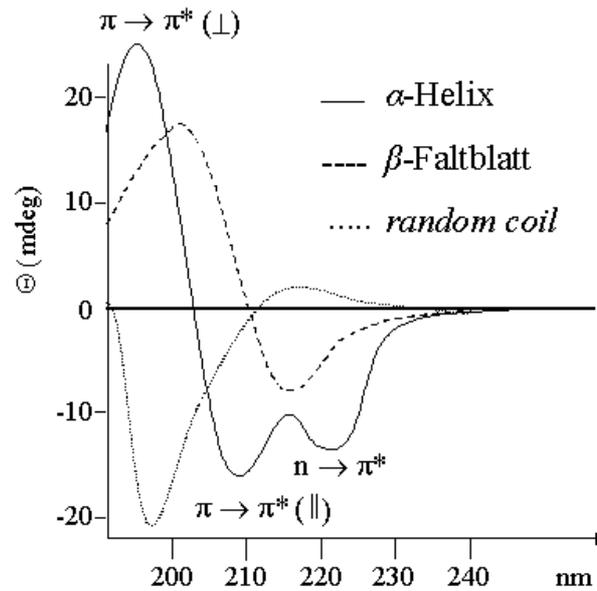


Abbildung 20: CD-Spektren einer α -helikalen Struktur, eines β -Faltblatts und einer vom Zufall bestimmten Knäuelkonformation (*random coil*), adaptiert aus Stryer, 1999.

Anhand des Quotienten R aus der Elliptizität bei 222 nm und der bei 208 nm ($R = \frac{\theta_{222}}{\theta_{208}}$) kann zwischen einer $\alpha(3.6_{13})$ -Helix und einer 3_{10} -Helix unterschieden werden. Wenn der Parameter $R \geq 1$ beträgt, liegt eine α -Helix vor; bei $R \approx 0,4$ existiert eine 3_{10} -Helix (Tanaka, 2006).

3.1.4.2 Zirkulardichroismus von Pigmenten

Pigmente ergeben charakteristische CD-Signale im sichtbaren bis nahen Infrarot-Bereich (Houssier und Sauer, 1969; Parkes-Loach et al., 1988; Sherman, 1969). Der Zirkulardichroismus gibt Aufschlüsse über die Stereochemie der Pigmente. Epimere Chlorine, die ein gleiches Absorptionsspektrum aufweisen, können anhand ihres unterschiedlichen Zirkulardichroismus unterschieden werden (Weiss, 1978). Auch beeinflusst die axiale Koordination von Kofaktoren deren Zirkulardichroismus. Demzufolge kann eine Wechselwirkung der Pigmente (wie (Bakterio)Chlorine oder Carotinoide) mit Peptiden anhand eines sich ändernden CD-Spektrums identifiziert werden (Clayton und Clayton, 1981; Gregory et al., 1980; Sauer und Austin, 1978; Zurdo et al., 1995). Dimere Chromophore, wie z. B. das Bakteriochlorophylldimer im Lichtsammelkomplex photosynthetischer Bakterien, zeigen im nahen Infrarot-Bereich aufgrund starker excitonischer Kopplung ein symmetrisch aufgespaltetes CD-Signal (positiv und negativ), dessen Nulldurchgang bei 850 nm dem Absorptionsmaximum entspricht (Cantor und Schimmel, 1980; Clayton und Clayton, 1981;

Cogdell und Scheer, 1985). Von achiralen Pigmenten ist bekannt, dass durch die Peptidbindung erst eine Chiralität entsteht und die dichroistische Aktivität dadurch erst generiert wird (Blauer et al., 1970).

3.1.5 Resonanz-Raman-Spektroskopie

Bei der Raman-Spektroskopie handelt sich um eine nichtresonante Wechselwirkung zwischen Licht und Materie. Molekülschwingungen oder -rotationen können indirekt als Streustrahlung in einem Ramanspektrum gemessen werden. Der Ramaneffekt wurde 1923 von Smekal theoretisch vorausgesagt und fünf Jahre später von Raman, einige Monate später auch von Landsberg und Mandelstam experimentell nachgewiesen (Hesse et al., 1995; Herzberg, 1945). Die Frequenzen der Ramanlinien oder -banden können größer oder kleiner sein als die Anregungsfrequenz ν_0 (Rayleigh-Linie). Charakteristisch für ein Molekül sind die Differenzen der Ramanfrequenzen von der Anregungsfrequenz. Die Methode des Ramaneffektes ist dabei folgende: Bei Wechselwirkung von eingestrahnten Photonen mit den Molekülen der durchstrahlten Substanz tritt entweder elastische Streuung (Rayleigh-Streuung) auf oder ein Teil der Lichtenergie wird zur Erhöhung der Schwingungsenergie des Moleküls aufgenommen, d. h. das Streulicht ist energieärmer (Stokes-Linien). Trifft der Photonenstrahl dagegen auf ein Molekül im angeregten Schwingungszustand, so tritt bei gleicher Wechselwirkung energiereicheres Licht aus (Anti-Stokes-Linien), (Abb. 21a). Aus der Frequenzverschiebung des eingestrahnten Lichts ergeben sich direkt die Frequenzen der Molekülschwingungen. Für die Infrarot-Spektroskopie ist während der Schwingung eine Änderung des Dipolmomentes erforderlich. Im Gegensatz dazu muss sich für das Auftreten des Ramaneffektes die Polarisierbarkeit des Moleküls während der Schwingung ändern. Die Polarisierbarkeit ist definiert als ein Maß für die Deformierbarkeit der Elektronenwolke des Atoms oder Moleküls.

Liegt die Frequenz des eingestrahnten Lichts im Bereich einer Absorptionsbande der untersuchten Probe, so treten im Streulicht ebenfalls Ramanbanden auf. Man spricht in diesem Fall von der Resonanz-Raman-Spektroskopie, die den Vorteil einer um einige Größenordnungen verstärkten Streuintensität bietet. Nichtresonante Streubanden erscheinen wegen der fehlenden Verstärkung durch die Anregung in der gewünschten Absorptionsbande lediglich im Untergrund des resonanten Spektrums. Diese Technik bietet die Möglichkeit, spezifisch die Konformation und die Wechselwirkung von Metalloproteinen oder anderen

Chromophoren mit Liganden zu untersuchen. Die Ramanstreuung nach Anregung im Bereich der Absorptionsbande eines Chromophors ist eine direkte Emission im Zeitbereich von 10^{-11} s. Wenn das Molekül nach Anregung durch Schwingungsrelaxation allerdings für eine längere Zeit im angeregten elektronischen Zustand verbleibt ($\sim 10^{-8}$ s), dann erfolgt die Rückkehr in den Grundzustand durch Fluoreszenz. Diese erschwert die Aufnahme eines Ramanspektrums erheblich (Galla, 1988).

Die Resonanz-Raman-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit zur Identifizierung der axialen Koordination des Hämin-Kofaktors eingesetzt. Somit werden nachfolgend speziell die Resonanz-Raman-Spektroskopie an Häm-Proteinen erläutert und charakteristische Banden vorgestellt.

Resonanz-Raman-Spektren von FePPIX-Proteinen

Aufgrund der D_{4h} -Symmetrie lassen sich für Metalloporphyrine die Symmetriegruppen A_{1g} , A_{2g} , B_{1g} und B_{2g} zuordnen. Bei Resonanzverstärkung durch elektronische Anregung im Soret-Übergang sind vor allem die ν_{2-} , ν_{3-} und ν_{4-} -Banden aus der totalsymmetrischen A_{1g} -Symmetriegruppe und die ν_{10} -Bande aus der B_{1g} -Symmetriegruppe zu beobachten. Diese Banden stellen die sogenannte Marker-Bereich-Region in dem Wellenzahlbereich von 1300 bis 1700 cm^{-1} im Resonanz-Raman-Spektrum eines FePPIX-Proteins dar und sind von besonderem Interesse, da sie Aussagen über den Oxidations-, Spin- und Koordinationszustand des zentralen Eisenions zulassen (Spiro und Streckas, 1974; Spiro, 1975). In diesem Bereich sind vorwiegend die C–C und C–N-Streckschwingungen zu beobachten, die von der Änderung des Fe–N(Pyrrrol)-Abstands, der sogenannten „core size“-Änderung, und seiner Elektronendichte in den π - und π^* -Orbitalen abhängig sind. Der Oxidationszustand des Eisens kann hauptsächlich anhand der intensivsten Bande, der ν_4 -Bande, bestimmt werden (Abb. 21b). Die Bezeichnung der Banden beruht auf einer Untersuchung des Resonanz-Raman-Spektrums von Nickel-Octaethylporphyrin (Abe et al., 1978). Die ν_4 -Bande der oxidierten Form von Cytochrom *c* liegt bei einer Wellenzahl von 1373 cm^{-1} . In der reduzierten Form führt die erhöhte Elektronendichte zu einer partiellen Besetzung der π^* -Orbitale des Porphyrins und damit zur Schwächung der C–C- und C–N-Bindungen. Es resultiert eine Frequenzverschiebung der ν_4 -Bande zu einer kleineren Wellenzahl von $\nu_4 = 1361\text{ cm}^{-1}$.

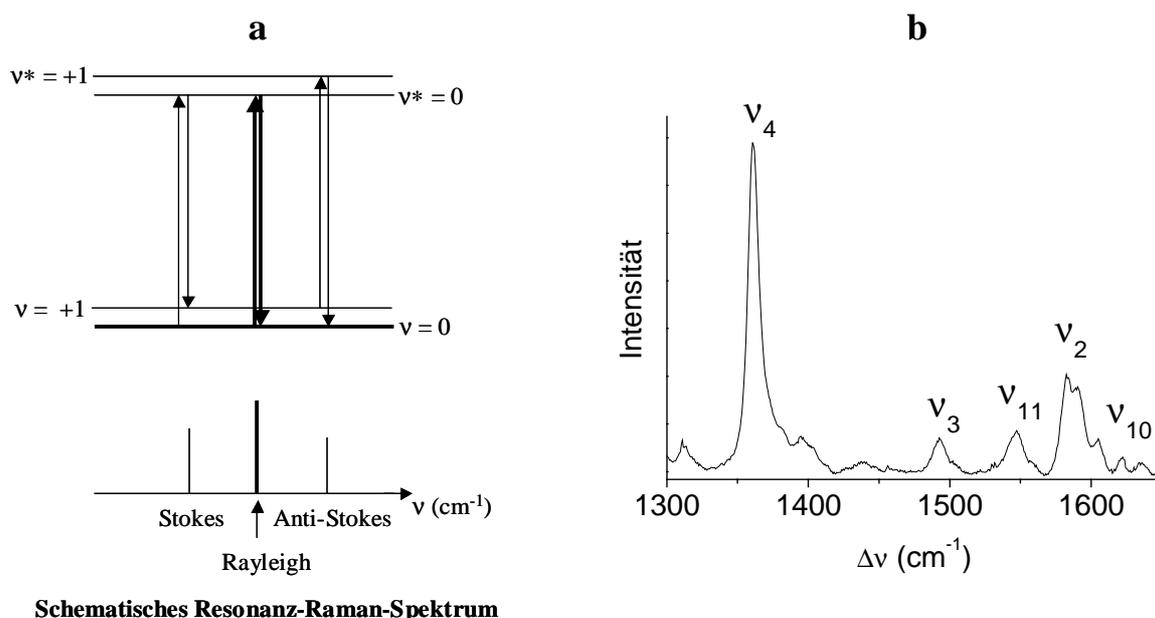


Abbildung 21: (a) Schematisches Resonanz-Raman Spektrum mit Rayleigh, Stokes- und Anti-Stokes-Linien. (b) Resonanz-Raman-Spektrum mit Markerbanden von reduziertem Cytochrom *c* in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7), $T = 77$ K, Anregungswellenlänge = 407 nm.

Die Lage der weiteren Marker-Banden ν_3 , ν_{11} , ν_2 , ν_{10} der FePPIX-Proteine lassen Aussagen über den Spin- und Koordinationszustand des Eisens zu. Zwei starke axiale Liganden ergeben einen sechsfach koordinierten *low spin*-Zustand des Porphyrins, der durch einen kleinen Fe-N-Abstand gekennzeichnet ist. Die ν_3 -Bande befindet sich in diesem Fall bei Wellenzahlen ≥ 1500 cm^{-1} . Der Fe-N-Abstand vergrößert sich bei zwei schwach gebundenen Liganden und es liegt ein sechsfach koordinierter *high spin*-Zustand vor, der auch bei einer Bindung von nur einem axialen Liganden existiert. Die ν_3 -Bande dieser Spezies liegt bei Wellenzahlen < 1500 cm^{-1} (Rojas et al., 1997).

3.1.6 Elektronen-Paramagnetische-Resonanz-Spektroskopie

Unter der EPR-Spektroskopie, die auch häufig als Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie bezeichnet wird, versteht man die Mikrowellen-induzierten Übergänge zwischen quantisierten Elektronenspinneiveaus in einem statischen Magnetfeld B_0 . Für die vorliegende Arbeit ist die Methode der EPR sowohl für die Messung des paramagnetischen Fe(III) in den FePPIX-*maquettes*, für die lichtinduzierten Triplettmessungen an den Zinkchlorinen als auch für die Detektion von Radikalen, die durch lichtinduzierten

Elektronentransfer zwischen Zinkchlorinen und einem Akzeptormolekül erzeugt werden, von Interesse.

Es wurden sowohl Messungen mit Mikrowellenfrequenzen im X-Band- (9 – 10 GHz) als auch im Q-Band-Bereich (35 GHz) aufgenommen.

Im Folgenden soll eine kurze Einführung in die physikalischen Grundlagen dieser Spektroskopieart gegeben werden. Eine ausführlichere Beschreibung zur EPR ist in zahlreichen Lehrbüchern und Monographien nachzulesen (Hoff, 1989; Atherton, 1993; Weil et al., 1994; Lowe, 1995; Poole, 1997; Eaton et al., 1998; Zech, 1998; Schweiger, 1991; Schweiger und Jeschke, 2001; u.a.).

Das EPR-Spektrum einer paramagnetischen Verbindung in einem äußeren Magnetfeld lässt sich durch das Konzept des Spin-Hamilton-Operators (SHO) beschreiben (Stevens, 1952; Abragam und Bleaney, 1970), mit dessen Hilfe man die Energieniveaus des Spinsystems und damit auch die EPR-Übergänge berechnen kann. In dem SHO sind nur die Terme des Hamiltonians von Interesse, die sich auf den Spin des Teilchens beziehen. Bei Betrachtung eines Systems aus einem Elektronenspin und einem Kernspin von $I = 1/2$ setzt sich der SHO aus der Elektron-Zeeman-, der Kern-Zeeman- und der Hyperfein-Wechselwirkung zusammen:

$$\mathcal{H} = \underbrace{g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \cdot \hat{S}}_{\mathcal{H}_{EZ}} + \underbrace{g_K \cdot \mu_K \cdot B_0 \cdot \hat{I}}_{\mathcal{H}_{KZ}} + \underbrace{\hat{S} \cdot \hat{A} \cdot \hat{I}}_{\mathcal{H}_{HFS}} \quad (3.1.6.1)$$

Die Wechselwirkungen im SHO werden im Nachfolgenden kurz erläutert.

Elektron-Zeeman-Aufspaltung

Der Elektron-Zeeman-Operator \mathcal{H}_{EZ} enthält die Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem äußeren Magnetfeld.

Bringt man ein Radikal mit einem Spin von $S = 1/2$ in ein zeitlich konstantes homogenes Magnetfeld B_0 , so stellt sich dieser in eine parallele, mit der magnetischen Spinquantenzahl $m_S = +1/2$ (α) oder in eine antiparallele Richtung $m_S = -1/2$ (β) zum Magnetfeld ein (Abb. 22).

Die potentielle Energie für die Aufspaltung der Energieniveaus kann vom klassischen Ausdruck für die Energie eines magnetischen Dipols in einem Magnetfeld abgeleitet werden.

Die Energien der beiden Spinzustände sind gegeben durch:

$$E_S = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \cdot m_S \quad \text{mit } \mu_B = \text{Bohrsche Magneton} \quad (3.1.6.2)$$

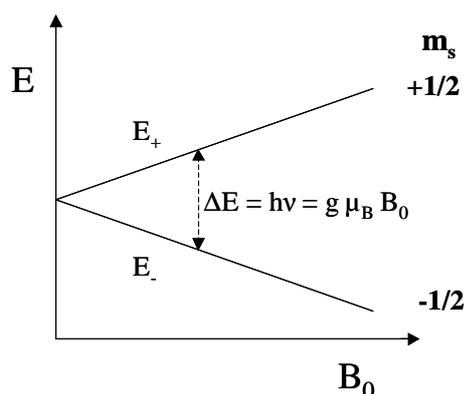


Abbildung 22: Elektron-Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus eines Elektrons mit $S = 1/2$ in einem statischen Magnetfeld B_0 .

Der Parameter g ist im Allgemeinen richtungsabhängig (anisotrop). Auch das Bahnmoment eines Elektrons (magnetisches Moment μ_L) trägt zur Elektron-Zeeman-Aufspaltung insbesondere in den Übergangsmetallkomplexen bei. Die Abweichung des g -Wertes von dem des freien Elektrons mit $g_e = 2,002319$ resultiert aus relativistischen Effekten und der Wechselwirkung der Elektronen mit dem eigenen Strahlungsfeld (Stone, 1963 und 1964).

Die Gleichung

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0. \quad (3.1.6.3)$$

gibt die energetische Aufspaltung $\Delta E = E_+ - E_-$ zwischen den beiden Energieniveaus an. Sie wird als Resonanzbeziehung bezeichnet und zeigt, dass die Differenz beider Energiezustände von der Stärke des äußeren Magnetfeldes abhängt. In der Praxis wird bei einer festen Mikrowellenfrequenz das Magnetfeld verändert und somit die Resonanzstelle bestimmt. Der Resonanzfall tritt ein, wenn die durch ein gegebenes Magnetfeld festgelegte Larmorfrequenz (Umlauffrequenz) mit der Frequenz der eingestrahlten Mikrowelle übereinstimmt. Die Resonanzfrequenz hängt dabei von der Umgebung des Elektronenspins ab. Der aus der EPR ermittelte richtungsabhängige g -Tensor ermöglicht Aussagen über die Symmetrie und die elektronische Struktur des paramagnetischen Zentrums.

Kern-Zeeman Aufspaltung

Die Kern-Zeeman Aufspaltung beruht auf der Wechselwirkung des Kerns mit dem äußeren Magnetfeld B_0 . Sie verursacht allerdings in erster Näherung im EPR-Spektrum keine Verschiebungen der Resonanzfrequenzen.

Hyperfeinaufspaltung

Der Term der Hyperfeinaufspaltung \mathcal{H}_{HFS} resultiert aus der Wechselwirkung des Elektronenspins mit den magnetischen Momenten der Atomkerne, die einen Spin von ungleich Null aufweisen. Allgemein ergibt die Wechselwirkung zwischen einer paramagnetischen Substanz mit dem Elektronenspin S und den Kernspins I von n äquivalenten Kernen ein EPR-Spektrum mit $(2nI + 1)$ Linien, da die Auswahlregeln $\Delta m_S = \pm 1$ und $\Delta m_I = 0$ gelten (Abb. 23).

Der Beitrag der Hyperfeinkopplung zur Gesamtenergie setzt sich nach Gleichung 3.1.6.4 aus einer isotropen Kopplung und einer anisotropen Dipolkopplung zusammen:

$$\mathcal{H}_{HFS} = \hat{S} \cdot \hat{A} \cdot \hat{I} = a \cdot \hat{S} \cdot \hat{I} + \hat{S} \cdot \hat{A}_D \cdot \hat{I} \quad (3.1.6.4)$$

Demzufolge kann der Hyperfeinkopplungstensor A in Gleichung 3.1.6.4 in die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante a und den dipolaren Hyperfeinkopplungstensor A_D aufgespalten werden.

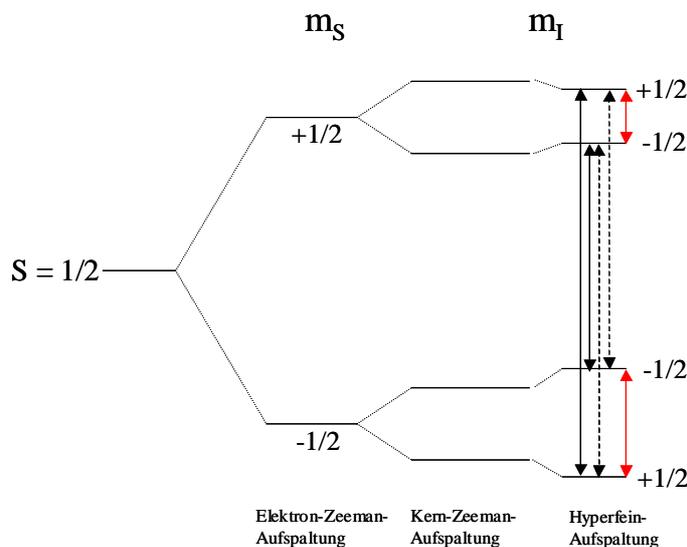


Abbildung 23: Hyperfeinaufspaltung aufgrund der Kopplung eines Kerns mit einem Spin von $I = 1/2$ und einem elektronischen Dublettspinzustand ($S = 1/2$) und Darstellung der EPR-erlaubten (durchgezogene schwarze Pfeile) und nach der Auswahlregel verbotenen Übergänge (gestrichelte schwarze Pfeile) sowie die NMR-Übergänge (rote Pfeile).

Die isotrope Kopplung, die sogenannte Fermi-Kontaktwechselwirkung, wird durch endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons am Kernort hervorgerufen. Der anisotrope Anteil der Hyperfeinkopplung kann als dipolare Wechselwirkung zwischen den magnetischen

Dipolen eines Elektrons und eines Kerns beschrieben werden und führt zu den Hauptwerten des g -Faktors, g_x , g_y und g_z , die abhängig von der Lage der Orbitale sind. Durch die Ermittlung der g -Tensorhauptwerte können damit detaillierte strukturelle Informationen zur Bindungssituation des Kofaktors erhalten werden.

3.1.6.1 EPR-Spektroskopie an gefrorenen Lösungen

In einer flüssigen Lösung existiert eine statistische Verteilung an Molekülorientierungen relativ zum äußeren Magnetfeld. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung werden in einer flüssigen Lösung alle richtungsabhängigen Wechselwirkungen herausgemittelt, die von der Orientierung des paramagnetischen Moleküls im Magnetfeld abhängen. Als Ergebnis wird ein isotroper g -Faktor erhalten. Im Gegensatz dazu liegt in einer gefrorenen Lösung eine Überlagerung der verschiedenen Resonanzpositionen vor. Diese sogenannten Pulverspektren spiegeln die Verteilung der Molekülorientierungen wieder.

In *continuous wave* (*cw*)-EPR-Spektren von Eisen-Porphyrinen ist häufig eine g -Anisotropie mit Hauptwerten von $g_{\parallel} = 2$ und $g_{\perp} = 6$ zu beobachten. Dies beruht auf dem *high spin*-Zustand des Fe^{3+} -Ions mit einem Spin von $S = 5/2$. Bei einem Spin von $S > 1/2$ liegt eine Spin-Spin-Wechselwirkung vor, die zur Nullfeldaufspaltung führt. Aus der Nullfeldaufspaltung resultieren die sogenannten Kramer-Dubletts. Wenn die Nullfeldaufspaltung größer als die Zeeman-Aufspaltung ist, kann der sogenannte effektive g -Wert (g_{eff}) eingeführt werden (Abb. 24a). Die Lage des g -Wertes bezüglich der Magnetfeldrichtung ergibt sich aus den Hauptwerten des g -Tensors g_x , g_y und g_z und den Winkeln α , β , γ :

$$g_{\text{eff}} = \left(g_x^2 \cdot \cos^2 \alpha + g_y^2 \cdot \cos^2 \beta + g_z^2 \cdot \cos^2 \gamma \right)^{1/2} \quad (\text{Atherton, 1973}) \quad (3.1.6.5)$$

Die ermittelten g -Tensorwerte geben allerdings keine Auskunft über die Richtung des angelegten Magnetfeldes im Bezug auf das zu untersuchende System. Die Zuordnung der g -Tensoren bezüglich der Richtung des Magnetfeldes (Abb. 24b) kann nur über Einkristallmessungen erhalten werden. Da für das in dieser Arbeit vorliegende *de novo* synthetisierte Häm-in-*maquette* keine Einkristalle vorliegen, kann die Zuordnung der g -Tensoren auch näherungsweise durch den Vergleich mit bekannten g -Tensoren aus kristallisierten, natürlichen Häm-in-Komplexen erfolgen.

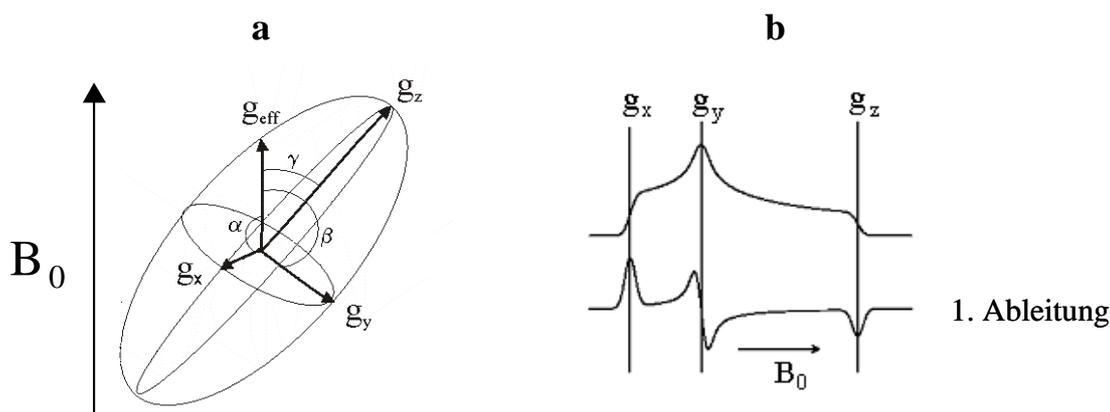


Abbildung 24: (a) Veranschaulichung eines Ellipsoids mit den g -Tensor-Ausrichtungen g_x , g_y , g_z im Magnetfeld B_0 . Der effektive g -Wert (g_{eff}) ergibt sich aus den Hauptwerten der drei g -Tensoren für eine beliebige Richtung und den Winkeln α , β und γ . (b) cw -EPR-Spektrum eines *low spin*-Fe(III)-Komplexes und deren erste Ableitung (adaptiert aus Fahnenschmidt, 2000). cw -EPR-Spektren werden aufgrund ihrer Aufnahmetechnik meist in der ersten Ableitung dargestellt.

3.1.6.2 EPR-Spektroskopie an Triplettzuständen

Diamagnetische und lichtabsorbierende Verbindungen können nach optischer Anregung über den S_1 -Zustand in den T_1 -Zustand gelangen (s. Abb. 19) und somit mit der EPR-Methode detektiert werden. In diesem Triplettzustand liegen zwei parallel ausgerichtete Elektronenspins vor ($S = 1$). Aufgrund der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den magnetischen Momenten der Elektronen kommt es auch ohne äußeres Magnetfeld zur sogenannten Nullfeldaufspaltung, die mit dem nachfolgenden Spin-Hamiltonian-Term beschrieben wird:

$$\mathcal{H}_{ZFS} = D \left(\hat{S}_z^2 - \frac{1}{3} \hat{S}^2 \right) + E \left(\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2 \right) \quad (3.1.6.6)$$

Weil der isotrope Anteil Null ist, können aus der Aufspaltung des T_1 -Zustands in die T_x , T_y und T_z Unterzustände die zwei Nullfeldparameter $|D|$ und $|E|$ bestimmt und darüber Aussagen über die Elektronenspinverteilung in den Triplettwellenfunktionen gemacht werden (Abb. 25a). Der Parameter $|D|$ gilt als Maß für die Ausdehnung der elektronischen Wellenfunktion des Triplettzustands und der Parameter $|E|$ gibt die Verzerrung des Systems ausgehend von einer tetragonalen Symmetrie an (Carrington und McLachlan, 1969).

Bei den transienten EPR-Messungen wird das Triplett-Signal bei kontinuierlicher Mikrowellenbestrahlung in einem bestimmten Zeitbereich (Integrationsfenster) nach dem Laserpuls und einer Verzögerungszeit (*delay time after flash*, DAF) in Abhängigkeit vom Feld gemessen (*continuous wave*-Technik), (Abb. 25b).

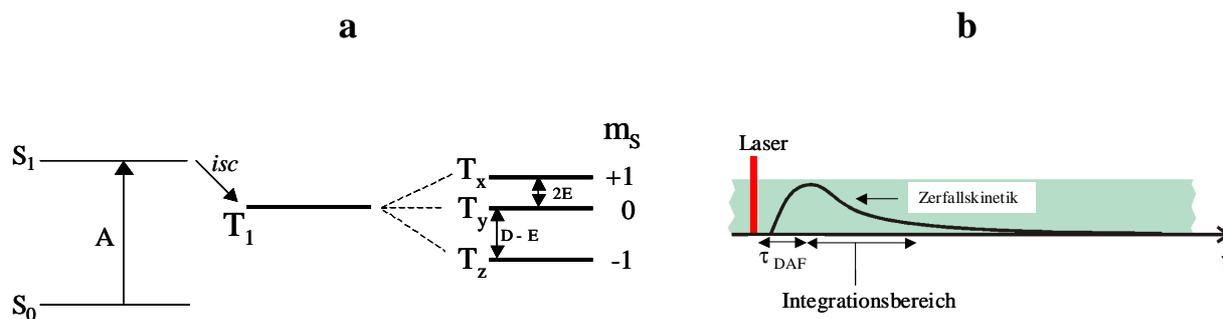


Abbildung 25:(a) Der Tripletzustand T_1 mit einem Spin von $S = 1$ spaltet infolge der Nullfeldaufspaltung in die Tripletunterzustände T_x , T_y und T_z auf. Die Unterschiede der Energieniveaus T_x , T_y und T_z sind in der Abbildung vergrößert dargestellt. (b) Messprinzip der transienten EPR-Spektroskopie.

Nach Anlegen eines Magnetfeldes spalten die Energieniveaus aufgrund der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung abhängig von der relativen Lage des Moleküls zur B_z -Achse, die als Quantisierungsrichtung gilt, erneut auf. Die nachfolgende Abbildung 26 zeigt die magnetfeldabhängigen EPR-Übergänge im Tripletzustand mit einem Spin von $S = 1$.

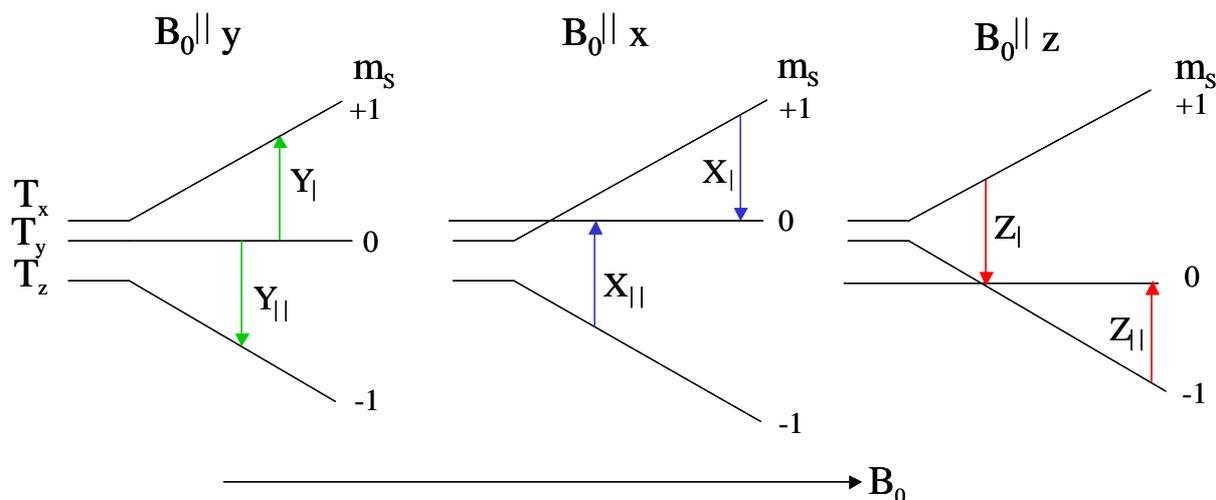


Abbildung 26: Schematische Darstellung der feldabhängigen EPR-Übergänge in einem Tripletssystem mit einem Spin von $S = 1$; $D, E > 0$. Die Lage der Resonanzübergänge ist abhängig von der relativen Lage der Molekülhauptachsen (x, y, z) zum äußeren Magnetfeld B_0 .

Die unterschiedliche Besetzung der drei Unterzustände des T_1 -Zustands, die durch den *intersystem crossing*-Prozess bestimmt wird, ist die Ursache für die Beobachtung, dass im zeitaufgelösten EPR-Spektrum bei kontinuierlicher Mikrowellenstrahlung absorptive oder emissive Linien erscheinen. Aus den Übergängen können die Nullfeldparameter $|D|$ und $|E|$ erhalten werden. Die Abbildung 27 zeigt ein solches Spektrum von Zink-Pheophorbid *a*, das aus den in Abbildung 26 gezeigten EPR-Übergängen nach Lichtanregung resultiert. Die erste

Resonanzfrequenz im Niederfeld ist der emissive Z_{\perp} -Übergang. Mit zunehmendem Magnetfeld folgt der absorptive X_{\parallel} -Übergang. Die weiteren Übergänge und Darstellungen im EPR-Spektrum erfolgen entsprechend. Gemäß der Auswahlregel $\Delta m_s = \pm 1$ setzt sich das Triplettsspektrum somit aus der Summe der Übergänge $m_s = 0 \rightarrow +1$ und $m_s = 0 \rightarrow -1$ zusammen.

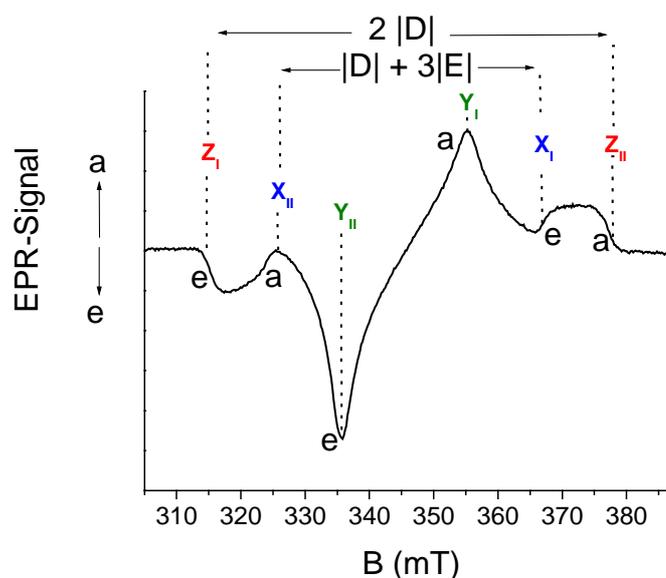


Abbildung 27: Transientes EPR-Spektrum (X-Band, 9,5 GHz) von Zink-Pheophorbid *a* in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,3 und 60 % Glycerin). Die Probe wurde bei 590 nm angeregt und die Messtemperatur war 80 K. Im Spektrum sind die absorptiven mit 'a' und die emissiven Übergänge mit 'e' gekennzeichnet. Die Größen für die $|D|$ - und $|E|$ -Beiträge sind im Spektrum angedeutet.

3.1.6.3 ESEEM-Spektroskopie

Die *Electron Spin Echo Envelope Modulation* (ESEEM)-EPR-Spektroskopie ist eine auf der Puls-EPR basierende Methode, bei der Hyperfeinwechselwirkungen zwischen Elektronenspins und nahe liegenden Kernspins beobachtet werden können. Rowan, Hahn und Mims beobachteten im Jahre 1965, dass das Hahn-Echo nicht exponentiell mit wachsenden Pulsabstand τ zerfällt, sondern dem Zerfall eine Modulation der Echointensität überlagert ist, deren Frequenzen denen der Kernspinübergänge der gekoppelten Kernspins entsprechen (Rowan et al., 1965; Mims, 1972).

Die nachfolgende Abbildung 28 zeigt zum einen ein Zwei-Puls ESEEM-Spektrum (90° und 180° Pulse) von Zinkchlorin mit den zu beobachteten Stickstoff- und Wasserstoffmodulationen und stellt zum anderen das Messprinzip einer Drei-Puls-ESEEM-Messung vor, das zur Anwendung der in Kapitel 5.2.2.4 gezeigten 2D-ESEEM-Spektroskopie diene. Bei einer Drei-Puls-Messung wird die Modulation des Zerfalls nicht nur als Funktion von τ (wie

beim Zwei-Puls-Verfahren), sondern auch als Funktion von t_1 beobachtet. ESEEM-Messungen erfolgen bei einem konstanten Magnetfeld. Das Spektrum eines Drei-Puls-Experiments kann zweidimensional als Funktion von t_1 und τ aufgetragen werden. Nach Umwandlung der Zeiten (t_1 und τ) durch Doppel-Fourier-Transformation in die Frequenzen ν_1 und ν_2 erhält man das typische 2D-ESEEM-Spektrum. Die Echointensitäten in Abhängigkeit der Frequenzen ν_1 und ν_2 resultieren aus den erlaubten und verbotenen EPR-Übergängen der Hyperfeinaufspaltung (Abb. 23).

Die ESEEM-Methode wurde in dieser Arbeit zur Überprüfung der axialen Koordination von peptidgebundenen Zinkchlorinen angewendet. Die Struktur des Zinkchlorins beinhaltet vier Stickstoffe im zyklischen Tetrapyrrolysystem und bei einer axialen Bindung kommt ein weiteres Stickstoffatom hinzu. Diese ^{14}N -Kerne mit einem Kernspin von $I = 1$ weisen ein elektrisches Quadrupolmoment auf, das mit dem elektrischen Feldgradienten am Kernort wechselwirkt. Im ESEEM-Spektrum werden somit zusätzliche Korrelationsfrequenzen erwartet, wenn eine axiale Bindung des Zinkchlorins vorliegt. Ohne axiale Bindung sind nur die Hyperfeinaufspaltungen, die aus den Stickstoffatomen des Tetrapyrrolysystems resultieren zu beobachten. Die Quadrupol-Wechselwirkung lässt sich mit den Parametern e^2qQ als Maß für die gesamte Quadrupol-Wechselwirkung und η als Geometrie-Parameter in Abhängigkeit von der Umgebung des Kernspins darstellen (De Groot et al., 1985; Hoff et al., 1985; Review: Dikanov und Tsvetkov, 1992).

Wenn als axiale Bindung des Zinkchlorins ein Stickstoffatom mit ^{15}N -Markierung vorliegt, das mit einem Kernspin von $I = 1/2$ keine Quadrupolaufspaltung aufweist, werden im ESEEM-Spektrum hauptsächlich die Signale der Hyperfeinaufspaltungen zu beobachten sein, die sich aus den ^{14}N -Kernen des Tetrapyrrolysystems ergeben. Das resultierende ESEEM-Spektrum ist in diesem Fall in erster Näherung vergleichbar mit dem Spektrum vom Zinkchlorin ohne axiale Stickstoffkoordination.

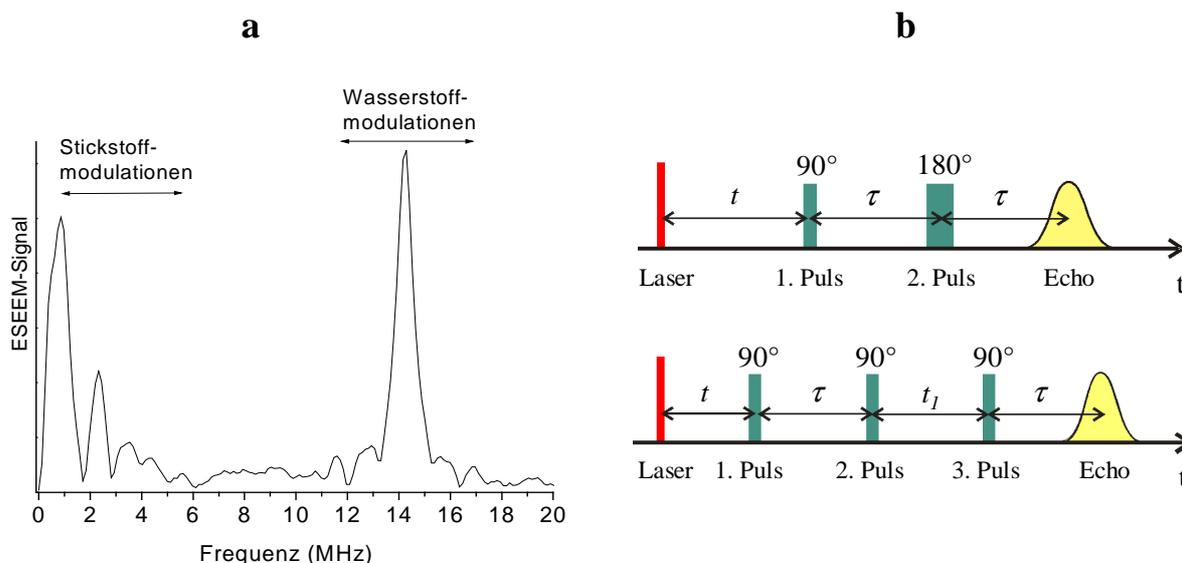


Abbildung 28: (a) Zwei-Puls-ESEEM-Spektrum von ^{14}N -Imidazol koordiniertem ZnPheida in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM KCl, pH 7,5 und 60 % Glycin; $B = 334$ mT; $\nu = 9,69$ GHz, $T = 5$ K, $\lambda_{\text{ex}} = 590$ nm; (b) Messprinzip einer Zwei-Puls- und Drei-Puls-ESEEM-Messung mit den Parametern $t =$ Zeit zwischen dem Laserblitz und dem ersten Puls (= DAF), $\tau =$ Zeit zwischen dem ersten und zweiten Puls und zwischen dem zweiten (Zwei-Puls-ESEEM) bzw. dritten Puls (Drei-Puls-ESEEM) und dem Echo-Signal, $t_1 =$ Zeit zwischen dem zweiten und dritten Puls.

3.1.7 NMR-Spektroskopie

Wie die EPR-Spektroskopie basiert die Kern-Magnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie auf einem magnetischen Resonanzphänomen; die physikalischen Grundlagen beider Methoden sind in der Regel die gleichen und sind detailliert in zahlreichen Lehrbüchern nachzulesen (z. B. Günther, 1983; Hesse et al., 1995; Williams und Fleming, 1985). Während man sich allerdings in der EPR mit den magnetischen Momenten der Elektronen befasst, basiert die NMR auf den magnetischen Momenten der Kerne.

Ein wesentlicher Unterschied ist die größere Masse des beobachteten Teilchens. So ist ein Proton 1836mal schwerer als ein Elektron. Das magnetische Moment eines Kerns ist gegeben durch:

$$\mu = g_N \cdot \mu_B \cdot I \quad (3.1.7.1)$$

Die Proportionalitätskonstante beträgt $g_N = 5,5855$ für ein freies Proton. Da das magnetische Moment eines Elektrons ca. 660-mal größer als das eines Protons ist, werden in der NMR-Spektroskopie im Vergleich zur EPR-Spektroskopie niedrigere Frequenzen und stärkere Magnetfelder benötigt. Die verwendeten Frequenzen liegen im Radiowellen (MHz)-Bereich.

Für die NMR-Spektroskopie sind alle natürlich vorkommenden oder substituierten Isotope mit einem von Null verschiedenem Kernspin geeignet. Die Auswahlregeln sind $\Delta m_s = 0$ und

$\Delta m_I = \pm 1$. Da die magnetischen Momente der Kernspins in einem Molekül verschiedenen lokalen Magnetfeldern ausgesetzt sein können, die z. B. auf den unterschiedlichen Elektronendichten in der Umgebung der Kerne beruhen, liegt bei jedem Kern eine spezifische magnetische Umgebung vor. Die exakte Resonanzfrequenz hängt infolgedessen von der Kernumgebung ab. Das am Kernort vorliegende effektive Magnetfeld (B_{eff}) beträgt:

$$B_{\text{eff}} = B_0 - \sigma B_0 \quad (3.1.7.2)$$

B_{eff} unterscheidet sich damit von dem angelegten Magnetfeld B_0 um das induzierte Magnetfeld (σB_0). Die dimensionslose Abschirmungskonstante σ geht in die Resonanzbedingung ein:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad (3.1.7.3)$$

Je stärker ein Kern durch Elektronen abgeschirmt wird, desto größer ist σ . Dadurch wird das effektive Magnetfeld kleiner und das angelegte Magnetfeld B_0 muss bei konstanter Frequenz größer sein, damit die Resonanz eintritt. Die chemischen Verschiebungen (δ) werden hauptsächlich durch die intramolekularen Faktoren des induktiven Effekts und der Anisotropie der chemischen Bindung verursacht. Wird die Elektronendichte durch einen induktiven Effekt eines benachbarten elektronegativen Atoms erniedrigt, liegt eine geringere Abschirmung des Kerns vor und die Resonanz kann bei einem niedrigeren Wert für das angelegte Feld erfolgen. Als Beispiel sind in olefinischen Doppelbindungen oder im Benzolring die Elektronen weitgehend in bestimmten Bereichen lokalisiert. Die sp^2 -Hybridisierung und die Anisotropie von C=C-Doppelbindungen führen zu chemischen Verschiebungen von $\delta = 4,5$ bis $6,5$ ppm. Im Benzolring wird zusätzlich bei Anlegen eines Magnetfeldes ein Ringstromeffekt durch kreiselnde Elektronen erzeugt, der das angelegte Feld oberhalb, unterhalb und im Innern des Benzolrings verstärkt. Durch die starke Abschirmung erfahren Protonen, die sich im Inneren eines ausgedehnten π -Systems befinden, eine Hochfeldverschiebung. Die außerhalb des Ringstroms befindlichen Protonen werden dagegen tieffeldverschoben.

Jedes Signal im NMR-Spektrum spaltet aufgrund der Kopplung zwischen magnetischen Kernen in einem Molekül, die nicht magnetisch äquivalent sind, auf. Als quantitatives Maß für die Größe der Aufspaltung wird die Kopplungskonstante J herangezogen. Die sogenannten *long-range* Kopplungen (4J und 5J) werden im eindimensionalen NMR-Spektrum aufgrund ihrer geringen Linienaufspaltung nur selten beobachtet. Die genannten Kopplungen über chemische Bindungen sind von sogenannten *through space*-Kopplungen (Wechselwirkung durch den Raum) zu unterscheiden. Eine Methode, um eine solche Kopplung indirekt zu detektieren, bietet der Kern-Overhauser-Effekt (*Nuclear Overhauser*

Effect, NOE). Dieser Effekt beruht darauf, dass durch Einstrahlung in den Frequenzbereich eines Kerns ein Eingriff in die Relaxation räumlich benachbarter Kerne erfolgt, der eine Intensitätsänderung in den Signalen der Nachbarkerne zur Folge hat. Die Kreuzsignale des 2D-Spektrums, die die Konnektivität durch den Raum angeben, lassen eine Aussage über die in der Lösung vorliegende Konformation zu. Der NOE ist zu r^{-6} (r = Abstand zweier Kerne) proportional. Bei Abständen von $>0,3$ nm ist kein NOE mehr zu beobachten.

NMR-Spektroskopie an Proteinen

Wesentliches Problem der Protonen-Resonanz an Proteinen ist die Auflösung und die Zuordnung einzelner Resonanzlinien. In Peptiden und Proteinen kommt es häufig zur Überlagerung der Linien vieler chemisch und magnetisch ähnlicher Gruppen und einzelne Linien sind wegen langer Rotationskorrelationszeiten (kurze Relaxationszeiten) stark verbreitert. Die Auflösung lässt sich zwar durch Verwendung höherer Frequenzen (> 500 MHz) verbessern, doch erlauben erst Verfahren der korrelierten zweidimensionalen NMR-Spektroskopie wie COSY (*Correlated Spectroscopy*), TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) oder NOESY (*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*) die Zuordnung wechselwirkender Spins in einem komplexen Makromolekül. Es wurden bereits zahlreiche Übersichtsartikel über die hochaufgelöste NMR-Spektroskopie an Proteinen publiziert (z. B. Locardi und Kessler, 2003; Wüthrich, 1995 und 2003).

Typische Protonen-Resonanzen für H^{α} -Protonen liegen im Bereich von 3 bis 5 ppm, während die aliphatischen Protonen der Aminosäurereste zwischen 1 und 3 ppm im 1H -NMR-Spektrum zu beobachten sind. Die H^N -Protonen liegen im Bereich von 7,5 bis 9 ppm. Jede Aminosäure bildet ein separates Spinsystem, da über den Carbonylkohlenstoff keine signifikante skalare Kopplung erreicht wird. Aminosäuren wie Prolin, Threonin oder Valin zeigen ein charakteristisches Aufspaltungsmuster, während die aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Histidin oder Tryptophan) ein gleiches AMXY Spinsystem mit $A = H^N$ -Proton; $M = H^{\alpha}$ -Proton, $X, Y =$ zwei CH_2^{β} -Protonen aufweisen (Locardi und Kessler, 2003). Die Spinsysteme können z. B. mit TOCSY-Messungen über skalare Kopplungen ermittelt werden. Durch eine ergänzende Messung unter Anwendung des NOE besteht die Möglichkeit, die aromatischen Aminosäuren zu unterscheiden. Es kann z. B. auf eines der beiden CH_2^{β} -Protonen eingestrahlt und durch Signalintensitätsänderungen der räumlich benachbarten Protonen am gebundenen Aromaten die entsprechende Aminosäure identifiziert werden.

3.2 Elektrochemie

Chemische Redoxtitration und Zyklovoltammetrie

Die Redoxreaktion bezeichnet einen Vorgang, bei dem gleichzeitig eine Reduktion und Oxidation stattfindet und dadurch ein oder mehrere Elektronen übertragen werden (Kortüm, 1966). Dabei stellt sich im Laufe der Reaktion immer wieder ein neues Gleichgewicht zwischen der oxidierten und reduzierten Spezies ein ($\text{Ox} + n e^- \rightleftharpoons \text{Red}$) und das Potential E der Lösung, gemessen gegen eine Referenzelektrode, verschiebt sich. Der Zusammenhang des Verhältnisses von [Ox] zu [Red] und des Potentials ist durch die Nernstgleichung gegeben:

$$E = E_m + \frac{R \cdot T}{F \cdot n} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} \quad (3.2.1)$$

mit E_m = Halbstufenpotential der untersuchten Verbindung

R = allgemeine Gaskonstante, $R = 8,31441 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = Temperatur

F = Faraday-Konstante, $F = 964846 \text{ C mol}^{-1}$

n = Zahl der übertragenen Elektronen

[Ox] und [Red] = Konzentration an oxidiertes bzw. reduziertes Spezies.

Bei der chemischen Redoxtitration wird durch definierte Zugabe eines Reduktions- (Oxidations)mittels das Gleichgewicht zwischen der oxidierten (reduzierten) und reduzierten (oxidierten) Form der zu untersuchenden Probe verschoben. Dem eingestellten Gleichgewicht entspricht gemäß der Nernstgleichung ein bestimmtes Potential E , das gemessen wird. Das Potential E entspricht dem Halbstufenpotential E_m , wenn 50 % der oxidierten Spezies reduziert vorliegt. In diesem Fall nimmt der zweite Summand der Gleichung 3.2.1 den Wert Null an.

Als Bezugspunkt werden die Potentiale gegen die Standard-Wasserstoff-Elektrode (*normal hydrogen electrode*, NHE) angegeben, deren Potential $E_0 (\text{H}_2/2\text{H}_3\text{O}^+) = 0 \text{ V}$ entspricht.

Das Verhältnis von oxidiertes zu reduziertes Spezies konnte bei den untersuchten Häm-Proteinen der vorliegenden Arbeit über eine gleichzeitig erfolgende Absorptionsänderung bei einer charakteristischen Wellenlänge beobachtet werden, bei der die oxidierte und reduzierte Form unterschiedlich absorbieren.

Die Schwierigkeit der Redoxtitration von redoxaktiven Metallzentren in einer Proteinumgebung besteht oftmals darin, dass diese Protein-Redoxzentren mit einer

Messelektrode nur sehr langsam oder gar keine Elektronen austauschen, da das aktive Zentrum durch die Proteinhülle abgeschirmt wird. Aus diesem Grund werden Redox-Mediatoren (Phenazin-, Viologen-, Anthrachinonderivate, u.a.) verwendet, die als oxidier- und reduzierbare Stoffe zwischen dem Redoxzentrum des Proteins und der Elektrodenoberfläche vermitteln, indem sie (im Fall einer Reduktion) Elektronen aus der Elektrode übernehmen und an das Protein weitergeben. Die Bedingungen für die Mediatoren bei einer Redox Titration sind, dass sie sowohl mit der Elektrode als auch mit dem Protein einen schnellen Elektronentausch ausführen und damit die Einstellung des elektrochemischen Gleichgewichts gewährleisten. Zudem sollten sie, einschließlich ihrer reduzierten Form, bei der zu untersuchenden Wellenlänge keine Absorption aufweisen, keine Reaktionen, außer dem Elektronenaustausch mit dem Proteinkomplex, eingehen und sich nach ihrer Reduktion nicht zersetzen. In der Regel kommt eine Mediatorenmischung zum Einsatz, die den gesamten zu untersuchenden Messbereich abdeckt.

Bei der zyklischen Voltammetrie (*cyclic voltammetry*, CV) wird zwischen der Arbeitselektrode und Referenzelektrode eine Spannung innerhalb einer bestimmten Zeit linear von einem Startpotential zu einem Umkehrpotential E_U geführt, von dem sie zum Startpotential E_S wieder zurückläuft. Der Arbeitselektrode wird demnach eine Dreiecksspannung aufgeprägt (Abb. 29a). Als Messkurve wird der resultierende Stromfluss in Abhängigkeit vom Potential aufgetragen (Abb. 29b). Bei einem Ein-Elektronenübergang werden zwei Strompeaks registriert, denen Oxidations- und Reduktionsvorgänge an der Arbeitselektrode zu Grunde liegen. Auf dem Weg von E_S zu E_U findet danach z. B. eine Reduktion statt, die auf dem Rückweg von E_U nach E_S wieder rückgängig gemacht wird.

Aus dem zyklischen Voltammogramm können die Spannung E_P und der maximale Strom I_P der Reduktion (Hinreaktion; E_p^H, I_p^H) und Oxidation (Rückreaktion; E_p^R, I_p^R) abgelesen werden (Abb. 29b). Je nach Reversibilität der Elektrodenvorgänge erhält man Voltammogramme verschiedenen Aussehens, aus denen man Rückschlüsse auf die Elektrodenvorgänge ziehen kann. Bei einer vollständigen Reversibilität der Oxidation und Reduktion des Moleküls sind die Ströme der Hin- und Rückreaktion gleich: $I_p^H = I_p^R$. Bei zwei Ein-Elektronenübergängen beobachtet man zwei Oxidations- und zwei Reduktionspeaks. Bei irreversiblen Reaktionen infolge einer schnellen chemischen Umsetzung des Produktes der Hinreaktion ist der Peak der Rückreaktion nur sehr schwach ausgeprägt oder gar nicht vorhanden.

Das Redoxpotential des untersuchten Redoxsystems ergibt sich aus:

$$E_m = \frac{E_p^H + E_p^R}{2}. \quad (3.2.2)$$

Die Potentialdifferenz $\Delta E = E_p^H - E_p^R$ gibt Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus und der Reversibilität einer Reaktion. Im Fall eines reversiblen Ein-Elektronenübergangs ($n = 1$) und einer Temperatur von $T = 298 \text{ K}$ beträgt ΔE nach der Gleichung

$$\Delta E = E_p^H - E_p^R = \frac{0,059V}{n} = 59mV. \quad (3.2.3)$$

Für die Übertragung von zwei Elektronen ($n = 2$) entspricht die Potentialdifferenz somit $\Delta E = 30 \text{ mV}$.

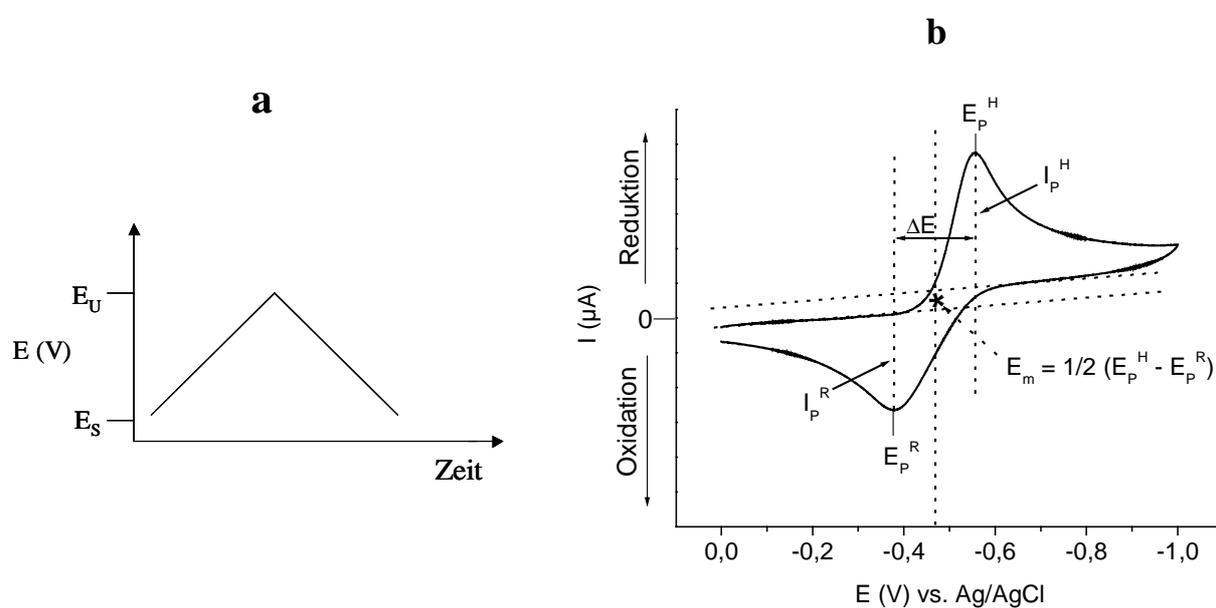


Abbildung 29: (a) Potentialverlauf an der Elektrode; (b) Darstellung der Strom-Spannungskurve (am Beispiel von 1,2-Naphtochinon-4-sulfonsäure in 25 mM Glycin-Puffer (50 mM NaCl, pH 10) und die Bezeichnung der wichtigsten Größen im zyklischen Voltammogramm. Die Indices H, R und P stehen in dieser Reihenfolge für die Hinreaktion, die Rückreaktion und für das Peakpotential. Für die Aufnahme des Zyklovoltammogramms wurde als Arbeitselektrode Glascarbon und als Gegenelektrode Platin eingesetzt.

3.3 Elektronische Struktur von FePPIX-Komplexen

Das Fe^{3+} -Ion besitzt die Elektronenkonfiguration $[\text{Ar}]3d^5$. Als freies Ion sind die d-Orbitale entartet und nach der Hundschen Regel und dem Pauli-Prinzip einfach besetzt. In einem Ligandenfeld kommt es zur Aufhebung der Entartung und die Orbitale werden energetisch aufgespalten. Die Aufspaltung ist dabei abhängig von der Art und Anordnung der Liganden. Starke oder schwache Liganden können sich, unter Annahme einer hohen Symmetrie, oktaedrisch, tetraedrisch oder quadratisch planar um das Zentralmetall anordnen. In einem oktaedrischen Ligandenfeld werden die e_g -Orbitale ($d_{x^2-y^2}$, d_{z^2}) energetisch angehoben und die t_{2g} -Orbitale (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz}) energetisch abgesenkt. Wenn die Aufspaltungsenergie des Oktaeders (Δ_o) größer als die Spinpaarungsenergie ist, werden zuerst die energieärmeren Orbitale besetzt und es entsteht der *low spin*-Zustand. Die Größe von Δ_o ist sowohl vom Zentralmetall als auch von den Liganden abhängig. Im Falle von *low spin* Fe(III) ist $\Delta_o \geq 1,4 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 30a).

Den gleichen Besetzungszustand wie ein freies Fe^{3+} -Ion in Lösung weist das Fe(III) im Porphyrin-System als oktaedrischer *high spin*-Komplex mit einem Spin von $S = 5/2$ auf. Beim oktaedrischen *low spin*-Komplex sind dagegen zwei t_{2g} -Orbitale doppelt und ein Orbital einfach besetzt. Der Spinzustand beträgt in diesem Fall $S = 1/2$. Da die unterschiedlichen Spinzustände in der EPR zu verschiedenen Signalen führen, kann mit dieser Methode der genaue Spinzustand und damit eine Information über die Koordination des Eisens (z. B. in den *de novo* synthetisierten Häm-Proteinen) erhalten werden.

Wenn ein Fe(III)-Porphyrin durch zwei Histidine eines Peptids koordiniert wird, liegt im Idealfall ein oktaedrisch koordiniertes Eisenzentrum vor. In diesem Fall ist die Aufspaltung zwischen dem t_{2g} - und e_g -Orbital so groß, dass das t_{2g} -Orbital separat betrachtet werden kann, da die Beimischung vom e_g -Orbital in diesem Fall vernachlässigbar ist. Anstelle der t_{2g}^5 -Elektronenkonfiguration wird im Folgenden zur mathematischen Vereinfachung anhand des „Loch-Formalismus“ eine t_{2g}^1 -Lochkonfiguration betrachtet, um Mehrelektronen-Wechselwirkungen zu eliminieren. Nach dem „Loch-Formalismus“ ist ein System von n -negativen Elektronen einem System von $10-n$ „Elektronenlöchern“ äquivalent. Die Aufspaltung des t_{2g} -Satzes wird durch tetragonale (Δ/λ) und rhombische (V/λ) Verzerrungen induziert (Abb. 30b). Die Größe λ ist der Spin-Bahn-Kopplungsparameter und beträgt für ein freies Fe^{3+} -Ion 420 cm^{-1} (Palmer, 1983). Durch die Verzerrungen wird die Symmetrie von O_h zu D_{2h} erniedrigt. Die tetragonale Verzerrung verläuft entlang der molekularen z-Achse und wird

durch die Ligandenfeldstärke oder den Bindungsabstand der axialen Liganden gegenüber dem Porphyrinring verursacht. Asymmetrische axiale Liganden oder eine Verzerrung des Porphyrinringes erzeugen eine rhombische Verzerrung in der x, y-Ebene. Die Werte Δ/λ und V/λ können aus den ermittelten g -Tensorwerten der EPR-Spektroskopie bestimmt werden:

$$\frac{V}{\lambda} = \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_y}{g_z - g_x} \quad \text{und} \quad \frac{\Delta}{\lambda} = \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_z}{g_y - g_x} - \frac{1}{2} \frac{V}{\lambda} \quad (3.3.1)$$

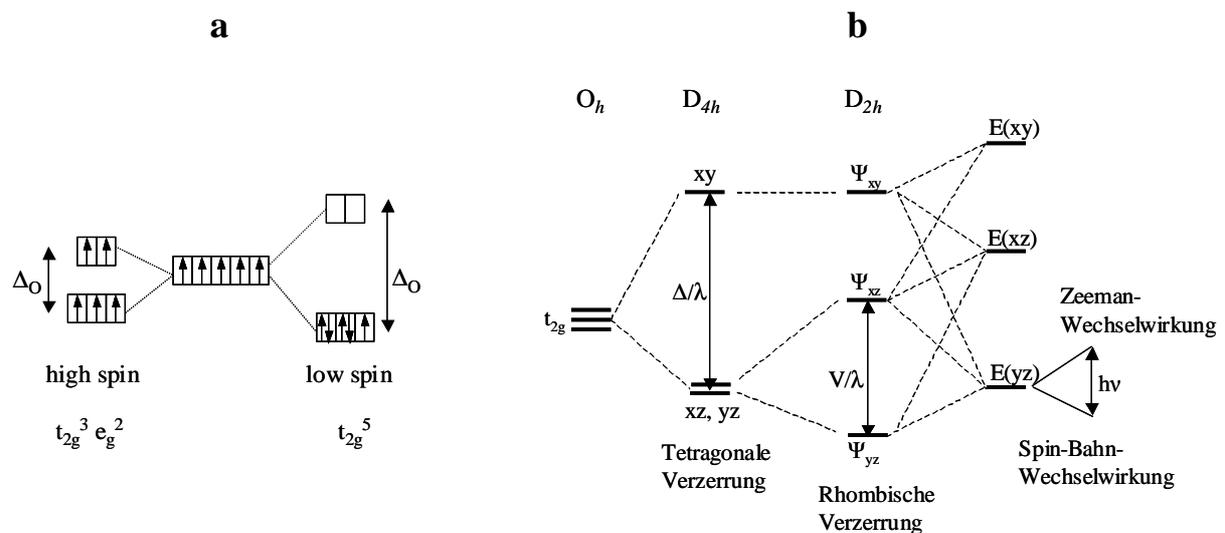


Abbildung 30: (a) Aufspaltung der d-Orbitale im oktaedrischen Ligandenfeld und deren Spinbesetzung im *high spin*- und *low spin*-Zustand von Fe^{3+} in Abhängigkeit von der oktaedrischen Aufspaltungsenergie Δ_O . (b) Aufspaltung der t_{2g} -Orbitale eines *low spin*-Fe(III)-Komplexes bei Annahme einer t_{2g}^1 -Lochkonfiguration durch tetragonale (Δ/λ) und rhombische (V/λ) Verzerrung des oktaedrischen Komplexes. Die Spin-Bahn-Kopplung mischt die Wellenfunktionen der rhombischen Verzerrung (Ψ_{xy} , Ψ_{xz} , Ψ_{yz}), was drei Orbitale mit den Energien $E(xy)$, $E(xz)$ und $E(yz)$ liefert. Durch Anlegen eines Magnetfelds spaltet das $E(yz)$ -Orbital durch die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung auf (adaptiert aus Fahnenschmidt, 2000).

3.4 Lichtinduzierter Elektronentransfer und spinkorreliertes Radikalpaar

Zinkchlorine können bei Lichtanregung als Donatoren in einem lichtinduzierten Elektronentransfer wirken, wobei ein Elektron auf ein Akzeptormolekül übertragen wird. Bei diesem Prozess entstehen Radikalpaare, die im Folgenden beschrieben werden.

Grundlegende Arbeiten zur Elektronentransfer-Theorie sind bereits in verschiedenen Büchern und Übersichtsartikeln beschrieben (Balzani, 2001; Gust und Moore, 1991; Kurreck und Huber, 1995; Rehm und Weller, 1969; Röder, 1999; Wasielewski, 1992). Das einfachste Modellsystem für den lichtinduzierten photosynthetischen Elektronentransfer besteht aus einem kovalent verknüpften Donator-Akzeptor (DA)-Paar. Entscheidende Kriterien für die Synthese solcher Systeme sind dabei die Redoxpotentiale, sowie die Orientierung und der Abstand der Moleküle zueinander. Wirkt der angeregte Chromophor als Donator gilt das in Abbildung 31 gezeigte Reaktionsschema. Das angeregte Donatormolekül ($^1D^*$) kann mit der Geschwindigkeitskonstante k_{S-ET} ein Elektron auf den Akzeptor übertragen und es entsteht das Singulett-Radikalpaar $^1(D^{\bullet+}A^{\bullet-})$. Alternativ kann der T_1 -Zustand ebenfalls ein Elektron an das Akzeptormolekül abgeben, woraus ein Triplett-Radikalpaar $^3(D^{\bullet+}A^{\bullet-})$ resultiert. Unmittelbar nach der Bildung spricht man von einem sogenannten spinkorrelierten Radikalpaar, das den gleichen Gruppenspin S wie der Ausgangszustand S_1 ($S = 0$) oder T_1 ($S = 1$) besitzt und somit weiterhin Singulett- oder Triplettcharakter aufweist. Beim spinkorrelierten Radikalpaar besteht eine starke Austauschwechselwirkung zwischen den beiden Radikalen. In Lösung separieren die Radikale jedoch in weniger als 100 ns so weit, dass die Austauschwechselwirkung vernachlässigbar wird und das separierte Radikalpaar zu beobachten ist. Das Radikalpaar $^3(D^{\bullet+}A^{\bullet-})$ kann erst zum stabilen Grundzustand des Ausgangsstoffes rekombinieren, wenn es seinen Gruppenspin zu $S = 0$ geändert hat. Alternativ können die getrennten Radikale auch Reaktionen mit ihrer Umgebung eingehen. Die Untersuchung der Radikalpaare bzw. der räumlich getrennten Radikale kann sowohl mit Hilfe der transienten Absorptions- (Kap. 3.1.2) als auch der EPR-Spektroskopie (Kap. 3.1.6) vorgenommen werden.

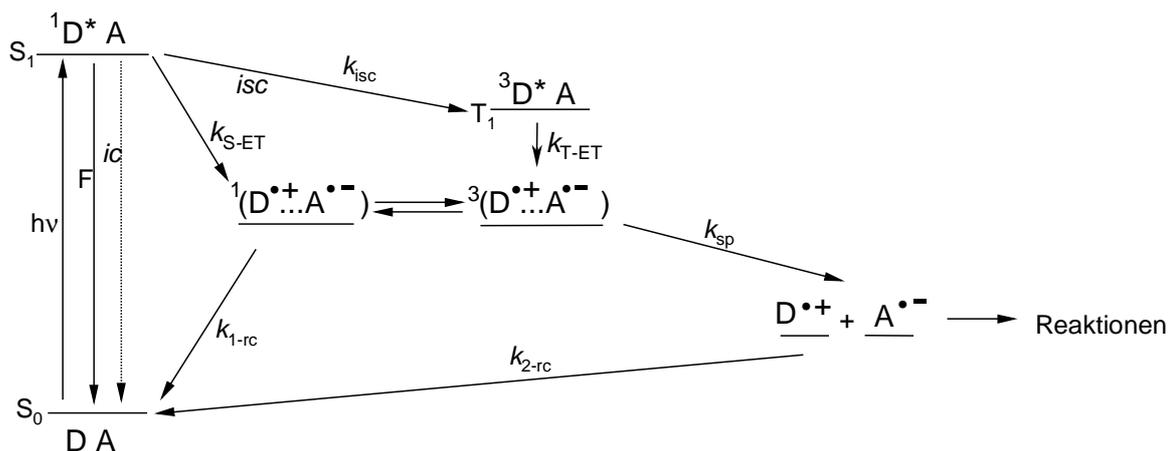


Abbildung 31: Lichtinduzierte Elektronentransferprozesse eines Donator-Akzeptor-Systems. Die in der Abbildung bezeichneten Geschwindigkeitskonstanten k sind im Einzelnen folgende: Zerfallsgeschwindigkeitskonstante des *isc*-Prozesses vom S_1 - zum T_1 -Zustand (k_{isc}); Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers aus dem Singulett- (k_{S-ET}) bzw. Triplettzustand (k_{T-ET}); Zerfallsgeschwindigkeitskonstante des Tripletttr radikalpaars zu separierten Radikalen (k_{sp}); Zerfallsgeschwindigkeitskonstante des Singuletttr radikalpaars (k_{1-rc}) und des separierten Radikalpaars, das zuvor einen Spin von $S = 0$ angenommen hat (k_{2-rc}).

Nach der Marcus-Theorie (Marcus, 1956; Marcus, 1959) ist der Elektronentransfer von der freien Reaktionsenthalpie $-\Delta G_0$, der Reorganisationsenergie λ (Energiebeitrag, der zur Umorientierung aller Kerne aufgrund der Ladungsseparation sowohl im Molekül als auch im Lösungsmittel benötigt wird), vom Lösungsmittel und der Temperatur abhängig. Die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers k_q wird durch Gleichung 3.4.1 bestimmt:

$$k_q = \kappa \cdot \exp\left[\frac{-\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right] = \kappa \cdot \exp\left[\frac{-(\Delta G_0 + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right] \quad (3.4.1)$$

mit ΔG^\ddagger = freie Aktivierungsenthalpie des Elektronentransfers, κ = Proportionalitätskonstante, k_B = Boltzmann-Konstante und T = absolute Temperatur.

Wenn die freie Reaktionsenthalpie der Reorganisationsenergie entspricht ($-\Delta G_0 = \lambda$), ist der Elektronentransfer aktivierungsfrei.

4. Experimenteller Teil - Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad puriss. p. a. oder p. a. und wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von folgenden Firmen bezogen: Acros Organics (Geel, BL), Fluka-Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D). Für die Spektroskopie wurden Uvasol-Lösungsmittel verwendet. Dimethylsulfoxid und Pyridin wurden in z. S. Qualität eingesetzt. Methanol, Diethylether (DE) und n-Pentan in technischer Qualität wurden vor Gebrauch destilliert.

Die Fmoc-Aminosäuren, Dimethylformamid (DMF) für die Peptidsynthese, Diisopropylamin (DIPEA), N-Methyl-pyrrolidon (NMP), PyBOP, TCTU und Trifluoressigsäure (TFA) in der Qualität *peptide grade* wurden von Iris Biotech (Marktredwitz, D) oder Novabiochem (Schwalbach, D) erhalten. Das PAL-PEG-PS-Harz für die Festphasenpeptidsynthese stammte von Applied Biosystems (Foster City, USA). Acetonitril in der Qualität *gradient grade* für die *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) wurde von J. T. Baker (Phillipsburg, USA) bezogen.

Chlorin e_6 wurde von Frontier Scientific, Inc. (Carnforth, UK) erworben.

Pyridin- d_5 für die NMR wurde von Deutero GmbH (Kastellaun, D) erhalten.

Für alle Pufferlösungen wurde deionisiertes Wasser (Milli-Q Academic, Millipore) verwendet.

4.1 Synthese, Aufreinigung und Identifizierung der Peptide

4.1.1 Chemische Peptidsynthese

Das Design der in dieser Arbeit synthetisierten Peptide beruht auf der bereits im Kapitel 1.5 gezeigten Cytb-Untereinheit des Cytbc₁-Komplexes von *Rb. capsulatus* (me-1 bis me-9) und auf den im Kapitel 1.8 beschriebenen natürlichen Lichtsammelkomplexen LH1 und LH2 von *Rb. sphaeroides* (sph α 31, sph β 31, sph α 54, sph β 50). Alle verwendeten Peptidsequenzen sind in der nachfolgenden Tabelle 1 angegeben:

Tabelle 1: Sequenzen der *de novo* synthetisierten Peptide mit der Anzahl der enthaltenen Aminosäuren z.

Peptid	Peptidsequenz	z.
me-1	L-K-K-K-R-E-E-H-L-K-L-L-E-E-F-K-K-L-L-E-E-H-L-K-W-L-E-G-G-G-C-C-G-G-G-E-L-W-K-L-H-E-E-L-L-K-K-F-E-E-L-L-K-L-H-E-E-R-K-K-K-L	62
me-2	L-K-K-L-R-E-E-A-L-K-L-L-E-E-F-K-K-L-L-E-E-H-L-K-W-L-E-G-G-G-G-G-G-G-E-L-L-K-L-M-E-E-L-L-K-K-C-E-E-L-L-K-L-A-E-E-R-L-K-K-L	62
me-3	L-K-K-L-R-E-E-A-L-K-L-L-E-E-F-K-K-L-L-E-E-H-L-K-W-L-E-G-G-G-G-G-G-G-E-L-L-K-L-M-E-E-L-L-K-K-A-E-E-L-L-K-L-A-E-E-R-L-K-K-L	62
me-4a	C-L-K-K-L-R-E-E-A-L-K-L-L-E-E-F-K-K-L-L-E-E-H-L-K-W-L-E-G-G-G-G-G-G-G-E-L-L-K-L-M-E-E-L-L-K-K-F-E-E-L-L-K-L-A-E-E-R-L-K-K-L	63
me-4b	C-L-K-K-L-R-E-E-A-L-K-L-L-E-E-F-K-K-L-L-E-E-M-L-K-W-L-E-G-G-G-G-G-G-G-E-L-L-K-L-M-E-E-L-L-K-K-F-E-E-L-L-K-L-A-E-E-R-L-K-K-L	63
me-5	L-K-K-K-R-E-E-A-L-K-L-L-E-E-F-K-K-L-L-E-E-H-L-K-W-L-E-G-G-G-G-C-C-G-G-G-E-L-W-K-L-H-E-E-L-L-K-K-F-E-E-L-L-K-L-A-E-E-R-K-K-K-L	62
me-6	L-K-K-L-R-E-E-A-L-K-L-L-E-E-F-K-K-L-L-E-E-H-L-K-W-L-E-G-G-G-G-G-G-G-E-L-L-K-L-H-E-E-L-L-K-K-C-E-E-L-L-K-L-A-E-E-R-L-K-K-L	62
me-7	L-K-K-K-R-E-E-F-K-K-L-L-E-E-H-L-K-W-L-E-G-G-G-C-C-G-G-G-E-L-W-K-L-H-E-E-L-L-K-K-F-E-E-R-K-K-K-L	48
me-8	L-K-K-K-R-E-E-F-K-K-L-L-E-E-A-L-K-W-L-E-G-G-G-C-C-G-G-G-E-L-W-K-L-A-E-E-L-L-K-K-F-E-E-R-K-K-K-L	48
me-9	L-K-K-K-R-E-E-A-K-K-L-L-E-E-H-L-K-W-L-E-G-G-G-C-C-G-G-G-E-L-W-K-L-H-E-E-L-L-K-K-A-E-E-R-K-K-K-L	48
sph α 31	D-P-R-R-V-F-V-A-Q-G-V-F-L-F-L-L-A-V-M-I-H-L-I-L-L-S-T-P-S-Y-N	31
sph β 31	E-L-H-S-V-Y-M-S-G-L-W-L-F-S-A-V-A-I-V-A-H-L-A-V-Y-I-W-R-P-W-F	31
sph α 54	M-T-N-G-K-I-W-L-V-V-K-P-T-V-G-V-P-L-F-L-S-A-A-V-I-A-S-V-V-I-H-A-A-V-L-T-T-T-T-W-L-P-A-Y-Y-Q-G-S-A-A-V-A-A-E	54
sph β 50	T-D-D-L-N-K-V-W-P-S-G-L-T-V-A-E-A-E-E-V-H-K-Q-L-I-L-G-T-R-V-F-G-G-M-A-L-I-A-H-F-L-A-A-A-A-T-P-W-L-G	50

Die Synthese der helikalen Peptide erfolgte mit einem multiplen Peptidsyntheseautomaten (348 Ω Modell, Advanced ChemTech) an einer festen Phase. Zur Programmierung der gewünschten Sequenzen wurde die zugehörige ACT 348 Ω MPS Software verwendet. Die natürlichen Aminosäuren, deren N $_{\alpha}$ -Gruppe durch eine Fmoc-Gruppe geschützt war, wurden in einem fünffachen molaren Überschuss zum Harz eingesetzt. Die reaktiven Seitenketten der Aminosäuren waren mit säurelabilen *tert*-Butyloxycarbonyl (*t*Boc)-, *tert*-Butyl (*t*But)-, 2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydroxybenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)- oder Trityl (Trt)-Gruppen geschützt. Das Harz (1,0 – 1,1 g), das als feste Phase für die Peptidsynthese eingesetzt wurde, bestand aus einem mit Polyamidlinkern versehenen Fmoc-geschützten Polyethylenglycol-Polystyrol (Fmoc-PAL-PEG-PS). Es hatte eine Beladungsdichte von 0,16 mmol/g und wurde vor der ersten Kopplung mit DMF gequollen. Die Aminosäuren wurden vor dem Synthesestart in NMP gelöst. Der erste Synthesesyklus begann mit der Zugabe von 25 % Piperidin in DMF zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe des Harzes. Nach mehreren Waschzyklen erfolgte die Kopplung der ersten Aminosäure durch eine Doppelkopplung mit TCTU/DIPEA und PyBOP/DIPEA bzw. zweimal TCTU/DIPEA (für die Synthese von me-4a und me-4b). Die Kopplungsreagenzien PyBOP und TCTU wurden in NMP gelöst und in einem fünffachen molaren Überschuss zum Harz eingesetzt. Das molare Verhältnis von DIPEA zum Harz betrug 10:1. Bei der Synthese der Lichtsammelpeptide wurde zusätzlich zu den Kopplungsreagenzien im gleichen molaren Verhältnis das Additiv HOBt zugesetzt. Nach erneutem Waschzyklus endete der erste Kopplungsprozess und der zweite Synthesesyklus begann mit der Abspaltung der Fmoc-Gruppe von der ersten gekoppelten Aminosäure. Die Tabelle 2 gibt detailliert die Abläufe eines Synthesesyklus für die verschiedenen Peptide an.

Durch die Wahl des Harzes bedingt, trägt der C-Terminus der synthetisierten Peptide eine Amidgruppe. Der N-Terminus wurde nach der letzten Kopplung zur Stabilisierung der Helices (s. Kap. 1.2) mit 5 % Acetanhydrid in DMF (120 min) acetyliert. Die Abspaltung der Peptide vom Harz mit gleichzeitiger Abspaltung aller Seitenschutzgruppen erfolgte mit einer frisch angesetzten Lösung aus 90 % TFA, 5 % Thioanisol, 3 % Ethandithiol und 2 % Anisol (Inkubationszeit: 1 x 120 min, 1 x 60 min). Die Peptid-Abspatlösung wurde für ca. 16 h bei 277 K aufbewahrt, um eine Abspaltung aller Seitenschutzgruppen zu gewährleisten. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe einer Öldiffusionspumpe eingengt. Das Rohprodukt konnte anschließend mit Ether/Pentan (1:1, v/v) gefällt werden. Zur Entfernung der restlichen Abspatlösung wurden die Peptide fünfmal mit ca. 5 ml Ether/Pentan (1:1, v/v) gewaschen, bevor sie in Essigsäure/Wasser (1:15, v/v) gelöst und anschließend lyophilisiert wurden.

Tabelle 2: Synthesesyklen der *de novo* synthetisierten Peptide

Peptide	me-1, me-2, me-3, me-5, me-6, me-7, me-8, me-9 sph α 31, sph β 31, sph α 54, sph β 50	me-4a, me-4b
Syntheseschritte		
Vor dem 1. Zyklus: Quellen des Harzes	DMF, 2 x 30 min	DMF, 1 x 60 min
1. Abspaltung der Fmoc-Gruppe	25 % Piperidin in DMF 2 x 15 min	25 % Piperidin in DMF 2 x 15 min
2. Waschen	DMF, 6 x 1 min	DMF, 6 x 1 min
3. Kopplung	1. TCTU/(HOBt)/DIPEA 1 x 60 min 2. PyBOP/(HOBt)/DIPEA 1 x 60 min	1. TCTU/DIPEA 1 x 60 min 2. TCTU/DIPEA 1 x 60 min
4. Waschen	DMF, 6 x 1min	DMF, 6 x 1min

Für die aus 62 Aminosäuren bestehenden und an einem Stück synthetisierten Peptide konnten Ausbeuten von max. 8 % relativ zum Erwartungswert, der aus der Beladungsdichte des Harzes berechnet wurde, erreicht werden. Für die kürzeren Peptidstränge konnten Ausbeuten von max. 10 % erhalten werden. Aufgrund einer aus technischen Gründen begrenzten Reproduzierbarkeit der gleichen Synthese eines Peptids können für die Ausbeuten nur Maximalwerte angegeben werden.

Die Peptide me-1, -5, -7, -8 und -9, die aus zwei homomeren α -Helices bestehen, wurden aus zwei 31meren durch Luftoxidation der Cystein-Reste am jeweiligen C-Terminus und Bildung einer Disulfidbrücke verknüpft. Dazu wurde das Peptid in einer 50 mM Ammoniumacetat-Pufferlösung mit 2 % DMSO (pH 7,6) bei Raumtemperatur (RT) für ca. 16 h gerührt. Die Dimerbildung (ca. 90 %) konnte durch Entstehen eines neuen Signals mit höherer Retentionszeit und gleichzeitiger Signalintensitätsverringerng des 31meren mittels HPLC verfolgt werden. Das entstandene Peptid wurde vom nicht umgesetzten Monomer abgetrennt, lyophilisiert und bei 253 K aufbewahrt.

Das Peptid me-4 wurde aus zwei heteromeren Peptiden (me-4a und me-4b) unter Verwendung von 2,2'-Dithiobis-5-nitropyridin (DTNP) über Cysteine verknüpft, die sich am C-Terminus beider Peptidstränge befinden (Rabanal et al., 1996). Hierzu wurde das Peptid me-4a in einer Argon-gesättigten Lösung aus Eisessig/Wasser (3:1, v/v) gelöst und unter

Rühren ein vierfacher Überschuss an DTNP zum Peptid hinzugeben. Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC verfolgt. Nach vollständiger Kopplung wurde die Lösung mit Eisessig versetzt, bis ein Essigsäure/Wasser-Verhältnis von 9:1 (v/v) vorlag und lyophilisiert. Der Überschuss an DTNP wurde durch wiederholtes Waschen mit Diethylether/Methylenchlorid (7:3, v/v) entfernt. Nach erneuter Gefriertrocknung wurde das Lyophilisat in einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 5) aufgenommen und das Peptid me-4b im molaren Verhältnis von 1:1 zum Peptid me-4a hinzugeben. Die Freisetzung von 5-Nitro-2-pyridinthiol konnte durch Gelbfärbung der Lösung beobachtet werden. Zudem konnte die Kopplung der beiden Peptide durch Aufnahme von HPLC-Chromatogrammen verfolgt werden (Tabelle 3).

4.1.2 HPLC

Die HPLC diente zur Aufreinigung der Peptide und erfolgte mit einer semipräparativen-HPLC-Anlage (Abimed-Gilson) bestehend aus zwei Pumpen (Typ 331 und 332), einem UV-Vis-Detektor (Typ 156), einem Umschaltventil (Valvemate), einem automatisierten Pipettierroboter mit Injektionsmodul und einem Fraktionssammler (215 Liquid Handle, 819 Injection Module). Zudem wurde ein Laufmittel-Entgaser (ERC-3215a, ERC) eingesetzt. Für die computerunterstützte Anlage wurde die Uni-Point™ LC System Software (Version 3.0) verwendet.

4.1.2.1 *De novo* synthetisierte Peptide me-1 bis me-9

Die lyophilisierten Peptid-Rohprodukte wurden in Acetonitril/Wasser (30:70, v/v, 0,1 % TFA) gelöst und mit einem Spritzenfilter (Spartan30, 45 µm, Schleicher & Schuell) vor dem Auftragen auf die HPLC-Säule filtriert. Die Peptide wurden mit einer Protein & Peptide-C18-Säule (Vydac, 250 x 22 mm, 300 Å, 218TP1022) mit Flussraten von 10 ml/min aufgereinigt. Die analytische HPLC der Peptide erfolgte an einer Protein & Peptide-C18-Säule (Vydac, 200 x 4,6 mm-Säule, 300 Å, 218TP54) mit einer Flussrate von 1 ml/min.

Es wurden folgende Gradienten verwendet:

Gradient 1: 0 min: 20 % - 80 % (35 min), 35 min: 80 % (12 min), 47 min: 80 - 20 % (1 min).

Gradient 2: 0 min: 30 % - 75 % (35 min), 35 min: 75 % (12 min), 47 min: 75 - 30 % (1 min).

Gradient 3: 0 min: 30 % - 90 % (35 min), 35 min: 90 % (12 min), 47 min: 90 - 30 % (1 min).

Gradient 4: 0 min: 30 % - 95 % (35 min), 35 min: 95 % (12 min), 47 min: 95 - 30 % (1 min).

Gradient 5: 0 min: 45 % - 95 % (35 min), 35 min: 95 % (12 min), 47 min: 95 - 45 % (1 min).

Die Prozent-Angaben entsprechen dem Gehalt an Acetonitril (+ 0,1 % TFA); die auf 100 fehlenden Prozentanteile geben den Wasseranteil (+ 0,1 % TFA) an.

Die Detektion der Peptide erfolgte bei 220 und 260 nm. Die getrennten Fraktionen wurden lyophilisiert, durch MALDI-TOF- oder ESI-Massenspektrometrie (Kap. 4.1.3) identifiziert und bei 253 K gelagert.

Tabelle 3: Verwendete HPLC-Gradienten und Retentionszeiten der synthetisierten Peptide me-1 bis me-9.

Peptid	Gradient	Retentionszeit (min)
me-1	2	27,6
me-2	5	29,7
me-3	5	30,6
me-4a	4	21,7
me-4a + DNTP	4	27,9
me-4b	4	27,8
me-4 (a + b)	5	39,9
me-5	2	25,4
me-6	3	31,5
me-7	1	25,1
me-8	1	30,5
me-9	1	24,2

4.1.2.2 *De novo* synthetisierte Peptide sph α 31, sph β 31, sph α 54 und sph β 50

Für die hydrophoben *de novo* synthetisierten Peptide, die nach der Sequenz der Peptide aus den Lichtsammelkomplexen von *Rb. sphaeroides* hergestellt wurden, erfolgte die Aufreinigung mit einer Gemini-C18-Säule (Phenomenex, 5 μ -C18 110A, 250 x 4,6 mm (analyt.), 250 x 21,2 mm (präp.)). Die Peptide wurden in Hexafluoraceton (HFA) angelöst und mit 30 % Acetonitril in Wasser (0,1 % TFA) versetzt. Vor der HPLC wurde die Peptidlösung mit einem PTFE-Spritzenfilter (0,45 μ m, Roth) filtriert. Die Flussrate der HPLC betrug 1 ml/min. Es wurde folgender Laufmittel-Gradient verwendet:

Gradient 6 : 0 min: 30 %, 7 min: 40 %, 17 min: 60 %, 47 min: 95 %, 49 min: 40 %, 54 min: 30 %.

Die Retentionszeiten sind in der nachfolgenden Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Retentionszeiten der synthetisierten Peptide sph α 31, sph β 31, sph α 54, sph β 50.

Peptid	Retentionszeit (min)
sph α 31	28,8
sph β 31	43,8
sph α 54	29,3
sph β 50	23,7

4.1.3 MALDI-TOF- und ESI-Massenspektrometrie

Die Aufnahme der *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight* (MALDI-TOF)-Massenspektren erfolgte an einem Voyager-DE PRO Workstation Spektrometer (Applied Biosystems) und einem Hochgeschwindigkeitsdigitalisierer (LeCroy). Die Proben wurden in Acetonitril/Wasser oder HFA (für Peptide der LH-Komplexe) gelöst und mit den Matrixsubstanzen wie α -Cyanohydroxymizsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder Sinapinsäure vermischt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV und einer Verzögerungszeit von 300 ns. Die Analyse der Peptide fand im linearen Negativ-Ionen-Modus statt und es wurden mindestens 100 Spektren akkumuliert. Zur Massenkalisierung wurden synthetisierte Oligonukleotide als externe Standards verwendet. Die Messgenauigkeit lag bei $\pm 0,2$ % des Molekulargewichtes. Die *Electrospray Ionisation* (ESI)-Messungen wurden am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung an einem *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (FT-ICR) APEX III-Massenspektrometer (Bruker) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem 7 T Magneten ausgestattet und an eine externe ESI-Quelle angeschlossen. Es wurden ausschließlich positiv geladene Ionen analysiert und zur Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses 100 oder 200 Einzelschusspektren akkumuliert. Die Proben wurden vor der Injektion in Methanol/Wasser (1:1, v/v) und 2 % Essigsäure gelöst.

ESI-Messungen an FePPIX-me-1 wurden von T. Daubenfeld aus der Arbeitsgruppe von Dr. G. van der Rest (Laboratoire DCMR, Ecole Polytechnique, Palaiseau, Frankreich) ebenfalls an einem FT-ICR APEX III-Massenspektrometer durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 4 bzw. 8 μM *maquette* in 10 mM Ammoniumacetat (pH 7,0) oder 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,9) gelöst und in das Spektrometer injiziert.

Die Fehler der ermittelten Molekulargewichte aus den ESI-MS-Messungen betragen in der Regel ± 1 Da.

Die durch MALDI-TOF- und gegebenenfalls ESI-MS ermittelten Molekulargewichte sind in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Berechnete und experimentell durch MALDI-TOF-MS bestimmte Molekulargewichte (M) der *de novo* synthetisierten Peptide. Molekulargewichte, die zur Kontrolle durch ESI-MS ermittelt wurden, sind gesondert angegeben. Die Abweichungen der ermittelten Molekulargewichte aus den ESI-Messungen von den berechneten Werten betragen max. 0,07 %.

Peptid	Molekulargewicht (Da) berechnet (monoisotop.)	Molekulargewicht (Da) experimentell
me-1	7600	7607 [M] ⁺ , 3802 [M] ²⁺ ; ESI-MS: 7600 [M] ⁺
me-2	7166	7175 [M] ⁺ ; ESI-MS: 7166 [M] ⁺
me-3	7134	7138 [M] ⁺ ; ESI-MS: 7134 [M] ⁺
me-4a	7313	7320 [M] ⁺
me-4b	7307	7318 [M] ⁺
me-4	14618	14663 [M] ⁺ , 7328 [M] ²⁺ ; ESI-MS: 14622 [M] ⁺
me-5	7470	7478 [M] ⁺ , 3739 [M] ²⁺ ; ESI-MS: 7470 [M] ⁺
me-6	7173	7177 [M] ⁺ ; ESI-MS: 7173 [M] ⁺
me-7	5877	5887 [M] ⁺ , 2945 [M] ²⁺
me-8	5745	5756 [M] ⁺ , 2881 [M] ²⁺
me-9	5725	5736 [M] ⁺ , 2868 [M] ²⁺
spha31	3570	3599 [M + Na] ⁺ , 3615 [M + Na + ½ O ₂] ⁺ ; ESI-MS: 3570 [M] ⁺
sphβ31	3702	3733 [M + Na] ⁺ , 3749 [M + Na + ½ O ₂] ⁺ ; ESI-MS: 3702 [M] ⁺
spha54	5636	5652 [M + ½ O ₂] ⁺ ; ESI-MS: 5640 [M] ⁺
sphβ50	5355	5364 [M] ⁺ , 2682 [M] ²⁺ ; ESI-MS: 5355 [M] ⁺

4.2 Darstellung der Kofaktoren

Bei der Isolierung und Synthese der Kofaktoren wurden alle Arbeitsschritte unter Grünlicht durchgeführt und die Proben zwischen den einzelnen Reaktionsschritten, sofern möglich, auf Eis gelagert. Die Metallisierungsreaktion erfolgte durch die Acetat-Methode, bei der das entsprechende Metallacetat zugegeben wurde (Smith, 1976).

Standardaufarbeitung: Die Standardaufarbeitung erfolgte bei 277 K. Der Reaktionsansatz wurde mit Ether/Wasser im Verhältnis 1:3 (v/v) versetzt. Nach der Phasentrennung (bei schlechter Phasentrennung wurde gesättigte Natriumchlorid-Lösung hinzugegeben) wurde die organische Phase sechsmal mit Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (Rotavapor R-124, Büchi) entfernt.

Aufreinigung der Kofaktoren: Die (Bakterio)Chlorinderivate wurden an einer analytischen und präparativen HPLC-Anlage (Abimed-Gilson) mit einem Gradientensystem (Pumpenmodelle 305 und 306) und Detektoren der Firma Shimadzu (SPD-M10AV, analyt.; SPD10AV, präp.) gereinigt. Als *reversed phase*-Säulen wurden die Nucleosil-5-C18- (Macherey & Nagel, 125 x 8 mm) und die Kromasil-5-C18-Säule (NZ-Analysentechnik, 125 x 4,6 mm) eingesetzt. Eine Econosphere-Si (Alltech, 125 x 4,6 mm) wurde als *normal phase*-Säule verwendet. Die verwendete Säule als stationäre Phase und das eingesetzte Laufmittel als mobile Phase für die jeweiligen Kofaktoren sind den entsprechenden Absätzen dieses Kapitels zu entnehmen. Die Detektion der Pigmente erfolgte bei der Wellenlänge ihrer Soretbande. Die Durchführung der HPLC fand unter Grünlicht statt und die gereinigten Fraktionen wurden bereits während der Aufreinigung auf Eis gelagert und mit Argon begast. Alle Pigmente wurden anschließend unter Argon bei 193 K gelagert.

4.2.1 Chlorophyll *a*

Chl_a konnte durch Methanol-Extraktion aus getrockneten *Spirulina platensis* Zellen gewonnen werden. Hierzu wurden 100 g Algen in 200 ml Methanol für 6 h inkubiert. Die Zellrückstände wurden mit einer Glasfritte abfiltriert und mit Methanol gewaschen, bis der Extrakt nur noch schwach grün gefärbt war. Der Extrakt wurde nach der Standardmethode (s. o.) aufgearbeitet. Für die anschließende HPLC wurde jeweils 1 g der getrockneten organischen Phase in wenig Methanol aufgenommen. Es gelang, das Chl_a von seiner

epimeren Form Chla' zu trennen. Man erhielt durchschnittlich 190 mg Chla. Die Ausbeute an Chla ist allerdings abhängig von den Wachstums- und Anzuchtbedingungen der Algen und kann deshalb variieren.

HPLC: stationäre Phase: Nucleosil-5-C18

mobile Phase: Methanol

Flussrate: 0,8 ml/min

Retentionszeiten: 7,9 min (Chla), 9,1 min (Chla').

UV-Vis (nm), DE: 382 (0,43), 412 (0,77), 428 (1,00), 532 (0,03), 577 (0,06), 615 (0,12), 661 (0,78); ϵ_{661} (DE) = 90300 M⁻¹cm⁻¹ (Jones et al., 1977).

Aceton: 382 (0,49), 414 (0,88), 429 (1,00), 531 (0,02), 578 (0,07), 616 (0,14), 662 (0,82).

MS (ESI) (g/mol): ber. für MgC₅₅H₇₂N₄O₅: M = 892 g/mol; exp. 893 [M + H] und 915 [M + Na].

¹H-NMR (ppm), 400 MHz, Pyridin-d₅, δ = 0,86 (m, je 3H, CH₃-P7a, CH₃-P11a, CH₃-P15a), 1,29 (m, je 2H, CH₂-P5 - CH₂-P15), 1,61 (s, 3H, CH₃-P3a), 1,62 (d, 3H, CH₃-18¹), 1,66 (t, 3H, CH₃-8²), 1,96 (m, 2H, CH₂-P4), 2,25 (m, je 1H, CH₂-17¹b, CH₂-17²b), 2,65 (m, 1H, CH₂-17¹a), 2,82 (m, 1H, CH₂-17²a), 3,28 (s, 3H, CH₃-7¹), 3,37 (s, 3H, CH₃-2¹), 3,71 (s, 3H, CH₃-12¹), 3,77 (q, 2H, CH₂-8¹), 3,82 (s, 3H, CH₃-13⁴), 4,51 (dq, 1H, CH-18), 4,66 (d, 2H, CH₂-P1), 4,76 (m, 1H, CH-17), 5,45 (t, 1H, CH-P2), 6,06, 6,36 (je dd, 2H, CH₂-3²), 6,71 (s, 1H, CH-13²), 8,30 (dd, 1H, CH-3¹), 8,60 (s, 1H, CH-20), 9,76 (s, 1H, CH-5), 9,93 (s, 1H, CH-10).
(Kennzeichnung aller H-Atome in Bezug auf Abbildung 12)

4.2.2 Pheophytin a

Durch Zugabe von 20 ml Eisessig zu 200 mg Chla entstand durch sofortige Entmetallisierung das Phea. Dieses war optisch an einem Farbumschlag von grün nach braun zu erkennen. Das Lösungsmittel wurde als azeotropes Gemisch mit gleichem Volumenanteil an Toluol an einer Vakuumanlage (Trivag, Leybold-Heraeus, 1x 10⁻² mbar) entfernt. Der Rückstand konnte ohne Reinigung für die Metallisierungsreaktion mit Zink (Kap. 4.2.3) eingesetzt werden.

UV-Vis (nm), DE: 406 (1,00), 504 (0,09), 533 (0,08), 561 (0,01), 610 (0,06), 667 (0,53);
 ϵ_{667} (DE) = 55900 M⁻¹cm⁻¹ (Jones et al., 1977).

MS (ESI) (g/mol): ber. für C₅₅H₇₄N₄O₅: M = 870 g/mol; exp. 871 [M + H] und 893 [M + Na].

4.2.3 Zink-Pheophytin *a*

120 mg Phea wurden in 40 ml Essigsäure gelöst und mit einem 250-fachen molaren Überschuss an Zinkacetat, 200 mg Natriumacetat und 10 mg Natriumascorbat versetzt. Die Suspension wurde 1 h bei RT gerührt. Nach der Standardaufarbeitung wurde die gewünschte Verbindung mittels HPLC aufgereinigt. Man erhielt 65 mg (51 %) ZnPhea.

HPLC: stationäre Phase: Nucleosil-5-C18

mobile Phase: Methanol

Flussrate 0,8 ml/min

Retentionszeiten: 10,3 min (ZnPhea), 12,3 min (ZnPhea').

UV-Vis (nm), DE: 423 (1,00), 519 (0,02), 563 (0,05), 605 (0,09) 653 (0,73);

$$\epsilon_{653} \text{ (DE)} = 90300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (Jones et al., 1968).}$$

MS (ESI): ber. für $\text{ZnC}_{55}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_5$: $M = 933 \text{ g/mol}$; exp. 956 $[\text{M} + \text{Na}]$.

$^1\text{H-NMR}$, 400 MHz, Pyridin- d_5 : Das NMR-Spektrum von ZnPhea in Pyridin entspricht dem von Chla mit maximalen Abweichungen von 0,05 ppm.

4.2.4 Pheophorbid *a*

Pheida wurde durch Zugabe von 5 ml TFA zu 150 mg Chla und einer Inkubationszeit von 30 min gewonnen. Das TFA wurde anschließend an einer Vakuumanlage entfernt und die Verbindung nach der Standardmethode aufgearbeitet. Die Verbindung konnte ohne weitere Aufreinigungsschritte für die Metallisierungsreaktion (Kap. 4.2.5) eingesetzt werden.

HPLC: stationäre Phase: Nucleosil-5-C18

mobile Phase: Methanol/0,5 M Ammoniumacetat-Lösung (8:1, v/v)

Flussrate: 1,5 ml/min

Retentionszeiten: 11,2 min (Pheida), 13,0 min (Pheida').

UV-Vis (nm), DE: 407 (1,00), 469 (0,03), 504 (0,09), 533 (0,07), 561 (0,01), 610 (0,05),

667 (0,49); $\epsilon_{667} \text{ (DE)} = 55900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Phea (Jones et al., 1977); der Beitrag des Phytylestes zum Absorptionsspektrum ist vernachlässigbar gering;

$$\epsilon_{667} \text{ (H}_2\text{O)} = 45000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (Eichwurz et al., 2000).}$$

MS (ESI) (g/mol): ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5$: $M = 592 \text{ g/mol}$; exp. 593 $[\text{M} + \text{H}]$.

4.2.5 Zink-Pheophorbid *a*

150 mg Pheida wurden in 15 ml Eisessig gelöst und mit einem 250-fachen molaren Überschuss an Zinkacetat, 100 mg Natriumacetat und 20 mg Ascorbat versetzt und 60 min bei RT gerührt. Durch die Metallisierung färbte sich die Lösung von braun nach grün. Nicht umgesetztes Zinkacetat wurde vor der Standardaufarbeitung abzentrifugiert. Die anschließende Probenaufreinigung erfolgte durch HPLC. Die Ausbeute an ZnPheida lag bei 80 mg (48 %). Ammoniumacetat wurde durch erneute Standardaufarbeitung aus der Probe entfernt und die Reinheit des Pigments durch analyt. HPLC kontrolliert.

HPLC: stationäre Phase: Nucleosil-5-C18

mobile Phase: Methanol/0,5 M Ammoniumacetat-Lösung (8:1, v/v)

Flussrate: 1,5 ml/min

Retentionszeiten: 5,6 min (ZnPheida), 8,4 min (ZnPheida').

UV-Vis (nm), DE: 378 (0,45), 407 (0,83), 423 (1,00), 523 (0,03), 563 (0,04), 607 (0,10), 653 (0,71); ϵ_{653} (DE) = 90900 M⁻¹cm⁻¹ (Jones et al, 1968);

ϵ_{663} (10mM KH₂PO₄/K₂HPO₄-Puffer, pH 7,3) = 47000 M⁻¹cm⁻¹.

MS (ESI) (g/mol): ber. für ZnC₃₅H₃₄N₄O₅, M = 654 g/mol; exp. 655 [M + H].

¹H-NMR (ppm), 400 MHz, Pyridin-d₅, δ = 1,67 (t, 3H, CH₃-8²), 1,72 (d, 3H, CH₃-18¹), 2,54 (m, 1H, CH₂-17¹b), 2,68 (m, 1H, CH₂-17²b), 2,84 (m, 1H, CH₂-17²a), 2,96 (m, 1H, CH₂-17¹a), 3,26 (s, 3H, CH₃-7¹), 3,37 (s, 3H, CH₃-2¹), 3,72 (s, 3H, CH₃-12¹), 3,77 (q, 2H, CH₂-8¹), 3,84 (s, 3H, CH₃-13⁴), 4,49 (m, 1H, CH-17), 4,57 (dq, 1H, CH-18), 6,08, 6,31 (je d, 2H, CH₂-3²), 6,78 (s, 1H, CH-13²), 8,27 (dd, 1H, CH-3¹), 8,67 (s, 1H, CH-20), 9,74 (s, 1H, CH-5), 9,93 (s, 1H, CH-10).

4.2.6 Zink-Chlorin *e*₆

Das kommerziell erworbene Ce₆ wurde in einer Pufferlösung (25 mM Glycin, 50 mM NaCl, pH 10) durch Zugabe äquimolarer Mengen an Zinkacetat und Rühren bei RT (1,5 h) zu ZnCe₆ umgesetzt. Der Einbau ließ sich mit der UV-Vis-Spektroskopie verfolgen. Nicht umgesetztes Edukt konnte mittels HPLC separiert werden.

HPLC: stationäre Phase: Kromasil-5-C18

mobile Phase: Methanol/50 mM Triethylammoniumacetat-Lösung (pH 8) (2:1, v/v)

Flussrate: 0,8 ml/min

Retentionszeiten: 14,2 min (Ce₆), 17,4 min (ZnCe₆).

UV-Vis (nm), Puffer (25 mM Glycin, 50 mM NaCl, pH 10): 412 (1,00), 520 (0,03), 593 (0,04), 633 (0,22); ϵ_{633} = 40000 M⁻¹cm⁻¹.

MS (ESI) (g/mol): ber. für $\text{ZnC}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6$: $M = 659$ g/mol, exp. 660 [M + H],
615 [M – CO₂].

4.2.7 Bakteriochlorophyll *a*

BChl*a* konnte aus dem Aceton-Extrakt von *Allochrochromatium vinosum* (DSM 185) isoliert werden. Hierzu wurden die frisch geernteten Zellen 30 min in Aceton gerührt (die Zellanzucht und das Aufbrechen der Zellen wurden von P. Kellers aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt). Durch das Aufbrechen der Membranen befand sich im Überstand neben verschiedenen Carotinoiden als Hauptkomponente BChl*a*. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (Biofuge R15, Heraeus, 5000 UpM, 277 K, 30 min) und der Überstand vor Anwendung der HPLC zweimal mit einem Spritzenfilter (45 µm, Roth) filtriert, um restliche Zellbestandteile zu entfernen.

HPLC: stationäre Phase: Nucleosil-5-C18

mobile Phase: Methanol

Flussrate: 0,8 ml/min

Retentionszeit: 4,7 min (BChl*a*).

Eine Epimerentrennung wird durch Verwendung der *normal phase*-Säule

(Econosphere-Si) in n-Hexan, 2-Propanol und Methanol (100, 2, 0,3; v/v/v) erhalten:

Retentionszeiten: 6,9 min (BChl*a'*), 9,8 min (BChl*a*).

UV-Vis (nm), DE: 357 (0,75), 391 (0,48), 574 (0,23), 707 (0,11), 770 (1,00);

$$\varepsilon_{770} \text{ (DE)} = 96000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (Sauer et al., 1966).}$$

MS (ESI) (g/mol): ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{74}\text{MgN}_4\text{O}_6$: $M = 910$; exp. 911 [M + H].

¹H-NMR (ppm), 400 MHz, Pyridin-d₅: $\delta = 0,87$ (m, je 3H, CH₃-P7a, CH₃-P11a, CH₃-P15a, Phytyl), 1,14 - 1,42 (m, je 2H, CH₂-P5 - CH₂-P15, Phytyl), 1,58 (d, 3H, CH₃-18¹), 1,69 (s, 3H, CH₃-P3¹), 1,75 (d, 3H, CH₃-7), 2,01 (m, 2H, CH₂-8¹), 2,24 (m, 2H, CH₂-17²), 2,59 (m, 2H, CH₂-17¹), 3,16 (s, 3H, CH₃-3²), 3,49 (s, 3H, CH₃-2¹), 3,59 (s, 3H, CH₃-12¹), 3,82 (s, 3H, CH₃-13⁴), 4,03 (m, 1H, CH-8), 4,26 (m, je 1H, CH-7 und CH-17), 4,37 (m, 1H, CH-18), 4,79 (d, 2H, CH₂-P1), 5,49 (m, 1H, CH-P2) 6,59 (s, 1H, CH-13²), 8,53 (s, 1H, CH-20), 8,67 (s, 1H, CH-10), 9,53 (s, 1H, CH-5).

CV, in Acetonitril/DMF (9:1, v/v) und 0,1 M Tetrabutylammoniumtetrafluorborat:

$E_{\text{ox}}^2 = +0,249$ V, $E_{\text{ox}}^1 = -0,100$ V, $E_{\text{red}}^1 = -1,440$ V, $E_{\text{red}}^2 = -1,802$ V vs. FeCp⁺/FeCp (siehe Anhang I). Die Werte sind gegen FeCp⁺/FeCp angegeben, um sie mit der Literatur vergleichen zu können (Noy et al., 1998).

4.2.8 Bakteriopheophorbid *a*

BPheida wurde durch Zugabe von 10 ml TFA zu 200 mg BChla und einer Inkubationszeit von 30 min gewonnen. Das Lösungsmittel wurde anschließend an einer Vakuumanlage entfernt. Das Pigment wurde ohne weitere Aufreinigung zu ZnBPheida umgesetzt.

UV-Vis (nm), DE: 356 (1,00), 383 (0,56), 491 (0,05), 524 (0,22), 679 (0,09), 749 (0,61);

ϵ_{748} (DE) = 67600 M⁻¹cm⁻¹ für BPhea (Oelze, 1985). Der Beitrag des Phtylrestes zum Absorptionsspektrum ist vernachlässigbar gering.

4.2.9 Zink-Bakteriopheophorbid *a*

150 mg BPheida wurden unter Argonatmosphäre in 15 ml Eisessig gelöst, mit einem 250-fachen molaren Überschuss an Zinkacetat, 50 mg Natriumacetat und 20 mg Ascorbat versetzt und 60 min unter Rückfluss erhitzt. Durch die Metallisierung entstand ein Farbumschlag von braun nach grün. Nicht gelöstes Zinkacetat wurde vor der Standardaufarbeitung abzentrifugiert. Aufgrund der Sensitivität des Pigments wurde das Lösungsmittel nach der Standardaufarbeitung nicht am Rotationsverdampfer, sondern an einer Vakuumanlage entfernt. Die anschließende Pigmentreinigung erfolgte durch HPLC. Man erhielt 50 mg (30 %) ZnBPheida. Ammoniumacetat wurde durch erneute Standardaufarbeitung aus der Probe entfernt und die Reinheit des Kofaktors durch analyt. HPLC kontrolliert.

HPLC: stationäre Phase: Nucleosil-5-C18

mobile Phase: Methanol/0,5 M Ammoniumacetat-Lösung (8:1, v/v)

Flussrate: 1,5 ml/min

Retentionszeit: 4,5 min (ZnBPheida), 5,6 min (ZnBPheida').

UV-Vis (nm), DE: 355 (1,00), 389 (0,82), 426 (0,36), 564 (0,29), 672 (0,24), 763 (1,00);

ϵ_{762} (DE) = 67700 M⁻¹cm⁻¹ (Hartwich et al., 1998);

ϵ_{770} (H₂O) = 47000 M⁻¹cm⁻¹ (Noy, 2005).

CV in Acetonitril/DMF (9:1, v/v) und 0,1 M Tetrabutylammoniumtetrafluoroborat:

$E^2_{ox} = +0,330$ V, $E^1_{ox} = +0,004$ V, $E^1_{red} = -1,421$ V, $E^2_{red} = -1,745$ V vs. FeCp⁺/FeCp (siehe Anhang II). Die Werte sind gegen FeCp⁺/FeCp angegeben, um sie mit der Literatur vergleichen zu können (Noy et al., 1998).

4.2.10 Lutein

Lutein konnte aus frischem Spinat (*Spinacia oleracea* L.) nach einem institutsinternen Standardprotokoll (persönliche Mitteilung M. Reus, Arbeitsgruppe Prof. Holzwarth) durch eine Petrolether/Methanol-Extraktion isoliert werden. Hierzu wurden 100 g gewaschene

Spinatblätter (ohne Stiel und Mittelrippe) in flüssigem Stickstoff gemörsert, in einen Rundkolben überführt und mit 200 ml Petrolether/Methanol (3:1, v/v) versetzt. Nach Rühren (6 h) bei RT und unter Lichtausschluss wurden die gemörserten Blattbestandteile abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Die vereinigte organische Phase wurde mit 80 %iger KOH-Lösung (0,1 Volumenanteile) und 30 ml einer gesättigten Natriumcarbonat-Lösung zur Verseifung der Chlorophylle und Entfernung restlicher Lipide versetzt. Nach erneutem Rührprozess (16 h) wurde die Lösung zur Phasentrennung mit Ether/Wasser (1:2, v/v) versetzt. Die organische Phase (gelb) enthielt die Carotinoide, während sich die Chlorophyllderivate nach Abspaltung des Phytylrestes in der wässrigen Phase (grün) befanden. Nach dem Waschen der organischen Phase mit Wasser erfolgte die Trocknung über Na_2SO_4 und schließlich das Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und über eine Kieselgelsäule (Glassäule, Durchmesser: 3 cm, Füllhöhe: 25 cm, Kieselgel 60 (Merck)) chromatographisch gereinigt. Als Laufmittel wurde n-Hexan/Aceton (1:1) verwendet. Während der Aufreinigung wurden DC-Kontrollen auf Kieselgelfolien (DC-Alufolien, Kieselgel 60F₂₅₄) mit gleichem Laufmittel durchgeführt. Nach der Säulenchromatographie fand eine weitere Aufreinigung mittels HPLC statt. Aus den 100 g Frischgewicht an Spinatblättern konnten 9,6 mg Lutein erhalten werden.

DC: R_F -Wert (Aceton/n-Hexan, 1:1, v/v): 0,48

HPLC: stationäre Phase: Nucleosil-5-C18

mobile Phase: A: Acetonitril/Methanol/Wasser (72:8:3, v/v/v)

B: Methanol/n-Hexan (4:1, v/v);

Flussrate: 2 ml/min

Gradient: 0 - 5 min 0 % B, 28 - 33 min 100 % B;

Retentionszeiten: 24,4 min (Lutein); aus dem Rohextrakt (vor der Säulenchromatographie) konnten weitere Carotinoide aus Spinat mit folgenden Retentionszeiten isoliert werden: 17,3 min (Neoxanthin), 19,5 min (Violaxanthin), 22,3 min (Antheraxanthin).

Für die Zuordnung der HPLC-Peaks dienten folgende Referenzen: Müller, 1997; Rivas et al., 1989.

UV-Vis (nm), Ethanol: 422 (0,70), 445 (1,00), 474 (0,90);

$$\epsilon_{445} (\text{Ethanol}) = 144840 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{Britton et al., 2004}).$$

MS (EI) (g/mol): ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$: $M = 568 \text{ g/mol}$; exp. 568 [M].

4.3 Biochemische Versuchsvorschriften

4.3.1 Einbau von Kofaktoren in die Peptide

4.3.1.1 Hämin

Das in DMSO gelöste Hämin (Fluka) ($c = 4,8 \text{ mM}$) wurde in kleinen Portionen zu den Peptiden ($c = 6 - 60 \text{ }\mu\text{M}$) hinzugegeben, die in 1 ml Puffer (50 mM Kalium-Phosphat, 100 mM KCl, pH 7,0) gelöst vorlagen. Die Lösung wurde 30 min bei RT im Grünlicht geschüttelt (Tischschüttler, Böhler). Überschüssiges Hämin konnte mit Hilfe einer PD-10-Säule (Pharmacia) entfernt werden. Für kleinere Volumina wurde eine NAP-5-Säule (Pharmacia) verwendet. Die Säulen wurden zuvor mit dem gleichem Puffer equilibriert, der auch für das Lösen der Peptide verwendet wurde. Der Einbau des Hämins in das Peptid me-1 betrug nach dem Absorptionsverhältnis der Soretbande bei 413 nm zu der Peptidbande bei 280 nm unter Berücksichtigung der entsprechenden Extinktionskoeffizienten 100 %. Um eine genügend hohe Konzentration des Komplexes für die EPR-Messungen zu erhalten, wurden Amicon-Ultra Konzentratoren (Millipore) mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa verwendet. Die entstandenen FePPIX-*maquettes* wurden lyophilisiert und bei 253 K gelagert.

4.3.1.2 Chlorin- und Bakteriochlorinderivate

Die Chlorin und Bakteriochlorinderivate, mit Ausnahme von ZnCe_6 , wurden in Aceton gelöst und portionsweise zum Peptid hinzugegeben, das in einer Argon-gesättigten Pufferlösung (1 – 2 ml, 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM KCl, pH 7,3) gelöst vorlag. Im Unterschied zu Kap. 4.3.1.1 wurde während der Einbaureaktion die Lösung 30 bis 60 min bei ca. 283 K im Grünlicht in einem 10 ml Kolben unter Argon gerührt. Nach dem Entfernen von überschüssigem und nicht eingebundenem Pigment durch eine PD-10-Säule konnte eine erfolgreiche Einlagerung der Pigmente an den entsprechenden Verschiebungen der UV-Vis-Banden festgestellt werden. Nach Anwendung der PD-10-Säule, die mit gleicher Pufferlösung (s. o.) equilibriert war, betrug der Acetongehalt der Metallopeptidproben weniger als 1 %.

Das hydrophile ZnCe_6 , das als konzentrierte Stammlösung in 25 mM Glycin, 50 mM NaCl (pH 10) bei 253 K aufbewahrt wurde, konnte direkt zum Peptid hinzugegeben werden. Der Einbau des Pigments und die Aufreinigung der erhaltenen ZnCe_6 -*maquettes* entsprachen dem oben beschriebenen Ablauf.

4.3.2 Konzentrationsbestimmungen der Peptide und Kofaktoren

Die lyophilisierten Peptide wurden mit einer Analysenwaage eingewogen und in einer bestimmten Menge Puffer gelöst. Die daraus ermittelte Konzentration wurde durch die Absorption von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm und ihrer bekannten Extinktionskoeffizienten (Kap. 3.1.3.1) durch Aufnahme eines UV-Vis-Spektrums überprüft. Enthielt die Peptidprobe in ihrer Sequenz zwei Tryptophane, wurde für dieses Peptid entsprechend des Extinktionskoeffizienten eines Tryptophans von $\epsilon_{280} = 5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ein Wert für $\epsilon_{280} = 11200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angenommen.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von ZnPheida in wässriger Lösung wurde aufgrund der hydrophoben Eigenschaft des Pigments eine Stammlösung in DE hergestellt. Von dieser Lösung wurden gleiche Mengen in verschiedenen Konzentrationen in jeweils 1 ml DE und Pufferlösung (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM KCl, pH 7,3) gegeben und Absorptionsspektren aufgenommen. Mit dem aus der Literatur bekannten Extinktionskoeffizienten von ZnPheida in DE ($\epsilon_{653} = 90900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Jones et al., 1968) kann für jede Absorption (Extinktion, E) der Q_y -Bande mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz die entsprechende Pigmentkonzentration (c) ermittelt werden:

$$c = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \quad \text{mit } d = \text{Schichtdicke in cm.} \quad (4.3.2.1)$$

Die Auftragung der gemessenen Absorption in der Pufferlösung gegen die Pigmentkonzentration ergibt eine Gerade, aus deren Steigung der Extinktionskoeffizient des Kofaktors im wässrigen Milieu bestimmt werden kann.

Zur Überprüfung einer möglichen Änderung des molaren Extinktionskoeffizienten beim Einbau von ZnPheida bzw. ZnCe_6 in die Peptide wurde lyophilisiertes Peptid im Überschuss zum Kofaktor in wässriger Lösung hinzugeben. Nach kurzem Rühren wurde das Absorptionsmaximum der Q_y -Bande von ZnPheida in der Pufferlösung mit dem vom peptidgebundenen ZnPheida verglichen. Peptidgebundenen ZnPheida zeigt dabei einen um 20 % höheren Extinktionskoeffizienten. Der Extinktionskoeffizient von peptidgebundenem ZnCe_6 war um 10 % höher als der vom freien ZnCe_6 in 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10).

4.3.3 Gelfiltration

Für die Gelfiltrationen zur Molmassenbestimmung der Peptide und der Peptid-Kofaktor-Komplexe wurde eine Superdex75 HR10/30-Säule (Amersham Biosciences) verwendet, die an einer FPLC-Anlage (Äkta Basic, Amersham Biosciences) mit der zugehörigen Software Unicorn angeschlossen war. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die Säule mit folgenden Proteinen (Molekulargewichte in Klammern angegeben) geeicht, die zuvor in dem als Laufmittel dienenden Puffer gelöst wurden: Dextran Blau 2000 (\cong 2000000 Da), Rinderserumalbumin (67000 Da), Ovalbumin (43000 Da), Chymotrypsinogen A (25000 Da), Ribonuklease A (13700 Da), Cytochrom *c* (12500 Da), Aprotinin (6500 Da).

Als Laufmittel wurden folgende Pufferlösungen verwendet:

- 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 8) oder 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (150 mM NaCl, pH 7,5) für FePPIX-*maquettes*,
- 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (150 mM NaCl, pH 7,3) für ZnPheida- und ZnCe₆-*maquettes*,
- 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (5 mM MgSO_4 , 0,9 % OG, pH 7,8) für die Modellsysteme der Lichtsammelkomplexe.

Die Chromatographie wurde unter Grünlicht bei 283 K durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,5 – 0,7 ml/min und die Detektion der Apo-peptide erfolgte bei 260 und 280 nm. Die Holo-peptide wurden zusätzlich bei 420 nm detektiert. Für die Molekulargewichtsbestimmungen wurden 100 μl Peptidprobe ($c = 50 - 100 \mu\text{M}$) in die Probenschleife injiziert und auf die Säule aufgetragen.

Aus dem Chromatogramm kann für jeden eluierten Peak das Elutionsvolumen (V_e) abgelesen werden. Das Elutionsvolumen ist das Volumen, das von der Probenaufgabe bis zum erscheinen des Peakmaximums über die Säule gepumpt wird und hängt vom totalen Säulenvolumen V_t und der Qualität der Säulenpackung ab. Bei der Superdex75 HR10/30-Säule wird vom Hersteller ein Säulenvolumen von $V_t = 24 \text{ ml}$ angegeben. Die Elution eines Probenbestandteils wird durch den Verteilungskoeffizienten K_{av} charakterisiert. Das Volumen der mobilen Phase in der Säule, das als Totvolumen V_0 bezeichnet wird, kann durch Dextran Blau 2000 bestimmt werden. Dieses Molekül ist so groß, dass es von der Diffusion auch in die größten Hohlräume des Säulenmaterials ausgeschlossen ist und damit ohne Bindungsaffinität durch das Säulenmaterial wandert.

$$\text{Mit der Formel } K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_t - V_0)} \quad (\text{Amersham Biosciences, 2002}) \quad (4.3.3.1)$$

kann durch die Auftragung von K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes des jeweiligen Eichproteins eine Eichgerade ermittelt und folglich mit dem K_{av} -Wert der zu untersuchenden Probe das Molekulargewicht bestimmt werden.

4.3.4 Bestimmung der pH-Abhängigkeit von FePPIX-me-1

Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit des FePPIX-me-1-Komplexes wurden folgende Pufferlösungen für die entsprechenden pH-Bereiche verwendet:

pH	Pufferbestandteile
3,0 - 3,5	50 mM NaAc, 100 mM KCl
4,0 - 6,0	50 mM MES, 100 mM KCl
7,0 - 8,5	50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM KCl
9,0 - 11,0	50 mM Glycin, 100 mM KCl

Das Metallopeptid (6 μM) wurde in gleichen Konzentrationen zu den oben genannten Pufferlösungen mit pH-Werten von 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 8,5; 9,0; 10,0 und 11,0 gegeben, wobei der Einbau des Hämins durch die Lage der Soretbande im UV-Vis-Spektrum kontrolliert wurde. Bei vollständigem Einbau des Hämins in das Peptid me-1 befindet sich die Soretbande bei 413 nm. Ein unvollständiger Einbau oder eine schwache Bindung verschiebt die Soretbande zu kürzeren Wellenlängen.

4.3.5 Denaturierung der Apo- und Holopeptide

Die Entfaltung des Apo- bzw. Holopeptides erfolgte durch Zugabe des chaotropen Agens Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl). Hierzu wurde eine 8 M Vorratslösung von GdnHCl in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 8) angesetzt. Von dieser Lösung wurden Konzentrationsreihen erstellt, indem die Konzentration von GdnHCl schrittweise um 0,5 M erhöht wurde, bis schließlich eine Endkonzentration an GdnHCl von ca. 7,5 M dem Peptid zugesetzt wurde. Die genaue GdnHCl-Konzentration in der jeweiligen Probenlösung wurde mit Hilfe eines Refraktometers bei 294 K bestimmt. Dabei wurde zunächst der Brechungsindex des verwendeten Puffers gemessen, um diesen von dem jeweiligen Brechungsindex der Puffer-GdnHCl-Mischung zu subtrahieren, in dem das Peptid

($c = 8 - 15 \mu\text{M}$) gelöst vorlag. Aus diesem Δn -Wert wurde die vorliegende Konzentration an GdnHCl mit folgender Gleichung ermittelt (Pace, 1986):

$$c = 57,15(\Delta n) + 36,80(\Delta n)^2 - 91,60(\Delta n)^3. \quad (4.3.5.1)$$

Die Peptidproben wurden für 60 min bei RT in dem Denaturierungsmittel inkubiert, bevor die Auswirkungen von GdnHCl auf die Peptide anhand von Fluoreszenz-, CD- oder UV-Vis-Messungen untersucht wurden.

Die Fluoreszenz von Tryptophan kann zur Ermittlung der freien Entfaltungsenthalpie ΔG_{H_2O} eines Proteins in wässriger Lösung genutzt werden, da die Lage des Tryptophanfluoreszenzmaximums von seiner Umgebung abhängt. Im gefalteten Peptid befindet sich das Tryptophan in hydrophober Umgebung. Durch Zugabe eines denaturierenden Agens wie GdnHCl gelangt es aufgrund der Entfaltung des Peptids zunehmend in die hydrophilere Umgebung des Wassers. Dieses hat eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zur Folge, deren Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration zur Erstellung von Denaturierungskurven genutzt werden kann. Die Denaturierungskurven, aus denen die Stabilitätsparameter eines Peptids gewonnen werden, ergeben sich aus der Auftragung des Anteils an gefaltetem Peptid f gegen die Konzentration des denaturierenden Agens. Ausgehend von einem Zwei-Zustandsmodell mit einem Zustand der komplett gefalteten Struktur und dem Parameter Φ_g , der in diesem Fall der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von Tryptophan ohne GdnHCl-Zusatz entspricht und einem Zustand der vollständig entfalteten Struktur, der als Parameter Φ_e angegeben wird, ergibt sich der Anteil des gefalteten Peptids f zu:

$$f = \frac{\Phi_{obs} - \Phi_e}{\Phi_g - \Phi_e} \quad (4.3.5.2)$$

In der Gleichung 4.3.5.2 ist Φ_{obs} die beobachtete Verschiebung des Maximums der Tryptophanfluoreszenz bei einer bestimmten Konzentration des denaturierenden Agens.

Die freie Gibbs-Enthalpie der Entfaltung ΔG_{obs} gibt den Energieunterschied zwischen gefaltetem und denaturiertem Zustand an:

$$\Delta G_{obs} = -RT \ln K = -RT \ln[(1-f)/(f)] \quad (4.3.5.3)$$

Zwischen der freien Entfaltungsenthalpie und der GdnHCl-Konzentration besteht eine lineare Abhängigkeit, deren Parameter m als Maß für die Kooperativität des Entfaltungsprozesses bezeichnet wird (Tanford, 1970; Dill und Shortle, 1991):

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{H_2O} - m \cdot c_{GdnHCl} \quad (4.3.5.4)$$

Die Kooperativität der Entfaltung gibt an, wie stark die Stabilität der Polypeptide im Verlauf der Denaturierung von der bereits vorliegenden Entfaltung beeinflusst wird. Der Parameter für die freie Entfaltungsenthalpie ohne Denaturierungsreagenzien ΔG_{H_2O} , der als Maß für die Stabilität der *de novo* synthetisierten Peptide in wässriger Lösung gilt, und der Parameter m können durch Auftragung von f gegen die Konzentration an GdnHCl erhalten werden. Durch Gleichsetzen der Formeln 4.3.5.3 und 4.3.5.4 und der daraus gewonnenen Gleichung wird diese den Messpunkten angepasst:

$$f = \frac{1}{(1 + e^{-k(x-b)})} \quad (4.3.5.5)$$

$$\text{mit } k = -\frac{m}{RT} \text{ und } b = \frac{\Delta G_{H_2O}}{m}.$$

Analog zur Fluoreszenzspektroskopie bietet die CD-Spektroskopie unter Anwendung der Gleichung 4.3.5.2 die Möglichkeit, ΔG_{H_2O} aus dem Intensitätsverlust des $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs bei 222 nm mit zunehmender Konzentration des Denaturierungsmittels zu bestimmen. In diesem Fall gibt der Parameter Φ_g das Maximum der Elliptizität bei 222 nm ohne GdnHCl-Zusatz und Φ_e das Minimum des Drehwertes nach Inkubation von 7,5 M GdnHCl an. Der Parameter Φ_{obs} entspricht dem beobachteten Drehwert bei einer bestimmten GdnHCl-Zugabe.

Für die Stabilitätsbestimmung des FePPIX-me-1-Komplexes in der vorliegenden Arbeit mittels UV-Vis-Spektroskopie gab die schmale Soretbande des *maquettes* bei 413 nm den Zustand der kompletten Faltung und die breite Soretbande der freien Hämingruppe mit einem Absorptionsmaximum bei 380 nm den Endzustand der Entfaltung an. Nach jeder Zugabe von GdnHCl zum Peptid-Komplex konnte durch Linearkombination dieser beiden Zustände der momentane Entfaltungszustand und daraus die Stabilität ermittelt werden.

4.3.6 Isolierung des natürlichen LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* WT

Der LH2-Komplex von *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (WT) wurde aus gefriergetrockneten Zellen, die von M. Reus aus der Arbeitsgruppe von Prof. Holzwarth erhalten wurden, isoliert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 20 mM Tris/HCl (pH 8) gelöst und anschließend zentrifugiert (Beckman, JA-10, 277 K, 8000 UpM, 20 min). Das Pellet wurde in 20 mM Tris/HCl (pH 8) aufgenommen und erneut zentrifugiert (Beckman, JA-10, 277 K, 8000 UpM, 20 min). Nach der Resuspension des Pellets in 20 mM Tris/HCl (pH 8) und dem Hinzufügen von DNase I (Merck) wurden die Zellen mit einem Sonifier aufgeschlossen und auf Eis gelagert. Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation (Beckman, JA-10, 277 K, 10000 UpM, 25 min) von den in Lösung befindlichen Lichtsammelkomplexen abgetrennt. Nach erneuter Zentrifugation des Überstandes (Beckman, Ti-70, 277 K, 90 min, 43000 UpM) wurde das Pellet in 20 mM Tris/HCl (pH 8) resuspendiert. Zur Isolierung des Antennensystems wurden die Membranen für 60 min mit 1 % LDAO (v/v) bei 277 K gerührt und anschließend in Zentrifugenröhrchen mit einem Saccharosedichtegradienten (1,2 M; 0,6 M; 0,4 M) überführt und ultrazentrifugiert (Beckman, SW28, 17 h, 277 K, 28000 UpM). Der LH-Komplex sammelte sich im 0,6 M Saccharosebereich an (Kontrolle durch Absorptionsmessungen). Als weiterer Reinigungsschritt wurde eine selbstgepackte DEAE-Sephacel-Säule (80 x 7 mm) verwendet. An einer LPLC-Anlage (Pharmacia) wurde die Säule mit 20 mM Tris/HCl (0,1 % LDAO, pH 8) equilibriert und die Verunreinigungen mit einem Gradienten bis 150 mM NaCl innerhalb von 20 min eluiert. Der Antennenkomplex konnte bei einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl in 20 mM Tris/HCl (0,1 % LDAO, pH 8) von der Säule eluiert werden. Die Aufbewahrung der Probe erfolgte bei 253 K.

4.3.7 Rekonstitution der synthetischen Lichtsammelkomplexe

Die lyophilisierten β -Peptide sph β 31 (Teilsequenz des β -Peptids aus LH1 von *Rb. sphaeroides*, PDB: 1DX7) und sph β 50 (Gesamtsequenz des β -Peptids aus LH2 von *Rb. sphaeroides*, NCBI: AAA26130) wurden in 10 – 30 μ l HFA gelöst und zu einer 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Pufferlösung (5 mM MgSO_4 , 4,5 % n-Octyl- β -glucopyranosid (OG), pH 7,8) gegeben. Anschließend wurde die gleiche Pufferlösung ohne OG hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,66 % OG in der Probenlösung erreicht wurde. Die α -Untereinheiten (sph α 31 als Teilsequenz des α -Peptids aus LH1 von *Rb. sphaeroides*, NCBI: Q3I1A4 und sph α 54 als Gesamtsequenz des α -Peptids aus LH2 von *Rb. sphaeroides*, NCBI:

AAA26131) wurden in 10 – 30 μl HFA gelöst und im molaren Verhältnis von 1:1 zum entsprechenden β -Peptid hinzugegeben. Die Peptidlösung wurde anschließend mit Argon gespült und BChl*a* (in Methanol) und Lutein (in Ethanol) in einem molaren Konzentrationsverhältnis von 3:1 (BChl*a*:Peptide) und 2:1 (Lutein:Peptide) in Anlehnung einer natürlichen LH-Untereinheit zum Peptidgemisch hinzugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 277 K inkubiert und am darauf folgenden Tag bei gleicher Temperatur vermessen.

4.4 Spektroskopische Methoden

4.4.1 Absorptionsspektroskopie

Absorptionsmessungen wurden mit einem Cary 5 UV-Vis-NIR- (Varian, CaryWinUV Software), mit einem Shimadzu- (UV-2401, UVPC-Software) oder einem Dioden-Array- (HP 8453, Hewlett Packard)-Spektrophotometer aufgenommen. Die Standardmessungen erfolgten bei RT. Für Messungen bei Temperaturen unterhalb RT wurde beim Cary 5 der Küvettenhalter mit Hilfe eines Peltier-Elementes gekühlt und mit Stickstoff umspült, um Kondenswasserbildung an den Küvetten zu vermeiden. Die Spektren wurden mit der Basislinie des reinen Lösungsmittels korrigiert. Für die Messungen wurden Quarzküvetten mit Schichtdicken von 0,02 cm (Sonderanfertigung) bis 5 cm verwendet; die Schichtdicke entsprach 1 cm bei Standardmessungen. In den Zweistrahlphotometern diente das Lösungsmittel der Probe als Referenz. Für die Untersuchung der Grundzustandsreaktionen zwischen Zinkchlorinen und Chinonen (Kap. 5.2.6) wurde das HP Dioden-Array-Photometer zur Aufnahme der Kinetiken bei charakteristischen Wellenlängen eingesetzt.

Die Standard-Probenkonzentration bei der Aufnahme der UV-Vis-Spektren lag zwischen 5 und 10 μM . Die Angabe von relativen Intensitäten in den Kap. 4.2.1 bis 4.2.10 ergänzen die aufgeführten Absorptionswellenlängen.

Der Ablesefehler für die in Kapitel 5 angegebenen Absorptionswellenlängen betrug $\pm 0,5$ nm.

4.4.2 Transiente Absorptionsspektroskopie

Für die zeitaufgelösten Absorptionmessungen wurde als Anregungslichtquelle die zweite Harmonische eines Nd:YAG Brilliant Laser (532 nm) in Kombination mit einem *Optical Parametric Oscillator* (OPO), (Opotek, Vibrant, 355 II) verwendet. Als Anregungswellenlängen wurden die Lage der Soret- und Q_y-Bande der untersuchten Zinkchlorin-Systeme gewählt. Der erzeugte Lichtpuls mit einer Länge von ca. 15 ns traf mit einer Energie von bis zu 10 mJ auf die Probe, die sich in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke befand. Zur Abschwächung der Laserleistung dienten geeignete Drahtnetze. Die Probe ($c = 6 - 15 \mu\text{M}$) wurde sowohl im Luft- als auch Argon-gesättigten Zustand bei RT vermessen. Als Messlicht diente eine 150 W Xenon-Lampe (Schoeffel), deren Wellenlängen durch einen Monochromator (Applied Photophysics) selektiert wurden. Die Detektion erfolgte über einen Photomultiplier (R955, Hamamatsu) und zwei Transientenrecorder (7912AD und 390AD, Tektronix).

Für die *intersystem crossing* Quantenausbeute Φ_{isc} wurde als Referenz der Wert von Chla in Ethanol von $\Phi_{\text{isc}} = 0,5$ verwendet (Jabben et al., 1986). Die experimentell bedingten Fehler betragen für $\Phi_{\text{isc}} \pm 15\%$ für Werte $>0,2$ und $\pm 30\%$ für Werte $<0,2$.

Für die Elektronentransferuntersuchungen wurden die verwendeten Chinone direkt vor der Messung in deionisiertem Wasser (*p*-Benzochinon) oder DMSO (Phenyl-*p*-Benzochinon) gelöst und zu den Chlorinsystemen hinzugegeben. Für die Messungen in Abhängigkeit von der Temperatur wurde die zu untersuchende Probe in einer Puffer/Glycerin-Lösung (2:3, v/v) gelöst und sowohl im Luft- als auch Argon-gesättigten Zustand vermessen. Als Reaktionsgefäß diente ein Quarz-Vierkant-Röhrchen, das zur Kühlung mit flüssigem Stickstoff umspült wurde. Ein Temperaturfühler, der sich im Probengefäß befand, gab die jeweilige Messtemperatur an.

Zur Datenerfassung und den kinetischen Analysen diente ein Archimedes Computer (Acorn). Die Auswertung der Kinetiken erfolgte nach einer Reaktion (pseudo) 1. Ordnung. Die Fehler der ermittelten Triplettlebensdauer τ_{T} und der Geschwindigkeitskonstanten durch Löschung mit Sauerstoff (k_{ox}) und durch Chinone (k_{q}) entsprachen $\pm 10\%$.

4.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Emissionsspektren und angeregte Fluoreszenzspektren wurden mit einem Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer (Varian) mit zugehöriger Software (Cary Eclipse) aufgenommen. Hierfür wurden Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke bei RT verwendet. Temperaturabhängige Messungen bis 277 K konnten mit Hilfe eines Peltier-Kühlers erreicht werden, wobei der Küvettenhalter auf die entsprechende Temperatur gebracht und der Probenraum mit Stickstoff gespült wurde.

Die Standardprobenkonzentration betrug zwischen 5 und 10 μM . Im Allgemeinen betrug der Ablesefehler aller in Kapitel 5 angegebenen Fluoreszenzwellenlängen ± 1 nm. Für die Auswertung der Tryptophanfluoreszenz wurde das Maximum der Messkurve mit der Anpassung nach Gauss bestimmt. Die Fluoreszenzquantenausbeute der Chlorinsysteme wurde nach Anregung bei 418 nm anhand der Fläche unter der Q_y -Bande durch Gauss-Anpassung bestimmt. Für die Messung wurden die Probenkonzentrationen so eingestellt, dass alle Proben bei 418 nm mit gleicher Intensität absorbierten. Als Referenz diente Chla in Aceton mit einer Quantenausbeute von $\Phi_F = 0,24$ (Bohne et al., 1988). Es wurden Fehler von ± 10 % für Werte $> 0,1$ und von ± 20 % für Werte $< 0,1$ angenommen.

4.4.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie wurde ein F900 Spektrofluorometer (Edinburgh Instruments) verwendet, das im Single-Counting Modus arbeitet. Die Anregungswellenlänge der Proben betrug 385 nm (LED, PLS 370, PicoQuant). Als Emissionswellenlänge wurde die Lage der Q_y -Bande der Zinkchlorine in Lösung bzw. in peptidgebundener Form verwendet. Zur Datenauswertung fand eine Akkumulation von 3000 Einzelphotonenspektren statt. Die Zeitskala der Aufnahme betrug 100 ns mit einer Zeitauflösung von 0,2 ns. Zur Aufnahme der Apparatefunktion wurde eine Streulichtmessung mit einer Ludox-Suspension (DuPont) durchgeführt. Bei gleichen Messbedingungen wurde ein Emissionsspektrum aufgenommen und von dem Spektrum der untersuchten Proben subtrahiert. Die Messung erfolgte bei RT in Luft- und Argon-gesättigten Lösungen. Für die Ermittlung der Fluoreszenzlebensdauer (τ_F) diente das Software-Paket F900 der Firma Edinburgh Instruments. Der absolute Fehler von τ_F betrug 0,2 ns.

4.4.5 Zirkulardichroismus

CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-715 CD-Spektrometer mit passender Software (SpectraManager) in Quarzküvetten mit 0,1 oder 0,2 cm Schichtdicke aufgenommen. Zur Detektion wurden folgende Photomultiplier der Firma Hamamatsu eingesetzt:

R376 (160 – 850 nm) und R316 (400 – 1100 nm).

Die Scan-Geschwindigkeit betrug 100 nm/min. Die eingestellte Bandbreite war 1 nm und es wurden jeweils, soweit nicht anders angegeben, zwei Spektren akkumuliert. Die Peptidkonzentration lag zwischen 5 und 50 μM in entsprechenden Pufferlösungen. Die Spektren wurden jeweils um die der Pufferbeiträge korrigiert.

4.4.6 Resonanz-Raman-Spektroskopie

Resonanz-Raman-Spektren wurden durch Anregung der Probe mit einem Ar^+/Kr^+ -Ionen-Laser (BeamLok 2060-6S, Spectra Physics) mit einer Leistung von 30 – 40 mW erhalten. Das gestreute Licht wurde auf einen Monochromator (TriplePro, Acton Research, 2400 Striche/mm holographisches Gitter) gelenkt, der zur spektralen Zerlegung des Streulichts diente. Eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte CCD-Kamera (Spec10-LN, Princeton Instruments) wurde als Detektor verwendet. Interferenzfilter (Edmund Optics) wurden zur Eliminierung von Laserseitenbanden eingesetzt. Die Spektrenaufnahme erfolgte unter Verwendung der Software Acton Research SpectraSense.

Die Resonanz-Raman-Spektren wurden bei 77 K in Q-Band EPR-Röhrchen aufgenommen. Die Proben wurden vor der Messung durch die *freeze-pump-thaw*-Methode entgast und das Quarzröhrchen unter Argon abgeschmolzen. Die Anregung der FePPIX-Proteine erfolgte bei 407 nm. Für ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis wurden 20 – 60 Spektren à 30 s gemittelt. Die Konzentration der Proben wurde so eingestellt, dass im Bereich der Anregungswellenlänge eine $\text{OD} \approx 5$ in 50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,0) vorlag. Die Reduktion der Hämiproteine erfolgte durch Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Für die Auswertung wurden die Spektren jeweils um das Spektrum des Lösungsmittels korrigiert. Der Ablesefehler der Wellenzahlen betrug $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

4.4.7 EPR-Spektroskopie

Die Aufnahme der EPR-Spektren erfolgte an X- und Q-Band EPR-Spektrometern der Firma Bruker.

Die X-Band *cw*-EPR Spektren der Hämin-Peptide wurden an einem Elexsys Spektrometer aufgenommen. Die Konzentrationen der untersuchten Peptidproben betragen 400 – 600 μM . Die Messtemperatur war 20 K. Die aufgenommenen Spektren wurden gemittelt und basislinienkorrigiert.

Die X-Band *cw*-EPR Spektren und die X-Band Puls-EPR-Spektren der Zinkchlorin-Triplettzustände wurden an einem ESP 380-E-Gerät aufgenommen. Die Proben wurden mit einem OPO VisIR 100 (Vibrant) belichtet, der wiederum von einem Nd:YAG Laser Typ GCR 130 (Spectra Physics) betrieben wurde. Die Messtemperatur der *cw*-EPR-Aufnahmen lag zwischen 180 und 220 K. Die Aufnahme der Puls-EPR-Spektren erfolgte bei 5 K. Die Pulslängen betragen $\pi/2 = 16$ ns und $\pi = 32$ ns, die Zeit zwischen den Pulsen $\tau = 200$ ns. Die Zeit zwischen der Laseranregung und dem ersten Puls war $\tau_{\text{DAF}} = 520$ ns. Die Anregungswellenlängen betragen, wenn nicht anders angegeben, 590 nm für ZnPheida-Proben und 639 nm für ZnCe₆-Proben.

Die X-Band 2D-Puls-ESEEM-Messungen an Zinkchlorinen wurden ebenfalls an einem ESP 380E Spektrometer mit einem dielektrischen Ringresonator (Bruker) (ESP380-1052 DLQ-H) aufgenommen. Die Pulssequenz war $\pi/2$ - τ - $\pi/2$ - t_1 - $\pi/2$ - τ -Echo, wobei $\pi/2 = 16$ ns, $\tau = 112$ ns und $t_1 = 40$ ns betragen. Die Probenanregung erfolgte mit gleichem Lasersystem wie oben beschrieben. Die Messung wurde bei 5 K durchgeführt. Die aufgenommenen Spektren wurden mit Hilfe der Software WinEPR (Version 2.11, Bruker) basislinienkorrigiert (lineare bzw. quadratische Funktion). Des Weiteren wurde die Zeitverfolgung mit einer Hamming-Funktion multipliziert und die Datensätze mit 1024 x 1024 Punkten aufgefüllt. Nach zweifacher Fouriertransformation der Zeitachsen wurden diese in Frequenzachsen umgewandelt. Die Darstellung der Spektren erfolgte als Konturenspektren.

Die X-Band Triplett-EPR-Spektren der untersuchten Zinkchlorine wurden an einem ESP 380-E FT-EPR Spektrometer mit einem dielektrischen Saphirring-Resonator ER4118X-MD-5W1 aufgenommen. Die Probenbelichtung erfolgte wie oben beschrieben.

Die Q-Band Triplett-EPR-Spektren wurden mit einem Elexsys 580 Super QFT Spektrometer (Bruker) mit einem hausintern gebauten zylindrischen Resonator gemessen. Für die Probenbelichtung wurde ein OPO (Vibrant 355 II, Opotek) verwendet, der mit einem Nd:YAG Laser Brilliant betrieben wurde. Die Messungen wurden zwischen 200 und 220 K durchgeführt.

Die auf die Zinkchlorine ($c = 200 - 500 \mu\text{M}$) treffende Laserleistung betrug in allen Fällen zwischen 12 und 15 mJ/Puls. Als Glasbildner wurde allen Zinkchlorin-Proben 60 % Glycerin zum Puffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM KCl, pH 7,3 oder 25mM Glycin, 50 mM NaCl, pH 10) hinzugefügt. Die Messfrequenz aller X-Band-Messungen betrug 9,7 GHz und die der Q-Band-Messungen 33,6 GHz. Alle EPR-Proben wurden vor der Messung entgast, unter Grünlicht in den Resonator eingeführt und durch einen Oxford Heliumkryostaten (Model CF935) mit Temperatursteuerung (ITC4) gekühlt.

4.4.8 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren der Pigmente wurden mit einem 400 MHz-Gerät (DRX-400, Bruker) bei RT aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf das verwendete deuterierte Lösungsmittel. Die Signalmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett. Das Lösungsmittel Pyridin- d_5 zeigt Signale bei 7,19, 7,56 und 8,69 ppm. Der Fehler der Signalzuordnung lag bei 0,1 ppm. Die Zuordnung der Signale für die (Bakterio)Chlorinderivate erfolgte mit Hilfe entsprechender Literaturdaten (Bönigk, 1994, Scheer, 1991, Smith, 1976).

Die NMR-Untersuchungen an “sph β 31“ wurden von Dr. P. Schmieder (Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie, Berlin) durchgeführt und ausgewertet. Für die Spektrenaufnahme wurde ein AV600-Gerät (Bruker Biospin) eingesetzt. Die Messtemperatur betrug 300 K. Das lyophilisierte Peptid wurde in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) gelöst, so dass eine Konzentration von $c = 320 \mu\text{M}$ vorlag. Es wurden neben einem ^1H -NMR-Spektrum auch zweidimensionale ^1H -NMR-Spektren zur Protonenzuordnung aufgenommen ($\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$ -, $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$ -NOESY (Mischzeit: 150 msec) und $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$ -TOCSY-Spektren (Mischzeiten: 32 und 80 msec)).

4.5 Elektrochemische Methoden

4.5.1 Elektrochemische Redoxtitration

Die elektrochemische Redoxtitration wurde in Kombination mit der Aufnahme von UV-Vis-Spektren an Cyt_c, FePPIX-me-1 und FePPIX-me-2 durchgeführt. Die Messung fand unter anaeroben Bedingungen in einer speziell angefertigten Quarzküvette ($V = 2,5$ ml) mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem abgedichteten Aufsatz für die Elektroden und Begasungsvorrichtung statt. Zur Verfolgung der Potentialänderung diente ein pH Meter (pHM 63 Digital pH Meter, Radiometer). Die Änderung des Redoxzustands bei Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ als Reduktions- bzw. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ als Oxidationsmittel konnte mit einem Dioden-Array Spektrophotometer (HP 8452 A, Hewlett-Packard) mit zugehöriger Software (HP 89532 A UV-Vis Software) an der Absorptionsänderung der α -Bande beobachtet werden. Eine Silber-Silberchlorid-Elektrode ($\text{Ag}/\text{AgCl}/1$ M AgCl) diente als Referenz- und ein Platindraht als Gegenelektrode.

Der Peptidkomplex ($c = 6 - 10$ μM) wurde in einer *Glovebox* in einem argongesättigten Puffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8) gelöst und eine geeignete Mediatorenmischung in DMSO (Tab. 6 und 7) hinzugegeben. Der Gesamtanteil an DMSO in der Peptidprobe betrug $<2,5$ %. Die Mediatoren sorgten für einen schnellen Elektronenaustausch zwischen Elektrode und Protein. Während der Messung wurde die Küvette mit Argon begast, das vor Verwendung durch eine Oxisorb-Säule (Messer-Griesheim) geleitet wurde. Nach jeder Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (Stammlösung $c = 2 - 10$ mM in 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8) bzw. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Stammlösung $c = 1$ mM in 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8) wurde die Peptidlösung gerührt und anschließend 2 – 3 min gewartet, bis sich ein Potentialgleichgewicht eingestellt hat. Zur Ermittlung des Halbstufenpotentials $E_{m,\text{pH}}$ wurde nach jeder Zugabe des Reduktionsmittels der Anteil der reduzierten Form gegen das Potential aufgetragen. Die Auftragung der ermittelten Werte aus der Absorptionsänderung der Soretbande (anstelle der α -Bande) gegen das Potential lieferte die gleiche Abhängigkeit. Die erhaltenen Kurven wurden an folgende Gleichungen angepasst, die eine Umstellung der allgemeinen Nernst-Gleichung (Gl. 4.5.1.1) darstellen:

$$y = \frac{1}{1 + 10^{(E - E_m)/(60/n)}} \quad (\text{für ein Halbstufenpotential})$$

$$\text{bzw. } y = \frac{0,5}{1 + 10^{(E-E_{m1})/(60/n_1)}} + \frac{0,5}{1 + 10^{(E-E_{m2})/(60/n_2)}} \quad (\text{für zwei Halbstufenpotentiale}) \quad (4.5.1.1)$$

mit $y = \text{Anteil der reduzierten Form (Red)/(Red + Ox)}$

$E = \text{zugehöriges Potential der Zelle}$

Den Anpassungen wurden die Halbstufenpotentiale $E_{m1,2}$ entnommen. Für die FePPIX-Peptid-Komplexe ($\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$) entspricht $n = 1$.

Für die Bestimmung des Halbstufenpotentials von Cyt c musste das Protein zunächst durch Zugabe von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ vollständig oxidiert worden, da es in der Mediatoren-Pufferlösung bereits zu Beginn der Messung teilweise reduziert vorlag.

Ein Teil der Mediatoren, die zur Bestimmung der Halbstufenpotentiale der FePPIX-Peptide verwendet wurden, waren nach einmaliger Reduktion nicht mehr redoxaktiv. Für Wiederholungsmessungen war es deshalb notwendig, eine neue Peptidlösung mit einer frisch angesetzten Mediatorenmischung zu verwenden.

Nach jeder Versuchsreihe wurde zur Eichung der Referenzelektrode das Halbstufenpotential von Methylviologen ($E_{MV\text{vs}Ag/AgCl}$) durch Aufnahme eines zyklischen Voltammogramms oder durch Anwendung der *Square-Wave*-Methode unter gleichen Messbedingungen bestimmt. Das Halbstufenpotential von Methylviologen ist pH-unabhängig und mit $E_{MV}^0 (MV^{2+} / MV^+)$ = -448 mV gegen NHE bekannt (Wardman, 1989). Der gemessene Potentialwert der Peptidkomplexe gegen Ag/AgCl ($E_{\text{vs}Ag/AgCl}$) kann als Potential gegen NHE mit folgender Gleichung umgerechnet werden:

$$E_{\text{vsNHE}} = (E_{\text{vsAgCl}} - E_{MV\text{vs}AgCl}) + E_{MV}^0 \quad (4.5.1.2)$$

Die Ermittlung der Halbstufenpotentiale der Mediatoren erfolgte durch zyklische Voltammetrie.

Tabelle 6: Verwendete Mediatoren für die chemische Redox Titration von Cyt c

Mediator	Konzentration (μM)	Halbstufenpotential $E_{m,pH7}$ vs. NHE (mV)
Phenazinthosulfat	16	+63
2,6-Dichlorophenol-Indophenol	10	+265
N,N-Dimethyl- <i>p</i> -phenylendiamin	16	+416
1,2-Naphthochinon	16	+125

Tabelle 7: Verwendete Mediatoren für die chemische Redoxtitration der FePPIX-Peptid-Komplexe

Substanz	Konzentration (μM)	Halbstufenpotential $E_{m,\text{pH}8}$ vs. NHE (mV)
Phenazin	10	-180
Phenazinmethosulfat	10	+82
Phenazinethosulfat	10	+63
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	10	-80
Anthrachinon-2-sulfonat	15	-237
2-Hydroxy-1,4-napthochinon	15	-228
1,4-Benzochinon	25	+280
1,2-Napthochinon	25	+125
1,4-Napthochinon	25	+28
Durochinon	40	+5
2,3,5,6-Tetramethyl- <i>p</i> -phenylendiamin	40	+234

4.5.2 Zyklovoltammetrie

Die Aufnahme der zyklischen Voltammogramme erfolgte mit einem Potentiostat der Firma EG&G Princeton Applied Research (Modell 273A). Die zu untersuchende Probenlösung befand sich in einem speziell angefertigten Glasgefäß ($V = 3 \text{ ml}$) mit Deckel und Öffnungen für die Elektroden und einer Argon-Zuleitung. Die Spannungsvorschubgeschwindigkeit (*scan rate*) betrug zwischen 50 und 200 mV/s. Das Halbstufenpotential ergibt sich bei reversibler Reaktion aus dem Mittelwert des Peakpotentials der Hinreaktion (Reduktion) und der Rückreaktion (Oxidation), (s. Kap. 3.2).

Als Referenzelektrode diente eine Kalomel-Elektrode ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/1 \text{ M KCl}$), als Gegenelektrode ein Platindraht und als Arbeitselektrode wurde eine Glascarbon-Elektrode eingesetzt. Die Messungen wurden in einer Argon-gesättigten Lösung bei 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 8) bei RT durchgeführt.

Auch zur Identifizierung von BChl*a* und ZnBPheid*a* wurde die Methode der zyklischen Voltammetrie angewendet. Hierfür wurde als Arbeitselektrode Glascarbon, als Gegenelektrode Graphit und als Referenz 0,01 M Ag/AgNO₃ verwendet. Als Elektrolytlösung dienten 5 ml Acetonitril (Uvasol-Qualität)/DMF (9:1, v/v), in denen 0,1 M Tetrabutylammoniumtetrafluoroborat als Leitsalz gelöst wurde. Die Pigmente wurden unter Argon aus dem Vorratsgefäß entnommen und in die argongesättigte Elektrolytlösung gegeben. Die Referenzelektrode wurde am Anfang und Ende der Messung gegen Ferrocen als Standard gemessen. Es wurde ein Wert von $E = +0,087 \text{ mV}$ ermittelt.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Wechselwirkung von Hämin mit *de novo* synthetisierten Peptiden

5.1.1 Charakterisierung von FePPIX-me-1

Das Modell des Peptids me-1 (Sequenzangabe s. Kap. 4.1.1, Tab. 1), das in diesem Abschnitt untersucht wird, beruht auf den B- und D-Helices der Cytb-Untereinheit des Cytbc₁-Komplexes aus *Rb. capsulatus* (Robertson et al., 1994), dem Prototypen [H24H10]₂ (Kap. 1.12). Es wurde bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Lubitz nach Austausch eines Leucins gegen Lysin an Position 28 zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Metalloporphyrinen und *de novo* synthetisierten Peptiden verwendet (Fahnenschmidt, 2000). Für dieses Peptid, zuvor von Fahnenschmidt als *maquette* verwendet und hier als me-1 bezeichnet (Abb. 32a), konnte bereits gezeigt werden, dass eingelagerte Häminmoleküle über zwei Histidine koordiniert werden (Abb. 32b), (Fahnenschmidt et al., 2000).

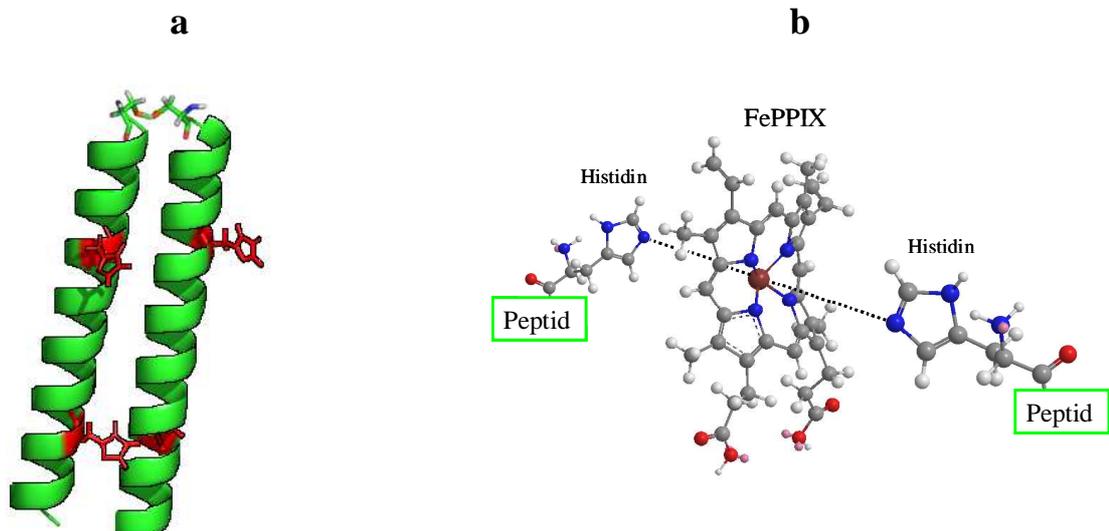


Abbildung 32: (a) Schematische Darstellung des Peptids me-1 mit einem Helix-turn-Helix-Bindungsmotiv (mit PyMOL™, Version 0.97, DeLano Scientific Software erstellt). Die Kofaktor-bindenden Histidine sind in rot hervorgehoben. (b) *bis*-Histidin-Koordination von FePPIX.

Das Peptid me-1 besitzt ein Helix-*turn*-Helix-Bindungsmotiv. Jede Helix besteht aus 27 Aminosäuren an deren N-Terminus nacheinander drei Glycine und ein Cystein gebunden sind. Das Cystein bildet mit einer gleichen, benachbarten Helix durch Luftoxidation eine Disulfidbrücke und damit den *turn* des Strukturmotifs. Bekanntlich erhöht eine derartige Disulfidbindung zwischen zwei parallelen α -Helices die Proteinstabilität, während die Proteinstruktur unverändert bleibt (Zhou et al., 1993).

Die Abbildung 33a zeigt eine Aufsicht entlang der Helixachsen des Vier-Helix-Bündels von me-1. Die Anordnung der überwiegend hydrophilen Aminosäuren auf einer Seite und der überwiegend hydrophoben Aminosäuren auf der anderen Seite einer Helix wird als amphipatisch bezeichnet. Ursprünglich wurde für den Prototypen [H24H10]₂ eine Zusammenlagerung vier solcher amphiphiler Helices unter Ausbildung einer *coiled coil* Struktur zu einem Vier-Helix-Bündel angenommen. Man kam zu dieser Annahme, da eine regelmäßige Aminosäuresequenz aus polaren und hydrophoben Aminosäuren vorliegt, die sich alle sieben Aminosäuren (a bis g) wiederholt (Abb. 33b). Die hydrophoben Aminosäuren 'a' und 'd' zeigen in das Innere des Peptids, wodurch sich ein hydrophober Bereich ausbildet. Die Kristallstruktur eines durch iterative Proteinmodellierung aus dem Prototypen entstandenen *maquettes* zeigte hingegen, dass die Winkel zwischen den Helices nicht einer typischen *coiled coil* Struktur entsprechen und die Anordnung der Helices flexibler ist (Huang et al., 2003). Dieses Strukturmotiv kann aber als vereinfachtes Modell des vorliegenden Vier-Helix-Bündels angenommen werden. Im Allgemeinen können Aminosäuren wie z. B. Histidin, Methionin oder Cystein den Kofaktor koordinativ über sein Zentralmetall binden. Diese Bindung kann durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Kofaktor unterstützt werden. Ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen tragen ebenfalls zur Gesamtstabilität des Protein-Kofaktor-Komplexes bei.

Die Abbildung 33a verdeutlicht, dass sich das Lysin, das von M. Fahnenschmidt anstelle des Leucins in die Sequenz eingebracht wurde, als hydrophile Aminosäure in Position 28 im hydrophoben Bereich befindet. Allerdings konnte bereits festgestellt werden, dass diese Substitution keine negative Auswirkung bezüglich der Bindungsaffinität und Gesamtstabilität im Vergleich zum ursprünglichen Modellsystem hat (Fahnenschmidt, 2000).

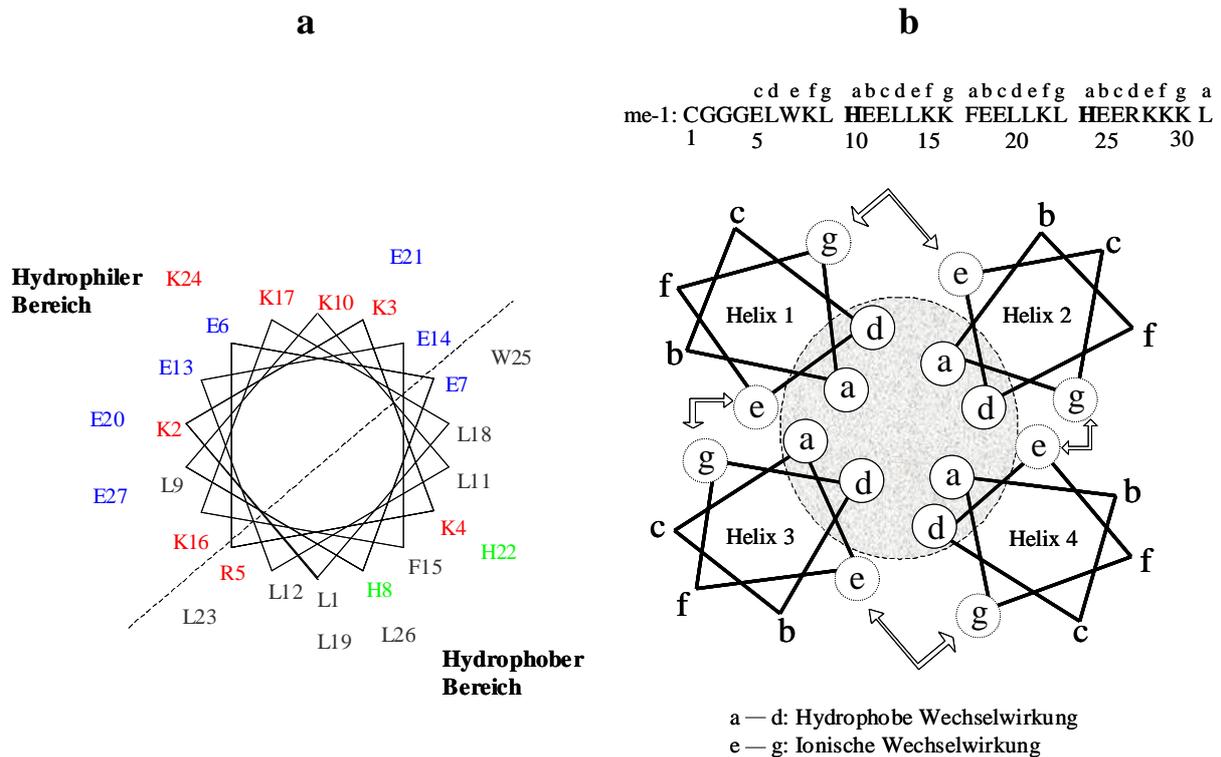


Abbildung 33: (a) Helixrad (*Helical Wheel*)-Darstellung entlang einer Helixachse vom N- zum C-Terminus am Beispiel von me-1 (erstellt mit WinPep, Version 3.01). (b) *Coiled coil* Struktur durch Zusammenlagerung von vier amphiphilen Helices unter Ausbildung eines Vier-Helix-Bündels. Die Heptadenpositionen einzelner Helices sind mit a bis g gekennzeichnet. Die hydrophoben Aminosäuren a und d zeigen ins Innere des Peptids und bilden den hydrophoben Bereich. Zwischen den e und g Positionen existieren ionische Wechselwirkungen.

Im Folgenden werden der Einbau von FePPIX in das Peptid me-1 und die Eigenschaften des entstandenen Kofaktor-Protein-Komplexes bezüglich seiner Sekundär- bzw. Tertiärstruktur, Stabilität und seines Redoxverhaltens beschrieben.

5.1.1.1 Einbau von FePPIX in me-1

Die Einlagerung von FePPIX (Fe(III)PPIX: Hämin, Fe(II)PPIX: Häm) in das Peptid me-1 konnte mit der UV-Vis-Spektroskopie verfolgt werden. Diese spektroskopische Methode gibt Aufschlüsse über den Oxidations- und Spinzustand des Eisens und ist die am häufigsten angewendete und effizienteste Technik zur Untersuchung von natürlichen und artifiziellen FePPIX-Proteinen (Lombardi et al., 2001). Nicht-kordiniertes Hämin absorbiert in einer 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 8)-Pufferlösung zwischen 340 und 420 nm mit einem Maximum bei 380 nm. Diese breite Soretbande ist auf Aggregation von Häminmolekülen in wässriger Umgebung zurückzuführen. Eine weitere und im Vergleich zur Soretbande ca. 10-fach schwächere Absorption ist bei 640 nm zu beobachten.

Nach Zugabe des Peptids me-1 zeigt das UV-Vis-Spektrum sowohl eine schmale Soretbande bei 413 nm ($\epsilon_{412} = 1,24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Robertson et al., 1994) als auch die im Kapitel 3.1.1 bereits beschriebenen α - und β -Banden bei 558 und 537 nm (Abb. 34), die sich mit dem dort erläuterten Vier-Orbital-Modell nach Gouterman erklären lassen. Die beobachteten Absorptionsbanden sind auch von natürlichen Cytochromen bekannt, in denen eine sechsfache Koordination des Hämins vorliegt (Moore und Pettigrew, 1990). Ein weiterer Hinweis einer sechsfachen Koordination ist das Verschwinden der Absorptionsbande bei 640 nm. Diese Bande, die aus einem „charge transfer“ zwischen dem π -Orbital des Porphyrins und dem d-Orbital des Eisens resultiert, weist auf eine *high spin*-Spezies hin, die typisch für FePPIX-Proteine mit einer His/H₂O-Koordination des Zentralmetalls ist (Brill und Williams, 1961; Moore und Pettigrew, 1990). Eine Anlagerung von H₂O an Hämin tritt auf, wenn der Kofaktor vier- oder fünffach koordiniert vorliegt oder für den Fall, dass der sechste Ligand nur sehr schwach gebunden ist und vom Wassermolekül verdrängt werden kann. Das Fe³⁺-Ion im FePPIX-me-1 lässt sich durch Natriumdithionit als Reduktionsmittel zu Fe²⁺ reduzieren. Das entstehende reduzierte Fe(II)PPIX-*maquette* zeigt daraufhin eine bathochrome Verschiebung der Soretbande zu 425 nm und eine starke Intensitätszunahme der α -Bande, während die Intensität der β -Bande nur leicht ansteigt (Abb. 34). Der Extinktionskoeffizient dieser Verbindung beträgt $\epsilon_{425} = 1,60 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in gleicher Pufferlösung wie oben beschrieben. Der Komplex ist unter Sauerstoffausschluss stabil und lässt sich durch Luftsauerstoff oder unter anaeroben Bedingungen durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat als Oxidationsmittel wieder zum Fe(III)PPIX-*maquette* oxidieren.

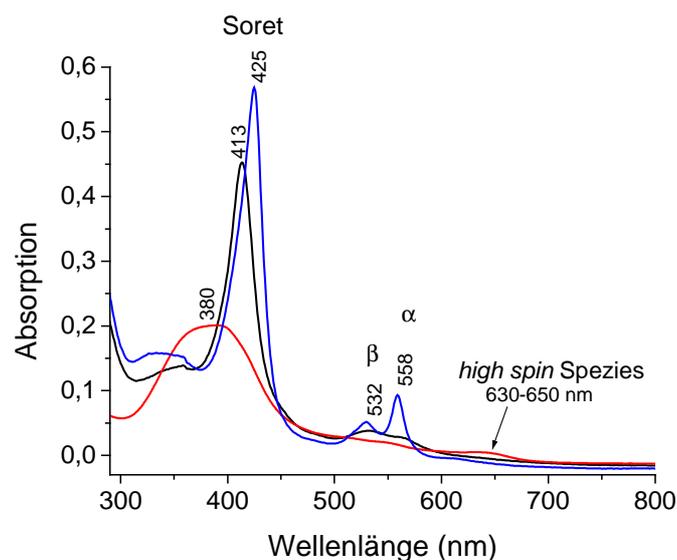


Abbildung 34: Absorptionsspektrum des freien Hämins ($c = 4 \mu\text{M}$) in 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 8) (rot) sowie des Hämin-me-1-Komplexes (schwarz) und seiner reduzierten Form Häm-me-1 (blau). Freies bzw. durch Wasseranlagerung fünffach koordiniertes Hämin absorbiert bei 630 – 650 nm. Diese Bande ist charakteristisch für eine *high spin*-Spezies.

Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit zeigten, dass der FePPIX-me-1-Komplex im Bereich zwischen pH 5 und 10 stabil ist. Hierfür wurde das Holopeptid in gleicher Konzentration in verschiedene Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten gegeben und die Lage der Soretbande durch UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. In sauren und alkalischen Bereichen ausserhalb der angegebenen Grenzen kam es zu einer hypsochromen Verschiebung und einer Intensitätsabnahme der Soretbande. Diese Beobachtungen sind auf Freisetzung von Hämin zurückzuführen, bedingt durch beginnende Entfaltung des Peptids. Die größte Stabilität weist die Verbindung bei pH 8 auf. Der Strukturverlust $< \text{pH } 4$ bzw. $> \text{pH } 10$ lässt keine (vollständige) Koordination des Kofaktors mehr zu. Zusätzlich kann der Verlust an Bindungsaffinität des Hämins an das Peptid einerseits durch die Protonierung der Histidinliganden bei niedrigen pH-Werten und andererseits durch koordinierende Hydroxylgruppen an das Hämin in stark alkalischem Milieu erklärt werden.

5.1.1.2 Struktur des FePPIX-me-1-Komplexes

Das Modell des Peptids me-1 ist so konzipiert, dass es sich in wässriger Lösung spontan zu einem Vier-Helix-Bündel, bestehend aus zwei Helix-*turn*-Helix-Peptidstrukturen, zusammenlagert. Um dies zu überprüfen, wurde die Methode der Gelfiltration (Kap. 4.3.3) angewendet. Die verwendete Superdex-75-Säule wurde zunächst mit Proteinen mit bekannten Molekulargewichten geeicht, um aus dem Elutionsvolumen des zu untersuchenden *maquettes* das Molekulargewicht bestimmen zu können.

Für das Apo-peptid me-1 ergibt sich in einer 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 8)-Pufferlösung ein Molekulargewicht von 18000 (± 2000) Da und für FePPIX-me-1 ein Wert von 20000 (± 2000) Da. Diese Molekulargewichte entsprechen denen eines Dimers (Vier-Helix-Bündel; Berechnung: $(\text{me-1})_2 = 15214$ Da; $(\text{FePPIX-me-1})_2 = 16448$ Da). Analog wurden vom Prototyp $[\text{H10H24}]_2$ Molekulargewichte von 20100 Da durch Gelfiltration bestimmt (Gibney et al., 1998).

Sowohl beim Apo- als auch beim Holopeptid können als Nebenkomponente ($< 8\%$) Molekulargewichte von 40000 (± 2000) Da beobachtet werden, die aus der Zusammenlagerung von zwei Vier-Helix-Bündeln resultieren können.

Die experimentellen Abweichungen von den berechneten Molekulargewichten beruhen darauf, dass die zu untersuchende Peptidverbindung eine andere Gestalt als die der Standards aufweist. Das *de novo* synthetisierte Peptid hat keine kugelsymmetrische, sondern eine zylindrische Form. Aus diesem Grund passt es nicht exakt in die Hohlräume des Säulenmaterials und wandert schneller durch die Säule. Als Ergebnis wird, verglichen mit

dem berechneten Wert, ein höheres Molekulargewicht bestimmt. Die Detektion des Molekulargewichtes eines Dimers bestätigt die spontane Ausbildung eines Vier-Helix-Bündels in Lösung. Ein solches Vier-Helix-Bündel, das durch Zusammenlagerung von amphiphilen Helices entsteht, wovon nur zwei über eine Disulfidbindung miteinander verbunden sind, erlaubt eine Umlagerung und beliebige Orientierung der Peptiduntereinheiten. Im Vergleich dazu ist ein Vier-Helix-Bündel, das nach dem TASP-Prinzip (Kap. 1.5) aufgebaut ist und den Vorteil einer bekannten Konformation durch selektives Ankoppeln der einzelnen Helices hat, weniger flexibel.

Die Existenz eines Vier-Helix-Bündels in wässriger Lösung erweckte das Interesse der Molekulargewichtsbestimmung durch eine massenspektroskopische ESI-Messung, die allerdings in der Gasphase durchgeführt wird. Hierfür wurde das Molekulargewicht des Apo-peptids am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung an einem FT-ICR-APEX III-Massenspektrometer bestimmt. Für das unter Standardbedingungen für Routinemessungen (Lösen und Injizieren der Peptids in MeOH/H₂O (1:1, v/v) und 2 % Essigsäure) durchgeführte Experiment ergab sich eine Molmasse von 7605 (± 2) Da, die exakt dem berechneten Wert einer monomeren Struktur vom Peptid me-1 entspricht (Abb. 35). Ein Nachweis eines Vier-Helix-Bündels in der Gasphase wurde nicht erbracht.

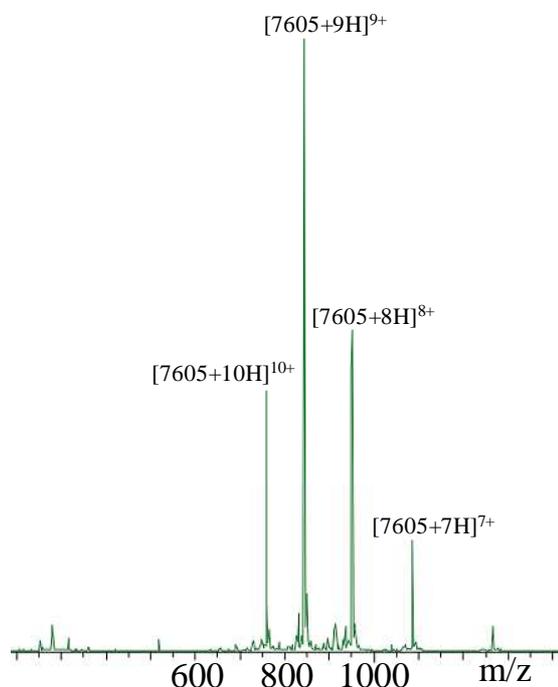


Abbildung 35.: ESI-Massenspektrum von Peptid me-1, injiziert in Methanol/Wasser (1:1, v/v) und 2 % Essigsäure. Die Angaben der Molekulargewichte entsprechen den durchschnittlich berechneten Molmassen.

Unter gleichen Messbedingungen gibt es auch keinen Hinweis, dass der FePPIX-me-1-Komplex in der Gasphase stabil ist. Das ESI-Spektrum zeigt lediglich Molekulargewichte des monomeren Apo-peptids me-1 von $M = 7605 (\pm 2)$ Da und des freien Hämins von $M = 617 (\pm 1)$ Da (Abb. 36).

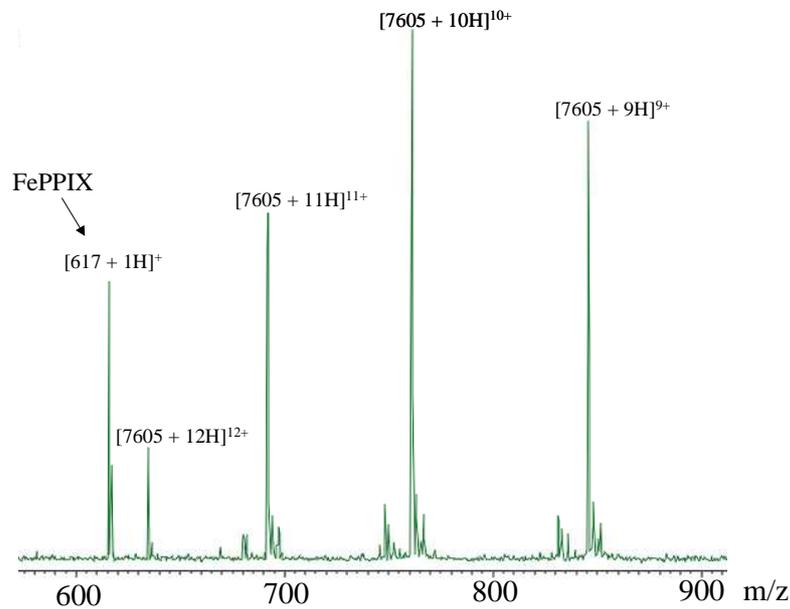


Abbildung 36.: ESI-Massenspektrum vom FePPIX-me-1, injiziert in Methanol/Wasser (1:1, v:v) und 2 % Essigsäure.

In Kollaboration mit T. Daubenfeld (Laboratoire DCMR, Ecole Polytechnique, Palaiseau, Frankreich), dessen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. G. van der Rest über gute Erfahrungen auf dem Gebiet von ESI-Messungen an nicht-kovalent verbundenen Kofaktor-Peptid-Komplexen verfügt, wurden ebenfalls ESI-Messungen am FePPIX-me-1-Komplex durchgeführt. Durch geänderte Messbedingungen (Lösen des FePPIX-*maquettes* in einer 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0)) wurden neben der Detektion des Apo-peptids mit einem Molekulargewicht von $7605 (\pm 2)$ Da Molekulargewichte von $8221 (\pm 2)$ und $8837 (\pm 2)$ Da gefunden, die einem monomeren Peptid, gebunden mit einem bzw. zwei Kofaktor(en) entsprechen (Abb. 37).

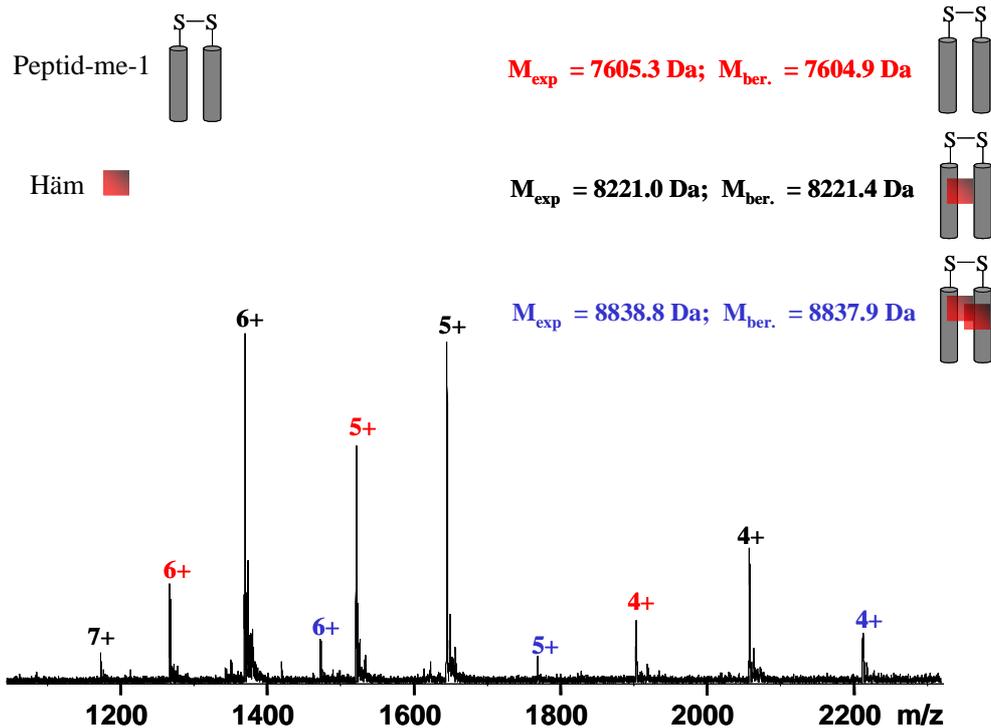


Abbildung 37: ESI-MS-Spektrum von Fe(III)PPIX-me-1 ($c = 8 \mu\text{M}$) in 10 mM Ammoniumacetat (pH 7,0).

Durch Messung des FePPIX-me-1-Komplexes in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,9) gelang schließlich neben der Bestimmung von Molekulargewichten des Apo-peptids me-1 ($7605 (\pm 2) \text{ Da}$) und des Peptids me-1 mit einem koordinierenden Hämin ($8221 (\pm 2) \text{ Da}$) die Detektion eines Signals von $16443 (\pm 2) \text{ Da}$ (Abb. 38). Dieses Molekulargewicht entspricht dem eines Vier-Helix-Bündels mit zwei gebundenen Häminmolekülen. Das Ergebnis stellt damit, unter Einbezug der mir zugänglichen Literatur, die erste Detektion eines synthetischen Vier-Helix-Bündels mit eingelagerten Kofaktoren in der Gasphase dar. Es zeigt zudem, dass zur Detektion von nicht-kovalent gebundenen Kofaktoren, die in eine Peptidstruktur eingebunden sind, mildere Messbedingungen und pH-Werte, die der maximalen Stabilität in wässriger Lösung entsprechen, gewählt werden müssen, um den Metallopeptidkomplex vollständig zu detektieren. Die Verwendung von Essigsäure, die routinemäßig zur besseren Ionisation der Peptide benutzt wird, wirkte sich negativ auf die Stabilität des FePPIX-*maquettes* in der Gasphase aus. Dies ist vergleichbar mit der Instabilität des Komplexes bei niedrigen pH-Werten in Lösung und der damit verbundenen Freisetzung der Hämingruppe.

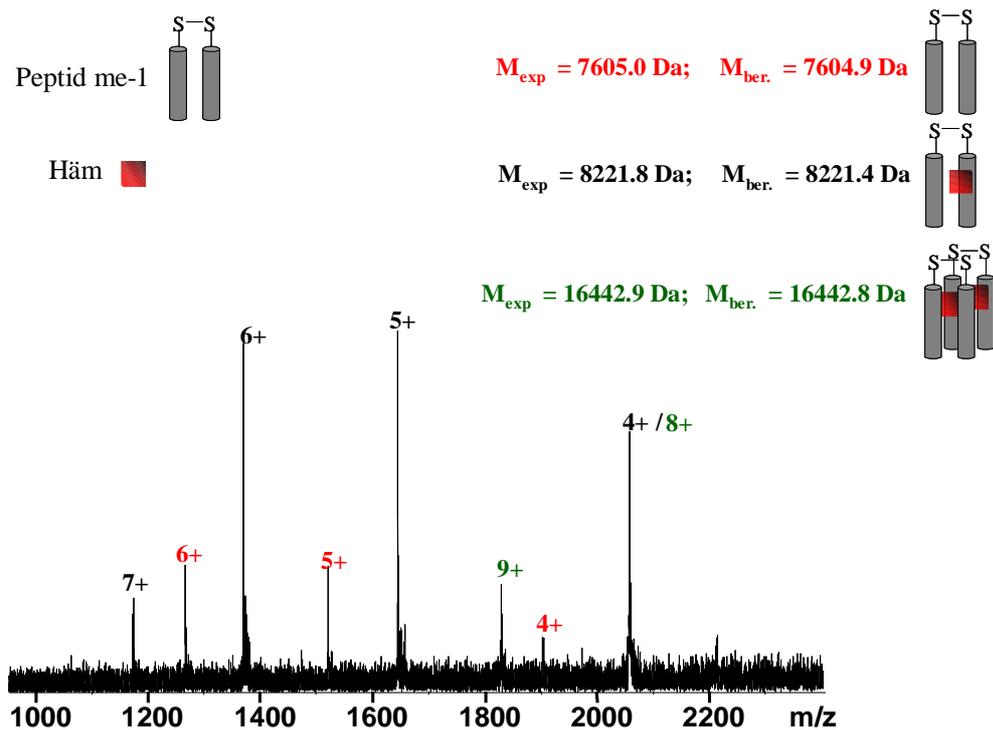


Abbildung 38: ESI-MS-Spektrum von Fe(III)PPIX-me-1 ($c = 4 \mu\text{M}$) in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,9).

Die ESI-Massenspektrometrie kann somit als ergänzende Methode zur Gelfiltration oder Ultrazentrifugation (Stryer, 1999), die zur Bestimmung der Molekulargewichte der *maquettes* in Lösung dienen, angewendet werden. Sowohl die Gelfiltration als auch die Ultrazentrifugation sind mit einem großen Fehler behaftet, der die Angabe der genauen Anzahl peptidgebundener Kofaktoren unmöglich macht. Durch ESI-Messungen lassen sich dagegen exakte Molmassen bestimmen. Die Detektion des Vier-Helix-Bündels mit zwei eingelagerten Häminmolekülen zeigt, dass die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Peptid und Kofaktor auch in der Gasphase stark genug sind, um die Hämingruppen an den Peptiden gebunden zu halten.

Die Anzahl der peptidgebundenen Kofaktoren in Lösung konnte auch durch chemische Titration des Kofaktors zum Peptid me-1 untersucht werden. Nach Auftragung der Absorptionsänderung bei 413 nm gegen das Konzentrationsverhältnis von Kofaktor zum Vier-Helix-Bündel wurde entsprechend dem Ergebnis der ESI-Messung auch in einem 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (100 mM KCl, pH 8) ein Einbau von zwei Kofaktoren in das Vier-Helix-Bündel nachgewiesen (Seidel, 2006).

5.1.1.3 Stabilität von FePPIX-me-1

Peptide lassen sich durch Erhitzen, in unpolaren Lösungsmitteln oder durch Zusätze von denaturierenden Verbindungen wie GdnHCl oder Harnstoff entfalten. Letztere brechen die Wasserstoffbrückenbindungen im Peptid auf und bilden ihrerseits Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren des ungefalteten Peptids aus (Creighton, 1993). Der Entfaltungsprozess führt zum Verlust der Sekundär- und folglich der Tertiärstruktur der Peptide. In dieser Arbeit wurde für die Entfaltungsstudien die Methode der GdnHCl-Zugabe gewählt. Die Peptiddenaturierung kann durch die Änderung der Lage des Fluoreszenzmaximums von Tryptophan oder durch die Abnahme des Drehwerts bei 222 nm im Zirkulardichroismus mit zunehmender Konzentration an GdnHCl verfolgt werden. Die Bestimmung mit Hilfe der Fluoreszenzmessung beruht auf einer Positionsänderung der Tryptophanseitengruppe aus einer eher hydrophoben in eine hydrophilere Umgebung, während die Messung des Drehwerts bei 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang) als Maß für den helikalen Anteil eines Peptids verwendet wird. Aufgrund der Absorption des Hämins kann für den FePPIX-me-1-Komplex die Stabilität zusätzlich über die Änderung des Absorptionsspektrums bei Zugabe des Denaturierungsmittels bestimmt werden.

Der helikale Anteil des Peptids me-1 in 5 mM Tris/HCl (10 mM NaCl, pH 8) wird aus dem CD-Spektrum durch Ablesen des Drehwerts bei 222 nm und Einsetzen in die Gleichung 3.1.4.1 zu 72 (± 5) % bestimmt. Der Parameter R , der das Verhältnis des Drehwertes bei 222 nm zu dem bei 208 nm angibt, beträgt 1,11 und gibt damit einen Hinweis auf das Vorliegen einer $\alpha(3.6_{13})$ -Helix. Der Prototyp [H24H10]₂ lieferte vergleichbare Prozentwerte für die Anteile an α -Helix (80,5 %) und für den Parameter R ($\geq 1,0$), (Gibney et al., 1998).

Das Tryptophan ist in wässriger Lösung in den hydrophoben Innenraum des Vier-Helix-Bündels gedreht und fluoresziert bei 345 nm. Mit zunehmender GdnHCl-Konzentration verschiebt sich seine Position aufgrund der Entfaltung des Peptids in die hydrophile Umgebung des Wassers und die Fluoreszenzintensität nimmt zu (Abb. 39a). Aus der Positionsänderung resultiert eine bathochrom verschobene Fluoreszenzbande zu 354 nm, d.h., der vollständig gefaltete Zustand und der entfaltete Endzustand fluoreszieren somit bei Wellenlängen, die um ca. 9 nm verschieden sind. Eine daraus entwickelte typische Entfaltungskurve, bei der gemäß den Gleichungen 4.3.5.2 – 4 der Anteil an gefaltetem Peptid gegen die GdnHCl-Konzentration aufgetragen wurde, ist in Abbildung 39b dargestellt. Die geringere Intensität der Fluoreszenz im gefalteten Zustand gegenüber der des ungefalteten Zustands kann durch eine schnellere Energieabgabe erklärt werden.

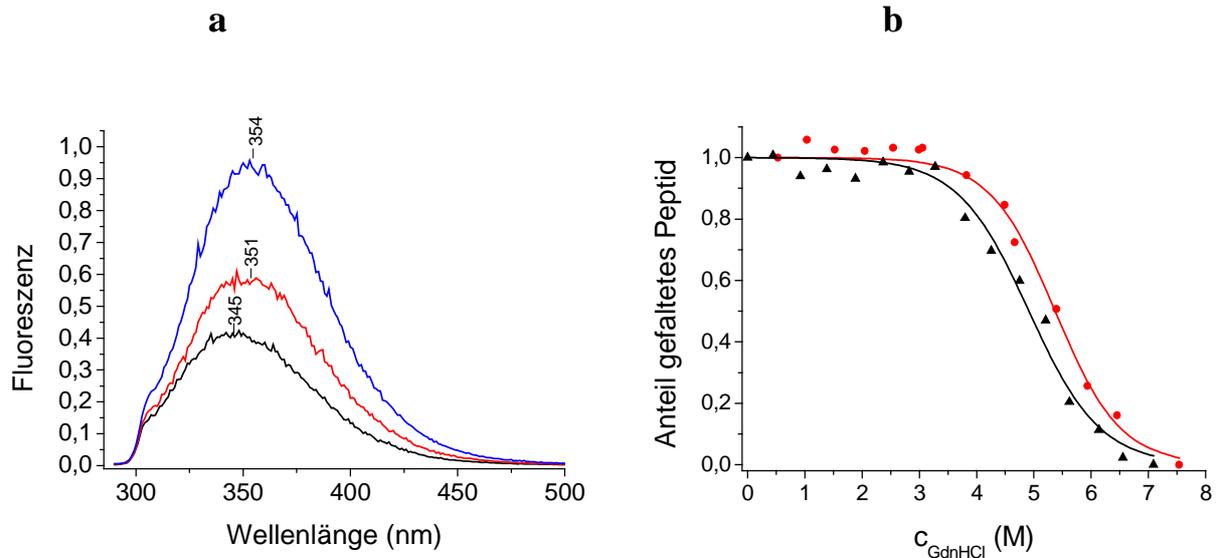


Abbildung 39: (a) Fluoreszenzverschiebung des Tryptophans in der Apoform von me-1 unter Einwirkung drei verschiedener GdnHCl-Konzentrationen ($c_{\text{GdnHCl}} = 0$ M (schwarz), $c_{\text{GdnHCl}} = 3,5$ M (rot), $c_{\text{GdnHCl}} = 7,5$ M (blau)) in 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 8,0). (b) Denaturierungskurven des Apo-me-1 (schwarz) und des FePPIX-me-1-Komplexes (rot). Die Entfaltung der Peptide mit GdnHCl und einer Inkubationszeit von 60 min erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Stabilität der Apoform von me-1 beträgt nach der Fluoreszenzauswertung unter Anwendung der Gleichungen 4.3.5.2 – 4 bei RT $\Delta G_{H_2O} = 19,3 (\pm 1,9)$ kJ mol⁻¹ und die ermittelte Kooperativität der Entfaltung ist $m = 3,9 (\pm 0,4)$ kJ mol⁻¹ M⁻¹ (Tab. 8). Die Konzentration an GdnHCl, bei der 50 % der *de novo* synthetisierten Peptide entfaltet sind, beträgt $c_{1/2} = 4,9 (\pm 0,2)$ M. Ein geringerer Wert für die freie Entfaltungsenthalpie wird über die CD-Auswertung gefunden.

Tabelle 8: Freie Entfaltungsenthalpie (ΔG_{H_2O}), Kooperativitäten (m) und Konzentrationen für eine 50 %ige Entfaltung der *de novo* synthetisierten Hämiproteine ($c_{1/2}$).

	Methode	ΔG_{H_2O} (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$c_{1/2}$ (M)
me-1	Fluoreszenz	19,3 ± 1,9	3,9 ± 0,4	4,9 ± 0,2
	CD	12,3 ± 1,2	2,2 ± 0,2	4,7 ± 0,2
FePPIX-me-1	UV-Vis	18,7 ± 1,9	4,5 ± 0,5	4,2 ± 0,2
	Fluoreszenz	23,3 ± 2,3	4,3 ± 0,4	5,4 ± 0,2
	CD	16,9 ± 1,7	3,1 ± 0,3	5,5 ± 0,2
[H24H10] ₂ (Gibney und Dutton, 1999)	CD	17,3	2,0	5,0
mMOP1 (Fahnenschmidt, 2000)	CD, Fluoreszenz*	22,4 ± 2,1	4,4 ± 0,4	5,1
FePPIX-mMOP1 (Fahnenschmidt, 2000)	UV-Vis, CD, Fluoreszenz*	31,4 ± 2,6	6,1 ± 0,5	5,2

* es liegen keine Angaben über Unterschiede in den ermittelten Parametern mit den verschiedenen Messmethoden vor.

Im Vergleich zum Apo-peptid zeigt das Holo-peptid bei gleicher spektroskopischer Untersuchungsmethode eine um ca. 4 kJ mol^{-1} größere Stabilität und es können höhere Werte für die Parameter m und $c_{1/2}$ ermittelt werden.

Die verschiedenen spektroskopischen Untersuchungsmethoden derselben Probe ergeben leicht unterschiedliche Stabilitätsparameter. Es werden über die Auswertung der Fluoreszenzspektroskopie höhere Werte für die freie Entfaltungsenthalpie als über die Methode des Zirkulardichroismus gefunden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich der Zirkulardichroismus auf die Chiralität bzw. das Drehvermögen des gesamten Peptids bezieht, während man bei den Entfaltungsstudien über die Tryptophanfluoreszenz nur eine Aminosäure betrachtet. Befindet sich das Tryptophan aufgrund der Peptidsequenz z. B. weiter von dem hydrophoben Kern eines Vier-Helix-Bündels entfernt oder ist es an einem Terminus eines Peptids positioniert, so kann sich seine Lage aus dem hydrophoben Milieu bei bereits geringen Zugaben an GdnHCl leichter in die hydrophilere Umgebung des Wassers ändern. Vergleichbar mit der Auswertung über die CD-Spektroskopie wird auch bei der Änderung der Absorptionen des FePPIX-me-1-Komplexes die Gesamtstruktur des Peptids betrachtet. Beide Messmethoden eignen sich somit gut für die Entfaltungsstudien α -helikaler Peptide und werden häufig in der Literatur angewendet (Feng und Sligar, 1991, Manning, 1993).

Bei den beschriebenen und auch in den folgenden Kapiteln dargestellten Stabilitätsuntersuchungen ist anzumerken, dass häufig die größte Peptidstabilität nach Zugabe von $0,5 \text{ M}$ GdnHCl beobachtet wurde und somit ein Mittelwert aus der beobachteten Messgröße bei 0 und $0,5 \text{ M}$ GdnHCl-Konzentration als Zustand der vollständigen Faltung für die Auswertung der Messdaten verwendet wurde. Die Zugabe einer kleinen GdnHCl-Konzentration verhilft dem Peptid offensichtlich, sich optimal zu falten.

Beim Vergleich der ermittelten freien Entfaltungsenthalpien des *de novo* synthetisierten FePPIX-*maquettes* mit der Literatur zeigt sich, dass z. B. beim FePPIX-mMOP1 (Tab. 8), das in der Arbeitsgruppe von Prof. Haehnel (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für Biologie II/Biochemie) als templat-assoziiertes Vier-Helix-Bündel synthetisiert wurde, ein um 10 kJ mol^{-1} höherer Wert gefunden wurde (Fahnenschmidt, 2000). Für das natürlich vorkommende Cyt_{b562}, in dem die Hämgruppe zwar über Histidin und Methionin koordiniert ist, das aber ebenfalls ein Vier-Helix-Bündel ausbildet, wurde als Maß für die Stabilität $\Delta G_{H_2O} = 30,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt (Arnesano et al., 2000), während für Apo-Cyt_{b562} ein Wert von $\Delta G_{H_2O} = 13,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ermittelt wurde (Fuentes und Wand, 1998). Damit trägt der Einbau des Kofaktors in natürliche Proteinstrukturen im Vergleich zu dem hier verwendeten Peptid in höherem Maße zur Stabilisierung bei. Dieses lässt sich mit der bereits aus der Evolution

entstandenen, vorgebildeten und definierten Struktur des Peptids und der optimalen und effektiven Einpassung des Kofaktors in die Peptidstruktur erklären, die bei den artifiziellen Peptiden nicht gegeben sind. Die ermittelten Werte für die Kooperativität der Entfaltung von me-1 sind mit denen des mMOP1-Peptids vergleichbar.

5.1.1.4 Redoxverhalten von FePPIX-me-1

Die Bestimmung des Halbstufenpotentials von FePPIX-me-1 gibt Aufschlüsse über die vorliegende Konformation der homodimeren Peptide im Vier-Helix-Bündel. Die hierfür angewendete chemische Titration erfolgte unter anaeroben Bedingungen durch Zugabe von definierten Mengen an Natriumdithionit zu der gepufferten Proteinlösung bei pH 8. Zunächst wurde das bereits aus der Literatur bekannte Halbstufenpotential von Cyt c bestimmt, um von diesem Experiment ausgehend gute Messbedingungen für die chemische Redoxtitration von FePPIX-me-1 zu entwickeln. Mit den in der Tabelle 6 angegebenen Mediatoren wurde ein Halbstufenpotential für Cyt c in 50 mM KH $_2$ PO $_4$ /K $_2$ HPO $_4$ -Puffer (100 mM NaCl, pH 7) von $E_{m,pH7} = +28 (\pm 15)$ mV vs. Ag/AgCl bestimmt (Abb. 40). Hierzu wurden die gemessenen Absorptionen der α -Bande als Anteil der reduzierten Form ((Red) / (Red + Ox)) mit zunehmender Konzentration an Natriumdithionit gegen die gemessenen Halbstufenpotentiale aufgetragen und die Messpunkte mit der Gleichung 4.5.1.1 (nach Nernst) für einen Ein-Elektronenübergang ($n = 1$) angepasst. Die Umrechnung des Halbstufenpotentials gegen Ag/AgCl in das von NHE erfolgte anhand der Gleichung 4.5.1.2.

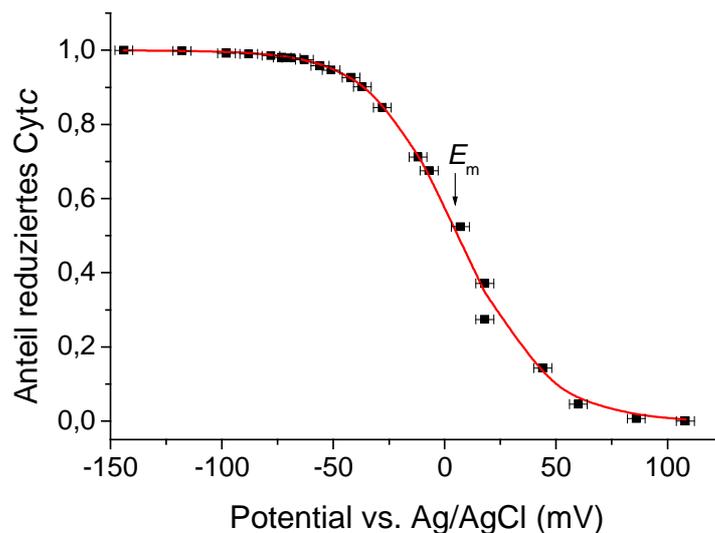


Abbildung 40: Chemische Redoxitration von 10,7 μ M Cyt c mit Natriumdithionit in 50 mM KH $_2$ PO $_4$ /K $_2$ HPO $_4$ (100 mM KCl, pH 7). Die Auswertung erfolgte über die Intensitätszunahme der α -Bande bei 556 nm mit zunehmender Dithionit-Konzentration. Die Fehler von 4 mV geben den Ablesefehler der Potentiale zur Gleichgewichtseinstellung an. Der Fehler für die Werte des Anteils an reduziertem Cyt c beträgt 0,01.

Man erhält für Cyt c ein Halbstufenpotential von $E_{m,pH7} = +215 (\pm 15)$ mV. Dieser Wert stimmt innerhalb seines Fehlerbereiches mit dem Literaturwert des Halbstufenpotentials von Cyt c von $E_{m,pH7} = +225$ mV überein (Dutton et al., 1970). Auf dieser Messung und entsprechender Literatur (Robertson et al., 1994; Gibney et al., 2001) aufbauend wurde eine geeignete Mediatorenmischung, deren Zusammensetzung in der Tabelle 7 beschrieben ist, zur Bestimmung des Halbstufenpotentials von FePPIX-me-1 gefunden.

Für den FePPIX-me-1-Komplex wurden Halbstufenpotentiale von $E_{m1,pH8} = -434 (\pm 15)$ mV und $E_{m2,pH8} = -337 (\pm 15)$ mV vs. Ag/AgCl mit jeweils einem Ein-Elektronenübergang ermittelt. Diese Werte entsprechen Halbstufenpotentialen von $E_{m1,pH8} = -207 (\pm 15)$ mV und $E_{m2,pH8} = -110 (\pm 15)$ mV vs. NHE. Die Differenz beträgt damit ca. 100 mV und ist typisch für die Einbindung von zwei Häminen an gleicher Position des Vier-Helix-Bündels. Die ermittelten Potentiale stimmen innerhalb ihres Fehlers mit denen vom *maquette* [H10A24]₂ überein, in denen für die zwei nahe des Glycin-loops eingebauten Hämine in Position 10 Potentiale von $E_{m,pH8} = -220$ und -105 mV bestimmt wurden (Sharp et al., 1998b). Die für den FePPIX-me-1-Komplex ermittelten Potentiale und die 50fach höhere Bindungsaffinität der Histidine in der Position 10 im Vergleich zu denen in Position 24 (Gibney und Dutton, 1999) geben einen Hinweis darauf, dass sich die zwei Hämingruppen bei einer *syn*-Topologie der beiden Helix-*turn*-Helix-Motive im Vier-Helix-Bündel von me-1 beide in der Position 10 befinden (s. Abb. 15 und 42). Die Potentialdifferenz lässt sich folglich durch die elektrochemische Wechselwirkung der beiden damit räumlich nahe gelegenen Kofaktoren erklären. Das erste Elektron kann aufgrund der zwei vorliegenden Hämin-Moleküle leichter aufgenommen werden als das zweite Elektron, bei dem nur noch ein oxidiertes FePPIX vorliegt.

Im Allgemeinen beeinflusst die lokale Peptidumgebung die Eigenschaften des Hämins und folglich auch sein Halbstufenpotential. Eine Änderung einer negativen zu einer positiveren Ladungsverteilung in der Proteinumgebung erhöht das Potential (Lombardi et al., 2001).

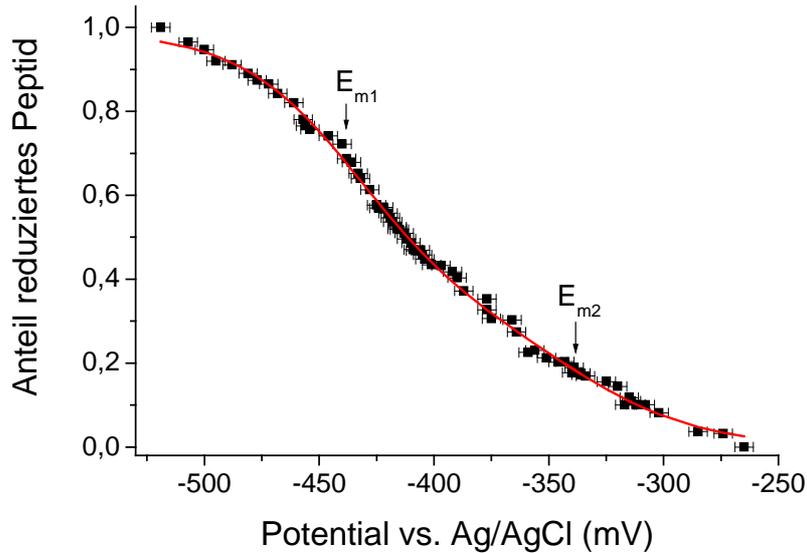


Abbildung 41: Chemische Redox Titration von 6,4 μM FePPIX-me-1 mit Natriumdithionit in 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 8). Die Auswertung erfolgte über die Absorptionsänderung bei 426 nm mit zunehmender Dithionit-Konzentration. Die Halbstufenpotentiale wurde mit der Gleichung 4.5.1.1 angepasst. Die Fehlerbalken mit einer Länge von 4 mV geben den Ablesefehler der Potentiale zur Gleichgewichtseinstellung an.

Der Einbau der positiv geladenen Hämine in die Peptide ergibt auch die Möglichkeit eines Konformationswechsels. Ausgehend von einer parallelen Anordnung der beiden Helix-*turn*-Helix-Motive mit einem Kofaktor-Kofaktor-Abstand von 13 Å kann es durch ionische Wechselwirkungen zu einer Abstoßung der beiden Kofaktoren kommen, die zu einer *anti*-Topologie führt. Die Distanz zwischen den beiden Hämingruppen beträgt in diesem Fall 26 Å und sie würden aufgrund der Äquivalenz das gleiche Halbstufenpotential besitzen (Gibney et al., 2000; Grosset et al., 2001; Ishida et al., 2004). Eine 20 – 80fache Änderung im *syn-anti*-Verhältnis der vorliegenden Konformere entspricht einer freien Standardenergie von 7,9 – 10,9 kJ mol⁻¹ (Abb. 42), (Grosset et al., 2001).

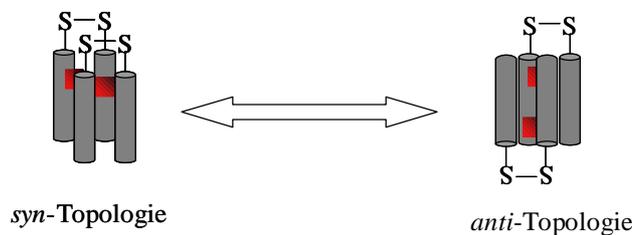


Abbildung 42: *Syn*- und *anti*-Topologie der Vier-Helix-Bündel-Proteinkomplexe. Die Energien für die Änderung im Konformerenverhältnis von *syn* zu *anti* liegen zwischen 7,9 – 9,6 kJ mol⁻¹; adaptiert aus Grosset et al., 2001.

5.1.2 Darstellung von [FePPIX-me-1]CN

Natürliche FePPIX-Proteine haben neben ihren redoxaktiven Eigenschaften und ihrer Funktion als Elektronentransferproteine in der Atmungskette und Photosynthese die Aufgabe, kleine Moleküle wie O₂, CO, CN oder NO zu binden. Durch Zugabe einer 20 mM KCN-Lösung (in 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8) zum FePPIX-me-1 sollte die Bindungsaffinität der CN⁻-Ionen zum FePPIX-Protein, in dem die Kofaktoren durch zwei Histidine gebunden sind, untersucht werden.

Nach der Zugabe von KCN wurden die in Abbildung 43 gezeigten Absorptionsspektren erhalten. Im Vergleich zu den Absorptionsbanden der oxidierten und reduzierten Form des FePPIX-Proteins ohne Cyanideinfluss können sowohl Bandenverschiebungen als auch Intensitätsunterschiede in den α - und β -Banden beobachtet werden. Die charakteristischen Absorptionen des Fe(III)PPIX-me-1-Komplexes liegen bei 413, 531 und 553 nm. Nach Zugabe von KCN ist die Soretbande zu 419 nm bathochrom verschoben. Die α - und β -Banden liegen nicht mehr separiert vor und eine Koaleszenz dieser Banden bei 545 nm wurde beobachtet. Im Vergleich dazu liegen bei freien Porphyrin-Basen mit D_{2h}-Symmetrie vier Q-Banden vor, während bei den höher symmetrischen Metalloporphyrinen nur zwei Q-Banden auftreten. Das Erscheinen von nur einer Q-Bande weist damit auf eine weitere Symmetrieerhöhung des Systems hin, die aus den koordinierenden Liganden an der fünften und sechsten Koordinationsstelle resultiert. Das Fehlen der Absorptionsbande bei 640 nm, die auf einen *high spin*-Zustand des Eisens und damit auf eine fünffache oder nur schwache sechsfache Koordination hinweist, bestärkt die Annahme einer sechsfachen Koordination des Hämins. Ein Vergleich der Lage der beobachteten Absorptionsbanden mit denen des natürlichen Hämiglobincyanids weist eindeutig auf einen entstandenen [FePPIX-me-1]CN-Komplex hin (Toothill, 1967). In beiden Komplexen (*de novo* und nativ) ist das FePPIX über ein Histidin an das Peptid gebunden und die sechste Koordinationsstelle wird durch ein CN-Molekül besetzt.

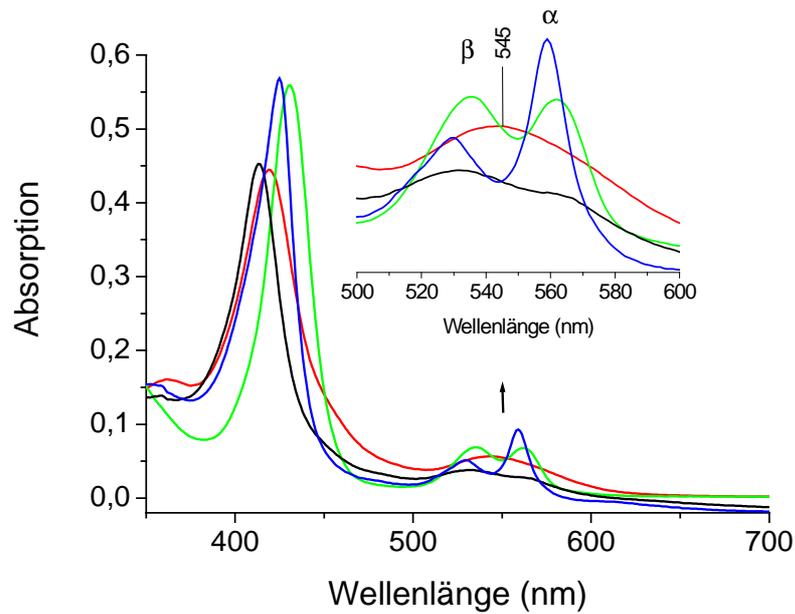


Abbildung 43: UV-Vis Absorptionsspektren jeweils 8 μM Fe(III)PPIX-me-1 (schwarz) und Fe(II)PPIX-me-1 (blau) und nach Zugabe von 10 mM KCN zu Fe(III)PPIX-me-1 (rot) und Fe(II)PPIX-me-1 (grün) in 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 8). Die reduzierten Formen wurden durch Zugabe von Natriumdithionit erhalten.

Auch der [Fe(III)PPIX-me-1]CN-Komplex konnte mit Dithionit zum [Fe(II)PPIX-me-1]CN-Komplex reduziert werden. Dadurch verschiebt sich die Soretbande zu 431 nm, während die α - und β -Banden bei 535 und 561 nm gleiche Intensitäten aufweisen (Abb. 44). Damit erfolgt im Cyanidkomplex [Fe(III)PPIX-me-1]CN wie auch beim cyanidfreien Komplex bei Reduktion eine Verschiebung der Soretbande um 12 nm. Die Wechselwirkung des Prototypen [H24H10]₂ mit Cyanid lieferte gleiche Änderungen in den Absorptionsspektren (Gibney et al., 1998).

Die Versuche haben gezeigt, dass der starke Cyanid-Ligand das Eisenatom des Porphyrins von einer Seite koordiniert, was sowohl beim oxidierten als auch beim reduzierten FePPIX-*maquette* zu einer bathochromen Verschiebung der Soretbande führt. Das σ -Orbital des Cyanid-Ions kann mit dem s-Orbital des Metalls eine σ -Bindung eingehen und durch Überlappung der besetzten d-Orbitale des Metalls mit unbesetzten π^* -Orbitalen des CN⁻-Ions entsteht eine π -Rückbindung. Beide Bindungen stabilisieren den Komplex. Allerdings wurde eine Freisetzung des Hämins vom Peptid und die Besetzung der sechsten Koordinationsstelle des Kofaktors durch ein weiteres Cyanid nicht beobachtet, da dieses zu einer stärker bathochromen Verschiebung der Soretbande führt ($\lambda = 422$ nm), die in diesem Fall nicht beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse zeigen damit eine gute Einbindung des FePPIX in das Vier-Helix-Bündel, dass trotz des starken CN⁻-Liganden nicht vom Peptid abgetrennt

wird. Es eignet sich somit hervorragend als Modellsystem eines natürlichen FePPIX-Proteins mit der Funktion von Bindung und Transport kleiner Moleküle, wie hier am Beispiel der Cyanid-Komplexierung gezeigt werden konnte.

5.1.3 Auswirkungen verkürzter Peptide im Vergleich zu me-1

Um die Auswirkung einer Verkürzung der Peptide auf ihre Bindungseigenschaft des Kofaktors, ihre Faltungsstruktur und die Stabilität des Komplexes zu überprüfen, wurden die Peptide me-7 bis me-9 synthetisiert (Sequenzangabe s. Kap. 4.1.1, Tab. 1). Ihre Helices bestehen aus jeweils 20 Aminosäuren. Die im Vergleich zum Peptid me-1 fehlenden sieben Aminosäuren betreffen die zweite, vom verbindenden *loop* entferntere Histidin-Bindungsstelle, die damit eliminiert wurde. Damit befinden sich im Peptid me-7 pro *Helix-turn-Helix*-Motiv anstelle von vier Histidinen, wie im Peptid me-1, nur noch zwei Histidine nahe der *loop*-Region. Das Peptid me-8, das keine Histidine enthält, dient der Überprüfung, ob eine selektive Koordination des Hämins über Histidine oder eine zufällige Anlagerung des Kofaktors an das Peptidgerüst erfolgt. Das Peptid me-9 entspricht der Sequenz von me-7 mit der Ausnahme des Austausches von Phenylalanin gegen Alanin (detaillierte Sequenz in 4.1.1, Tab. 1). Damit bietet dieses Peptid die Möglichkeit, die Funktion und den Einfluss einer einzelnen Aminosäure, in diesem Fall die des Phenylalanins, auf die Stabilität des Peptids und die Bindungsaffinität zum Hämin zu untersuchen.

Die Absorptionsspektren der me-7- und me-9-*maquettes* zeigen nach Zugabe von FePPIX die gleichen Absorptionsbanden wie die des FePPIX-me-1-Komplexes. Im Unterschied dazu entspricht das Spektrum des *maquettes*-me-8 dem eines Hämins in wässriger Lösung (Abb. 44). Das frei vorliegende Hämin erklärt auch die zu beobachtende Bande um 630 nm, die aus einer *high spin*-Spezies des Eisens resultiert. Damit kann gezeigt werden, dass der Kofaktor ausschließlich in die Peptide me-7 und me-9 eingebaut werden kann. Die Nichteinlagerung des Hämins in das Peptid me-8 beweist, dass sich das Hämin nicht unselektiv am Peptidgerüst anlagert, sondern dass das Histidin die Bindungsstelle des Kofaktors darstellt.

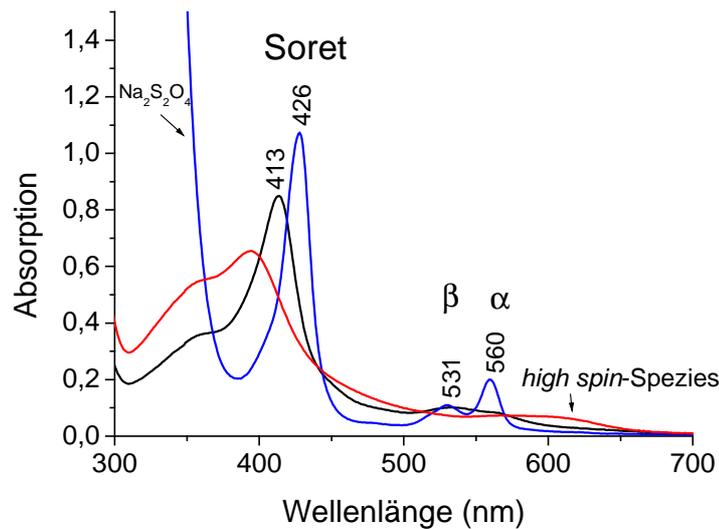


Abbildung 44: Absorptionsspektren von jeweils 7 μM Peptid me-7 (schwarz) und Peptid me-8 (rot) nach Zugabe von FePPIX. Der FePPIX-me-7 Komplex wurde mit Natriumdithionit reduziert (blau). Die Absorptionsspektren von FePPIX-me-9 sind mit denen von FePPIX-me-8 identisch und werden deshalb nicht gesondert gezeigt.

Um Informationen über die Supersekundärstruktur der Peptide in wässriger Lösung zu erhalten, wurden die Molekulargewichte der Peptide über Gelfiltration bestimmt. Die Abbildung 45 zeigt als Beispiel die Elutionsprofile der verwendeten Eichproteine und des Peptids me-8. Alle ermittelten Molekulargewichte sind in Tabelle 9 angegeben.

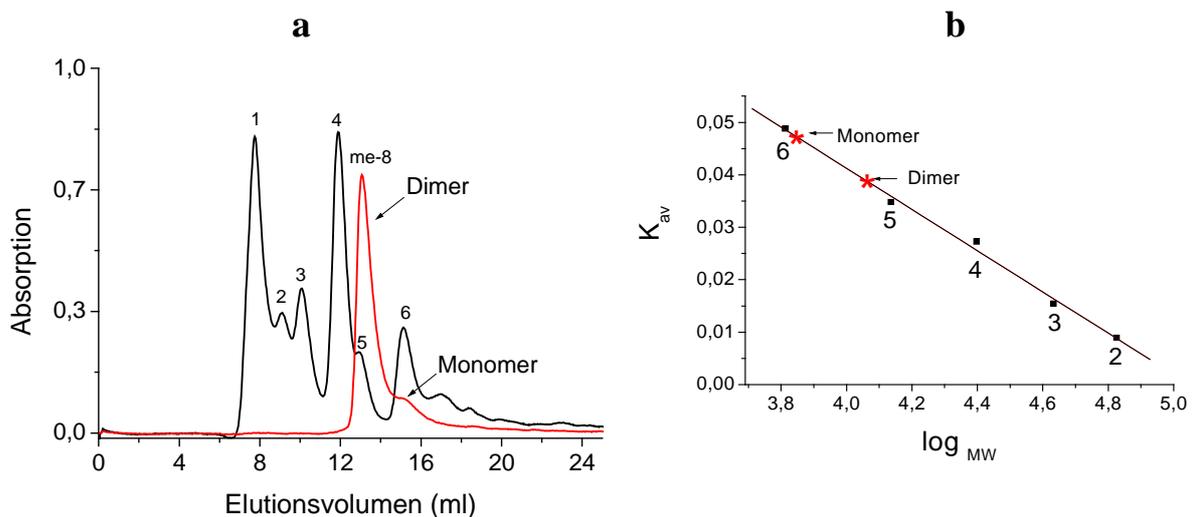


Abbildung 45: (a) Elutionsprofil einer Gelfiltration von Eichproteinen (schwarz) und vom 75 μM Peptid me-8 (rot) in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (150 mM NaCl, pH 7,5), $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. Die mit Nummern gekennzeichneten Elutionsvolumina gehören zu folgenden Eichproteinen: 1. Dextran-Blau (>200000 Da), 2. Rinderserumalbumin (67000 Da), 3. Ovalbumin (43000 Da), 4. Chymotrypsinogen (25000 Da), 5. Ribonuklease A (13700 Da), 6. Aprotinin (6500 Da). (b) Die Auftragung des Verteilungskoeffizienten K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes der entsprechenden Eichproteine ergibt eine lineare Abhängigkeit, aus der die Molekulargewichte des untersuchten Peptids (hier me-8) bestimmt werden können. Die anhand der Gleichung 4.3.3.1 ermittelten K_{av} -Werte sind für das Peptid me-8 (Monomer und Dimer) eingezeichnet.

Es können für jedes der drei Peptide Molekulargewichte bestimmt werden, die zu 90 % dem berechneten Wert eines Dimers entsprechen. Nur ein geringer Anteil von 10 % liegt in monomerer Form vor. Im Vergleich dazu wurde beim Peptid me-1 kein monomerer Anteil beobachtet. Es liegt neben der Vier-Helix-Bündel-Formierung lediglich ein < 8 %-Anteil an Oligomer vor.

Tabelle 9: Durch Gelfiltration bestimmte Molekulargewichte der *de novo* synthetisierten Peptide me-7, me-8 und me-9. Die Prozentangaben, die aus den Absorptionsverhältnissen bestimmt wurden, geben den Anteil der jeweiligen Form an.

Peptid	ber. Masse (Da)	exp. Masse ± 2000 Da
me-7	5878 (Monomer)	5700 (10 %)
	11756 (Dimer)	10500 (90 %)
me-8	5747 (Monomer)	6500 (10 %)
	11494 (Dimer)	14500 (90 %)
me-9	5727 (Monomer)	6200 (10 %)
	11454 (Dimer)	11300 (90 %)

Die Ergebnisse der Gelfiltration zeigen, dass sich auch die verkürzten Peptidstränge zu Vier-Helix-Bündeln zusammenlagern können. Um die Anzahl der Hämine im Vier-Helix-Bündel der Peptide me-7 und me-9 zu bestimmen, wurde eine Häminlösung bekannter Konzentration zum Peptid titriert, das gelöst in einem 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (100 mM KCl, pH 7,5) vorlag (Abb. 46a). Die Titrations ergaben, dass bei beiden Peptiden nur ein Kofaktor pro Vier-Helix-Bündel eingelagert wird. Die Abbildung 46b stellt die Auftragung der Absorptionsänderung bei 416 nm mit zunehmender Konzentration an FePPIX gegen das Verhältnis der Stoffmenge des Kofaktors zu der des Vier-Helix-Bündels exemplarisch am Peptid me-9 dar.

Durch die Eliminierung der zweiten Histidin-Bindungsstelle in den Peptiden me-7 und me-9 wurde im Vergleich zum Peptid me-1 nur noch ein Hämin pro Vier-Helix-Bündel eingelagert. Aufgrund der immer noch vorhandenen vier Histidine wäre auch hier eine Einlagerung von zwei Häminmolekülen möglich gewesen. Dieses lässt darauf schließen, dass bei einer Verkürzung der Peptidstränge um ca. 1 nm (\equiv sieben Aminosäuren) die Faltung, Struktur und insbesondere die Stabilität der Peptide, die nachfolgend dargestellt wird, so verändert werden, dass nur die Bindung eines Kofaktors erfolgt.

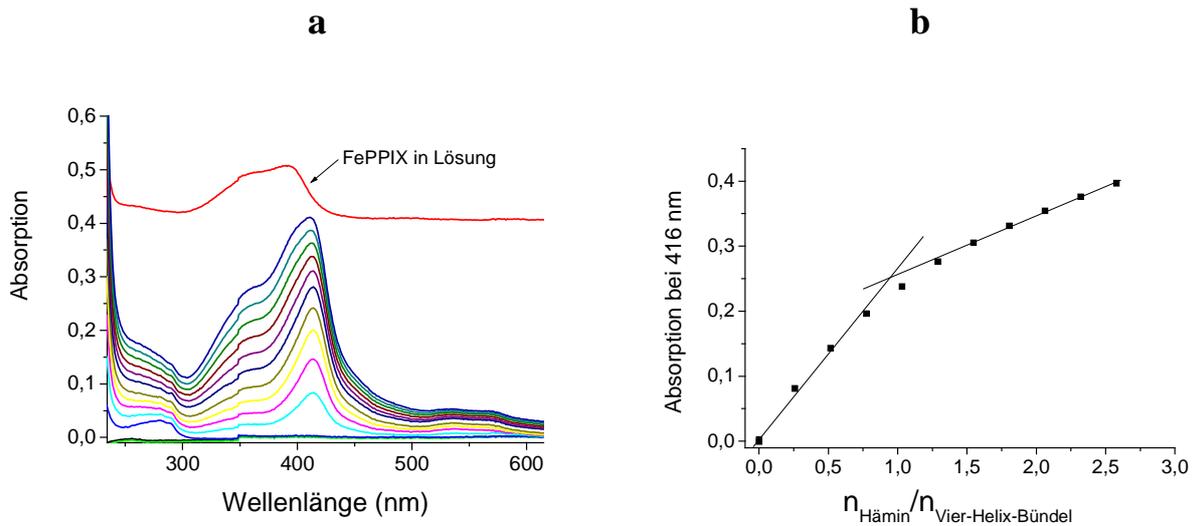


Abbildung 46: (a) Absorptionsspektren der chemischen Titration von FePPIX (Vorratslösung 0,9 mM) zu 1 μ M Peptid me-9 in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,5). Als Vergleich ist ein Spektrum von nicht peptidgebundenem FePPIX in gleicher Pufferlösung (rot) gezeigt, das zur besseren Darstellung um 0,4 Absorptionseinheiten verschoben wurde. (b) Auftragung der Absorptionsänderung bei 416 nm gegen das Stoffmengenverhältnis vom Kofaktor zum Peptid me-9 als Vier-Helix-Bündel.

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur und der Stabilitäten der Peptide diente auch hier die Messung des Zirkulardichroismus. Hierzu wurden die Peptide me-7 bis me-9 mit verschiedenen Konzentrationen an GdnHCl inkubiert und die Denaturierung der Peptide anhand der Abnahme des Drehwertes bei 222 nm beobachtet (Abb. 47a). Mit Hilfe der Gleichung 4.3.5.2 und der Auftragung der Fraktion an gefaltetem Peptid gegen die entsprechende GdnHCl-Konzentration erhält man die in Abbildung 47b am Beispiel für das Peptid me-9 gezeigte Denaturierungskurve.

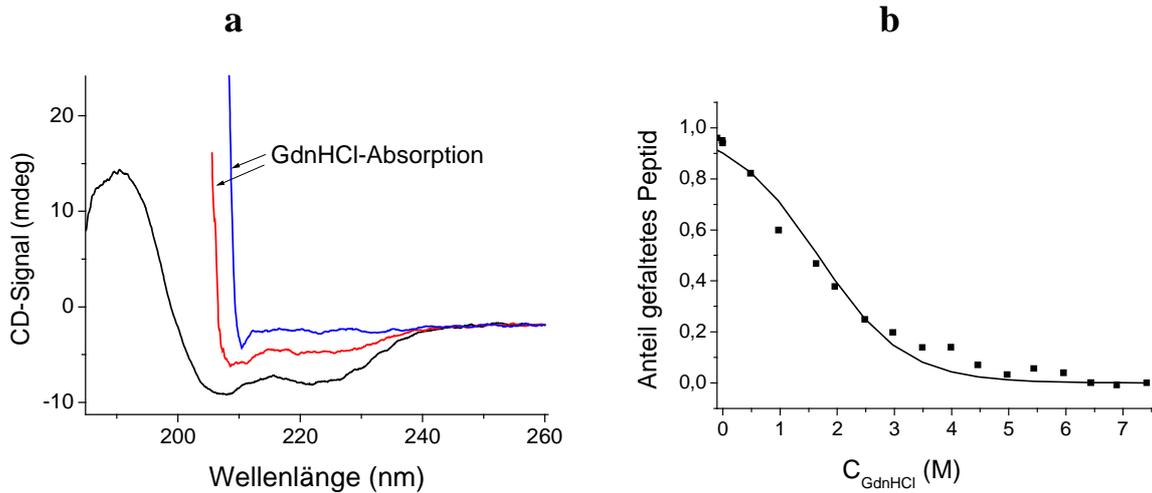


Abbildung 47: (a) CD-Spektren von 20 µM Peptid me-9 ohne GdnHCl-Zusatz (schwarz), nach Inkubation mit 2 M GdnHCl (rot) und mit 7 M GdnHCl (blau) in 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (10 mM KCl, pH 7,5). (b) Aus den Messwerten der CD-Spektren resultierende Denaturierungskurve vom Peptid me-9.

Im Vergleich zum 62meren Peptid me-1 weisen die in diesem Abschnitt gezeigten 48mere in wässriger Lösung eine zwei- bis dreifach geringere freie Entfaltungsenthalpie ΔG_{H_2O} und damit eine geringere Stabilität auf (Tab. 10), während sich das Kooperativitätsmaß m nur geringfügig ändert. Die geringen Werte für $c_{1/2} = 1,5 - 1,9 (\pm 0,2)$ M GdnHCl im Vergleich zu dem für FePPIX-me-1 von $c_{1/2} = 4,7 (\pm 0,2)$ M GdnHCl zeigen, dass bereits bei geringen GdnHCl-Konzentrationen eine 50%ige Entfaltung der jeweiligen Peptide vorliegt.

Der α -helikale Anteil, dessen Gehalt mit der Formel 3.1.4.1 bestimmt wurde, beträgt 30 (± 5) % für das Peptid me-7, 38 (± 5) % für me-8 und 28 (± 5) % für das Peptid me-9. Dieser im Vergleich zum Peptid me-1 (72 % Helixanteil) geringe Anteil an α -Helikalität spiegelt sich in der geringen Stabilität der Peptide wieder, obgleich die Gelfiltration auch bei den Peptiden me-7 bis me-9 die Existenz eines Dimers angibt. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass bereits der hier vorhandene geringe Anteil an α -Helix ausreicht, um ein Vier-Helix-Bündel zu bilden und das Hämin selektiv zu binden. Dennoch zeigen die geringen Stabilitäten der Peptide me-7 bis me-9 eine Begrenzung für den minimalistischen Nachbau eines natürlichen Proteins an. Eine zu kurze Peptidkette führt zum Verlust der Sekundärstrukturelemente und folglich zur Einschränkung der funktionellen Peptideigenschaften.

Das Verhältnis des Drehwertes bei 222 nm zu dem bei 208 nm beträgt $R = 0,91$ (me-7), 0,88 (me-8) und 0,90 (me-9). Die Werte verifizieren in allen drei Fällen das Vorliegen einer $\alpha(3.6_{13})$ -Helix (vgl. Kap. 3.1.4).

Die Substitution des Phenylalanins durch Alanin hat weder eine Auswirkung auf die Lage der Absorptionsbanden der entsprechenden FePPIX-*maquettes* (me-7 und me-9) noch auf die

Stabilitäten der Apo-peptide, deren Werte innerhalb ihres Fehlerbereiches vergleichbar sind. Im Allgemeinen erhöht ein Phenylalanin, das ein Alanin ersetzt, die Stabilität eines Proteins um 8 – 20 kJ mol⁻¹, indem es zur Hydrophobizität im Inneren eines Proteins beiträgt (DeGrado et al., 1999). Allerdings hängt dies stark von der Position der Aminosäure ab. Nach außen gedrehte oder sich an den Enden einer Helix befindende Phenylalanine, die einen Alaninrest ersetzen, erzeugen keine erhöhte Stabilität (Creighton, 1993).

Tabelle 10: Freie Entfaltungsenthalpie (ΔG_{H_2O}), Kooperativitäten (m) und Konzentrationen für eine 50 %ige Entfaltung ($c_{1/2}$) der *de novo* synthetisierten Peptide me-7, me-8 und me-9 in 5 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (10 mM KCl, pH 7,5).

	Methode	ΔG_{H_2O} (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$c_{1/2}$ (M)
me-7	CD	4,7 ±0,5	2,5 ±0,3	1,9 ±0,2
me-8	CD	3,7 ±0,4	2,4 ±0,2	1,5 ±0,2
me-9	CD	5,5 ±0,6	3,3 ±0,3	1,7 ±0,2
Vergleich: me-1	CD	12,3 ±1,2	2,2 ±0,2	4,7 ±0,2

5.1.4 Bis-His vs. His-Met-Koordination von FePPIX

5.1.4.1 Einbau von FePPIX in me-2

In diesem Teil der Arbeit sollte geprüft werden, ob eine His-Met-Koordination der Hämgruppe, wie sie z. B. in natürlichem Cyt_c vorliegt, sich gegenüber einer konkurrierenden *bis*-Histidin-Koordination ausbilden kann. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde das Peptid me-2 verwendet, das in der Arbeitsgruppe Dutton modelliert wurde und auf eine Weiterentwicklung des erstmalig gezeigten *maquettes* als Modellsystem der Cyt_b-Untereinheit beruht (Sharp et al., 1998a; Robertson et al., 1994). Das Peptid besteht aus 62 Aminosäuren (Sequenz s. Kap. 4.1.1), die wie beim Peptid me-1 aus einem Helix-*turn*-Helix-Motiv aufgebaut sind. Der *turn* besteht in diesem Fall aus acht Glycinen. Bekanntlich unterbrechen Glycine eine α -Helix (Kap. 1.2) und bilden einen *turn* aus, was die annähernde Parallelität der beiden α -Helices im Peptid me-2 zur Folge hat. Im Unterschied zu me-1 sind in dem Helix-*turn*-Helix-Motiv anstelle von zwei Histidinen ein Histidin und ein Methioninrest benachbart. Die Zusammenlagerung zu einem Vier-Helix-Bündel mit einer *syn*-Topologie schließt damit eine mögliche *bis*-His-Koordination nicht aus. Durch Zugabe von FePPIX zum Peptid existieren, ausgehend von einer sechsfachen Koordination des Hämins, verschiedene Koordinationsmöglichkeiten, die in Abbildung 48 gezeigt werden.

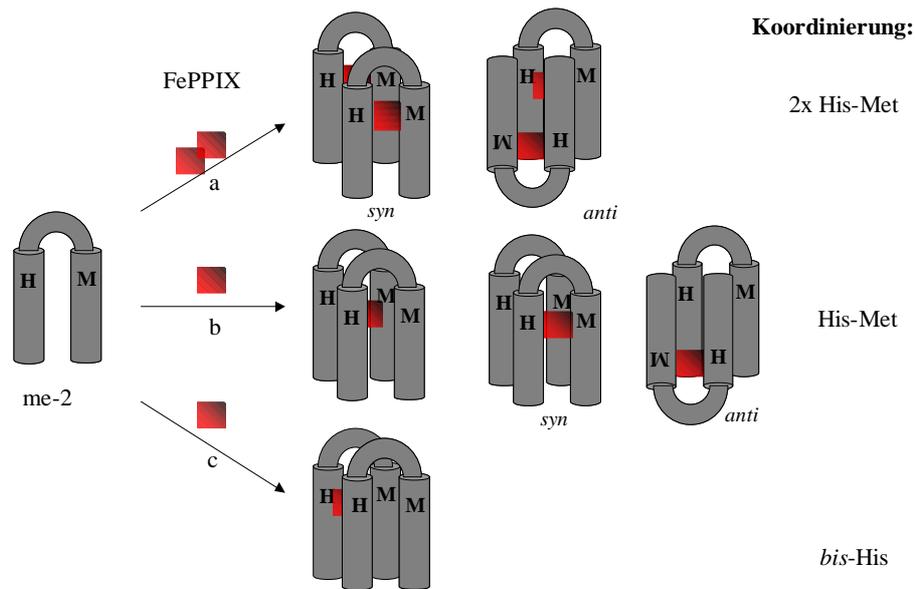


Abbildung 48: Darstellung der verschiedenen möglichen Kombinationen für den Einbau von FePPIX in das Vier-Helix-Bündel des Peptids me-2. Neben der Einlagerung von zwei Hämingruppen und Ausbildung von zwei His-Met-Koordinierungen (a) kann ein Kofaktor über zwei gegenüberstehende oder benachbarte Histidin- und Methioninreste (b) oder von zwei Histidinen (c) koordiniert werden.

Als erster Schritt zur Charakterisierung des FePPIX-Einbaus in das Peptid me-2 wurde die UV-Vis-Spektroskopie verwendet. Als Vergleichsprobe diente der FePPIX-me-1-Komplex, bei dem bereits eine gute Einbindung des Hämins festgestellt wurde (s. Kapitel 5.1.1). Die Absorptionsspektren beider FePPIX-*maquettes* sind in Abbildung 49a dargestellt.

Die charakteristischen B- und Q-Banden des Hämin-me-2-Komplexes befinden sich bei 412 (Soret), 531 und 562 nm (β - und α -Bande). Die Wellenlängen unterscheiden sich damit kaum von denen des Hämin-me-1-Komplexes. Allerdings ist beim FePPIX-me-2 eine ausgeprägte Schulter bei 370 nm und eine zusätzliche Absorption zwischen 630 und 650 nm zu beobachten. Diese Absorptionen weisen auf eine fünffach oder nur schwach sechsfach koordinierte Hämingruppe hin. Eine erneute Chromatographie zur Abtrennung des ungebundenen Kofaktors ergab das gleiche Spektrum. Hieraus lässt sich ableiten, dass kein ungebundenes Hämin vorliegt, sondern dass eine fünf- oder sechsfache Koordination des Kofaktors existiert, die beim FePPIX-me-1 nicht beobachtet wurde. Die hohe Intensität und Lage der Soretbande deutet allerdings an, dass ein bedeutender Anteil an gebundenem Hämin sechsfach koordiniert vorliegt.

Eine kurzzeitige Ultraschallbehandlung der Proteinprobe konnte den Einbau des Hämins in das Peptid me-2 geringfügig verbessern, was sich sowohl an den geringer werdenden Intensitäten bei 370 und 640 nm als auch an der höheren Absorption der Soretbande zeigt

(Abb. 49a). Eine *charge transfer*-Bande mit einem im Vergleich zur Soretbande mehr als 100fach schwächeren Extinktionskoeffizienten bei 695 nm, die bei einer Koordination von Schwefel (aus Methionin) mit dem Eisen des Porphyrins zurückzuführen ist, wird nicht beobachtet (Dickerson und Timkovitch, 1975; Moore und Pettigrew, 1990, Sreenathan und Taylor, 1971). Die sehr geringe Absorption dieser Bande erlaubt es allerdings nicht, eine His-Met-Koordination des Kofaktors vollständig auszuschließen (Rojas et al., 1997).

Eine Reduktion des FePPIX-me-2-Komplexes mit Natriumdithionit ergab eine bathochrome Verschiebung der Soretbande zu 425 nm und eine Intensitätszunahme der α -Bande bei 562 nm, wie es bereits beim FePPIX-me-1-Komplex beobachtet wurde.

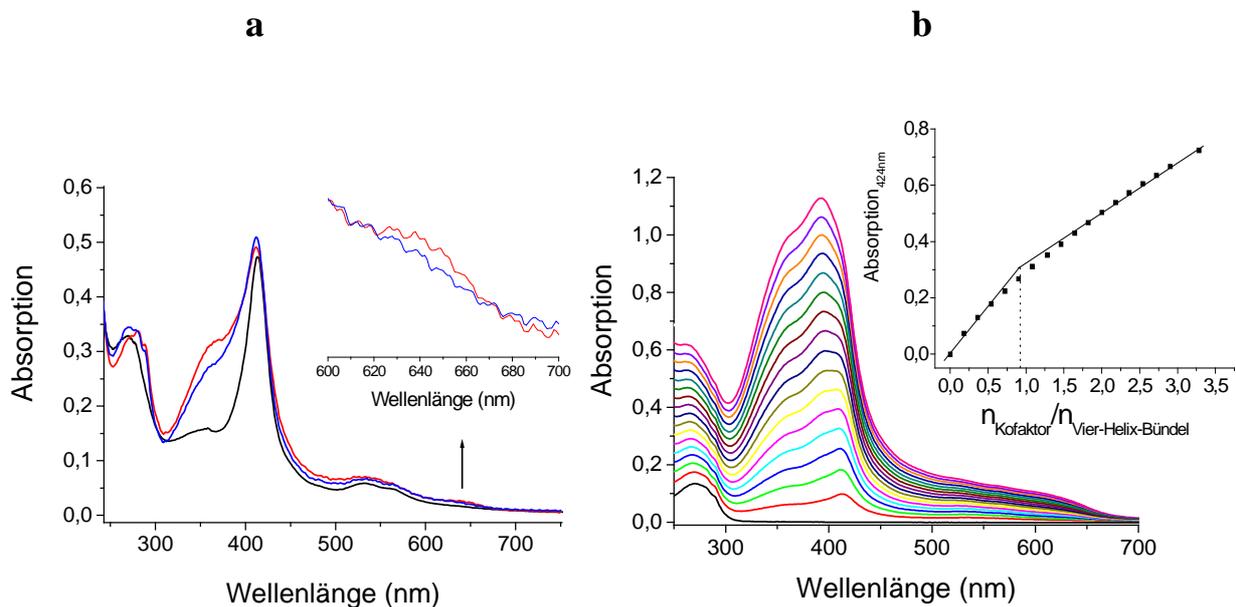


Abbildung 49: (a) Absorptionsspektren von 8 μM Häm-in-me-2 vor (rot) und nach (blau) der Ultraschallbehandlung und zum Vergleich 5 μM FePPIX-me-1 (schwarz). Der Bildeinsatz zeigt die Intensitätsabnahme der Absorptionsbande bei 640 nm, die aus einem *high spin*-Fe(III)-Zustand resultiert. (b) Chemische Titration zum Peptid me-2 in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,5). Die Einfügung zeigt die Auftragung der Absorptionsänderung bei 416 nm in Abhängigkeit vom Verhältnis der Stoffmenge des Kofaktors zu der des Vier-Helix-Bündels von me-2.

Zur weiteren Charakterisierung des entstandenen Komplexes, von dem bislang im Vergleich zum FePPIX-me-1 eine schwächere Einbindung des Kofaktors festgestellt werden konnte, diente die chemische Titration des Kofaktors zum Peptid (Abb. 49b). Dieses Verfahren zeigte, dass pro Vier-Helix-Bündel ein Häm-in gebunden wird. Infolgedessen trifft das in Abbildung 48 gezeigte Modell (a), in dem zwei Hämingruppen eingelagert sind, nicht zu.

5.1.4.2 Struktur des FePPIX-me-2-Komplexes

Die Gelfiltration wurde zur Bestimmung des Molekulargewichtes in Lösung eingesetzt. Es konnten Molekulargewichte von 19400 (± 2000) Da vom Apo-peptid und 20500 (± 2000) Da vom Holo-peptid ermittelt werden, die die Existenz eines Vier-Helix-Bündels bestätigen. Vergleichbar zum me-1 wurde als Nebenkomponente zu 10 % ein tetramerer Anteil mit einem Molekulargewicht von 42000 (± 2000) Da ermittelt.

Die Sekundärstruktur des Peptids me-2 bzw. des FePPIX-me-2-Komplexes wurde auch mit Hilfe des Zirkulardichroismus untersucht. Aus der beobachteten Elliptizität bei 222 nm ohne Zusatz eines Denaturierungsmittels wurde bei RT unter Anwendung der in Kap. 3.1.4 angegebenen Formel ein α -Helixanteil von 75 % sowohl für das Apo- als auch für das Holo-peptid ermittelt. Dieser Wert entspricht unter Berücksichtigung eines Fehlers von 5 % der α -Helikalität von FePPIX-me-1 mit 72 (± 5) %. Obgleich Methionin im Vergleich zu Histidin eine größere Bildungstendenz zu einer α -Helix aufweist (Kap. 1.2), führt eine einzelne Substitution kaum zu einer Änderung dieses Parameters. Ein möglicher Einfluss des Methionins auf die Gesamtstabilität des Komplexes wird im nachfolgenden Kapitel dargestellt.

5.1.4.3 Stabilität von FePPIX-me-2

Die Denaturierung des Apo- und Holo-peptids durch Zugabe von GdnHCl zur Ermittlung der Stabilitäten wurde über die Verschiebung der Tryptophanfluoreszenzbande beobachtet. Aus der bathochromen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums mit zunehmender Konzentration des denaturierenden Agens wurden Stabilitäten von $\Delta G_{H_2O} = 18,4$ ($\pm 1,8$) kJ mol⁻¹ und eine Kooperativität von $m = 3,0$ ($\pm 0,3$) kJ mol⁻¹ M⁻¹ ermittelt. Die Konzentration, bei der 50 % des Peptids bereits entfaltet vorliegen, betrug $c_{1/2} = 6,5$ ($\pm 0,2$) M GdnHCl.

Die ermittelten Stabilitätsparameter sind vergleichbar mit dem FePPIX-me-1-Komplex ($\Delta G_{H_2O} = 23,3$ ($\pm 2,3$) kJ mol⁻¹, $m = 4,3$ ($\pm 0,4$) kJ mol⁻¹ M⁻¹, $c_{1/2} = 5,4$ ($\pm 0,2$) M GdnHCl). Damit kann gezeigt werden, dass sowohl das Methionin als auch der Glycin-loop im Vergleich zur Disulfidbrücke die Stabilität des Peptids-me-2 nicht ändern.

5.1.4.4 Redoxverhalten von FePPIX-me-2

Aus den chemischen Titrations der Hämingruppe zum Peptid me-2 ist bereits bekannt, dass sich ein Häm in im Peptiddimer befindet, dessen Halbstufenpotential durch chemische Titration bestimmt werden kann. Unter Verwendung der Mediatorenlösung, die auch für die Bestimmung der Halbstufenpotentiale des FePPIX-me-1-Komplexes eingesetzt wurde

(Tab. 7), ergibt die Titration von FePPIX-me-2 die in Abbildung 50 gezeigte Redoxkurve mit einem Halbstufenpotential von $E_{m,pH8} = -365 (\pm 15)$ mV vs. Ag/AgCl. Dies entspricht ein Halbstufenpotential von $E_{m,pH8} = -138 (\pm 15)$ mV vs. NHE. Die Redoxkurve wurde mit der Nernstgleichung für einen Ein-Elektronenübergang (Gl. 4.5.1.1) den Messpunkten angepasst.

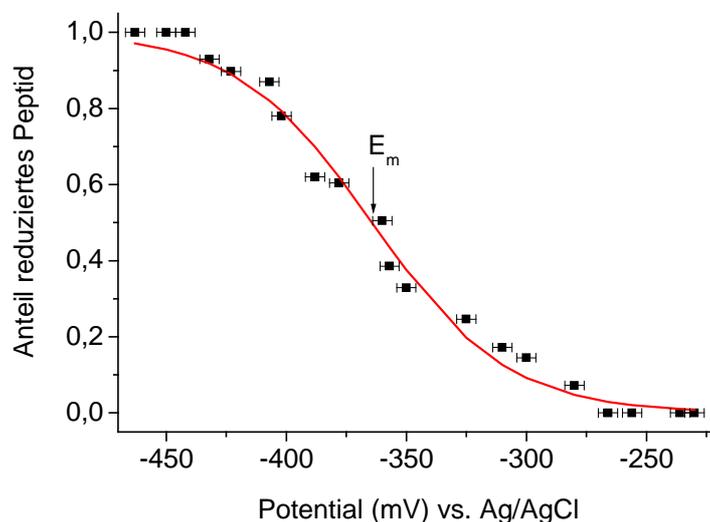


Abbildung 50: Chemische Redox Titration von 8 μ M FePPIX-me-2 mit Natriumdithionit in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 8). Die Auswertung erfolgte über die Intensitätszunahme der α -Bande bei 562 nm mit zunehmender Dithionit-Konzentration.

Vergleichsweise wurde von $[\text{H10A24}]_2$, bei dem das Histidin des Prototyps $[\text{H10H24}]_2$ in Position 24 gegen ein Alanin substituiert wurde, bei Bindung von nur einem Hämin ein Halbstufenpotential von $E_{m,pH8} = -155 (\pm 10)$ mV vs. NHE gefunden (Shifman et al., 1998). Eine Koordination des Kofaktors in der Position 24 im anderen Fall, $[\text{A10H24}]_2$, ergab ein höheres Potential von $E_{m,pH8} = -110 (\pm 10)$ mV (Gibney und Dutton, 1999). Damit kann die Aussage getroffen werden, dass sich das Hämin in me-2 aufgrund des ähnlichen Halbstufenpotentials im Allgemeinen in gleicher elektrochemischer Umgebung wie jeweils das in $[\text{H10A24}]_2$ und $[\text{A10H24}]_2$ befindet. Aufgrund der in Kap. 5.1.1 erläuterten Koordination des Hämins zwischen den Histidinen in Position 10 kann das Hämin in me-2 wegen des höheren Halbstufenpotentials aber leichter reduziert werden als das sich in gleicher Position befindende Hämin in $[\text{H10A24}]_2$. Bekanntlich haben His-Met- im Vergleich zu *bis*-His-Koordinationen bei ansonsten gleicher Peptidumgebung ein um 15 – 30 mV höheres Halbstufenpotential (Ishida et al., 2004). Damit würde das ermittelte Halbstufenpotential von FePPIX-me-2 mit $E_{m,pH8} = -135 (\pm 15)$ mV bedeuten, dass der Kofaktor eine His-Met-Koordination eingeht. In Anbetracht der Fehlergrenzen stimmt das Halbstufenpotential allerdings auch mit dem einer *bis*-His koordinierten Hämingruppe überein. Somit waren

weitere spektroskopische Charakterisierungsmethoden wie die EPR-Spektroskopie notwendig, um die Einlagerungssituation des Hämins zu entschlüsseln. Die Ergebnisse sollen nachfolgend dargestellt und diskutiert werden.

5.1.4.5 Spinzustand des Eisens im FePPIX-me-2-Komplex

Die EPR-Spektroskopie an Hämiproteinen dient zur Aufklärung des Spinzustands des Eisens und damit zur Charakterisierung der Einbausituation des Hämins. In der Arbeitsgruppe von Prof. Lubitz wurden bereits cw-EPR-Messungen am FePPIX-me-1 durchgeführt und die Ergebnisse ausführlich dargestellt (Fahnenschmidt et al., 2000). Dieser Peptid-Komplex soll in diesem Kapitel als Vergleichsprobe zum FePPIX-me-2 dienen. Die X-Band cw-EPR-Spektren beider *maquettes* sind in Abbildung 51 gezeigt.

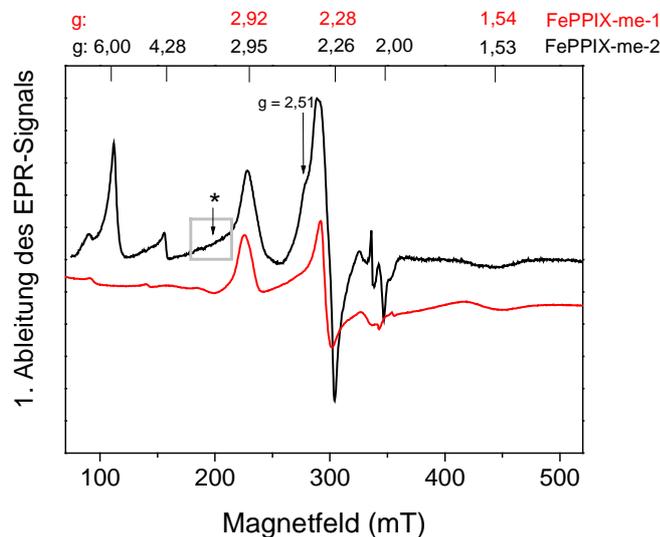


Abbildung 51: X-Band cw-EPR-Spektren vom FePPIX-me-1 (rot) und FePPIX-me-2 (schwarz) in 50 mM TRIS/HCl (100 mM NaCl, pH 7,5); $\nu = 9,47$ GHz, $T = 20$ K. * Im FePPIX-me-2-Komplex tritt bei $g_{\max} = 3,48$ zusätzlich eine *highly anisotropic low spin* (HALS)-Komponente auf.

Das EPR-Spektrum von FePPIX-me-1 zeigt ein deutliches *low spin* Fe^{3+} -Signal mit g -Tensor-Hauptwerten bei $g_z = 2,92$, $g_y = 2,28$ und $g_x = 1,54$. Der Anteil an ungebundenem oder fünffach koordiniertem Eisen im Häm in mit einem Gesamtspin von $S = 5/2$, das als *high spin*-Spezies vorliegt und Tensorwerte von etwa $g_{\perp} = 6,00$ und $g_{\parallel} = 2,00$ aufweist, ist in diesem Komplex vernachlässigbar klein (< 1 %). Neben dem Signal dieser *high spin*-Spezies liegen bei $g = 2$ weitere unspezifische paramagnetische Verunreinigungen vor. Die Detektion des *low spin*-Zustands mit $S = 1/2$ stellt einen Nachweis für den spezifischen Einbau der Hämingruppe über eine starke axiale Koordination mit zwei parallel planar angeordneten Histidinliganden dar (Review: Walker, 2004). Als Beispiel soll Eisen-Tetraphenylporphyrin

genannt werden, das in Chloroform durch zwei Imidazole oktaedrisch koordiniert wird und die rhombischen g -Tensoren von $g_z = 2,87$, $g_y = 2,29$ und $g_x = 1,56$ aufweist (Walker et al., 1984).

Im Vergleich zum Peptid me-1 zeigt das EPR-Spektrum von FePPIX-me-2 neben der *low spin*-Komponente des Eisens mit g -Tensorwerten bei $g_z = 2,95$, $g_y = 2,26$ und $g_x = 1,53$ eine nicht zu vernachlässigende *high spin*-Spezies mit g -Tensoren von $g_{\perp} = 6,02$ und $g_{\parallel} = 2,00$, die bei ungebundenem oder fünffach koordiniertem Eisen im Hämin vorliegt (Peisach et al., 1973; Scholes et al., 1982). Dieses Ergebnis stimmt mit dem der UV-Vis-Spektroskopie überein, bei dem das Absorptionsspektrum bereits auf einen unvollständigen Einbau des Hämins hinweist (Kap. 5.1.4.1). Das Signal bei $g = 4,28$ ist auf rhombisches Eisen zurückzuführen.

Im EPR-Spektrum des FePPIX-me-2-Komplexes ist des Weiteren eine *highly anisotropic low spin* (HALS)-Komponente, auch als *large g_{max}* bezeichnet, bei $g_{max} = 3,48$ zu beobachten, die auf eine verdrehte Stellung der axialen Liganden hinweist (Review: Walker, 2004).

Die rhombischen g -Tensoren und die daraus erhaltenen Ligandenfeldparameter V/λ , Δ/λ und V/Δ (Gleichung 3.3.1; Tab. 11) beider Hämin-*maquettes* zeigen typische Werte für einen *low spin*-Zustand des Eisens und sind mit den g -Tensoren des Prototyps [H10A24]₂, in dem eine *bis*-His-Koordination der Hämingruppe vorliegt, mit $g_z = 2,89$, $g_y = 2,24$ und $g_x = 1,54$ vergleichbar (Gibney et al., 2000).

Tabelle 11: Vergleich der g -Tensorwerte und Ligandenfeldparameter von FePPIX-me-2 mit FePPIX-me-1 in 50 mM Tris/HCl (100 mM NaCl, pH 7,5).

EPR-Daten	FePPIX-me-2	FePPIX-me-1
g_z	$2,95 \pm 0,01$	$2,92 \pm 0,01$
g_y	$2,26 \pm 0,01$	$2,28 \pm 0,01$
g_x	$1,53 \pm 0,02$	$1,54 \pm 0,02$
V/λ	$1,89 \pm 0,03$	$1,95 \pm 0,03$
Δ/λ	$3,39 \pm 0,13$	$3,27 \pm 0,13$
V/Δ	$0,56 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,02$

Dennoch kann aus den g -Tensoren keine genaue Aussage über die Lage der Hämingruppe gemacht werden, da von natürlichen Häminproteinen in wässriger Lösung g -Tensoren von $g_z = 3,03$, $g_y = 2,23$ und $g_x = 1,43$ für Cytb₅ (*bis*-His-Koordination), (Bois-Poltoratsky und Ehrenberg, 1967) und $g_z = 3,04$, $g_y = 2,18$ und $g_x = 1,42$ für Cytb₅₆₂ (His-Met-Koordination) bekannt sind (Mathews, 2001).

Trotz der unterschiedlichen Koordination des Hämins sind die g -Tensoren kaum verschieden. Damit kann durch die EPR-Spektroskopie die Fragestellung bezüglich der Koordination der Hämingruppen im Peptid me-2 nicht eindeutig beantwortet werden. Die fast identische Lage der g -Tensoren schließt eine Überlagerung der Signale beider Komponenten nicht aus. Außerdem soll an dieser Stelle auf die Schulter bei $g = 2,51$ hingewiesen werden, die beim FePPIX-me-1 nicht beobachtet wird und vielleicht ein verdecktes EPR-Signal andeutet. Insgesamt konnte durch Anwendung der EPR aufgrund der Beobachtung einer HALS-Spezies und eines *high spin*-Zustands des Eisens gezeigt werden, dass das Hämin im Vergleich zum FePPIX-me-1 weniger stark gebunden vorliegt und die Substitution eines Histidins gegen Methionin zumindest einen negativen Einfluss auf die *bis*-His-Bindung des Kofaktors ausübt. Für weitere Informationen bezüglich der Koordination wurde die Resonanz-Raman-Spektroskopie angewendet, deren Ergebnisse im Nachfolgenden dargestellt werden.

Für die strukturelle Charakterisierung von FePPIX-Proteinen ist die Resonanz-Raman-Spektroskopie eine besonders geeignete Technik. Durch Anregung in einem elektronischen Übergang des Chromophors ergibt sich ein Resonanz- und damit ein Verstärkungsfaktor, so dass dessen Schwingungsbanden im Spektrum stärker werden. Im Gegensatz dazu treten die Proteinschwingungsbanden im Spektrum nicht auf (Kap. 3.1.5). Zur Charakterisierung der Bindungsstelle des Kofaktors in me-2 wurden für die Messungen als Vergleichsproben zum einen FePPIX-me-1, in dem eine *bis*-His-Koordination vorliegt und zum anderen das natürlich vorkommende FePPIX-Protein Cyt c verwendet, in dem das Hämin durch ein Histidin und Methionin gebunden wird. Die Proben wurden sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand (durch Zugabe von Natriumdithionit) vermessen. Die beobachteten Schwingungsbanden sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Die ermittelten Markerbanden von Cyt c stimmen unter Berücksichtigung ihres Fehlers mit denen der Literatur überein (Oellerich, 2001).

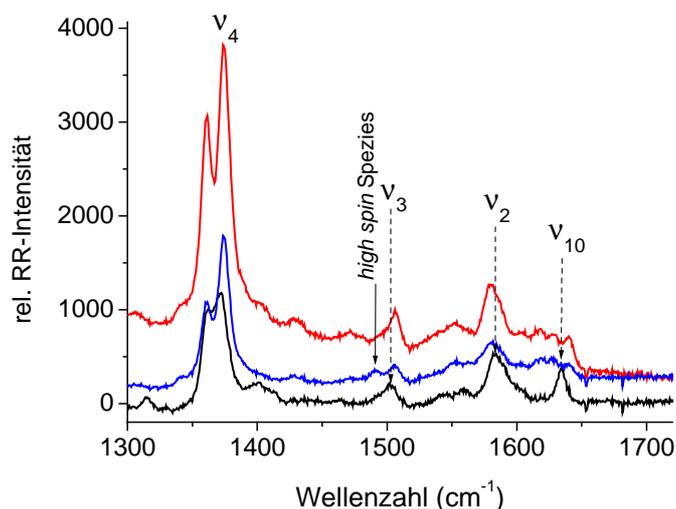
Die intensivste Resonanz-Raman-Bande von Häminproteinen ist die als ν_4 bezeichnete Bande bei 1374 cm^{-1} . Aufgrund von Photoreduktionen und infolgedessen der Akkumulation an reduzierter Spezies sind bei der intensivsten ν_4 -Bande auch Ramanstreuungen der reduzierten Hämproteine detektierbar.

Tabelle 12: Zuordnung und Vergleich der intensivsten RR-Banden (in cm^{-1}) in der Marker-Banden-Region von Cytc, FePPIX-me-1 und FePPIX-me-2.

	Cytc		FePPIX-me-1		FePPIX-me-2		Cytc (Oellerich, 2001)	
	ox	red	ox	red	ox	red	ox	red
ν_4	1373	1361	1375	1389	1374	1361	1373	1361
ν_3	1503	1492	1507	1494	1506	1494	1502	1492
ν_2	1584	1588	1580	1583	1582	1586	1584	1591
ν_{10}	1635	1621	1639	1621	1641	1624	1635	1621
ν_{11}	—	1547	—	1554	—	1554	—	—

Der Fehler der gemessenen RR-Banden beträgt $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$

Die drei weiteren Markerbanden ν_3 , ν_2 und ν_{10} geben Informationen über den Spinzustand des Hämins. Die Lage der ν_3 -Bande aller drei untersuchten Systeme bei Wellenzahlen $> 1500 \text{ cm}^{-1}$ gibt einen Hinweis auf einen *low spin*-Zustand des Eisens und folglich auf eine sechsfache Koordination des Kofaktors (Rojas et al., 1997). Beim FePPIX-me-2 ist im Spektrum zusätzlich eine ν_3 -Bande bei 1492 cm^{-1} zu beobachten (Abb. 52). Sie befindet sich damit bei einer Wellenzahl von $< 1500 \text{ cm}^{-1}$ und resultiert aus einem *high spin*-Zustand des Eisens. Damit bestätigt die Resonanz-Raman-Spektroskopie die vorherigen spektroskopischen Untersuchungen und zeigt, dass neben einem sechsfach koordinierten Eisen im Hämin als *low spin* auch eine fünffach koordinierte Spezies vorliegt oder ein sechster Ligand nur schwach an den Kofaktor gebunden ist.

**Abbildung 52:** Resonanz-Raman-Spektren oxidierter FePPIX-Proteine: $25 \mu\text{M}$ Cytc (schwarz), $40 \mu\text{M}$ FePPIX-me-1 (rot) und $23 \mu\text{M}$ FePPIX-me-2 (blau) bei 77 K in $50 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl , $\text{pH } 7,3$). Die Anregungswellenlänge betrug 407 nm .

Aus der Reduktion des Cytc bzw. der FePPIX-*maquettes* resultiert eine Verschiebung der ν_4 - und ν_3 -Bande zu kleineren Wellenzahlen. Durch die Reduktion erscheint im Spektrum eine neue Markerbande, die sogenannte ν_{11} -Bande. Diese ν_{11} -Bande des reduzierten Cytc befindet

sich bei 1547 cm^{-1} , während die der Häm-*maquettes* bei 1554 cm^{-1} liegt und zusätzlich eine weitere Schwingung mit geringerer Intensität bei 1532 cm^{-1} beobachtet wird. Sowohl die ν_2 -Bande des Cytc als auch die der zwei artifiziellen Hämproteine haben die gleiche Lage, während die ν_{10} -Bande der Häm-*maquettes* aufgrund schlechter Auflösung nicht genau zugeordnet werden kann (Abb. 53).

Die reduzierte Form der drei Hämproteine gibt an, dass das in me-2 eingebundene Häm nicht His-Met koordiniert ist, da die Lage der Resonanz-Raman-Banden nicht mit denen des Cytc, sondern mit den Banden des FePPIX-me-1-Komplexes übereinstimmen, in dem nur eine *bis*-His-Koordination vorliegen kann.

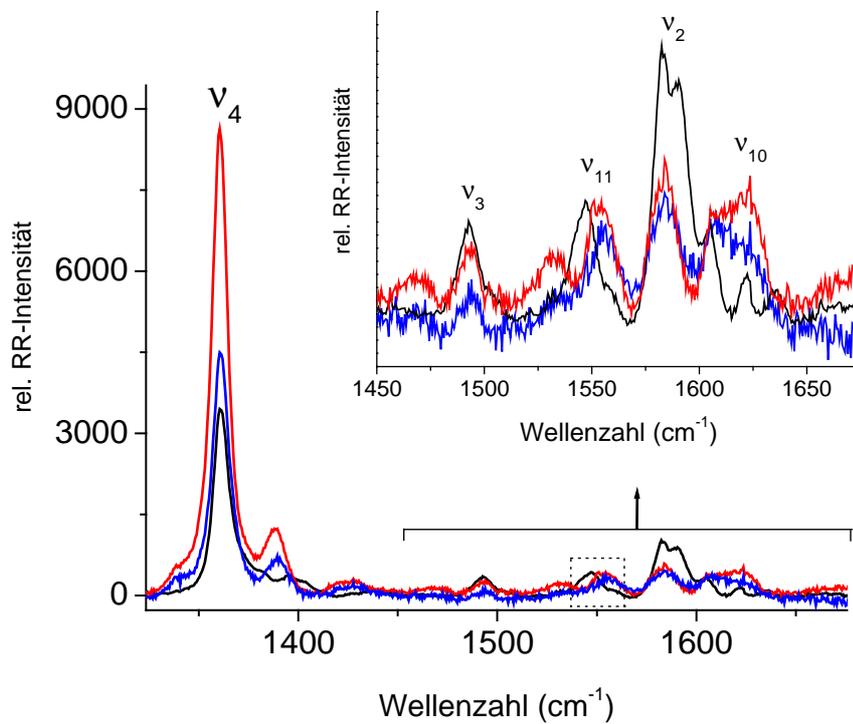


Abbildung 53: Resonanz-Raman-Spektren reduzierter FePPIX-Proteine: $25\ \mu\text{M}$ Cytc (schwarz), $40\ \mu\text{M}$ FePPIX-me-1 (rot) und $23\ \mu\text{M}$ FePPIX-me-2 (blau) bei $77\ \text{K}$ in $50\ \text{mM}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ($100\ \text{mM}$ KCl , pH 7,3). Die Anregungswellenlänge betrug $407\ \text{nm}$. Die unterschiedliche Lage der ν_{11} -Bande ist markiert. Die RR-Banden zwischen 1450 und $1675\ \text{cm}^{-1}$ sind vergrößert dargestellt.

Alle spektroskopischen Charakterisierungsmethoden an FePPIX-me-2 haben gezeigt, dass der Austausch von Methionin die Einbindung des Hämins beeinflusst und die Kofaktoren nicht mehr vollständig durch zwei planar zueinander stehende Histidine gebunden werden. Dennoch treten *low spin*-Komponenten auf, die bei einem sechsfach koordinierten Häm vorliegen. Durch die unterschiedliche Lage der ν_{11} -Bande im RR-Spektrum der reduzierten Hämproteine ist damit eine His-Met-Koordination für den FePPIX-me-2-Komplex

auszuschließen; folglich kann nur das in Abbildung 48 gezeigte Modell “c“ zutreffen. Das Vorliegen einer *high spin*-Spezies des Eisens kann damit erklärt werden, dass eine Helix-turn-Helix-Untereinheit des Vier-Helix-Bündels seine Lage so verändert, dass sein Methioninrest in Position 10 durch die Größe des Schwefelatoms eine *bis*-His-Koordination behindert und das Hämin nur noch fünffach gebunden vorliegt. Die Anwesenheit von freiem Hämin, in dem das Eisen ebenfalls einen *high spin*-Zustand aufweist, kann aufgrund der durchgeführten Chromatographie, die den ungebundenen Kofaktor vom restlichen Peptid-Komplex abtrennt, ausgeschlossen werden. Das Peptid me-2 enthielt in der Sequenz ein Cystein, das ebenfalls Kofaktoren binden kann. Auch diese fünffache Koordination des Hämins würde die Beobachtung einer *high spin*-Komponente erklären. Als Kontrollexperiment dienend wurde daraufhin me-3 synthetisiert, das kein Cystein enthält. Da das UV-Vis-Spektrum nach dem Einbau des Hämins identisch mit dem von FePPIX-me-2 war, kann die Koordination des Kofaktors am Cystein ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Spektren von FePPIX-me-2 sowohl eine *low spin*-Komponente des Eisens, die aus einer sechsfachen Koordination resultiert als auch eine *high spin*-Spezies, die durch Abschirmung der sechsten Koordinationsstelle des Eisens durch Methionin erklärt werden kann. Dadurch kommt es zu einer Teilaufhebung der *bis*-His-Koordination des Hämins und zum Auftreten einer fünffach koordinierten Spezies.

Um die hier behandelte Fragestellung abschließend zu behandeln, wurde das Peptid me-4 synthetisiert. An diesem Peptid, in dem drei Methionine und ein Histidin sich an gleicher Position im Vier-Helix-Bündel gegenüberstehen, sollte untersucht werden, ob eine artifizielle His-Met-Koordination des Kofaktors prinzipiell möglich ist. Die Schwierigkeit in der Synthese bestand darin, zwei 62mere zu synthetisieren und diese über Disulfidbrücken in der Weise zu verbinden, dass keine Disulfidbrücken zwischen homomeren Helix-turn-Helix-Motiven entstehen. Es gelang, das Peptid, dessen Masse von 14622 Da (berechnet: 14618 Da) mit der ESI-MS nachgewiesen wurde, mit einer Ausbeute von 1 mg zu synthetisieren. Das UV-Vis-Spektrum deutete nach dem Einbauversuch des Hämins auf einen hohen Gehalt an freiem oder fünffach koordiniertem Kofaktor hin. Das Verhältnis der Absorption bei 410 nm (peptidgebundenen Hämin) zu 380 nm (freies Hämin in Lösung) betrug 1,16 (zum Vergleich: FePPIX-me-1: 3,25) und macht damit den unvollständigen Einbau des Kofaktors deutlich (Abb. 54a). Die Absorption bei 402 nm zeigte, dass nur geringe Mengen an Hämin eingebaut wurden, da die Lage der Soretbande durch den Einbau weniger stark bathochrom verschoben vorlag und nicht bei 413 nm zu beobachten war wie es z. B. vom FePPIX-me-1 bekannt war (Kap. 5.1.1). Die Reduktion durch Natriumdithionit lieferte hingegen das typische Spektrum

reduzierter Hämproteine mit Absorptionen bei 425, 531 und 560 nm. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei der Reduktion ein besserer Einbau des Kofaktors ermöglicht wird, da das Eisen-Atom in seiner reduzierten Form einen kleineren Ionenradius hat und somit in seiner Porphyrinumgebung besser zwischen seine Bindungspartner passt. Im EPR-Spektrum war fast ausschließlich eine *high spin*-Spezies zu beobachten, was durch die Lage der ν_3 -Bande bei 1492 cm^{-1} im Resonanz-Raman-Spektrum der oxidierten Spezies bestätigt wurde. Die Lage der Markerbanden der reduzierten Form entsprechen denen der FePPIX-me-1/-me-2-Komplexe (Abb. 54b). Insbesondere befindet sich die ν_{11} -Bande bei gleicher Wellenzahl wie die von FePPIX-me-1 und FePPIX-me-2, während die ν_{11} -Bande des Cytc zu kleineren Wellenzahlen verschoben vorliegt. Damit liegt auch in diesem Peptid keine His-Met-Koordination vor. Geringe Anteile einer *low spin*-Spezies könnten durch Zusammenlagerung zweier Vier-Helix-Bündel entstanden sein, deren Histidine kurzzeitig nach außen gedreht waren, um somit das Häm sechsfach zu koordinieren.

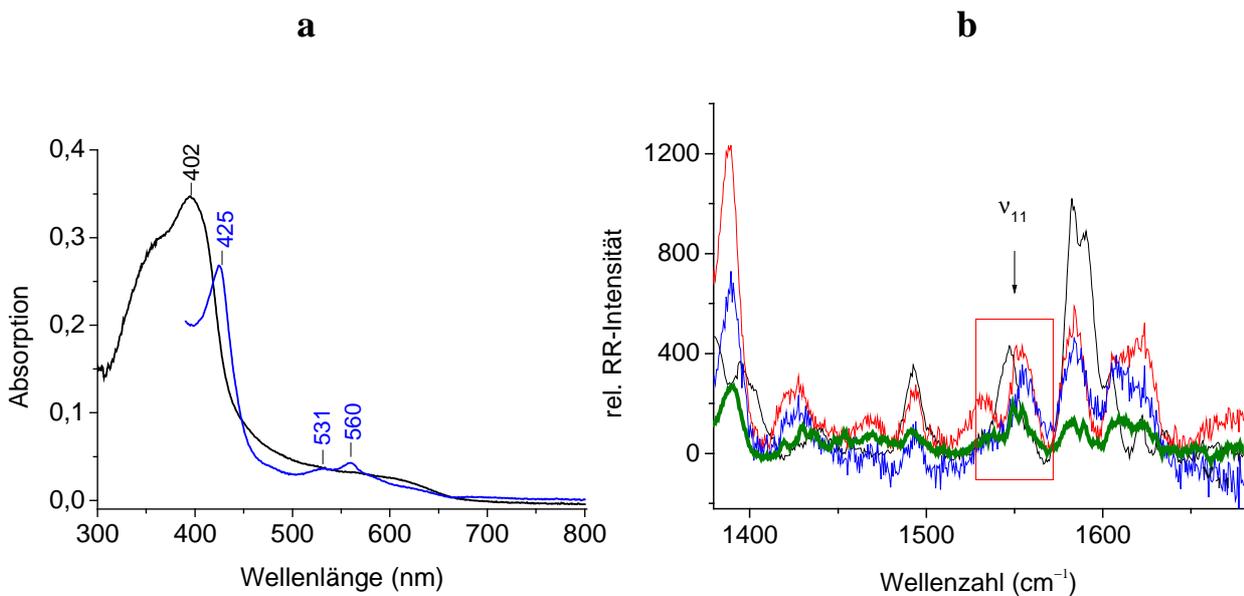


Abbildung 54: (a) Absorptionsspektrum nach dem Einbau von FePPIX in das Peptid me-4 in der oxidierten (schwarz) und reduzierten (blau) Form. (b) Resonanz-Raman-Spektren der reduzierten Häm-Proteine: 25 μM Cytc (schwarz), 40 μM FePPIX-me-1 (rot) und 23 μM FePPIX-me-2 (blau) und 8 μM FePPIX-me-4 (grün) bei 77 K in 50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7). Die Anregungswellenlänge betrug 407 nm. Die unterschiedliche Lage der ν_{11} -Bande ist markiert.

Die Experimente haben gezeigt, dass die verwendete Peptidsequenz me-2 keine eindeutige His-Met-Koordination des Hämins zulässt und dass dieses *maquette* somit nicht ohne weitere Modifikationen als Modell für ein natives FePPIX-Protein wie Cytc verwendet werden kann. Dies begründet vermutlich auch die Tatsache, dass für dieses Sequenzmotiv noch keine His-Met-Koordination in der Literatur beschrieben ist.

5.2 Wechselwirkung von Chlorophyllderivaten mit *de novo* synthetisierten Peptiden

In diesem Kapitel werden die Peptide me-1 und me-6 für den Einbau verschiedener Chlorophyllderivate verwendet und die spektroskopischen Eigenschaften der entstandenen Peptid-Kofaktor-Komplexe verglichen (Abb. 55a, b). Die Wahl dieser Peptide beruhte darauf, dass für me-1 bereits gezeigt werden konnte (s. Kap. 5.1), dass die Hämingruppe gut in das Vier-Helix-Bündel einbindet. Folglich wird eine entsprechend effiziente Koordination auch für die Chlorophyllderivate erwartet. Für das Peptid me-6 mit einem zusätzlichen N-terminalen Methioninrest war bereits eine erfolgreiche Einlagerung von Zink-Chlorin e_6 ($ZnCe_6$) aus der Literatur bekannt (Razeghifard und Wydrzynski, 2003). Dieses Peptid wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Wydrzynski rekombinant durch Expression in *E. coli* und nicht durch chemische Peptidsynthese hergestellt. Durch die Wahl von Chlorophyllderivaten als Kofaktoren eignen sich diese Proteinkomplexe im Unterschied zu den FePPIX-Proteinen zum Nachbau von synthetischen Photosystemen, da die Pigmente Licht absorbieren und aus ihrem angeregten Zustand Elektronen an ein Akzeptormolekül abgeben können. Im Unterschied zu den natürlichen Photosystemen wurden Zinkchlorine verwendet, die im Vergleich zu den entsprechenden Magnesiumkomponenten stabiler sind, aber vom chemischen Verhalten die gleichen Eigenschaften aufweisen (Kap. 1.9.1 und Scheer, 1991). In diesem Kapitel sollen nach der vollständigen Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Zinkchlorinen und Peptiden auch Elektronentransferprozesse zu einem nicht kovalent gebundenem Chinon gezeigt werden.

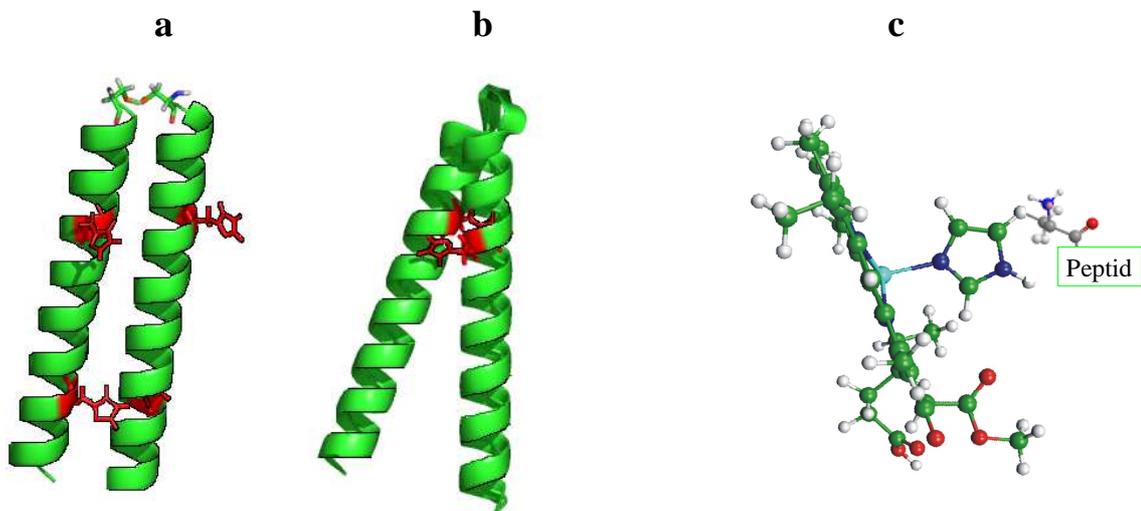


Abbildung 55: Schematische Darstellung des (a) Peptids me-1 mit einer Disulfidbrücke als *turn* und vier Histidinen (rot) pro Helix-*turn*-Helix-Bindungsmotiv und des (b) Peptids me-6 mit einem Glycin-*loop* und zwei Histidinen (rot); (c) Fünffache Koordination des Histidins an das Zentralmetall des Zinkchlorins.

5.2.1. Darstellung der photosynthetischen Pigmente

Die im vorliegenden Kapitel verwendeten Chlorine und Bakteriochlorine sind Chlorophyll *a*, Pheophorbid *a*, Pheophytin *a*, Zink-Pheophorbid *a*, Zink-Pheophytin *a*, Zink-Chlorin *e*₆ und Zinkbakteriopheophorbid *a*. Die nachfolgend aufgeführten Darstellungsmethoden der genannten Kofaktoren und die zugehörigen analytischen Charakterisierungen sind im Kapitel 4.2 im Detail beschrieben. Nach der Isolierung von Chl*a* aus *Spirulina platensis* wurde durch Zugabe von Eisessig das demetallisierte Molekül (Pheophytin *a*) gewonnen. Durch Umsetzung mit Zinkacetat in Essigsäure entstand das Zink-Pheophytin *a*. Wenn das Chl*a* anstelle von Eisessig mit Trifluoressigsäure umgesetzt wurde, erfolgte neben der Entfernung von Magnesium auch die Verseifung des Phytylesters. Aus dem entstandenen Pheophorbid *a* konnte durch Umsetzung mit Zinkacetat in Eisessig das Zink-Pheophorbid *a* erhalten werden. Die Darstellung des Zink-Chlorin *e*₆ erfolgte aus der Umsetzung des kommerziell erworbenen Chlorin *e*₆ mit Zinkacetat in einer Pufferlösung (pH 10). Ausgehend vom BChl *a*, das aus dem Acetonextrakt aus *Allochromatium vinosum*-Zellen isoliert wurde, wurde über die Stufe des Bakteriopheophorbids *a* durch Zugabe von Zinkacetat in Eisessig und Erhitzen unter Rückfluss das Zink-Bakteriopheophorbid *a* erhalten.

Die charakteristischen Absorptionsspektren der dargestellten Verbindungen werden nachfolgend beschrieben.

Die Abbildung 56 zeigt die Absorptionsspektren von Chlorophyll *a* (a), Pheophorbid *a* (b) und Zink-Pheophorbid *a* (b). Alle drei Verbindungen unterscheiden sich in der Lage ihrer Absorptionsbanden, die aus den verschiedenen Strukturen resultieren. Nach dem Gouterman-Modell sind bei Metalloporphyrinen die B und Q-Banden entartet, während bei der freien Porphyrinbase die Entartung aufgehoben wird, obgleich die Übergänge der beiden äußerst intensiven B-Banden energetisch sehr dicht beieinander liegen, so dass sie als eine Bande im UV-Vis-Spektrum erscheinen. Dieses Modell lässt sich auch in erster Näherung auf die vorliegenden Spektren übertragen. Die Soretbande aller drei Chlorinsysteme ist zweifach entartet und infolgedessen ergeben die B_x- und B_y-Banden eine gemeinsame Absorptionsbande. Die Q_y-Banden (Q_y (0,0)) zeigen im Vergleich zu den Q_x-Banden eine hohe Intensität und ihre vibronische Nebenbande Q_y (0,1), die aus dem niedrigsten Schwingungsniveau des Grundzustands und dem ersten Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustands resultiert, ist in allen drei Spektren zu beobachten. Beim Chl*a* mit Magnesium als Zentralmetall und beim ZnPheid*a* wird die Q_x-Bande (Q_x (0,0)), die den Übergang zwischen dem niedrigsten Schwingungsniveau des Grundzustands und dem des ersten angeregten Zustands beschreibt, nur mit geringer Intensität beobachtet. Beim

metallfreien Pheophorbid *a* wird die Äquivalenz der x- und y-Richtungen der Dipolmomente aufgehoben, da zwei verschiedene Sorten von Stickstoffatomen vorliegen (mit und ohne Wasserstoff). Dadurch können zwei getrennte Q_x -Banden bei 505 ($Q_x(0,1)$) und 533 nm ($Q_x(0,0)$) beobachtet werden. Beim Vergleich der drei Spektren zeigt sich, dass das Verhältnis von Soret- zu Q_y -Bande bei den metallhaltigen Verbindungen (Chl*a* und ZnPheid*a*) geringer ist ($\approx 1,3$) als beim Pheid*a* ohne Zentralmetall (hier Soret-/ Q_y -Bande $\approx 2,0$). Die Entfernung des Metalls erhöht die Symmetrie des Systems und infolgedessen wird die Intensität der Soret- als auch der Q_x -Banden erhöht. Die η_1 - und η_2 -Banden, die bei allen carbonyl-substituierten Porphyrinsystemen erscheinen (in allen Chlorophyllsystemen liegt mindestens eine Carbonylgruppe vor: α -C=O am zyklischen Isopentanonring), sind als Schultern in der Soretbande auf der höherenergetischen Seite zu beobachten (Caughey et al., 1965; Weiss, 1972 und 1978). Die η_1 - und η_2 -Banden erscheinen beim Pheid*a* weniger aufgelöst, da durch die Nichtäquivalenz der Übergänge in x- und y-Richtung die Absorption in der Soretbande neben den B_x - und B_y -Übergängen noch weitere, nicht aufgelöste Übergänge beinhaltet (Weiss, 1978).

Die Absorptionsspektren des Pheophytins und des Zink-Pheophytins sind mit denen der entsprechenden Pheophorbide (Pheid*a* und ZnPheid*a*) nahezu identisch, da der Phitylrest kaum einen Einfluss auf das Absorptionsspektrum hat.

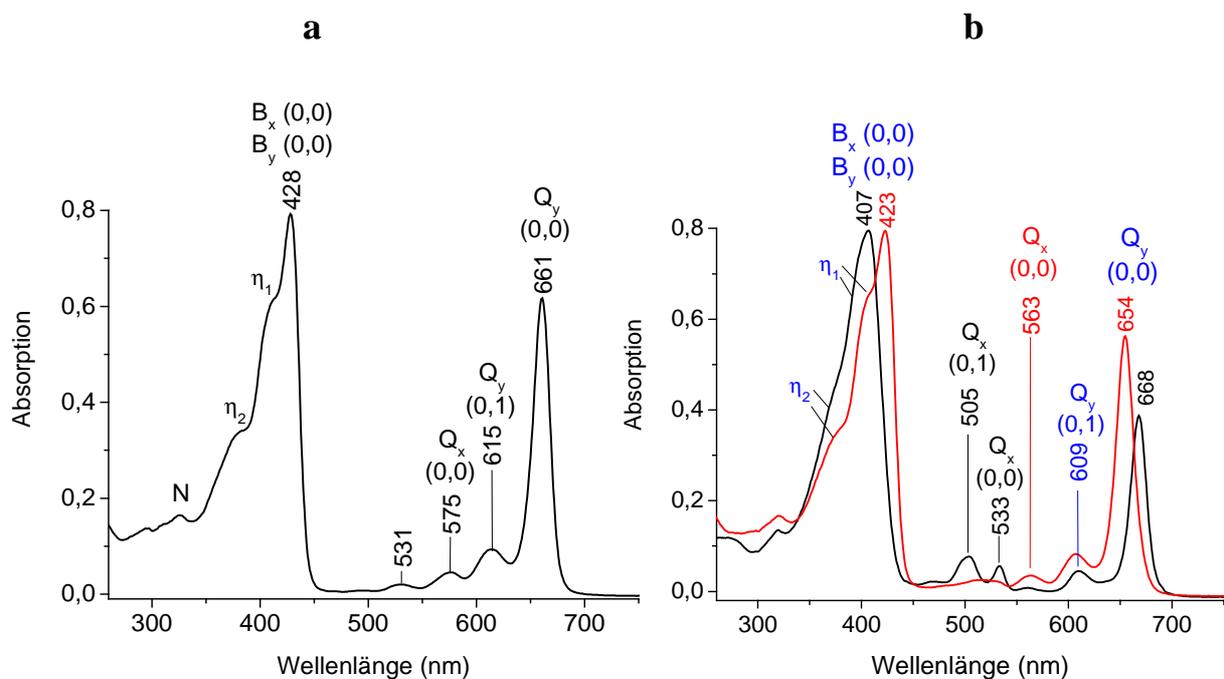


Abbildung 56: Absorptionsspektren mit den jeweiligen elektronischen Übergängen von (a) 7 μ M Chlorophyll *a* und (b) 8 μ M Pheophorbid *a* (schwarz) und 8 μ M Zink-Pheophorbid *a* (rot) in Diethylether. Die blau dargestellten Übergänge mit den zugehörigen Wellenlängen in (b) beziehen sich auf beide Verbindungen.

Im Absorptionsspektrum des metallfreien Ce_6 sind Banden bei 401 (Soret, B_x und B_y), 504 ($Q_x(0,0)$) und 655 ($Q_y(0,0)$) nm zu beobachten. Die Intensität der vibronischen Seitenbande des Q_y -Übergangs aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustands in das erste Schwingungsniveau des ersten angeregten Singulettzustands ist sehr schwach. Eine aufgesplante Q_x -Bande, wie sie bei der freien Porphyrinbase oder auch beim Pheophorbid *a* zu beobachten ist, liegt ebenfalls vor, doch ist die Absorption des verbotenen $Q_x(0,0)$ -Übergangs sehr klein (Einsatz Abb. 57). Dies kann mit den unterschiedlichen Substituenten am Tetrapyrrolring (fehlender Zyklopentanonring) und der infolgedessen veränderten Symmetrie im Vergleich zu dem Pheophorbiden erklärt werden (Briat et al., 1967). Der nicht vorhandene Zyklopentanonring erklärt das Fehlen der η_1 - und η_2 -Banden (Abb. 57), die bei den bereits erläuterten Absorptionsspektren der Chlorophylle zu beobachten waren. Metallfreies Ce_6 absorbiert bei 401 (Soret) und 655 (Q_y) nm. Nach dem Einbau von Zink in Ce_6 ist die Soretbande zu 412 nm bathochrom und die Q_y -Bande hypsochrom zu 633 nm verschoben. Die Intensitäten dieser Absorptionsbanden sind vor und nach der Metallisierung gleich. Die $Q_x(0,0)$ -Bande wird von 504 (Ce_6) zu 516 ($ZnCe_6$) nm bathochrom verschoben und ihre Intensität verkleinert sich um etwa ein Drittel (Abb. 57).

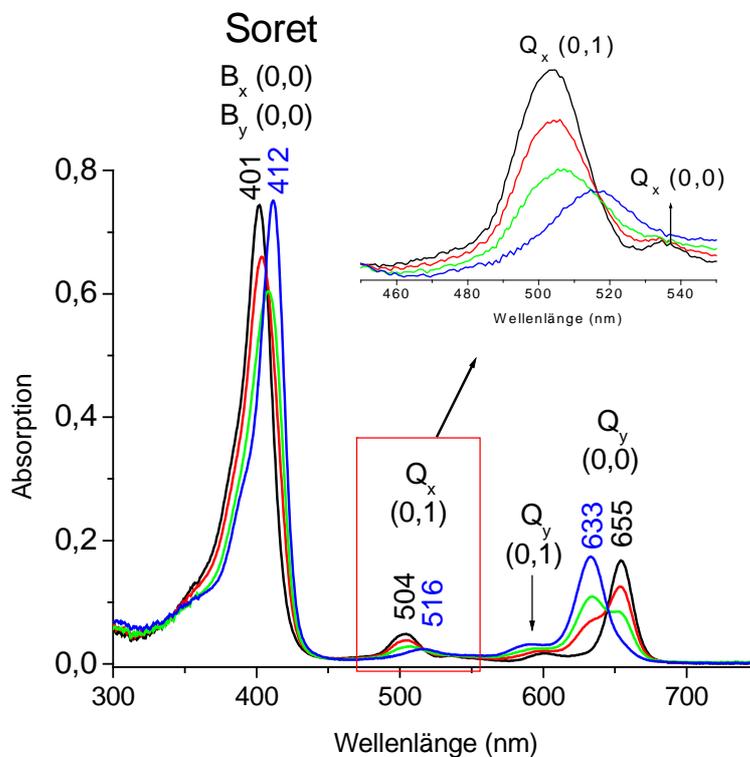


Abbildung 57: Absorptionsspektren von Ce_6 (schwarz) und nach Zugabe von Zinkacetat in Abhängigkeit von der Zeit: nach 15 min (rot), 45 min (grün) und 75 min (blau). Nach 75 min ist das Ce_6 fast vollständig zu $ZnCe_6$ umgesetzt. Der Einsatz stellt den Bereich des Q_x -Übergangs vergrößert dar.

Beim BChla liegt im Vergleich zum Chla eine weitere Hydrierung im tetrapyrrolischen Grundgerüst vor (s. Kap. 1.9.1). Das konjugierte System ist dadurch entlang der y-Achse länger als entlang der x-Achse, aber dennoch symmetrisch zu beiden Achsen. Daraus resultiert im Absorptionsspektrum von BChla im Vergleich zum Chla eine intensivere und rotverschobene Q_y -Bande und eine blauverschobene Soretbande (zitiert nach: Kobayashi, 2006). Die Abbildung 58 zeigt, dass die Soretbande von BChla, BPheida und ZnBPheida in die B_x - (bei kleineren Wellenzahlen) und B_y (bei größeren Wellenzahlen)-Banden aufgespalten vorliegt. Aufgrund der Blauverschiebung der Soretbande und der im Vergleich zum Chlorophyll *a* gleichbleibenden Lage der η -Banden sind diese weniger von den B-Banden separiert und tragen ebenfalls zur Absorption der Soretbande bei (Weiss, 1978). Die Lage der intensiven Q_x -Bande ist abhängig von der Art der Koordination, der Koordinationszahl des Zentralmetalls und seinem induktiven Effekt (Noy et al, 1998; Hartwich et al., 1998). Beim BPheida, ohne Zentralmetall befindet sich die Q_x -Bande bei 523 nm. Mit Zink als Zentralmetall (ZnBPheida) ist sie zu 563 und mit Magnesium (BChla) zu 573 nm verschoben.

Das Verhältnis der Soretbande (B_x -Übergang) zur Q_y -Bande beträgt bei den metallhaltigen Verbindungen für BChla $\approx 0,76$ und für ZnBPheida = 1,00, während bei der metallfreien Verbindung BPheida in Analogie zu den Chlorophyllsystemen das Verhältnis mit $\approx 1,62$ deutlich höher als bei den metallhaltigen Verbindungen ist. Dies ist mit der Symmetrieerhöhung der metallfreien Verbindungen zu erklären.

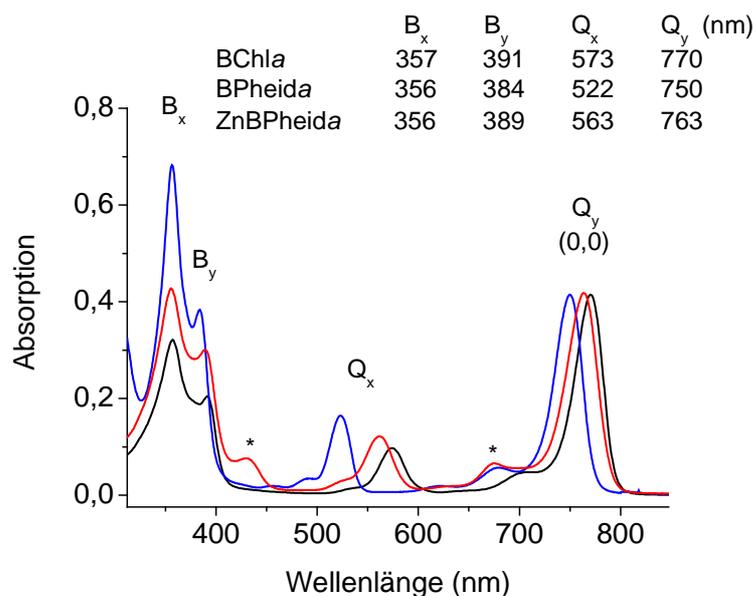


Abbildung 58: Absorptionsspektren mit den jeweiligen elektronischen Übergängen von 9 μM Bakteriochlorophyll *a* (schwarz), 12 μM Bakteriopheophorbid *a* (blau) und 12 μM Zink-Bakteriopheophorbid *a* (rot) in Diethylether. * Geringer Anteil an Oxidationsprodukt des ZnBPheida.

5.2.2 Einbau der Kofaktoren

Die UV-Vis-Spektroskopie diente sowohl zur Kontrolle der Metallisierung der verschiedenen Kofaktoren als auch zur Überprüfung von deren Einbau in die Peptide, da sich durch die Peptidbindung die Absorptionsspektren deutlich verändern. Zusätzlich bieten sowohl die verwendeten Chlorinsysteme als auch die Tryptophan enthaltenden Peptide die Möglichkeit, die Peptideinlagerung der Kofaktoren über die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften zu überprüfen. Des Weiteren wurden die Änderung des Zirkulardichroismus der Pigmente nach deren Peptidbindung und die ESEEM-Spektroskopie zur Untersuchung der Einlagerung des Kofaktors verwendet.

5.2.2.1 Einbaukontrolle durch Absorptionsspektroskopie

Bei den Einbauversuchen der Kofaktoren in die Peptide wurde mit Chla begonnen. Das gleiche Absorptionsspektrum vor und nach dem Einbauversuch von Chla zeigt, dass keine Peptidbindung des Kofaktors stattfand. Auch durch den Austausch des Zentralmetalls von Magnesium zu Zink (= ZnPhea) erfolgte keine Koordination. Sowohl im Absorptionsspektrum von Chla als auch in dem von ZnPhea deutet die breite Q_y-Bande auf eine Aggregation der Verbindungen in der Pufferlösung (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 100 mM KCl, pH 7,3) hin (Abb. 59a). Dieses lässt sich möglicherweise durch den langen C₂₀-kettigen Phitylrest erklären, der sehr hydrophob ist und eine Zusammenlagerung der Verbindungen in wässriger Lösung bewirkt. Auch die in der Pufferlösung gelösten Peptide können die spontane Aggregation nicht durch einen Einbau verhindern. Für aggregierte Moleküle ist der hydrophobe Bereich des Vier-Helix-Bündels zu klein, um eine Einbindung zu ermöglichen, obgleich eine Koordination eines Dimers wie z. B. beim *special pair* im RC (Kap. 1.7) vorstellbar gewesen wäre.

Durch die Verseifung des Phitylrestes von ZnPhea wurden bei dem daraus entstehenden ZnPheida nach dem Peptideinbau Absorptionsänderungen im Vergleich zum freien ZnPheida in wässriger Lösung beobachtet (Abb. 59b). Die Soretbande des ZnPheida verschob sich nach Peptideinbindung von 425 zu 437 nm und die Q_y-Bande von 663 zu 669 nm. Diese bathochromen Verschiebungen der beiden Absorptionsbanden entsprechen den aus der Literatur bekannten Absorptionsänderungen, die eine Peptideinlagerung des Kofaktors anzeigen (Fahnenschmidt et al., 2001; Sharp et al., 1998a). Die zuvor beobachtete Nicht-Einlagerung von ZnPhea in die Peptide zeigt damit, dass der Phitylrest am Pheophytin aufgrund sterischer Hinderung einen Einbau verhindert.

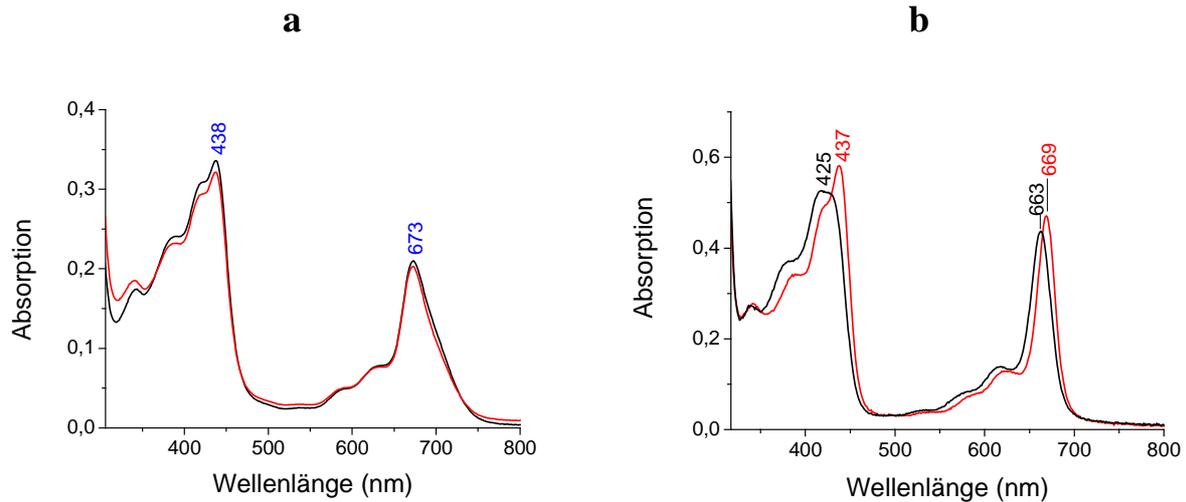


Abbildung 59: (a) Identische Absorptionsspektren von Chla vor (schwarz) und nach (rot) dem Einbauversuch in das Peptid me-6 (Anmerkung: Einbauversuch in me-1 ergab das gleiche Spektrum). (b) Absorptionsspektren von freiem (schwarz) und peptidgebundenem ZnPheida (rot). Alle Proben lagen gelöst in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,3) vor.

Analog zu ZnPheida zeigt ZnCe₆ nach der Peptidbindung bathochrom verschobene Absorptionsbanden (Abb. 60, Tab. 13).

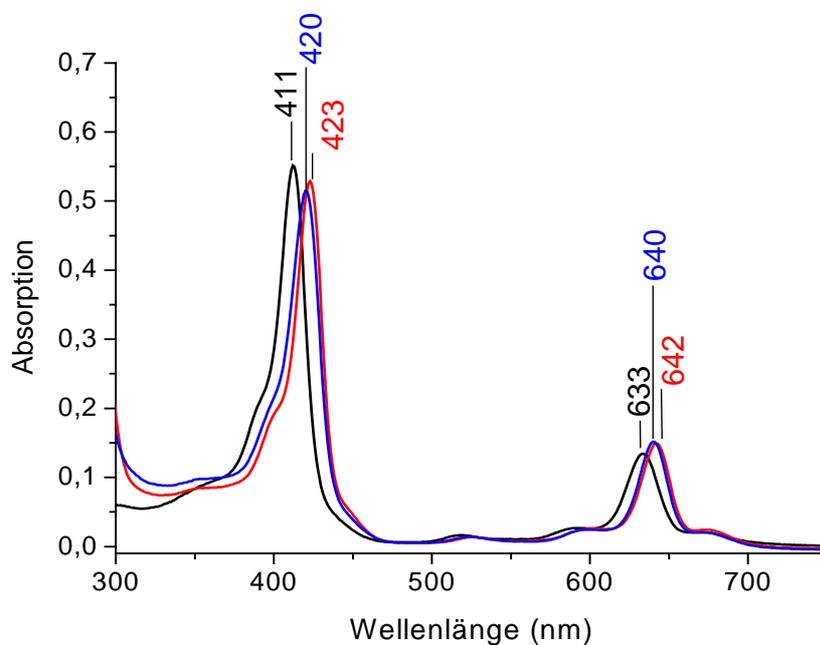


Abbildung 60: Absorptionsspektren von 3 μM ZnCe₆ (schwarz), 3 μM ZnCe₆-me-1 (rot) und 4 μM ZnCe₆-me-6 (blau) in 25 mM Glycin-Puffer (50 mM NaCl, pH 10).

Die metallfreien Komponenten *Pheida* und Ce_6 zeigten bei den Untersuchungen zur Peptidbindung keine Änderung ihrer Absorptionsspektren im Vergleich zu den entsprechenden Pigmenten in wässriger Lösung. Dies gibt einen Hinweis, dass die Kofaktoren über ihre Metalle an das Peptid gebunden werden und sowohl hydrophobe als auch ionische Wechselwirkungen zwischen dem zyklischen Tetrapyrrolysystemen und den Peptiden allein nicht ausreichen, um im Vier-Helix-Bündel einen Einbau zu erreichen.

Bei den metallsubstituierten Bakteriochlorophyllen kann über die Lage der Q_x -Bande, die bei den Chlorinsystemen nur sehr schwach ausgeprägt ist, die Koordinationszahl des Zentralmetalls ermittelt werden (Hartwich et al., 1998). Aus diesem Grund wurde *ZnBPheida* hergestellt und im Überschuss zum Peptid me-6 hinzugeben, um einen vollständigen Einbau des Kofaktors sicherzustellen. Aus der Bindung des Pigments zum Peptid resultiert eine starke Rotverschiebung der Q_x -Bande zu 589 nm im Vergleich zur Q_x -Bande bei 575 nm, die bei *ZnBPheida* in wässriger Lösung zu beobachten ist. Damit wurde gezeigt, dass die Lage der Q_x -Bande von *ZnBPheida* stark von der Koordination des Zentralmetalls abhängig ist. Je höher das Zentralmetall koordiniert ist, desto mehr ist die Q_x -Bande zum langwelligeren Bereich verschoben. Wie in Kap. 3.1.1 beschrieben, entsteht die Q_x -Bande durch den Elektronenübergang $a_{2u} \rightarrow e_{gx}$, dessen Energie stark von der Elektronendichte an den zentralen Stickstoffatomen beeinflusst wird. Das a_{2u} -Orbital hat eine hohe Elektronendichte bei den vier Pyrrol-Stickstoffatomen, die sich in der Nähe des Metallzentrums befinden. Die Elektronendichte an den zentralen Stickstoffatomen wird allgemein durch den Ionenradius und die Elektronegativität des Zentralmetalls und durch seine zusätzlichen, axialen Liganden beeinflusst. Durch eine hohe Elektronegativität und einen kleinen Ionenradius des Zentralmetalls wird das a_{2u} -Orbital energetisch abgesenkt und infolgedessen die Q_x -Bande kurzwellig verschoben. Dagegen können Liganden die negative Ladung und Elektronegativität des Zentralmetalls reduzieren. Eine stärkere Wechselwirkung des Zentralmetalls mit den Pyrrol-Stickstoffatomen erhöht die Energie des a_{2u} -Orbitals und führt zu einer Rotverschiebung der Q_x -Bande (Hartwich et al., 1998).

Bei den e_{gx} - und e_{gy} -Orbitalen beschränkt sich die Elektronendichte auf zwei Pyrrol-Stickstoffatome und beim a_{1u} -Orbital liegt gar keine Elektronendichte auf den Stickstoffatomen vor. Daher beeinflussen Liganden in erster Näherung nur die e_g -Orbitale und sind infolgedessen für die Verschiebung der Q_y - und B_x -Banden verantwortlich (Callahan und Cotton, 1987).

Tabelle 13: Absorptions- und Fluoreszenzwellenlängen sowie die Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_F) und Fluoreszenzlebensdauer (τ_F) der freien und peptidgebundenen Kofaktoren in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (100 mM KCl, pH = 7,3)

	Absorption ($\pm 0,5$) nm			Fluoreszenz (± 1) nm	Φ_F	τ_F (ns) ($\pm 0,2$) ns
	Soret	Q_x	Q_y	Q_y		
ZnCe ₆	412	518	633	647	0,32 \pm 0,03	2,1
ZnCe ₆ -me-1	421	523	642	674	0,29 \pm 0,03	2,2
ZnCe ₆ -me-6	419	523	640	677	0,29 \pm 0,03	2,2
ZnPheida	425	—	663	669	0,03 \pm 0,01	3,4
ZnPheida-me-1	437	—	669	674	0,02 \pm 0,01	2,1
ZnPheida-me-6	433	—	668	677	0,02 \pm 0,01	3,1

Mit den Verbindungen ZnCe₆ und ZnPheida war es gelungen, zwei Kofaktoren vorliegen zu haben, die trotz ihrer unterschiedlichen Eigenschaften (ZnCe₆ als eher hydrophile und ZnPheida als mehr hydrophobe Komponente) in beide Peptide eingebunden werden. Sie eignen sich damit hervorragend zur weiteren Charakterisierung sowohl ihrer Grundzustandskomplexe als auch ihrer durch Lichtanregung erzeugten Tripletzustände. Eine weitere Diskussion erfolgt in Kapitel 5.2.5.

5.2.2.2 Einbaukontrolle durch Fluoreszenzspektroskopie und Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute

Analog zur UV-Vis-Spektroskopie kann auch die Fluoreszenzspektroskopie zur Überprüfung der Einlagerung des Kofaktors verwendet werden, da zum einen axiale Liganden die Lage der Fluoreszenzbanden der Kofaktoren beeinflussen und zum anderen die Intensität der Tryptophanfluoreszenz der Peptide bei Einlagerung der Pigmente verringert wird.

Das Fluoreszenzspektrum von ZnCe₆ zeigt nach Anregung der Soretbande bei pH 7,3 eine Fluoreszenzbande bei 643 nm, die unabhängig von der Phosphatkonzentration der Pufferlösung ($c = 0,1 - 50$ mM) ist. Die Emissionsbande von ZnPheida liegt bei 669 nm. Peptidgebundenen ZnCe₆ bzw. ZnPheida zeigen im Vergleich zu ihren freien Verbindungen in wässriger Lösung analog zur Absorptionsspektroskopie bathochrom verschobene Fluoreszenzbanden (Abb. 61a, Tab. 13). Die Fluoreszenzbande von peptidgebundenem ZnPheida hat die gleiche Lage wie ZnPheida, das von Pyridin koordiniert wird. Dieses gibt einen Hinweis auf die für beide Fälle gleiche Koordinationszahl des Kofaktors (Abb. 61b).

Alle Emissionsspektren zeigen die in Kap. 3.1.3 erwähnten und damit erwarteten Verschiebungen der Wellenlängen gegenüber den Absorptionsbanden.

Die Fluoreszenzlebensdauern τ_F betragen für die freien $ZnCe_6$ -Moleküle $\tau_F = 2,1 (\pm 0,2)$ ns und für die $ZnCe_6$ -Peptidkomplexe jeweils $2,2 (\pm 0,2)$ ns (Tab. 13). Sie sind damit innerhalb ihres Fehlerbereiches gleich. Im Vergleich dazu zeigen die *ZnPheida*-Systeme eine um eine Nanosekunde längere Lebensdauer (Einsatz Abb. 61b). Die Fluoreszenzlebensdauer von *ZnPheida* in wässriger Lösung ist mit $\tau_F = 3,4 (\pm 0,2)$ ns geringfügig länger als die der entsprechenden peptidgebundenen Moleküle $\tau_F = 3,1 (\pm 0,2)$ ns (Tab. 13). Die Fluoreszenzlebensdauern waren in Luft- und Argon-gesättigten Lösungen gleich, d.h., die Fluoreszenzlöschung durch Sauerstoff ist gering. Eine kürzere Fluoreszenzlebensdauer kann aus erhöhten Schwingungen und Rotationen im Molekül resultieren, die zu einer erhöhten Energieabgabe führen (s. Kap. 3.1.3). Durch das Fehlen des Cyclopentanonrings in $ZnCe_6$ (E-Ring) kann das Molekül in größere Schwingungszustände versetzt werden, die eine schnelle Energieabgabe zur Folge haben und die Fluoreszenzlebensdauer im Vergleich zum *ZnPheida*, das den E-Ring enthält, verkürzen (zum Vergleich der Strukturen s. Kap. 1.9.1).

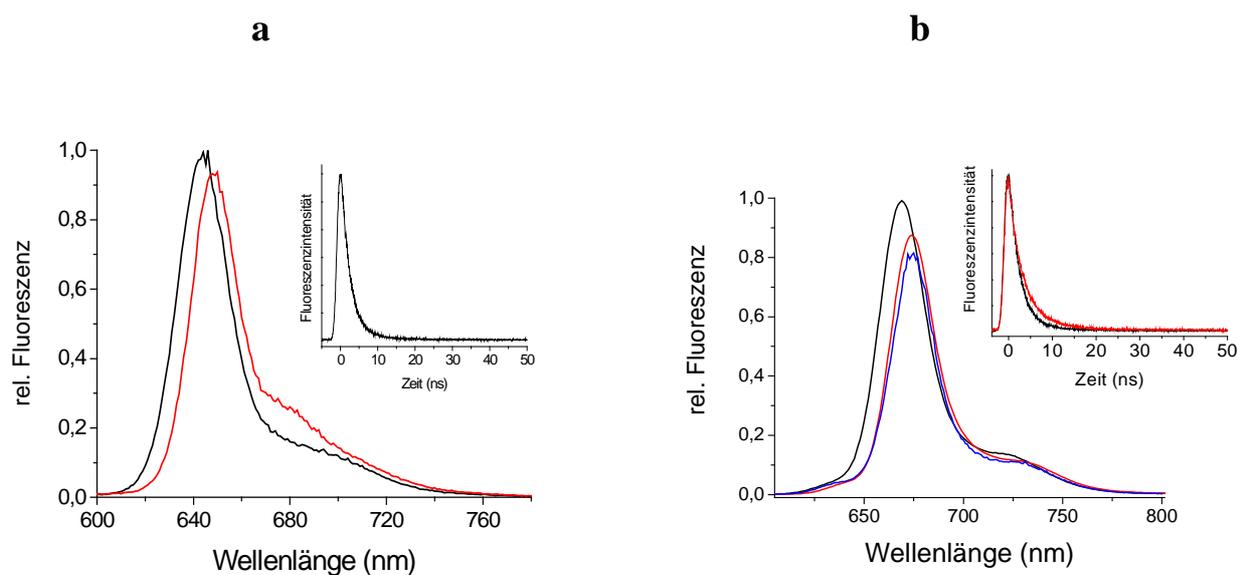


Abbildung 61: Fluoreszenzspektren von (a) 6 μM $ZnCe_6$ (schwarz) und 6 μM $ZnCe_6\text{-me-6}$ (rot) und (b) 6 μM *ZnPheida* (schwarz), 6 μM *ZnPheida-me-6* (rot) und 6 μM *ZnPheida* mit 20 % Pyridin (v/v) (blau). Die Einfügungen in (a) und (b) zeigen die zeitaufgelöste Emission von (a) $ZnCe_6\text{-me-6}$ und (b) *ZnPheida-me-6* (rot) in Argon-gesättigter Lösung aus der die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt wird; zusätzlich wird in der Einfügung von (b) als Vergleich die unter (a) gezeigte Fluoreszenzlöschung von $ZnCe_6\text{-me-6}$ (schwarz) dargestellt. Alle Proben lagen gelöst in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,3) vor.

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F beträgt für $ZnCe_6$ in einer Pufferlösung (pH 7,3) $\Phi_F = 0,32 \pm 0,03$ und für $ZnCe_6$ -me-1 und $ZnCe_6$ -me-2 entspricht $\Phi_F = 0,29 \pm 0,03$. Damit weisen die $ZnCe_6$ -Verbindungen eine höhere Quantenausbeute auf als Chla in Aceton ($\Phi_F = 0,24$), (Bohne et al., 1988). In wässriger Lösung zeigt Chla keine Fluoreszenz, was auf eine Aggregation des Pigments zurückzuführen ist. In organischen Lösungsmitteln wie Aceton weist Chla dagegen eine hohe Intensität und Quantenausbeute an Fluoreszenz auf, die auf monomere Chla-Moleküle in dem nicht wässrigen Lösungsmittel hinweisen (Weber und Teale, 1957). Die hohe Quantenausbeute von $ZnCe_6$ zeigt die Hydrophilie der Verbindung und infolgedessen das Vorliegen von monomeren $ZnCe_6$ -Molekülen in wässriger Lösung an. Bei $ZnPheida$ wurde eine weitaus geringere Quantenausbeute von $\Phi_F = 0,03 \pm 0,01$ ermittelt. Dieses kann auf Aggregation der im Vergleich zu $ZnCe_6$ hydrophoberen Verbindung zurückgeführt werden. Dennoch ist im Unterschied zu Chla eine Fluoreszenz in wässriger Lösung zu detektieren, was auf einen Anteil an monomerem $ZnPheida$ hinweist und auf die Eliminierung des Phitylrestes zurückgeführt werden könnte. Diese Beobachtungen können mit Literaturdaten belegt werden, denn von den metallfreien Pigmenten Ce_6 und $Pheida$ in wässriger Lösung ist bekannt, dass Ce_6 als Monomer (Roeder und Wabnitz, 1987), $Pheida$ aber in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt (Eichwurzel, 2000). Ähnliches Verhalten wird für die in dieser Arbeit verwendeten metallhaltigen Kofaktoren $ZnCe_6$ und $ZnPheida$ vorgeschlagen. Man könnte erwarten, dass beide Zinkchlorine, $ZnCe_6$ und $ZnPheida$, durch den Peptideinbau eine größere Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen. Die Peptide sollten durch die Bindung der Zinkchlorine den Anteil an monomeren Komponenten in der Lösung vergrößern, da sie die Pigmente untereinander durch Einlagerung und entsprechende Peptidummantelung voneinander trennen. Die Beobachtung der niedrigeren Fluoreszenzquantenausbeute für die bereits erwähnten $ZnCe_6$ -me-1- bzw -me-6-Komplexe ($\Phi_F = 0,29 \pm 0,03$) und für $ZnPheida$ -me-1 und $ZnPheida$ -me-6 ($\Phi_F = 0,02 \pm 0,01$) entsprach allerdings nicht der Erwartung. Dieses gibt einen Hinweis darauf, dass die Zinkchlorine sich nicht vollständig im hydrophoben Innenraum des Vier-Helix-Bündels befinden. Die Pigmente können aufgrund einer Fünffach-Koordination (Abb. 55c), die eine höhere freie Drehbarkeit im Gegensatz zu dem in Kapitel 5.1 diskutierten sechsfach koordinierten Hämin in me-1 erlaubt, zur hydrophileren Seite gedreht sein. Dadurch kann es zu einer Aggregation mit Wassermolekülen oder anderen Kofaktoren kommen, so dass der monomere, fluoreszierende Anteil an Pigmenten unverändert bleibt.

Die Annahme einer fünffachen Koordination der Zinkchlorine beruht auf den bereits untersuchten Zink-Verbindungen wie Zink-Protoporphyrin IX mit *de novo* synthetisierten

Peptiden (Sharp et al., 1998a) und den fünffach koordiniert vorliegendem Zink-BChla, das sowohl in Pyridin als auch eingelagert im Reaktionszentrum von *Rhodobacter sphaeroides* untersucht wurde (Hartwich, et al., 1998; Chen et al., 1995). Auch native Mg-Komplexe weisen fast ausschließlich fünffache Koordination auf (Katz et al., 1976), was wiederum den legitimen Austausch von Magnesium gegen Zink rechtfertigt, zudem beide auch ähnliche Ionenradien aufweisen (s. Kap. 1.9.1).

Von den artifiziellen Häminproteinen ist bereits bekannt, dass die Intensität der Tryptophanfluoreszenz bei der Entfaltung zunimmt bzw. die Intensität bei dem Einbau des Kofaktors abnimmt (Kap. 5.1.1.3). Das Auftreten eines solchen Effektes, der ebenfalls einen Einbau des Kofaktors anzeigt, sollte auch für die Zinkchlorine überprüft werden und wird am Beispiel von Peptid me-6 in Abbildung 62 gezeigt. Das Tryptophan des Peptids fluoresziert in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,3) bei einer Wellenlänge von 346 nm. Nach Zugabe von ZnPheida oder ZnCe_6 nimmt die Fluoreszenzintensität ab. Wie in Kap. 3.1.3 beschrieben, erfolgt die Fluoreszenz aus dem ersten angeregten Zustand, in den das Molekül durch schnelle strahlungslose Desaktivierung (*internal conversion*) aus höher angeregten Zuständen übergeht. Neben der spontanen Emission kann die Fluoreszenzlöschung durch eine weitere strahlungslose Desaktivierung in den Grundzustand, durch einen Singulett-Triplett-Übergang (*intersystem crossing*) oder durch Energieübertragung auf sogenannte Löschermoleküle erfolgen. Der hier vorliegende Löscheffekt der Tryptophanfluoreszenz beruht auf einer Energieübertragung auf das Chlorin (Elöve et al, 1992). Nach dem Förster Energietransfer ist die Ratenkonstante dieses Singulett-Singulett-Energietransfers proportional zu r^{-6} (mit r = Abstand des Donator- und Akzeptor-Paares). Ein solcher Energietransfer kann bis zu Abständen von 65 Å zwischen den Zentren beider Moleküle erfolgen (Stryer, 1968). Die vorliegende Energieübertragung und die daraus resultierende Abnahme der Fluoreszenzintensität gibt damit einen Hinweis auf die Bindung bzw. den Einbau der beiden Zinkchlorine in den hydrophoben Bereich des Vier-Helix-Bündels. Der vollständige Einbau der Kofaktoren wurde parallel zur Tryptophanfluoreszenz durch Aufnahme von Absorptionsspektren und der Detektion der entsprechenden Wellenlänge für das peptidgebundene Pigment kontrolliert. Das Peptid me-1 zeigte nach dem Hinzufügen von ZnPheida bzw. ZnCe_6 die gleichen Löscheffekte wie me-6. Als Kontrollexperiment wurde das bereits aus dem Kap. 5.1.3 bekannte Peptid me-8 verwendet, in dem aufgrund des Fehlens von Kofaktor-bindenden Aminosäuren keine Pigmente eingelagert werden. Die Zugabe von Zinkchlorin erzeugte in diesem Fall nur eine sehr geringe Löschung des Fluoreszenzsignals ($\approx 5\%$). Dies kann auf den größeren Abstand zwischen dem Tryptophan und dem Zinkchlorin

bei Nichteinlagerung in das Vier-Helix-Bündel zurückgeführt werden. Die beobachtete geringe Löschung beruht in diesem Fall lediglich auf einem zufälligen Aufeinandertreffen des Kofaktors mit dem Tryptophan aufgrund der Molekularbewegung und einer daraus resultierenden geringen Energieübertragung

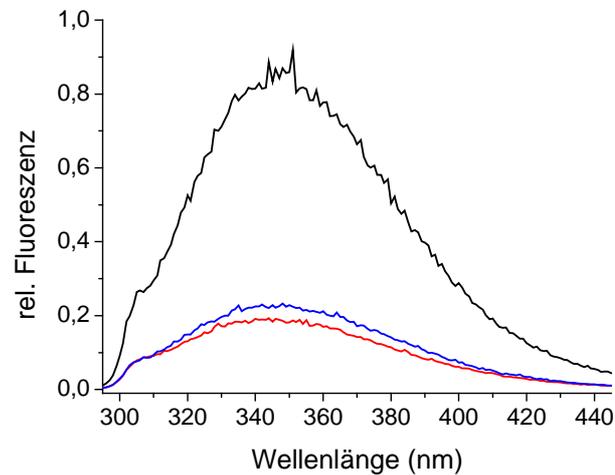


Abbildung 62: Tryptophanfluoreszenzspektren von 6 µM me-6 bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm (schwarz), nach Zugabe von 3 µM ZnPheida (rot) und 3 µM ZnCe₆ (blau) in jeweils 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (100 mM KCl, pH 7,3).

5.2.2.3 Einbaukontrolle über den Zirkulardichroismus der Pigmente

Die CD-Spektren der Pigmente können ebenfalls zur Charakterisierung des Einbaus verwendet werden. Das Spektrum von ZnPheida zeigt in einer Pufferlösung sowohl im Soret- als auch Q_y-Bereich charakteristische CD-Signale. Die Soret- und Q_y-Banden spalten in einem positiven und negativen Zirkulardichroismus auf (Abb. 63a). Die Maxima liegen bei 377 und 662 nm. Die Minima des negativen Zirkulardichroismus befinden sich bei 682 und 450 nm. Durch die Pigmenteinlagerung in das Peptid ändern sich die Vorzeichen des Zirkulardichroismus in der Q_y-Bande (Minimum: 669 nm; Maximum: 695 nm) und der positive und negative Zirkulardichroismus der Soretbande ist längerwellig verschoben. Das Maximum befindet sich bei 425 nm und das Minimum bei 459 nm. Die vorliegende Aufspaltung des CD-Signals im Q_y-Bereich in einem positiven und negativen Zirkulardichroismus ist im Allgemeinen typisch für eine Dimerbildung der Pigmente (Cantor und Schimmel, 1980) und wird z. B. auch im CD-Spektrum des LH2-Komplexes der Purpurbakterien aufgrund des vorhandenen BChl_a-Dimers beobachtet (Bandilla et al., 1998). Der Nulldurchgang dieser Aufspaltung entspricht in der Regel der Wellenlänge der Absorptionsbande. Die Abbildung 63a zeigt, dass die Nulldurchgänge der CD-Signale um

6 nm im Vergleich zu den entsprechenden Absorptionsmaxima verschoben sind (mit Ausnahme des Nulldurchgangs in der Soretbande des freien ZnPheida in wässriger Lösung, der genau der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Kofaktors in wässriger Lösung entspricht). Eine solche Verschiebung ist auch vom CD-Signal der Q_y -Bande des LH2-Komplexes im Vergleich zu seinem Absorptionsmaximum bekannt (Georgakopoulou et al., 2002). Der beobachtete negative und positive Zirkulardichroismus von ZnPheida sowohl in Lösung als auch eingebunden ins Peptid geben einen Hinweis auf eine Dimerbildung und bestätigen damit das Ergebnis der geringen Fluoreszenzquantenausbeute, die aus einer Zusammenlagerung von Pigment-Molekülen entsteht (Kap. 5.2.2.1 – 2). Daraus lässt sich schließen, dass die Zink-Pheophorbide nicht vollständig von dem Peptid umhüllt sind und neben der Kofaktor-Peptid-Wechselwirkung auch eine Interaktion zwischen den Kofaktoren vorliegt. Bei einer Untersuchung von Stereoisomeren verschiedener Zinkchlorine zeigte ein Stereoisomer ebenfalls eine Aufspaltung des CD-Signals in der Soretbande, wie sie auch in dieser Arbeit beobachtet wurde (Furukawa et al., 2000).

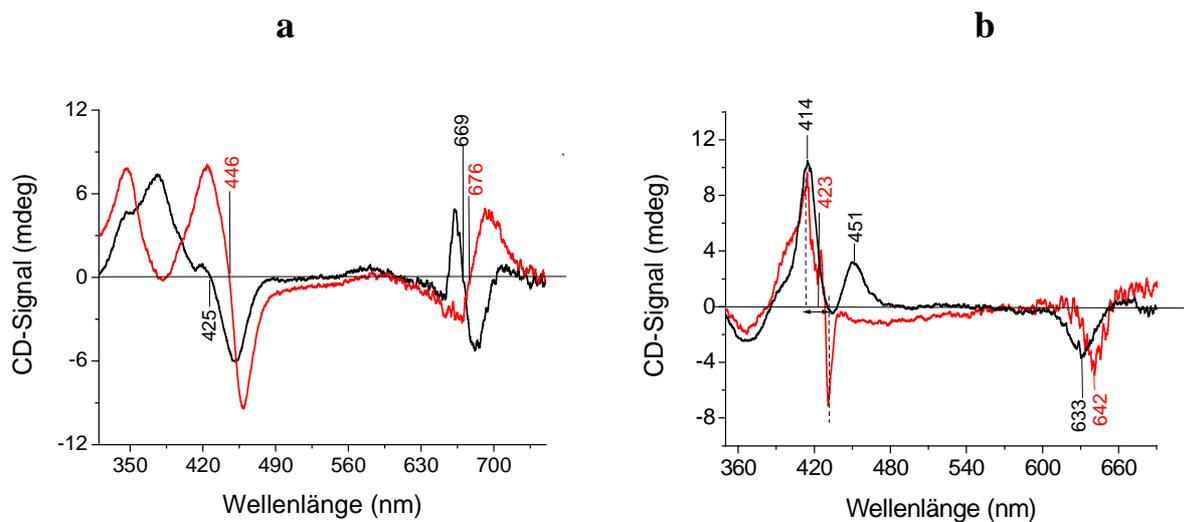


Abbildung 63: CD-Spektren von (a) ZnPheida (schwarz) und ZnPheida-me-1 (rot) in jeweils 5mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (10 mM KCl, pH 7,3) und (b) ZnCe₆ (schwarz) und ZnCe₆-me-1 (rot) in jeweils 5 mM Glycin (10 mM NaCl, pH 10).

ZnCe₆ zeigt im CD-Spektrum Maxima im Soretbereich bei 414 und 451 nm sowie ein Minimum in der Q_y -Bande bei 633 nm. Nach der Einlagerung des Pigments in das Vier-Helix-Bündel von Peptid me-1 verschiebt sich der negative Zirkulardichroismus der Q_y -Bande zu 642 nm. Im Soretbereich treten ein positiver Zirkulardichroismus bei 413 nm und ein negativer Zirkulardichroismus bei 433 nm auf, dessen Nulldurchgang sich bei 423 nm

befindet. Damit entsprechen die CD-Signale der Lage der entsprechenden Absorptionsmaxima. Der ausschließlich negative Zirkulardichroismus in der Q_y -Bande gibt einen Hinweis darauf, dass keine Dimere vorliegen und bestätigt damit ebenfalls die Ergebnisse der vorherigen spektroskopischen Untersuchungen. Im Fall des $ZnCe_6$ kann damit angenommen werden, dass keine Pigment-Pigment-Wechselwirkung im Kofaktor-Peptid-Komplex vorliegt, da das Pigment durch eine gute Einlagerung in das Peptid von seiner weiteren Umgebung abgeschirmt wird.

5.2.2.4 Einbaukontrolle durch ESEEM-Spektroskopie am Pigment-Triplettzustand

Die bereits dargestellten Charakterisierungsmethoden wie Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie zeigen nach dem Einbau der Zinkverbindungen in die Peptide veränderte Spektren im Vergleich zu den nicht peptidgebundenen Pigmenten. Bei Annahme von Histidin-koordinierenden Pigmenten bietet die ESEEM-Spektroskopie die Möglichkeit, über die direkte Detektion der ^{14}N -Kern-Quadrupolkonstante des Histidins als axialer Ligand, die Peptidbindung zu verifizieren. Ein alternativer Weg wurde in Kap. 5.1.3 gezeigt, in dem das Histidin in der Peptidsequenz gegen eine nicht-kofaktorbindende Aminosäure substituiert wurde und infolgedessen das Hämin nicht koordiniert werden konnte. Für das EPR-Verfahren, das hier gezeigt wird, ist keine Änderung der Peptidsequenz notwendig. Das Histidin kann als Koordinationspartner über die Detektion der Stickstoffmodulationen des axialen Stickstoffatoms im Imidazolrest des Histidins identifiziert werden. Die Methode soll im Nachfolgenden am Beispiel von *ZnPheida* dargestellt werden.

Die verwendeten paramagnetischen Zink-Systeme gelangen durch Lichtanregung aus dem Grundzustand in den ersten angeregten Singulettzustand, aus dem durch den *isc*-Prozess der Triplettzustand generiert wird (s. Abb. 19). An diesem Triplettzustand können durch EPR-Messungen die Nullfeldparameter erhalten werden, die eine Aussage über die elektronische Spinverteilung der Triplettwellenfunktionen zulassen. Diese sogenannten Transient-EPR-Messungen werden im Kapitel 5.2.5 dargestellt. Für die hier vorliegende Fragestellung der axialen Koordination des Kofaktors wird eine spezielle EPR-Methode, die sogenannte ESEEM-Spektroskopie angewendet, bei der die Hyperfeinwechselwirkung zwischen den Elektronenspins und den Kernspins detektiert wird. Die Anregung des *ZnPheida* in den Triplettzustand erfolgte in dieser Arbeit durch einen Laser bei einer Anregungswellenlänge von 590 nm. Neben dem freien *ZnPheida* in einer Pufferlösung und dem peptidgebundenen *ZnPheida* (*ZnPheida-me-6*) wurden ^{14}N - und ^{15}N -Imidazol-gebundenes *ZnPheida* als Modelle untersucht. Das freie *ZnPheida* in der Lösung enthält vier ^{14}N -Atome im zyklischen

Tetrapyrrolysystem. Bei einer axialen Bindung des Kofaktors mit Histidin in ZnPheida-me-6 oder beim ^{14}N -Imidazol-kordinierendem ZnPheida (jeweils fünffache Koordination) liegt ein weiteres ^{14}N -Atom im Komplex vor, das zusätzliche Signale im ESEEM-Spektrum hervorruft.

Imidazol wurde in diesem Versuch eingesetzt, da es die Imidazolgruppe des Histidins vom Peptid simuliert und infolgedessen als Vergleichsprobe für peptidgebundenes ZnPheida verwendet wird. Während ^{14}N -Atome einen Kernspin von $I = 1$ haben, liegt bei ^{15}N -Atomen ein Kernspin von $I = 1/2$ vor. Sie weisen dadurch eine andere Hyperfeinaufspaltung als die ^{14}N -Kerne auf und haben keine Quadrupolaufspaltung. Im ^{15}N -gebundenen ZnPheida sind damit hauptsächlich die Wechselwirkungen der Elektronenspins mit den magnetischen Momenten der Kerne aus den ^{14}N -Stickstoffatomen des zyklischen Tetrapyrrolysystems zu beobachten, während die Wechselwirkungen die aus der axialen Bindung vom ^{15}N -Imidazol resultieren aufgrund des Fehlens der Quadrupolaufspaltung mit geringerer Intensität erscheinen.

Für die Untersuchung der axialen Bindung wurden zunächst nach Laseranregung Zwei-Puls-EPR-Spektren von den vier verschiedenen $^3\text{ZnPheida}$ -Systemen aufgenommen, um die nachfolgenden ESEEM-Messungen an geeigneten und charakteristischen Magnetfeldern durchführen zu können. Das Zwei-Puls-EPR-Spektrum von $^3\text{ZnPheida}$ (Abb. 64a) zeigt die in Kapitel 3.1.6.2 beschriebenen Übergänge der Triplettunterzustände in Abhängigkeit vom angelegten Magnetfeld. Die Zwei-Puls-EPR-Spektren der anderen $^3\text{ZnPheida}$ -Komplexe unterscheiden sich von dem gezeigten lediglich in den relativen Intensitätsverhältnissen ihrer Signale. Die Zwei-Puls-ESEEM-Messungen wurden für alle vier Systeme (freies ZnPheida, ZnPheida-me-6, ZnPheida- ^{14}N -Imidazol, ZnPheida- ^{15}N -Imidazol) bei den in Abb. 64a markierten Magnetfeldern durchgeführt. Als Beispiel wird in Abbildung 64b ein Spektrum von $^3\text{ZnPheida-me-6}$ bei einem Magnetfeld von 334 mT (Y_{\parallel} -Übergang) gezeigt. Die Echointensitäten der Modulationen wurden in Abhängigkeit von der Zeit zwischen den Pulsen (τ) aufgenommen. Nach einer Fouriertransformation erhält man die Auftragung der Echointensität gegen die Frequenz ν . Nach Kap. 3.1.6.3 sind Stickstoffmodulationsfrequenzen im Bereich von 0 – 4 MHz und Modulationsfrequenzen von Wasserstoff zwischen 13 und 16 MHz zu beobachten. Beim Vergleich der ESEEM-Spektren der vier verschiedenen Systeme war zu erkennen, dass von allen untersuchten Magnetfeldern die Stickstoffmodulationen bei einem Magnetfeld von $B = 355$ mT die größten Unterschiede zeigten. An dieser Stelle wird fast ausschließlich der $m_s = 0 \rightarrow +1$ Übergang detektiert und

der $m_s = 0 \rightarrow -1$ Übergang ist an dieser Feldposition nahe Null. Daher wurde dieses Magnetfeld für die anschließende 2D-ESEEM-Messung verwendet.

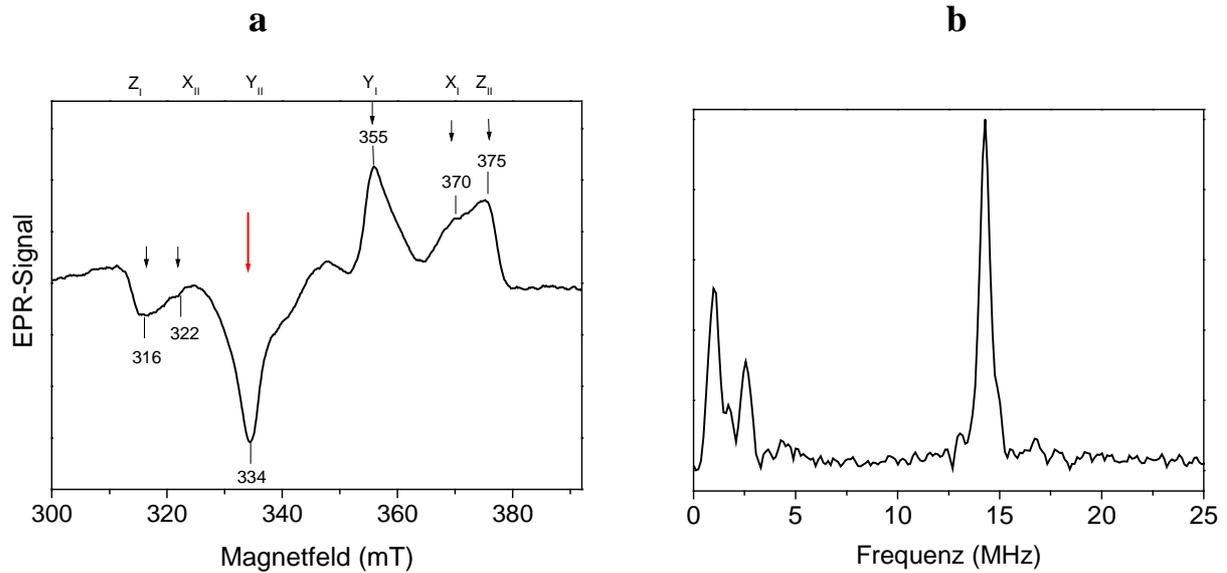


Abbildung 64: (a) X-Band 2-Puls-EPR-Spektrum von $^3\text{ZnPheida}$ in Puffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM KCl, pH 7,5/Glycerin (40 %/60 %)); Pulslängen 16 ns (90°) und 32 ns (180°), $\tau = 200$ ns, $t_{\text{DAF}} = 540$ ns; $\nu = 9,69$ GHz; $T = 5$ K. Im Spektrum sind die Magnetfelder angegeben, bei denen die ESEEM-Messungen durchgeführt wurden. (b) ESEEM-Spektren von $^3\text{ZnPheida-me-6}$; $B = 334$ mT, $\nu = 9,69$ GHz, $T = 5$ K, $\lambda_{\text{ex}} = 590$ nm.

Das 2D-ESEEM-Spektrum zeigt die Echointensitäten in Abhängigkeit der Zeiten τ und t_1 (Abb. 65). Durch eine Fouriertransformation entlang von τ und eine zweite Fouriertransformation entlang von t_1 erhält man ein zweidimensionales Spektrum, das Korrelationen zwischen Übergängen des gleichen Kernspins in den verschiedenen m_s -Zuständen des Elektronspins angibt. Korrelationsfrequenzen, die in allen Spektren der hier untersuchten Systeme auftreten, können den Stickstoffatomen aus dem Tetrapyrrolysystem zugeordnet werden. Zusätzliche Korrelationen müssen demzufolge aus der axialen Bindung resultieren. Die in Abbildung 65 dargestellten 2D-ESEEM-Spektren zeigen, dass Korrelationsfrequenzen von Stickstoffen, die bei ^{14}N -Imidazol-ligandierten und peptidgebundenen $^3\text{ZnPheida}$ bei $\nu_{t_1} = 0,4$ und $1,8$ MHz auftreten, sowohl beim ^{15}N -Imidazol-ligandierten Kofaktor und auch beim freien $^3\text{ZnPheida}$ in der Pufferlösung fehlen. Somit können die Korrelationsfrequenzen bei $\nu_{t_1} = 2 - 4$ MHz, die in allen drei Spektren vorhanden sind, den Stickstoffatomen des Tetrapyrrolysystems zugeordnet werden. Die nur in ^{14}N -Imidazol- und $^3\text{ZnPheida-me-6}$ erscheinenden Korrelationsfrequenzen resultieren infolgedessen aus dem Stickstoffatom des ligandierenden Imidazolrestes. Damit ist das Histidin als ZnPheida -bindende Aminosäure identifiziert. Aufgrund der Vielzahl von EPR-Übergängen ist es mit der ESEEM-

Spektroskopie nicht möglich, eine Aussage über die Koordinationszahl des Kofaktors zu treffen und damit zwischen einer fünf- oder sechsfachen Koordination zu entscheiden. Allerdings können die hier beobachteten Korrelationen durch die in Kapitel 5.2.2.2 bereits diskutierte Annahme einer fünffachen Koordination des Pigments auf die Bindung von nur einem koordinierenden Imidazol bzw. Histidin zurückgeführt werden.

Die aus den Spektren erhaltenen Quadrupolparameter von $e^2qQ/h = 3,2$ MHz und $\eta = 0,56$ wurden aus dem $m_s = 0$ Niveau bestimmt, in dem keine Hyperfeinwechselwirkung zu berücksichtigen ist. Diese Parameter geben in der vorliegenden Arbeit eine Information über das koordinierende N-Atom der axialen Bindung mit dem Zinkchlorin. Mit dem Vergleich von Literaturdaten für N_ϵ -Histidin ($e^2qQ/h = 3,36$ MHz) und N_δ H-Histidin ($e^2qQ/h = 1,44$ MHz) kann aus den ermittelten Werten die Aussage getroffen werden, dass das hier vorliegende Zinkchlorin mit dem N_ϵ -Atom des Histidins im Peptid bzw. des Imidazols koordiniert (zitiert nach Lubitz und Feher, 1999).

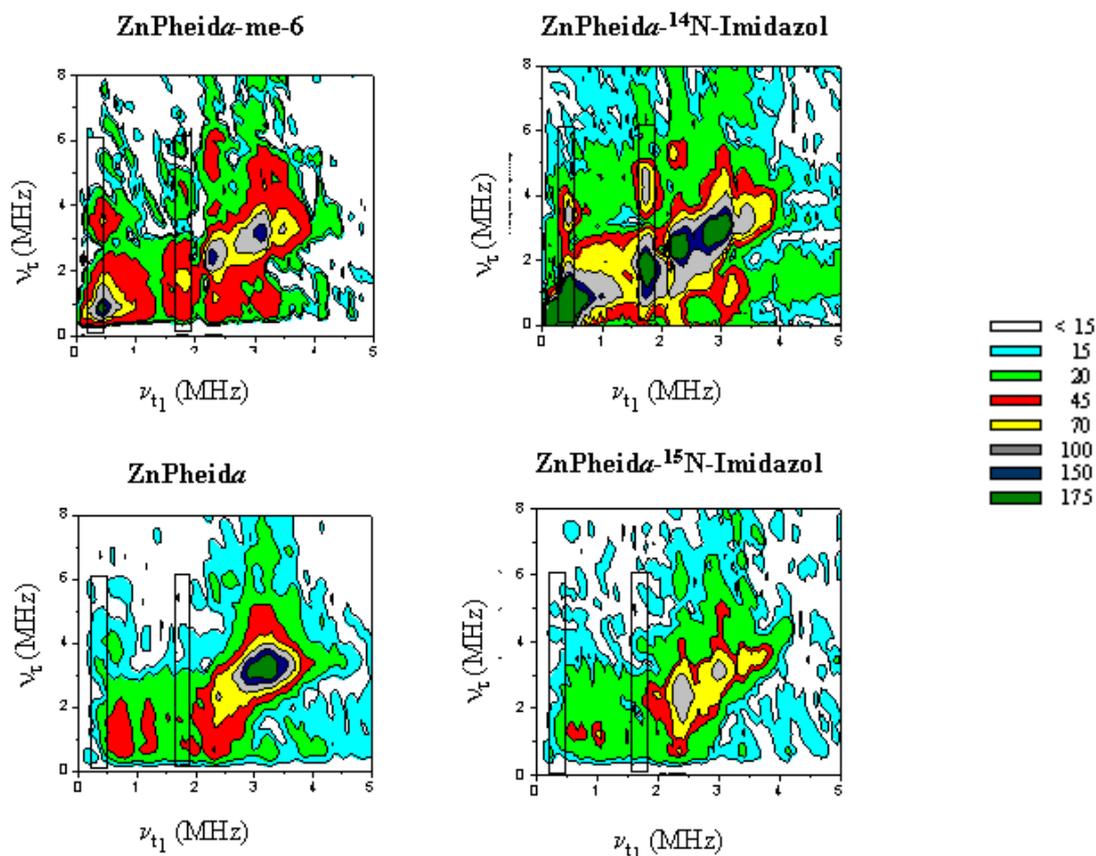


Abbildung 65: 2D-ESEEM-Konturdarstellung von $^3\text{ZnPheida}$ (500 μM) in jeweils: me-6 (500 μM), ^{14}N -Imidazol (10 mM), Puffer (50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM KCl, pH 7,3) und ^{15}N -Imidazol (10 mM) und jeweils 60 % Glycerin.

Messbedingungen: Mikrowellenfrequenz $\nu = 9,69$ GHz, $B = 355$ mT, $T = 5$ K, $\lambda_{\text{ex}} = 590$ nm, Laserleistung = 12 mJ/Puls. Die Frequenzachsen resultieren aus den Fouriertransformationen der t_1 - und τ -Zeitachsen. Die markierten Bereiche geben die charakteristischen Frequenzbereiche an, in denen sich die Spektren unterscheiden. Die Korrelationsfrequenzen zwischen $\nu_{\tau 1} = 2 - 4$ MHz resultieren aus den Pyrrolstick-stoffen des Pheophorbid-Grundgerüsts und die Korrelationen bei $\nu_{\tau 1} = 0,4$ und $1,8$ MHz aus dem Stickstoff des axialen Liganden.

5.2.3 Strukturen der Zinkchlorin-*maquettes*

Die Sekundärstruktur des Peptids me-1 wurde bereits in Kapitel 5.1 gezeigt. Das Zirkulardichroismusspektrum des Peptids me-6 zeigt ebenfalls den typischen Kurvenverlauf einer α -Helix mit Minima bei 208 ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang) und einem Maximum bei 193 nm. Der Anteil an α -Helikalität beträgt 78 (± 5) % (Kap. 3.1.4.1). Bei Anwesenheit von 0,5 M GdnHCl vergrößert sich der Drehwert bei 208 und 222 nm und damit der Anteil an α -Helix zu 92 (± 5) % (Abb. 66). Dies konnte bereits bei den artifiziellen Hämiproteinen gezeigt werden, bei denen die α -Helikalität und damit auch die Stabilität der Peptide durch den Zusatz einer geringen GdnHCl-Konzentration ebenfalls erhöht wurde. Für die im nachfolgenden Kapitel 5.2.4 aufgeführten Entfaltungsstudien wurde deshalb die Probe, in der 0,5 M GdnHCl vorlagen, als Zustand der kompletten Faltung angenommen. Entsprechendes konnte für die Zinkchlorin-Peptide beobachtet werden. Auch hier waren die maximalen Drehwerte festzustellen, wenn 0,5 M GdnHCl in der Probe vorhanden waren.

Der Parameter R , der das Verhältnis des Drehwertes bei 222 nm zu dem bei 208 nm angibt und damit eine Aussage über den Helixtyp erlaubt, wurde sowohl für das Apo- als auch für das Holopeptid zu $R = 0,98$ bestimmt. Damit liegt eine $\alpha(3.6_{13})$ -Helix vor.

Im Vergleich zum Apo-peptid konnte der Drehwert nicht erhöht werden, wenn die Zinkchlorine eingelagert vorlagen. Dies gibt bereits einen Hinweis darauf, dass sich die Stabilitäten der Peptide nur geringfügig bei Einlagerung der Kofaktoren ändern und soll in Kapitel 5.2.4 genauer untersucht werden.

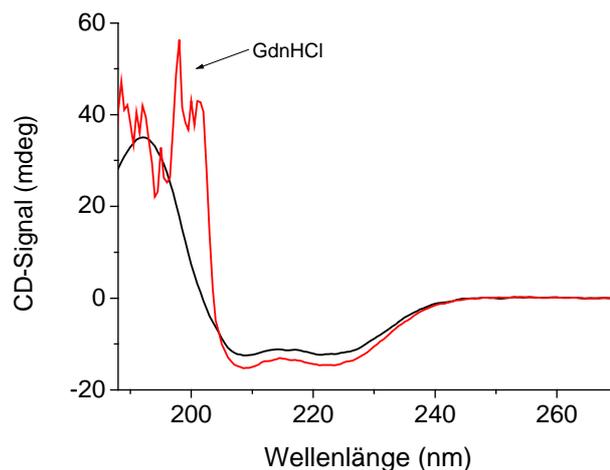


Abbildung 66: CD-Spektren von 8 μ M Apo-me-6 ohne (schwarz) und mit 0,5 M GdnHCl (rot) bei RT. Die Schichtdicke der Quarzküvette betrug $d = 0,1$ cm.

Mit Hilfe der Gelfiltration wurde das Molekulargewicht der Peptide in wässriger Lösung bestimmt. In Abbildung 67a sind als Beispiel die Elutionsprofile von me-6 und ZnCe₆-me-6 gezeigt. Nach dem Einbau des Kofaktors in den Peptidkomplex eluiert das ZnCe₆-maquette aufgrund seines höheren Molekulargewichts früher als das Apozeptid (Abb. 67b). Die Anzahl der gebundenen Kofaktoren konnte allerdings aufgrund der Ungenauigkeit der Messmethode nicht bestimmt werden.

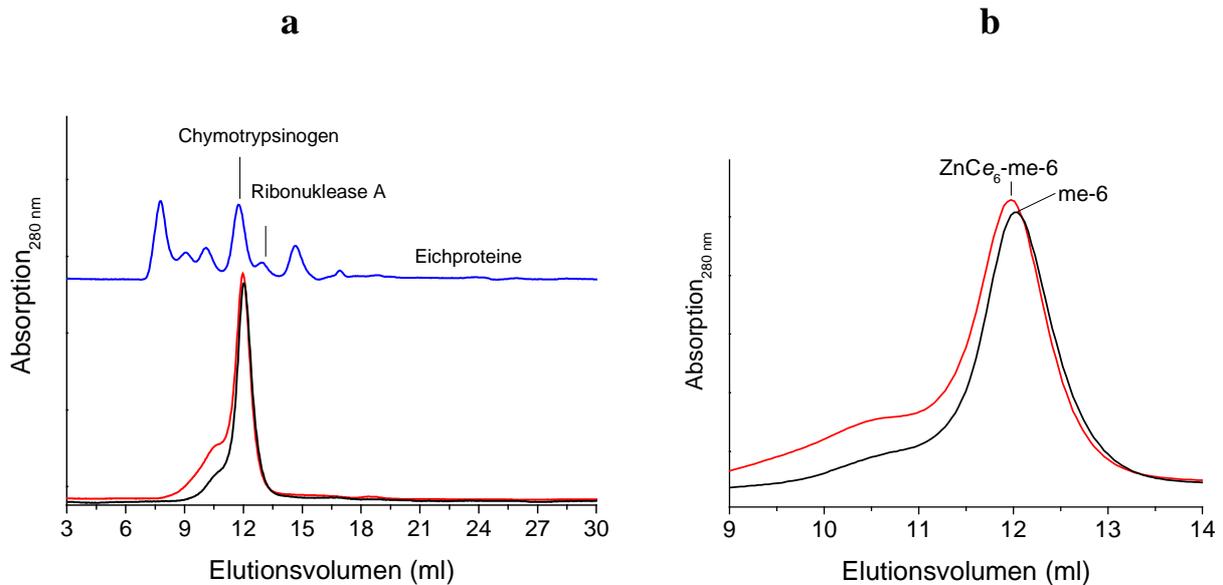


Abbildung 67: (a) Elutionsprofile der Gelfiltration von 100 µM me-6 (schwarz), ZnCe₆-me-6 (rot) und den Eichproteinen (zur Kalibrierung der Superdex 75-Säule) (blau) in 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (150 mM NaCl, pH 7,3) bei 283 K unter Grünlicht. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. (b) Vergrößerung der Elutionsprofile von me-6 (schwarz) und ZnCe₆-me-6 (rot) zur Verdeutlichung verschiedener Molekulargewichte.

Die nachfolgende Tabelle 14 zeigt, dass die Peptide mindestens zu 80 % als Dimer und damit als Vier-Helix-Bündel vorliegen. Der restliche Prozentanteil entspricht der Zusammenlagerung zweier Vier-Helix-Bündel. Beim Vergleich der beiden Peptide wird beim me-6 ein höherer Anteil an Oligomer festgestellt, der abhängig von dem peptidgebundenen Kofaktor bei ZnPheida unverändert bleibt oder im Fall des peptidgebundenen ZnCe₆ erhöht wird.

Analog zum Peptid me-1 werden vom Peptid me-6 etwas höhere Werte für die Molekulargewichte ermittelt als die berechneten Werte angegeben. Auch me-6 weist eine zylindrische Struktur auf, die von der der relativ kugelsymmetrischen und natürlichen Standardproteine abweicht. Das Peptid passt infolgedessen nicht exakt in die Hohlräume des Säulenmaterials und wandert schneller durch die Säule, so dass ein höheres Molekulargewicht als das tatsächlich vorliegende bestimmt wird.

Tabelle 14: Molekulargewichte der Peptide me-1 und me-6 und deren Pigmentkomplexe. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil des jeweiligen Strukturmotivs. Die berechneten Molekulargewichte der Kofaktor-Peptid-Komplexe beruhen auf der Annahme von zwei eingelagerten Kofaktoren pro Peptid dimer. Die Prozentanteile konnten aus den Verhältnissen der maximalen Intensitäten der vorliegenden Spezies bestimmt werden, da eine eindeutige Basislinie vorlag.

Peptid	ber. Masse (Da)	exp. Masse \pm 2000 (Da)	
me-1	7607 (Monomer)		
	15214 (Dimer)	18000	(92 \pm 5 %)
	30428 (Tetramer)	40000	(8 \pm 5 %)
ZnCe ₆ -me-1	16532 (Dimer)	21800	(100 %)
ZnPheida-me-1	16522 (Dimer)	19200	(100 %)
me-6	7173 (Monomer)		
	14346 (Dimer)	18500	(90 \pm 5 %)
	28692 (Tetramer)	37000	(10 \pm 5 %)
ZnCe ₆ -me-6	15664 (Dimer)	23100	(80 \pm 5 %)
	31328 (Tetramer)	37000	(20 \pm 5 %)
ZnPheida-me-6	15654 (Dimer)	20800	(90 \pm 5 %)
	31308 (Tetramer)	38000	(10 \pm 5 %)

Aufgrund des bereits erwähnten großen Fehlers der Gelfiltration bietet diese Methode keine Möglichkeit, die Anzahl der peptidgebundenen Kofaktoren zu ermitteln. Wie bereits in Kap. 5.1 gezeigt, wird die Anzahl der gebundenen Kofaktoren durch chemische Titration des Pigments zum entsprechenden Peptid ermittelt. Entsprechend der artifiziellen Hämiproteine erfolgt die Bestimmung des Stoffmengenverhältnis von Kofaktor zum jeweiligen Peptid anhand der Absorptionsänderung der Soretbande oder der Q_y-Bande (s. Abbildung 68a, Titration von ZnPheida zu me-6). Die Auswertung der chemischen Titration der Zinkchlorine ist aufwendiger als die der Hämiproteine, da sich die Absorptionswellenlängen der ungebundenen Kofaktoren kaum von denen der peptidgebundenen Kofaktoren unterscheiden. Dadurch wird keine typische Sättigungskurve erhalten, weil die Absorption des freien Kofaktors von der des peptidgebundenen Kofaktors überlagert ist und infolgedessen in die Auswertung miteingeht. Für den in Abbildung 68b gezeigten Fall wurde zur Auswertung die Wellenlänge von 675 nm gewählt, die sich nahe dem Maximum der Q_y-Bande befindet und sich aus Erfahrung am besten für die Bestimmung des gesuchten Stoffmengen- bzw. Konzentrationsverhältnisses eignet (Noy, 2005 und vorliegende Arbeit).

Für die Titration von ZnPheida zu 4,6 μ M me-6 wird ein Konzentrationsverhältnis von einem Kofaktor zum Peptidmonomer ermittelt, d.h., es befinden sich zwei ZnPheida-Moleküle in einem Vier-Helix-Bündel. Das gleiche Ergebnis ergab die Titration des gleichen Kofaktors zu me-1.

In Abbildung 68a ist ebenfalls zum Vergleich ein Absorptionsspektrum von ZnPheida (ohne Peptid) gezeigt. Die Aufnahme erfolgte ca. eine Stunde nachdem das Pigment ($c = 8 \mu$ M) zur

Pufferlösung hinzugefügt wurde. Es wird eine aufgespaltene Q_y -Bande beobachtet, die wahrscheinlich auf eine Aggregation zurückzuführen ist. Von dem metallfreien Pigment Pheida, das in wässriger Lösung in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt, ist eine entsprechende Aufspaltung der Q_y -Absorptionsbande mit Maxima bei 667 und 685 nm bekannt (Eichwurzel, 2000). Bei Pigment-Konzentrationen bis zu 8 μM gelingt es durch Zugabe von me-1 oder me-6, dass diese Banden wieder als gemeinsames Maximum bei 673 nm erscheinen. Das Verhindern der Aggregation von Chla durch Einlagerung in den hydrophoben Peptidbereich konnte bereits bei anderen synthetischen Peptiden gezeigt werden (Dudkowiak et al., 1998).

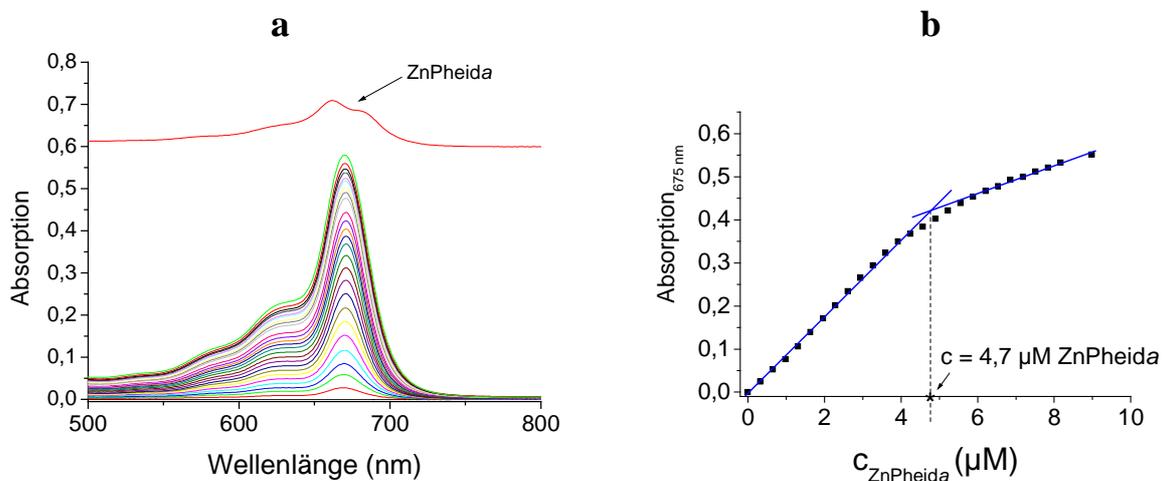


Abbildung 68: Chemische Titration von ZnPheida zu 4,6 μM me-6 in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,3); (a) Absorptionsänderung der Q_y -Bande mit steigender Konzentration des Kofaktors. Als Vergleich ist ein Spektrum von nicht peptidgebundenem ZnPheida in gleicher Pufferlösung gezeigt, das nach 1 h Inkubation bei RT aufgenommen wurde. Zur besseren Darstellung wurde die Aufspaltung der Q_y -Bande des ZnPheida in der Pufferlösung (rot) um 0,6 Absorptionseinheiten verschoben. (b) Absorptionsänderung bei 675 nm in Abhängigkeit von der ZnPheida-Konzentration.

Zur Veranschaulichung der Pigmenteinlagerung in das Peptid soll die Abbildung 69 dienen. Ohne Peptide in der Pufferlösung fallen die Kofaktoren aufgrund der Aggregation aus und lagern sich auf dem Boden des Reaktionsgefäßes ab. Die Peptide reduzieren die Aggregation durch Komplexbildung, indem sie die eingebundenen Kofaktoren weitestgehend von der Umgebung abschirmen. Die geringe Fluoreszenzquantenausbeute der ZnPheida-*maquettes* (Kap. 5.2.2.2) gibt dennoch einen Hinweis darauf, dass auch im Komplex eine Aggregation vorliegt, die aus einem existierenden Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Form des Pigments resultieren kann.

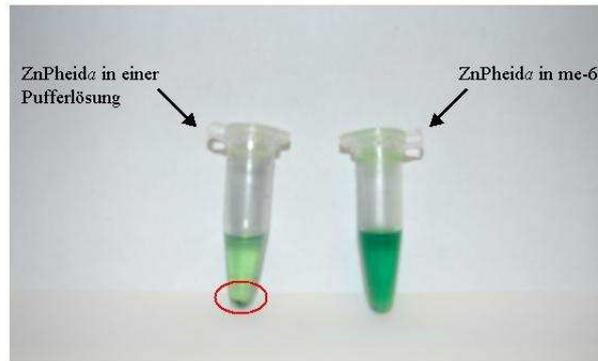


Abbildung 69: ZnPheida ohne (links) und mit Peptid me-6 (rechts) in jeweils 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,3). Die Aggregation und Fällung der ZnPheida-Moleküle am Boden des Reaktionsgefäßes ist gekennzeichnet.

In gleicher Weise wie ZnPheida wurde ZnCe_6 zu den Peptiden titriert. Die Abbildung 70a zeigt die Absorptionsänderung der Q_y -Bande in Abhängigkeit von der ZnCe_6 -Konzentration, die zum Peptid me-1 hinzugegeben wurde. Mit der stetig wachsenden Konzentration an ZnCe_6 wird zum einen die Intensität der Q_y -Bande größer, zum anderen verschiebt sich die Lage der Q_y -Bande kurzweilig zu 633 nm, wo das freie Pigment absorbiert und infolgedessen als Überschuss vorliegt. Aus der Auftragung der Absorptionsänderung bei 642 nm in Abhängigkeit von der ZnCe_6 -Konzentration und der bekannten Konzentration an me-1 von $3,8 \mu\text{M}$ wird ein Konzentrationsverhältnis von einem Kofaktor zu einem Peptidmonomer ermittelt. In einem Vier-Helix-Bündel liegen somit zwei Kofaktoren vor. Das gleiche Ergebnis wurde für die Titration von ZnCe_6 zu me-6 gefunden. Obwohl das me-1 im Vergleich zum me-6 vier weitere Histidine im Vier-Helix-Bündel enthält, liegen in beiden Komplexen zwei Kofaktoren vor. Durch eine Titration von ZnCe_6 in das Peptid me-5, das wie me-1 aus zwei disulfidverbrückten 31meren Peptidsträngen besteht, aber nur die Histidine in Position 10 besitzt, wurde ebenfalls ein Verhältnis von einem Kofaktor pro Peptidmonomer bestimmt. Dies gab einen weiteren Hinweis darauf, dass nur die Histidine in Position 10 die Kofaktoren koordinieren.

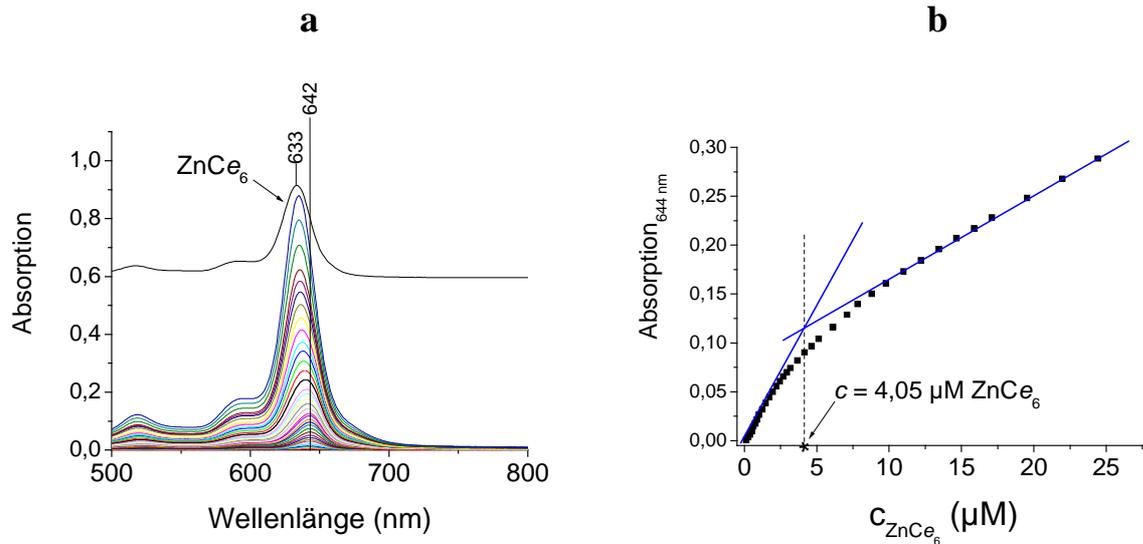


Abbildung 70: Chemische Titration von ZnCe_6 zu $3,8 \mu\text{M me-1}$ in 25 mM Glycin (50 mM NaCl , $\text{pH } 10,0$). (a) Absorptionsänderung der Q_y -Bande mit steigender Konzentration des Kofaktors. Als Vergleich ist ein um $0,6$ Absorptionseinheiten verschobenes Spektrum (schwarz) von nicht peptidgebundenem ZnCe_6 in gleicher Pufferlösung gezeigt. Die vertikale Linie verdeutlicht die Absorptionsverschiebung. (b) Absorptionsänderung bei 644 nm in Abhängigkeit von der ZnCe_6 -Konzentration.

Zusammengefasst liegen in allen vier möglichen Kombinationen ($\text{ZnCe}_6\text{-me-1}$, $\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$, ZnPheida-me-1 , ZnPheida-me-6) also jeweils zwei Kofaktoren pro Vier-Helix-Bündel vor, obgleich das Peptid me-1 vier zusätzliche Histidine pro Dimer aufweist (Abb. 55), die infolgedessen unbesetzt bleiben. Die Anzahl der an das Peptid bindenden Kofaktoren stimmt mit der Literatur überein, die für das Peptid me-6 mit einer N-terminalen Methioningruppe, die als Startcodon für die Translation verwendet wurde, ebenfalls zwei gebundene ZnCe_6 -Moleküle pro Vier-Helix-Bündel angibt (Razeghifard und Wydrzynski, 2003).

5.2.4 Stabilität der Zinkchlorin-*maquettes*

Bevor die Stabilitätsparameter der Kofaktor-Peptid-Komplexe bestimmt werden, sollen zunächst die beobachteten Eigenschaften der Zinkchlorine dargestellt werden. Beim Aufbewahren des ZnCe_6 an der Luft bei RT wurde eine langsame Entmetallisierung des Pigments nach bereits einem Tag festgestellt, die durch UV-VIS-Spektroskopie nachgewiesen wurde. Bei 277 K und unter Lichtausschluss ist die Pigmentlösung mindestens eine Woche und bei einer Aufbewahrung bei 193 K mehrere Monate stabil. Das Hinzufügen der basischen ZnCe_6 -Lösung zu einer Pufferlösung mit einem niedrigeren pH-Wert von pH 7,3 erzeugte nach ca. einer Stunde ebenfalls eine Entmetallisierung des Pigments. Diese Beobachtungen mussten für die nachfolgenden Charakterisierungsmethoden berücksichtigt werden. Nach dem Einbau von ZnCe_6 in die Peptide zeigte dagegen ein Pufferwechsel von pH 10 zu pH 7,3 keine Auswirkungen auf die Grund- (gleiche Absorptionsspektren) und Triplettzustände (s. Kap. 5.2.5). Aufgrund der Hydrophobie von ZnPheida war es notwendig, das Pigment zunächst vollständig in Aceton zu lösen, um es dann zu der Pufferlösung hinzuzugeben. Dabei wurde in Abhängigkeit von der Pigmentkonzentration in einigen Fällen eine aufgespaltene Q_y -Bande beobachtet, die bereits in Kap. 5.2.3 gezeigt wurde und auf eine Aggregation der Kofaktoren hinwies. Um annähernd monomeres Vorliegen der Pigmente sicherzustellen, wurde bei den nachfolgenden Charakterisierungen stets zuvor ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen.

Analog zu den artifiziellen Hämiproteinen wurden die Stabilitäten des Apo-me-6 und der Zinkchlorin-Peptid-Komplexe über die Fluoreszenzspektroskopie bestimmt und eine Änderung der Intensität des Zirkulardichroismus bei 222 nm nach Zugabe des Peptids zum vorgelegten Kofaktor überprüft. Die Spektren, die die Verschiebung der Tryptophanfluoreszenz zu längeren Wellenlängen mit zunehmender Konzentration an GdnHCl zeigen, sind mit denen der Hämiproteine in Kap. 5.1 vergleichbar und werden infolgedessen nicht gesondert gezeigt. Die Auswertung der Stabilitätsuntersuchungen durch die Fluoreszenzspektroskopie ergibt die in Tabelle 15 zusammengefassten Stabilitätsparameter.

Tabelle 15: Freie Entfaltungsenthalpien (ΔG_{H_2O}), Kooperativitäten (m) und Konzentrationen für eine 50 %ige Entfaltung ($c_{1/2}$) der *de novo* synthetisierten Peptide me-1, me-6 und ihrer Zinkchlorin-Komplexe in (sofern nicht anders gekennzeichnet) 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (10 mM KCl, pH 7,3).

	ΔG_{H_2O} (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$c_{1/2}$ (M)
me-1	19,3 ±1,9	3,9 ±0,4	4,9 ±0,2
ZnPheida-me-1	20,2 ±2,0	4,0 ±0,4	5,1 ±0,2
ZnCe ₆ -me-1	19,4 ±1,9	3,8 ±0,4	4,9 ±0,2
me-6	20,8 ±2,1	4,1 ±0,4	5,4 ±0,2
ZnPheida-me-6	21,9 ±2,2	4,0 ±0,4	5,4 ±0,2
ZnCe ₆ -me-6	21,0 ±2,1	4,0 ±0,4	5,3 ±0,2
me-6*	15,1 ±1,5	3,1 ±0,3	4,9 ±0,2
ZnCe ₆ -me-6*	15,5 ±1,6	3,1 ±0,3	5,0 ±0,2

* Messungen erfolgten in 5 mM Glycin (10 mM NaCl, pH 10)

Aus der Tabelle 15 geht hervor, dass die Stabilitätsparameter der vier Kofaktor-Peptid-Komplexe vergleichbare Werte aufweisen. Die freie Entfaltungsenthalpie ΔG_{H_2O} , die als Maß für die Stabilität der Peptide gilt, bleibt unter Berücksichtigung ihres Fehlers nach dem Einbau der Zinkchlorine unverändert. Analog sind auch die Werte für die Kooperativitäten und Konzentrationen, bei der bereits 50 % der Peptide entfaltet vorliegen, beim Apo- und Holopeptid vergleichbar (Abb. 71).

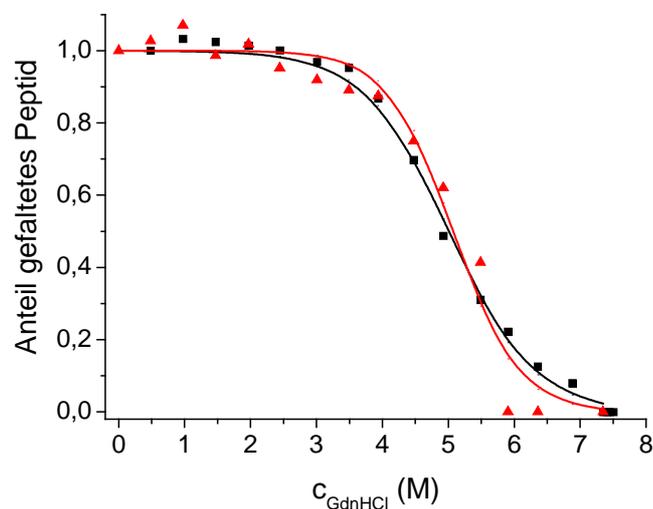


Abbildung 71: Ermittelte, gefittete Denaturierungskurven aus der Tryptophanfluoreszenzverschiebung von me-6 (schwarz) und ZnPheida-me-6 (rot). Die Abbildung verdeutlicht die Ähnlichkeit der Denaturierungseigenschaften des Apo- und Holopeptids.

Eine unveränderte Elliptizität im CD-Spektrum nach dem Peptideinbau des Kofaktors zeigte, dass die Pigmente die Stabilität des Peptids nicht erhöhen. Dies wird mit den hier ermittelten Stabilitätsparametern aus der Fluoreszenzauswertung bestätigt.

In Kapitel 5.1 wurde bereits gezeigt, dass das Peptid me-1 ein Stabilitätsmaximum bei pH 7 – 8 besitzt. Anhand der Denaturierungsstudien des Peptids me-6 bei pH 10 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass dieses Peptid im alkalischen Bereich eine geringere freie Entfaltungsenthalpie ΔG_{H_2O} von 15,1 ($\pm 1,5$) kJ mol⁻¹ im Vergleich zu dem bei pH 7,3 ermittelten Wert von $\Delta G_{H_2O} = 20,8 (\pm 2,1)$ kJ mol⁻¹ aufweist.

5.2.5 Tripletzustände der Zinkchlorine und deren Peptid-Komplexe

5.2.5.1 Bestimmung der Nullfeldparameter

Lichtanregung induziert in Zinkchlorinen Tripletzustände, die durch *intersystem crossing* aus dem angeregten Singulettzustand entstehen. Diese Zustände sind damit der Untersuchung durch die transiente EPR-Spektroskopie zugänglich. Alternativ können die Tripletzustände, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, durch zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie untersucht werden. Beide Verfahren sollen in dieser Arbeit dazu dienen, sowohl die Tripletzustände der Zinkchlorine in Lösung als auch die der peptidgebundenen Kofaktoren zu charakterisieren. Während aus der zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie die Quantenausbeute, Lebensdauer und Zerfallskinetik des Triplets bestimmt werden kann, bietet die EPR-Spektroskopie die Möglichkeit zur Bestimmung der Nullfeldparameter und damit Aussagen über die elektronische Struktur der Tripletwellenfunktionen zu erhalten. Dabei ist zu beachten, dass die EPR-spektroskopischen Untersuchungen an gefrorenen Lösungen und an Probenkonzentrationen von $c = 200 - 500 \mu\text{M}$ durchgeführt wurden. In der Peptidlösung lag ein 60 %iger Anteil an Glycerin als Glasbildner vor. Im Gegensatz dazu wurden die zeitaufgelösten Absorptionmessungen bei RT und mit Pigment-Peptid-Konzentrationen von $c = 5 - 10 \mu\text{M}$ ausgeführt.

Beginnend mit der EPR-Spektroskopie an Tripletzuständen der peptidgebundenen Zinkchlorine, ZnCe₆ und ZnPheida, werden in Abbildung 72 die aufgenommenen EPR-Absorptionsspektren und deren erste Ableitungen gezeigt. Aus der Darstellung der ersten Ableitung können die Wendepunkte des EPR-Absorptionssignals als Minima und Maxima mit höherer Genauigkeit aus dem Spektrum abgelesen werden. Diese Darstellung wurde

früher häufig angewendet, als es noch keine Spektrens simulationsprogramme gab, um die Nullfeldparameter zu bestimmen (z. B. Levanon und Norris, 1978).

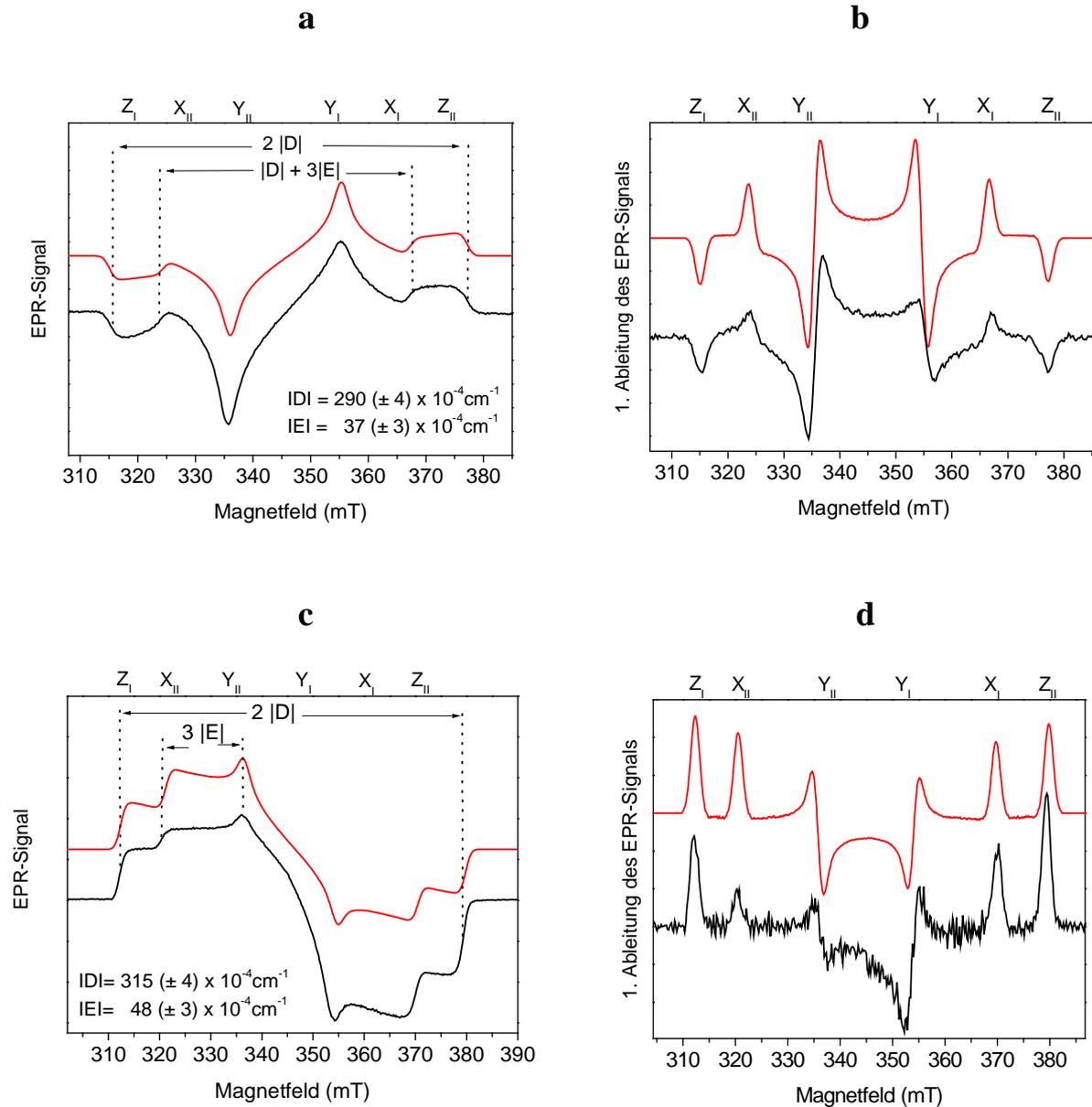


Abbildung 72: (a) Transientes X-Band Absorptions-EPR-Spektrum von $300 \mu\text{M}$ ZnPheida-me-6 (schwarz) in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,3) mit Simulation* (rot) und (b) Darstellung der 1. Ableitung der entsprechenden Absorptionsspektren aus a); $\nu = 9,66 \text{ GHz}$, $T = 80 \text{ K}$. (c) Transientes X-Band Absorptions-EPR-Spektrum von $450 \mu\text{M}$ ZnCe₆-me-6 (schwarz) in 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10) mit Simulation* (rot) und (d) Darstellung der 1. Ableitung der entsprechenden Absorptionsspektren aus c); $\nu = 9,64 \text{ GHz}$, $T = 80 \text{ K}$. Die Nullfeldparameter $|D|$ und $|E|$ (in MHz) wurden aus den Simulationen erhalten und in cm^{-1} umgerechnet.

* Das Simulationsprogramm „esetNtriplet“ wurde von Dr. M. van Gastel aus unserer Arbeitsgruppe entwickelt.

Das Triplettenspektrum des ZnPheida-me-6-Komplexes weist ein *ee-aea*-Polarisationsmuster aus absorptiven (*a*) und emissiven (*e*) Banden auf. Das ZnCe₆-me-6-Triplettenspektrum zeigt ein *aaa-eee*-Polarisationsmuster. Die unterschiedlichen Spektren der beiden Triplettzustände gehen aus der verschiedenen Besetzung der Triplettunterzustände T_x, T_y und T_z in beiden Systemen hervor (s. Kap. 3.1.6.2, Abb. 25a). Aus der Simulation dieser Pulverspektren können die Beträge der Nullfeldparameter |D| und |E| bestimmt werden, die zur Charakterisierung der Elektronenspinverteilung in der Triplettwellenfunktion herangezogen werden. Die asymmetrischen Spektren der Triplettzustände von peptidgebundenem ZnPheida und ZnCe₆ beruhen auf der Selektivität ungleicher Mikrowellenpulse für die $m_s = 0 \rightarrow +1$ und $m_s = 0 \rightarrow -1$ Übergänge (Abb. 72). Für ³ZnPheida-me-6 wird für den Parameter |D|, der als Maß für die Ausdehnung der elektronischen Wellenfunktion des Triplettzustands gilt, bei einer Messtemperatur von 80 K ein Wert von $|D| = 290 (\pm 4) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt. Der Parameter |E|, der die Verzerrung des Systems ausgehend von einer tetragonalen Struktur angibt, beträgt $|E| = 37 (\pm 3) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

Vom ³ZnCe₆-me-6-Komplex werden bei gleicher Temperatur Nullfeldaufspaltungsparameter von $|D| = 315 (\pm 4) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ und $|E| = 48 (\pm 3) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.

Eine Temperaturerhöhung auf 200 K zeigte keine Änderung im Triplettenspektrum und infolgedessen wurden die gleichen |D| und |E| Parameter bestimmt.

Die Triplettzustände der freien und Imidazol-koodinierten Zinkchlorine weisen das gleiche Polarisationsmuster wie die entsprechenden peptidgebundenen Pigmente auf und die |D| und |E| Parameter unterscheiden sich nur geringfügig (Abb. 73; Tab. 16). Die ermittelten Nullfeldparameter beider Systeme sind sowohl mit den Triplettparametern von ZnChla in Lösung als auch mit denen von natürlichen Chlorophyllen in pflanzlichen Photosystemen vergleichbar (Tab. 16; Scheer, 1991).

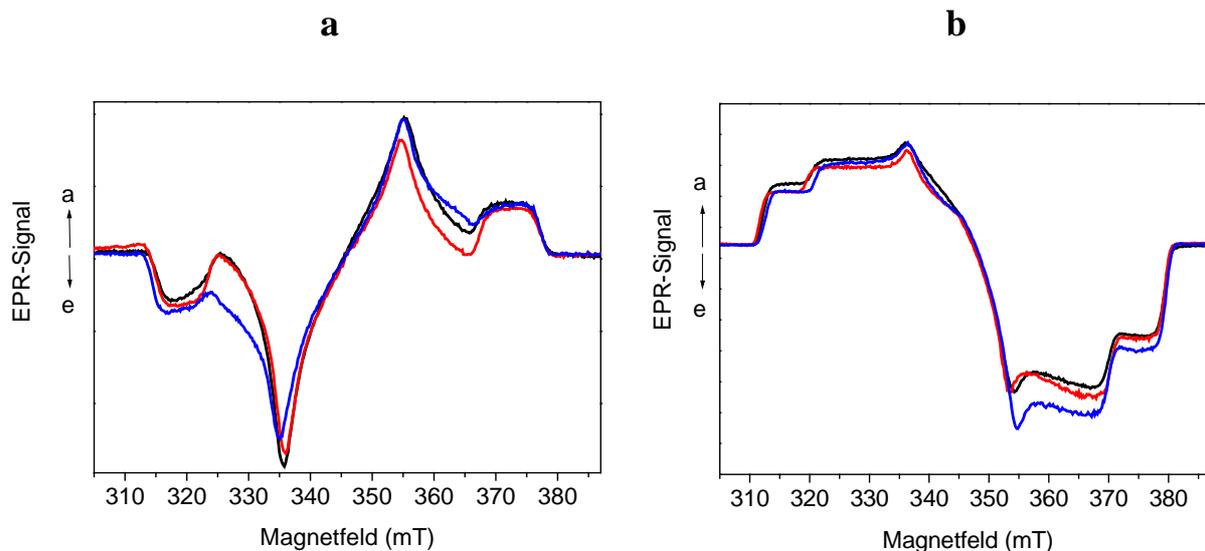


Abbildung 73: Transiente X-Band EPR-Spektren ($T = 80 \text{ K}$; $\nu = 9,62 \text{ GHz}$) von (a) ZnPheida-me-6 (schwarz), ZnPheida (rot) und ZnPheida-Imidazol (blau) jeweils in $50 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM NaCl , $\text{pH } 7,3$; 60% Glycerin) und von (b) ZnCe₆-me-1 (schwarz), ZnCe₆ (rot) und ZnCe₆ in Imidazol (blau) jeweils in 25 mM Glycin (50mM NaCl , $\text{pH } 10$; 60% Glycerin). Die entsprechenden Simulationen sind im Anhang III – V gezeigt.

Tabelle 16: Aus den transienten EPR-Spektren (X- oder Q-Band) abgelesene Nullfeldparameter $|D|$ und $|E|$ für die Zinkchlorine und deren Vergleich mit Literaturdaten. Soweit nicht anders angegeben, lagen die ZnPheida-Proben in $50 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM NaCl , $\text{pH } 7,3$) und die ZnCe₆-Proben in 25 mM Glycin (50mM NaCl , $\text{pH } 10$) vor. Die Messtemperatur betrug jeweils 80 K .

	$ D $ ($\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) (± 4)	$ E $ ($\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) (± 3)
ZnPheida	290	38
ZnPheida-me-1	290	38
ZnPheida-me-6	290	37
ZnPheida in Imidazol/Puffer	295	36
ZnPheida in Ethanol	292	38
ZnPheida in Pyridin	298	38
ZnCe ₆ in Puffer	322	50
ZnCe ₆ -me-1	315	52
ZnCe ₆ -me-6	315	48
ZnCe ₆ in Imidazol/Puffer	315	48
ZnChla (= ZnPhea) in Methylcyclohexan/Pentan (1:1) und $20 \text{ mM H}_2\text{O}$ (zitiert nach Scheer, 1991, Kap. 4.8)	$306 (\pm 3)$	$42 (\pm 3)$
³ P700 (PSI aus Spinat), den Blanken und Hoff, 1983)	$280 (\pm 5)$	$38 (\pm 2)$

Die Q-Band Spektren der Triplettzustände von ZnPheida in den organischen Lösungsmitteln Ethanol und Pyridin zeigen eine geringe Asymmetrie in den EPR-Übergängen. So beträgt der Bereich zwischen dem Z_{\parallel} und X_{\parallel} -Übergang von $^3\text{ZnPheida}$ in Pyridin 9,5 mT im Vergleich zu 11,4 mT zwischen dem X_{\parallel} und Z_{\parallel} -Übergang (Abb. 74). Dieses resultiert aus einer Anisotropie des g -Faktors. Diese Anisotropie kann in den X-Band-Spektren aufgrund der geringeren Mikrowellenfrequenz nicht aufgelöst werden.

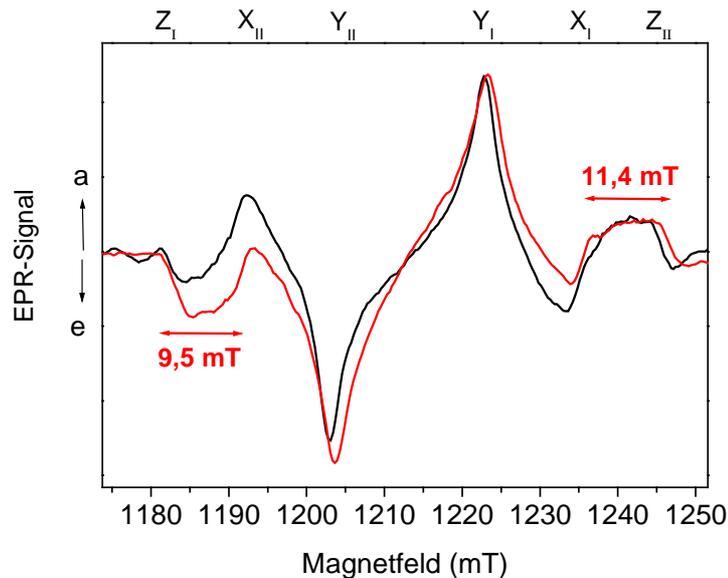


Abbildung 74: Transiente Q-Band EPR-Spektren von 500 μM ZnPheida in Ethanol (schwarz) und ZnPheida in Pyridin (rot), $\nu = 34,01$ GHz, $T = 80$ K. Die Spektren sind über 5 Punkte geglättet. Die Simulationen sind im Anhang VI dargestellt.

Die Intensität des Triplettsignals der Zinkchlorine ist abhängig von der Integrationszeit nach dem Laserblitz. Dies soll am Beispiel von $^3\text{ZnCe}_6$ in 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10) gezeigt werden (Abb. 75). Direkt nach der Laseranregung und einer Integrationszeit von 0 – 1 μs befinden sich die meisten ZnCe_6 -Moleküle im Triplettzustand und man beobachtet eine hohe Signalintensität. Bei Integrationszeiten von 1 – 2 μs und 2 – 3 μs liegen bereits wieder viele Moleküle im Grundzustand vor und infolgedessen ist eine niedrige Triplett-signalintensität zu beobachten. Des Weiteren ändert sich insbesondere das relative Intensitätsverhältnis des Y_{\parallel} -Übergangs zu den anderen Übergängen im Vergleich zu den Signalintensitäten, die direkt nach dem Laserblitz aufgenommen wurden. Nach ca. 15 μs war unter den gegebenen Bedingungen kein Triplett-signal mehr zu beobachten.

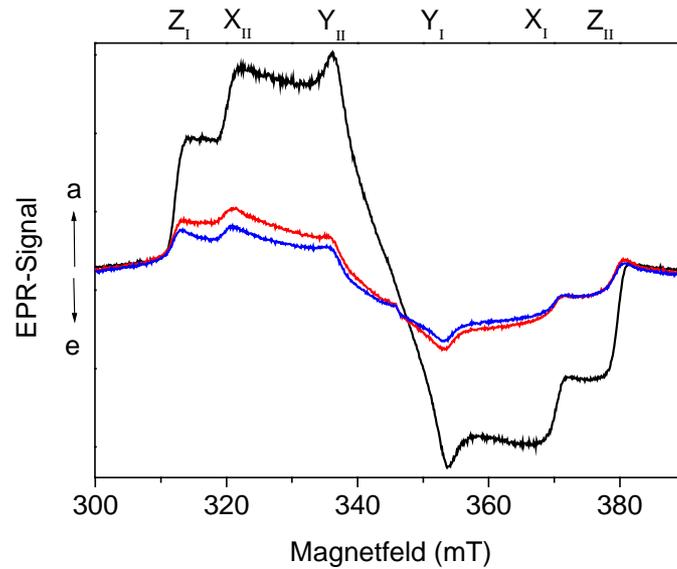


Abbildung 75: Transiente Q-Band EPR-Spektren von 200 μM $\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$ in 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10, 60 % Glycerin) nach einer Integrationszeit von 0 – 1 μs (schwarz), 1 – 2 μs (rot) und 2 – 3 μs (blau); $\nu = 9,62$ GHz, $T = 80$ K.

Nach der Charakterisierung der Tripletzustände soll im nachfolgenden Kapitel ein lichtinduzierter Elektronentransfer von den Zinkchlorinen zu nicht-kovalent gebundenen Chinonen dargestellt und der Einfluss der *de novo* synthetisierten Peptide auf den Elektronentransferprozess aufgezeigt werden.

5.2.5.2 Bestimmung der Tripletquantenausbeute

Für die Bestimmung der Quantenausbeute des *intersystem crossing* Φ_{isc} diente die Triplet-Triplet-Absorption bei 480 nm. Für freies ZnCe_6 in einer Pufferlösung wurde ein Wert von $\Phi_{isc} = 0,3$ ($\pm 0,05$) ermittelt. Als Vergleich wird für Chla in Ethanol eine Tripletquantenausbeute von $\Phi_{isc} = 0,5$ angegeben (Jabben et al., 1986), die als Referenzwert verwendet wurde. Auch die $\text{ZnCe}_6\text{-maquettes}$ weisen eine relativ hohe Tripletquantenausbeute mit $\Phi_{isc} = 0,2$ ($\pm 0,03$) auf, während sowohl in freiem als auch in peptidgebundenem ZnPheida nur wenige Moleküle einen *isc*-Prozess erfahren ($\Phi_{isc} = \ll 0,1$). Vergleichbar kleine Werte sind auch für das metallfreie Pheida mit $\Phi_{isc} = 0,02$ in Methanol/deuteriertes Wasser (1:20, v/v) bekannt (Tanielian et al., 1996). Entsprechend zeigen die Triplettsignale der freien ZnPheida -Moleküle und der $\text{ZnPheida-maquettes}$ geringere Intensitäten als die der freien und peptidgebundenen ZnCe_6 -Systeme. Die niedrige *isc*-Quantenausbeute für die ZnPheida -Systeme steht im Einklang mit der geringen Fluoreszenzquantenausbeute. Dies gibt einen Hinweis auf Aggregation, denn nur bei monomer vorliegenden Pigmenten (z. B. ZnCe_6) sind beide Werte relativ groß.

5.2.5.3 Abhängigkeit der Chlorin-Triplettlebensdauer vom Lösungsmittel

Allgemein zeigen Chlorophylle in einer wässrigen Umgebung eine kleinere Löschkonstante durch Sauerstoff k_{ox} und eine längere Triplettlebensdauer als in einem organischen Lösungsmittel. Dies konnte am Beispiel des metallfreien Ce_6 gezeigt werden: Während in Ethanol $k_{ox} = 1,5 (\pm 0,2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beträgt und eine Triplettlebensdauer von $\tau_T < 0,03 \text{ ms}$ ermittelt wurde, wurden in einer wässrigen Lösung (pH 7,3) Werte für $k_{ox} = 0,1 (\pm 0,01) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $\tau_T = 0,1 (\pm 0,01) \text{ ms}$ bestimmt. Der Transient der untersuchten Chlorine in dieser Arbeit resultiert aus dem niedrigsten Tripletzustand. Das Verhalten, unter Berücksichtigung des zuvor erwähnten Einflusses des Lösungsmittels, ist vergleichbar mit dem Tripletzustand von monomerem Chl*a* in Aceton oder Ethanol mit Ausbleichungen bei $\lambda = 420$ und 635 nm und Lebensdauern zwischen $20 - 100 \mu\text{s}$. Aufgrund von Aggregation ist der Tripletzustand von Chl*a* in wässriger Lösung nicht sichtbar (Chibisov et al., 2003).

5.2.6 Grundzustandswechselwirkung von Zinkchlorinen mit Chinonen

Bevor die Ergebnisse der Elektronentransferprozesse vorgestellt und diskutiert werden, wird nachfolgend eine bislang in der Literatur nicht bekannte Grundzustandswechselwirkung zwischen Chinon und ZnPheida bzw. $ZnCe_6$ beschrieben, die sowohl im Absorptions- als auch im Fluoreszenzspektrum der Pigmente beobachtet wurde.

Für die Untersuchungen der Grundzustandswechselwirkungen wurden *p*-Benzochinon (BQ) und das Derivat Phenyl-*p*-Benzochinon (phBQ) mit einem Phenylrest als größeres Chinonmolekül gewählt. Bei Zugabe eines fünffachen Überschusses an BQ oder phBQ wird im Absorptionsspektrum von $ZnCe_6$ eine Abnahme der Intensität der Soret- als auch der Q_y-Bande beobachtet. Zudem entstehen neue Absorptionsbanden bei 440 und 673 nm mit „quasi“-isosbestischen Punkten bei 422 und 646 nm (Abb. 76a). Diese Absorptionsänderungen konnten zeitaufgelöst verfolgt werden (Abb. 77). Dabei wurde eine schnellere Kinetik der Absorptionsverluste der Soret- und Q-Banden (Geschwindigkeitskonstante k_-) im Vergleich zu der Zunahme der Absorption der entstehenden Banden bei 440 und 673 nm (Geschwindigkeitskonstante k_+) ermittelt. Es wurden Geschwindigkeitskonstanten für den Zerfall von $k_- = 0,008 \text{ s}^{-1}$ und für das Herauswachsen der neuen Absorptionsbanden von $k_+ = 0,0001 \text{ s}^{-1}$ ermittelt (Abb. 77a). Die Wechselwirkung des Zinkchlorins mit den Chinonen (BQ und phBQ) wurde direkt nach der Chinonzugabe festgestellt, wobei sich der endgültige Zustand zwischen den zwei Komponenten nach ca. einer Stunde eingestellt hatte. Bei Zugabe

von höheren Chinonkonzentrationen (Abb. 77b), wie z. B. einem vierzigfachen Überschuss von BQ zu ZnCe_6 , konnten höhere Werte ermittelt werden: $k_- = 0,03 \text{ s}^{-1}$ und $k_+ = 0,002 \text{ s}^{-1}$, d.h., die Intensitätsabnahme der ursprünglichen Soret- und Q_y -Bande und die Bildung der neuen Absorptionsbanden tritt bei höheren Konzentrationen schneller ein. Es kann ausgeschlossen werden, dass das Entstehen der Banden bei 440 und 673 nm auf die Puffersalze zurückzuführen ist, da gleiche Beobachtungen auch in deionisiertem Wasser (ohne Zusätze) gemacht wurden. Auch im Fluoreszenzspektrum tritt die entsprechende Verschiebung der Q_y -Bande von ZnCe_6 nach BQ- oder phBQ-Zugabe auf. Im Fall des ZnPheida wird nach BQ-Zugabe eine neu entstehende Absorptionsbande bei 740 nm beobachtet, während die ursprüngliche Q_y -Bande des Pigments in wässriger Lösung (pH 7,3) bei 663 nm an Intensität abnimmt (Abb. 76b). Diese beiden Absorptionsbanden liegen somit um 67 nm getrennt voneinander vor. Die Soretbande von ZnPheida bei 425 nm zeigt nach Chinonzugabe ebenfalls einen Intensitätsverlust und eine neue Bande bei 456 nm erscheint. Analog zu ZnCe_6 in wässriger Lösung liegen auch im Spektrum von ZnPheida "quasi"-isobestische Punkte bei 441 und 691 nm vor.

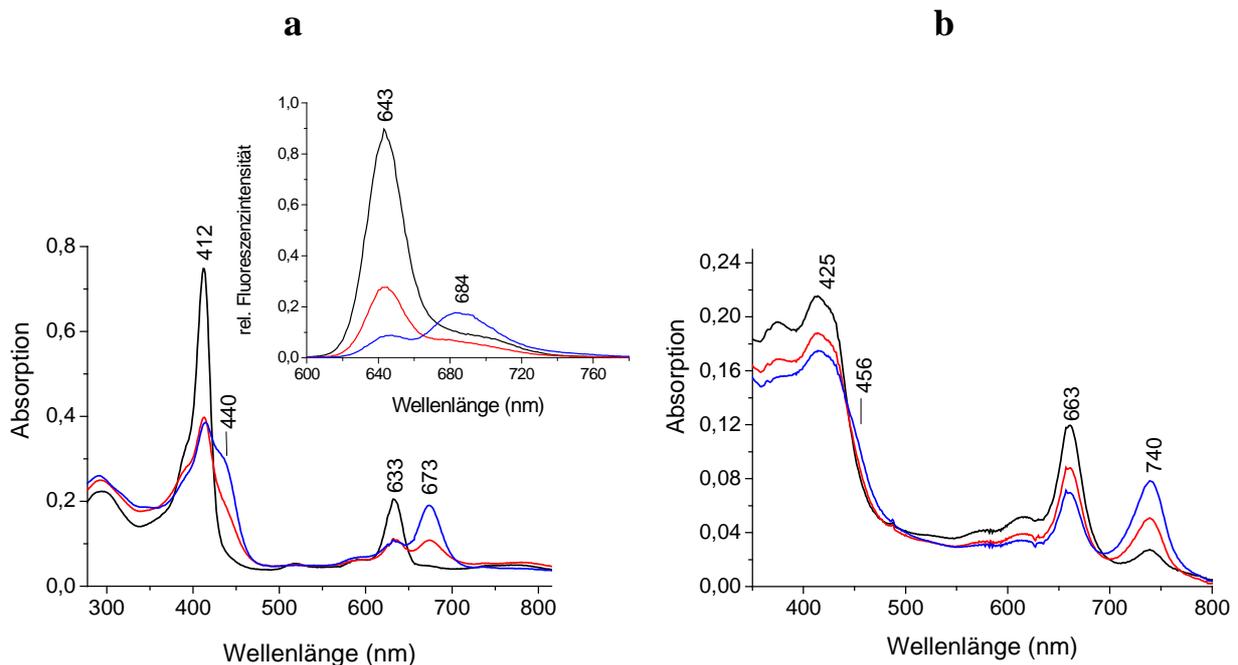


Abbildung 76: (a) Absorptionsspektren von $4 \mu\text{M}$ ZnCe_6 und $20 \mu\text{M}$ BQ direkt nach Chinonzugabe (schwarz), nach 200 s (rot) und nach 600 s (blau); die Einfügung zeigt die entsprechende Verschiebung der Emission in der Q_y -Bande; (b) Absorptionsspektren von $10 \mu\text{M}$ ZnPheida und $100 \mu\text{M}$ BQ direkt nach der Chinonzugabe (schwarz), nach 200 s (rot) und nach 600 s (blau).

Die Auftragungen der Kinetiken in Abbildung 77 zeigen, dass das Entstehen des unbekanntes Komplexes, der nachfolgend diskutiert werden soll, nach der Chinonzugabe in zwei Stufen erfolgt. Nachdem die Intensitäten der Absorptionsbanden des freien $ZnCe_6$ in wässriger Lösung zu ca. 70% ($\pm 10\%$) abgenommen haben ($k_- > k_+$), bildet sich zunächst ein instabiler Komplex, aus dem ein neuer stabiler Komplex mit den rotverschobenen optischen Banden generiert wird.

Im Gegensatz zu den Chinon-induzierten Absorptions- und Emissionsänderungen der Zink-Pigmente in wässriger Lösung (pH 7,3) ist bei den metallfreien Pigmenten, Pheida und Ce_6 , nach Chinonzugabe sowohl das Absorptions- als auch das Emissionsspektrum unverändert. Auch von den peptidgebundenen Zinkchlorinen ($ZnCe_6$ -me-1, $ZnCe_6$ -me-6, $ZnPheida$ -me-1, $ZnPheida$ -me-6) konnten weder Intensitätsabnahmen in den Soret- und Q_y -Banden noch das Auftreten neuer Absorptions- oder Emissionsbanden beobachtet werden.

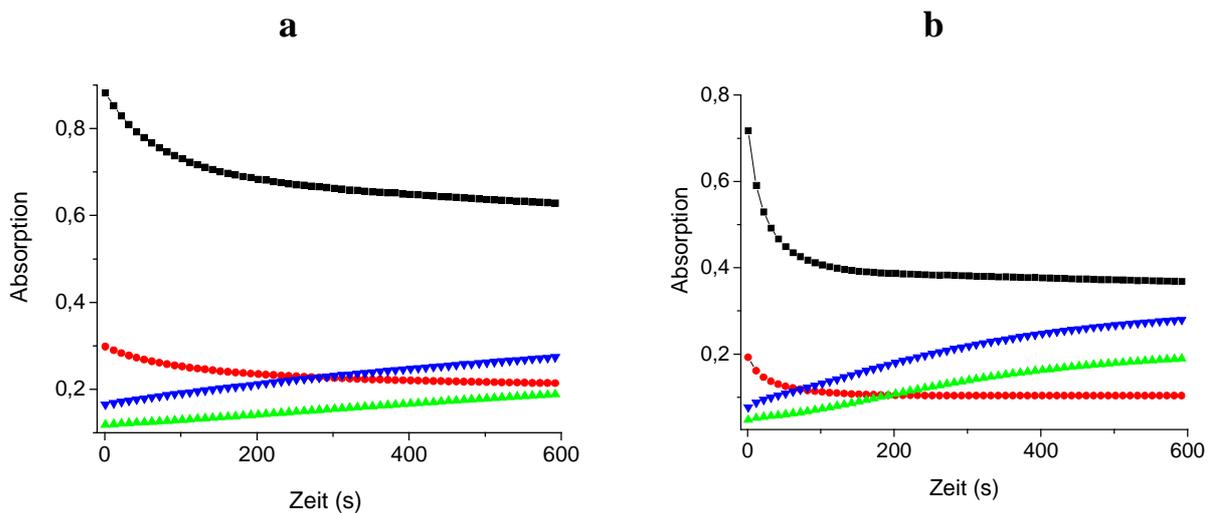


Abbildung 77: Kinetische Verfolgung der Absorptionsänderung von 4 μM $ZnCe_6$ in 10 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH 7,3) nach Zugabe a) 20 μM BQ und b) 170 μM BQ bei charakteristischen Wellenlängen von 410 (■), 630 (●), 675 (▲) und 440 (▼) nm.

In der Literatur ist bislang erst wenig über die Wechselwirkung von Zinkchlorinen mit Chinonen bekannt. Dagegen gibt es bereits konkrete Vorstellungen über die Aggregation von Chlorinen in wässriger Lösung ohne Anwesenheit von Chinonen, die ebenfalls eine bathochrome Verschiebung der Soret- und Q_y -Bande zur Folge haben. Die Art dieser Zusammenlagerung ist abhängig vom Lösungsmittel. Ein besonderes Beispiel stellt die Wechselwirkung in einem unpolaren Lösungsmittel zwischen der Hydroxylgruppe in 3¹-Position eines Bakteriochlorins und dem Zentralmetall eines benachbarten Bakteriochlorins dar, das wiederum über seine Carbonylgruppe an ein drittes Pigment

koordiniert (Abb. 78), (Tamiaki et al., 1996; Miyatake et al., 1999). Aus dieser Aggregation resultiert eine Rotverschiebung der Q_y -Bande von 667 zu 739 nm (Balaban et al., 2000), die vergleichbar mit der hier beobachteten Verschiebung der Q_y -Bande von ZnPheida (663 \rightarrow 740 nm) nach Chinonzugabe ist. Dennoch kann diese Art der Aggregation hier nicht vorliegen, da sich die verwendeten Zinkchlorine strukturell von den chlorosomalen Chlorophyllen unterscheiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Zinkchlorine besitzen keine Hydroxylgruppe in der 3¹-Position, sondern eine Vinylgruppe (s. Abb. 13).

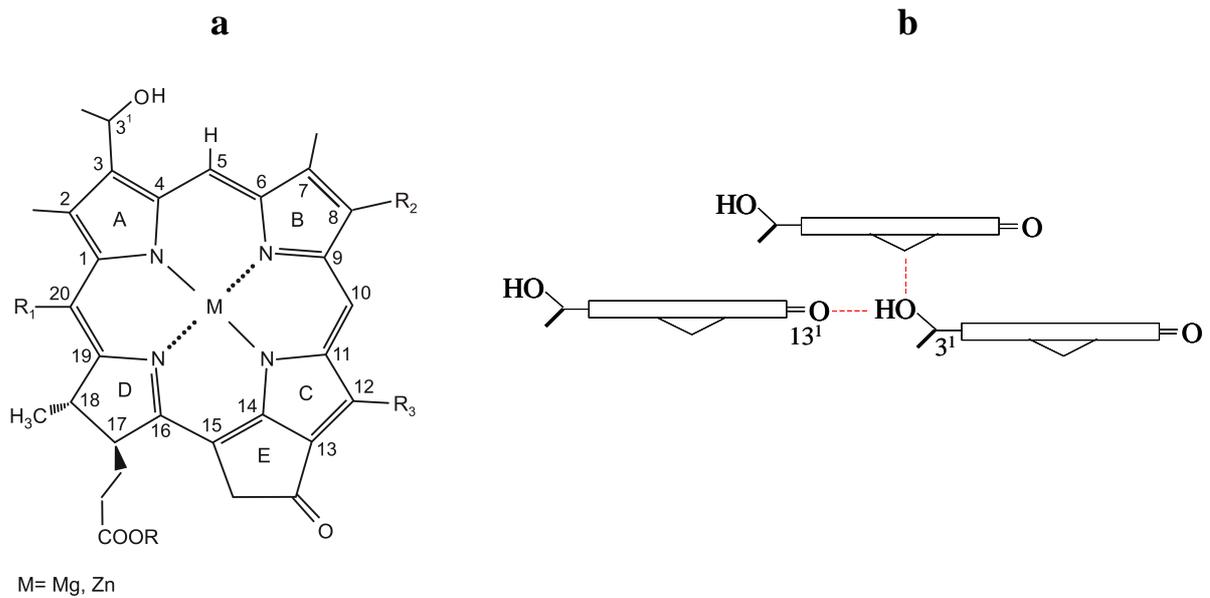


Abbildung 78: a) Strukturen von Bakteriochlorophyll *c/d* oder synthetischen Zink-Bakteriochlorinen mit einer Hydroxylgruppe in 3¹-Position; b) Aggregationsmodell dieser Pigmente im unpolaren Lösungsmittel.

In polaren Lösungsmitteln kann das Sauerstoffatom des Lösungsmittels (Wasser, Ethanol, u.a.) mit dem Zentralmetall eines (Bakterio)Chlorins koordinieren und eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe eines weiteren Chlorins ausbilden (Balaban et al., 2005). Diese Art der Aggregation ($Mg--O(H)H--O=C$) wurde erstmalig nach einer geringen Zugabe von Wasser zu Chla festgestellt, das in einem aliphatischen Kohlenwasserstoff als Lösungsmittel vorlag. In diesem Fall wurde eine Rotverschiebung der Q_y -Bande zu 740 nm beobachtet (Katz und Ballschmiter, 1968). Eine ähnliche Art der Wechselwirkung könnte auch zwischen dem hier verwendeten Zinkchlorin und den entsprechenden Benzochinonen vorliegen. Die Carbonylgruppe des Chinons kann über ein Wassermolekül mit dem Zentralmetall des Zinkchlorins koordinieren. Die Annahme einer solchen Aggregation wird durch die Tatsache unterstützt, dass in einem organischen Lösungsmittel wie DMSO das Entstehen der neuen Absorptionsbande nicht beobachtet wurde, da dieses Lösungsmittel nicht

die Möglichkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke bietet. Die beschriebene literaturbekannte Aggregation kann durch das nicht-ionische Detergens Triton X-100 aufgehoben werden (Miyatake et al., 1999). Bekanntlich liegt auch ZnPheida als Monomer in Triton X-100 vor (Agostiano et al., 2002). Im Gegensatz dazu wird für den in dieser Arbeit untersuchten „Komplex“ nach Zugabe des gleichen Detergens keine Absorptionsänderung beobachtet bzw. das Ausgangsspektrum des freien $ZnCe_6$ nicht zurückerhalten. Dies deutet auf eine hohe Stabilität des neuen Komplexes hin. Des Weiteren könnte die Verschiebung der Q_y -Bande auch aus einer Benzochinon-induzierten Aggregation der Zinkchlorine mit Wassermolekülen resultieren, ohne dass das Chinon selber an dieser Aggregation beteiligt ist. Ausgeschlossen werden kann dagegen, dass das Zinkchlorin durch das Chinon entmetallisiert wird, da die Banden der metallfreien Chlorine andere Absorptionswellenlängen aufweisen. Bislang ist bekannt, dass Porphyrine mit einem Hydroxynaphthylrest Wasserstoffbrückenbindungen mit Benzochinonen eingehen (Hayashi et al., 1997). Zu beachten ist allerdings, dass in diesem Fall keine Metallionen notwendig sind und es sich somit von dem in dieser Arbeit diskutierten Ergebnis unterscheidet, da hier nach dem Chinonzusatz zu den metallfreien Pigmenten Pheida und Ce_6 keine Absorptionsverschiebungen zu beobachten waren. Dies bedeutet, dass das Metall eine entscheidende Rolle bei der Aggregation oder Komplexbildung einnimmt.

Die Einlagerung der Zinkchlorine in die *de novo* synthetisierten Peptide verhindert ebenfalls eine Wechselwirkung zwischen den Pigmenten und Chinonen. Damit sind die Peptide in der Lage, die Kofaktoren von den Chinonen abzuschirmen, obwohl diese als Überschuss in der Lösung vorliegen. Daraus ergibt sich die interessante Fragestellung, ob die Peptide trotz der guten Einbindung und Abschirmung der Pigmente einen diffusionskontrollierten Elektronentransfer zwischen den Zinkchlorinen und Chinonen gewährleisten bzw. das Peptid auch mit dem Chinon eine Wechselwirkung eingeht und die Rate des Elektronentransfers durch Anbindung des Chinons am Peptid sogar erhöht werden kann.

Zunächst aber soll die Wahl des pH-Wertes erörtert werden. Alle Messungen wurden bei pH 7,3 oder in Argon-gesättigten Lösungen bei pH 10 durchgeführt. Bei pH-Werten ≥ 8 wird in einer Luft-gesättigten Pufferlösung das Chinon zum 2-Hydroxy-*p*-Benzochinon mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm reduziert (Finley, 1974; Görner, 2003). Während der Reduktion des Chinons kommt es zur Bildung des Semichinon-Radikalanions (Fukuzumi und Yorisue, 1991), das bei EPR-Untersuchungen in Lösungen mit einem pH-Wert von pH 10 in den Spektren zu detektieren war (Kap. 5.2.6.5). Durch Argonzufuhr wurde in den Absorptionsspektren beobachtet, dass die Intensität der Absorptionsbande bei 260 nm nicht

weiter zunahm und damit keine weitere Umsetzung des Chinons erfolgte. Somit konnte gezeigt werden, dass es für nachfolgende Messungen notwendig war, entweder bei pH-Werten < 8 oder unter Sauerstoffausschluss zu arbeiten. Aufgrund der besseren Handhabung wurden für die zeitaufgelösten Absorptionsmessungen das Arbeiten bei pH-Werten von $\text{pH} \leq 7,3$ gewählt. Für die EPR-Messungen wurden alle Proben bei einem pH-Wert von 10 zuvor entgast. In Kap. 5.2.4 wurde bereits eine Entmetallisierung des ZnCe_6 erwähnt, die nach ca. 1 h bei Aufbewahrung an der Luft einsetzte. Infolgedessen wurde für jede Absorptionsmessung eine frisch angesetzte Lösung verwendet und der Metallgehalt durch die charakteristischen Absorptionsbanden des ZnCe_6 (s. Abb. 57) überprüft.

5.2.7 Lichtinduzierter Elektronentransfer von freien und peptidgebundenen Zinkchlorinen zu Chinonen

5.2.7.1 Redoxpotentiale ausgewählter Chinone

Die Triplettzustände der freien und peptidgebundenen Zinkchlorine wurden bereits im Kap. 5.2.5 mittels EPR-Spektroskopie charakterisiert. Diese Untersuchungsmethode soll neben der zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie auch in diesem Kapitel zur Charakterisierung der Triplettzustände und ihrer Löschung durch Chinone infolge eines Elektronentransferprozesses von einem angeregten Zinkchlorin zu einem weder am Chlorin noch am Peptid kovalent gebundenen Chinon dienen. Um einen Hinweis auf einen effizienten Elektronentransfer zu erhalten, wurde zunächst das Halbstufenpotential von phBQ durch zyklische Voltammetrie bei pH-Werten von 7 und 10 bestimmt. Die Halbstufenpotentiale von BQ bei gleichen pH-Werten sind bereits aus der Literatur bekannt:

$E_{\text{m,pH}7,3} = +278 (\pm 3)$ vs. NHE und $E_{\text{m,pH}10} = +122 (\pm 3)$ vs. NHE (Bailey und Ritchie, 1985).

Die hier ermittelten Halbstufenpotentiale von phBQ betragen nach Umrechnung gegen NHE (Gl. 4.5.1.2) $E_{\text{m,pH}7,3} = +248 (\pm 15)$ mV und $E_{\text{m,pH}10} = +102 (\pm 15)$ mV. Das zyklische Voltammogramm von phBQ bei pH 10 ist in Abbildung 79 dargestellt. Im Allgemeinen gilt: Je negativer das Potential des Elektronenakzeptors ist, desto leichter können die Elektronen übertragen werden. Allerdings gibt der geringere Unterschied der Halbstufenpotentiale beider Chinone bei gleichen pH-Werten keinen Hinweis auf einen bevorzugten Elektronenakzeptor.

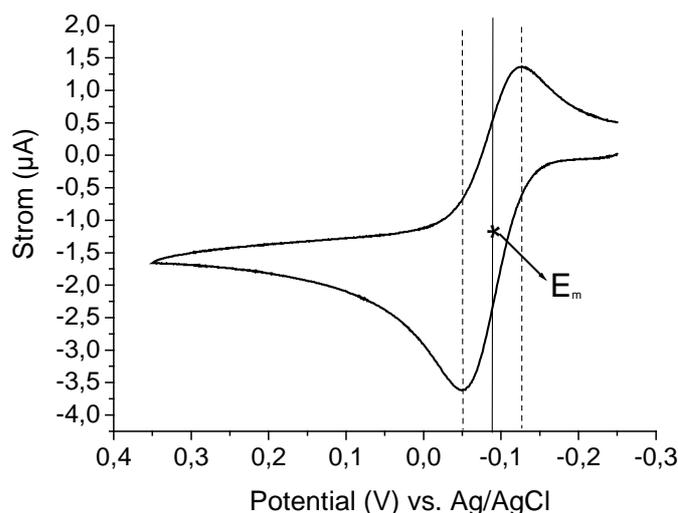


Abbildung 79: Zyklisches Voltammogramm von 50 μM phBQ in 25 mM Glycin-Puffer (50 mM NaCl, pH 10).

Für die nachfolgenden Messungen wurde dennoch häufig BQ als Elektronenakzeptor eingesetzt, da es hydrophiler als phBQ ist und somit beim Lösen des Chinons auf ein organisches Lösungsmittel verzichtet werden konnte. Dennoch soll erwähnt werden, dass Kontrollexperimente mit phBQ kaum abweichende Ergebnisse lieferten.

Von ZnCe_6 konnte ein Halbstufenpotential von $E_{m,\text{pH}10} = +349 (\pm 15)$ mV bestimmt werden.

5.2.7.2 Herkunft des Radikalpaares und dessen Charakterisierung durch transiente Absorptionsspektroskopie

Während eines Elektronentransferprozesses entstehen Radikale, die durch Elektronenübertragung aus dem Singulett- oder Triplettzustand eines Donators zu einem Akzeptor resultieren (s. Kap. 3.4, Abb. 31). Um Informationen über den Ausgangszustand des entstehenden spinkorrelierten Radikalpaares aus den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zinkchlorinen (nicht peptidgebundenen ZnCe_6 und ZnPheida , $\text{ZnCe}_6\text{-me-1}$, $\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$, ZnPheida-me-1 und ZnPheida-me-6) und ihrer Wechselwirkung mit Chinonen zu erhalten, wurde zunächst die Lebensdauer der Fluoreszenz der freien und peptidgebundenen Zinkchlorine nach Zusatz von Chinonen untersucht. Wenn das Radikalpaar aus dem Singulettzustand resultiert, so wird eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer erwartet. Hierfür wurden die Systeme bei 385 nm angeregt und die Emission in der Q_y -Bande beobachtet. Es zeigt sich, dass für die untersuchten Systeme ein Elektronentransfer aus dem S_1 -Zustand ausgeschlossen werden kann, da die Fluoreszenzlebensdauern bei allen Systemen nach Zugabe von Chinon (BQ- und phBQ-Konzentration $\leq 0,2$ mM) unverändert blieben.

Infolgedessen sollen nachfolgend die Triplettzustände und die von diesem Zustand ausgehenden Elektronentransferprozesse durch transiente Absorptionsspektroskopie (Kap. 3.1.2) charakterisiert werden. Die Absorptionsdifferenzspektren die aus der Summe der Grundzustandsabsorption und der Triplett-Triplett-Absorption bestehen, zeigen starke Ausbleichbanden in den Soret- und Q_y -Regionen der Pigmente, da die Extinktionskoeffizienten der Grundzustandsabsorption größer als die der Triplett-Triplett-Absorption sind. Mit Hilfe der transienten Absorptionsspektroskopie können auch die entstehenden Radikale während des Elektronentransfers detektiert und deren Lebenszeiten ermittelt werden. Die Standardmessungen wurden bei Raumtemperatur und maximalen Probenkonzentrationen von $10 \mu\text{M}$ durchgeführt.

Die Abbildung 80a (durchgezogene Linie) zeigt das direkt nach der Lichtanregung aufgenommene Absorptionsdifferenzspektrum von ZnCe_6 in einer Argon-gesättigten Pufferlösung (pH 7,3) mit positiven Absorptionen zwischen 300 und 660 nm, die nur durch zwei negative Absorptionen (Ausbleichungen) bei Wellenlängen von 400 und 635 nm unterbrochen werden, die den Soret- und Q_y -Banden der Grundzustandsabsorption (vgl. Kap. 5.2.2.1, Abb. 60) entsprechen. Der Transient erscheint direkt nach dem Laserblitz und zerfällt mit einer Kinetik erster Ordnung. Die Lebensdauer des Triplettzustands τ_T für ZnCe_6 in wässriger Lösung wurde aus dem Kinetikverlauf bei 460 nm ermittelt und beträgt $\tau_T = 460 (\pm 40) \mu\text{s}$. Die Kinetik wurde bei 460 nm verfolgt, da direkt im Absorptionsmaximum des Transienten bei 450 nm die Grundzustandskinetiken die Messungen beeinflussen würden. Generell wurden in Luft-gesättigten Lösungen kürzere Lebenszeiten als in Argon-gesättigter Lösung beobachtet, was auf den Löscheffekt des Sauerstoffs in Bezug auf den Triplettzustand zurückzuführen ist. Für ${}^3\text{ZnCe}_6$ wurde eine Geschwindigkeitskonstante der Löschung durch Sauerstoff von $k_{\text{ox}} = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Im Kapitel 5.2.5 wurden mittels transienter EPR-Spektroskopie maximale Triplettlebensdauern von $15 \mu\text{s}$ gefunden. Sie sind damit deutlich kürzer als die hier ermittelten Lebenszeiten. Der Zerfall des Triplettzustands kann im Allgemeinen damit erklärt werden, dass direkt nach dem Laserblitz zunächst viele Zinkchlorine über den angeregten Singulettzustand durch den *isc*-Prozess in den Triplettzustand gelangen, aber mit zunehmender Zeit immer mehr Pigmente wieder in den Grundzustand zurückkehren und infolgedessen das Triplettsignal immer mehr abnimmt. Wenn in der untersuchten Probe eine hohe Konzentration an Pigment vorliegt, wie es für die EPR-Untersuchungen notwendig ist, kann ein schnellerer Zerfall des Triplett durch intermolekulare Wechselwirkung der Pigmente stattfinden und eine kürzere Triplettlebensdauer wird beobachtet.

Der Zerfall des Triplets verläuft parallel zum Aufbau des Grundzustandssignals, der in Abbildung 80 bei einer Kinetikaufnahme im Soretbereich des Zinkchlorins zu sehen ist.

Nach Zugabe von BQ (Abb. 80b) wird ein Löscheffekt des nach Lichtanregung entstehenden Triplets beobachtet und die Triplettlebensdauer von ZnCe_6 in Argon-gesättigter Pufferlösung verkürzt sich auf $\tau_T = 50 (\pm 5) \mu\text{s}$. Die Spektrenaufnahme erfolgte ca. 1 – 2 min nach Zugabe des Chinons, so dass der Anteil der in Kap. 5.2.6 beobachteten ‘Komplexbildung’ zum Zeitpunkt der Messung $< 10 \%$ betrug. Die gemessenen Triplettlebensdauern und Löschkonstanten aller untersuchten Systeme, die im nachfolgenden nicht als Abbildung gezeigt werden, sind in Tabelle 17 angegeben.

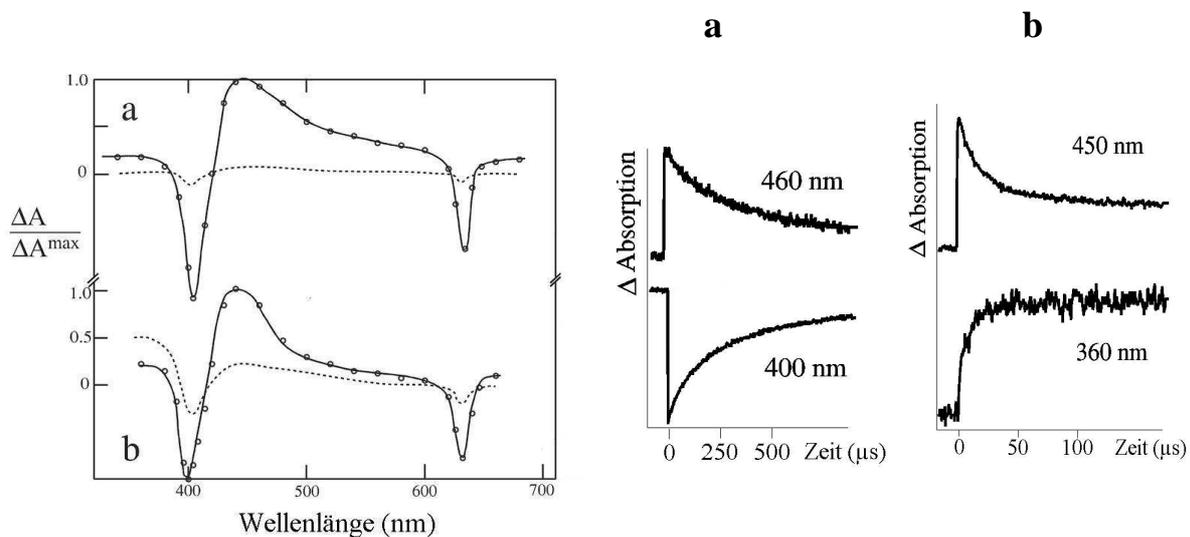


Abbildung 80: Transiente Absorptionsspektren von $5 \mu\text{M ZnCe}_6$ in Argon-gesättigtem $0,01 \text{ M KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 7,3). (a) Ohne Elektronenakzeptor und (b) nach $10 \mu\text{M BQ}$ -Zugabe als Endkonzentration. Die Aufnahmen in (a) und (b) erfolgten direkt nach dem Laserpuls (Länge: 20 ns) (—) und nach (a) 1 ms (---) und (b) $0,1 \text{ ms}$ (---). Die gestrichelte Linie bezieht sich in (b) auf einen Zeitbereich, bei dem nur das Radikalkation zu detektieren ist. In der Abbildung sind zusätzlich die für (a) und (b) zugehörigen Zerfalls- bzw. Aufbaukinetiken bei charakteristischen Wellenlängen gezeigt.

Das transiente Absorptionsspektrum von ZnCe_6 zeigt nach Chinonzugabe neben dem schnelleren Zerfall des Zinkchlorin-Triplettzustands die Bildung eines neuen Transienten zwischen Wellenlängen von 380 und 420 nm . Dieser Transient ist auf das Radikalkation ${}^3\text{ZnCe}_6^{\bullet+}$ zurückzuführen, das aus dem Triplettzustand nach Elektronenabgabe gebildet wird. Das Absorptionsmaximum des Radikals befindet sich bei 400 nm und ist aufgrund der hohen Grundzustandsabsorption von ZnCe_6 nicht zu detektieren. Bekanntlich absorbiert auch das Radikalkation von $\text{Chl}a$ bei 400 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{400} ({}^3\text{Chl}a^{\bullet+}) = 3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Brown et al., 1978; Levanon und Neta, 1982).

Das Radikalanion des Benzochinons ist aufgrund seines geringeren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{431} = 0,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Steenken und Neta, 2003) nicht im Spektrum zu beobachten. Im Vergleich zum Absorptionsmaximum des $^3\text{Chla}^{\bullet+}$ bei 400 nm ist der Extinktionskoeffizient des Chinon-Radikalanions aufgrund seiner Absorptionshalbwertsbreite von ca. 50 nm bei dieser Wellenlänge nochmals um ca. 30 % kleiner als bei 431 nm. Somit wurde am Beispiel von ZnPheida in wässriger Lösung als Vergleich Methylviologen (MV^{2+}) anstelle von BQ als Elektronenakzeptor hinzugesetzt, da es einen höheren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{396} = 4,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ besitzt (Watanabe und Honda, 1982). Die transienten Absorptionsspektren sind in Abbildung 81 vor und nach der Zugabe von Benzochinon im Vergleich zu denen mit Methylviologen gezeigt.

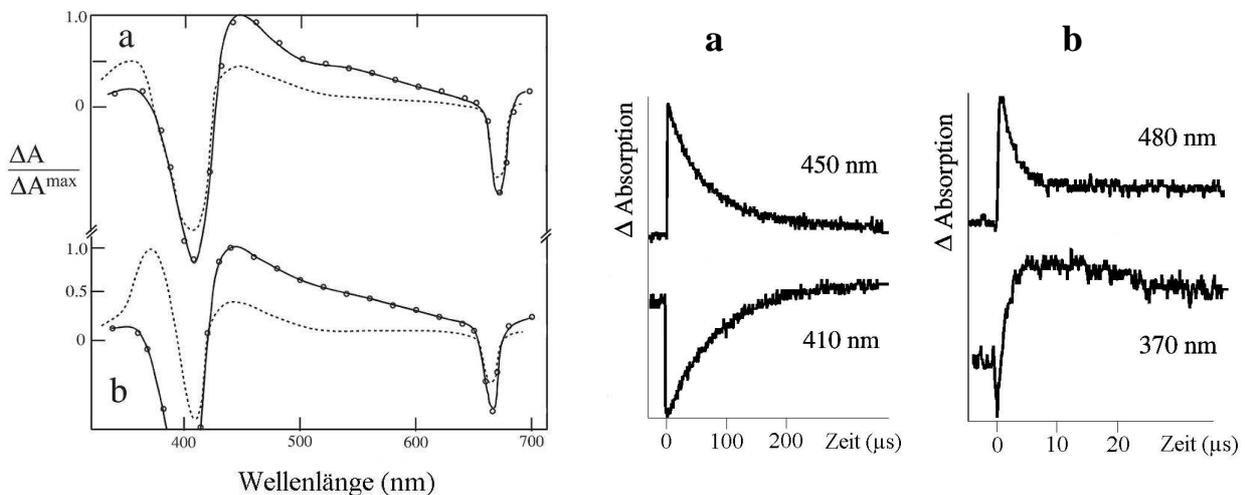


Abbildung 81: Transiente Absorptionsspektren von 5 μM ZnPheida in Argon-gesättigtem 0,01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 7,3). (a) Nach 10 μM BQ- und (b) 10 μM Methylviologen-Zugabe als Endkonzentrationen. Die Aufnahmen in (a) und (b) erfolgten direkt nach dem Laserpuls (Länge: 20 ns) (—) und nach 0,1 ms (---). In der Abbildung sind zusätzlich die für (a) und (b) zugehörigen Zerfalls- bzw. Aufbaukinetiken bei charakteristischen Wellenlängen gezeigt.

Beim Vergleich der zeitaufgelösten Absorptionsspektren in Abbildung 81 ist die deutlich höhere Triplettabsorption bei 380 und 420 nm zu beobachten, wenn das Methylviologen anstelle von BQ als Elektronenakzeptor eingesetzt wird. Der Transient, dessen Maximum bei 410 nm aufgrund der hohen Grundzustandsabsorption des ZnCe_6 nicht zu beobachten ist, beruht auf dem spinkorrelierten Radikalpaar von $^3(\text{ZnCe}_6^{\bullet+}-\text{MV}^{\bullet+})$ (s. Kap. 3.4), da sowohl das Radikalkation $^3\text{ZnCe}_6^{\bullet+}$ als auch das Radikal des Akzeptors $\text{MV}^{\bullet+}$ in diesem Wellenlängenbereich absorbieren. Des Weiteren ist im zeitaufgelösten Absorptionsspektrum (Abb. 81b) ein schwacher Transient bei 620 nm zu detektieren, der ebenfalls auf der Existenz eines $\text{MV}^{\bullet+}$ -Radikals beruht (Watanabe und Honda, 1982). Die Detektion des Radikalkations und -

anions weist damit auf einen Elektronentransfer zwischen den beiden untersuchten Komponenten hin.

5.2.7.3 Einfluss der Peptidmatrix auf den Elektronentransferprozess

Um Informationen über den Einfluss der Peptidmatrix auf die Elektronentransferrate zwischen Zinkchlorinen und Chinonen zu erhalten, werden nachfolgend die Triplett-eigenschaften der freien Zinkchlorine und der nach Lichtanregung entstehende Elektronentransfer zu einem Chinon mit denen der peptidgebundenen Zinkchlorine verglichen. Das transiente Absorptionsspektrum von $\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$ (Abb. 82) ähnelt auf den ersten Blick dem des freien Pigments (Abb. 80). Allerdings zeigen die kinetischen Untersuchungen, dass die Triplettlebensdauer des peptidgebundenen ZnCe_6 $\tau_T = 1,5 (\pm 0,2)$ ms beträgt und damit der Aufenthalt angeregter peptidgebundener Zinkchlorine im Triplettzustand ca. dreimal länger als der der freien Pigmente ist. Dies kann mit der Abschirmung der Kofaktoren durch die Peptide begründet werden, aus der eine geringere Löschung durch den Grundzustand resultiert und das Triplett somit eine längere Lebensdauer aufweist.

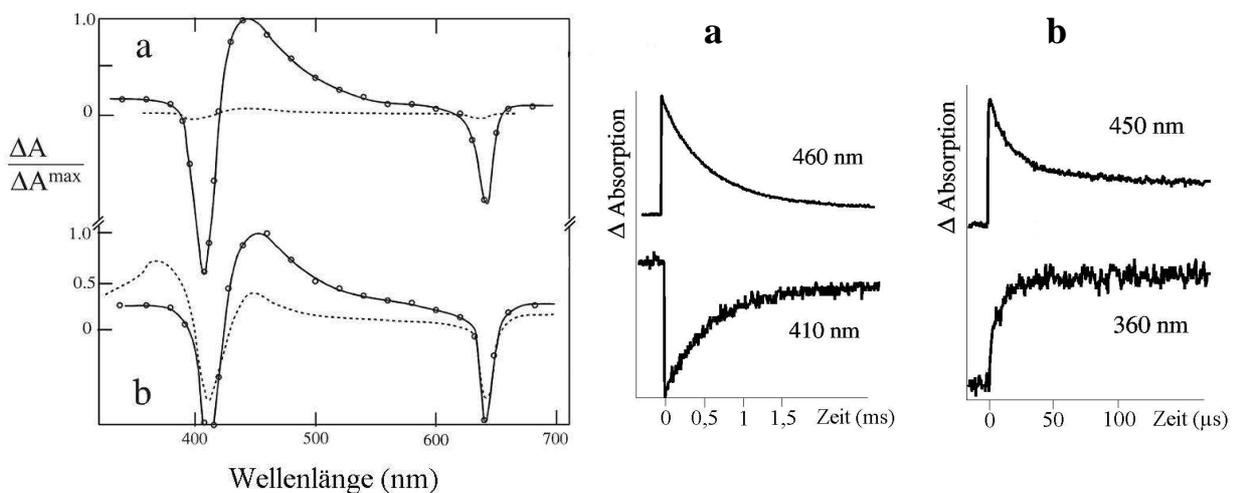


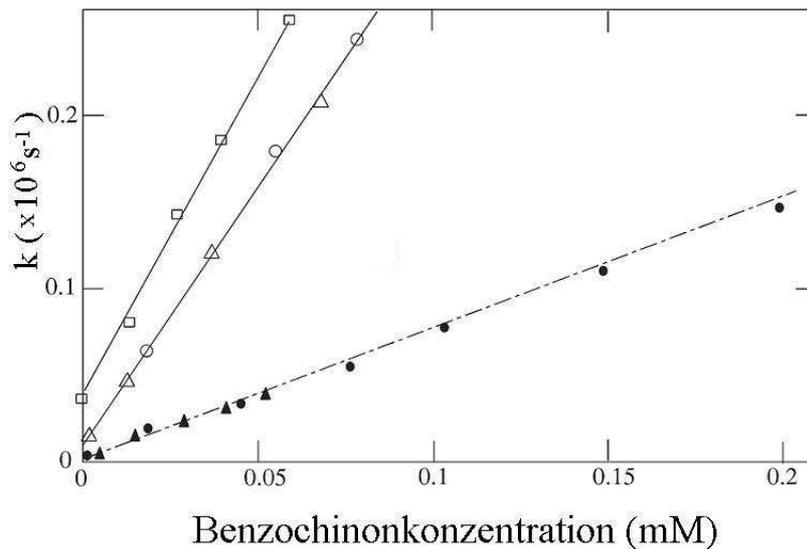
Abbildung 82: Transiente Absorptionsspektren von $6 \mu\text{M}$ $\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$ in Argon-gesättigtem $0,01 \text{ M}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 7,3). (a) Ohne Elektronenakzeptor und (b) mit $10 \mu\text{M}$ BQ als Endkonzentration. Die Aufnahmen in (a) und (b) erfolgten direkt (—) und nach (a) 1 ms (\cdots) und (b) 0,1 ms nach dem Laserpuls (Länge: 20 ns). In der Abbildung sind zusätzlich die für (a) und (b) zugehörigen Zerfalls- bzw. Aufbaukinetiken bei charakteristischen Wellenlängen gezeigt.

Bei Anwesenheit von Benzochinon wird die Triplettlebensdauer des $^3\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$ -Komplexes auf $50 (\pm 5) \mu\text{s}$ verkürzt. Der Triplettzustand weist damit die gleiche Lebensdauer wie die des nicht peptidgebundenen Pigments nach dem Zusatz von Chinon auf.

Tabelle 17: Tripletteigenschaften der untersuchten Zinkchlorin-Systeme in argongesättigtem 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (pH 7,3); Ausnahme: Messung zur Bestimmung von k_{ox} .

	τ_T (ms) ($\pm 10\%$)	Φ_{isc}	k_{ox} ($\times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ($\pm 10\%$)	k_q ($\times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ($\pm 10\%$)
ZnCe ₆	0,4	0,3 ($\pm 0,05$)	0,10	3,0
ZnCe ₆ -me-1	1,0	0,2 ($\pm 0,03$)	0,03	0,8
ZnCe ₆ -me-6	1,5	0,2 ($\pm 0,03$)	0,03	0,7
ZnPheida	0,08	<0,1 ($\pm 0,03$)	0,10	3,0
ZnPheida-me-1	0,5	<0,1 ($\pm 0,03$)	0,03	0,7
ZnPheida-me-6	0,8	<0,1 ($\pm 0,03$)	0,03	0,7

Die Geschwindigkeitskonstante für den Triplettzerfall aller untersuchten Chlorin-Proben ($k = 1/\tau$) in Argon-gesättigter wässriger Lösung zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Benzochinonkonzentration (Abb. 83).

**Abbildung 83:** Stern-Volmer-Auftragungen für ${}^3\text{ZnCe}_6/\text{BQ}$ (\circ), ${}^3\text{ZnPheida}/\text{BQ}$ (Δ), ${}^3\text{ZnCe}_6\text{-me-6}/\text{BQ}$ (\bullet) und ${}^3\text{ZnPheida-me-6}/\text{BQ}$ (\blacktriangle) zur Ermittlung der Löschgeschwindigkeitskonstanten durch BQ in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,3). Zum Vergleich ist zusätzlich die Abhängigkeit der Löschkonstante von ${}^3\text{Chla}$ in EtOH durch BQ (\square) aufgetragen.

Aus der Steigung der sogenannten Stern-Volmer-Auftragung ergibt sich die Löschgeschwindigkeitskonstante k_q . Die Kinetiken werden bei einer Wellenlänge von 540 nm gezeigt, da bei Wellenlängen um 400 nm die Spektren von ${}^3\text{Chl}^*$ und $\text{Chl}^{\bullet+}$ stark überlappen.

Die Pigmente zeigen in diesem Bereich gleiche Extinktionskoeffizienten:

$\varepsilon_{460} = 3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (${}^3\text{Chl}^*$) und $\varepsilon_{400} = 3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (${}^3\text{Chl}^{\bullet+}$), (Watanabe und Honda, 1980; Levanon und Neta, 1982).

Die ermittelten Löschgeschwindigkeitskonstanten betragen für freies ${}^3\text{ZnCe6}$ und ${}^3\text{ZnPheida}$ $k_q = 3 (\pm 0,3) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für die Kofaktor-*maquettes* $k_q = 0,8 (\pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (${}^3\text{ZnCe}_6\text{-me-1}$) und $k_q = 0,7 (\pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (${}^3\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$, ${}^3\text{ZnPheida-me-1}$, ${}^3\text{ZnPheida-me-6}$), (Tab. 17). Die freien Pigmente weisen damit eine ähnliche Löschgeschwindigkeitskonstante wie die des ${}^3\text{Chla}$ in EtOH von $k_q = 3,7 (\pm 0,4) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf, die mit der Literatur übereinstimmt (Castelli, 1984). Die Werte der Löschgeschwindigkeitskonstanten zeigen, dass die *de novo* synthetisierten Peptide die Geschwindigkeit des Elektronentransferprozess um den Faktor vier herabsetzen.

5.2.7.4 Abhängigkeit der Triplettlebensdauer der ZnCe_6 -*maquettes* von der Temperatur

Temperaturabhängige Messungen haben gezeigt, dass die Triplettlebensdauern der untersuchten ${}^3\text{ZnCe}_6$ -*maquettes* mit und ohne Zusatz von BQ in einer Puffer/Glycerin-Lösung (2:3, v/v) bei niedrigeren Temperaturen größer waren als bei Raumtemperatur. In Abbildung 84 ist die Geschwindigkeitskonstante für den Triplettzerfall bei einer BQ-Konzentration von $c = 1 \text{ mM}$ in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Im Gegensatz zu den Absorptionmessungen bei RT in einer Pufferlösung war aufgrund des viskosen Glycerinzusatzes eine höhere Konzentration an BQ nötig, um eine Löschung der Triplets zu erzielen. Die Triplettlebensdauern der ${}^3\text{ZnCe}_6$ -*maquettes* ohne Zusatz eines Löschmoleküls ist bei jeder Temperatur $> 220 \text{ K}$ länger als die der ${}^3\text{ZnCe}_6$ -*maquettes* unter Zusatz eines Löschmoleküls. Die beobachteten längeren Triplettlebensdauern bei tiefen Temperaturen im Vergleich zur Raumtemperaturmessung sind auf die zunehmende Viskosität des Lösungsmittels und der verminderten Bewegung der Moleküle bei niedrigeren Temperaturen zurückzuführen, so dass der Lösprozess insgesamt langsamer erfolgt. Ein geringerer Anteil an Löschung geht mit einem geringeren Radikalgehalt einher. Unterhalb von 220 K und einer Triplettlebensdauer von $\tau_T = 5 (\pm 0,5) \text{ ms}$ (im Vergleich zu $\tau_T = 20 (\pm 2) \mu\text{s}$ bei 298 K bei ansonsten gleichen Bedingungen) konnte kein Elektronentransfer mehr beobachtet werden. Eine Arrhenius-Auftragung ergab keine lineare Abhängigkeit von $\ln k$ gegenüber $1/T$. Die hohe Viskosität von Glycerin verhindert eine übliche Bestimmung der Aktivierungsenergie. Dies ist im Einklang mit anderen Messungen im gleichen Lösungsmittel, bei denen gezeigt wurde, dass die Viskosität von Glycerin bei einer Temperaturänderung von 275 K auf 175 K um vier Größenordnungen zunimmt (Fischer und Fischer, 1977).

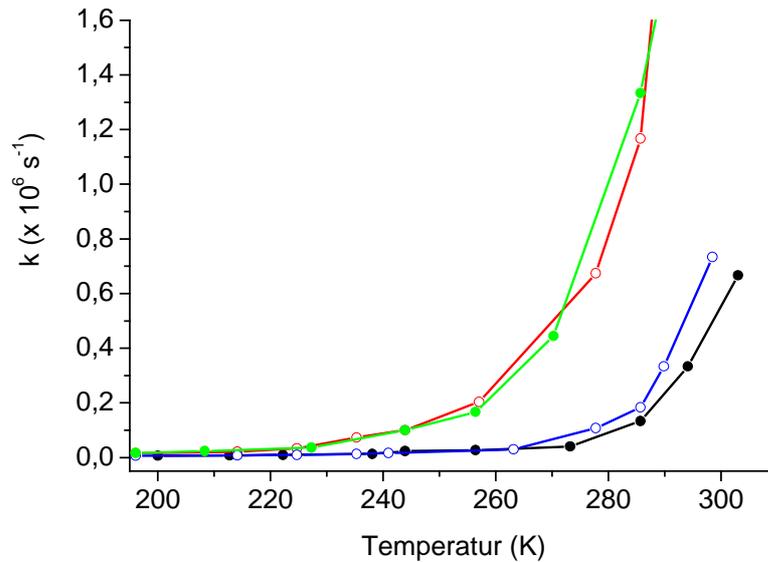


Abbildung 84: Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten für den Triplettzerfall von jeweils 8 μM ${}^3\text{ZnCe}_6\text{-me-1}$ (●), ${}^3\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$ (○), ${}^3\text{ZnCe}_6\text{-me-1/1 mM BQ}$ (●) und ${}^3\text{ZnCe}_6\text{-me-6/1 mM BQ}$ (○) in 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,3) und 60 % Glycerin in Abhängigkeit von der Temperatur.

Nach der Charakterisierung des Elektronentransferprozesses bei Raumtemperatur und niedrigen Probenkonzentrationen sollen nachfolgend die Ergebnisse aus den EPR-Messungen an gefrorenen Lösungen und hohen Pigment-Protein-Konzentrationen dargestellt und diskutiert werden. Durch die EPR-Messungen kann das Radikalpaar direkt nachgewiesen und die Änderung des Radikalsignals zeitlich verfolgt werden.

5.2.7.5 Charakterisierung des Radikalpaares durch transiente EPR-Spektroskopie

Die Abbildung 85 zeigt das Puls-EPR-Spektrum von ZnPheida und phBQ. Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 80 K aufgenommen, wobei die Probe zuvor bei 220 K belichtet wurde. Bei einem g -Wert von $g = 2,00$ ist ein Radikalsignal zu beobachten, dass auf einen stattgefundenen Elektronentransfer bei 220 K hinweist. Bei diesem Prozess sind Radikale entstanden, die bei tiefer Temperatur von 80 K in der gefrorenen Lösung zu beobachten sind. Bei 220 K ist die Lösung aufgrund des Glycerinzusatzes noch nicht vollständig gefroren und es liegt eine viskose Lösung vor, bei der ein diffusionskontrollierter Elektronentransfer stattfinden kann.

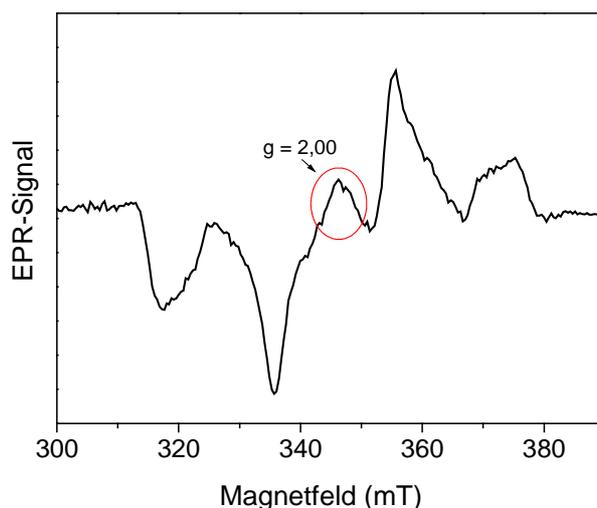


Abbildung 85: X-Band Puls-EPR-Spektrum von ZnPheida und phBQ in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM KCl, pH 7,3) und 60 % Glycerin; $T = 80$ K; $\nu = 9,68$ GHz, $\lambda_{\text{ex}} = 590$ nm.

Für detailliertere Untersuchungen des Radikalsignals beziehen sich die nachfolgend gezeigten Abbildungen und Ergebnisse auf den Magnetfeldbereich, indem das Radikal zu beobachten war. Um eine höhere Auflösung des Radikalsignals zu erhalten, erfolgte eine Messung bei höheren Mikrowellenfrequenzen im Q-Band-Bereich. Das aus dieser Messung erhaltene Spektrum wird am Beispiel von ZnCe_6 und phBQ in wässriger Lösung in Abbildung 86 gezeigt. Nach einer Lichtanregung bei 220 K, bei der die Probe als viskose Lösung vorlag, wird in der gefrorenen Lösung bei 80 K ein Radikalsignal beobachtet, dessen Maximum einen g -Tensor von $g_{\text{eff}} = 2,0061$ aufweist. Durch den Vergleich mit literaturbekannten g -Tensoren für Chinone kann das Radikalsignal dem Radikalanion des Chinons zugeordnet werden (Hales, 1975; Burghaus et al., 1993).

Die Abbildung 86 zeigt weiterhin, dass bereits vor der Lichtanregung ein Radikalsignal zu beobachten ist. Dieses Signal entspricht dem Semichinon-Radikalanion, dass sich in einer alkalischen Pufferlösung bildet. Durch Lichtanregung bei 220 K vergrößert sich die Intensität des Radikalsignals um den Faktor von ≈ 8 , was auf einen Elektronentransfer hinweist. Das beobachtete Radikalsignal zeigt eine asymmetrische Linienform. Dies kann damit erklärt werden, dass das Radikalkation des Zinkchlorins, ${}^3\text{ZnCe}_6^{\bullet+}$, dessen Maximum sich bei einem g -Tensor von $g_{\text{eff}} = 2,0037$ befindet (Detektion des Signals s. u.), vom Radikalanion des Chinons überlagert wird. Daraus resultiert eine Linienbreite von 14 G. Auch das ZnCe_6 -maquette zeigt nach Zugabe von Chinon eine Intensitätszunahme eines Radikalsignals, dessen Maximum ebenfalls einem g -Tensor von $g_{\text{eff}} = 2,0061$ entspricht. Die Intensität des Radikalsignals vergrößert sich in diesem Fall im Vergleich zu dem bereits vorliegenden Semichinon-

Radikalanion vor der Lichtanregung allerdings nur um einen Faktor von ≈ 3 , was auf einen geringeren Elektronentransfer im Vergleich zu dem nicht peptidgebundenen Zinkchlorin hinweist. Im Q-Band Puls-EPR-Spektrum des Chinons ohne ZnCe_6 als Elektronendonator wurde bei gleichen Messbedingungen nach Laseranregung dagegen nur eine geringe Intensitätserhöhung des Radikalsignals ($< 2\%$) zum bereits vor der Lichtanregung vorhandenen Semichinon-Radikalanion beobachtet. Dieses Kontrollexperiment zeigt damit, dass in den oben beschriebenen Fällen ein lichtinduzierter Elektronentransfer von dem angeregten Zinkchlorin zum Chinon stattgefunden hat.

Eine Lichtanregung der Probe bei einer Temperatur von 80 K, bei der eine gefrorene Lösung vorlag, führte zu keiner Zunahme des Radikalsignals und gibt einen Hinweis darauf, dass in der gefrorenen Lösung kein Elektronentransfer stattfindet.

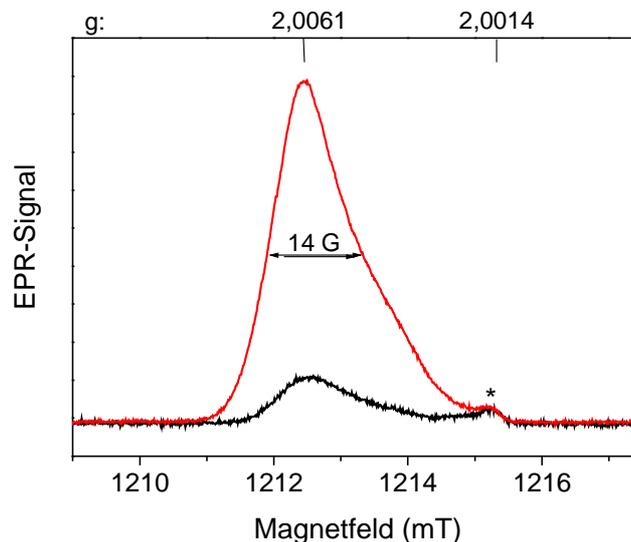


Abbildung 86: Q-Band Puls-EPR-Spektren von $220 \mu\text{M ZnCe}_6$ und Zugabe von $2,2 \text{ mM phBQ}$ ($\nu = 33,98 \text{ GHz}$) und in $25 \text{ mM Glycin-Puffer}$ (25 mM NaCl , $\text{pH } 10$; 60% Glycerin) vor (schwarz) und nach (rot) der Lichtanregung bei 220 K ; $\lambda_{\text{ex}} = 639 \text{ nm}$, Messtemperatur = 80 K . *Das Signal bei $g = 2,0014$ wird durch eine unbekannte paramagnetische Verunreinigung erzeugt, die nicht an dem Elektronentransfer beteiligt ist (keine Zu- und Abnahme der Radikalintensität nach Laseranregung).

Die Abhängigkeit des Radikalsignals von der Temperatur wurde zunächst durch X-Band CW-EPR-Messungen mit vielen Laserpulsen am Beispiel vom $\text{ZnCe}_6\text{-me-1}$ untersucht. Die Abbildung 87 zeigt, dass bei einer Temperatur von 220 K die Intensität des Radikalsignals vom bereits vorliegenden Radikalsignal des Semichinonanions um den Faktor von ≈ 8 zunimmt. Dagegen konnte bei einer Temperatur von 180 K nur ein Anstieg des Radikalsignals um den Faktor von ≈ 2 beobachtet werden. Damit ist die Radikalzunahme bei 220 K wesentlich höher als die bei 180 K und infolgedessen findet bei höheren Temperaturen

ein effizienterer Elektronentransferprozess statt. Dies kann damit erklärt werden, dass bei 180 K die Lösung fast vollständig in den gefrorenen Zustand übergegangen ist und ein Elektronentransferprozess kaum noch möglich ist.

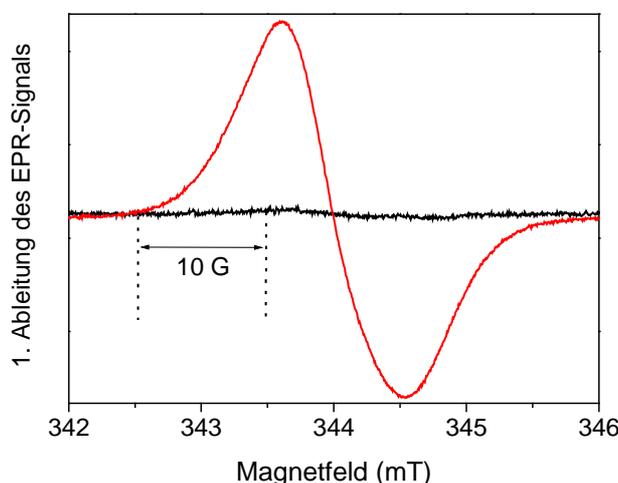


Abbildung 87: X-Band CW-EPR-Spektrum von 220 μM $\text{ZnCe}_6\text{-me-1}$ und 2,2 mM phBQ bei einer Temperatur von 220 K ($\nu = 9,65$ GHz) vor (schwarz) und nach (rot) der Belichtung (ca. 5 min mit einem Laser bei $\lambda_{\text{ex}} = 639$ nm, Laserleistung 12 mJ/Puls) in 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10, 60 % Glycerin).

Bestimmung der g -Tensoren für die Radikale bei maximaler Intensität

Die Existenz eines aus dem lichtinduzierten Elektronentransfer erzeugten Radikalkations des Zinkchlorins und eines Radikalanions des Chinons konnte durch Q-Band Puls-EPR-Messungen bei 10 K in der gefrorenen Lösung nachgewiesen werden, indem die Probe zuvor bei 220 K (in viskoser Lösung) durch Licht angeregt und die Messungen bei unterschiedlichen Zeitintervallen zwischen dem ersten Laserpuls des ersten Durchgangs und dem ersten Laserpuls des zweiten Durchgangs durchgeführt wurden. Anhand dieser Messungen wurden die g_{eff} -Tensoren der beiden Radikale bestimmt. Dies soll am Beispiel von $\text{ZnCe}_6/\text{phBQ}$ gezeigt werden (Abb. 88). Die Probe wurde bei 220 K belichtet und dann unter Bestrahlung auf eine Messtemperatur von 10 K gebracht, bei der die Probe im gefrorenen Zustand ist. Bei einer Zeit von 2,99 ms zwischen den beiden ersten Pulsen zweier Durchgänge ist im Spektrum das Radikalanion des Chinons zu beobachten. Wird das Zeitintervall zwischen den Pulsen verkürzt, so kann das Radikalkation des Zinkchlorins detektiert werden, dessen Maximum einen g -Tensor von $g_{\text{eff}} = 2,0037$ aufweist. Dieses Experiment beruht auf dem Relaxationseffekt. Bei kürzeren Zeitintervallen zwischen den Pulsen nimmt das Radikalanion aufgrund seiner im Vergleich zum Zinkchlorin-Radikalkation

langsameren Relaxation keinen stabilen Zustand ein und kann folglich nicht mehr detektiert werden. Der ermittelte g -Tensor des $\text{ZnCe}_6^{\bullet+}$ von $g_{\text{eff}} = 2,0037$ ist damit größer als die literaturbekannten g -Tensoren für die Radikalkationen in natürlichen Photosystemen ($g_{\text{eff}} = 2,0026$), (Klette et al., 1993). Eine Bestimmung der anisotropen g -Tensorhauptwerte in Abhängigkeit vom Feld ist aufgrund der geringen Auflösung der Spektren nicht möglich.

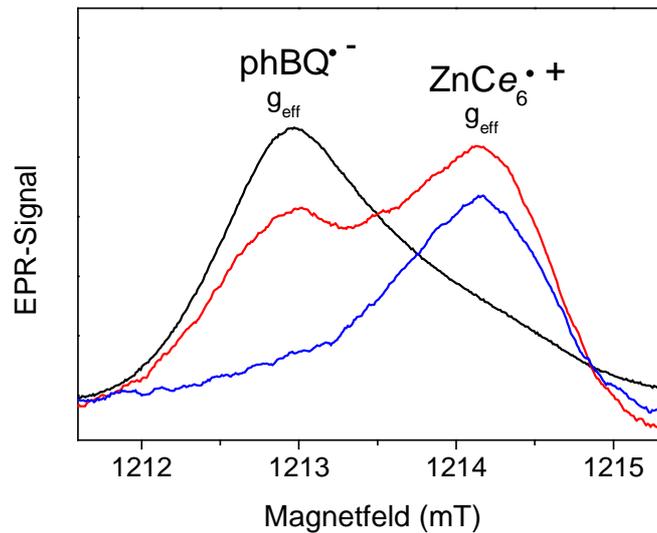


Abbildung 88: Q-Band Puls-EPR-Spektrum der $\text{ZnCe}_6^{\bullet+}$ - und $\text{phBQ}^{\bullet-}$ -Radikale als stationäres Radikalpaar nach Laseranregung in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen dem ersten Puls des ersten Durchgangs und dem ersten Puls des nachfolgenden Durchgangs (*shot repetition time, srt*) ($srt = 2,99$ ms (schwarz), $srt = 1,00$ ms (rot), $srt = 0,5$ ms (blau)) bei einer Temperatur von 10 K; $\nu = 33,92$ GHz; 1. Puls: 40 ns, 2. Puls: 80 ns; $\tau = 300$ ns; $\lambda_{\text{ex}} = 639$ nm. Die Spektren sind durch 10 Punkte geglättet.

Erzeugung des Radikalpaares in Abhängigkeit von der Temperatur und der Konzentration des Elektronenakzeptors

Am Beispiel von ZnCe_6 - phBQ wird nachfolgend der lichtinduzierte Aufbau bzw. die Abnahme des Tripletradikalpaarsignals bei einem konstanten Magnetfeld von $B = 344$ mT (im X-Band) in Abhängigkeit von der Temperatur und der Chinonkonzentration dargestellt. Die Abbildung 89 zeigt das aufgenommene EPR-Signal nach dem Ein- und Ausschalten des Lasers bei Temperaturen von 220 und 200 K. Nach der Laseranregung der Probe wird ein Anstieg der Radikalintensität beobachtet, der aus der Erzeugung des Tripletradikalpaars $^3(\text{ZnCe}_6^{\bullet+}\text{-phBQ}^{\bullet-})$ resultiert. Aus der Steigung des Radikalsignalaufbaus ist zu entnehmen, dass bei 220 K im Vergleich zu 200 K ein höherer Anteil an Radikalen erzeugt wird. Analog ist eine schnellere Abnahme des Radikalsignals bei höheren Temperaturen nach dem Abschalten des Lichts zu beobachten. Die Abnahme des Radikalpaarsignals von $^3(\text{ZnCe}_6^{\bullet+}\text{-phBQ}^{\bullet-})$ erfolgt bei 220 K mit einer zweiphasigen Kinetik mit Zerfallszeiten von

$\tau_{\text{Zerfall-1}} = 18 \text{ s}$ und $\tau_{\text{Zerfall-2}} = 73 \text{ s}$ (Tab. 18). Bei 200 K erfolgte mit einem 84 %igen Anteil einer einphasigen Kinetik der Abbau des Radikalpaarsignals innerhalb von 649 s, während bei 180 K nur noch eine einphasige Kinetik zu 100 % zu beobachten war. Bei einer Temperatur von 220 K ist die Probenlösung weniger viskos und noch flüssig im Vergleich zu der hochviskosen Probe bei 200 K. Dadurch liegt bei 220 K eine höhere Molekularbewegung vor und die Radikale können schneller rekombinieren oder auseinander diffundieren und abreagieren. Dies hat eine schnellere Abnahme des Radikalpaarsignals zur Folge. Bei niedrigen Temperaturen ist die Molekularbewegung durch das zunehmend viskosere Lösungsmittel bzw. durch die fast gefrorene Lösung bei 180 K eingeschränkt. Infolgedessen ist bei 180 K primär nur noch ein geringer Elektronentransfer (Aufbau des Radikalpaarsignals) und ein langsames Abreagieren des Radikalpaarsignals nach dem Ausschalten des Lichts zu beobachten. Peptidgebundenes ZnC_{e_6} , zu dem ein 10facher molarer Überschuss an Chinon zugegeben wurde, zeigte bei 220 K im Vergleich zu dem freien Pigment und gleicher Chinonkonzentration einen geringfügig schnelleren Zerfall des Radikalsignals, dessen Anteile bei 70 % (me-1) und 79 % (me-6) lagen (Tab. 18).

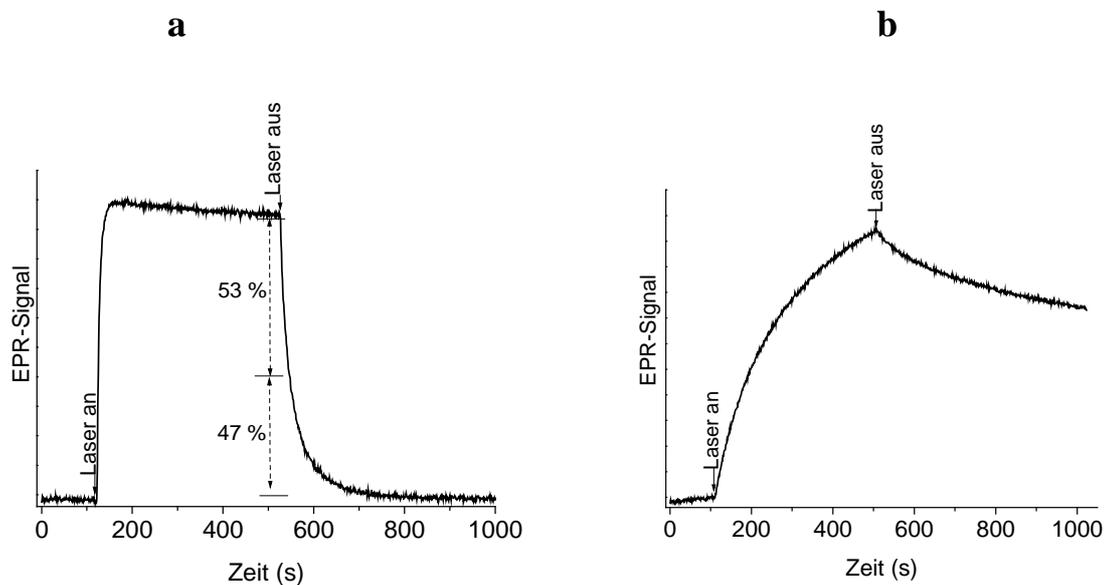


Abbildung 89: Bildung- und Zerfallskinetiken durch Anwendung der X-Band CW-EPR-Spektroskopie von $220 \mu\text{M}$ ZnC_{e_6} und $2,2 \text{ mM}$ phBQ in 25 mM Glycin (100 mM NaCl, pH 10) und 60% Glycerin bei (a) $T = 220 \text{ K}$ (flüssige, viskose Lösung) und (b) $T = 200 \text{ K}$ (hoch viskose Lösung); $B = 344 \text{ mT}$, $\lambda_{\text{ex}} = 639 \text{ nm}$. Die Prozentangaben in (a) beziehen sich auf die Amplituden, die aus dem langsamen und schnellen Zerfall ermittelt wurden.

Tabelle 18: Zerfallszeiten τ_{Zerfall} des Radikalsignals in Abhängigkeit von der Konzentration an phBQ und der Temperatur. Die Zerfallszeiten und deren Fehler wurden aus der Gleichung für eine ein- oder zweiphasige exponentielle Abnahme des Radikalsignals und deren Anpassung an die Messpunkte erhalten. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Amplituden, die aus dem langsamen und schnellen Zerfall ermittelt wurden.

Systeme und molares Verhältnis	τ_{Zerfall} (s), T = 220 K	τ_{Zerfall} (s), T = 200 K	τ_{Zerfall} (s), T = 180 K
ZnCe ₆ ^{•+} - phBQ ^{•-} 1 : 10	18 (±1) 53 %	67 (±6) 16 %	223 (±32) 100 %
	73 (±1) 47 %	649 (±57) 84 %	
ZnCe ₆ ^{•+} - phBQ ^{•-} 1 : 100	55 (±3) 33 %	44 (±1) 49 %	—
	314 (±15) 67 %	422 (±24) 51 %	
ZnCe ₆ ^{•+} - me-1 - phBQ ^{•-} 1 : 10	6 (±0,1) 79 %	—	630 (±42) 100 %
	70 (±2) 21 %		
ZnCe ₆ ^{•+} - me-6 - phBQ ^{•-} 1 : 10	4 (±0,1) 70 %	—	790 (±50) 100 %
	97 (±2) 30 %		

Die Bestimmung eines zweiphasigen Abbaus des Signals resultiert aus der Rekombination bzw. der Abreaktion der Radikale, die bei der zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie bei Raumtemperatur nicht beobachtet werden konnte. Die Messungen zeigten zudem, dass das molare Verhältnis von Zinkchlorin zu Chinon mit 1:10 den höchsten Gehalt an Radikalsignal ergab. Der zehnfache Überschuss an Chinon und die damit vorliegende Nähe zum Pigment sorgt auch dafür, dass der Einfluss der Pigment-Pigment-Wechselwirkung bei den freien Zinkchlorinen auf das EPR-Spektrum als gering angenommen werden kann. Molare Verhältnisse von 1:1 bzw. 1:100 zwischen dem Donator- und dem Akzeptormolekül erzeugten ein geringeres EPR-Signal. Die Ergebnisse lassen damit folgende Annahme zu: Bei einer zu geringen Chinonkonzentration treffen innerhalb einer bestimmten Zeit eine kleinere Anzahl an Donator- und Akzeptormolekülen in einem für den Elektronentransfer günstigen Abstand und geeigneter Orientierung aufeinander, während ein Überschuss an Chinonen durch gegenseitige sterische Hinderung der Chinon-Moleküle untereinander den Elektronentransfer verlangsamt.

Die hier beobachteten Zeitkonstanten im Sekundenbereich für den Auf- und Abbau des Tripletradikals zeigen, dass geringe Temperaturen und das viskose Lösungsmittel den Elektronentransfer deutlich verlangsamen. Im Vergleich dazu lag die beobachtete Zeitskala bei den Absorptionmessungen bei RT und ohne Glycerinzusatz im μs -Bereich.

Detektion des Radikalpaarsignals im transienten EPR-Spektrum

Das aus dem Triplettzustand generierte Radikalpaar aus dem me-6-gebundenen $ZnCe_6$ -Radikalkation und dem Radikalanion des Chinons kann auch im transienten EPR-Spektrum beobachtet werden. Diese im X-Band und Q-Band aufgenommenen EPR-Spektren sind in Abbildung 90 gezeigt.

Die transienten EPR-Messungen ergaben ein Radikalsignal von geringer Intensität, wenn phBQ anstelle von BQ verwendet wurde. Aufgrund der ähnlichen Halbstufenpotentiale der beiden Chinone kann diese Beobachtung nicht darauf zurückgeführt werden, dass das BQ einen besseren Elektronenakzeptor darstellt, der die Elektronen schneller aufnimmt. Allerdings kann die sterische Phenylgruppe des phBQ dazu führen, dass dieses Chinon im beobachteten Zeitraum des transienten EPR-Spektrums nicht in dem Maße in die Nähe des Zinkchlorins gelangt, wie es ein effizienter Elektronentransfer erfordert und infolgedessen das Radikalsignal eine geringere Intensität aufweist.

Die Beobachtung eines Tripletttradikalpaares neben dem Triplettzustand des Zinkchlorins im transienten EPR-Spektrum konnte nur bei $ZnCe_6$, das an me-6 gebunden vorlag, beobachtet werden und trat nicht bei den freien Pigmenten oder bei der Einlagerung des Pigments in me-1 auf. Für diese Beobachtung kann bislang keine Erklärung gefunden werden, da in den anfänglich beschriebenen Puls-EPR-Messungen und cw-EPR-Experimenten durch An- und Ausschalten des Lasers in allen untersuchten Systemen Radikale erzeugt wurden und damit ein Elektronentransfer nachgewiesen werden konnte. Die zeitaufgelösten Absorptionsmessungen ergaben ebenfalls sowohl bei den freien als auch peptidgebundenen Zinkchlorinen eine Löschung des Triplettzustands durch Chinone und folglich eine Elektronentransferreaktion.

Abschließend soll erwähnt werden, dass es sich bei allen angegebenen Parametern aus den Triplettzuständen um statistische Mittelwerte handelt, da in den Vier-Helix-Bündeln jeweils zwei Kofaktoren eingelagert sind, die nicht den gleichen Triplettzustand aufweisen müssen. Des Weiteren kann das Chinon mit beiden Kofaktoren, die im Peptid eingelagert sind, eine unterschiedliche Wechselwirkung eingehen.

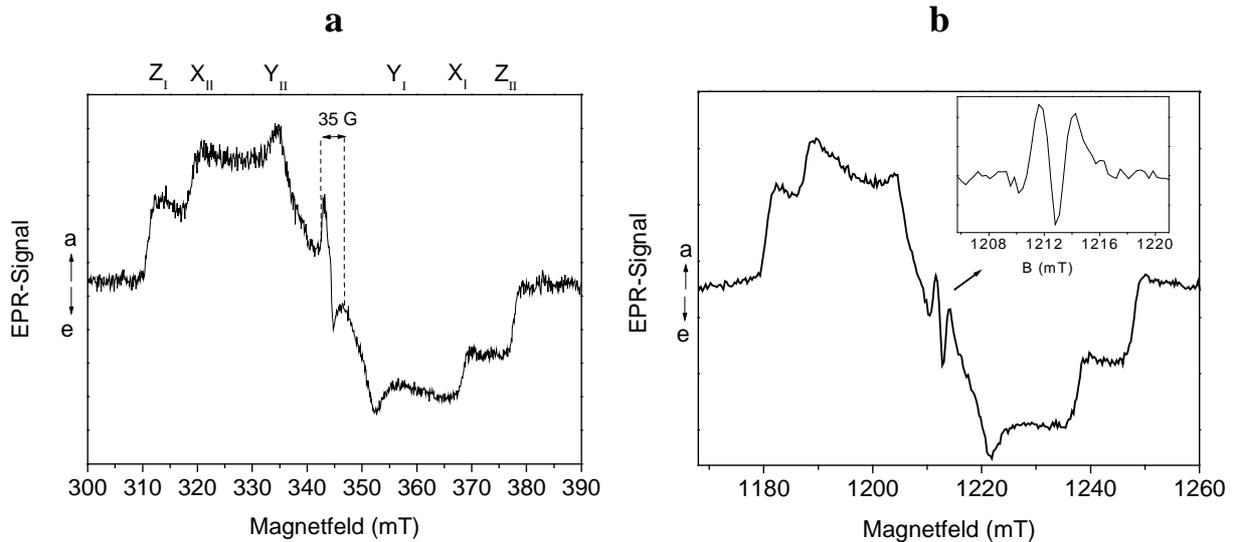


Abbildung 90: (a) Transiente X-Band ($\nu = 9,65$ GHz) und (b) Q-Band ($\nu = 33,91$ GHz)-EPR-Spektren von ${}^3\text{ZnCe}_6\text{-me-6-BQ}$ in 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10)/Glycerin (2:3, v/v) bei $T = 200$ K, $\lambda_{\text{ex}} = 639$ nm. Die Einfügung in (b) hebt den Bereich des Radikalpaarsignals hervor, der basislinienglättet wurde.

Zeitaufgelöste Detektion des Radikalpaarsignals

Die zeitabhängige Transient-EPR-Messung ergab, dass das Triplettsignal nach ≈ 15 μs fast vollständig abgebaut ist, während das Radikalsignal nicht an Intensität abnimmt (Abb. 91a).

Die Spektrenaufnahme zwischen Magnetfeldern von $B = 1209 - 1216$ mT zeigt die zeitabhängige Änderung des Radikalsignals (Abb. 91b). Bei einer Integrationszeit von 0,2 μs liegt ein Polarisationsmuster von *aeae* vor, das sich innerhalb einer μs zu einem *eaea*-Polarisationsmuster ändert. Die Entwicklung der Polarisation entsteht durch Singulett-Triplett-Mischung innerhalb des Radikalpaares, wodurch die ursprünglich reinen Triplettzustände Singulettcharakter annehmen. Da die Rekombination des Radikalpaars nur aus dem Singulettzustand spinerlaubt ist, rekombinieren die einzelnen Triplettunterzustände aufgrund ihres bereits unterschiedlichen Gehalts an Singulettcharakter verschieden schnell. Aus dieser unterschiedlichen Entvölkerung der Triplettunterzustände in den Grundzustand resultiert das sich ändernde Polarisationsmuster während der Messung.

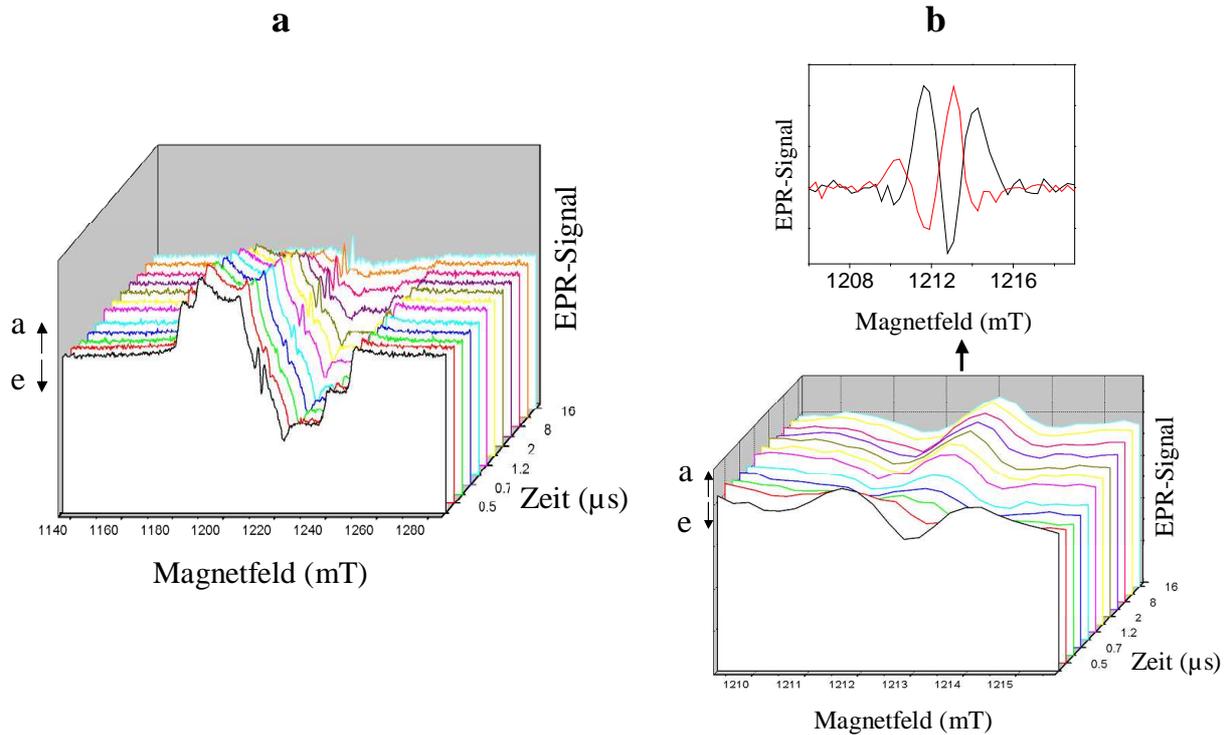


Abbildung 91: Transiente Q-Band 2D-EPR-Spektren von $\text{ZnCe}_6\text{-me-6}$ und dem Radikalpaar ${}^3(\text{ZnCe}_6^{\bullet+}\text{-BQ}^{\bullet-})$ in 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10) und 60 % Glycerin bei $T = 200$ K und $\nu = 33,91$ GHz, $\lambda_{\text{ex}} = 639$ nm; (a) $B = 1140 - 1290$ mT und (b) $B = 1209 - 1216$ mT in Abhängigkeit von der Integrationszeit. In (b) sind oben die Spektren vom Radikalpaar bei $0,4$ μs (schwarz) und 4 μs (rot) herausgestellt, um die Änderung des Polarisationsmusters zu verdeutlichen.

Im Unterschied zum Elektronentransfer aus dem angeregten Singulettzustand in natürlichen bakteriellen oder pflanzlichen Photosystemen entstand das in dieser Arbeit charakterisierte Radikalpaar, wie auch in vielen anderen photosynthetischen Modellsystemen, aus dem Triplettzustand (z. B. Castelli et al., 1979; Fahnenschmidt, 2001; Kiwi und Grätzel, 1980; Levanon und Möbius, 1997). Durch die Absorptionsspektroskopie konnte gezeigt werden, dass die *de novo* synthetisierten Peptide in der Lage sind, die Pigmente von den Chinonen abzuschirmen, so dass es zu keiner Komplexbildung kommt. Allerdings wurde bei den peptidgebundenen Zinkchlorinen im Vergleich zu den freien Pigmenten ein vierfach langsamerer Elektronentransfer vom Zinkchlorin zum Chinon beobachtet. Um einen effizienteren Elektronenaustausch und vielleicht auch die Bildung eines Singulett-radikal-paares zu erzeugen, müsste die Peptidsequenz bzw. -struktur zukünftig so verändert werden, dass sich die Donator- und Akzeptormoleküle in einer definierten Lage zueinander anordnen. Auch die Wahl des Lösungsmittels und die Temperatur ist entscheidend, um eine maximale Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers zu erhalten. Diese wird nach der Marcus-Theorie maximal, wenn $-\Delta G_0 = \lambda$ entspricht und damit die freie Aktivierungsenthalpie des Elektronentransfers ΔG^\ddagger den Wert Null annimmt (Kap. 3.4).

5.3 Artificielle Peptide und ihre Wechselwirkung mit Kofaktoren als Modell natürlicher bakterieller Lichtsammelkomplexe

Wie im Kapitel 1.8 beschrieben, sind die Lichtsammelkomplexe der Purpurbakterien aus Untereinheiten aufgebaut, die sich aus zwei hydrophoben Peptidsträngen (α - und β -Peptid), drei BChla-Molekülen und zwei Carotinoiden zusammensetzen (Law et al., 2004). Je nach Gattung ist die Anzahl der zusammenlagernden Untereinheiten verschieden, die den ringförmigen LH-Komplex ausbilden. Bislang sind in der mir zugänglichen Literatur neben der Charakterisierung der natürlichen Systeme nur Rekonstitutionen von LH-Komplexen bekannt, bei denen mindestens ein Peptid aus dem natürlichen System isoliert wurde (Parkes-Loach et al., 2004). Allerdings ist bereits eine Darstellung einer Lichtsammelkomplexuntereinheit aus vollständig chemisch synthetisierten Peptiden gelungen, deren Sequenzen aber nicht denen der natürlichen LH-Peptide entsprechen und bei diesem System wurde auch keine Ringstruktur aus mehreren Untereinheiten beobachtet (Noy und Dutton, 2006). Eine detaillierte Untersuchung der Wechselwirkung von artifiziellen Peptiden mit den Kofaktoren BChla und Lutein, deren Peptidsequenzen denen der natürlichen Peptide aus den LH-Komplexen von *Rb. sphaeroides* entsprechen, wurde somit bislang noch nicht durchgeführt. Während die Peptide sph α 31 und sph β 31 nur einen Teilbereich von 31 Aminosäuren aus den natürlichen LH1-Komplex darstellen, sind die *de novo* synthetisierten Peptide sph α 54- und sph β 50-Peptide mit der Sequenz der natürlichen Peptide aus dem LH2-Komplex in voller Länge identisch (Abb. 92). Die Peptide konnten allerdings – durch die in Kap. 4.1.1 beschriebene Synthese – nur mit einer sehr geringen Ausbeute von <0,2 % hergestellt werden. Dies ist vermutlich auf die stark hydrophobe Aminosäuresequenz zurückzuführen.

α- und β-Peptid des LH1-Komplexes von <i>Rb. sphaeroides</i>	
sphα31	<u>D</u> PRRVFVAQGVFL <u>FLLAVMIHLILL</u> STPSYN
α (nativ; NCBI: Q3J1A4)	MSKFKYKIWMIF <u>D</u> PRRVFVAQGVFL <u>FLLAVMIHLILL</u> STPSYNWLEISAAYNRVAVAE
sphβ31	ELHSVYMSGLWLFSAVAIVAH <u>LAVYIWRPWF</u>
β (nativ; PDB: 1DX7)	ADKSDLGYTGLTDEQAQ <u>ELHSVYMSGLWLFSAVAIVAH</u> LAVYIWRPWF
α- und β-Peptid des LH2-Komplexes von <i>Rb. sphaeroides</i>	
sphα54 (= nativ; NCBI: AAA26131)	MTNGKIWLVVKPTVGVPLFLSAAVIA <u>SVVIHAAVLT</u> TTTTWLPAYYQGSAAVAAE
sphβ50 (= nativ; NCBI: AAA26130)	(M)TDDLKQVWPSGLTVAEAEVHKQILGTRVFGGMALIAHFLAAATPWLG

Abbildung 92: Aminosäuresequenzen der nativen und der *de novo* synthetisierten Peptide der LH1- und LH2-Komplexe von *Rb. sphaeroides*. Die unterstrichenen Aminosäuren geben den Bereich des hydrophoben Kerns an.

Die Identifizierung der Peptide erfolgte durch MALDI-TOF- oder ESI-MS (Tab. 5) und soll beispielhaft für das sph β 50-Peptid gezeigt werden (Abb. 94).

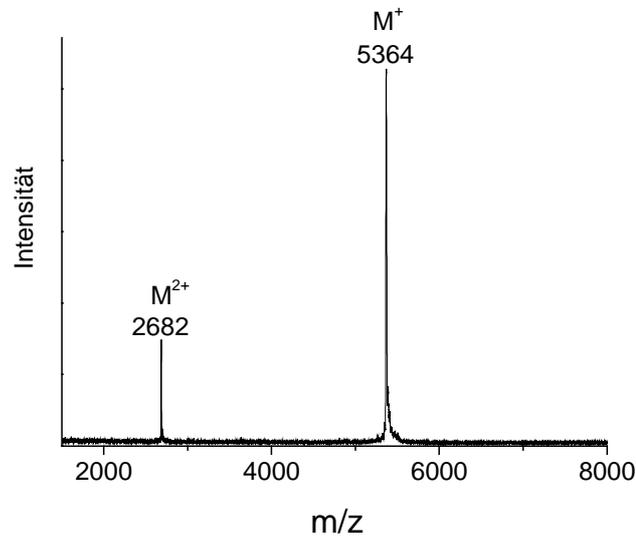


Abbildung 93: MALDI-TOF-Massenspektrum von sph β 50.

5.3.1 NMR-Spektroskopie an einem *de novo* synthetisierten LH-Peptid

Das Peptid sph β 31 wurde für eine NMR-spektroskopische Untersuchung zur Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur verwendet. Das gesamte natürliche β -Peptid aus dem LH1-Komplex konnte 1999 erstmalig mittels NMR charakterisiert werden und ergab eine α -helikale Sekundärstruktur (Kikuchi et al., 1999). Die nachfolgend aufgeführten NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden von Dr. P. Schmieder vom Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (Berlin) gemessen und ausgewertet. Vom sph β 31-Peptid wurde ein gut aufgelöstes ¹H-NMR-Spektrum mit schmalen Linienbreiten erhalten (Abb. 94). Im ppm-Bereich von 1 – 2 liegen die aliphatischen Protonen der Aminosäureseitenketten. Die Protonen des C $_{\alpha}$ -Atoms befinden sich zwischen 3,2 und 4,9 ppm, während die Signale der Amid-Protonen und Protonen aromatischer Aminosäurereste zwischen 6,5 und 9 ppm im Spektrum zu beobachten sind. Die Indol-Protonen der drei Tryptophane in sph β 31 liegen zwischen 10 und 11 ppm.

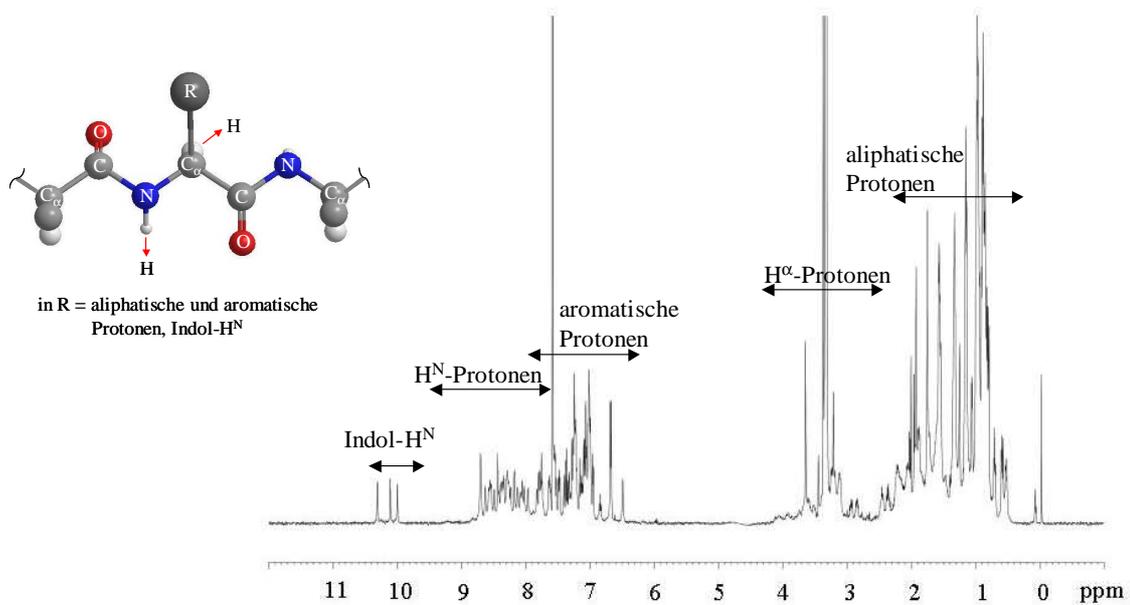


Abbildung 94: 1H -NMR-Spektrum von 320 μM sph β 31 in $CDCl_3/CD_3OH$ (1:1, v/v), Resonanzfrequenz = 600 MHz, $T = 300K$.

Anhand von NOESY- und TOCSY-Aufnahmen wurden Informationen über die H^N - H^α -Korrelationen in den Amidregionen erhalten. Durch die NOESY-Messungen wurden die gekoppelten Protonen der Aminosäure i und $(i-1)$ detektiert, während im TOCSY nur die Protonen-Kopplungen derselben Aminosäure zu beobachten sind und damit das Spinsystem bestimmt werden kann. Der Abstand vom H^N zum H^α innerhalb einer Aminosäure ist immer kurz genug für einen NOE. Das gleiche gilt für den Abstand vom H^N zum H^α der Aminosäure $(i-1)$ und auch – mit Einschränkungen – für den Abstand vom H^N zum H^β der Aminosäure $(i-1)$. Damit können für jedes H^N mindestens zwei Signale im Spektrum beobachtet werden: eines zum H^α der gleichen Aminosäure und eines zum H^α der in der Sequenz vorangehenden Aminosäure: Durch die NOESY- und TOCSY-Aufnahmen in der Amidregion des sph β 31-Peptids und der Detektion der H^N - H^α -Korrelationen gelang es, die Protonensignale den einzelnen Aminosäuren zuzuordnen (Abb. 95). Die NOESY-Aufnahme bezüglich der H^N - H^N -Kopplungen gab eine Information über die Sekundärstruktur des Peptids. Aus den Kreuzsignalen benachbarter Amidprotonen konnte die Struktur einer α -Helix nachgewiesen werden, die erst an Position 29 durch das Prolin unterbrochen wird (Abb. 96). Damit wurde gezeigt, dass die Verkürzung der natürlichen Peptidsequenz keine Auswirkungen auf die Sekundärstruktur hat und analog zum natürlichen β -Peptid des LH1-Komplexes von *Rb. sphaeroides* eine α -Helix vorliegt. Die aufgenommenen Spektren zeigen erstmalig die Anwendung der NMR-Spektroskopie an einem artifiziellen Peptid eines LH-Komplexes, das durch chemische Peptidsynthese hergestellt wurde.

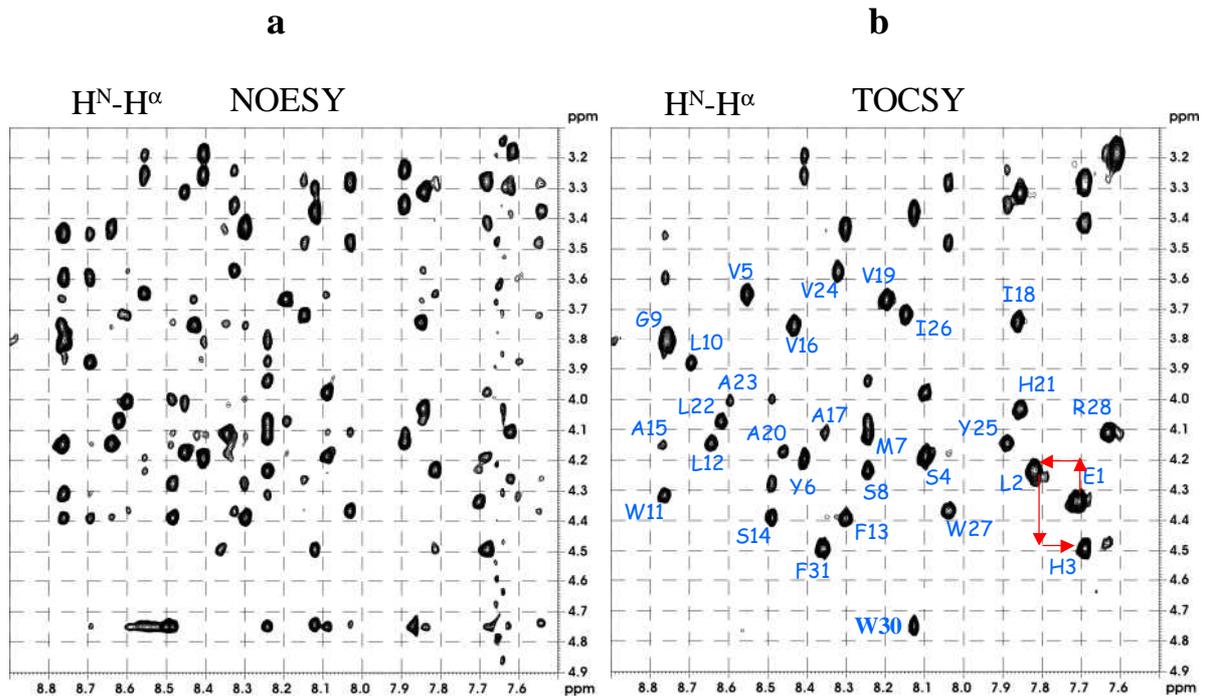


Abbildung 95: (a) NOESY- und (b) TOCSY-NMR-Spektren der H^N - H^α -Region von sph31 und Zuordnung der Protonensignale zu der entsprechenden Aminosäure der Sequenz.

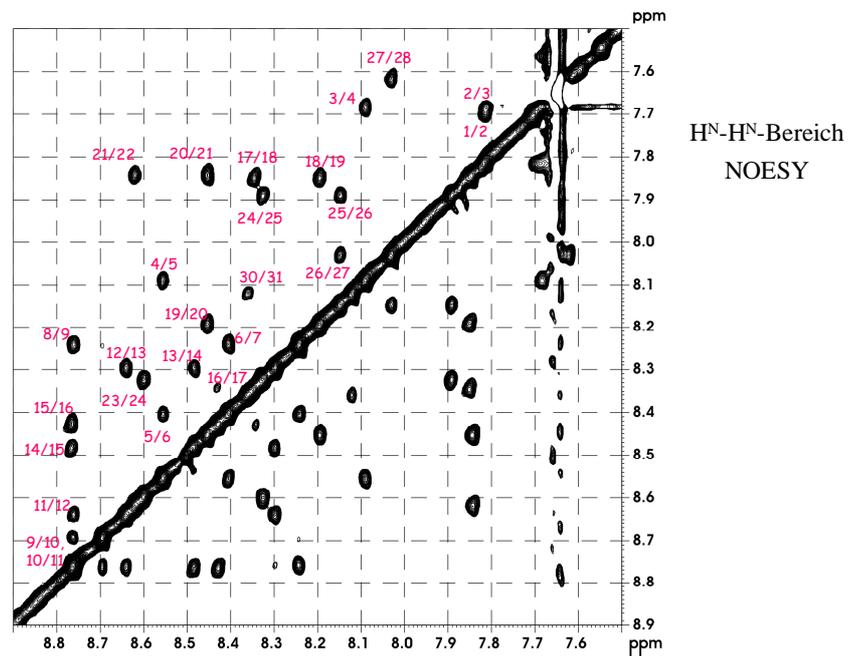


Abbildung 96: NOESY-Spektrum mit H^N - H^N -Korrelationen von sph31 und deren Zuordnung zu den entsprechenden Aminosäuren. Beim Vorliegen einer α -Helix sind von benachbarten Aminosäuren Kreuzsignale im Spektrum zu beobachten. Das Prolin (Position 29 in sph31) ist im Spektrum nicht zu detektieren und zeigt, dass es die Helixstruktur unterbricht.

5.3.2 Sekundärstruktur der artifiziellen LH-Peptide in einer Detergenlösung

Durch die Aufnahme von Zirkulardichroismus-Spektren des natürlichen LH1 β -Peptids in organischen Lösungsmitteln und in Micellen-bildenden Detergenzien war bekannt, dass in beiden Lösungen eine Helixstruktur vorlag (Kikuchi et al., 1999). Es wurde ein α -Helix-Anteil von 60 % (Kikuchi et al., 1999) bzw. von 65 % (Cogdell und Scheer, 1985) angegeben. Dies sollte auch für das artifizielle sph β 31-Peptid überprüft werden. So wurde seine Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Detergenkonzentration durch CD-Spektroskopie untersucht. Die Abbildung 97 zeigt, dass bei einer Konzentration von 4,5 % OG in der Pufferlösung das Peptid keine definierte Struktur aufweist. Dagegen wird der größte α -helikale Anteil von 65 (± 5) % (berechnet nach Gl. 3.1.4.1) bei einer OG-Konzentration von 0,9 % erhalten. Analog zum Ergebnis der NMR zeigt das artifizielle und kürzere sph β 31 damit keine Abweichungen vom nativen β -Peptid des LH1-Komplexes. Von den anderen drei *de novo* synthetisierten Peptiden wurde ebenfalls der größte α -Helix-Anteil bei einer Detergenkonzentration von 0,9 % ermittelt, obgleich für die Rekonstitution einer LH-Untereinheit als optimaler Wert eine OG-Konzentration von 0,66 % angegeben wird (Meadows et al., 1995).

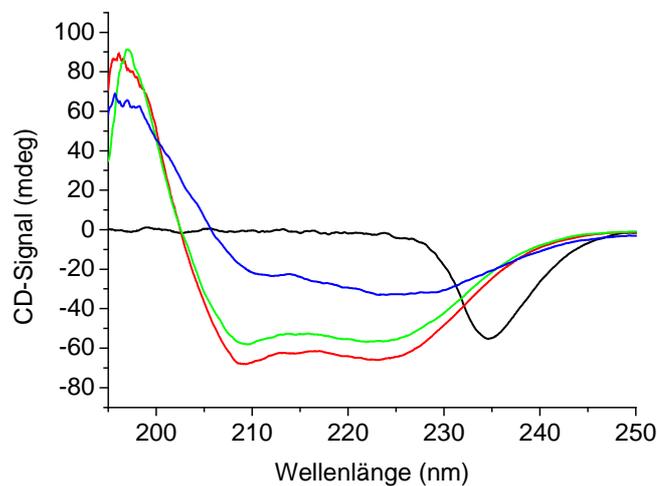


Abbildung 97: Zirkulardichroismusspektren von 50 μ M sph β 31 in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (5 mM MgSO_4 , pH 7,8) und 4,5 % OG (schwarz), 0,9 % OG (rot), 0,78 % OG (grün) und 0,66 % OG (blau).

5.3.3 Darstellung der Kofaktoren und Isolierung des natürlichen LH2-Komplexes aus *Rb. sphaeroides* WT

Das zur Untersuchung der Peptid-Kofaktor-Wechselwirkung verwendete BChla wurde, wie bereits im Kapitel 5.2.1 angegeben, aus *Allochrodatum vinosum* gewonnen. Als Carotinoid wurde Lutein zur Charakterisierung der Peptid-Kofaktor-Wechselwirkung gewählt, da es leicht zugänglich ist und aufgrund seiner zwei Hydroxylgruppen im Vergleich zum β -Carotin geringfügig hydrophiler ist (Strukturen s. Abb. 14). Das Lutein wurde aus *Spinacia oleracea* L. durch eine Petrolether/Methanol-Extraktion isoliert und durch Säulenchromatographie und anschließende HPLC aufgereinigt (Kap. 4.2.10). Das Absorptionsspektrum von Lutein ist in Abbildung 98a gezeigt.

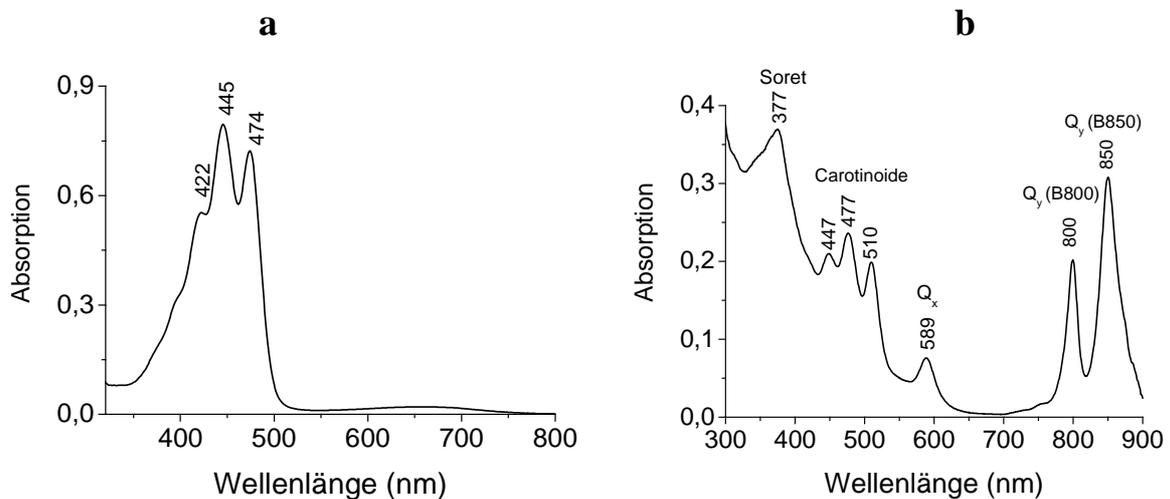


Abbildung 98: Absorptionsspektren von (a) 6 μ M Lutein in Ethanol und vom (b) LH2-Komplex von *Rb. sphaeroides* WT in 20 mM Tris/HCl (300 mM NaCl, 0,1 % LDAO, pH 8).

Für die nachfolgenden spektroskopischen Untersuchungen der artifiziellen Peptide und deren Wechselwirkung mit den Kofaktoren wurde das native LH2-System aus *Rb. sphaeroides* WT als Vergleichsprobe isoliert (s. Kap. 1.8 und 4.3.6). Das zugehörige Absorptionsspektrum ist in Abbildung 98b dargestellt und entspricht dem literaturbekannten Absorptionsspektrum des LH2-Komplexes von *Rb. sphaeroides* (Bandilla et al., 1998). Der Wildtyp enthält neben dem LH2-Komplex auch den LH1-Komplex, dessen Q_y-Bande bei 875 nm absorbiert. Durch den geringen Anteil dieses Komplexes in der vorliegenden, isolierten Probe werden seine Absorptionsbanden vollständig von denen des LH2-Komplexes überlagert.

5.3.4 Spektroskopische Untersuchungen zur Wechselwirkung artifiziieller LH-Peptide mit BChla und Lutein

Die Versuchsvorschrift zur Darstellung eines artifiziiellen LH-Komplexes (Kap. 4.3.7) ist der Durchführung zur Rekonstitution natürlicher LH-Systeme angelehnt (Davis et al., 1995; Loach und Parkes-Loach, 1995). Die Absorptions- und CD-Spektren von BChla in der verwendeten Detergenlösung, des artifiziiellen sowie des natürlichen LH-Komplexes sind in Abbildung 99 gezeigt. Für die spektroskopische Charakterisierung konnten nur Untersuchungsmethoden eingesetzt werden, bei denen eine geringe Probenkonzentration für die Messung ausreicht. Bei hohen Pigment-Peptidkonzentrationen trat, trotz des Zusatzes eines Detergens, sowohl eine Fällung der Peptide als auch eine Aggregation der BChla-Moleküle auf, die sich am Boden des Reaktionsgefäßes ablagerten.

Die Absorptionsspektren des artifiziiellen "Komplexes" und die von BChla in der gepufferten Detergenlösung zeigen im Vergleich zu dem des nativen LH2-Komplexes breitere Banden. Dies ist auf eine Aggregation durch Wasseranlagerung an den Pigmenten zurückzuführen, die in dem natürlichen System durch definierte Pigment-Peptid- und Pigment-Pigment (BChla-Dimer)-Anordnung nicht vorliegt. BChla absorbiert nach der Wechselwirkung mit den *de novo* synthetisierten $\text{spha}31$ und $\text{sph}\beta 31$ bei 783 und 868 nm. Das gleiche Experiment mit den *de novo* synthetisierten LH2-Peptiden ergab ein entsprechendes Spektrum, bei dem lediglich die relativen Intensitäten der beiden Q_y -Banden unterschiedlich waren (hier höhere Absorption bei 783 nm). Eine literaturbekannte Formierung zu einer Untereinheit des LH-Komplexes mit einer Absorption bei 820 nm wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet (Meadows et al., 1998, Nango et al., 2002). Auch das Absorptionsspektrum von BChla in der Micellen-bildenden Detergenlösung ohne Peptideinfluss wies die gleichen Bandenlagen wie unter Peptideinwirkung auf. Die Rotverschiebung der monomeren Q_y -Bande, die im organischen Lösungsmittel bei 770 nm absorbiert, wird durch Wasseranlagerung am Pigment infolge einer Aggregation zu 865 nm bathochrom verschoben (Abb. 99a), (Katz, 1994). Durch ein Verdünnen der Lösung nahm der Anteil an monomer vorliegendem BChla mit einer Absorption bei 783 nm in wässriger Lösung zu und die Absorption bei 865 nm ab. Die Absorptionseigenschaften von BChla im Detergens führen dazu, dass sich das Spektrum mit Ausnahme der Linienbreite nicht wesentlich von den LH2-Antennensystemen der Purpurbakterien unterscheidet (Katz et al., 1976). Aufgrund der Ähnlichkeit der Spektren von BChla mit und ohne Peptideinfluss kann folglich anhand der UV-Vis-Spektroskopie keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Wechselwirkung der Pigmente mit den artifiziiellen Peptiden stattfindet oder nicht; demzufolge waren weitere spektroskopische

Charakterisierungen erforderlich. Nachfolgend sollen somit die Ergebnisse, die über den Zirkulardichroismus der Pigmente als ergänzende Untersuchungsmethode erhalten wurden, dargestellt werden.

Die Zirkulardichroismusspektren zeigen, dass eine Verschiebung des CD-Signals in der Q_y -Bande von BChla erfolgt, wenn die *de novo* synthetisierten Peptide mit BChla wechselwirken (Abb. 99b). Die Signale des Luteins können im Spektrum allerdings nicht beobachtet werden. Das CD-Spektrum des isolierten nativen LH2-Komplexes, das mit dem von Bandilla et al. publizierten Spektrum übereinstimmt, zeigt dagegen eine aufgespaltene Soretbande, einen positiven Zirkulardichroismus in den Carotinoïdbanden und eine aufgrund excitonischer Wechselwirkung aufgespaltene Q_y -Bande, deren Vorzeichen umgekehrt von den CD-Signalen des BChla ohne und mit Peptideinwirkung ist und zudem hypsochrom verschoben vorliegt (Bandilla et al., 1998). Der Nulldurchgang der Doppelbande im Q_y -Bereich des nativen LH2-Komplexes liegt bei 850 nm und entspricht damit dem Absorptionsmaximum der Q_y (B850)-Bande. Der Nulldurchgang von BChla in der gepufferten Detergenlösung befindet sich bei 856 nm und verschiebt sich durch die Wechselwirkung mit den Peptiden und Lutein zu 871 nm. Eine detaillierte Auswertung des CD-Spektrums kann bis dato nicht gegeben werden, da zu geringe strukturelle Daten von der Wechselwirkung der artifiziellen Peptide mit den Kofaktoren bekannt sind und ein CD-Spektrum von vielen Faktoren abhängig ist. Dennoch zeigt die Anwendung der Zirkulardichroismus-Spektroskopie, dass der artifizielle Peptidkomplex nicht die gleiche Struktur und Anordnung der Pigmente aufweist wie das natürliche Antennensystem, aber ein anderes CD-Spektrum als das peptidfreie BChla beobachtet wird und damit auf eine Wechselwirkung zwischen den Kofaktoren und den Peptiden hingewiesen wird.

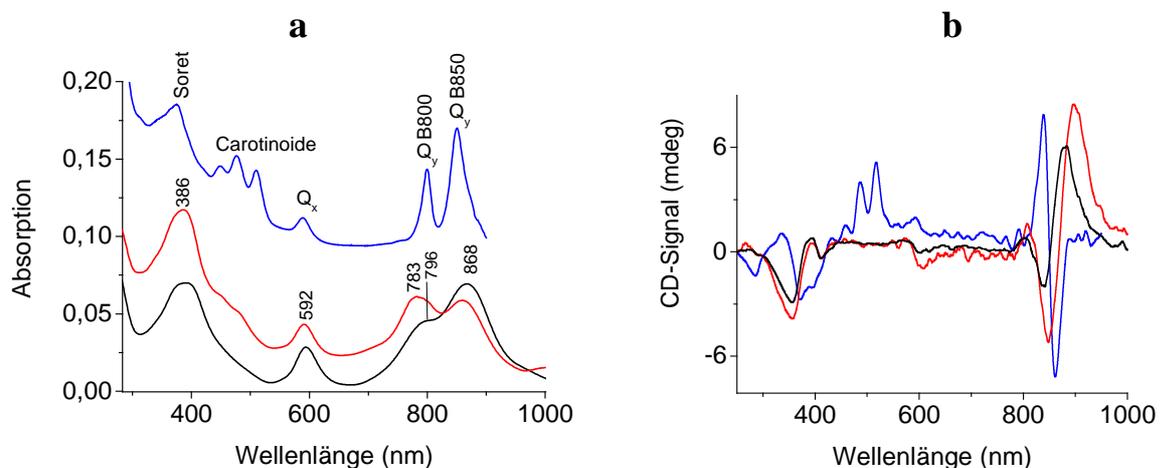


Abbildung 99: (a) Absorptionsspektren und (b) CD-Spektren (über 100 Punkte geglättet) von BChla (schwarz), des nativen (blau) und artifiziellen „LH-Komplexes“ (rot). Alle Spektren sind in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (5 mM MgSO_4 , 0,66 % OG, pH 7,8) bei 277 K aufgenommen. Die Probenkonzentrationen lagen bei max. 1 μM .

Als weitere Untersuchungsmethode wurde die Fluoreszenzspektroskopie gewählt. Durch die Aufnahme von Fluoreszenzanregungsspektren kann neben dem Ergebnis der CD-Spektroskopie ein weiterer Hinweis für eine Wechselwirkung der *de novo* synthetisierten Peptide mit den Pigmenten erhalten werden. Während im Fluoreszenzanregungsspektrum der BChla-Luteinprobe ohne Peptide die Carotinoidbanden nicht detektiert werden, sind diese im Spektrum bei konstanter Emissionswellenlänge von 850 nm vom nativen und artifiziellen Peptidkomplex zu beobachten (Abb. 100). Die Carotinoidbanden des nativen Komplexes liegen geringfügig hypsochrom verschoben, was durch das Vorliegen eines anderen Carotinoids (Rhodopin) erklärt werden kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass durch alleinige Anwesenheit des β -Peptids – nicht aber im Fall des α -Peptids – die Carotinoidbanden ebenfalls beobachtet werden können. Die Detektion dieser Banden gibt einen Hinweis auf einen Energietransfer zwischen den beiden Pigmenten, der bei Abwesenheit einer Peptidumgebung nicht abläuft.

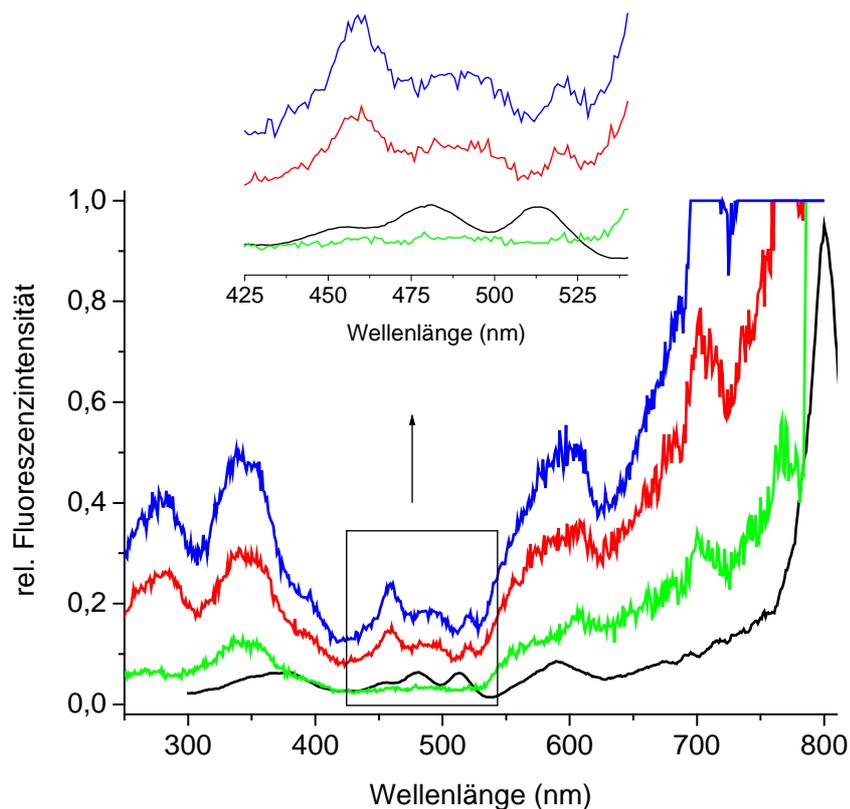


Abbildung 100: Fluoreszenzanregungsspektren von BChla/Lutein (grün), nativem LH2-Komplex (schwarz) (über 10 Punkte geglättet), BChla/Lutein/sph β 50 (rot) und BChla/Lutein/spha54/sph β 50 (blau) bei 277 K in 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (5 mM MgSO₄, 0,66 % OG, pH 7,8); λ_{em} = 850 nm; T = 277 K. Der Bereich der Carotinoidabsorption ist gesondert herausgestellt.

5.3.5 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration und MALDI-TOF-MS

Um eine Aussage über die Größe der aus der Wechselwirkung der *de novo* synthetisierten α - und β -Peptide mit den Kofaktoren BChla und Lutein zu erhalten, wurde das Molekulargewicht des „artificialen LH-Komplexes“ durch Gelfiltration (s. Kap. 4.3.3) bestimmt. Hierzu wurde eine Superdex75-HR10/30-Säule verwendet, die an eine FPLC-Anlage angeschlossen war. Die Säule wurde mit 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (5 mM MgSO_4 , 0,66 % OG, pH 7,8) equilibriert und mit Standardproteinen geeicht. Das Gelfiltrationschromatogramm ist in Abbildung 101a gezeigt. Aus der Wechselwirkung der *de novo* synthetisierten α - und β -Peptide mit BChla und Lutein wird eine strukturelle Anordnung erhalten, deren Molekulargewicht ca. 47000 (± 4000) Da entspricht. Unter gleichen Bedingungen wurde vom isolierten natürlichen LH2-Komplex ein Wert von 65000 (± 4000) Da ermittelt. Ein vergleichbarer Wert von 72000 – 75000 Da wurde als Hauptkomponente nach einer SDS-Behandlung des nativen Lichtsammelkomplexes B850 von *Rb. sphaeroides* erhalten (Braun und Scherz, 1991).

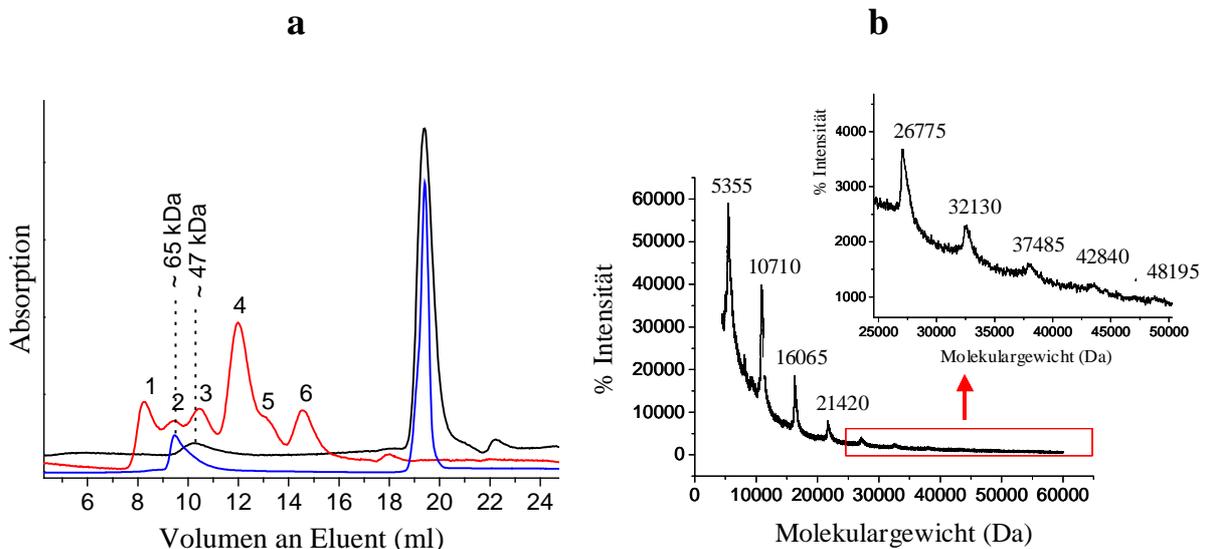


Abbildung 101: (a) Gelfiltrationschromatogramm des nativen (blau) und künstlichen LH-Komplexes (sph α 54, sph β 50, Lutein und BChla) in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (5 mM MgSO_4 , 0,66 % OG, pH 7,8), $\lambda_{\text{ex}} = 260$ nm. Die mit Nummern gekennzeichneten Elutionsvolumina gehören zu folgenden Eichproteinen (rot): 1. Dextran-Blau (>200000 Da), 2. Rinderserumalbumin (67000 Da), 3. Ovalbumin (43000 Da), 4. Chymotrypsinogen (25000 Da), 5. Ribonuklease A (13700 Da), 6. Aprotinin (6500 Da). (b) MALDI-TOF-Massenspektrum von sph β 50.

Bei der Gelfiltration kann zudem ein Anteil mit einem hohen Extinktionskoeffizienten bei sehr geringen Molekulargewichten detektiert werden, der auf freies BChla zurückgeführt wird, das unter den verwendeten Bedingungen freigesetzt wird. Vom sph β 50-Peptid ohne Zusatz des α -Peptids und der Kofaktoren wurde ebenfalls durch Gelfiltration ein Molekulargewicht von ca. 47000 (\pm 4000) Da bestimmt. Die Aufnahme eines MALDI-TOF-Massenspektrums vom sph β 50 zeigt die Molekulargewichte, die aus dem Zerfall des Oligomers resultieren (Abb. 101b). Das Molekulargewicht des sph β 50-Monomers beträgt 5355 Da. Das Signal mit sehr geringer Intensität bei 48195 Da gibt das Molekulargewicht des sph β 50-Oligomers an, das auch durch Gelfiltration in der angegebenen Detergenzlösung bestimmt wurde. Es entspricht damit einem Nonamer.

Zusammengefasst zeigen die dargestellten Untersuchungsmethoden, dass zwar eine definierte Wechselwirkung zwischen den Pigmenten und den artifiziellen LH-Peptiden stattfindet, die aber anderer Natur als die des nativen LH2-Komplexes ist. Sowohl die größere Linienbreite im UV-Vis-Spektrum als auch die starke Aggregation bei Pigment-Konzentrationen $> 1 \mu\text{M}$ im Gegensatz zu dem natürlichem Antennensystem geben einen Hinweis auf eine weniger gute oder andersartige Einlagerung der Pigmente in die artifiziellen Peptide. Dennoch sind im CD- und Fluoreszenzanregungs-Spektrum Unterschiede zwischen den BChla-Lutein-System ohne und mit Peptidmatrix zu beobachten. Zudem konnte ein Molekulargewicht eines Peptidkomplexes, das aus neun Untereinheiten besteht, detektiert werden. Dieses Teilprojekt stellt damit einen Ansatzpunkt zur Synthese eines artifiziellen Lichtsammelkomplexes dar, macht aber gleichzeitig die Schwierigkeiten im Umgang mit hydrophoben *de novo* synthetisierten Peptiden deutlich.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die chemische Peptidsynthese stellt die Grundlage der vorliegenden Arbeit dar, durch die verschiedene Peptide zum einen nach dem Modell der Cytochrom *b*-Untereinheit des Cytochrom *bc*₁-Komplexes und zum anderen auf der Grundlage der Peptidsequenz natürlicher bakterieller Lichtsammelkomplexe hergestellt wurden. Die hydrophilen Peptide, deren Sequenzen aus bis zu 62 Aminosäuren bestehen, wurden mit einer Ausbeute von 8 % hergestellt, was einer Ausbeute von 96 % pro Kopplungsschritt entspricht. Die synthetisierten Helix-*turn*-Helix-Motive, basierend auf einem literaturbekanntem Modell der Cytochrom *b*-Untereinheit, zeigten in wässriger Lösung das gewünschte Strukturmotiv eines Vier-Helix-Bündels. In diesem Vier-Helix-Bündel werden zwei Hämingruppen über jeweils zwei axial gebundene Histidine koordiniert. Eine derartige Einlagerung der Kofaktoren in das Peptid führte zu einem charakteristischen Absorptionsspektrum, das dem der natürlichen Häminproteine vergleichbar ist. Durch ESI-Massenspektrometrie gelang es das Molekulargewicht dieses Hämin-Peptid-Komplexes zu bestimmen, was bislang noch nicht in der Literatur von einem derartigen System ohne kovalente Peptid-Kofaktor-Wechselwirkung gezeigt wurde. Die chemische Redox Titration ermöglichte eine Aussage über die vorliegende Konformation der beiden Helix-*turn*-Helix-Motive im Vier-Helix-Bündel. Es wurden zwei Halbstufenpotentiale ermittelt, die auf eine *syn*-Konformation der beiden Struktur motive hinwiesen. Durch Zugabe von Cyanid wurde ein artifizieller Hämiglobincyanidkomplex hergestellt, der mittels UV-Vis-Spektroskopie identifiziert wurde. Dieses Experiment zeigte, dass auch die *maquettes* in Analogie zu den komplexen, natürlichen Hämin-Proteinen in der Lage sind, kleine Moleküle zu binden.

Eine Verkürzung der Peptidstränge von 31 auf 24 Aminosäuren verminderte sowohl deren Stabilität als auch die Ligandenbindungsfähigkeit. So konnte im Vier-Helix-Bündel der verkürzten Peptidstrukturen lediglich ein Hämin koordiniert werden, was durch chemische Titration des Kofaktors zum Peptid nachgewiesen wurde. Die selektive Peptidbindung der Kofaktoren über die Histidine des Peptids konnte durch einen gezielten Austausch des Histidins gegen Alanin bestätigt werden.

Die Untersuchung zur Ausbildung einer Histidin-Methionin-Koordination des Hämins, wie sie z. B. im Cytochrom *c* vorliegt, als Alternative zu einer *bis*-Histidin-Bindung des Kofaktors

wurde ebenfalls in dieser Arbeit an einem *maquette* überprüft. Dabei konnte durch verschiedene spektroskopische Charakterisierungsmethoden (UV-Vis, EPR, Resonanz Raman) eine Schwächung der sich ausbildenden *bis*-Histidin-Koordination festgestellt werden, die ohne Methionin in der Sequenz nicht beobachtet wurde. Es zeigte sich, dass die ansonsten parallel zueinander stehenden Histidine, die das Hämin koordinieren, durch Anwesenheit des Methionins ihre Position geringfügig ändern und dadurch nicht mehr vollständig sechsfach koordiniertes Hämin vorliegt. Eine Histidin-Methionin-Ligation des Kofaktors wurde allerdings nicht beobachtet. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Histidine in einer Konkurrenz die stärkeren Bindungspartner darstellen.

Eines der Ziele, eine minimalistische, photosynthetische Struktureinheit nachzubauen, konnte durch den Austausch der redoxaktiven Hämgruppen mit redoxinaktiven und diamagnetischen Zink(bakterio)chlorophyllderivaten in den *de novo* synthetisierten Peptiden erreicht werden. Die Einlagerung der Kofaktoren wurde durch spektroskopische Methoden wie UV-Vis-, Fluoreszenz- oder CD-Spektroskopie bestätigt. Durch eine spezielle Methode der EPR, der ESEEM-Spektroskopie, gelang es zum ersten Mal durch direkte Detektion des axial koordinierenden Stickstoffatoms des Histidins am Kofaktor, diese Aminosäure als Bindungspartner zu identifizieren. Die ESEEM-Methode zeigt damit eine Alternative zur Peptidmutation auf, wenn als Bindungspartner des Kofaktors eine Aminosäure erwartet wird, die das Pigment über ihre Stickstoffe koordiniert.

Bei den Einlagerungsversuchen verschiedener Chlorophylle in die Peptide zeigte sich, dass es nicht möglich war, Chlorophyllderivate mit Phytylresten in die Vier-Helix-Bündel-Proteine einzubauen. Nach der Entfernung des hydrophoben und langkettigen Seitenrestes vom zyklischen Tetrapyrrolysystem fand dagegen eine Einlagerung der Zink(bakterio)chlorine statt. Die Zinkchlorine können nach Lichtanregung über den ersten angeregten Singulettzustand durch den *intersystem crossing*-Prozess in den Triplettzustand übergehen. In dieser Arbeit wurden an zwei Zinkchlorinen, ZnPheida und ZnCe₆, deren Triplettzustände mittels transients Absorptionsspektroskopie und durch transiente EPR-Spektroskopie untersucht. Dabei wurden jeweils die Ergebnisse der Peptid-gebundenen mit denen der freien Pigmente verglichen. Durch die Bestimmung der Nullfeldparameter aus den EPR-Spektren gelang es, Aussagen über die elektronische Struktur der Triplettwellenfunktionen zu erhalten und durch die transiente Absorptionsspektroskopie erhielt man eine Information über die Lebensdauern bzw. die Zerfallskinetiken der systemabhängigen Triplettzustände. Bei Zugabe eines Chinons als Elektronenakzeptor konnte aus dem Triplettzustand ein Elektronentransfer vom lichtangeregten Zinkchlorin zum Chinon beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigte damit

erste Ansätze zur Entwicklung eines artifiziellen Photosynthesemodells. Es gelang, das entstehende Tripletttr radikalpaar zeitaufgelöst durch zweidimensionale transiente EPR-Spektroskopie direkt zu detektieren. Durch die transiente Absorptionsspektroskopie wurden die Kinetik der Triplettlöschung durch das Akzeptormolekül und die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Peptidhülle, die die eingelagerten Zinkchlorine umgibt, einen vierfach langsameren Elektronentransfer verursacht. Dieses Ergebnis weist auf die Schwierigkeit der Nachbildung eines effizienten Modells für den Elektronentransfer hin, wie er in natürlichen Pigment-Peptid-Komplexen stattfindet. In natürlichen Redoxzentren der Photosysteme kann nämlich erst durch die Anwesenheit der Peptide, die die miteinander elektronentauschenden Moleküle in einem definierten Abstand und in einer optimalen Orientierung zueinander halten, und infolge des optimalen Verhältnisses von freier Reaktionsenthalpie des Elektronentransfers zu der Reorganisationsenergie ($\Delta G_0/\lambda$) nach der Marcus-Theorie ein schneller Elektronentausch erfolgen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt des Weiteren eine erstmalig beobachtete und aus der Literatur bislang unbekannte Zinkchlorin-Chinon-Grundzustandswechselwirkung, die während der Experimente zu den Elektronentransferuntersuchungen entdeckt wurde. Da die verwendeten Pigmentproben zur Qualitätsuntersuchung vor jeder Messung durch die UV-Vis-Spektroskopie untersucht wurden, konnten sowohl im Absorptionsspektrum als auch im Fluoreszenzspektrum der freien Pigmente nach Chinonzugabe das Entstehen neuer und das Verschwinden der ursprünglichen Absorptionsbanden beobachtet werden. Die *de novo* synthetisierten Peptide verhindern nach Einlagerung der Zinkchlorine eine solche Grundzustandswechselwirkung, indem sie die Kofaktoren durch ihre Peptidummantelung von den Chinonen abschirmen. Die Peptidmatrix ließ aber dennoch ein Elektronenaustausch zwischen den Zinkchlorinen und dem Chinon zu. Eine derartige Grundzustandswechselwirkung konnte bei den metallfreien Pigmenten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass das Zink als Zentralmetall an der Ausbildung des entstehenden Komplexes oder der Aggregation beteiligt ist. Eine detaillierte Beschreibung über die Natur der Wechselwirkung kann bislang allerdings noch nicht gegeben werden.

Die *de novo*-Synthese der Peptide nach dem Modell der Lichtsammelkomplexe von *Rb. sphaeroides* als auch deren Aufreinigung durch HPLC gestaltete sich aufgrund der Hydrophobizität der Peptide weitaus schwieriger als die Synthese der oben beschriebenen hydrophilen Peptide, die auf der Cytochrom *b*-Untereinheit beruhen. Dennoch gelang es, die sogenannten α - und β -Peptide einer LH-Untereinheit, wenn auch mit einer geringen Ausbeute von <0,2 % herzustellen. Anhand dieser artifiziellen Peptide sollte eine Wechselwirkung mit

Bakteriochlorophyll *a* und Lutein untersucht und eine mögliche Nachbildung eines LH-Komplexes überprüft werden. Dabei diente der natürliche LH2-Komplex aus *Rb. sphaeroides*, der aus den Bakterienzellen isoliert wurde, als Vergleichsprobe für die spektroskopischen Untersuchungen. Das verwendete BChl_a wurde aus *Allochromatium vinosum* und Lutein aus *Spinacia oleracea* L. isoliert und mittels HPLC aufgereinigt. Durch die Aminosäuresequenz der ursprünglich transmembranen Peptide der LH-Komplexe bedingt, ließen sich die Peptide in wässriger Umgebung nur durch Zusatz eines Detergens unter Ausbildung von Micellen in Lösung bringen. Anhand von CD-Messungen konnte der größte Anteil an α -Helikalität in Abhängigkeit von der Detergengkonzentration bestimmt werden. Für eines dieser Peptide wurde mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie in einem organischen Lösungsmittel ebenfalls das Vorliegen einer α -helikalen Sekundärstruktur bestätigt. Anhand der Aufnahme von CD- und Fluoreszenzanregungs-Spektren in einem Wellenlängenbereich, in dem die Pigmente absorbieren, konnte zwar eine Wechselwirkung der *de novo* synthetisierten Peptide mit den Pigmenten festgestellt werden, allerdings entsprach diese nicht der des natürlichen LH2-Komplexes. Dennoch konnte für den artifiziellen Komplex ein Molekulargewicht von ca. 48000 Da ermittelt werden, was einer Zusammenlagerung von neun Untereinheiten entspricht. Zusammenfassend zeigte dieses Teilprojekt deutlich die Schwierigkeit auf, ein artifizielles Antennensystem aus vollständig isolierten Komponenten *in vitro* herzustellen und bedarf zukünftig weiterer Studien. Eine entscheidende Rolle spielen dabei auch Parameter wie Puffer- und Detergens-Konzentration, pH-Wert und die Temperatur. Dennoch konnte bereits eine Wechselwirkung der in diesem Teilprojekt vorliegenden Peptide mit den Pigmenten festgestellt werden. Daraus ergibt sich für zukünftige Arbeiten die Möglichkeit, durch den bereits erfolgreichen Nachbau der Peptide aus dem LH-Komplex weitere Optimierungsmethoden für die Darstellung eines Antennensystems zu erforschen.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit damit verschiedene Kofaktor-Peptid-Wechselwirkungen dar und zeigt gleichzeitig die Möglichkeiten, aber auch die Grenzen der artifiziiellen Peptidkomplexe auf, die zum Nachbau natürlicher Systeme dienen sollen. Gelingt es jedoch, eine minimalistische Nachbildung mit den Eigenschaften und Funktionen eines natürlichen Kofaktor-Protein-Komplexes herzustellen, können daran viele Details zur Struktur und Funktion des natürlichen Systems aufgeklärt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, können durch Änderung der Peptidsequenz die für die Bindung eines Kofaktors wichtigen Aminosäuren bestimmt oder Aussagen über die Stabilität der Peptidkomplexe gemacht werden. Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass die chemische Peptidsynthese für Modellstudien besonders effizient zur Peptidgewinnung eingesetzt werden kann, da sie mittels

eines automatischen Peptidsyntheseautomaten die Möglichkeit eröffnet, parallel verschiedene Peptide mit ähnlichen Sequenzen in einer kurzen Zeit herzustellen. Durch optimale Synthesebedingungen (z. B. geeignete Kopplungsreagenzien und -zeiten) können gute Kopplungsausbeuten erzielt und die gewünschten Peptide in ausreichender Menge für die geplanten Experimente hergestellt werden. Dennoch spielt, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, die Länge und Zusammensetzung der Peptidsequenz bezüglich der Ausbeute der Peptide eine entscheidende Rolle.

Ausblick

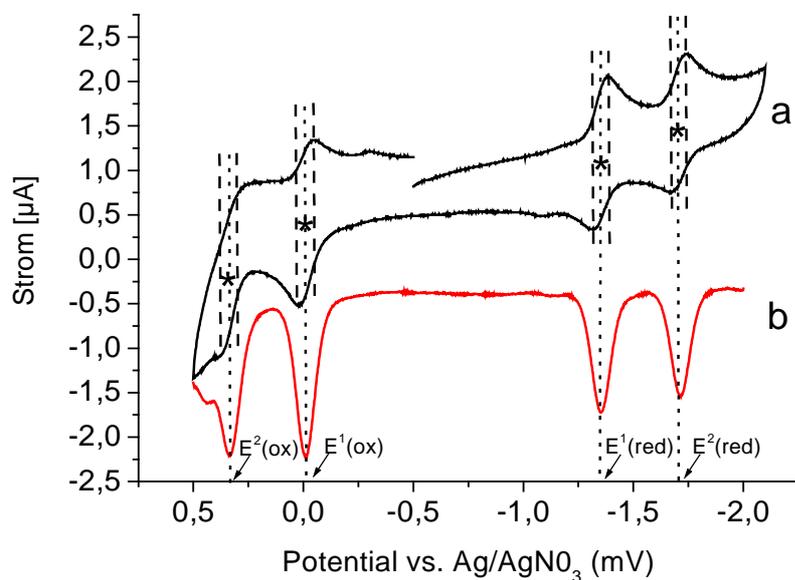
Der Ansatz der chemischen Peptidsynthese stellt durch den Einsatz natürlicher, aber auch unnatürlicher Aminosäuren eine fast unbegrenzte Möglichkeit an Sequenzkombinationen dar, deren Synthese in biologischen Systemen oftmals an ihre Grenzen kommen würde. Dennoch spielt im Vorfeld der Synthese die Proteinmodellierung eine große Rolle. Ohne eine derartige computerunterstützte Modellierung und Sequenzoptimierung ist es schwierig, geeignete Peptidsequenzen zu entwickeln, die der Aufklärung der Struktur und Funktion natürlicher Protein-Komplexe dienen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Peptidmodell, das für eine *bis*-Histidin-Koordination des Kofaktors entwickelt wurde, nicht durch den Austausch eines Histidins gegen Methionin als Modell für ein Cytochrom *c*-Komplex verwendet werden kann. Hierfür müsste ein anderes Peptid entwickelt werden. Ein weiteres Beispiel für den wirkungsvollen Einsatz der Peptidmodellierung bietet der in dieser Arbeit untersuchte Elektronentransfer. Um einen effizienten Elektronentransfer zu erzeugen, wie er u. a. in natürlichen Photosystemen abläuft, müssen sich die Elektronen-Akzeptor-Paare in einer definierten Lage zueinander befinden, beide Komponenten geeignete Redoxpotentiale aufweisen und nach der Marcus-Theorie optimale Parameter für eine maximale Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers gefunden werden. In der Natur liefern die Proteine dazu den entscheidenden Beitrag, indem sie die Kofaktoren, zwischen denen der Elektronentransferprozess abläuft, in geeigneten Anordnungen halten und durch ihre spezifische Proteinumgebung das Redoxpotential der Kofaktoren optimal einstellen. Insbesondere entspricht hier in der Regel die freie Reaktionsenthalpie der freien Reorganisationsenergie, so dass keine Aktivierungsenergie für die ablaufende Reaktion aufgebracht werden muss. Für den im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ansatz des künstlichen Photosynthesemodells muss zukünftig die Peptidsequenz dementsprechend so optimiert werden, dass die Peptide den Elektronentransfer nicht verlangsamen, sondern für einen

effizienteren Elektronentransfer sorgen als für die freien Kofaktoren ohne Peptidumgebung ermittelt werden kann. Dieses könnte dadurch erreicht werden, dass eine geeignete Peptidbindungstasche für das Chinon entworfen wird. Für den Nachbau eines natürlichen Photosystems sollte der Energietransfer aus dem ersten angeregten Singulettzustand erfolgen, da der Triplettzustand mit dem Luftsauerstoff reagiert. Da der resultierende Singulett-Sauerstoff das Pigmentmolekül schädigen kann, sollte die Bildung des Pigment-Triplettzustandes verhindert werden. Auch dieses könnte durch die Synthese einer geeigneten Chinonbindungsstelle am Peptid und den dadurch schnelleren Elektronenaustausch zwischen dem Pigment und dem Chinon gelingen, so dass kein Triplettübergang des Pigments erfolgt. Die Peptidmodellierung stellt damit zukünftig einen wichtigen Schritt vor der eigentlichen Peptidsynthese dar. Dabei soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass man mit dem derzeitigen Stand der Forschung noch nicht in der Lage ist, ein komplexes Peptidsystem, wie es in dieser Arbeit vorliegt, zu modellieren und dessen Struktur vorherzusagen.

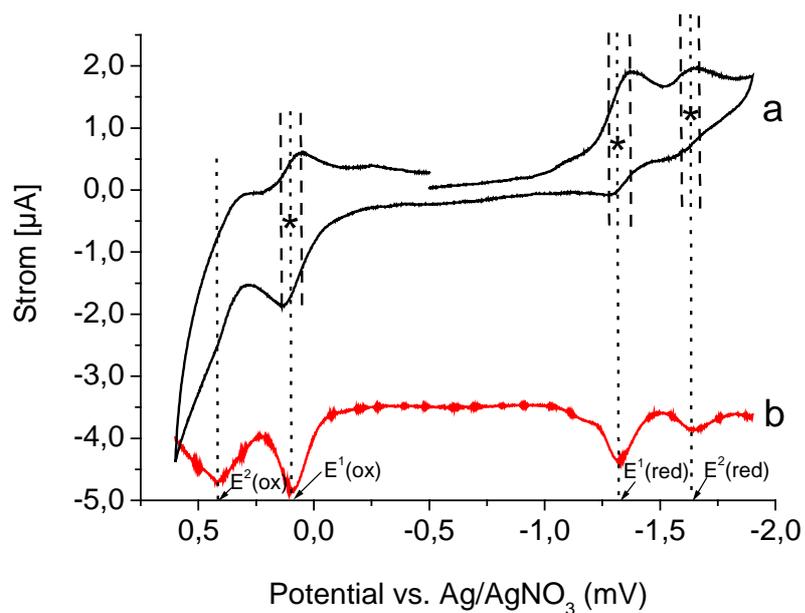
Durch den gezeigten Einbau der Zinkchlorine in die *de novo* synthetisierten Peptide wäre es zukünftig von Interesse, die Redoxpotentiale der Zinkchlorine im Peptid zu bestimmen, um darüber die Konformation der Helix-turn-Helix-Motive im Vier-Helix-Bündel zu ermitteln.

Die vorliegende Arbeit macht die Schwierigkeit der Synthese hydrophober Peptide und deren Handhabung deutlich. Ohne Änderung der natürlichen Sequenz der Peptide aus den Lichtsammelkomplexen ist es kaum möglich, einen derartigen Komplex aus artifiziellen Peptiden herzustellen. Erste Ansätze zu einer solchen Änderung der natürlichen Peptidsequenz zu hydrophileren Peptiden, die dennoch ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie die natürlichen Lichtsammelkomplexe aufweisen, wurden kürzlich veröffentlicht (Noy und Dutton, 2006). Auf dieser Grundlage besteht zukünftig die Möglichkeit, aus vollständig isolierten Einheiten (Kofaktoren und artifiziellen Peptide) einen effizienten Lichtsammelkomplex herzustellen, der auch auf dem Gebiet der Weiterentwicklung und Gewinnung von Solarenergie von großem Nutzen sein kann.

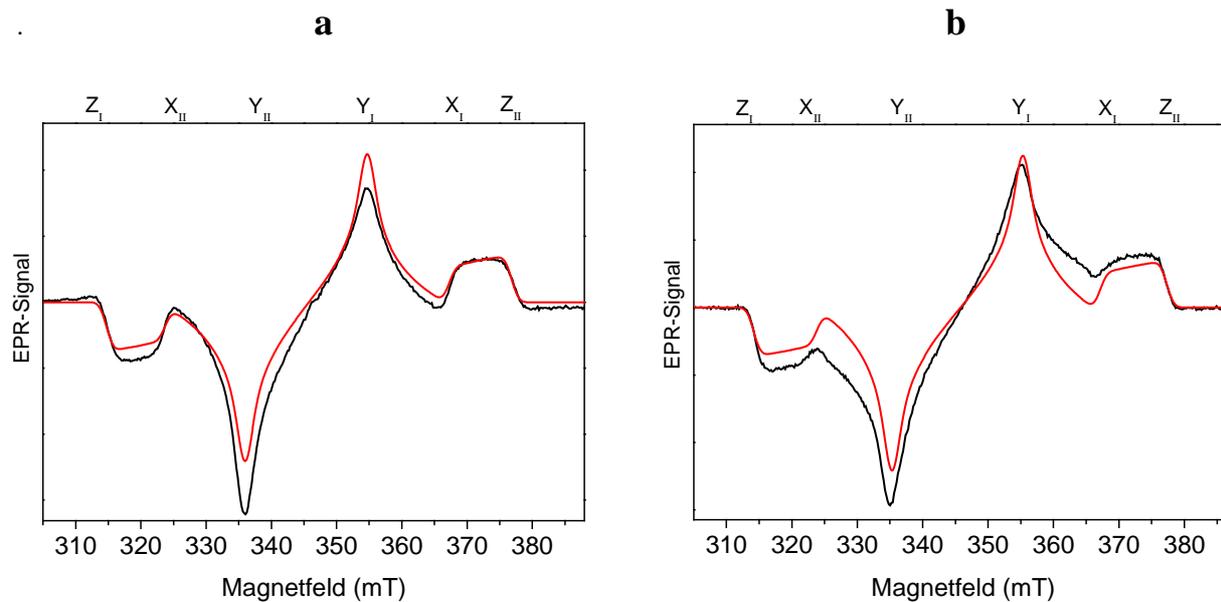
7. Anhang



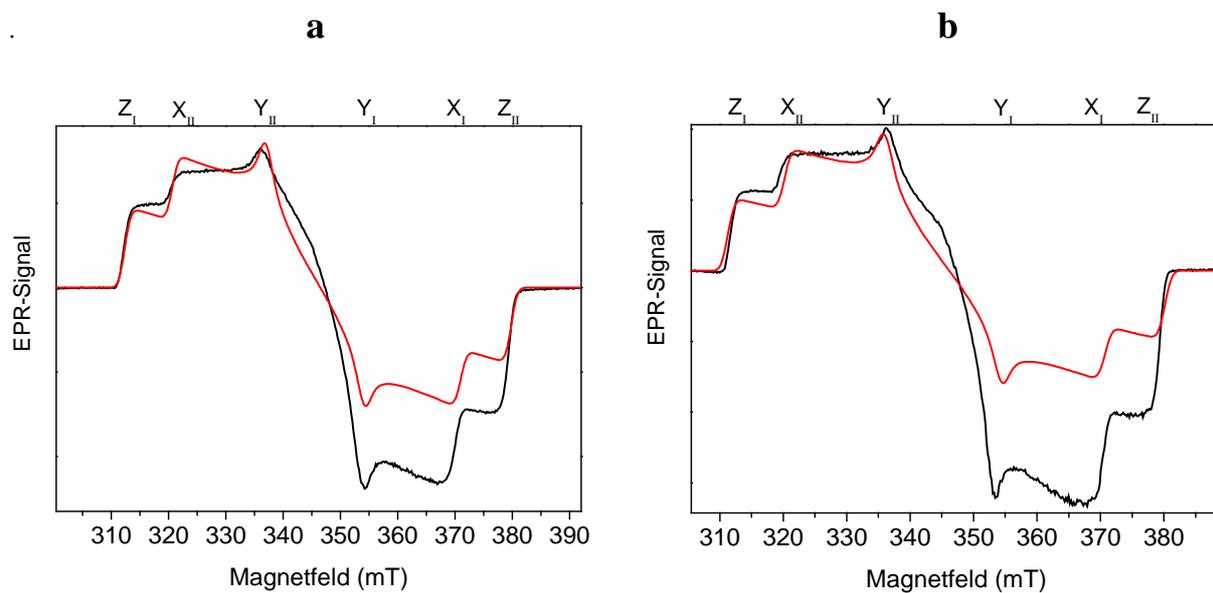
Anhang I: Ermittelte Halbstufenpotentiale von BChla mittels (a) zyklischer Voltammetrie und (b) *Square-Wave*-Methode in Acetonitril/DMF (9:1, v/v) und 0,1 M Tetrabutylammoniumtetrafluorborat.



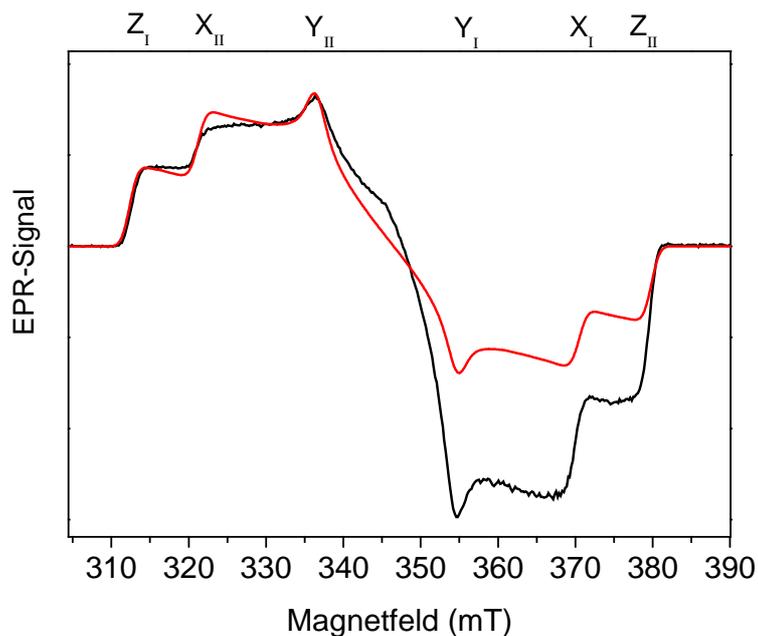
Anhang II: Ermittelte Halbstufenpotentiale von ZnBPheida mittels (a) zyklischer Voltammetrie und (b) *Square-Wave*-Methode in Acetonitril/DMF (9:1, v/v) und 0,1 M Tetrabutylammoniumtetrafluorborat.



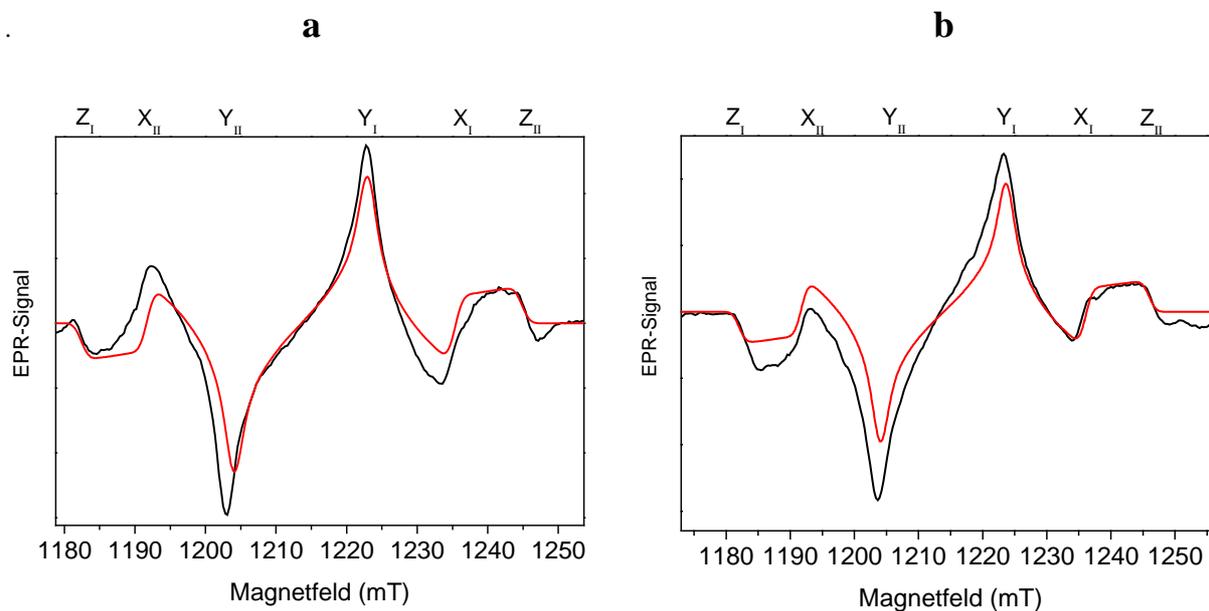
Anhang III: Transiente X-Band-EPR-Spektren von (a) ZnPheida (schwarz) und (b) ZnPheida-Imidazol (schwarz) in jeweils 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 mM NaCl, pH 7,3; 60 % Glycerin); $T = 80 \text{ K}$, $\nu = 9,62 \text{ GHz}$, $\lambda_{\text{ex}} = 590 \text{ nm}$ und zugehörige Simulationen (rot).



Anhang IV: Transiente X-Band-EPR-Spektren von (a) $\text{ZnCe}_6\text{-me-1}$ (schwarz) und (b) ZnCe_6 (schwarz) in jeweils 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10; 60 % Glycerin); $T = 80 \text{ K}$, $\nu = 9,62 \text{ GHz}$, $\lambda_{\text{ex}} = 639 \text{ nm}$ und zugehörige Simulationen (rot).



Anhang V: Transientes X-Band-EPR-Spektrum von ZnCe_6 -Imidazol (schwarz) in 25 mM Glycin (50 mM NaCl, pH 10; 60 % Glycerin); $T = 80 \text{ K}$, $\nu = 9,62 \text{ GHz}$, $\lambda_{\text{ex}} = 639 \text{ nm}$ und Simulation (rot).



Anhang VI: Transiente Q-Band-EPR-Spektren von (a) ZnPheida in Ethanol (schwarz) und (b) ZnPheida in Pyridin (schwarz); $T = 80 \text{ K}$, $\nu = 34,01 \text{ GHz}$, $\lambda_{\text{ex}} = 590 \text{ nm}$ und zugehörige Simulationen (rot).

8. Literaturverzeichnis

Abe M, Kitagawa T, Kyogoku Y. 1978. Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and *meso*-deuterated and ^{15}N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. *J. Chem. Phys.*, 69:4526-4534.

Abragam A, Bleaney B. 1970. *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*. Clarendon Press, Oxford.

Agostiano A, Catucci L, Colafemmina G, Scheer H. 2002. Role of Functional Groups and Surfactant Charge in Regulating Chlorophyll Aggregation in Micellar Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 106:1446-1454.

Åkerfeldt KS, DeGrado WF. 1994. Synthesis and Per-Functionalization of Heptakis(6-O-carboxymethyl-2,3-di-O-methyl)cyclomaltoheptaose. *Tetrahedron Lett.*, 35:4489-4492.

Åkerfeldt KS, Kim RM, Camac D, Groves JT, Lear LD, DeGrado WF. 1992. Tetraphilin: A Four-Helix Proton Channel Built on a Tetraphenylporphyrin Framework. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:9656-9657.

Amersham Biosciences. 2002. *Handbook: Gel Filtration – Principles and Methods*. 18-1022-18. Amersham Biosciences AB, Uppsala.

Arnesano F, Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S. 2000. Structural Consequences of *b*- to *c*-Type Heme Conversion in Oxidized *Escherichia coli* Cytochrome *b*₅₆₂. *Biochemistry*, 39:1499-1514.

Aronoff S. 1966. The Chlorophylls - an introductory survey. In *The Chlorophylls*. Vernon LP, Seely GR (Hrsg.), Academic Press, New York.

Atherton NM. 1973. *Electron spin resonance theory and application*. Wiley, New York.

Atherton NM. 1993. *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall, Chichester.

Atkins PW. 2001. *Physikalische Chemie*. 3., korrigierte Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.

Bailey SI, Ritchie IM. 1985. A Cyclic Voltammetric Study of the Aqueous Electrochemistry of Some Quinones. *Electrochim. Acta*, 30:3-12.

Balaban TS, Leitich J, Holzwarth AR, Schaffner K. 2000. Autocatalyzed Self-Aggregation of (3¹R)-[Et,Et]Bacteriochlorophyll *c*_F Molecules in Nonpolar Solvents. Analysis of the Kinetics. *J. Phys. Chem. B*, 104:1362-1372.

- Balaban** TS, Tamiaki H, Holzwarth AR. **2005**. Chlorins Programmed for Self-Assembly. *Top. Curr. Chem.*, 258:1-38.
- Balzani** V. **2001**. *Electron Transfer in Chemistry*. Vol. I – V. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bandilla** M, Uecker B, Ram M, Simonin I, Gelhaye E, McDermott G, Cogdell RJ, Scheer H. **1998**. Reconstitution of the B800 bacteriochlorophylls in the peripheral light harvesting complex B800–850 of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 with BChl *a* and modified (bacterio)-chlorophylls. *Biochim. Biophys. Acta*, 1364:390-402.
- Bergmann** M, Zervas L. **1932**. Über eine neue Methode der Peptidsynthese. *Ber. Dtsch. Chem. Gesell.*, 65:1192-1201.
- Blankenship** RE. **2002**. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Blauer** G, Harmatz D, Naparstek A. **1970**. Circular Dichroism of Bilirubin-Human Serum Albumin Complexes in Aqueous Solution. *FEBS Lett.*, 9:53-55.
- Bönigk** B. **1994**. *Isolation und Charakterisierung von nativen und isotoopenmarkierten bakteriellen Reaktionszentren und ihren Pigmenten*, Dissertation, TU Berlin.
- Bohne** C, Faljoni-Arário A, Cilento G. **1988**. Interaction of Enzyme Generated Species with Chlorophyll-alpha and Probes bound to Serum Albumins. *Photochem. Photobiol.*, 48:341-347.
- Bois-Poltoratsky** R, Ehrenberg A. **1967**. Magnetic and Spectrophotometric Investigations of Cytochrome *b₅*. *European J. Biochem.*, 2:361-365.
- Boonstra** AF, Visschers RW, Calkoen F, van Grondelle R, van Bruggen EFJ, Boekema EJ. **1993**. Structural Characterization of the B800-850 and B875 Light-Harvesting Antenna Complexes from *Rhodobacter sphaeroides* by Electron Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1142:181-188.
- Boxer** SG, Kuki A, Wright KA, Katz BA, Xuong NH. **1982**. Oriented Properties of the Chlorophylls: Electronic Absorption Spectroscopy of Orthorhombic Pyrochlorophyllide *a*-Apomyoglobin Single Crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:1121-1125.
- Braun** P, Scherz A. **1991**. Polypeptides and Bacteriochlorophyll Organisation in the Light-harvesting Complex B850 of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1. *Biochemistry*, 30:5177-5184.
- Briat** B, Schooley DA, Records R, Bunnenberg E, Djerassi C. **1967**. Magnetic Circular Dichroism Studies. III. Investigations of Some Optically Active Chlorins. *J. Am. Chem. Soc.*, 89:6170-6177.
- Brill** AS, Williams RJP. **1961**. The Absorption Spectra, Magnetic Moments and the Binding of Iron in some Haemoproteins. *Biochem. J.*, 78:246-253.
- Britton** G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (Hrsg.). **2004**. *Carotenoids; Handbook*. Birkhäuser Verlag, Basel.

- Brown** RG, Harriman A, Harris L. **1978**. Quenching of Triplet Chlorophyll-*a* by Aromatic Nitrogen-Compounds. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 74:1193-1199.
- Burghaus** O, Plato M, Rohrer M, Möbius K, MacMillan F, Lubitz W. **1993**. 3-mm High-Field EPR on Semiquinone Radical Anions $Q^{\bullet-}$ Related to Photosynthesis and on the Primary Donor $P^{+\bullet}$ and Acceptor $Q_A^{\bullet-}$ in Reaction Centers of *Rhodobacter sphaeroides* R-26. *J. Phys. Chem.*, 97:7639-7647.
- Callahan** PM, Cotton TM. **1987**. Assignment of Bacteriochlorophyll *a* Ligation State from Absorption and Resonance Raman Spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7001-7007.
- Cantor** CR, Schimmel PR. **1980**. *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. Teil II, Kap. 8, Freeman and Company, San Francisco.
- Carpino** LA. **1957**. Oxidative Reactions of Hydrazines. IV. Elimination of Nitrogen from 1,1-Disubstituted-2-arensulfonhydrazides. *J. Am. Chem. Soc.*, 79:4427-4430.
- Carpino** LA, Han GY. **1970**. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.*, 92:5748-5749.
- Carrington** A, McLachlan AD. **1969**. *Introduction to Magnetic Resonance*. Harper und Row, New York.
- Castelli** F. **1984**. Laser Photolysis Studies of Quinone Reduction by Chlorophyll *a* in Homogenous and Heterogenous Systems. In *Laser Application in Chemistry*. Kompa KL, Wanner J (Hrsg.), NATO Series B, 105, Plenum Press, New York.
- Castelli** F, Cheddar G, Rizzuto F, Tollin G. **1979**. Laser Photolysis Studies of Quinone Reduction by Pheophytin- α in Alcohol Solution. *Photochem. Photobiol.*, 29:153-163.
- Caughey** WS, Deal RM, Weiss C, Gouterman M. **1965**. Electronic Spectra of Substituted Metal Deuteroporphyrins. *J. Mol. Spectrosc.*, 16:451-463.
- Chang** CD, Meienhofer J. **1978**. Solid-Phase Peptide-Synthesis using Mild Base Cleavage of N- α -Fluorenylmethyloxycarbonylamino acids, Exemplified by a Synthesis of Dihydrostatostatin. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 11:246-249.
- Chang** TK, Jackson DY, Burnier JP, Wells JA. **1994**. Subtiligase - A Tool for Semisynthesis of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12544-12548.
- Chen** LX, Wang Z, Hartwich G, Katheder I, Scheer H, Scherz A, Montano PA, Norris JR. **1995**. An X-ray absorption study of chemically modified bacterial photosynthetic reaction centers. *Chem. Phys. Lett.*, 234:437-444.
- Chibisov** AK, Slavnova TD, Görner H. **2003**. Effect of macromolecules and triton X-100 on the triplet of aggregated chlorophyll in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 72:11-16.
- Choma** CT, Kaestle K, Åkerfeldt KS, Kim RM, Groves JT, DeGrado WF. **1994**. A General Method for Coupling Unprotected Peptides to Bromoacetamido Porphyrin Templates. *Tetrahedron Lett.*, 35:6191-6194.

- Choma** CT, Lear JD, Nelson MJ, Dutton PL, Robertson DE, DeGrado WF. **1994**. Design of a Heme-Binding Four-Helix Bundle. *J. Am. Chem. Soc.*, 116:856-865.
- Clayton** RK, Clayton BJ. **1981**. B850 Pigment-Protein Complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: Extinction Coefficients, Circular Dichroism, and the Reversible Binding of Bacteriochlorophyll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:5583-5587.
- Cogdell** RJ, Scheer H. **1985**. Circular-Dichroism of Light-Harvesting Complexes from Purple Photosynthetic Bacteria. *Photochem. Photobiol.*, 42:669-678.
- Collings** AF, Critchley C. **2005**. *Artificial Photosynthesis. From Basic Biology to Industrial Application*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Connolly** JS, Bolton JR. **1988**. Intramolecular Electron Transfer: History and Some Implications for Artificial Photosynthesis. In *Photoinduced Electron Transfer, Part D*. Fox MA, Chanon M (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, Kap. 6.2.
- Cornish** VW, Schultz PG. **1994**. A New Tool for Studying Protein Structure and Function. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 4:601-607.
- Creighton** TE. **1989**. *Protein structure – a practical approach*. IRL Press, Oxford University Press, Oxford.
- Creighton** TE. **1993**. *Proteins. Structures and Molecular Properties*. 2nd Edition. Freeman and Company, New York.
- Curtius** T. **1904**. Verkettung von Aminosäuren. *J. Prakt. Chem.*, 70:57-180.
- Davis** CM, Bustamante PL, Loach PA. **1995**. Reconstitution of the Bacterial Core Light-Harvesting Complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* with Isolated α - and β -Polypeptides, Bacteriochlorophyll *a*, and Carotenoid. *J. Biol. Chem.*, 270:5793-5804.
- Dawson** PE, Kent SBH. **1993**. Convenient Total Synthesis of a 4-Helix TASP Molecule by Chemoselective Ligation. *J. Am. Chem. Soc.*, 115:7263-7266.
- Dawson** PE, Kent SBH. **2000**. Synthesis of Native Proteins by Chemical Ligation, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923-960.
- Dawson** PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SBH. **1994**. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science*, 266:776-779.
- DeGrado** WF, Ho SP, Weber PC, Salemm FR, Wilcox W, Eshita S, Pryciak P, Eisenberg D. **1986**. A Synthetic 4-Helical Bundle Protein. *Biophys. J.*, 49:A573-A573, Part 2.
- DeGrado** WF, Summa CM, Pavone V, Nastri F, Lombardi A. **1999**. De Novo Design and Structural Characterization of Proteins and Metalloproteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:779-819.

- De Groot A**, Evelo R, Hoff AJ, de Beer R, Scheer H. **1985**. Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy of the Triplet State of the Primary Donor of ^{14}N and ^{15}N Bacterial Photosynthetic Reaction Centers and of ^{14}N and ^{15}N Bacteriochlorophyll *a*. *Chem. Phys. Lett.*, 118:48-54.
- Den Blanken HJ**, Hoff AJ. **1983**. High-Resolution Absorbance-Difference Spectra of the Triplet State of the Primary Donor P-700 in Photosystem I Subchloroplast Particles Measured with Absorbance-Detected Magnetic Resonance at 1.2 K. Evidence that P-700 is a Dimeric Chlorophyll Complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 724:52-61.
- Dickerson RE**, Timkovitch R. **1975**. Cytochromes *c*. In *The enzymes: XI. Oxidation-reduction, Part A*. Boyer TD (Hrsg.), Academic Press, New York.
- Dikanov SA**, Tsvetkov YD. **1992**. *Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy*. CRC Press, Boca Raton, S. 334-357.
- Dill KA**, Shortle D. **1991**. Denatured States of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 60:795-825.
- Doolittle RF**. **1995**. Proteine. In *Proteine*. Goody RS (Hrsg.), Beiträge aus Spektrum der Wissenschaft. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Dudkowiak A**, Nakamura C, Arai T, Miyake J. **1998**. Interactions of chlorophyll *a* with synthesized peptide in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 45:43-50.
- Dutton PL**, Wilson DF, Lee CP. **1970**. Oxidation-Reduction Potentials of Cytochromes in Mitochondria. *Biochemistry*, 9:5077-5082.
- Eaton GR**, Eaton SS, Salikhov KM. **1998**. *Foundation of Modern EPR*. World Scientific Publishing, Singapore.
- Eichwurz I**, Stiel H, Röder B. **2000**. Photophysical studies of the pheophorbide *a* dimer. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 54:194-200.
- Elöve GA**, Chaffotte AF, Roder H, Goldberg ME. **1992**. Early Steps in Cytochrome *c* Folding Probed by Time-Resolved Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry*, 31:6876-6883.
- Evans TA**, Katz JJ. **1975**. Evidence for 5- and 6-Coordinated Magnesium in Bacteriochlorophyll *a* from Visible Absorption Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 396:414-426.
- Fahnenschmidt M**. **2000**. *De novo synthetisierte Proteine mit Metalloporphyrinkofaktoren*. Dissertation, TU Berlin.
- Fahnenschmidt M**, Bittl R, Rau HK, Haehnel W, Lubitz W. **2000**. Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopy of a heme protein maquette. *Chem. Phys. Lett.*, 323:329-339.
- Fahnenschmidt M**, Bittl R, Schlodder E, Haehnel W, Lubitz W. **2001**. Characterization of *de novo* synthesized four-helix bundle proteins with metalloporphyrin cofactors. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3:4082-4090.

- Fairman R**, Shoemaker KR, York EJ, Stewart JM, Baldwin RL. **1989**. Further Studies of the Helix Dipole Model: Effect of a Free $\alpha\text{-NH}_3^+$ or $\alpha\text{-COO}^-$ Group on Helix Stability. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 5:1-7.
- Feng Y**, Sligar AG. **1991**. Effect of Heme Binding on the Structure and Stability of *Escherichia coli* Apocytochrome *b*₅₆₂. *Biochemistry*, 30:10150-10155.
- Fiedor, L.** **2006**. Hexacoordination of Bacteriochlorophyll in Photosynthetic Antenna LH1. *Biochemistry*, 45:1910-1918.
- Fields GB**, Noble RL. **1990**. Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35:161-214.
- Finley KT.** **1974**. The addition and substitution chemistry of quinones. In *The chemistry of the quinonoid compounds, Part 2*. Patai S. (Hrsg.), Wiley & Sons, The Stonebridge Press, Bristol.
- Fischer G**, Fischer E. **1977**. Viscosity of Glass-Forming Organic Solvents and Solvent Mixtures. *Mol. Photochem.*, 8:279-281.
- Fischer E**, Fourneau E. **1901**. Über einige Derivate des Glykokolls. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 34:2868-2877.
- Francia F**, Wang J, Venturoli G, Melandri BA, Barz WP, Oesterhelt D. **1999**. The Reaction Center-LH1 Antenna Complex of *Rhodobacter sphaeroides* Contains one PufX Molecule which is Involved in Dimerization of this Complex. *Biochemistry*, 38:6834-6845.
- Frank HA**, Cogdell RJ. **1995**. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, 63:257-264.
- Frese RN**, Olsen JD, Branvall R, Westerhuis WHJ, Hunter, CN, van Grondelle R. **2000**. The Long-Range Supraorganization of the Bacterial Photosynthetic Unit: A Key Role for PufX. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97:5199-5202.
- Fuentes EJ**, Wand AJ. **1998**. Local Dynamics and Stability of Apocytochrome *b*₅₆₂ Examined by Hydrogen Exchange. *Biochemistry*, 37:3687-3698.
- Fukuzumi S**, Yorisue T. **1991**. Quinone/Hydroxide Ion Induced Oxygenation of *p*-Benzoquinone to Rhodizonate Dianion ($\text{C}_6\text{O}_6^{2-}$) Accompanied by One-Electron Reduction to Semiquinone Radical Anion. *J. Am. Chem. Soc.*, 113:7764-7765.
- Furukawa H**, Oba T, Tamiaki H, Watanabe T. **2000**. Effect of C13²-Stereochemistry on the Molecular Properties of Chlorophylls. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 73:1341-1351.
- Futaki S**, Sogawa K, Maruyama J, Asahara T, Niwa M, Hojo H. **1997**. Preparation of Peptide Thioesters using Fmoc-Solid-Phase Peptide Synthesis and its Application to the Construction of a Template-Assembled Synthetic Protein (TASP). *Tetrahedron Lett.*, 38:6237-6240.
- Galla HJ.** **1988**. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart.

- Gammeren** van AJ, Hulsbergen FB, Erkelens C, de Groot HJM. **2004**. Synthetic analogues of the histidine-chlorophyll complex: a NMR study to mimic structural features of the photosynthetic reaction center and the light-harvesting complex. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 9:109-117.
- Gauglitz** G. **1986**. Elektronenspektroskopie. In *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. Naumer H und Heller W (Hrsg.), 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Georgakopoulou** S, Frese RN, Johnson E, Koolhaas C, Cogdell RJ, van Grondelle R, van der Zwan G. **2002**. Absorption and CD Spectroscopy and Modeling of Various LH2 Complexes from Purple Bacteria. *Biophys. J.*, 82:2184-2197.
- Ghadiri** MR, Case MA. **1993**. De-Novo Design of a Novel Heterodinuclear 3-Helix Bundle Metalloprotein. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 32:1594-1597.
- Ghadiri** MR, Choi C. **1990**. Secondary Structure Nucleation in Peptides. Transition Metal Ion Stabilized α -Helices. *J. Am. Chem. Soc.*, 112:1630-1632.
- Ghadiri** MR, Soares C, Choi C. **1992**. A Convergent Approach to Protein Design. Metal Ion-Assisted Spontaneous Self-Assembly of a Polypeptide into a Triple-Helix Bundle Protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:825-831.
- Gibney** BR, Dutton PL. **1999**. Histidine placement in de novo-designed heme proteins. *Protein Sci.*, 8:1888-1898.
- Gibney** BR, Dutton PL. **2001**. De novo Design and Synthesis of Heme Proteins. *Adv. Inorg. Chem.*, 51:409-455.
- Gibney** BR, Huang SS, Skalicky JJ, Fuentes EJ, Wand AJ, Dutton PL. **2001**. Hydrophobic modulation of heme properties in heme protein maquettes. *Biochemistry*, 40:10550-10561.
- Gibney** BR, Isogai Y, Rabanal F, Reddy KS, Grosset AM, Moser CC, Dutton PL. **2000**. Self-Assembly of Heme A and Heme B in a Designed Four-Helix Bundle: Implications for a Cytochrome *c* Oxidase Maquette. *Biochemistry*, 39:11041-11049.
- Gibney** BR, Rabanal F, Reddy KS, Dutton PL. **1998**. Effect of Four Helix Bundle Topology on Heme Binding and Redox Properties. *Biochemistry*, 37:4635-4643.
- Gibney** BR, Rabanal F, Skalicky JJ, Wand AJ, Dutton PL. **1999**. Iterative protein redesign. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:4952-4960.
- Görner** H. **2003**. Photoprocesses of *p*-benzoquinones in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A*, 107:11587-11595.
- Gouterman** M. **1959**. Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin. *J. Chem. Phys.*, 30:1139-1161.
- Gouterman** M. **1961**. Spectra of Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.*, 6:138-163.
- Gouterman** M, Snyder LC, Wagnière GH. **1963**. Spectra of Porphyrins. 2. Four Orbital Model. *J. Mol. Spectrosc.*, 11:108-127.

- Gregory** RPF, Demeter S, Faludi-Daniel 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.
- Groenen** E, Orrit M. **2006**. Bilder sind folgender Homepage entnommen: <http://www.monos.leidenuniv.nl/smo/index.html>. Molecular Nano-Optics and Spins, Arbeitsgruppe: Single-Molecule Optics.
- Grosset** AM, Gibney BR, Rabanal F, Moser CC, Dutton PL. **2001**. Proof of Principle in a De novo Designed Protein Maquette: An Allosterically Regulated, Charge-Activated Conformational Switch in a Tetra- α -Helix Bundle. *Biochemistry*, 40:5474-5487.
- Günther** H. **1983**. *NMR-Spektroskopie. Eine Einführung in die Protonenresonanz-Spektroskopie und ihre Anwendungen in der Chemie. 2.*, verbesserte Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Gust** D, Moore TA. **1989**. Mimicking Photosynthesis. *Science*, 244:35-41.
- Gust** D, Moore TA. **1991**. Photosynthetic Model Systems. *Top. Curr. Chem.*, 159:103-151.
- Gust** D, Moore TA, Moore AL. **1998**. Mimicking bacterial photosynthesis. *Pure & Appl. Chem.*, 70:2189-2200.
- Häder** DP. **1999**. *Photosynthese*, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hales** BJ. **1975**. Immobilized Radicals. 1. Principal Electron-Spin Resonance Parameters of Benzosemiquinone Radical. *J. Am. Chem. Soc.*, 97:5993-5997.
- Han** SY, Kim YA. **2004**. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron*, 60:2447-2467.
- Hartwich** G, Fiedor L, Simonin I, Cmiel E, Schäfer W, Noy D, Scherz A, Scheer H. **1998**. Metal-Substituted Bacteriochlorophylls. 1. Preparation and Influence of Metal and Coordination on Spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:3675-3683.
- Hayashi** T, Miyahara T, Koide N, Kato Y, Masuda H, Ogoshi H. **1997**. Molecular Recognition of Ubiquinone Analogues. Specific Interaction between Quinone and Functional Porphyrin via Multiple Hydrogen Bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:7281-7290.
- Hecht** MH, Richardson JS, Richardson DC, Ogden RC. **1990**. De Novo Design, Expression, and Characterization of Felix: A Four-Helix Bundle Protein of Native-Like Sequence. *Science*, 249:884-891.
- Hesse** M, Meier H, Zeeh B. **1995**. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 5.*, überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Herzberg** G. **1945**. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules. In *Molecular Spectra and Molecular Structure*. Vol. II, Lancaster Press, Lancaster.
- Hoff** AJ. **1989**. *Advanced EPR – Application in Biology and Biochemistry*. Elsevier, Amsterdam.

- Hoff** AJ, De Groot A, Dikanov SA, Astashkin AV, Tsvetkov YuD. **1985**. Electron Spin Echo Envelope Modulation Spectroscopy (ESEEM) of the Radical Cations of ^{14}N and ^{15}N Bacteriochlorophyll *a*. *Chem. Phys. Lett.*, 118:40-47.
- Houssier** C, Sauer K. **1969**. Optical Properties of the Protochlorophyll Pigments. II. Electronic Absorption, Fluorescence, and Circular Dichroism Spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, 172:492-502.
- Hu** X und Schulten K. **1998**. Model for the Light-Harvesting Complex I (B875) of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.*, 75:683-694.
- Huang** SS, Gibney BR, Stayrook SE, Dutton PL, Lewis M. **2003**. X-ray Structure of a Maquette Scaffold. *J. Mol. Biol.*, 326:1219-1225.
- Imahori** H. **2004**. Porphyrin-fullerene linked systems as artificial photosynthetic mimics. *Org. Biomol. Chem.*, 2:1425-1433.
- Ishida** M, Dohmae N, Shiro Y, Oku T, Iizuka T, Isogai Y. **2004**. Design and Synthesis of De Novo Cytochromes *c*. *Biochemistry*, 43:9823-9833.
- Iwata** S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK. **1998**. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome *bc*₁ Complex. *Science*, 281:64-71.
- Jabben** M, Garcia NA, Braslavsky SE, Schaffner K. **1986**. Photophysical Parameters of Chlorophylls-*a* and Chlorophylls-*b* - Fluorescence and Laser-Induced Optoacoustic Measurements. *Photochem. Photobiol.*, 43:127-131.
- Jones** G, Vullev V, Braswell EH, Zhu D. **2000**. Multistep Photoinduced Electron Transfer in a de Novo Helix Bundle: Multimer Self-Assembly of Peptide Chains Including a Chromophore Special Pair. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:388-389.
- Jones** ID, White RC, Gibbs E, Butler LS. **1977**. Estimation of Zinc Pheophytins, Chlorophylls, and Pheophytins in Mixtures in Diethyl Ether or 80% Acetone by Spectrophotometry and Fluorometry. *J. Agric. Food. Chem.*, 25:146-149.
- Jones** ID, White RC, Gibbs E, Denard CD. **1968**. Absorption Spectra of Copper and Zinc Complexes of Pheophytins and Pheophorbides. *J. Agric. Food Chem.*, 16:80-83.
- Kalsbeck** WA, Robertson DE, Pandey RK, Smith KM, Dutton PL, Bocian DF. **1996**. Structural and Electronic Properties of the Heme Cofactors in a Multi-Heme Synthetic Cytochrome. *Biochemistry*, 35:3429-3438.
- Kamtekar** S, Hecht MH. **1995**. The four-helix bundle: what determines a fold? *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.*, 9:1013-1022.
- Karrasch** S, Bullough PA, Ghosh R. **1995**. The 8.5 Å Projection Map of the Light-Harvesting Complex I from *Rhodospirillum rubrum* Reveals a Ring Composed of 16 Subunits. *EMBO J.*, 14:631-638.

- Kasha M. 1950.** Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules. *Discuss. Faraday Soc.*, 9:14-19.
- Katz JJ. 1994.** Long-Wavelength Chlorophyll. *The Spectrum*, 7:1-9.
- Katz JJ, Ballschmiter K. 1968.** Chlorophyll-Water Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 7:286-287.
- Katz JJ, Oettmeier W, Norris JR. 1976.** Organization of Antenna and Photo-Reaction Center Chlorophylls on Molecular Level. *Phil. Trans. Roy Soc. London, Ser. B: Biol. Sc.*, 273:227-253.
- Kavarnos GJ, Turro NJ. 1986.** Photosensitization by Reversible Electron Transfer: Theories, Experimental Evidence, and Examples. *Chem. Rev.*, 86:401-449.
- Kehoe JW, Meadows KA, Parkes-Loach PS, Loach PA. 1998.** Reconstitution of Core Light-Harvesting Complexes of Photosynthetic Bacteria Using Chemically Synthesized Polypeptides. 2. Determination of Structural Features That Stabilize Complex Formation and Their Implications for the Structure of the Subunit Complex. *Biochemistry*, 37:3418-3428.
- Kemp DS, Leung SL, Kerkman DJ. 1981.** Models that demonstrate peptide bond formation by prior thiol capture. I. Capture by disulfide formation. *Tetrahedron Lett.*, 22:181-184.
- Kemp DS, Kerkman DJ. 1981.** Models that demonstrate peptide bond formation by prior thiol capture. II. Capture by organomercury derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 22:185-186.
- Kent SBH. 1988.** Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 57:957-989.
- Kikuchi J, Asakura T, Loach PA, Parkes-Loach PS, Shimada K, Hunter CN, Conroy MJ, Williamson MP. 1999.** A Light-Harvesting Antenna Protein Retains its Folded Conformation in the Absence of Protein-Lipid and Protein-Pigment Interactions. *Biopolymers*, 49:361-372.
- Kimmerlin T und Seebach D, 2005.** '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies. *J. Pept. Res.*, 65:229-260.
- Kirmaier C, Holton D. 1993.** Electron Transfer and Charge Recombination Reactions in Wild-Type and Mutant Bacterial Reaction Centers. In *The Photosynthetic Reaction Center*. Deisenhofer J, Norris JR (Hrsg.), Vol. II, Academic Press, San Diego.
- Kiwi J, Grätzel M. 1980.** Chlorophyll *a* Sensitized Redox Processes in Microemulsion Systems. *J. Phys. Chem.*, 84:1503-1507.
- Klette R, Törring JT, Plato M, Möbius K, Bönigk B, Lubitz W. 1993.** Determination of the g Tensor of the Primary Donor Cation Radical in Single Crystals of *Rhodobacter sphaeroides* R-26 Reaction Centers by 3-mm High-Field EPR. *J. Phys. Chem.*, 97:2015-2020.

- Kobayashi M**, Akiyama M, Kano H, Kise H. **2006**. Spectroscopy and Structure Determination. In *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*. Grimm B, Porra RJ, Rüdiger W, Scheer H (Hrsg.), Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 25, Kap. 6, Springer, Dordrecht.
- 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, Hiraishi A. **1998**. Structural Determination of the Novel Zn-Containing Bacteriochlorophyll in *Acidiphilium rubrum*. *Photochem. Photobiol.*, 20:75-80.
- Koder RL**, Dutton PL. **2006**. Intelligent design: the *de novo* engineering of proteins with specified functions. *Dalton Trans.*, 25:3045-3051.
- Koepke J**, Hu X, Muenke C, Schulten K, Michel H. **1996**. The Crystal Structure of the Light-Harvesting Complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*. *Structure*, 4:581-597.
- Kortüm G**. **1966**. *Lehrbuch der Elektrochemie*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Kozlov GV**, Ogawa MY. **1997**. Electron Transfer Across a Peptide-Peptide Interface Within a Designed Metalloprotein. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:8377-8378.
- Kuki A**, Boxer SG. **1983**. Chlorophyllide-Substituted Hemoglobin Tetramers and Hybrids: Preparation, Characterization, and Energy Transfer. *Biochemistry*, 22:2923-2933.
- Kurreck H**, Huber M. **1995**. Model Reactions for Photosynthesis-Photoinduced Charge and Energy-Transfer between Covalently-Linked Porphyrin and Quinone Units. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 34:849-866.
- Lancaster CRD**, Michel H. **2001**. Photosynthetic reaction centers of purple bacteria. In *Handbook of Metalloproteins*. Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghardt K (Hrsg.). J. Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Laporte LL**, Palaniappan V, Davis DG, Kirmaier C, Schenck CC, Holton D, Bocian DF. **1996**. Influence of Electronic Asymmetry on the Spectroscopic and Photodynamic Properties of the Primary Electron Donor in the Photosynthetic Reaction Center. *J. Phys. Chem.*, 100:17676-17707.
- Lapouge K**, Naeveke A, Robert B, Scheer H, Sturgis JN. **2000**. Exchanging Cofactors in the Core Antennae from Purple Bacteria: Structure and Properties of Zn-Bacteriopheophytin-Containing LH1. *Biochemistry*, 39:1091-1099.
- Law CJ**, Roszak AW, Southall J, Gardiner AT, Isaacs NW, Cogdell RJ. **2004**. The structure and function of bacterial light-harvesting complexes (Review). *Mol. Membr. Biol.*, 21:183-191.
- Levanon H**, Möbius K. **1997**. Advanced EPR spectroscopy on electron transfer processes in photosynthesis and biomimetic model systems. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26:495-540.
- Levanon H**, Neta P. **1982**. Electron-Transfer Reactions of Chlorophyll *a* and Porphyrin Triplets with Radicals in Aqueous Micellar Solutions. *J. Phys. Chem.*, 86:4532-4537.

- Levanon H, Norris JR. 1978.** The Photoexcited Triplet State and Photosynthesis. *Chem. Rev.*, 78:185-198.
- Liddell PA, Kuciauskas D, Sumida JP, Nash B, Nguyen D, Moore AL, Moore TA, Gust D. 1997.** Photoinduced Charge Separation and Charge Recombination to a Triplet State in a Carotene-Porphyrin-Fullerene Triad. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:1400-1405.
- Lieberman M, Sasaki T. 1991.** Iron (II) Organizes a Synthetic Peptide into Three-Helix Bundles. *J. Am. Chem. Soc.*, 113:1470-1471.
- Loach PA, Parkes-Loach PS. 1995.** Structure-Function Relationships in Core Light-Harvesting Complexes (LHI) as Determined by Characterization of the Structural Subunit and by Reconstitution Experiments. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Blankenship R, Madigan MT, Bauer CE (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Locardi E, Kessler H. 2003.** High Resolution NMR Spectroscopy. In *Methods of Organic Chemistry* (Houben-Weyl). Synthesis of Peptides and Peptidomimetics. Goodman M, Felix A, Moroder L, Toniolo C (Hrsg.), Vol. E 22b, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lombardi A, Nistri F, Pavone V. 2001.** Peptide-Based Heme-Protein Models. *Chem. Rev.*, 101:3165-3189.
- Lowe DJ. 1995.** *ENDOR and EPR of Metalloproteins*. Springer, New York.
- Lubitz W, Feher G. 1999.** The Primary And Secondary Acceptors in Bacterial Photosynthesis. III. Characterization of the Quinone Radicals $Q_A^{\bullet-}$ and $Q_B^{\bullet-}$ by EPR and ENDOR. *Appl. Magn. Reson.*, 17:1-48.
- Lüttge U, Kluge M, Bauer G. 1994.** *Botanik*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Maglio O, Nistri F, Pavone V, Lombardi A, DeGrado WF. 2003.** Preorganization of molecular binding sites in designed diiron proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:3772-3777.
- Manning MC. 1993.** Protein-Structure and Stability Assessment By Circular-Dichroism Spectroscopy. *ACS Symposium Ser.*, 516:33-52.
- Marcus RA. 1956.** On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. *J. Chem. Phys.*, 24:966-978.
- Marcus RA. 1959.** On the Theory of Electrochemical and Chemical Electron Transfer Processes. *Can. J. Chem.*, 37:155-163.
- Mathews FS. 2001.** *b*-Type cytochrome electron carriers: cytochromes b_{562} and b_5 , and flavocytochrome b_2 . In *Handbook of Metalloproteins*. Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghardt K (Hrsg.). J. Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Matthews JI, Braslavsky SE, Camilleri P. 1980.** The Photophysics of Bonellin - a Chlorin Found in Marine Animals. *Photochem. Photobiol.*, 32:733-738.

- McDermott** G, Prince SM, Freer AA, Hawthornthwaite-Lawless AM, Papiz MZ, Cogdell RJ, Isaacs NW. **1995**. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature*, 374:517-521.
- McGlynn** P, Hunter CN, Jones MR. **1994**. The *Rhodobacter sphaeroides* PufX Protein is not Required for Photosynthetic Competence in the Absence of a Light Harvesting System. *FEBS Lett.*, 349:349-353.
- McKay** FC, Albertson NF. **1957**. New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 79:4868-4690.
- Meadows** KA, Iida K, Tsuda K, Recchia PA, Heller BA, Antonio B, Nango M, Loach PA. **1995**. Enzymatic and Chemical Cleavage of the Core-Light-Harvesting Polypeptides of Photosynthetic Bacteria: Determination of the Minimal Polypeptide Size and Structure Required for Subunit and Light-Harvesting Complex Formation. *Biochemistry*, 34:1559-1574.
- Meadows** KA, Parkes-Loach PS, Kehoe JW, Loach PA. **1998**. Reconstitution of Core Light-Harvesting Complexes of Photosynthetic Bacteria Using Chemically Synthesized Polypeptides. 1. Minimal Requirements for Subunit Formation. *Biochemistry*, 37:3411-3417.
- Merrifield** RB. **1963**. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154.
- Milgrom** LR. **1997**. *The Colours of Life. An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. Oxford University Press, Oxford.
- Mims** WB. **1972**. Envelope Modulation in Spin-Echo Experiments. *Phys. Rev. B*, 5:2409-2419.
- Miyatake** T, Tamiaki H, Holzwarth AR, Schaffner K. **1999**. Self-Assembly of Synthetic Zinc Chlorins in Aqueous Microheterogeneous Media to an Artificial Supramolecular Light-Harvesting Device. *Helv. Chim. Acta*, 82:797-810.
- Moog** RS, Kuki A, Fayer MD, Boxer SG. **1984**. Excitation Transport and Trapping in a Synthetic Chlorophyllide Substituted Hemoglobin: Orientation of the Chlorophyll S1 Transition Dipole. *Biochemistry*, 23:1564-1571.
- Moore** GR, Pettigrew GW. **1990**. *Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physico-chemical Aspects*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Müller** H. **1997**. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, 204:88-94.
- Munoz** V, Serrano L. **1995**. Elucidating the Folding Problem of Helical Peptides Using Empirical Parameters. II. Helix Macrodipole Effects and Rational Modification of the Helical Content of Natural Peptides. *J. Mol. Biol.*, 245:275-296.
- Mutter** M, Altmann E, Altmann KH, Hersperger R, Koziej P, Nebel K, Tuchscherer G, Vuilleumier S. **1988**. The Construction of New Proteins. Part III. Artificial Folding Units by Assembly of Amphiphilic Secondary Structures on a Template. *Helv. Chim. Acta*, 71:835-847.

- Mutter M, Vuilleumier S. 1989.** A Chemical Approach to Protein Design - Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28:535-554.
- Mutz MW, Case MA, Wishart JF, Ghadiri MR, McLendon GL. 1999.** De Novo Design of Protein Function: Predictable Structure-Function Relationship in Synthetic Redox Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:858-859.
- Nastri F, Lombardi A, Morelli G, Maglio O, D'Auria G. 1997.** Hemoprotein Models Based on a Covalent Helix-Heme-Helix Sandwich: 1. Design, Synthesis, and Characterization. *Chem. Eur. J.*, 3:340-349.
- Norrish RGW, Porter G. 1949.** Chemical reactions produced by very high light intensities. *Nature*, 164:658-658.
- Noy D. 2005.** persönliche Mitteilung.
- Noy D, Dutton, PL. 2006.** Design of a Minimal Polypeptide Unit for Bacteriochlorophyll binding and Self-Assembly Based on Photosynthetic Bacterial Light-Harvesting Proteins. *Biochemistry*, 45:2103-2113.
- Noy D, Fiedor L, Hartwich G, Scheer H, 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.
- Oellerich S. 2001.** *Spektroskopische Charakterisierung von Konformationsübergängen des Cytochrom c*. Dissertation, Universität Essen/Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim an der Ruhr, Schriftenreihe des Max-Planck-Institutes für Strahlenchemie, Nr. 144.
- Oelze J. 1985.** Analysis of bacteriochlorophylls. *Methods Microbiol.*, 18:257-284.
- Pace CN. 1986.** Determination and Analysis of Urea and Guanidine Hydrochlorid Denaturation Curves. *Methods Enzymol.*, 131:266-280.
- Pace CN, Shirley BA, Thompson JA. 1989.** Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A Practical Approach*. Creighton TE (Hrsg.), IRL, Oxford.
- Palmer G. 1983.** Electron Paramagnetic Resonance of Hemoproteins. In *Iron Porphyrins, Part II*. Lever ABP, Gray HB (Hrsg.), Addison – Wesley Publishing Comp., London.
- Papiz MZ, Prince SM, Howard T, Cogdell RJ, Isaacs NW. 2003.** The Structure and Thermal Motion of the B800-850 LH2 Complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å Resolution and 100 K: New Structural Features and Functionally Relevant Motions. *J. Mol. Biol.*, 326:1523-1538.
- Parkes-Loach PS, Majeed AP, Law CJ, Loach PA. 2004.** Interactions Stabilizing the Structure of the Core Light-Harvesting Complex (LH1) of Photosynthetic Bacteria and its Subunit (B820). *Biochemistry*, 43:7003-7016.
- Parkes-Loach PS, Sprinkle JR, Loach PA. 1988.** Reconstitution of the B873 Light-Harvesting Complex of *Rhodospirillum rubrum* from the Separately Isolated α - and β -Polypeptides and Bacteriochlorophyll *a*. *Biochemistry*, 27:2718-2727.

- Parson WW, Cogdell RJ. 1975.** Primary Photochemical Reaction of Bacterial Photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 416:105-149.
- Peisach J, Blumberg WE, Adler A. 1973.** Electron Paramagnetic Resonance Studies of Iron Porphyrin and Chlorin Systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 206:310-327.
- Poole CP. 1997.** *Electron Spin Resonance: A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques*. 2. Auflage, Dover Publications, Dover.
- Porter G. 1950.** Flash Photolysis and Spectroscopy. A new method for the study of free radical reactions. *Proc. Roy. Soc. London Ser. A*, 200:284-300.
- Rabanal F, DeGrado WF, Dutton PL. 1996.** Use of 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) for the Heterodimerization of Cysteine Containing Peptides. Introduction of the 5-nitro-2-pyridinesulfonyl Group. *Tetrahedron Lett.*, 37:1347-1350.
- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. 1963.** Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *J. Mol. Biol.*, 7:95-99.
- Rau HK, DeJonge N, Haehnel W. 1998.** Modular synthesis of *de novo*-designed metalloproteins for light-induced electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:11526-11531.
- Rau HK, DeJonge N, Haehnel W. 2000.** Combinatorial Synthesis of Four-Helix Bundle Hemoproteins for Tuning of Cofactor Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39:250-253.
- Rau HK, Haehnel W. 1998.** Design, Synthesis, and Properties of a Novel Cytochrome *b* Model. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:468-476.
- Rau HK, Snigula H, Struck A, Robert B, Scheer H, Haehnel W. 2001.** Design, Synthesis and Properties of Synthetic Chlorophyll Proteins. *Eur. J. Biochem.*, 268:3284-3295.
- Razeghifard MR, Wydrzynski T. 2003.** Binding of Zn-Chlorin to a Synthetic Four-Helix Bundle Peptide through Histidine Ligation. *Biochemistry*, 42:1024-1030.
- Regan L, DeGrado W. 1988.** Characterization of a Helical Protein Designed from First Principles. *Science*, 241:976-978.
- Rehm D, Weller A. 1969.** Kinetics and Mechanics of Electron Transfer During Fluorescence Quenching in Acetonitrile. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, 73:834-839.
- Rimington C, Mason SF, Kennard O. 1958.** Porphin. *Spectrochim. Acta*, 12:65-77.
- Rivas de las J, Abadia A, Abadia J. 1989.** A New Reversed Phase-HPLC Method Resolving All Major Higher Plant Photosynthetic Pigments. *Plant Physiol.*, 91:190-192.
- Robertson DE, Farid RS, Moser CC, Urbauer JF, Mulholland SE, Pidikiti R, Lear JD, Wand AJ, DeGrado WF, Dutton PL. 1994.** Design and Synthesis of Multi-Heme Proteins. *Nature*, 368:425-432.
- Röder B. 1999.** *Einführung in die molekulare Photophysik*. Teubner Verlag, Stuttgart.

- Röder B, Wabnitz H. 1987.** Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Hematoporphyrin, Mesoporphyrin, Pheophorbide *a* and Chlorin *e*₆ in Ethanol and Aqueous Solution. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1:103-113.
- Rojas NRL, Kamtekar S, Simons CT, McLean JE, Vogel KM, Spiro TG, Farid RS, Hecht MH. 1997.** De novo heme proteins from designed combinatorial libraries. *Protein Sci.*, 6:2512-2524.
- Roszak AW, Howard TD, Southall J, Gardiner AT, Law CJ, Isaacs NW, Cogdell RJ. 2003.** Crystal Structure of the RC-LH1 Core Complex from *Rhodospseudomonas palustris*. *Science*, 302:1969-1972.
- Rowan LG, Hahn EL, Mims WB. 1965.** Electron-Spin-Echo Envelope Modulation. *Phys. Rev.*, 137: A61-A71.
- Sasaki T, Kaiser ET. 1989.** Helichrome: Synthesis and Enzymatic Activity of a Designed Hemeprotein. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:380-381.
- Sasaki T, Lieberman M. 1993.** Between the Secondary Structure and the Tertiary Structure falls the Globule: A Problem in *de novo* Protein Design. *Tetrahedron*, 49:3677-3689.
- Sauer K, Austin LA. 1978.** Bacteriochlorophyll-Protein Complexes from the Light-Harvesting Antenna of Photosynthetic Bacteria. *Biochemistry*, 17:2011-2019.
- Sauer K, Smith JRL, Schultz AJ. 1966.** The Dimerization of Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b* and Bacteriochlorophyll in Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 88:2681-2688.
- Scheer H. 1991.** *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton.
- Scheer H, Hartwich G. 1995.** Bacterial Reaction Centers with Modified Tetrapyrrol Chromophores, in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Blankenship R, Madigan MT, Bauer CE (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Scheer H, Inhoffen HH. 1978.** Hydroporphyrins: Reactivity, Spectroscopy and Hydroporphyrin Analogues. In *The Porphyrins*. Vol. 2, Dolphin D (Hrsg.), Academic Press, New York.
- Schlegel HG. 1992.** *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schnölzer M, Kent SBH. 1992.** Constructing Proteins by Dovetailing Unprotected Synthetic Peptides: Backbone-Engineered HIV Protease. *Science*, 256:221-225.
- Scholes CP, Lapidot A, Mascarenhas R, Inubushi T, Isaacson RA, Feher G. 1982.** Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) from Heme and Histidine Nitrogens in Single Crystals of Aquometmyoglobin. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:2724-2735.
- Schweiger A. 1991.** Puls-Elektronenspinresonanz-Spektroskopie: Grundlagen, Verfahren und Anwendungsbeispiele. *Angew. Chem.*, 103:223-250.
- Schweiger A, Jeschke G. 2001.** *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*. Oxford University Press, Oxford.

Seidel RW. 2006. *Einlagerung von Metalloporphyrinen in de novo synthetisierte Peptide*. Diplomarbeit. Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie/Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Senge MO. 1992. The conformational flexibility of tetrapyrroles – current model studies and photobiological relevance. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 16:3-36.

Serrano-Andrés L, Merchán M, Rubio M, Roos BO. 1998. Interpretation of the electronic absorption spectrum of free base porphyrin by using multiconfigurational second-order perturbation theory. *Chem. Phys. Lett.*, 295:195-203.

Sharp RE, Diers JR, Bocian DF, Dutton PL. 1998a. Differential Binding of Iron(III) and Zinc(II) Protoporphyrin IX to Synthetic Four-Helix Bundles. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:7103-7104.

Sharp RE, Moser CC, Rabanal F, Dutton PL. 1998b. Design, synthesis and characterization of a photoactivatable flavocytochrome molecular maquette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:10465-10470.

Sherman GM. 1969. Circular Dichroism of Long Wavelength Forms of Chlorophyll *a*. *Nature*, 224:1108-1110.

Shifman JM, Gibney BR, Sharp RE, Dutton PL. 2000. Heme Redox Potential Control in de novo Designed Four- α -Helix Bundle Proteins. *Biochemistry*, 39:14813-14821.

Shifman JM, Moser CC, Kalsbeck WA, Bocian DF, Dutton PL. 1998. Functionalized *de Novo* Designed Proteins: Mechanisms of Proton Coupling to Oxidation/Reduction in Heme Protein Maquettes. *Biochemistry*, 37:16815-16827.

Shimada K, Itoh S, Iwaki M, Nagashima KVP, Matsuura K, Kobayashi M, Wakao N. 1998. Reaction Center Complex Based on Zn-Bacteriochlorophyll from *Acidiphilium rubrum*, in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Garab G (Hrsg.), *Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 11th, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Smith KM. 1976. *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Snigula H. 2003. *(Bakterio-)Chlorophyll-Modifikationen zur Einlagerung in synthetische Peptide*. Dissertation, Fakultät für Biologie, LMU München.

Spiro TG. 1975. Resonance Raman Spectroscopic Studies of Heme Proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 416:169-189.

Spiro TG, Strekas TC. 1974. Resonance Raman Spectroscopy of Heme Proteins. Effects of Oxidation and Spin State. *J. Am. Chem. Soc.*, 96:338-345.

Sreenathan BR, Taylor CPS. 1971. The insensitivity of 695 nm band of horse heart ferricytochrome *c* to protein conformation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 42:1122-1126.

Steenken S, Neta P. 2003. Transient phenoxyl radicals: Formation and properties in aqueous solutions. In *The Chemistry of Phenols*. Rappaport Z (Hrsg.), Wiley, New York.

- Steinberg-Yfrach** G, Liddell PA, Hung SC, Moore AL, Gust D, Moore TA. **1997**. Conversion of light energy to proton potential in liposomes by artificial photosynthetic reaction centers. *Nature*, 385:239-241.
- Stevens** KWH. **1952**. Matrix Elements and Operator Equivalents Connected with the Magnetic Properties of Rare Earth Ions. *Proc. Phys. Soc. A.*, 65:209-215.
- Stone** AJ. **1963**. G factors of aromatic free radicals. *Mol. Phys.*, 6:509-515.
- Stone** AJ. **1964**. G tensors of aromatic hydrocarbons. *Mol. Phys.*, 7:311-316.
- Stryer** L. **1968**. Fluorescence Spectroscopy of Proteins. *Science*, 162:526-533.
- Stryer** L. **1999**. *Biochemie*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Suslick** KS, Watson RA. **1992**. The Photochemistry of Chromium, Manganese, and Iron Porphyrin Complexes. *New J. Chem.*, 16:633-642.
- Tamiaki** H, Amakawa M, Shimono Y, Tanikaga R, Holzwarth AR, Schaffner K. **1996**. Synthetic Zinc and Magnesium Chlorin Aggregates as Models for Supramolecular Antenna Complexes in Chlorosomes of Green Photosynthetic Bacteria. *Photochem. Photobiol.*, 63:92-99.
- Tanaka** M. **2006**. *Side-Chain Chiral Centers of Amino Acids and Helical-Screw Handedness of their Peptides*. Vortrag. European Peptide Symposium 2006, Gdansk.
- Tanford** C. **1970**. Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv. Protein Chem.*, 24:1-95.
- Tanielian** C, Wolff C, Esch M. **1996**. Singlet Oxygen Production in Water: Aggregation and Charge-Transfer Effects. *J. Phys. Chem.*, 100:6555-6560.
- Toothill** C. **1967**. The Chemistry of the In Vivo Reaction Between Haemoglobin and Various Oxides of Nitrogen. *Br. J. Anaesth.*, 39:405-412.
- Turro** NJ. **1991**. *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, Mill Valley.
- Valeur** B. **2002**. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Vannelli** TA, Karpishin TB. **2000**. Neocuproine-Extended Porphyrin Coordination Complexes. 2. Spectroscopic Properties of the Metalloporphyrin Derivatives and Investigations into the HOMO Ordering. *Inorg. Chem.*, 39:340-347.
- Voet** D, Voet JG. **1992**. *Biochemie*. Deutsche Übersetzung, Maelicke A, Müller-Esterl W (Hrsg.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Walker** FA. **2004**. Models of the Bis-Histidine-Ligated Electron-Transferring Cytochromes. Comparative Geometric and Electronic Structure of Low-Spin Ferro- and Ferrihemes. *Chem. Rev.*, 104:589-615.

- Walker** FA, Reis D, Balke VL. **1984**. Models of the Cytochromes *b*. 5. EPR Studies of Low-Spin Iron(III) Tetraphenylporphyrins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106:6888-6898.
- Wardman** P. **1989**. Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Ref. Data*, 18:1637-1755
- Wasielowski** MR. **1992**. Photoinduced Electron-Transfer in Supramolecular Systems for Artificial Photosynthesis. *Chem. Rev.*, 92:435-461.
- Watanabe** T, Honda K. **1980**. Lifetime of Chlorophyll *a* Radical Cation in Water-Containing Acetonitrile. *J. Am. Chem. Soc.*, 102:370-372.
- Watanabe** T, Honda K. **1982**. Measurement of the Extinction Coefficient of the Methyl Viologen Cation Radical and the Efficiency of its Formation by Semiconductor Photocatalysis. *J. Phys. Chem.*, 86:2617-2619.
- Weber** G, Teale FWJ. **1957**. Determination of the Absolute Quantum Yield of Fluorescent Solutions. *Trans. Faraday Soc.*, 53:646-655.
- Weil** JA, Bolton JR, Wertz JE. **1994**. *Electron Paramagnetic Resonance - Elementary Theory and Practical Applications*. Wiley, New York.
- Weiss** C. **1972**. The Pi Electron Structure and Absorption Spectra of Chlorophylls in Solution. *J. Mol. Spectrosc.*, 44:37-80.
- Weiss** C. **1978**. Electronic Absorption Spectra of Chlorophylls. In *The Porphyrins*. Dolphin D (Hrsg.), Vol. III, Kap. 3, Academic Press, New York.
- Weiss** C, Kobayashi H, Gouterman H. **1965**. Spectra of Porphyrins. Part III. Self-Consistent Molecular Orbital Calculations of Porphyrin and Related Ring Systems. *J. Mol. Spectrosc.*, 16:415-450.
- Whitford** D. **2005**. *Proteins - Structure and Function*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Wieland** T, Bokelmann E, Bauer L, Lang HU, Lau H. **1953**. Über Peptidsynthesen. 8. Mitteilung: Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 583:129-149.
- Williams** DH, Fleming I. **1985**. *Strukturauflösung in der organischen Chemie. Eine Einführung in die spektroskopischen Methoden*. 5., neubearbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Woodward** RB, Ayer WA, Beaton JM, Bickelhaupt F, Bonnett R, Buchschacher P, Closs GL, Dutler H, Hannah J, Hauck FP Ito S, Langemann A, Legoff E, Leimgruber W, Lwoski W, Sauer J, Valenta Z, Volz H. **1960**. The Total Synthesis of Chlorophyll. *J. Am. Chem. Soc.*, 82:3800-3802.
- Wüthrich** K. **1995**. NMR - This other Method for Protein and Nucleic Acid Structure Determination. *Acta Cryst.*, 51:249-270.

Wüthrich K. 2003. NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules (Nobel Lecture). *Angew. Chem.-Int. Ed.*, 42:3340-3363.

Zahn H. 1967. Chemische Synthese von Proteinen. *Naturwissenschaften*, 54:396-402.

Zech SG. 1998. *Pulsed and Transient Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy on Light-Induced Radical Pairs in Photosynthetic Reaction Centers*. Shaker Verlag, Aachen.

Zhou NE, Kay CM, Hodges RS. 1993. Disulfide Bond Contribution to Protein Stability: Positional Effects of Substitution in the Hydrophobic Core of the Two-Stranded α -Helical Coiled-Coil. *Biochemistry*, 32:3178-3187.

Zuber H, Brunisholz RA. 1993. Structure and Function of Antenna Polypeptides and Chlorophyll-Protein Complexes: Principles and Variability. In *Chlorophylls*. Scheer H (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton.

Zurdo J, Centeno MA, Odriozola JA, Fernandez-Cabrera C, Ramirez JM. 1995. The structural role of the carotenoid in the bacterial light-harvesting protein 2 (LH2) of *Rhodobacter capsulatus*. A Fourier transform Raman spectroscopy and circular dichroism study. *Photosynth. Res.*, 46:363-369.

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Lubitz für die Aufnahme am Institut und für die interessante Themenstellung, die viele Freiräume für eigene Ideen offen ließ. Ich möchte mich zudem für stetige Diskussionsbereitschaft, wertvolle Hinweise und Unterstützung während der gesamten Promotion und nicht zuletzt für die Möglichkeit zur Teilnahme an Konferenzen bedanken.

Für die Übernahme des Koreferats möchte ich Herrn Prof. Dr. Weinkauf einen großen Dank aussprechen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Gruppenleiter Herrn Prof. Dr. Gärtner, der zu jeder Zeit interessiert den Fortgang dieser Arbeit verfolgt hat und bei dem immer die Tür offen stand für zahlreiche Diskussionen und Anregungen. Für sein Interesse und sein Zuhören danke ich ihm sehr.

Für die Unterstützung und ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit möchte ich folgenden Personen herzlichst danken:

- Inge Heise für die Synthese und Aufreinigung zahlreicher Peptide, für ihre Geduld und ihre Erfahrung bei unserer „Montags-HPLC“, die dank Ihrer nächtlichen Ideen am nächsten Tag meistens wieder funktionierte. Vor allem für die Synthese der hydrophoben Peptide, die in der Handhabung so schwierig waren, möchte ich mich noch einmal für Ihren unermüdlichen Einsatz bedanken
- Dr. Maurice van Gastel für die Aufnahme der vielen EPR-Spektren und die Entwicklung des Triplett-Simulationsprogramms. Ohne seine Erfahrung auf dem Gebiet der EPR, seine Ideen und sein Interesse an meiner Arbeit wäre die Bearbeitung meines Themas nicht möglich gewesen
- Dr. Helmut Görner für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der transienten Absorptionsmessungen, für zahlreiche weitere optischen Messungen, die vielen Diskussionen und Ideen, die Literaturrecherche, das Interesse an meiner Arbeit und nicht zuletzt für die wertvolle Hilfe und Unterstützung der gemeinsamen Publikation
- Manuela Trinoga für die zügigen und sehr guten HPLC-Aufreinigungen, für die Hilfsbereitschaft und ihr Wissen auf dem Gebiet der HPLC
- Rüdiger W. Seidel für die chemische Titration des FePPIX-me-1-Komplexes im Rahmen seiner Diplomarbeit
- Norbert Dickmann für die Aufnahme zahlreicher MALDI-TOF-Massenspektren
- Der Serviceabteilung für Massenspektrometrie am MPI für Kohlenforschung
- Christoph Laurich für die Hilfe bei der Durchführung der Redox-titrations, für das Abschmelzen zahlreicher EPR-Proben und für das Ausleihen der Pipetten, was mir häufig einen erneuten Gang zurück auf die zweite Etage ersparte

- Dr. Eberhard Bothe für das Interesse an den elektrochemischen Experimenten und für viele fruchtbare Diskussionen
- Birgit Nöring für die Bestimmung der Halbpotentiale einiger Mediatoren
- Michael Reus aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Holzwarth für die Hilfestellung bei der Gelchromatographie und für die getrockneten *Rhodobacter*-Zellen
- Petra Kellers für die Überlassung der Zellextrakte mit (viel) BChl_a
- Marion Stapper aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Neese für die Aufnahme der Resonanz-Raman-Spektren
- Dr. Peter Paul Schmidt für die bereitwillige Hilfestellung in biochemischen Fragestellungen und Auswertungen
- Birgit Deckers für die hilfsbereite und kompetente Unterstützung bei grafischen Abbildungen
- Andreas Göbels für die „Bedienungsanleitung“ des CD-Spektrometers und die Photomultiplierwechsel
- Jörg Bitter und Kerstin Sand für die Aufnahme der NMR-Spektren
- Leslie Currell, Gül Koc, Gudrun Klihm, Helene Steffen, Tanja Berndsen und Frank Reikowski für die Unterstützung und Hilfestellungen bei verschiedenen technischen Geräten. Ohne Ihren Einsatz wäre die Durchführung vieler Experimente nicht möglich gewesen
- Dr. Thorsten Daubenfeld vom Laboratoire DCMR am Ecole Polytechnique in Palaiseau für die Aufnahme der ESI-Spektren vom FePPIX-me-1-Komplex
- Dr. Peter Schmieder vom Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie in Berlin für die NMR-Messungen am “sph β 31“
- Alessandra Hoppe für die abschließende Durchsicht der Arbeit
- meiner „Punkt12“-Essensgruppe, egal in welcher Konstellation, für die vielen netten Gespräche und Erzählungen.

Mein allergrößter Dank aber gilt meinen Eltern und Frank.

Liebe Mama, lieber Papa. Ich weiß, dass Ihr zu jeder Zeit immer an mich gedacht, geglaubt und mir Glück gewünscht habt. Ohne Eure Liebe und Unterstützung wäre es nicht möglich gewesen, dass ich nun hier sitze und die Danksagung meiner Dissertation schreiben kann. Vielen, vielen Dank!

Frank, ich danke Dir über alles für Deine Liebe und Wärme.

Alle Experimente wurden durch die Max-Planck-Gesellschaft und dem Sonderforschungsbereich 663 (Teilprojekt A7) unterstützt.

Lebenslauf

Zur Person

Anke Mennenga
geboren am 15. Januar 1978 in Norden
ledig
deutsche Staatsangehörigkeit

Studium

- 06/2003-03/2007 Promotion an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (angefertigt am Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie) zum Thema: „Einlagerung von Häm, Chlorophyll- und Bakteriochlorophyllderivaten in *de novo* synthetisierte Peptide als Modellsysteme natürlicher Protein-Kofaktor-Komplexe“
- 10/2002-04/2003 Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Pflanzen an der Bergischen Universität Wuppertal zum Thema: „Antibiotische Wirkung von Naturstoffen aus Hanf und Gewürzen“
- 10/1997-04/2003 Studium der Chemie an der Bergischen Universität Wuppertal
Abschluss: Diplom-Chemikerin

Studentische Tätigkeiten

- seit 06/2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie in Mülheim a. d. Ruhr
- 09/2001-06/2002
und
10/2002-03/2003 Studentische Hilfskraft am Institut für Physiologische Chemie der Pflanzen an der Bergischen Universität Wuppertal
- 04/2001-07/2001 Studentische Hilfskraft am Institut für Anorganische Chemie an der Bergischen Universität Wuppertal
- 02/1998-03/1998
und
08/1998-09/1998 Werkstudentin bei der Bayer AG, Wuppertal

Schulbildung

- 1984-1997 Grundschule Lintel, Orientierungsstufe und Ulrichsgymnasium in Norden;
Abschluss: Abitur

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Mülheim, den 17.01.2007

Anke Mennenga