

Lehrstuhl für Physik Weihenstephan

Lochbrennspektroskopie von Biomolekülen in äußeren Feldern

Markus R. Stübner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Fischer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Friedrich
2. Univ.-Prof. Dr. F. G. Parak

Die Dissertation wurde am 18.11.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 17.12.2002 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Spektrales Lochbrennen	5
2.1.1	Optische Übergänge in dotierten Festkörpern	5
2.1.2	Methode des spektralen Lochbrennens	8
2.2	Starkeffekt	12
2.2.1	Grundlegende Überlegungen	12
2.2.2	Spektrale Löcher im elektrischen Feld	15
2.3	Druckeffekt	22
2.3.1	Wechselwirkungen: Chromophor \leftrightarrow Matrix	22
2.3.2	Spektrale Löcher unter Druck	24
2.3.3	Kompressibilität und Volumenfluktuationen	27
2.3.4	Näherungen des mikroskopischen Modells	28
3	Experiment	31
3.1	Lasersysteme und Monochromator	31
3.2	Kryostat und optischer Aufbau	34
3.3	Starkeffekt	36
3.4	Druckeffekt	40
4	Aromatische Aminosäuren	45
4.1	Einleitung	45
4.1.1	Aufbau und Struktur von Proteinen	45
4.1.2	Proteine in der Spektroskopie	49
4.1.3	Die aromatischen Aminosäuren	51
4.1.4	BPTI: Ein Anwendungsbeispiel	52
4.2	Probenpräparation	55
4.3	pH und tiefe Temperaturen	57
4.3.1	Titrationsexperimente	57
4.3.2	pH-Wert bei tiefen Temperaturen	59
4.4	Phenylalanin	62
4.4.1	Absorptionsspektrum	62
4.4.2	Starkeffekt	62

4.5	Tyrosin	69
4.5.1	Absorptions- und Emissionsspektren	69
4.5.2	Starkeffekt	71
4.6	Tryptophan	77
4.7	BPTI	80
4.7.1	Absorptions- und Emissionsspektren	80
4.7.2	Starkeffekt	80
4.7.3	Druckeffekt	85
4.8	Zusammenfassung	91
5	Farbstoff-DNA-Komplexe	95
5.1	Einleitung	95
5.1.1	Aufbau und Struktur der DNA	95
5.1.2	Telomere und Krebsforschung	99
5.1.3	Thrombin-Aptamer und Blutgerinnung	101
5.2	BODIPY-DNA-Systeme	103
5.2.1	Der BODIPY-Farbstoff	103
5.2.2	BP-Thymin-Komplex	105
5.2.3	BP-Haarnadelstrukturen	105
5.2.4	BP-Aptamer	107
5.2.5	BP-Telomer	108
5.3	Starkeffekt	109
5.4	Druckeffekt	121
5.5	Zusammenfassung	134
A	Abkürzungen	137

Abbildungsverzeichnis

2.1	Homogene und inhomogene Linienbreite	7
2.2	Methode des spektralen Lochbrennens	9
2.3	Verbreiterungsmechanismen des Starkeffekts	16
2.4	Fallbeispiele des Starkeffekts	18
2.5	Simulation der Fallbeispiele	20
3.1	Laseraufbau	33
3.2	Kryostat und optischer Aufbau	35
3.3	Anordnung des Starkeffekt-Experiments	37
3.4	Beispiel eines Starkeffekts spektraler Löcher	39
3.5	Anordnung des Druckeffekt-Experiments	41
3.6	Beispiel eines Druckeffekts spektraler Löcher	43
4.1	Aufbau und Struktur von Proteinen	47
4.2	Struktur der aromatischen Aminosäuren	50
4.3	Absorptionsspektren der aromatischen Aminosäuren	52
4.4	Aufbau und Struktur von BPTI	53
4.5	Titrationsskurve von Phenylalanin	58
4.6	Struktur von Fluorescein	60
4.7	pH-Wert bei tiefen Temperaturen	61
4.8	Absorptionsspektren von Phenylalanin	63
4.9	Starkspektren von Phenylalanin	64
4.10	Starkverbreiterung von Phenylalanin	65
4.11	Absorptions- und Emissionsspektren von Tyrosin	70
4.12	Starkspektren von Tyrosin bei pH 1.65	72
4.13	Starkspektren von Tyrosin bei pH 7.5	73
4.14	Absorptions- und Emissionsspektren von Tryptophan	78
4.15	Absorptions- und Emissionsspektren von BPTI	81
4.16	Starkspektren von BPTI	82
4.17	Druckeffekt von Tyrosin in freier Lösung	86
4.18	Druckeffekt von Tyrosin in BPTI	87
4.19	Strukturdetails von BPTI	89
5.1	Struktureller Aufbau der DNA	96
5.2	DNA-Basenpaarungen und Guanin-Quartett-Struktur	98
5.3	BP-DNA-Komplexe	104

5.4	Absorptionsspektren der BP-DNA-Systeme	106
5.5	Starkeffekt-Beispiel der BP-DNA-Komplexe	110
5.6	Starkeffekt des freien Chromophors BP	111
5.7	Starkeffekt des BP-Thymin-Komplexes	112
5.8	Starkeffekt von BP-HD-A	113
5.9	Starkeffekt von BP-HD-B	114
5.10	Starkeffekt von BP-Apt	115
5.11	Druckeffekt-Beispiel der BP-DNA-Komplexe	122
5.12	Druckeffekt des freien Chromophors BP	125
5.13	Druckeffekt des BP-Thymin-Komplexes	126
5.14	Druckeffekt von BP-HD-A	127
5.15	Druckeffekt von BP-HD-B	128
5.16	Druckeffekt von BP-Apt	129
5.17	Druckeffekt von BP-Tel	130

Tabellenverzeichnis

3.1	Lasersysteme und Frequenzbereiche	32
4.1	pK _S -Werte und isoelektrische Punkte von Phe, Tyr und Trp	57
4.2	pH-Wert bei tiefen Temperaturen	60
4.3	Ionenformen von Phenylalanin	66
4.4	Starkeffekt von Phenylalanin	67
4.5	Starkeffekt von Tyrosin	74
5.1	Telomer-Sequenzen	100
5.2	Absorptionsbanden der BP-DNA-Systeme	107
5.3	Starkeffekt-Resultat der BP-DNA-Komplexe	119
5.4	Druckeffekt und inhomogene Bande	123
5.5	Druckeffekt-Resultate der BP-DNA-Komplexe	124

Kapitel 1

Einleitung

Mit einer hochauflösenden optischen Methode, dem sogenannten spektralen Lochbrennen, können Wechselwirkungen zwischen einem Sondenmolekül und seiner lokalen Umgebung studiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Lochbrenn-Experimente an Biomolekülen in äußeren Feldern ausgeführt, um elektrostatische und elastische Eigenschaften der Sonden-Umgebung zu bestimmen.

Strahlt man mit schmalbandigem Laserlicht in die inhomogene Absorptionsbande der Farbstoffsonde ein, wird ein Ensemble von Molekülen selektiert, die alle ausschließlich bei der Laserfrequenz absorbieren. Bei Verwendung eines geeigneten Sondenmoleküls wird eine photochemische Reaktion in Gang gesetzt, die zu einem frequenzselektiven Ausbleichen führt. Als Folge davon erscheint im Spektrum ein sogenanntes spektrales Loch. Solche spektrale Löcher können auch als extrem hochaufgelöste Frequenzmarker gesehen werden, wobei ihre Reaktionen auf beliebige Einflüsse, wie z.B. auf dynamische Prozesse in der Matrix, auf externe und interne elektrische Felder oder auf die Änderung des hydrostatischen Drucks, völlig dem Verhalten des durch den Laser weggebrannten Ensembles entsprechen.

Die Lochbrennspektroskopie wird bereits seit langem als hochempfindliche optische Methode an Biopolymeren eingesetzt. Dafür wurden bisher immer geeignete photoreaktive Chromophore benötigt. Da viele Proteine über keine chromophore Gruppen verfügen, war die Anzahl an natürlichen Proteinen für diese optische Methode stark eingeschränkt. Aus diesem Grund war es ein wichtiges Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, inwieweit aromatische Aminosäuren als Sondenmoleküle für die Lochbrennspektroskopie benutzt werden können. Könnten aromatische Aminosäuren als intrinsische Sonden eingesetzt werden, so würden nun auch Proteine ohne eigenes Chromophorsystem für spektrales Lochbrennen zur Verfügung stehen. Somit wären chemische Modifikationen zur Farbstoffmarkierung von Proteinen nicht notwendig. Ein weiterer Vorteil würde in der grundsätzlichen Möglichkeit bestehen, die Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Sondenmolekül und seiner lokalen Umgebung an unterschiedlichen Positionen innerhalb des Proteins zu messen.

Da die aromatischen Aminosäuren im ultravioletten Spektralbereich absorbieren, ist ein erheblicher technischer Aufwand erforderlich. Nach Überwindung anfänglicher Schwierigkeiten konnte aber am Beispiel des Proteins BPTI gezeigt werden, daß hochauflösende Lochbrennspektroskopie mit intrinsischen aromatischen Aminosäuren möglich ist.

Proteine sind komplexe Biomoleküle, die nur in ihrem korrekt gefalteten Zustand ihre Funktion in einwandfreier Weise erfüllen. Die Struktur dieses sogenannten nativen Zustands ist für jedes Protein auf seine entsprechende Funktion hin optimiert und erfordert das Zusammenwirken einer Vielzahl unterschiedlicher Wechselwirkungen, wobei die elektrostatischen Wechselwirkungen eine herausragende Rolle einnehmen. Für das Verständnis von Faltung, Struktur, Funktion und Stabilität eines Proteins sind demnach detaillierte Kenntnisse über die elektrostatischen Kräfte innerhalb des Biopolymers von besonderer Wichtigkeit.

Mit Hilfe von theoretischen Simulationen können elektrostatische Felder innerhalb von Proteinen im Detail berechnet werden. Entsprechende Modelle und Programme existieren bereits seit einigen Jahren. In vielen Fällen sind allerdings die notwendigen Startparameter, wie z.B. Ladungen, Dipolmomente, Protonierungszustände etc. unter bestimmten Bedingungen unbekannt und müssen durch gute Schätzwerte ersetzt werden. Um Resultate aus elektrostatischen Berechnungen sowie die dazu erforderlichen Startparameter überprüfen zu können, werden geeignete Experimente zur Bestimmung derartiger Wechselwirkungen innerhalb des Proteins an unterschiedlichen Positionen benötigt. Aufgrund seiner hohen Auflösung und Empfindlichkeit ist der Starkeffekt spektraler Löcher dazu hervorragend geeignet.

Um den Starkeffekt an Proteinen auswerten zu können, ist es zunächst notwendig, die elektrostatischen Eigenschaften der Sondenmoleküle zu kennen. Aus diesem Grund wurden zunächst die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in Lösung untersucht. An der aromatischen Aminosäure Phenylalanin wurden Starkeffekt-Messungen als Funktion des pH-Wertes ausgeführt. Dabei standen die beiden Fragestellungen im Vordergrund, inwieweit die Carboxyl- bzw. die Aminogruppe die Symmetrieeigenschaften des π -Elektronensystems beeinflusst und wie stark sich der pH-Wert über die beiden funktionellen Gruppen auf die elektrostatischen Eigenschaften der π -Elektronen der Aminosäure auswirkt. Mit ihrem quasi-zentrosymmetrischen π -Elektronensystem kann Phenylalanin z.B. als intrinsische Sonde zur Bestimmung lokaler Proteinfelder mittels Starkeffekt-Messungen genutzt werden. Für Tyrosin wurden ebenfalls pH-abhängige Lochbrenn-Experimente durchgeführt. Im Gegensatz zu Phenylalanin besitzt Tyrosin jedoch aufgrund der Symmetriestörung des π -Elektronensystems durch die OH-Gruppe am aromatischen Ring ein permanentes Dipolmoment, wie aus den Starkeffekt-Messungen eindeutig hervorgeht. Spektrale Löcher können

in Tyrosin nur gebrannt werden, wenn die Hydroxylgruppe in protonierter Form vorliegt. In Tryptophan ändert sich das elektrische Dipolmoment nach optischer Anregung so stark, daß eine effektive Ankopplung an Gitterschwingungen der Matrix erfolgt, die in der vorliegenden Arbeit die Erzeugung spektraler Löcher verhinderte. In dem kleinen Protein BPTI diente Tyr10 als intrinsisches Sondenmolekül, um elektrostatische und elastische Eigenschaften über UV-Lochbrenn-Experimente zu untersuchen.

Neben der großen Vielzahl an Proteinen stellen DNA-Moleküle eine weitere bedeutende Gruppe von Biomolekülen dar. Farbstoff-DNA-Komplexe sind infolge ihres vielschichtigen Netzwerkes aus unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Chromophor, Lösungsmittel und DNA-Molekül äußerst interessante biologische Systeme, die sich gut für die Untersuchung mittels optischer Spektroskopie eignen. Für das Verständnis zahlreicher biologischer Reaktionen sind die Wechselwirkungen, die sich zwischen dem DNA-Strang und speziellen Substratmolekülen (z.B. Proteine oder medizinische Wirkstoffe) ausbilden, grundlegend.

Die in diesem Zusammenhang verwendete Farbstoffsonde BODIPY zeichnet sich durch hohe interne Beweglichkeit, gute spektrale Eigenschaften und eine problemlose kovalente Verknüpfung an DNA-Moleküle aus. Die Auswahl der unterschiedlichen DNA-Sequenzen erfolgte nach strukturellen Kriterien: Neben einer ungeordneten linearen Kette aus zehn Thymin-Nucleotiden wurden wohlgeordnete Haarnadel-Strukturen sowie äußerst kompakte sog. Guanin-Quartett-Strukturen verwendet. Letztere spielen in den Vorgängen der Blutgerinnung (Thrombin-Aptamer) und in der Krebsforschung (telomere Sequenz des Einzellers *Oxytricha nova*) eine bedeutende Rolle für die therapeutische Anwendung. Ziel dieser Arbeit war es, diese vielschichtigen Wechselwirkungen an den Farbstoff-DNA-Komplexen zu untersuchen.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Spektrales Lochbrennen

Für die Vorstellung der Modelle des Stark- bzw. Druckeffekts spektraler Löcher sind zunächst Detailkenntnisse zur Erzeugung derartiger Löcher im Absorptionsspektrum der untersuchten Sondenmoleküle notwendig.

2.1.1 Optische Übergänge in dotierten Festkörpern

Chromophor im Vakuum

Zunächst soll ein einzelnes Farbstoffmolekül im Vakuum betrachtet werden. Es kann durch eine elektromagnetische Welle vom Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand befördert werden. Die Linienbreite dieses optischen Übergangs hängt von der Lebensdauer T_1 des angeregten Zustands ab und wird durch Prozesse wie Fluoreszenz, Intersystem Crossing etc. begrenzt. Die Heisenbergsche Unschärferelation verknüpft die sogenannte *natürliche Linienbreite* γ_0 mit der Lebensdauer des angeregten Zustands T_1 auf folgende Weise:

$$\gamma_0 = \frac{1}{2\pi T_1} \quad (2.1)$$

Chromophor im idealen Kristall

Werden nun diese Farbstoffmoleküle in geringer Konzentration in einen perfekten Kristall eingebracht, ergeben sich aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Kristallumgebung Veränderungen ihrer Energieniveaus. Wechselwirkungen zwischen einzelnen Chromophoren können durch die geringe Konzentration im Wirtsgitter aufgrund genügend großer Abstände vernachlässigt werden. Die Folge sind nun Verschiebungen der Übergangsfrequenzen, die zu der sogenannten *Lösungsmittelverschiebung* führen. Da sich jedoch in diesem idealen Kristall die Mikro-Umgebungen der Farbstoffmoleküle exakt gleichen (siehe auch Abb. 2.1 (a)), werden alle Farbstoffübergänge *identisch* verschoben.

Relaxationsprozesse

Neben der Lösungsmittelverschiebung ergeben sich zusätzlich auch Änderungen in der Linienbreite des optischen Übergangs. Thermische Bewegungen des Kristallgitters verursachen die sogenannte *Phasenrelaxation*, die letztendlich zu einer Linienverbreiterung führt und auf folgende Weise erklärt werden kann: Ein Ensemble von Chromophoren wird beispielsweise durch einen geeigneten Laserpuls kohärent angeregt, d.h. in allen Farbstoffmolekülen ist eine phasengleiche Oszillation der Übergangsdipolmomente vorhanden. Durch Gitterschwingungen geht allerdings diese Phasenkohärenz im Laufe der Zeit verloren, bis schließlich nach einer sogenannten *reinen Phasenrelaxationszeit* T_2^* wieder alle Phasen statistisch verteilt sind. Ein weiterer linienverbreiternder Effekt entsteht durch die *Energie-relaxation* und wird durch Zerfälle in den Grundzustand mit der entsprechenden *Energierelaxationszeit* T_1 beschrieben. Für die effektive Zerfallszeit T_2 läßt sich deshalb folgende Beziehung aufstellen:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_1} + \frac{2}{T_2^*} \quad (2.2)$$

Homogene Linienbreite

Sind die beiden Relaxationszeiten T_1 und T_2 bekannt, kann der Wert γ berechnet werden, der sich aus der Messung einer Linienbreite beispielsweise durch Auslesen des entsprechenden optischen Übergangs mit Hilfe eines Lasers ergibt:

$$\gamma = \frac{1}{2\pi T_2} \cdot \sqrt{1 + \Omega^2 T_1 T_2} \quad (2.3)$$

Ω bezeichnet die sogenannte *Rabifrequenz*, die neben atomaren Größen auch von der Intensität des eingestrahlten Lichtes abhängt (siehe auch (1)). Mit ihrer Hilfe läßt sich auch die *Leistungsverbreiterung* verstehen, die für eine Zunahme der Linienbreite bei Verwendung größerer Laserleistungen verantwortlich ist. Dies kann jedoch durch Verwendung schwacher Lichtintensitäten vermieden werden ($\Omega \rightarrow 0$) und führt in Gleichung 2.3 zur sogenannten *homogenen Linienbreite*¹ γ_h .

Nullphononlinie und Phononenseitenflügel

Wird ein Farbstoffmolekül in einem idealen Kristall angeregt, wird die Energie des absorbierten Lichts neben der Anregung des Chromophors zusätzlich zur Erzeugung von Schwingungen im Wirtsgitter benutzt. Folglich ergeben sich neben der sogenannten *Nullphononlinie* hypsochromverschobene Absorptionslinien, die den sogenannten *Phononenseitenflügel* bilden (siehe Abb. 2.1 (b)).

¹Die homogene Linienbreite γ_h hängt empfindlich von der Temperatur des Systems ab, da die Bewegungen des Wirtsgitters mit sinkender Temperatur eingefroren werden.

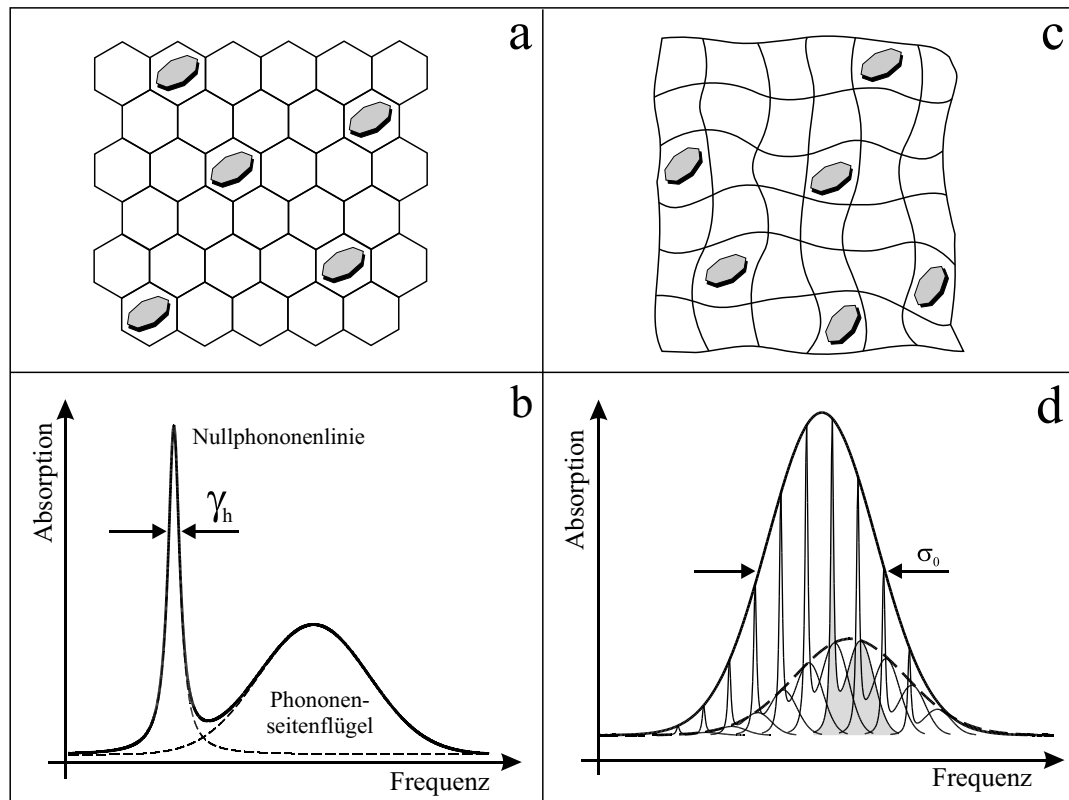


Abbildung 2.1: (a) Chromophormoleküle in einem idealen Kristall besitzen alle die genau gleiche Mikro-Umgebung. (b) Das typische Absorptionsspektrum von Chromophoren in einem perfekten Kristall mit einer schmalen Null-Phononenlinie und einem breiten Phononenseitenflügel. (c) Farbstoffmoleküle in einem amorphen Festkörper (z.B. Glas oder Protein) haben unterschiedliche Matrix-Umgebungen. (d) Die unterschiedlichen Mikro-Umgebungen der einzelnen Farbstoffmoleküle in einem amorphen System verursachen eine inhomogene Verbreiterung der einzelnen Absorptionsbanden.

Elektron-Phonon-Kopplung

Die Wechselwirkung zwischen Farbstoffmolekülen nach Lichtanregung und den Schwingungen des Kristallgitters, auch als *Elektron-Phonon-Kopplung* bezeichnet, spiegelt sich in dem Flächenverhältnis von Nullphononenlinie und Seitenphononflügel wieder und wird durch den *Debye-Waller-Faktor* α beschrieben. Bei schwacher Elektron-Phonon-Kopplung und entsprechend großem Wert des Debye-Waller-Faktors α dominiert die Nullphononenlinie über den Phononenseitenflügel bzw. umgekehrt. Da die Phononenzustände i.a. sehr viel kürzere Lebensdauern als der niedrigste angeregte elektronische Zustand des Farbstoffmoleküls besitzen, ergeben sich aus diesem Grund auch entsprechend größere Linienbreiten.

Chromophor in einem realen System

Befindet sich das Ensemble von Farbstoffmolekülen in einem realen System, beispielsweise einem Glas oder einem Protein, variieren die Mikro-Umgebungen um die Chromophor-Moleküle in einem hohem Maße (siehe Abb. 2.1 (c)) und erzeugen dementsprechend unterschiedliche Lösungsmittel-Verschiebungen. Das resultierende Absorptionsspektrum des Ensembles von Farbstoffmolekülen der Bandbreite σ_0 kann daher als Überlagerung verschiedener Sub-Ensembles interpretiert werden, die jeweils bei verschiedenen Frequenzen angeordnet sind. Dieser Mechanismus wird auch als *inhomogene Verbreiterung* des Absorptionsprofils bezeichnet (siehe hierzu Abb. 2.1 (d)). Mathematisch gesehen entspricht dieser Vorgang einer Faltung der homogenen Linie mit einer für gewöhnlich gaußförmig angenommenen Verteilungsfunktion der Breite σ_0 , die das Auftreten von unterschiedlichen Lösungsmittel-Verschiebungen beschreibt.

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden bei tiefen Temperaturen von wenigen Kelvin ausgeführt. Die inhomogene Breite σ_0 der untersuchten Systeme lag um Größenordnungen über der homogenen Linienbreite γ_h . Typische Werte für σ_0 lagen bei etwa 100 cm^{-1} , für γ_h bei etwa 0.03 cm^{-1} .

2.1.2 Methode des spektralen Lochbrennens

Das spektrale Lochbrennen ist eine spezielle Art der Sättigungsspektroskopie mit dem Ziel, in inhomogen verbreiterten Absorptionsprofilen die homogene Linie des optischen Übergangs zu vermessen und dadurch die hohe Empfindlichkeit des optischen Experiments besser zu nutzen. Im Vergleich zu resonanzspektroskopischen Methoden wie ESR und NMR können mit der Lochbrenn-Methode dauerhafte Löcher im Absorptionsspektrum erzeugt werden. Das in dieser Arbeit angewandte photophysikalische bzw. photochemische Lochbrennen wurde 1974 von zwei Gruppen entdeckt (2; 3).

Erzeugung spektraler Löcher

Durch die Einstrahlung schmalbandigen Laserlichts in einen bestimmten Bereich der niederenergetischen inhomogenen Bande (*Brennen*) werden die dort absorbierenden Moleküle in einen langlebigen Photoproduktzustand $|P\rangle$ überführt (siehe Abb. 2.2 (a)). Dabei verändern die Sondenmoleküle ihre Absorptionsfrequenz und somit stehen bei der Brennfrequenz ν_B weniger Absorbermoleküle zur Verfügung, als vor dem Brennvorgang. Diese Verminderung der Absorption um ν_B führt zu einem *spektralen* Loch. Es werden zwei Arten der Phototransformation unterschieden:

1. **Photochemisches Lochbrennen:** Die photoaktiven Moleküle erfahren eine chemische Veränderung nach dem Anregungsprozeß, sodaß gewöhnlich die Absorption des Photoprodukts bei einer weit entfernten Wellenlänge, meist sogar außerhalb der inhomogenen Bande des Edukts absorbiert (siehe Abb. 2.2 (c)).

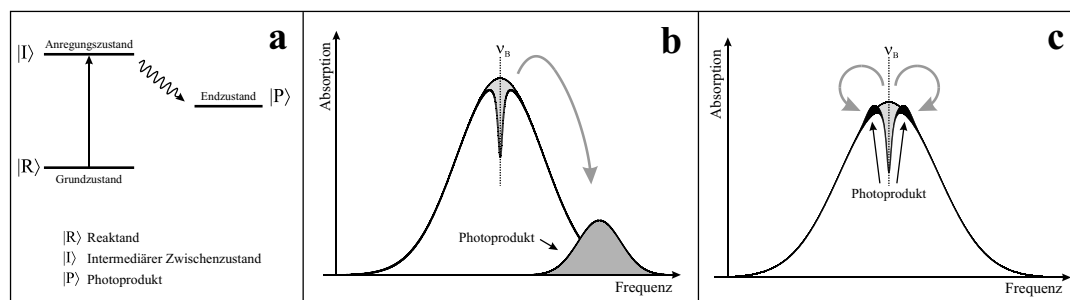


Abbildung 2.2: (a) Typisches Niveauschema für den Prozess des spektralen Lochbrennens. (b) Photochemisches Lochbrennen: Das entstehende Photoprodukt absorbiert weit außerhalb der Brennfrequenz ν_B . (c) Photophysikalisches Lochbrennen: Die Photoproduktabsorption liegt an den Rändern des spektralen Lochs.

- 2. Photophysikalisches Lochbrennen:** In diesem Fall bleiben die photoaktiven Moleküle chemisch unverändert. Es finden lediglich Umlagerungen innerhalb der umgebenden Matrix statt, die zu veränderten Chromophor-Matrix-Wechselwirkungen führen. Die hierdurch auftretenden Verschiebungen der Absorptionsfrequenz des Sondenmoleküls sind jedoch deutlich kleiner als beim photochemischen Lochbrennen, so daß die Photoproduktabsorption in der näheren Umgebung (4) des spektralen Lochs um ν_B zu liegen kommt (siehe Abb. 2.2 (c)).

Eine Verminderung der Absorption an der Brennposition kann auch ohne Übergang in einen Photoproduktzustand $|P\rangle$ erfolgen, allerdings ist die Lebensdauer des auf diese Weise erzeugten Sättigungslochs nicht größer, als die Lebensdauer des angeregten elektronischen Zustands (5). Dagegen ist die Lebensdauer permanenter spektraler Löcher nur von der Lebensdauer des Photoproduktzustandes abhängig und kann bei tiefen Temperaturen Tage und Wochen betragen.

Oft ist es für die Vorstellung günstiger, sich ein spektrales Loch als negatives Absorptionsspektrum eines Ensembles aus Farbstoffmolekülen zu denken, die zum Zeitpunkt des Lochbrennens alle die gleiche Absorptionsfrequenz besitzen. Werden anschließend experimentelle Parameter wie beispielsweise ein externes elektrisches Feld \vec{E} oder ein hydrostatischer Druck p verändert, so würde ein derartiges Ensemble in der gleichen Weise reagieren, wie das spektrale Loch selbst (4).

Resonantes und nichtresonantes Lochbrennen

Bei genauerer Betrachtung eines photochemisch erzeugten spektralen Lochs können folgende vier Beiträge separiert werden (1):

- 1. Scharfes Nullphononenloch:** Durch Einstrahlung schmalbandigen Laserlichts der Brennfrequenz ν_B werden Farbstoffmoleküle selektiert, deren Nullphononenlinie bei ν_B liegt.

2. **Direktes Phononenloch:** Die durch die Nullphononenlinie selektierten Sondenmoleküle besitzen natürlich auch einen Phononenseitenflügel, dessen fehlende Absorption zu einem relativ breiten, in Bezug auf die Nullphononenlinie hypsochrom verschobenen Loch führt.
3. **Pseudo-Phononenloch:** Eine Reihe von Sondenmolekülen werden über ihre Seitenphononenflügel-Absorption durch die Lasereinstrahlung bei ν_B angeregt. Durch das Fehlen der jeweiligen Nullphononenlinien dieser nicht-resonant angeregten Farbstoffmoleküle entsteht der dritte Beitrag des spektralen Lochs, der in diesem Fall bathochrom zur resonant erzeugten Nullphononenlinie verschoben ist.
4. **Phonon-Phononloch:** Dieser relativ schwache Beitrag wird durch die Phononenbeiträge der Chromophore erzeugt, die über das Pseudo-Phononloch weggebrannt wurden.

Satelliten-Lochbrennen

Wird in einer höherenergetischen Bande eines Chromophors mit mehreren einzelnen Banden an der Frequenzposition ν_B ein spektrales Loch erzeugt, werden die dort weggebrannten Moleküle auch in allen anderen Banden fehlen und zu Löchern im Absorptionsspektrum führen. In der Regel werden jedoch eine Vielzahl von sogenannten *Satellitenlöchern* beobachtet. Wird beispielsweise in der ersten höherenergetischen Bande eines Chromophors ein spektrales Loch an der Frequenzposition ν_B erzeugt und wird diese inhomogen verbreiterte Bande aus z. B. drei sich überlappenden Schwingungszuständen gebildet, dann trägt jede Schwingungsbande mehr oder weniger zur Absorption bei ν_B bei. Das dort entstehende resonante Loch wird von Farbstoffmolekülen gebildet, die aufgrund unterschiedlicher Mikro-Umgebungen in die drei verschiedenen Schwingungszustände angeregt werden. In der niederenergetischen Bande erscheinen nun drei gut getrennte nichtresonante Löcher, die den drei unterschiedlichen Mikro-Umgebungen zugeordnet werden können (für Details siehe (6)). Der Frequenzunterschied zwischen resonantem und den jeweiligen nichtresonanten Löchern entspricht gerade den Schwingungsniveau-Abständen des ersten elektronischen Anregungszustands des Sondenmoleküls. Diese Methode dieses sogenannten *Satellitenlochbrennens* wurde z.B. von T.-C. Chang benutzt, um Wechselwirkungen zwischen Farbstoffmolekülen und DNA-Oligomeren aufgrund der Störung der Schwingungsmoden des Chromophors zu interpretieren (7; 8; 9; 10) (siehe auch Kapitel 5).

Linienverbreiterung

Die Linienbreite eines spektralen Lochs hängt zunächst entscheidend von der homogenen Linienbreite γ_h des verwendeten optischen Übergangs ab und wird von unterschiedlichen Verbreiterungsmechanismen beeinflusst:

- **Leistungsverbreiterung:** Werden beim Brennvorgang hohe Laserintensitäten verwendet, kann es gemäß Gleichung 2.3 auf S. 6 zu einer Leistungsverbreiterung kommen. Diese kann jedoch leicht verhindert werden, wenn

beim Brennen relativ niedrige Leistungen verwendet werden und im Gegenzug mit größeren Brenndauern gearbeitet wird.

- **Energieverbreiterung:** Während des Brennens erfolgt bei der Laserfrequenz ν_B eine Ausbleichung der Absorptionsbande. Die Anzahl absorbierender Moleküle ist aus diesem Grunde in den Flanken des spektralen Lochs höher, als im Zentrum, so daß die Photoreaktion vorzugsweise in diesen Flanken stattfindet. Die Lochverbreiterung über die homogene Linienbreite hinaus steigt mit wachsender Brennenergie.
- **Spektrale Diffusion:** Selbst bei tiefen Temperaturen unterliegen die Farbstoffmoleküle in ihrem Wirtsgitter Relaxationsprozessen, die zu Verschiebungen der ursprünglichen Absorptionsfrequenz führen. Ungleichgewichtszustände werden mit der Zeit ausgeglichen, indem Moleküle in der spektralen Umgebung eines Lochs in unbesetzte strukturelle Zustände diffundieren und so bei gleichzeitiger Abnahme der Tiefe eine Verbreiterung des Lochs erzeugen. Die spektrale Diffusion wird bei tiefen Temperaturen auf einer Zeitskala von Minuten bis Tagen gemessen.

Der doppelte Einfluß der Linienbreite beim Brennen sowie beim anschließenden Auslesen des spektralen Lochs mit geringer Intensität stellt die Ursache dar, daß der gemessene Wert für die Linienbreite gerade zweimal der homogenen Linienbreite γ_h entspricht.

2.2 Starkeffekt

2.2.1 Grundlegende Überlegungen

Die Absorptionsfrequenz eines Farbstoffmoleküls wird durch die Energiedifferenz zwischen dem Grund- und dem Anregungszustand bestimmt. Ein äußeres elektrisches Feld kann diesen optischen Übergang verändern, wenn die beiden Zustände in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden. Ein ionischer Zustand ist dazu jedoch nicht in der Lage, da bei elektronischer Anregung des Chromophors keine Ladungsänderungen auftreten und folglich Grund- und Anregungszustand in gleichem Maße verschoben werden. Elektrische Dipolmomente sorgen allerdings für eine Absorptionsänderung, da die Ladungsverteilung vom angeregten Zustand abhängig ist. Wird das Farbstoffmolekül als hinreichend klein angenommen, um ein homogenes elektrisches Feld zu spüren, können höhere Multipolmomente vernachlässigt werden und die folgenden Betrachtungen beschränken sich auf die Wechselwirkungen zwischen einem Chromophor mit einem Punktdipol und einem äußeren homogenen elektrischen Feld.

Die Starkverschiebung

Die Frequenzverschiebung $\Delta\nu$ eines optischen Übergangs in einem externen elektrischen Feld \vec{E} hängt von der Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}$ zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand auf folgende Weise ab:

$$\Delta\nu = -\frac{1}{h} \cdot (\vec{E} \cdot \Delta\vec{\mu}) \quad (2.4)$$

Hierbei bedeutet h die Planck-Konstante. Molekulare Dipolmomente $\Delta\vec{\mu}$ können entweder von einem elektrischen Feld induziert werden ($\Delta\vec{\mu}_i$) oder vom Chromophormolekül selbst stammen ($\Delta\vec{\mu}_0$):

$$\Delta\vec{\mu} = \Delta\vec{\mu}_0 + \Delta\vec{\mu}_i = \Delta\vec{\mu}_0 + \Delta\vec{\alpha} \cdot \vec{E} \quad (2.5)$$

$\Delta\vec{\alpha}$ stellt die Polarisierbarkeitsdifferenz des Farbstoffmoleküls zwischen Grund- und Anregungszustand dar. Durch Berücksichtigung der unterschiedlichen Dipolmomente ergibt sich mit Gleichung 2.4 für die Starkverschiebung $\Delta\nu$:

$$\Delta\nu = -\frac{1}{h} \cdot \left(\vec{E} \cdot \Delta\vec{\mu}_0 + \frac{1}{2} \cdot \vec{E} \cdot \Delta\vec{\alpha} \cdot \vec{E} \right) \quad (2.6)$$

Die Existenz der intrinsischen Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ hängt von der molekularen Punktgruppe des Chromophors ab und verschwindet beispielsweise für zentrosymmetrische Moleküle ganz. In diesem Falle wird die Frequenzverschiebung in einem externen elektrischen Feld allein durch die induzierte Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_i$ bzw. die Polarisierbarkeitsdifferenz $\Delta\vec{\alpha}$ bestimmt. Der Faktor $\frac{1}{2}$ in Gleichung 2.6 berücksichtigt die Tatsache, daß das Dipolmoment einerseits von

dem elektrischen Feld induziert wird und andererseits für die Frequenzverschiebung sorgt.

Das elektrische Feld \vec{E} am Ort des Sondenmoleküls setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: Dem von der Chromophor-Umgebung erzeugten Matrixfeld \vec{E}_M und dem externen Starkfeld \vec{E}_S . Während von der Matrix elektrische Feldstärken von bis zu 10^8 V/cm (11) ausgehen können, sind die Starkfelder um bis zu vier Größenordnungen kleiner.

$$\vec{E} = \vec{E}_M + f \cdot \vec{E}_S \quad (2.7)$$

Der *Lorentz-Korrekturfaktor* f berücksichtigt die Abschirmung des äußeren elektrischen Feldes am Ort des Chromophors durch das als kontinuierliches Medium angenommene Lösungsmittel mit der Dielektrizitätszahl ϵ . Setzt man diese Beziehung in Gleichung 2.6 ein, so ergibt sich als Ergebnis für die Starkverschiebung $\Delta\nu$:

$$\Delta\nu = -\frac{1}{h} \cdot (A + B + C + D) \quad (2.8)$$

mit

$$A = \vec{E}_M \cdot \Delta\vec{\mu}_0 + \frac{1}{2} \cdot \vec{E}_M \cdot \Delta\vec{\alpha} \cdot \vec{E}_M$$

$$B = f \cdot \vec{E}_S \cdot \Delta\vec{\mu}_0$$

$$C = \frac{1}{2} f^2 \cdot \vec{E}_S \cdot \Delta\vec{\alpha} \cdot \vec{E}_S$$

$$D = f \cdot \vec{E}_S \cdot \Delta\vec{\alpha} \cdot \vec{E}_M$$

Die vier Beiträge zur Frequenzverschiebung in der Gegenwart eines äußeren elektrischen Feldes sollen nun im Einzelnen besprochen werden.

(A) Elektrostatische Lösungsmittelverschiebung

Wird die Frequenzverschiebung eines gelösten Farbstoffs im Vergleich zum Vakuum durch interne elektrostatische Felder verursacht, spricht man von der *elektrostatischen* Lösungsmittelverschiebung, deren Stärke von dem jeweils benutzten System abhängig ist. Auf diese Weise sind Lösungsmittelverschiebungen von mehreren 100 cm^{-1} möglich und liegen damit in der Größenordnung der inhomogenen Bandenbreite (12).

Durch die Anwendung eines externen Feldes können nun die Systemparameter mit den experimentellen Parametern gekoppelt werden. Um jedoch die geringen Frequenzverschiebungen beobachten zu können, wurden verschiedene Techniken entwickelt: Modulationstechniken (13), Einzelmolekülspektroskopie (14) oder die in dieser Arbeit verwendete Methode des spektralen Lochbrennens (4).

(B) Linearer Starkeffekt

Der lineare Starkeffekt wird nur dann beobachtet, wenn das Sondenmolekül auch eine intrinsische Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ zwischen Grund- und Anregungszustand besitzt. Dies ist beispielsweise bei der aromatischen Aminosäure Tyrosin oder dem für die Farbstoff-DNA-Systeme verwendeten Chromophor BODIPY der Fall. In der vorliegenden Dissertation wird immer mit isotropen Lösungen gearbeitet. Regt man diese mit polarisiertem Licht an, so kann es zu einer Aufspaltung des Lochs, der sogenannten *Starkaufspaltung* Δ , kommen:

$$\Delta = (f/h) \cdot \vec{E}_S \cdot \Delta\vec{\mu}_0 = (f/h) \cdot E_S \cdot \Delta\mu_0 \cdot \langle \cos \phi \rangle \quad (2.9)$$

Δ wird also durch das Skalarprodukt aus dem Starkfeld \vec{E}_S und der permanenten Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ gebildet, wobei zwischen den beiden Vektoren der Winkel ϕ besteht. Die Mittelungsklammern deuten darauf hin, daß durch das polarisierte Laserlicht \vec{E}_L nicht nur Moleküle angeregt werden, deren Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ exakt parallel bzw. antiparallel dazu ausgerichtet sind, sondern einer $\cos^2\beta$ -Verteilung unterliegen, wobei mit β der Winkel zwischen diesen beiden Vektoren bezeichnet wird.

(C) Quadratischer Starkeffekt

Ein jeweils geringer Anteil des linearen bzw. pseudolinearen Starkeffekts (siehe B und D in Gleichung 2.8) sind die Voraussetzung zur Beobachtung des quadratischen Effekts. Dies ist durch Vergleich der entsprechenden Terme in Gleichung 2.8 leicht verständlich: Im quadratischen Term C der Starkverschiebung wird durch das externe Feld \vec{E}_S ein Dipolmoment induziert, das im Vergleich zu den starken Matrixfeldern \vec{E}_M des pseudolinearen Starkeffekts D kleiner ausfällt. Die entsprechenden Dipolmomentdifferenzen sind in der Regel wiederum kleiner, als die vom Farbstoffmolekül stammende permanente Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ in B. Folglich müßte für die Beobachtung eines quadratischen Starkeffekts beispielsweise ein Sondenmolekül mit Inversionssymmetrie gewählt werden, das zudem nur geringen Matrixfeldern ausgesetzt wäre. Da die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle diese Bedingungen nicht erfüllen, konnte der quadratische Starkeffekt auch nicht aufgelöst werden.

(D) Pseudolinearer Starkeffekt

Aufgrund der Polarisierbarkeitsdifferenz $\Delta\vec{\alpha}$ zwischen Grund- und Anregungszustand wird durch die Matrixfelder \vec{E}_M in der Umgebung des Chromophors eine Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_i = \Delta\vec{\alpha} \cdot \vec{E}_M$ induziert. Die Wechselwirkung dieser induzierten Dipolmomentdifferenz mit dem äußeren elektrischen Feld \vec{E}_S führt zu einer Frequenzverschiebung. Obwohl der pseudolineare Starkeffekt von zweiter Ordnung ist, kann er aufgrund ausgeprägter Matrixfelder \vec{E}_M , die bis zu 10^8 V/m betragen können (11) nicht vernachlässigt werden. Es werden ähnliche Frequenzverschiebungen wie für den linearen Starkeffekt in der Größenordnung von einigen GHz erzielt.

Mit Hilfe des pseudolinearen Starkeffekts lassen sich Informationen über Betrag und Richtung der Matrixfelder am Ort des Chromophors sowie des Ordnungsgrads in der Farbstoffumgebung erhalten. Ist die Matrix perfekt geordnet, induziert das Matrixfeld immer die gleiche Dipolmomentdifferenz in jedem Sondenmolekül. Dagegen unterliegen in einer amorphen Matrix die induzierten Dipolmomentdifferenzen einer statistischen Verteilung und die *Starkverbreiterung* σ läßt sich durch folgende Beziehung beschreiben:

$$\sigma = (f/h) \cdot \left\langle \left(\vec{E}_S \cdot \Delta \vec{\alpha} \cdot \vec{E}_M \right)^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} = (f/h) \cdot E_S \cdot \langle \Delta \mu_i^2 \rangle^{\frac{1}{2}} \langle \cos^2 \phi' \rangle^{\frac{1}{2}} \quad (2.10)$$

Die **Starkverbreiterung** σ ist dem Skalarprodukt aus induziertem Dipolmoment $\Delta \vec{\mu}_i = \Delta \vec{\alpha} \cdot \vec{E}_M$ und Starkfeld \vec{E}_S proportional. Der Winkel ϕ' wird von den beiden Vektoren $\Delta \vec{\mu}_i$ und \vec{E}_S gebildet. Während die Mittelung über die induzierten Dipolmomentdifferenzen unterschiedliche Mikro-Umgebungen der Sondenmoleküle berücksichtigt, deutet die zweite Mittelungsklammer wieder auf die $\cos^2 \beta$ -Verteilung in der Laseranregung hin.

2.2.2 Spektrale Löcher im elektrischen Feld

Mit Hilfe der Methode des spektralen Lochbrennens wird aus der inhomogenen Bande eines Chromophors bei einer bestimmten Frequenz ein kleines Ensemble selektiert, daß etwa aus einem Bruchteil von 10^{-4} bis 10^{-5} Molekülen bezüglich der Gesamtzahl der Absorber besteht. Dieses Sub-Ensemble hat wiederum inhomogene Eigenschaften, da die statistische Unabhängigkeit der Chromophore aufgrund individueller Mikro-Umgebungen zustande kommt. Obwohl durch den schmalbandigen Laser Moleküle mit den gleichen energetischen Eigenschaften bezüglich des optischen Übergangs markiert wurden, müssen die einzelnen Farbstoffe nicht die gleichen Matrixumgebungen besitzen. Spektrale Löcher reagieren auf ein externes elektrisches Feld mit zwei Phänomenen, einer Lochverbreiterung und gegebenenfalls mit einer zusätzlichen Lochaufspaltung.

Starkverbreiterung σ

Eine Verbreiterung spektraler Löcher bedingt durch äußere elektrische Felder kann immer beobachtet werden. Durch den Lochbrennprozeß wird ein Ensemble von Molekülen innerhalb der inhomogenen Bande selektiert, wobei alle Chromophore bei der gleichen Frequenz, eben der verwendeten Laserbrennfrequenz ν_B , absorbieren. Wie bereits zuvor erwähnt, nehmen jedoch diese Moleküle durch unterschiedliche Mikro-Umgebungen verschiedene Orientierungen bezüglich des externen Starkfelds \vec{E}_S ein und verursachen demzufolge unterschiedliche Verschiebungen. Drei wesentliche Mechanismen tragen zur Lochverbreiterung in einem externen elektrischen Feld bei (siehe Abb. 2.3):

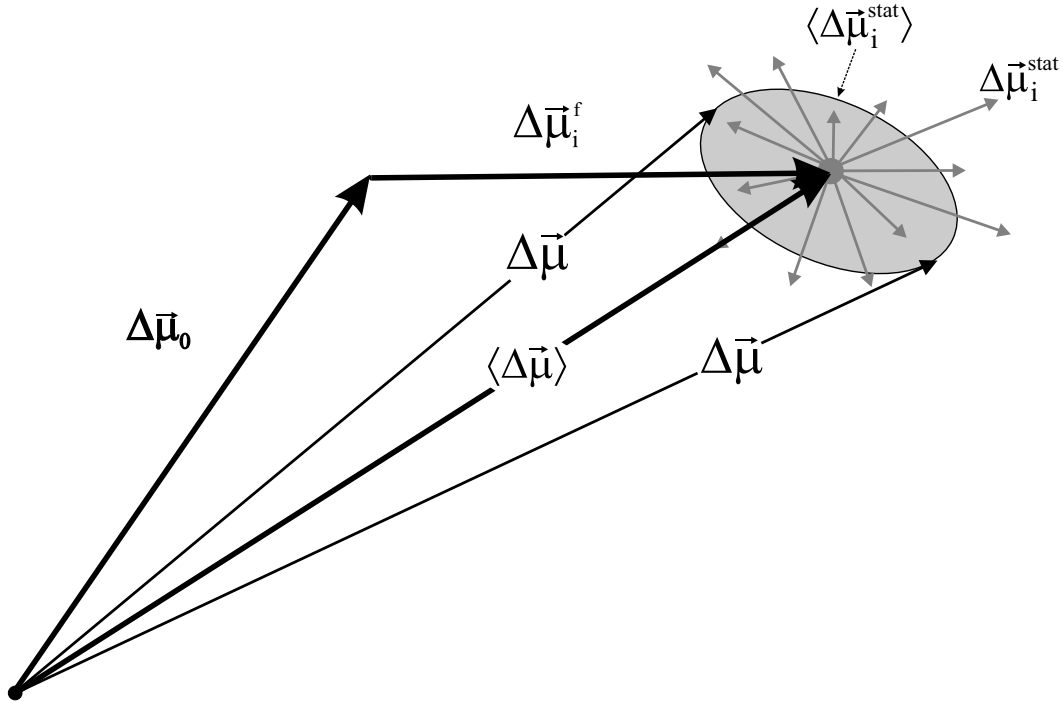


Abbildung 2.3: Die Gesamt-Dipolmomentendifferenz $\Delta\vec{\mu}$ eines Farbstoffmoleküls in einem externen elektrischen Feld setzt sich aus den folgenden beiden Beiträgen zusammen: Der intrinsischen Dipolmomentendifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ und der induzierten Dipolmomentendifferenz $\Delta\vec{\mu}_i$. Letztere zerfällt wiederum in zwei Anteile: Einer im Koordinatensystem des Chromophors fixierten induzierten Dipolmomentendifferenz $\Delta\vec{\mu}_i^f$ sowie den statistisch verteilten Dipolmomentendifferenzen $\Delta\vec{\mu}_i^{stat}$ mit einem mittleren Betrag von $\langle\Delta\mu_i^{stat}\rangle$. Dieser Sachverhalt führt nun zu einem zusätzlichen Freiheitsgrad von $\Delta\vec{\mu}$, der nach entsprechender Mittelung der statistischen Beiträge auf einem Kegelmantel liegt.

1. **Lochverbreiterung durch Laseranregung:** Das zum Lochbrennen verwendete linear polarisierte Laserlicht \vec{E}_L sorgt nicht nur für die Anregung von Molekülen in exakt paralleler $\uparrow\uparrow$ bzw. antiparalleler $\uparrow\downarrow$ Anordnung bzgl. des entsprechenden Übergangsdipolmoments $\vec{\mu}_{01}$, sondern wird durch eine gewisse zu $\cos^2\beta$ proportionalen Anregungswahrscheinlichkeit verursacht, wobei β der Winkel zwischen Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ und Laserfeld \vec{E}_L darstellt.
2. **Verbreiterung spektraler Löcher durch die reale Matrix:** Die durch die Matrixfelder \vec{E}_M induzierten Dipolmomentendifferenzen $\Delta\vec{\mu}_i$ besitzen in einem realen System neben ihrem molekülfesten Anteil $\Delta\vec{\mu}_i^f$ immer auch einen statistischen Beitrag $\Delta\vec{\mu}_i^{stat}$. Letzterer variiert von Chromophor zu Chromophor und wird durch die unterschiedlichen Mikro-Umgebungen verursacht.

Starkaufspaltung Δ

Die Voraussetzung für die Beobachtung einer Aufspaltung spektraler Löcher in einem äußeren elektrischen Feld ist immer die Existenz einer molekülfesten Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$. In einer geordneten Matrix kann zu $\vec{\mu}_0$ noch ein molekülfester Anteil $\vec{\mu}_i$ (Pseudolinerer Effekt) hinzukommen. Zum besseren Verständnis sollen nun folgende vier Spezialfälle dienen, die jeweils auf drei Annahmen basieren:

1. Der Winkel θ zwischen dem Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ und der permanenten Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ der Sondenmoleküle soll entweder 0° oder 90° betragen.
2. Der Einfachheit halber werden die statistischen Beiträge $\Delta\vec{\mu}_i^{stat}$ bei den anschließenden Betrachtungen vernachlässigt.
3. Das Laserfeld \vec{E}_L soll die beiden Polarisationsgeometrien der parallelen ($\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$) bzw. der senkrechten Anordnung ($\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$) erfüllen.

Mit diesen Annahmen können nun vier Extremfälle konstruiert werden:

- (a) $\theta = 0^\circ$, $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ (siehe Abb. 2.4 (a)):

In diesem ersten Spezialfall ist der Vektor des Laserfelds \vec{E}_L parallel zum angelegten Starkfeld \vec{E}_S orientiert. Desweiteren ist das Sondenmolekül derartig beschaffen, daß seine permanente Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ parallel zu dessen Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ gerichtet ist ($\theta = 0^\circ$). Durch den Lochbrennvorgang werden nun Moleküle selektiert, dessen Übergangsdipolmomente parallel bzw. antiparallel zum Laserfeld \vec{E}_L liegen, so daß auch das externe Starkfeld \vec{E}_S parallel bzw. antiparallel zu $\Delta\vec{\mu}_0$ orientiert ist. Dies wird durch folgende Argumentationskette deutlich:

$$\vec{E}_S \parallel \vec{E}_L \uparrow\uparrow \text{ bzw. } \uparrow\downarrow \vec{\mu}_{01} \parallel \Delta\vec{\mu}_0 \quad (2.11)$$

Betrachtet man nun die Gleichung 2.4 auf S. 12, so nimmt das Skalarprodukt aus $\Delta\vec{\mu}_0$ und \vec{E}_S und damit auch die resultierende Frequenzverschiebung $\Delta\nu$ maximale positive bzw. negative Werte an. Gemäß dieser beiden Möglichkeiten ergibt sich nun für den einen Teil der Chromophore mit $\Delta\vec{\mu}_0 \uparrow\uparrow \vec{E}_S$ eine bathochrome Verschiebung, für den anderen Teil mit $\Delta\vec{\mu}_0 \uparrow\downarrow \vec{E}_S$ eine hypsochrome Verschiebung des spektralen Lochs. Die Aufspaltung Δ erfolgt symmetrisch in beide Richtungen, so daß der Schwerpunkt des Lochs unverändert bleibt.

Berücksichtigt man zusätzlich noch die $\cos^2 \beta$ -Verteilung bei der Laseranregung, beschreiben die $\Delta\vec{\mu}_0$ -Vektoren einen Kegel um \vec{E}_L mit einem maximalen Öffnungswinkel β . Als Resultat erhält man nun betragsmäßig *große* Projektionen von $\Delta\vec{\mu}_0$ auf \vec{E}_S , die in beide Richtungen weisen: das spektrale Loch spaltet auf. Die entsprechenden Simulationen von Starkspektren sind in Abb. 2.5 (a) dargestellt.

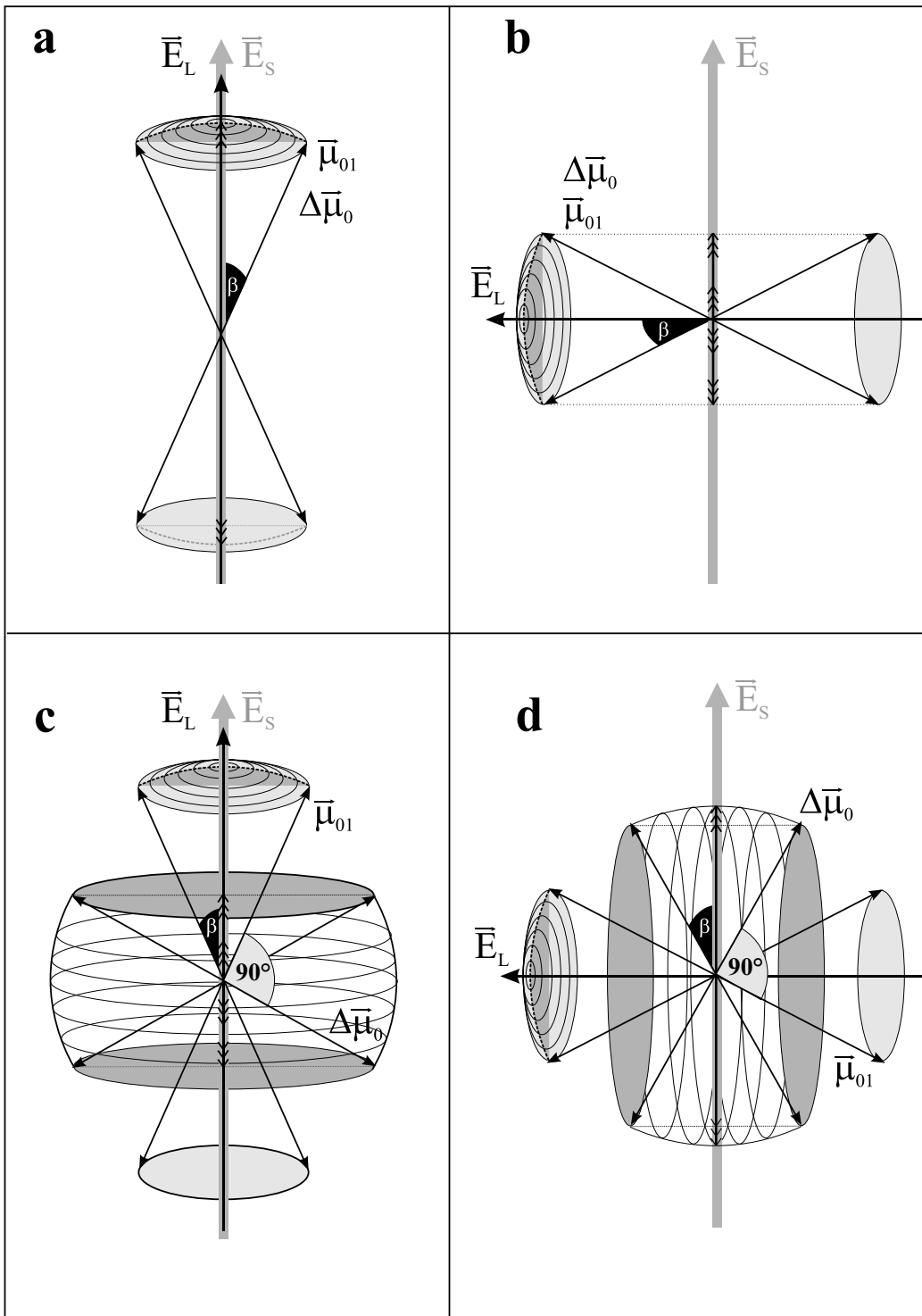


Abbildung 2.4: Vier Extremfälle dienen zur Veranschaulichung des Starkeffekts spektraler Löcher. Details finden sich im Text auf S. 17.

(b) $\theta = 0^\circ$, $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ (siehe Abb. 2.4 (b)):

Nach wie vor sind $\vec{\mu}_{01}$ und $\Delta\vec{\mu}_0$ parallel zueinander, jedoch stehen \vec{E}_L und \vec{E}_S senkrecht aufeinander. Obige Argumentationskette verändert sich auf folgende Weise:

$$\vec{E}_S \perp \vec{E}_L \uparrow\uparrow \text{ bzw. } \uparrow\downarrow \vec{\mu}_{01} \parallel \Delta\vec{\mu}_0 \quad (2.12)$$

In diesem Falle stehen $\Delta\vec{\mu}_0$ und \vec{E}_S senkrecht aufeinander und das Skalarprodukt verschwindet. Berücksichtigt man wieder die $\cos^2 \beta$ -Verteilung bei der Anregung der Chromophore, so pendeln die Projektionen von $\Delta\vec{\mu}_0$ in der \vec{E}_S -Richtung um den Nullpunkt: es wird lediglich eine Verbreiterung, jedoch keine Aufspaltung beobachtet. Siehe dazu auch die entsprechenden Simulationsspektren in Abb. 2.5 (b).

(c) $\theta = 90^\circ$, $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ (siehe Abb. 2.4 (c)):

\vec{E}_L liegt wieder parallel zum Starkfeld \vec{E}_S . Diesesmal sind $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\vec{\mu}_{01}$ zueinander senkrecht orientiert. Es gilt also:

$$\vec{E}_S \parallel \vec{E}_L \uparrow\uparrow \text{ bzw. } \uparrow\downarrow \vec{\mu}_{01} \perp \Delta\vec{\mu}_0 \quad (2.13)$$

Wiederum verschwindet das Skalarprodukt aus $\Delta\vec{\mu}_0$ und \vec{E}_S und es wird neben einer Lochverbreiterung keine Aufspaltung beobachtet, wie auch aus den Simulationsspektren in Abb. 2.5 (c) ersichtlich ist.

(d) $\theta = 90^\circ$, $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ (siehe Abb. 2.4 (d)):

Neben den Vektoren \vec{E}_L und \vec{E}_S stehen nun auch $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\vec{\mu}_{01}$ aufeinander senkrecht:

$$\vec{E}_S \perp \vec{E}_L \uparrow\uparrow \text{ bzw. } \uparrow\downarrow \vec{\mu}_{01} \perp \Delta\vec{\mu}_0 \quad (2.14)$$

Ähnlich wie im ersten Beispiel ergeben sich betragsmäßig große Projektionsbeiträge von $\Delta\vec{\mu}_0$ auf \vec{E}_S in beiden Richtungen: Das spektrale Loch spaltet wieder auf (siehe dazu Simulationsspektren in Abb. 2.5 (d)).

Die Linienprofile spektraler Löcher in einem externen elektrischen Feld wurden von P. Schätz und M. Maier weitgehend analytisch berechnet (15). Auf diesen Funktionen beruhen auch die numerischen Simulation der zuvor dargestellten vier Extremfälle. Da die Werte des Winkels θ in der Regel zwischen 0 bzw. 90° liegen, sind reale Lochspektren auch schwieriger zu interpretieren. Für Auswertung und Interpretation eines Starkeffekt-Experiments ist deshalb immer ein Vergleich der beiden Polarisationsgeometrien $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ und $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ nötig.

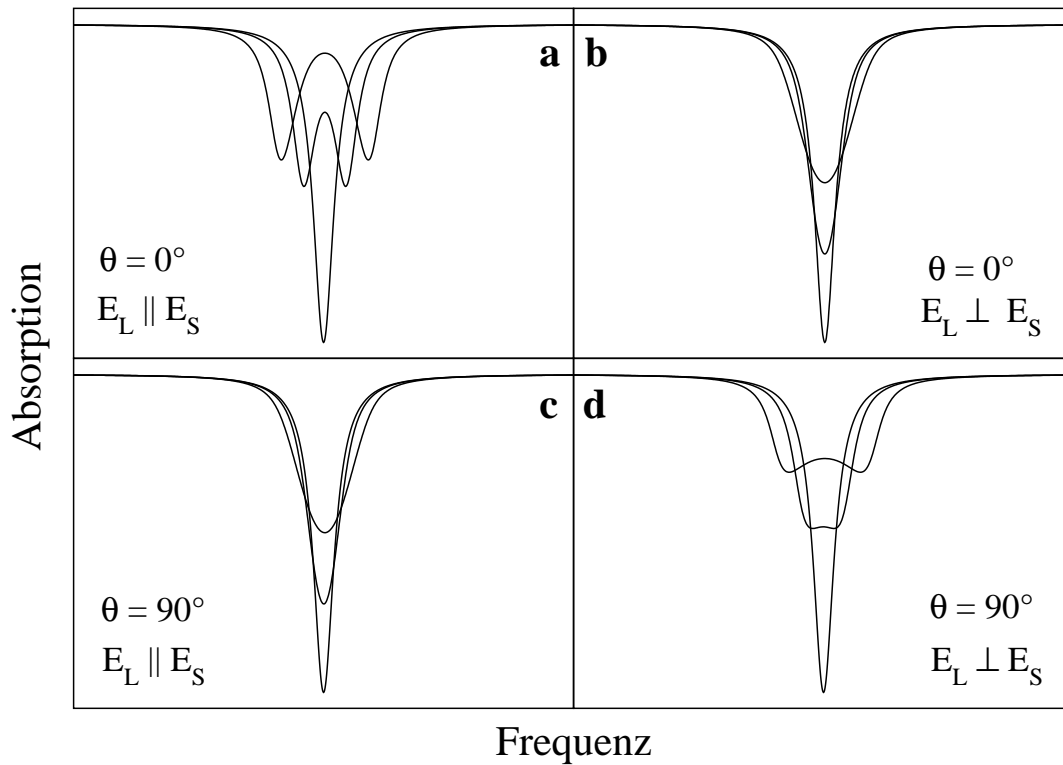


Abbildung 2.5: Simulation der Starkspektren der vier in Abb. 2.4 dargestellten Extremsituationen. Einzelheiten sind wiederum dem Text ab S. 17 zu entnehmen.

Einen Grenzfall stellt der sogenannte *magische Winkel* (16) bei $\theta = 55^\circ$ dar: Die Existenz einer intrinsischen Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}$ führt für Winkel $\theta < 55^\circ$ zu einer Aufspaltung in der parallelen Polarisationsanordnung (siehe Abb. 5.5 auf S. 110), für $\theta > 55^\circ$ zu einer Aufspaltung in der senkrechten Polarisationsgeometrie (siehe Abb. 4.12 auf S. 72). Wird allerdings für beide Polarisierungen keine Aufspaltung beobachtet, kann nicht automatisch auf eine nicht vorhandene permanente Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}$ geschlossen werden. Eine fehlende Starkaufspaltung kann durch die drei folgenden Situationen verursacht werden:

1. Es existiert tatsächlich keine permanente Dipolmomentdifferenz;
2. Die permanente Dipolmomentdifferenz ist so klein, daß sie durch die Starkverbreiterung überdeckt wird;
3. Der Winkel θ liegt in der Nähe des magischen Winkels von 55° .

Unter Umständen führen entsprechende Kombinationen von $\Delta\vec{\mu}$ und θ zu experimentell schwer unterscheidbaren Spektren². Bei geringer Starkaufspaltung oder schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis muß die Interpretation der Starkspektren deshalb mit Vorsicht erfolgen. Die Vorgehensweise bei der Durchführung eines Starkexperiments sowie dessen Auswertung mit Hilfe einer auf den Formeln von P. Schätz und M. Maier zugrundeliegenden Fitroutine wird in Kap. 3.3 näher eingegangen.

²Als Beispiel kann hierfür der Starkeffekt spektraler Löcher in dem Protein Meerrettichperoxidase mit dem Chromophor Mesoporphyrin IV in einem Wasser-Glycerin Glas bei etwa 16310 cm^{-1} dienen (siehe Abb. 3.4 auf S. 39). Erst durch relativ hohe Feldstärken tritt eine Abplattung des Lochspektrums in der parallelen Polarisationsanordnung in Erscheinung. Zwar liegt der Winkel θ mit etwa 47° noch nicht in unmittelbarer Nähe des magischen Winkels von 55° , doch überdeckt in diesem Falle eine relativ starke Verbreiterung die sich zaghaft andeutende Aufspaltung.

2.3 Druckeffekt

Im wesentlichen können zwei Druckbereiche für spektroskopische Untersuchungen unterschieden werden: Experimente mit relativ niedrigen Drücken von bis zu etwa 10 MPa verursachen reversible und elastische Deformationen des untersuchten Systems (17; 18) und eignen sich u. a. zur Ermittlung unterschiedlicher Proteinkonformationen (4; 19), während Hochdruckexperimente mit Drücken über 100 MPa zu Phasenübergängen und damit einhergehenden Änderungen thermodynamischer Parameter (20; 21) führen und sich somit besonders gut für Proteinfaltungsstudien eignen (22).

In ersten Experimenten an Polymeren (23), die zur Untersuchung der Beeinflussung spektraler Löcher durch äußere hydrostatische Drücke dienten, wurde neben einer Lochverschiebung unter Druckanwendung zusätzlich auch eine Verbreiterung des Lochs beobachtet. Dies wurde in Folge auch für zahlreiche Studien an Chromoproteinen bestätigt (4; 17; 18; 24; 25; 26). Zur Beschreibung und Interpretation der Druckeffekt-Experimente an spektralen Löchern dient ein mikroskopisches Modell, das im Jahre 1989 von B. B. Laird und J. L. Skinner veröffentlicht wurde (27) und auf einem stochastischen Ansatz zur Beschreibung inhomogener Linienformen von A. M. Stoneham (28) basiert.

2.3.1 Wechselwirkungen: Chromophor ↔ Matrix

Die Theorie von B. B. Laird und J. L. Skinner zur quantitativen Beschreibung des Druckeffekts spektraler Löcher in Farbstoff-Glas-Systemen berücksichtigt nur niedrige Drücke, die für eine elastische und reversible Deformation der Probe sorgen. Wie bereits in Kap. 2.2.1 dargestellt, bewirken Wechselwirkungen zwischen Chromophor und seiner Umgebung eine Verschiebung der Absorptionsfrequenz. Befinden sich die Farbstoffmoleküle in niedriger Konzentration³ in einer realen Matrix, ergeben sich aufgrund unterschiedlicher Mikro-Umgebungen unterschiedliche Frequenzverschiebungen und führen zu einer inhomogenen Verbreiterung der Absorptionslinie. Durch die Anwendung hydrostatischen Drucks auf das Farbstoff-Matrix-System werden nun die interatomaren Abstände verändert. Aus der Abstandsabhängigkeit zwischenmolekularer Wechselwirkungen in solchen Systemen können mittels entsprechender Experimente Materialgrößen wie beispielsweise Kompressibilität κ oder Volumenfluktuationen $\Delta V/V$ gewonnen werden.

Folgende elektrostatische Wechselwirkungstypen können zur Betrachtung herangezogen werden: Die Ion-Ion-, Ion-Dipol-, Dipol-Dipol- sowie die Dispersions-Wechselwirkung. Höhere Multipolmomente können aufgrund relativ geringen Einflusses außer Acht gelassen werden. Wechselwirkungen mit Beteiligung einer Punkt-

³Eine niedrige Farbstoffkonzentration in einer Wirtsmatrix stellt die Vernachlässigung von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Chromophormolekülen sicher.

ladung können mit den gleichen Argumenten, wie für den Starkeffekt in Kap. 2.2.1 diskutiert, vernachlässigt werden, da für optisch sichtbare Frequenzverschiebungen Grund- und Anregungszustand unterschiedlich beeinflusst werden müssen. Demnach verbleiben für den Druckeffekt alle diejenigen Wechselwirkungen, an denen elektrische Dipole beteiligt sind. Für die Abstandsabhängigkeit der elektrostatischen Wechselwirkungen läßt sich eine R^{-n} -Gesetzmäßigkeit formulieren, wobei für die Ion-Dipol-Wechselwirkung $n = 2$, für die Dipol-Dipol-Wechselwirkung $n = 3$ und für die Dispersionswechselwirkung $n = 6$ gültig ist. Induziert ein molekularer Dipol weitere elektrische Dipole in benachbarten Molekülen, können diese wiederum für zusätzliche induzierte Dipole sorgen. Eine auf diese Weise zustandekommende Wechselwirkung zwischen verschiedenen induzierten Dipolen gehorcht, wie auch die Dispersionswechselwirkung, einer R^{-6} Abstandsabhängigkeit.

Die Dispersionswechselwirkung stellt die Ursache für eine bathochrome Verschiebung dar: Eine höhere Polarisierbarkeit des angeregten Zustand gegenüber des Grundzustands resultiert auch in einem größeren Energiegewinn im Anregungszustand (29). Dagegen führen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen je nach Orientierung der Dipole im Grund- bzw. Anregungszustand sowohl zu bathochromen als auch zu hypsochromen Verschiebungen (30; 31; 32). Da alle diese Effekte simultan auftreten, äußert sich die Kombination der verschiedenen Wechselwirkungen in einer Verschiebung spektraler Löcher unter Druckanwendung. Die Richtung der Druckverschiebung spektraler Löcher ist zudem von der Brennfrequenz ν_B abhängig: durch die Selektion eines Ensembles von Farbstoffmolekülen durch einen schmalbandigen Laser bei ν_B ergeben sich unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Matrix, wobei die dominanteste Wechselwirkung unter Druckanwendung für eine bathochrome oder hypsochrome Verschiebung des Lochspektrums verantwortlich ist. Bei einer ausgezeichneten Brennfrequenz $\nu_B = \nu_{vac}$, der sogenannten *Vakuumfrequenz*, bei der keine Druckverschiebung beobachtet wird, heben sich die konkurrierenden Effekte gerade auf und die Situation verhält sich wie bei einem von der Matrix völlig isolierten Farbstoffmolekül.

Nach diesen Überlegungen zu den verschiedenartigen Wechselwirkungen, die zwischen Farbstoffmolekülen und seiner Umgebungen auftreten können, sollen nun die Grundzüge der Theorie von B. B. Laird und J. L. Skinner skizziert werden (27). Die Wechselwirkung *eines* Chromophors mit *einem* Lösungsmittelmolekül, die sich in einem Abstand $|\vec{R}|$ voneinander befinden, bewirkt eine Frequenzverschiebung $\nu(|\vec{R}|)$. Berücksichtigt man jedoch N Lösungsmittelmoleküle an den Positionen $\vec{R}_1, \dots, \vec{R}_N$, die mit *einem* Farbstoffmolekül in Wechselwirkung treten, gilt für die resultierende Frequenzverschiebung näherungsweise die Summe aller N Einzelverschiebungen. Zwei vereinfachende Annahmen werden nun benötigt, um die inhomogene Verteilungsfunktion $I(\nu)$ angeben zu können:

1. Es besteht keine Korrelation zwischen den Lösungsmittelmolekülen. Mit dieser Annahme vereinfacht sich die N -dimensionale Verteilungsfunktion

$P(\vec{R}_1, \dots, \vec{R}_N)$ zu einem Produkt aus N Zwei-Teilchen-Verteilungsfunktionen $g(\vec{R}_1) \cdot \dots \cdot g(\vec{R}_N)$.

2. Die Anzahldichte $\rho = N/V$ des Lösungsmittels ist hoch. Diese Annahme ist nötig, damit die inhomogene Verteilungsfunktion $I(\nu)$ mit Hilfe des Zentralen Grenzwertsatzes als Gaußfunktion angenähert werden kann.

Mit diesen beiden Annahmen ergibt sich für gaußförmige Frequenzverteilung:

$$I(\nu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_0^2}} \cdot \exp \left\{ -\frac{(\nu - s_0)^2}{2\sigma_0^2} \right\} \quad (2.15)$$

Das Zentrum der inhomogenen Absorptionsbande s_0 und dessen Breite σ_0 werden durch die beiden folgenden Beziehungen beschrieben:

$$s_0 = N \cdot \langle \nu(\vec{R}) \rangle = \frac{N}{V} \iiint d\vec{R} g(\vec{R}) \cdot \nu(\vec{R}) \quad (2.16)$$

$$\sigma_0^2 = N \cdot \langle \nu^2(\vec{R}) \rangle = \frac{N}{V} \iiint d\vec{R} g(\vec{R}) \cdot \nu^2(\vec{R}) \quad (2.17)$$

Desweiteren gilt für die sogenannte *mittlere Lösungsmittelverschiebung* s_0 der Zusammenhang $s_0 = \nu_0 - \nu_{vac}$. s_0 wird also aus der Differenz der Frequenz des Bandenmaximums ν_0 und der Vakuumfrequenz ν_{vac} gebildet. V bezeichnet das Wechselwirkungsvolumen zwischen Farbstoff und Matrix.

2.3.2 Spektrale Löcher unter Druck

Die Veränderung der Absorptionslinie unter Druck wird im Rahmen des Modells völlig analog zur inhomogenen Verbreiterung behandelt. Eine weitere Annahme der Theorie betrifft die Auswirkung einer äußeren Druckausübung auf die Matrix, die nur zu einer Kompression oder Dilatation führen soll und eine Umorientierung der Matrixmoleküle vernachlässigt. Durch die Anwendung hydrostatischen Drucks ergeben sich aufgrund neuer Abstände zwischen Farbstoffmolekülen und ihrer jeweiligen Matrixumgebung veränderte Wechselwirkungen, die sich schließlich in einer Änderung des Lochspektrums zeigen. Im Übrigen gelten auch in diesem Zusammenhang die gleichen Überlegungen, wie in Kap. 2.1.2 auf S. 9: Spektrale Löcher verhalten sich unter Druck genauso, wie die entsprechenden durch Laserbestrahlung selektierten Ensembles von Molekülen.

Wird die *lorentzförmige* Linienform des Ausgangslochs $i(\nu)$ im mathematischen Sinne mit der *gaußförmigen* Verteilungsfunktion $f(\nu'|\nu, \Delta p)$ gefaltet, ergibt sich für das geänderte *voigtförmige* Linienprofil $i(\nu', \Delta p)$ nach Druckänderung Δp :

$$i(\nu', \Delta p) = \int_{-\infty}^{+\infty} d\nu f(\nu'|\nu, \Delta p) \cdot i(\nu) \quad (2.18)$$

Die Verteilungsfunktion $f(\nu'|\nu, \Delta p)$, auch als sogenannter *Druckkern* bezeichnet, beschreibt die bedingte Wahrscheinlichkeit eines Farbstoffmoleküls, das zunächst bei einer Frequenz ν absorbierte, nach Druckänderung Δp bei einer neuen Frequenz ν' zu absorbieren.

Einfaches Modell der Lochverschiebung

Ist man nur an der Beschreibung der Verschiebung spektraler Löcher interessiert, kann diese mit einem einfachen Modell erfolgen. Dazu geht man davon aus, daß durch die Kompression der Matrix eine kleine Störung $\Delta\nu(\vec{R})$ auf die ohnehin schon vorhandene Lösungsmittelverschiebung $\nu(\vec{R})$ ausgeübt wird. Gilt für entsprechend kleine Drücke $\Delta\nu(\vec{R}) \ll \nu(\vec{R})$, kann die verschobene Absorptionsfrequenz $\nu'(\vec{R}, \Delta p)$ um $\Delta p = 0$ linear entwickelt werden:

$$\nu'(\vec{R}, \Delta p) = \nu(\vec{R}, \Delta p = 0) + \Delta\nu(\vec{R}, \Delta p) \quad (2.19)$$

wobei

$$\Delta\nu(\vec{R}, \Delta p) = \frac{\partial\nu}{\partial R} \cdot \frac{\partial R}{\partial V} \cdot \frac{\partial V}{\partial p} \cdot \Delta p \equiv \alpha(\vec{R}) \cdot \Delta p \quad (2.20)$$

Unter einer weiteren wesentlichen Annahme einer *homogenen* und *isotropen* Matrix können nun alle Vektoren \vec{R} durch deren Beträge R ersetzt werden. Wird desweiteren von einem kugelförmigen Volumen ausgegangen und die Definition der isothermen Kompressibilität κ verwendet, ergeben sich für die beiden partiellen Ableitungen in Gleichung 2.20 folgende Relationen:

$$V = \frac{4}{3}\pi R^3 \quad \text{und} \quad \kappa = -\frac{1}{V} \cdot \frac{\partial V}{\partial p} \implies \frac{\partial R}{\partial V} = \frac{R}{3V} \quad \text{und} \quad \frac{\partial V}{\partial p} = -V\kappa \quad (2.21)$$

Schließlich kann $\alpha(R)$ aus Gleichung 2.20, als Maß für die Druckempfindlichkeit des Systems, auf folgende Weise geschrieben werden:

$$\alpha(R) = -\frac{R}{3} \cdot \kappa \cdot \frac{\partial\nu(R)}{\partial R} \quad (2.22)$$

Vollständige Beschreibung der Theorie

Analog zur Berechnung der inhomogenen Linie gewinnt man auch aus der mittleren Lösungsmittelverschiebung s_0 sowie der inhomogenen Verbreiterung σ_0 eines spektralen Lochs unter Druckänderung Δp die entsprechenden Größen für die Druckverschiebung s_p und der Druckverbreiterung σ_p . Dabei gilt zunächst für die gaußförmige Druckverteilungsfunktion $f(\nu'|\nu, \Delta p)$:

$$f(\nu'|\nu, \Delta p) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_p^2}} \cdot \exp\left\{-\frac{(\nu' - \nu - \Delta\nu(\nu, \Delta p))^2}{2\sigma_p^2}\right\} \quad (2.23)$$

Hierbei kann ν als Differenz der Brennfrequenz ν_B und der Vakuumfrequenz ν_{vac} geschrieben werden:

$$\nu = \nu_B - \nu_{vac} \quad (2.24)$$

Somit erhält man schließlich für die **Verschiebung** eines spektralen Lochs s_p unter Druckanwendung Δp :

$$s_p = \left[N \langle \alpha(R) \rangle + \frac{\langle \alpha(R) \cdot \nu(R) \rangle}{\langle \nu(R)^2 \rangle} \cdot (\nu_B - \nu_{vac} - s_0) \right] \cdot \Delta p \quad (2.25)$$

Entsprechend erhält man für die **Lochverbreiterung** σ_p unter Druckveränderung Δp :

$$\sigma_p = \sqrt{N \langle \alpha^2(R) \rangle \cdot (1 - \rho^2)} \cdot |\Delta p| \quad (2.26)$$

Der Korrelationsgrad ρ stellt ein Maß für die Ähnlichkeit der Größen $\alpha(R)$ und $\nu(R)$ dar, die wiederum die Matrixkonfigurationen *mit* bzw. *ohne* Druck charakterisieren:

$$\rho^2 = \frac{\langle \alpha(R) \cdot \nu(R) \rangle^2}{\langle \alpha^2(R) \rangle \langle \nu^2(R) \rangle} \quad (2.27)$$

Die spitzen Klammern in den Gleichungen 2.16, 2.17, 2.25, 2.26 und 2.27 stellen jeweils Ensemble-Mittelwerte nach folgendem Muster dar:

$$\langle \alpha(\vec{R}) \rangle = \frac{1}{V} \iiint d^3 R g(\vec{R}) \alpha(\vec{R}) \quad (2.28)$$

Der Korrelationsgrad ρ zwischen $\alpha(R)$ und $\nu(R)$ schwankt zwischen hoher bzw. gar keiner Korrelation: $0 \leq \rho^2 \leq 1$. Besteht eine nahezu perfekte Korrelation zwischen $\alpha(R)$ und $\nu(R)$, gilt $\rho^2 = 1$ und darausfolgend verschwindet σ_p in Gleichung 2.26. Ein solches Verhalten wird beispielsweise bei hochgeordneten kristallinen Materialien beobachtet und konnte experimentell verifiziert werden (33; 34): trotz einer starken Verschiebung des spektralen Lochs unter Druck kommt es zu keiner signifikanten Verbreiterung. Offensichtlich verändert sich in derartig hochkorrelierten Systemen durch Anwendung hydrostatischer Drücke ausschließlich die Materialdichte, nicht aber lokale Strukturen in der Umgebung der Sondenmoleküle. Sind dagegen $\alpha(R)$ und $\nu(R)$ völlig unkorreliert, gilt entsprechend $\rho \simeq 0$, erreicht die Lochverbreiterung σ_p maximale Werte. Dieses Verhalten ist z.B. für Gläser typisch, deren struktureller Aufbau durch statistische Unordnung geprägt ist. Bemerkenswert ist jedoch die Beobachtung, das selbst Proteine ein ähnliches Verhalten bezüglich der Druckverbreiterung spektraler Löcher zeigen, wie sie für Gläser auftreten, obwohl sie einen wohlorganisierten Aufbau besitzen.

2.3.3 Kompressibilität und Volumenfluktuationen

Durch Berücksichtigung der Farbstoff-Matrix-Wechselwirkungsart erhält man für Gleichung 2.25 eine analytisch auswertbare Beziehung der Druckverschiebung s_p . Die Annahme einer R^{-n} -Abhängigkeit, wie sie beispielsweise für die elektrostatische Dispersions-Wechselwirkung Gültigkeit hat, führt schließlich in Gleichung 2.22 zu $\nu(R) \propto \alpha(R)$. Nun kann in Gleichung 2.25 $\alpha(R)$ durch von $\nu(R)$ abhängende Terme ersetzt werden. Der erste Summand ist somit zur mittleren Lösungsmittelverschiebung s_0 proportional und wird durch s_0 im zweiten Summanden eliminiert. Damit ergibt sich folgende für die Auswertung der Druckeffekt-Experimente bedeutende Beziehung für die Druckverschiebung s_p :

$$s_p = \frac{n}{3} \cdot \kappa \cdot (\nu_B - \nu_{vac}) \cdot \Delta p \quad (2.29)$$

Elastische Deformationen von Gläsern und Proteinen werden in erster Linie von Dispersionskräften und elektrostatischen Wechselwirkungen höherer Ordnung bestimmt und lassen sich daher gut durch die Wahl von $n = 6$ für die Abstandsabhängigkeit zwischen Chromophor und Matrixumgebung beschreiben (34; 35). Die Untersuchung von Polymeren mit bereits bekannten Werten der Kompressibilität κ durch Druckeffekt-Experimente an spektralen Löchern bestätigen diesen Ansatz (36). Vergleiche gemessener Kompressibilitäten in Gläsern und Proteinen mit der Methode des spektralen Lochbrennens und anderer Techniken liefern eine gute Übereinstimmung der erhaltenen Ergebnisse (37; 38; 39).

Die folgenden beiden wichtigen Aussagen können aus Gleichung 2.29 gewonnen werden:

1. Die Verschiebung des spektralen Lochs unter Druck s_p hängt in linearer Weise von der Druckdifferenz Δp ab.
2. Die Geradensteigung $s_p/\Delta p$ steht in einem linearen Zusammenhang zur Brennfrequenz ν_B . Dies wird auch als *Farbeffekt* bezeichnet.

Ermittlung der Vakuumfrequenz ν_{vac}

Die Druckverschiebung s_p verschwindet gerade dann, wenn die Brennfrequenz ν_B der Vakuumfrequenz ν_{vac} entspricht. Druckeffekt-Experimente erlauben also die Bestimmung der Vakuumfrequenz eines Farbstoff-Matrix-Systems. Liegt zudem ν_{vac} innerhalb der inhomogenen Absorptionsbande, wechselt die Druckverschiebung s_p an der Frequenzposition $\nu_B = \nu_{vac}$ ihr Vorzeichen und führt somit für $\nu_B < \nu_{vac}$ zu hypsochromen, entsprechend für $\nu_B > \nu_{vac}$ zu bathochromen Verschiebungen der spektralen Löcher unter Druck.

Bestimmung der Kompressibilität κ

Trägt man die Geradensteigungen $s_p/\Delta p$ gegen die Brennfrequenz ν_B auf, erhält man wiederum eine Gerade, deren Steigung gerade dem doppelten Wert (für

$n = 6$) der Kompressibilität κ entspricht. Der Druckeffekt spektraler Löcher ermöglicht somit die Ermittlung der Kompressibilität κ sowie der Vakuumfrequenz ν_{vac} eines untersuchten Chromophor-Matrix-Systems. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, daß mit dieser speziellen Technik eine Kompressibilität gemessen wird, die sich aus einem Mittelwert über die Reichweite R^{-6} -relevanter Wechselwirkungen zusammensetzt und nicht die ganze Probe betrifft. In diesem Sinne handelt es sich bei der optisch bestimmten Kompressibilität κ um eine lokale Größe, die speziell die mechanischen Eigenschaften der Nahumgebung des Chromophors berücksichtigt. Diese Methode ist daher besonders zur Untersuchung der elastischen Eigenschaften biologischer Makromoleküle geeignet, die einen Chromophor als Sondenmolekül enthalten.

Volumenfluktuationen

Die isotherme Kompressibilität κ ist nicht nur für die elastischen Eigenschaften der Chromophorumgebung von Interesse, sondern spielt zudem als thermodynamische Grundzustandsgröße eine Rolle. Die statistische Mechanik liefert außerdem einen Zusammenhang zwischen der Kompressibilität κ , einem Materialparameter, der durch Experimente zugänglich ist und den Volumenfluktuationen $\Delta V/V$ (20):

$$\langle \Delta V \rangle^2 = \kappa \cdot k_B \cdot T \cdot V \quad (2.30)$$

Neben dem Ensemble-Mittelwert der Volumenschwankungen $\langle \Delta V \rangle$ bedeuten κ die isotherme Kompressibilität, k_B den Boltzmannfaktor, T die Temperatur und V das betrachtete Volumen. Volumenfluktuationen spielen gerade bei Proteinen eine wesentliche Rolle z.B. in der Enzymaktivität oder der Besetzung von Konformationssubzuständen.

2.3.4 Näherungen des mikroskopischen Modells

Zur analytischen Beschreibung des Druckeffekts durch das mikroskopische Modell von B. B. Laird und J. L. Skinner sind einige Näherungen notwendig, die für biologische Systeme in Glasmatrixes im ersten Moment nicht unbedingt angemessen scheinen. Die folgenden drei wichtigsten Annahmen sollen aus diesem Grunde kurz besprochen werden (4):

1. **Reversible und elastische Deformationen:** Alle Druckeffekt-Experimente wurden mit Drücken unter 2 MPa ausgeführt. In diesem Druckbereich reagieren Systeme biologischer Makromoleküle, wie beispielsweise Proteine, völlig elastisch. Auch die Reversibilität der Deformationen war für alle durchgeführten Messungen gewährleistet und wurde stets überprüft: Nach einer Meßreihe an einer bestimmten Brennfrequenz ν_B mit schrittweiser

Erhöhung des Drucks ausgehend von einem gewissen Anfangsdruck p_0 wurde der Druck am Ende wieder auf den Ausgangsdruck reduziert und die beiden entsprechenden Lochspektren miteinander verglichen. Es wurden keine signifikanten Änderungen beobachtet.

2. **Homogene und isotrope Matrix:** Für die Einführung der skalaren isothermen Kompressibilität κ in die Theorie des Druckeffekts spektraler Löcher sind die beiden Bedingungen einer homogenen und isotropen Matrix nötig. Die Richtungsabhängigkeit der Materialgröße κ müßte streng genommen im Falle einer anisotropen Struktur der Chromophor-Umgebung durch einen entsprechenden tensoriellen Charakter der Kompressibilität berücksichtigt werden. Biologische Makromoleküle stellen jedoch in der Regel keine Systeme mit homogenen und isotropen Strukturen dar. Einzelne Domänen in Proteinen können durchaus voneinander abweichende mechanische Eigenschaften besitzen. Deshalb können mit dieser experimentellen Methode lediglich Aussagen über eine lokal gemittelte Kompressibilität getroffen werden.
3. **Unkorrelierte Lösungsmittelmoleküle:** Zur Herleitung der inhomogenen Absorptionsbande wurden zwei Annahmen getroffen, die sich beide zu widersprechen scheinen (siehe S. 24): Zum einen wurde für die Gaußsche Näherung eine hohe Anzahldichte an Lösungsmittelmolekülen benötigt, zum anderen sollten Lösungsmittelmoleküle nur Wechselwirkungen mit Farbstoffmolekülen eingehen und nicht untereinander. Röntgenstrukturanalysen von Proteinen zeigen eine strukturelle Unbestimmtheit der Aminosäure-Residuen von durchschnittlich $\langle x^2 \rangle^{1/2} = 0.2 \dots 0.3 \text{ \AA}$, die um etwa zwei Größenordnungen größer als die relativen Lageänderungen durch Druckeinwirkung sind. Auf dieser Längenskala können die einzelnen Residuen also tatsächlich als voneinander unabhängig gesehen werden. Der Gültigkeitsbereich des mikroskopischen Modells kann deswegen von Gläsern auch auf biologische Systeme, wie beispielsweise Proteine oder DNA-Stränge ausgeweitet werden.

Kapitel 3

Experiment

3.1 Lasersysteme und Monochromator

Lochbrennexperimente mit ihrer hohen spektralen Auflösung erfordern einigen technischen Aufwand. Hierfür ist ein durchstimmbares Lasersystem mit einer schmalen Linienbreite erforderlich. Um die zu untersuchenden Proben bei tiefsten Temperaturen von einigen Kelvin zu halten, wird ein Kryostat samt Kältemittel (flüssiger Stickstoff zur Vorkühlung und flüssiges Helium als eigentliches Kältemittel) und Tieftemperaturzubehör (Pumpen für Schutzvakuum, Kühlmittelpumpe und Manometer zur Dampfdruck- bzw. Temperaturbestimmung) benötigt.

Lasersystem für VIS-Anwendungen (siehe Kapitel 5)

Für die Experimente im sichtbaren Spektralbereich stand ein Farbstoffringlaser 699-21 (Coherent) zur Verfügung, der von einem Argonionenlaser Innova 90 (Coherent) mit einer Ausgangsleistung von 6 W im MultiLine-Betrieb¹ optisch gepumpt wurde. Der verwendete Laserfarbstoff Rhodamin 6G erlaubte einen Durchstimmbereich von 565 bis 615 nm ($16260 - 17699 \text{ cm}^{-1}$) mit einer typischen Ausgangsleistung nach dem Auskoppelspiegel des Ringlasers von etwa 200 – 300 mW.

Lasersystem für UV-Anwendungen (siehe Kapitel 4)

Die Messungen im ultravioletten Spektralbereich wurden mit einem entsprechenden Lasersystem unternommen. In diesem Falle wurden der Argonionenlaser Innova Sabre (Coherent) mit einer Pumpleistung von 6 W im SingleLine-Betrieb² benutzt, um einen nachfolgenden Farbstoffringlaser 899-29 (Coherent) optisch zu pumpen. Mit dem Laserfarbstoff Rhodamin 6G konnte in einem Wellenlängenbereich von 565 und 615 nm ($16260 - 17699 \text{ cm}^{-1}$) mit einer typischen

¹Im MultiLine-Betriebsmodus tragen alle sichtbaren Argonübergänge (etwa 8 Linien) zur Gesamtleistung bei. Hier sind im wesentlichen zwei Hauptlinien bei 514.5 nm (19436 cm^{-1}) mit ca. 40% und bei 488 nm (20492 cm^{-1}) mit ca. 30% maßgeblich.

²Bei diesem Argonionenlaser-Modell ist es möglich, mittels eines Prismas im Resonator einzelne Argonlinien zu selektieren. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurde immer die 514.5 nm-Linie verwendet.

Experiment	VIS (DNA) ^a	UV (Phe, Tyr, Trp, BPTI) ^b	
Pumplaser	Innova 90 6 W MultiLine	Innova Sabre 6 W SingleLine	
Farbstofflaser	699-21	899-29	
Farbstoffe	Rhodamin 6G 565-615 nm 16260-17700 cm ⁻¹ ca. 200-300 mW	Rhodamin 110 530-570 nm 17544-18868 cm ⁻¹ ca. 400-500 mW	Rhodamin 6G 565-615 nm 16260-17700 cm ⁻¹ ca. 250-350 mW
Frequenz- verdoppler Einheit		265-285 nm 35088-37736 cm ⁻¹ ca. 1-5 mW	283-308 nm 32468-35336 cm ⁻¹ ca. 5-10 mW

^asiehe Kapitel 5

^bsiehe Kapitel 4

Tabelle 3.1: Frequenzbereiche und Leistungen der verwendeten Lasersysteme einschließlich Frequenzverdoppler-Einheit.

Ausgangsleistung von ca. 400 – 500 mW gearbeitet werden. Der benachbarte Spektralbereich von 530 bis 570 nm (17544 – 18868 cm⁻¹) wurde mit Rhodamin 110 sowie typischen Ausgangsleistungen von ca. 250 bis 350 mW abgedeckt. Der Übersichtlichkeit halber sind alle Frequenzbereiche und Lichtleistungen in Tabelle 3.1 nochmals zusammengefaßt.

Eigenschaften der Farbstoffringlaser

Die für die Lochbrenn-Experimente verwendeten cw-Lasersysteme waren über einen Frequenzbereich von 30 GHz durchstimmbar und lieferten einige hundert mW Ausgangsleistung. Die Linienbreite der Farbstofflaser lag laut Herstellerangaben in der Größenordnung von einigen hundert kHz³, die gegenüber der gemessenen Linienbreite in dieser Arbeit (einige GHz) vollkommen vernachlässigbar ist. Auch der Frequenzdrift des Lasers (Größenordnung von einigen MHz/Stunde) waren im Rahmen der hier vorgestellten Experimente vernachlässigbar.

Kalibrierung des Scanbereichs

Für die Kalibrierung des vom Laser durchstimmbaren Frequenzbereichs wurde ein Teil des Laserlichts durch ein Fabry-Perot-Interferometer (FPI) auf eine Photodiode geleitet. Der freie Spektralbereich (FSR) war genau definiert und es konnte zwischen drei verschiedenen Etalons gewählt werden: 0.3 bzw. 1.5 und 7.5 GHz. Durch Abzählen der Transmissionsmaxima während des Durchstimmens von 30 GHz konnte der Scanbereich genau kalibriert werden.

³Coherent gibt in seinen Betriebsanleitungen einen Wert von 500 kHz an.

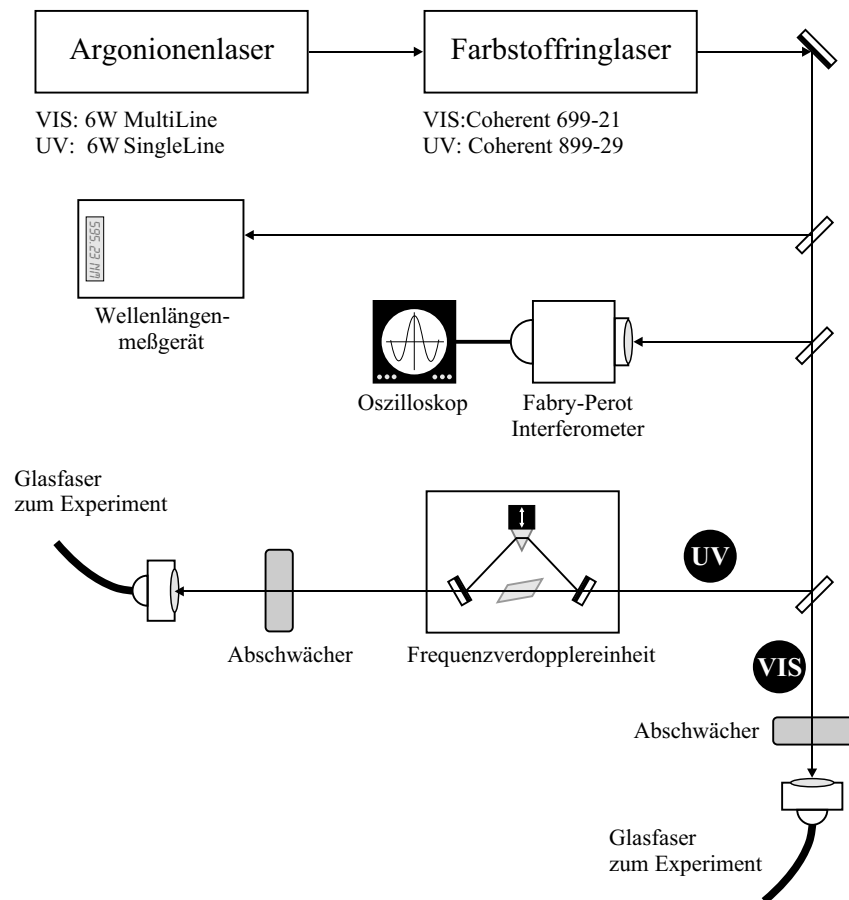


Abbildung 3.1: Laseraufbau für die Lochbrenn-Experimente im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. Einzelheiten finden sich im Text.

Absolutmessung der Laserwellenlänge

Zur Bestimmung der absoluten Laserwellenlänge wurde ein kommerzielles Wellenlängenmeßgerät (Burleigh WA-2000) verwendet.

Brenn- und Auslesevorgang

Die Laserintensitäten zwischen dem Brenn- und Ausleseprozeß unterscheiden sich um den Faktor 100 bis 1000, so daß sich Nachbrenneffekte vermeiden lassen. Für die Abschwächung der Laserintensität wurden Graufilter verwendet, die im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich arbeiten.

Für die Starkeffekt-Messungen wird noch zusätzlich ein Glan-Taylor-Polarisator verwendet, um linear polarisiertes Licht mit einem frei wählbaren Winkel zur Laborebene zu erzeugen.

Frequenzverdoppler

Um in den ultravioletten Spektralbereich vordringen zu können, wird ein Frequenzverdoppler benötigt. In dem hier vorliegenden Fall wurde ein durchstimmbarer, externer Frequenzverdoppler (WaveTrain) verwendet. Das Laserlicht des Farbstofflasers gelangt in den Resonator des Frequenzverdopplers und wird dort derart verstärkt, daß durch nichtlineare optische Prozesse in einem BBO-Kristall⁴ ultraviolettes Licht erzeugt wird. Der Resonator kann seine Länge über ein Prisma, daß auf einem Piezo-Element angebracht ist, verändern. Somit ist es möglich, daß während eines Scanvorgangs des Farbstofflasers der Frequenzverdoppler automatisch der fundamentalen Laserwellenlänge folgt und somit eine Durchstimmung im UV erfolgt.

Monochromator

Für Übersichtsspektren wurde ein Jobin Yvon Monochromator (1m-Czerney-Turner-Anordnung) mit einem Gitter mit 600 Strichen/mm (geblazed im UV) verwendet. Als Lichtquelle hierfür diente eine Xenon-Hochdruck-Bogenlampe mit einer Leistung von 75 W. Bei einer gewöhnlich verwendeten Spaltbreite von 100 μm für Ein- und Ausgangsspalt, ergaben sich für die Auflösung des Monochromators einige cm^{-1} . Dies war für die vorliegende Arbeit ausreichend.

3.2 Kryostat und optischer Aufbau

Helium-Badkryostat

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde ein Helium-Badkryostat (Eigenbau) mit optischen Fenstern verwendet. In dieser Kryostat-Ausführung befindet sich die Probe direkt im flüssigen Helium, das bei Raumdruck eine Temperatur von 4.2 K besitzt. Durch Erniedrigung des Dampfdrucks von Helium im Kryostat durch eine mechanische Drehschieberpumpe wurden für die Lochbrennexperimente Drücke von 30 mbar erreicht, was einer Temperatur des flüssigen Heliums von etwa 2 K entspricht. Die Bestimmung der Temperatur geschieht mittels Messung des Dampfdrucks von Helium. Bei 2.18 K, dem sogenannten λ -Punkt von Helium (entsprechend einem Dampfdruck von etwa 50 mbar), findet ein Phasenübergang von der flüssigen in die suprafluide Phase statt. In diesem Zustand kommt jegliches Sieden von Helium zum Erliegen und die Blasenbildung erlischt. Aufgrund des verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden alle Lochbrennexperimente unterhalb des λ -Punktes ausgeführt.

⁴BBO ist die Abkürzung für Bariumbetaborat ($\beta - \text{BaB}_2\text{O}_4$) und ist einer der Kristalle, die zur Frequenzverdopplung eingesetzt werden können. Er arbeitet im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 350 nm und hält Leistungsdichten von bis zu 5 GW/cm^2 stand.

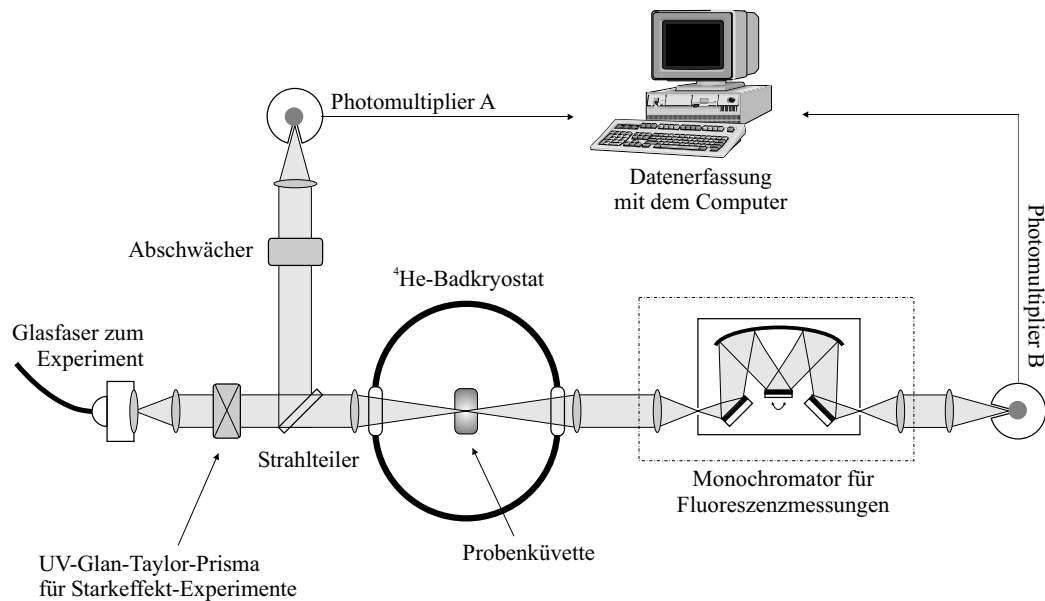


Abbildung 3.2: Kryostat und optischer Aufbau. Für Starkeffekt-Messungen wird zusätzlich ein UV-Glan-Taylor-Prisma benötigt. Ein kleiner Gitter-Monochromator hinter der Probe ermöglicht die Aufnahme von Emissionsspektren.

Optischer Aufbau

Der Kryostat wurde in einen typischen Absorptionaufbau integriert (siehe Abb. 3.2). Alle optischen Elemente nebst Kryostat wurden UV-tauglich konzipiert. Für die Starkeffekt-Messungen wurde noch ein linearer Polarisator (Glan-Taylor-Prisma) benötigt. Zur Erfassung der Lichtintensität wurden zwei baugleiche Photomultiplier (R928 von Hamamatsu) verwendet. Die Ausgangsströme der Photomultiplier wurden geglättet (RC-Glieder) und verstärkt (Strom-Spannungsverstärker HMS Modell 564) und über eine A/D-Wandler-Karte in einem PC weiterverarbeitet. Während der Photomultiplier A (A-Kanal, Probe) die transmittierte Lichtintensität erfaßt, dient der Photomultiplier B (B-Kanal, Referenz) zur Erfassung der Leistungsschwankungen des Lasers bzw. des Monochromators. Für die Fluoreszenzmessungen wurde zusätzlich hinter die Probe ein kleiner Gittermonochromator (1/8 m Monochromator der Firma Oriel) mit einer Auflösung von 100 cm^{-1} eingebaut.

3.3 Starkeffekt

Technische Beschreibung

Für die Starkeffekt-Messungen befand sich die Probenküvette zwischen zwei Stark-Elektroden (Aluminium-Platten, $b = 18$ mm, $l = 35$ mm) in einem Abstand d , der je nach Küvettenart zwischen 0.6 und 1.1 cm variiert werden konnte. Beide Platten wurden jeweils mit einem unpolbaren Hochspannungsnetzgerät verbunden (fug HCN 14-6500 für ± 6.5 kV bzw. fug HCN 14-12500 für ± 12.5 kV). Mit dieser Anordnung konnten maximale Feldstärken bis zu 58 kV/cm erreicht werden. Wird beispielsweise ein Loch gebrannt, an der einen Elektrode eine Spannung von -6.5 kV, an der anderen eine Spannung von $+12.5$ kV angelegt und anschließend schrittweise die Elektrodenspannung verändert, so daß schließlich erstere nun -6.5 kV und letztere -12.5 kV besitzt, wird eine Hochspannung von maximal 38 kV durchlaufen. Aufgrund der Linearität des Starkeffekts spielen in diesem Falle nur die Änderungen des elektrischen Feldes eine Rolle. Wird beispielsweise ein Plattenabstand von $d = 0.65$ cm realisiert, können maximale elektrische Feldstärken von bis zu 58 kV/cm erreicht werden (siehe hierzu Abb. 3.4). Im Folgenden wird immer die Differenz bzw. die Änderung des Feldes nach dem Brennen des Lochs betrachtet.

Alle Starkeffekt-Experimente wurden unterhalb des λ -Punktes ausgeführt, da durch das Ausbleiben des Siedens von Helium und der damit verbundenen Beruhigung der Flüssigkeit in der suprafluiden Phase Durchschläge vermieden wurden, sowie das bessere Signal-zu-Rausch-Verhältnis ausgenutzt werden konnte. Um die für den Starkeffekt nötigen unterschiedlichen Polarisationsgeometrien einzustellen, wird noch ein UV-Glan-Taylor-Prisma benötigt, das unpolarisiertes Licht in linear polarisiertes Licht mit einem bestimmten Winkel zu einer Bezugsebene verwandelt. Das anfangs linear polarisierte Laserlicht wird durch die Benutzung einer MultiMode-Glasfaser unpolarisiert, so daß nach der Auskopplung des Laserlichts aus der Glasfaser das Glan-Taylor-Prisma wiederum das Laserlicht linear polarisiert und durch Drehung des Prismas jeder gewünschte Winkel einstellbar ist. Zwei Polarisationsgeometrien werden für die hier beschriebenen Experimente benötigt:

- die parallele Polarisationsanordnung: $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$
- die senkrechte Polarisationsanordnung: $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$

Dabei bedeuten \vec{E}_L die Polarisierung des Laserfeldes, \vec{E}_S das durch die Elektroden erzeugte Starkfeld. Zur besseren Veranschaulichung siehe auch Abb. 3.3.

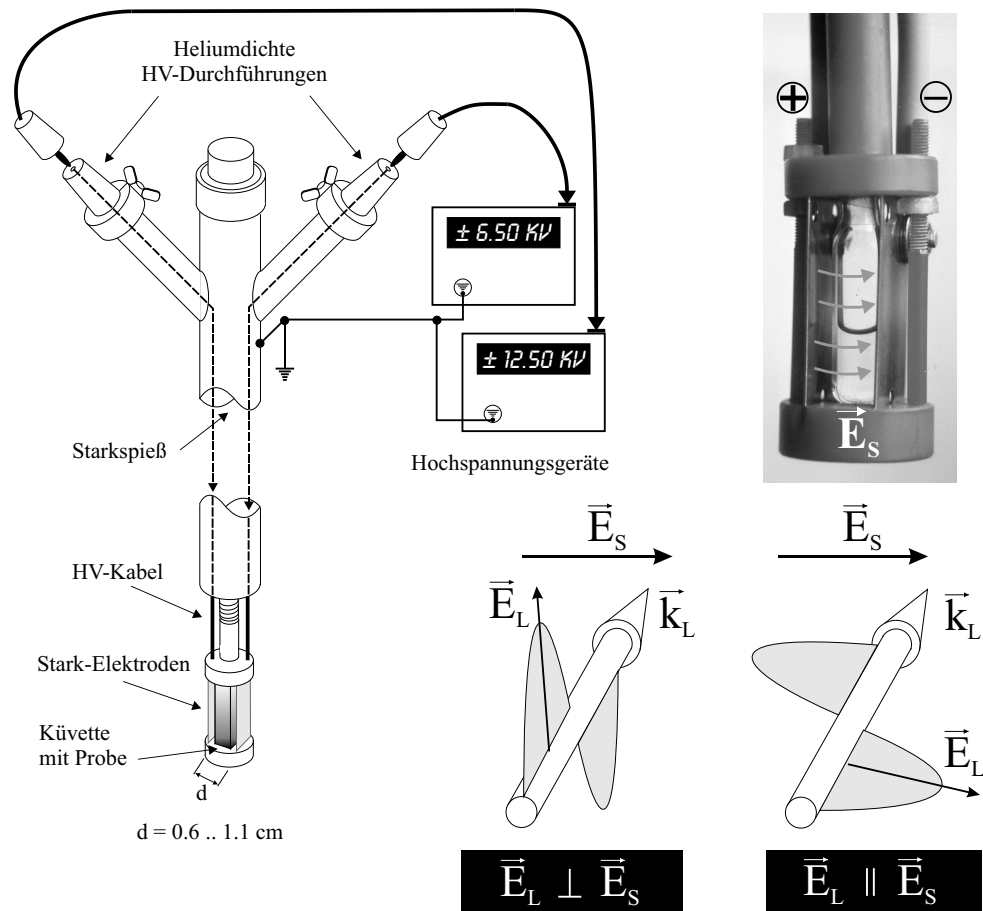


Abbildung 3.3: Anordnung für die Starkeffekt-Experimente. Starkspieß mit Stark-Elektroden und Probenküvette. Zum besseren Verständnis sind die beiden Polarisationsgeometrien dargestellt. Näheres dazu im Text.

Durchführung des Starkeffekt-Experiments

Wie bereits zuvor erwähnt, wird die Probe für das Starkeffekt-Experiment zunächst unter den λ -Punkt abgekühlt. Wenn sich die gewünschte Temperatur stabilisiert hat, wird das Stark-Feld eingestellt, mit dem Glan-Taylor-Prisma eine der beiden Polarisationsgeometrien realisiert und ein Loch gebrannt. Das somit erhaltene Lochspektrum wird für Mittelungszwecke mehrmals ausgelesen, da für die nachfolgende Auswertung eine gute Qualität der Spektren nötig ist. In konstanten Schritten wird anschließend die elektrische Feldstärke bis zu einem Maximalwert verändert und jeweils mehrere Lochspektren aufgenommen. Abschließend wird die Hochspannung wieder auf die Anfangswerte zurückgestellt und wiederum mehrmals Lochspektren aufgenommen. Dies ist notwendig, um die während der gesamten Messung überlagerte spektrale Diffusion zu korrigieren.

Dieses Experiment wird nun für die zweite Polarisationsgeometrie an einer benachbarten spektralen Position wiederholt. Dieser Abstand beträgt mindestens eine Scanbreite von 30 GHz. Im Vergleich zur inhomogenen Linienbreite ist diese Frequenzdistanz jedoch vernachlässigbar klein und man spricht deshalb von einer gemeinsamen Brennfrequenz ν_B .

Auswertung der Starkspektren

Für die Auswertung der Meßdaten wurde ein FORTRAN-Programm von Jürgen Gafert (40) verwendet, das auf eine Fitroutine aus der IMSL-Bibliothek (41) zurückgreift. Die Formeln für den Starkeffekt gehen auf P. Schätz und M. Maier zurück (15).

Die Lochspektren des Starkeffekt-Experiments hängen für beide Polarisationsrichtungen von den gleichen Materialparametern ab:

- der molekülfesten Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$
- dem Winkel θ zwischen dem Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ und der molekülfesten Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$
- und der statistischen induzierten Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_i$

Aus diesem Grunde erfolgt die Fehlerquadrat-Minimierung für beide Polarisationsgeometrien simultan. Das Fitprogramm liefert pro Feldstärke \vec{E}_S folgende Parameter:

- der Winkel θ zwischen $\vec{\mu}_{01}$ und $\Delta\vec{\mu}_0$
- die Aufspaltung $\Delta = (f/h) \cdot E_S \cdot \Delta\mu_0 \cdot \langle \cos \phi \rangle$
- die Verbreiterung $\sigma = (f/h) \cdot E_S \cdot \langle \Delta\mu_i^2 \rangle^{\frac{1}{2}} \cdot \langle \cos^2 \phi' \rangle^{\frac{1}{2}}$

Da der Korrekturfaktor f unbekannt ist, wird auf die Angabe der absoluten Werte für Δ und σ verzichtet.

Werden nun Δ , σ und θ gegen \vec{E}_S aufgetragen, kann man aufgrund der Linearität der beiden Dipolmomentdifferenzen sowie der Konstanz des Winkels die Zuverlässigkeit der Fitergebnisse einschätzen (siehe dazu das Beispiel für den Starkeffekt in Abb. 3.4).

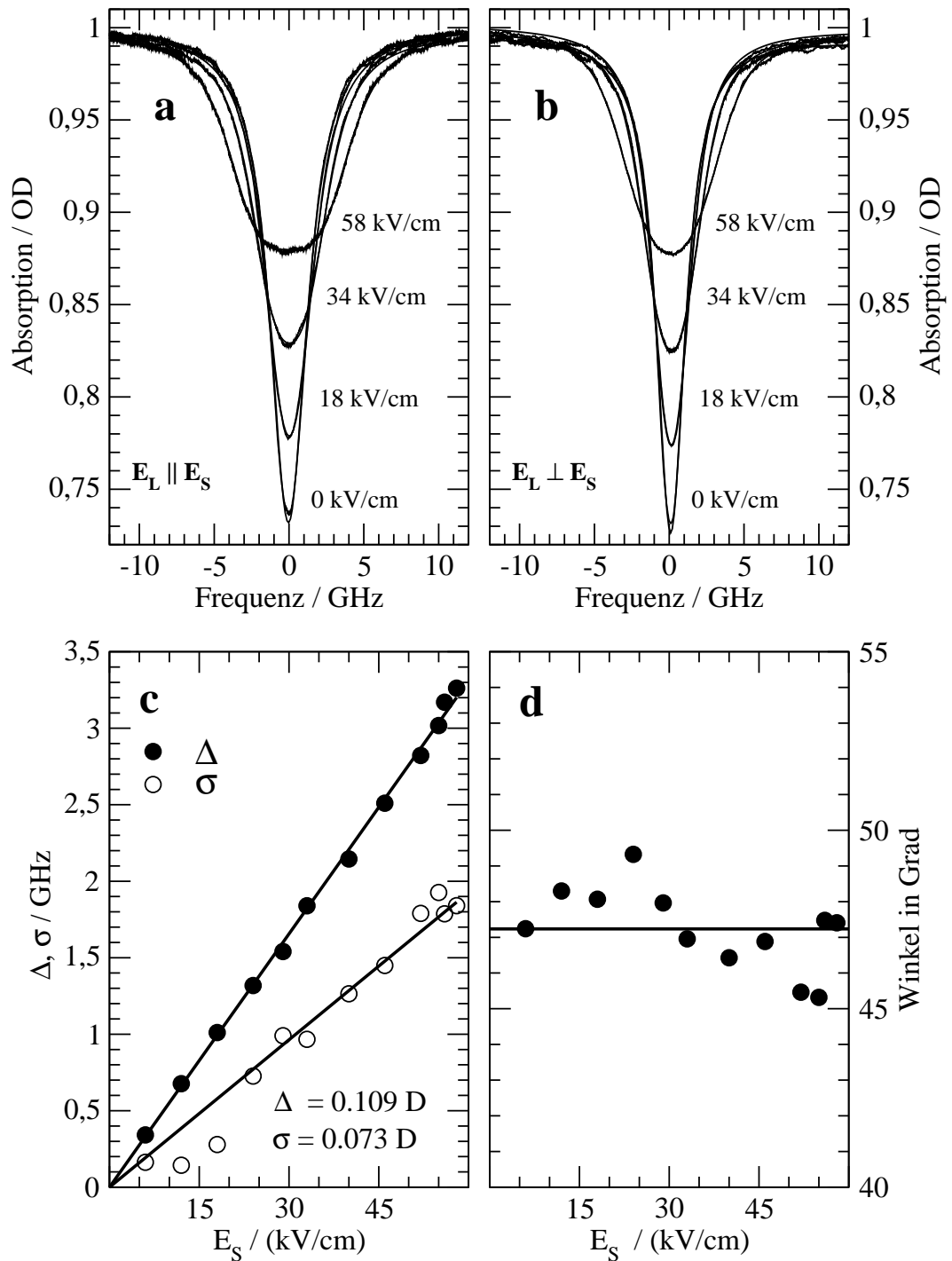


Abbildung 3.4: Beispiel eines Starkeffekts spektraler Löcher: Das Protein Meerretichperoxidase mit seinem Chromophor Mesoporphyrin IV in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K: (a) $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ bei 16310 cm^{-1} und (b) $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ bei 16312 cm^{-1} . (c) Aufspaltung Δ und Verbreiterung σ und entsprechende Ergebnisse in Debye. (d) Winkel θ zwischen $\Delta \vec{\mu}_0$ und dem Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ als Funktion des Starkfeldes \vec{E}_S . Experimente zur Spektralen Diffusion dieses Proteins sind in (42) beschrieben.

3.4 Druckeffekt

Beschreibung der Vorrichtung

Die Druckübertragung für die Druckeffekt-Experimente wird mit Hilfe einer Helium-Druckgasflasche realisiert. Damit eine isotrope Druckverteilung in der Probe gewährleistet ist, muß die zu untersuchende Substanz zuvor in ein Plastikbeutelchen eingeschweißt werden. Als Material diente hierzu Polyethylen, da die Transmission sowohl für den sichtbaren, also auch für den in dieser Arbeit interessierenden ultravioletten Spektralbereich nahezu bei 100% lag. Die Photostabilität wurde für Raum- und Heliumtemperatur getestet und stellte kein Problem dar. Die Dicke eines typischen Probebeutelchens lag im Bereich von 1 – 1.5 mm. Die Probe wurde in eine Druckzelle gegeben und mit UV-Fenstern über eine Indium-Dichtung verschlossen (siehe Abb. 3.5). Bei der üblichen Arbeitstemperatur von ca. 2 K konnten maximale Drücke von bis zu 2.5 MPa angelegt werden, da bei höheren Drücken die Erstarrung des flüssigen Heliums einsetzt (Phasendiagramm). Ein Präzisionsdrucksensor (Sensotec TJE/713-25) mit einer Genauigkeit von 10^{-3} diente der Druckmessung.

Experimentelle Durchführung

Mit einem handelsüblichen Haushaltsschweißgerät wurden kleine Plastik-Taschen gefertigt, die Probe mit Hilfe einer Injektionsspritze eingefüllt und anschließend verschweißt. Das entstandene Beutelchen wurde darauffolgend in die Druckzelle gegeben, die über zwei Indium-gedichtete UV-Fenster abgeschlossen wurde. Die Druckzelle wurde sodann auf Dichtigkeit überprüft und mit Drücken bis zu 3 MPa bei Raumtemperatur beaufschlagt. Um Luft und Feuchte aus der Druckkapillare zu entfernen, wurden mehrere Heliumspülungen des kompletten Systems ausgeführt. Nach dem Einbau in den Kryostaten mußte zuerst die Durchlässigkeit der Kapillare gewährleistet sein, um schließlich mit dem Experiment beginnen zu können.

Alle Druckeffekt-Experimente wurden unterhalb des λ -Punktes ausgeführt. Bei einem definierten Startdruck wurde ein relativ tiefes Loch gebrannt und die Lochspektren mehrmals für eine Mittelung aufgezeichnet. Die Erhöhung des Drucks erfolgte in konstanten Schrittweiten bis zu einem Maximalwert. An jedem Zwischenpunkt wurden mehrmals Lochspektren aufgenommen. Durch Ablassen des Heliums gelangte man wieder zum Ausgangspunkt zurück, wo wiederum die Lochspektren gemessen wurden. Durch Vergleich dieser Spektren mit den Anfangspektren konnten irreversible Effekte (z.B. spektrale Diffusion, Rückreaktion des Photoprodukts u.a.) und vor allem ein Laserdrift festgestellt werden. Die Messungen wurden für mindestens zehn Positionen in der Absorptionsbande der Probe wiederholt.

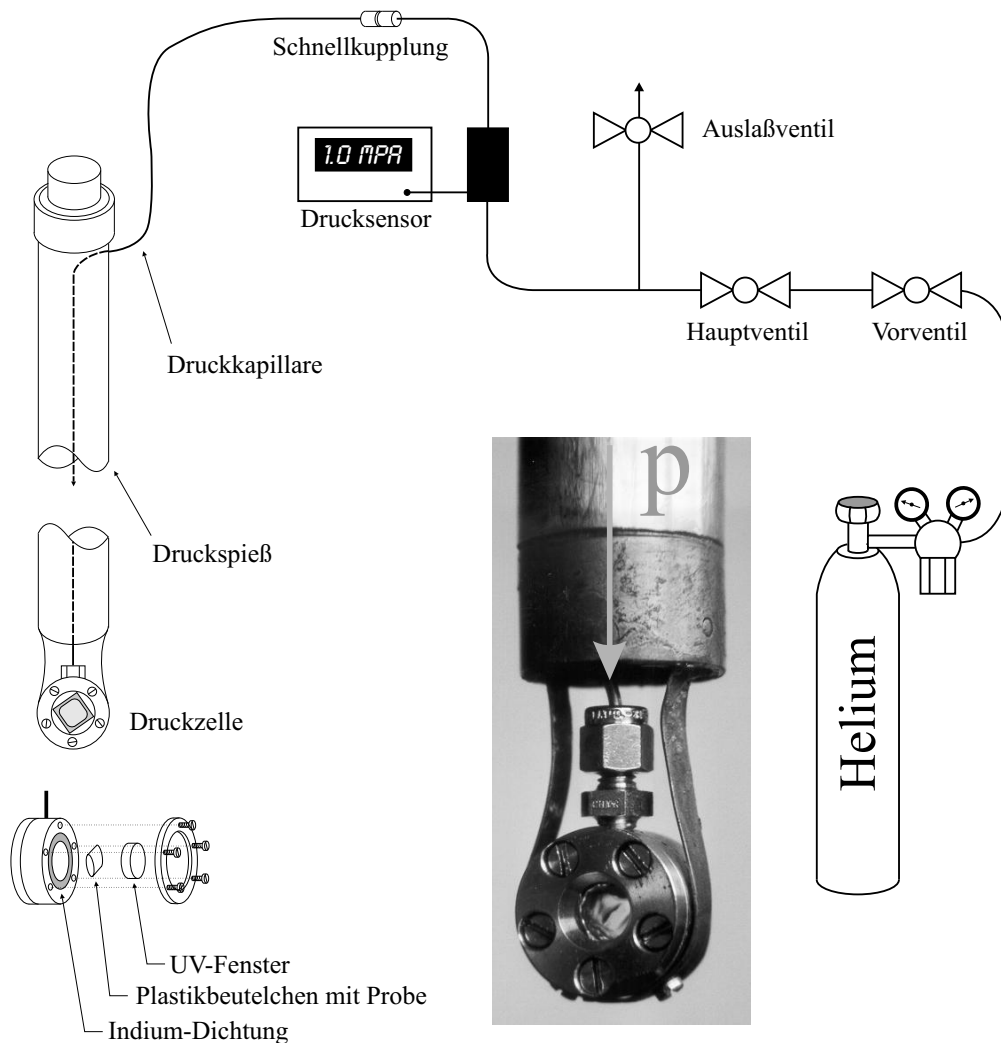


Abbildung 3.5: Anordnung für die Durchführung des Druckeffekts: Druckspieß und Druckzelle mit einzelnen Details. Weitere Einzelheiten finden sich im Text.

Die Kontrolle der Temperatur geschah über das Regulierungsventil beim permanenten Abpumpen des Heliums im Kryostaten (Erniedrigung des Dampfdrucks und Abkühlung der Flüssigkeit) und war von enormer Wichtigkeit, da eine leichte Temperaturveränderung im Kryostaten automatisch eine Druckveränderung auf der Probe verursachte.

Versuchsauswertung

Die bei einem bestimmten Ausgangsdruck gebrannten Löcher wurden mit Lorentzprofilen angepaßt. Nach Druckbeaufschlagung entwickeln sich diese lorentzförmigen Anfangslöcher mit einem Gaußkern weiter, so daß hier voigtförmige Profile zur Anpassung der Spektren nötig werden. Mit Hilfe der Fitroutine können Tiefe, Breite und Zentralfrequenz der spektralen Löcher ermittelt werden. Dabei

wird die Lochverschiebung s_p aus der Differenz der momentanen Zentralfrequenz und der Ausgangsfrequenz gewonnen. Zur Bestimmung von Kompressibilität κ und Vakuumwellenlänge ν_{vac} wird zunächst die Lochverschiebung s_p gegen die Druckdifferenz Δp aufgetragen. Die sich daraus ergebenden Geradensteigungen $s_p/\Delta p$ stehen wiederum mit der Brennfrequenz ν_B in einem linearen Zusammenhang (*Farbeffekt*, siehe Kap. 2.3). Auf diese Weise erhält man aus der Geradensteigung $(s_p/\Delta p)/\nu_B$ den zweifachen Wert der Kompressibilität κ . Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Frequenzachse liefert den Wert für die Vakuumfrequenz ν_{vac} (siehe Kap. 2.3 oder Abb. 3.6). Wird wie in Kap. 4 nur die Lochverschiebung s_p zur Auswertung der Druckeffekt-Experimente herangezogen, können neben den lorentzförmigen Ausgangsspektren auch die voigtförmigen Profile der spektralen Löcher unter Druck mit Lorentzkurven angepaßt werden, da es nur auf die Ermittlung der Zentralfrequenz der symmetrischen Lochspektren ankommt. Sind jedoch weitere Lochparameter wie Lochtiefe und Lochbreite von Interesse, muß die Anpassung der Lochspektren mit Voigtprofilen erfolgen. Dies war beispielsweise in Kap. 5 nötig, um die Lochverbreiterungen σ_p der verschiedenen Farbstoff-DNA-Systeme zu ermitteln.

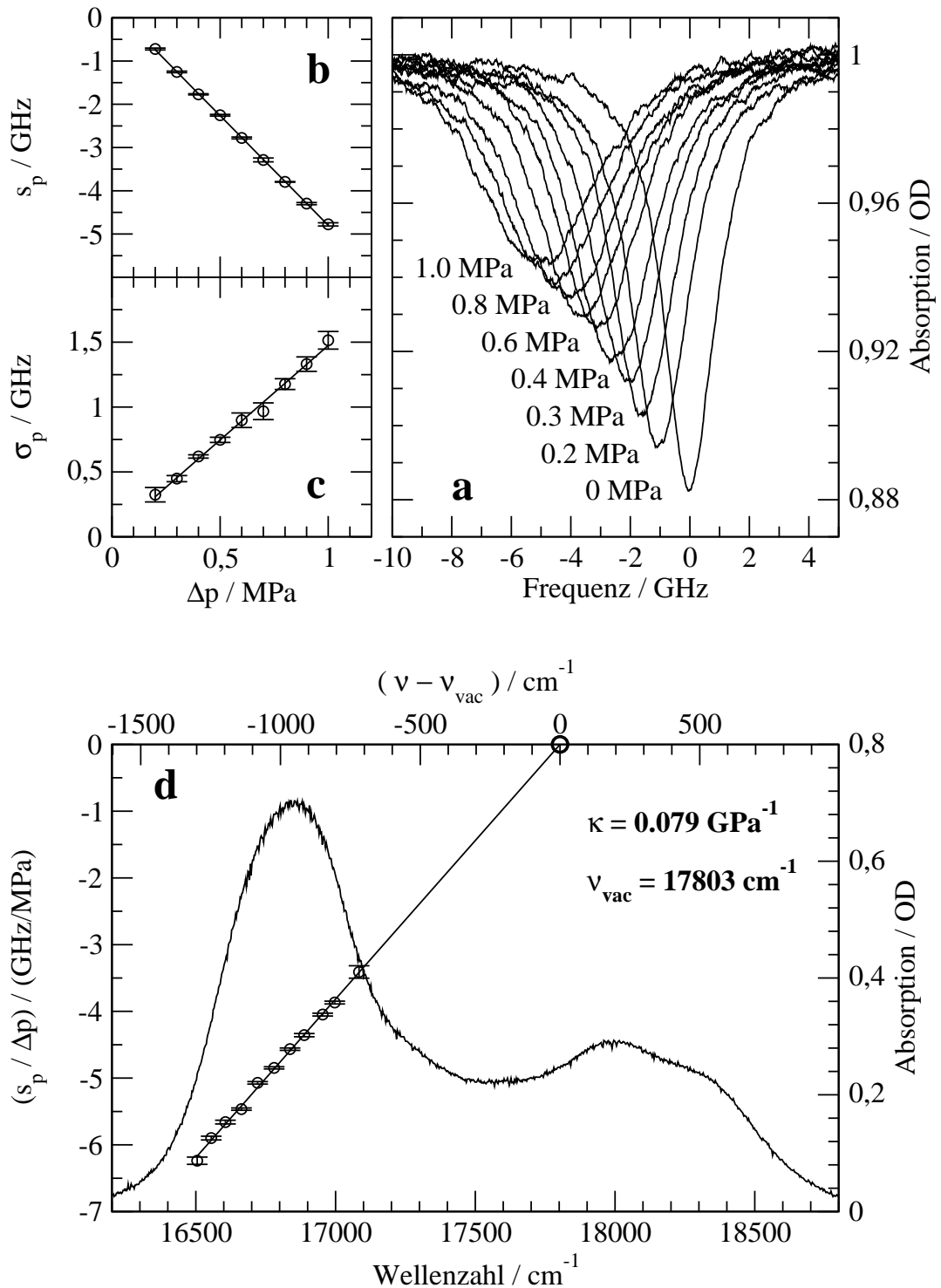


Abbildung 3.6: Beispiel eines Druckeffekts spektraler Löcher: BODIPY – [Thymin]₁₀-Komplex in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K. Die Probe wurde mit einem $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -Puffersystem auf einen pH von 9.0 stabilisiert. (a) Das bei 16721 cm^{-1} erzeugte spektrale Loch unter der Einwirkung eines äußeren Drucks Δp und dessen Verschiebung s_p (b) bzw. Verbreiterung σ_p (c). (d) $(s_p/\Delta p)$ als Funktion der spektralen Position mit hinterlegtem Absorptionsspektrum. Die Kompressibilität κ und die Vakuumwellenzahl ν_{vac} sind mit angegeben.

Kapitel 4

Aromatische Aminosäuren

Sollen Proteine und Protein-Komplexe mit Hilfe der hochauflösenden spektroskopischen Methode des Lochbrennens untersucht werden, sind dafür geeignete Farbstoffe als Sondenmoleküle nötig. Bisher konnten hierfür etliche Chromoproteine eingesetzt werden, wie beispielsweise einige spezielle Häm-Proteine. Neue Möglichkeiten ergeben sich durch die Nutzung der aromatischen Aminosäuren als intrinsische Sonden für die Lochbrennspektroskopie. In diesem Kapitel werden Lochbrenn-Experimente an den freien aromatischen Aminosäuren und von Tyrosin in dem Protein BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) vorgestellt und diskutiert. Da die aromatischen Aminosäuren in dieser Arbeit in Abhängigkeit des pH-Wertes betrachtet wurden, folgen in einem weiteren Abschnitt einige Überlegungen zu den Säure-Base-Eigenschaften und deren Auswirkung auf tiefe Temperaturen. Anschließend werden die Experimente an den drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan präsentiert und besprochen. Die Verwendung von Tyrosin als intrinsische Sonde im Protein BPTI beschließt dieses Kapitel.

4.1 Einleitung

4.1.1 Aufbau und Struktur von Proteinen

Proteine sind lange Kettenmoleküle, die durch eine kovalente Verknüpfung von 20 verschiedenen Aminosäuren gebildet werden. Sowohl die physikalischen als auch die chemischen Eigenschaften eines Proteins hängen davon ab, *wie* sich die Kette der Aminosäuren faltet. Die gesamte Information für die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur dieses Biopolymers ist bereits in der Aminosäuresequenz festgeschrieben.

Die Aminosäure als Grundbaustein der Proteine

Jede Aminosäure besteht aus einem α -Kohlenstoffatom C_α im Zentrum eines Tetraeders, dessen Eckpunkte mit einem Wasserstoffatom $-H$, einer *Aminogruppe* $-NH$, einer *Carboxylgruppe* $-COOH$ und einer *Seitenkette* $-R$ besetzt sind (siehe

Abb. 4.1 (a)). Die Aminosäuren unterscheiden sich lediglich durch ihre Seitenkette $-R$. In der Natur werden 20 ausgewählte Aminosäuren zur Biosynthese der Proteine verwendet.

Ihre vielfältigen Eigenschaften ergeben unterschiedliche Klassifizierungsmöglichkeiten. In der folgende Einteilung werden die Aminosäuren aufgrund ihrer elektrostatischen Eigenschaften in drei Gruppen gegliedert:

Aminosäuren mit

- hydrophoben Seitenketten: Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Met, (Gly)
- geladenen Seitenketten: Asp, Glu, Lys, Arg
- polaren Seitenketten: Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, His, Tyr, Trp.

Die Peptidbrücke als Bindeglied für Polypeptide

Zwei Aminosäuren werden kovalent zu einem Peptid verknüpft, wenn sich die Aminogruppe $-NH$ der einen Aminosäure mit der Carboxylgruppe $-COOH$ der anderen Aminosäure unter Wasserabspaltung verbindet. Durch Wiederholung dieser Reaktion entsteht eine Kette aus n einzelnen Aminosäuren, deren Anfang aus einer freien $-NH$ -Gruppe (Amino- oder N-terminus) und deren Ende aus einer freien Carboxylgruppe $-C=O$ (Carboxy- oder C-terminus) besteht. Die Abfolge der Aminosäuren (Aminosäure-Sequenz) wird als *Primärstruktur* bezeichnet.

Werden mehrere Aminosäuren durch die *Peptidbrücke* zu einem Protein verbunden, entsteht die sogenannte *Hauptkette*, auch *Protein-Rückgrat* genannt, deren Atome sich in periodischer Art und Weise fortsetzen: $\leftarrow (NH)-C_{\alpha}-(C=O)\rightarrow$. Da sich das π -Elektronensystem der $-C=O$ -Gruppe auch über die $C-N$ -Bindung erstreckt, bildet die dadurch entstehende delokalisierte π -Elektronenwolke eine starke Ebene aus (siehe Abb. 4.1 (b)). Zwischen zwei derartigen, plattenförmigen Peptideinheiten können noch zwei Rotationsbewegungen (Abb. 4.1 (c)) ausgeführt werden:

- Rotation um C_{α} -C-Achse (ψ -Winkel)
- Rotation um N- C_{α} -Achse (ϕ -Winkel)

Allerdings sind nicht alle Kombinationen der Rotationswinkel ϕ und ψ realisierbar, da die sterische Behinderung zwischen den Seitenketten und der Hauptkette die Anzahl der Konformationsmöglichkeiten beträchtlich einschränkt. Die in Proteinen tatsächlich beobachteten Winkelpaare werden in einem ϕ - ψ -Diagramm, nach seinem Erfinder auch als *Ramachandran-Plot* bezeichnet (43), durch zusammenhängende Flächen dargestellt.

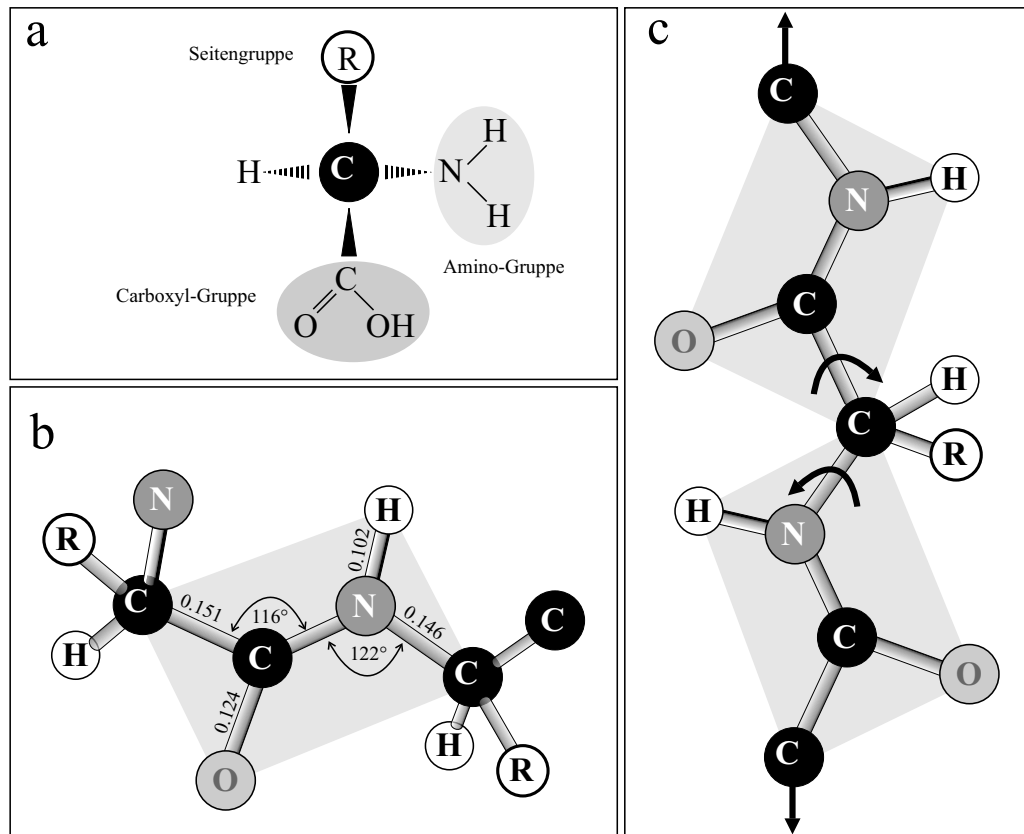


Abbildung 4.1: (a) Struktur einer α -Aminosäure: An dem zentralen α -Kohlenstoff befinden sich die Carboxyl- und die Aminogruppe, ein Wasserstoffatom und die für jede Aminosäure spezifische Seitengruppe (Rest). (b) Verknüpfung zweier Aminosäuren zu einem Dipeptid: zentrales Strukturelement ist die planare Peptideinheit (grau eingefärbt). Bindungslängen sind in nm angegeben. (c) Rotationsfreiheitsgrade einer Polypeptidkette entlang des Rückgrats: Jeweils zwei starre Peptideinheiten können gegeneinander um die Winkel ϕ und ψ verdreht werden.

Sekundärstrukturen und der Aufbau von Proteinen

Da Proteine häufig von wässrigem Medium umgeben sind, werden hydrophobe Seitenketten nach innen gebracht (*Hydrophober Kollaps*), während hydrophile Residuen die Moleküloberfläche bilden. Doch was geschieht mit der polaren Hauptkette in einer hydrophoben Umgebung? Diese Problemstellung führt schließlich zur Bildung von *Sekundärstrukturen*, wobei die hydrophilen Gruppen des Proteinrückgrats durch Wasserstoff-Brücken neutralisiert werden (44).

Der amerikanische Chemiker Linus Pauling beschrieb erstmalig 1951 eine schraubenförmige Sekundärstruktur in Proteinen, die er α -Helix nannte (45). Die Stabilisierung der α -Helix erfolgt durch Wasserstoff-Brücken zwischen den $-\text{C}=\text{O}$ -Gruppen der n -ten Residuen und den $-\text{NH}$ -Gruppen der $(n + 4)$ -ten Residuen.

Die erste $-NH$ -Gruppe bzw. die letzte $-C=O$ -Gruppe einer α -Helix bildet keine internen Wasserstoff-Brücken mehr aus und bleiben aus diesem Grunde polar. Folglich finden sich die Enden dieser schraubenförmigen Sekundärstruktur oft an der Proteinoberfläche.

Eine wichtige physikalische Eigenschaft der α -Helix ist die Bildung eines *elektrischen Dipolmomentes*. Unterschiedliche Elektronegativitäten der Atome der $-NH$ bzw. $-C=O$ -Gruppen innerhalb einer Peptideinheit führen zu Ladungsverschiebungen und schließlich zu einem lokalen Dipolmoment. Da alle Peptideinheiten in der gleichen Orientierung entlang der Helixachse liegen, werden alle lokalen Dipolmomente zu einem deutlichen Gesamt-Dipolmoment der α -Helix aufsummiert. Dabei befindet sich die positive Partialladung stets am N-terminalen Ende, die negative Partialladung am C-terminalen Ende der Helix.

Prolin nimmt eine Sonderstellung innerhalb der zwanzig Aminosäuren ein. Durch die kovalente Verknüpfung des letzten Atoms der Prolin-Seitenkette mit dem Stickstoffatom der eigenen Aminogruppe, bildet sich eine starre Ringstruktur $C_\alpha - CH_2 - CH_2 - CH_2 - N$ aus. Dadurch wird eine von dem Stickstoffatom ausgehende Wasserstoff-Brücke verhindert, die für die Bildung einer α -Helix unerlässlich ist. Allerdings bewirkt die starre Struktur der Prolinseitenkette mit der Hauptkette eine Knickerzeugung, die häufig zur Richtungsänderung des Protein-Rückgrats benutzt wird.

Während eine α -Helix aus direkt benachbarten Residuen entsteht, werden die β -*Faltblätter* durch Aneinanderlegen einzelner β -Stränge gebildet, deren dreidimensionale Form einem Ziehharmonikabalg gleicht. Wasserstoffbrücken zwischen den $-C=O$ -Gruppen des einen Strangs und den $-NH$ -Gruppen des anderen Strangs und umgekehrt stabilisieren die Sekundärstruktur. Es werden zwei grundsätzliche Typen von β -Faltblättern unterschieden:

- **parallele β -Faltblätter:** In dieser Form werden die Einzelstränge in paralleler Weise aneinandergelegt. Alle Wasserstoffbrücken haben die gleiche Länge und bilden einen Winkel zur Ausbreitungsrichtung.
- **antiparallele β -Faltblätter:** Die Einzelstränge werden immer in abwechselnder Richtung aneinandergefügt. Es wechseln sich schmale und breite Wasserstoffbrücken ab.

Die Verbindung beider zuvor aufgeführten Sekundärstrukturen kann durch *Schlaufen* variabler Länge bewerkstelligt werden. Das kurze Zwischenstück zweier antiparalleler β -Stränge wird als Haarnadelschleife bezeichnet. Häufig liegen die Schlaufen-Regionen an der Proteinoberfläche und besitzen deswegen in der Regel hydrophile Residuen. Da die $-NH$ bzw. $-C=O$ -Gruppen keine internen Wasserstoffbrücken eingehen, können sie derartige Bindungen mit umgebenden Wassermolekülen eingehen. Die große Flexibilität der Schlaufen wird in der Natur

beispielsweise zur molekularen Erkennung benutzt. Dort besitzen die Antigen-Bindungsstellen der Antikörper sechs Schlaufen, die sich hinsichtlich ihrer Länge und Aminosäuren-Sequenz unterscheiden.

Ein weiteres wichtiges Strukturelement in Proteinen sind die *Disulfidbrücken*, die sich zwischen zwei Cysteinen ausbilden und durch folgende Oxidationsreaktion entstehen: $2(-\text{CH}_2-\text{SH}) + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightleftharpoons (-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2) + \text{H}_2\text{O}$. Derartige kovalente Schwefelbindungen dienen zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen und können einerseits innerhalb *einer* Aminosäuren-Kette (z.B. BPTI) oder aber zwischen *verschiedenen* Aminosäuren-Ketten (z.B. Insulin) geknüpft werden.

In der folgenden Einteilung wird die hierarchische Struktur beim Aufbau von Proteinen aus seinen Grundbausteinen ersichtlich:

- **Primärstruktur:** Aminosäure-Sequenz
- **Sekundärstruktur:** α -Helices, β -Faltblätter, Schlaufen
Motive: Kombination von Sekundärstrukturen
- **Tertiärstruktur:** dreidimensionale Erscheinungsform des Proteins
Domäne: Polypeptidkette oder Teil davon, die unabhängig in eine dreidimensionale Struktur falten kann.
- **Quartiärstruktur:** Kombination von mehreren einzelnen Peptidsträngen (Verbindung durch Disulfid- oder H-Brücken)

4.1.2 Proteine in der Spektroskopie

Um Proteine und Protein-Komplexe mit spektroskopischen Methoden untersuchen zu können, werden Chromophore als Sondenmoleküle benötigt. Da in erster Linie der natürliche, unverfälschte Zustand des Biopolymers samt seiner Funktionsweise interessiert, ist eine künstliche Modifikation (46) durch die Anbringung von Sondenmolekülen (z.B. Fluoreszenz-Marker) nicht erwünscht. Welche Proteine, die über eigene Farbstoffmoleküle verfügen, lassen sich für hochauflösende spektroskopische Untersuchungen verwenden?

An einer großen Anzahl von Chromo-Proteinen konnten bisher erfolgreich Lochbrenn-Experimente ausgeführt werden: Photosynthese-Pigmente wie z.B. Chlorophyll (47), Carotinoid (48) oder Phycobilin (49; 50), ganze Lichtsammelkomplexe und Reaktionszentren in Bakterien und Pflanzen (51; 52; 53; 54) und einigen Vertretern der Häm-Proteine. Die kurzen Lebensdauern der angeregten Zustände der natürlich vorkommenden Eisen-Porphyrin-Systeme in Häm-Proteinen verursachen allerdings homogene Linienbreiten, die den inhomogenen Verbreiterungen

der Absorptionsbanden vergleichbar sind und damit für die Methode des spektralen Lochbrennens ungeeignet sind (55). Der Austausch des zentralen Eisensatoms gegen Magnesium, Zink oder zweier Wasserstoffatome ermöglicht dagegen schmalbandiges Lochbrennen, was zu einer Vielzahl hochauflösender spektroskopischer Experimente mit Myoglobin (12; 24; 25), Cytochrom c (56; 57; 58) und Meerrettich-Peroxidase (42; 59; 60) führte.

Die volle Funktionsfähigkeit der bisher beschriebenen Chromo-Proteine wird erst durch die Integration des Chromophors erlangt. Das Apo-Protein und der entsprechende Cofaktor werden jedoch zunächst getrennt produziert und als post-translatorische Modifikation miteinander zu dem aktiven Komplex verbunden. Ganz anders verhält es sich mit dem Green Fluorescent Protein (GFP), dessen Chromophor durch Zyklisierung von Ser65, Tyr66 und Gly67 aus der eigenen Aminosäuren-Sequenz entsteht und gänzlich ohne Cofaktor auskommt (61). Der GFP-Farbstoff sitzt im Zentrum des Proteins, dessen faßartige Struktur durch β -Faltblätter zustande kommt (62). Auch für diesen Molekültyp existieren Lochbrenn-Studien, z.B. Experimente zur Photochemie des GFP-Proteins (63; 64) oder seines einzelnen Chromophors (65).

Eine neuartige Idee besteht nun darin, die drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan als intrinsische Sonden im UV-Bereich für die Methode des spektralen Lochbrennens zu verwenden. Mit Hilfe dieses Ansatzes ließen sich noch eine ganze Reihe interessanter Proteine zur spektroskopischen Untersuchung hinzugewinnen.

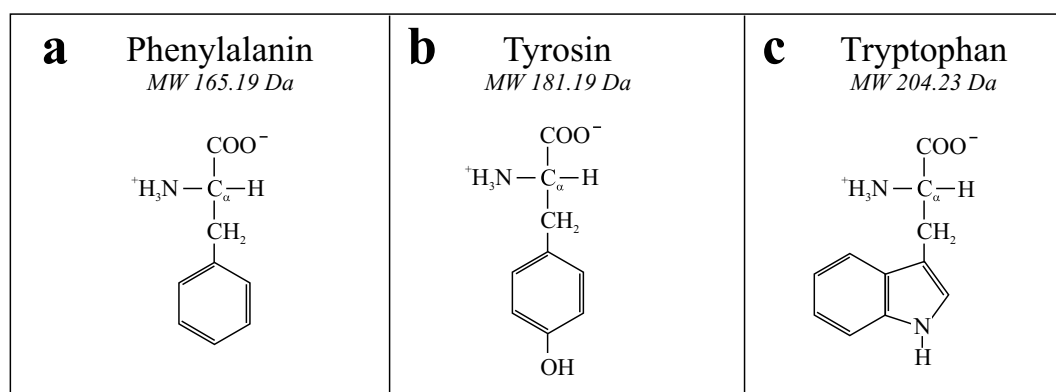


Abbildung 4.2: Die Struktur der drei aromatischen Aminosäuren in der zwitterionischen Form: (a) Phenylalanin, (b) Tyrosin und (c) Tryptophan. Zusätzlich sind die Molekulargewichte in Dalton angegeben.

4.1.3 Die aromatischen Aminosäuren

Spektroskopische Eigenschaften

Benzol, Phenol und Indol sind die Farbstoffe der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die Licht aus dem ultravioletten Spektralbereich absorbieren. Phenylalanin mit dem kleinsten π -Elektronensystem absorbiert in seiner ersten Bande zwischen 37250 und 41000 cm^{-1} und erreicht eine maximale Extinktion ε_{max} von etwa 200 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei $\nu_{max} \simeq 37875 \text{ cm}^{-1}$. Die OH-Gruppe des Phenols sorgt für eine Erweiterung des π -Elektronensystems von Benzol und bewirkt einen sich zu kleineren Wellenzahlen hin erstreckenden Absorptionsbereich des Tyrosins von 34750 bis 41000 cm^{-1} mit ε_{max} von $\simeq 1400 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei $\nu_{max} \simeq 36350 \text{ cm}^{-1}$. Die höchste Extinktion von $\varepsilon \simeq 5600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei etwa 35700 cm^{-1} erreicht Tryptophan, dessen größtes π -Elektronensystem Licht zwischen 33750 und 41000 cm^{-1} absorbiert.

Die Extinktion eignet sich gut zum Vergleich der Absorption verschiedener Stoffe (siehe Abb. 4.3) und läßt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnen:

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot d \cdot c} \quad (4.1)$$

T bezeichnet die gemessene Größe der Transmission in %, d die Schichtdicke der Probe in cm, c die Konzentration der Substanz in M^{-1} und ε ist schließlich die Extinktion in $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Die spektroskopischen Eigenschaften von Proteinen im ultravioletten Spektralbereich werden jedoch nicht nur durch die drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan bestimmt. Die beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein beginnen mit ihrer Absorption bei 40000 cm^{-1} und erreichen maximale Extinktionswerte von $\varepsilon_{max} \simeq 1900 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei $\nu_{max} \simeq 50000 \text{ cm}^{-1}$ für Methionin sowie $\varepsilon_{max} \simeq 200$ bzw. $2200 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei $\nu_{max} \simeq 46000$ bzw. 52100 cm^{-1} für Cystein. Der Absorptionsbereich der aus zwei Cysteinen gebildeten Disulfidbrücke erstreckt sich relativ weitläufig beginnend bei etwa 32000 cm^{-1} , erreicht das erste Extinktionsmaximum ($n_1\sigma^*$ -Übergang) von 335 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 40600 cm^{-1} und klettert schließlich bei 48400 cm^{-1} auf etwa 2000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ($n_4\sigma^*$). Die für alle Aminosäuren in Frage kommenden Peptidübergänge befinden sich bei 45455 cm^{-1} ($n\pi^*$), 52632 cm^{-1} ($\pi_0\pi^*$), 55555 cm^{-1} ($n'\pi^*$) und 71430 cm^{-1} ($\pi_+\pi^*$) (66). Die logarithmisch aufgetragene Extinktion von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (gemessen in einem Wasser-Glycerin-Glas bei 4.2 K) und die Absorptionsbereiche der interessierenden Aminosäuren und der Disulfidbrücken sind in Abb. 4.3 dargestellt. Die schraffierten Felder stellen die in dieser Arbeit verwendeten Wellenzahlenbereiche dar und verdeutlichen, daß nur die Schwefelbrücken in Proteinen einen, wenn auch geringen, Beitrag zur Gesamtabsorption leisten.

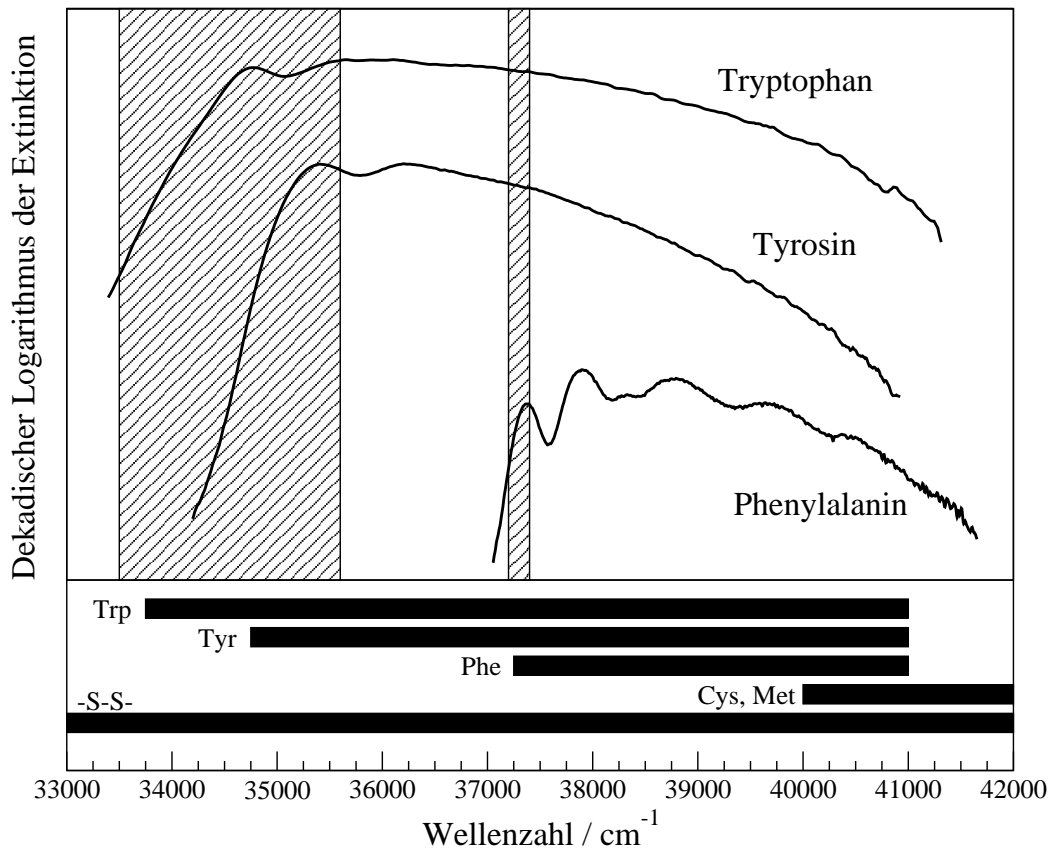


Abbildung 4.3: Die Absorption der drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in einem Wasser-Glycerin Glas bei 4.2 K ist als dekadischer Logarithmus der Extinktion aufgetragen. Darunter befinden sich die Spektralbereiche der zwischen 33000 und 42000 cm^{-1} absorbierenden Aminosäuren und Disulfidbrücken. Die schraffierten Felder stellen die in dieser Arbeit verwendeten Wellenzahlenbereiche dar.

Die optischen Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren spielen in der belebten Natur eine wichtige Rolle: ultraviolette Anteile des Sonnenlichts werden absorbiert, kurzlebige S_1 -Zustände geben ihre Energie durch schnellen Energietransfer in der folgenden Weise weiter: Phe \mapsto Tyr \mapsto Trp (67).

4.1.4 BPTI: Ein Anwendungsbeispiel

Strukturelle Eigenschaften

BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) ist ein kleines globuläres Protein in Form eines Ellipsoids, dessen große Halbachse 2.9 nm und dessen kleine Halbachse 1.9 nm mißt. Es besteht aus 58 Aminosäuren, die eine wohldefinierte Sekundärstruktur bilden (vergleiche dazu Abb. 4.4): Eine α -Helix am N-terminalen Ende α_1 [3-5], eine zweite am C-terminalen Ende α_2 [47-56], ein antiparalleles β -Faltblatt zusammengesetzt aus den beiden β -Strängen β_1 [16-25] und β_2 [28-

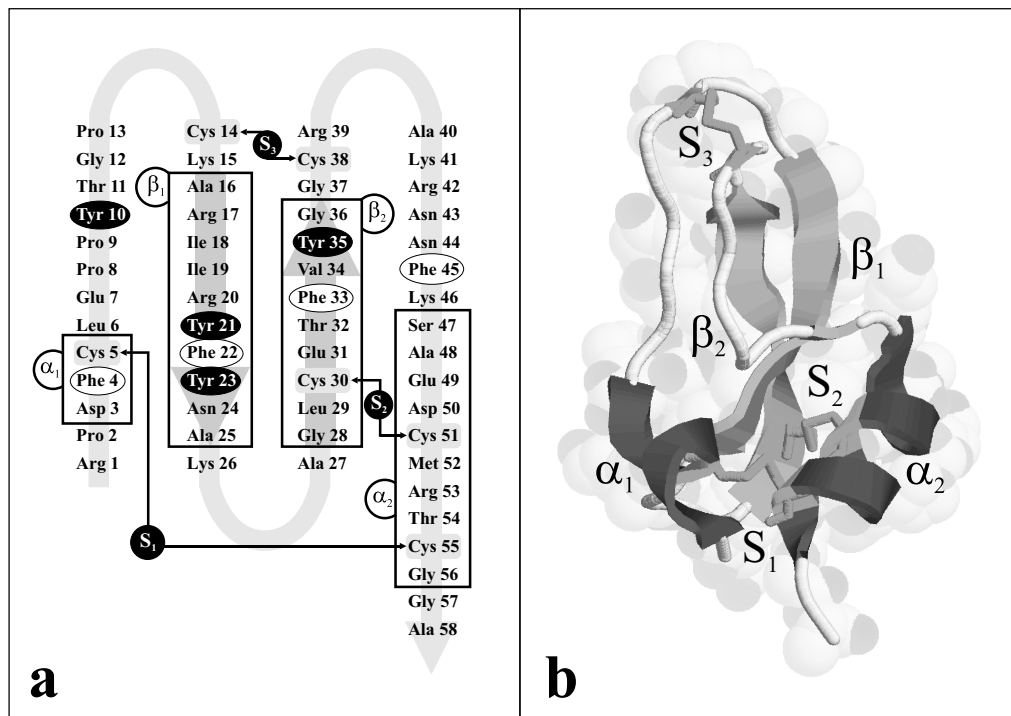


Abbildung 4.4: (a) Aminosäure-Sequenz von BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) im Dreibuchstaben-Code. Die Sekundärstrukturelemente α_1 , α_2 , β_1 und β_2 sowie die drei Disulfidbrücken S_1 , S_2 und S_3 sind eingezeichnet. Weiter Angaben finden sich im Text. (b) Dreidimensionale Ansicht des Proteins BPTI, basierend auf der Röntgenstruktur 1BPI (68) der Brookhaven Protein Database aufbereitet mit RasMol.

36]. Die dreidimensionale Struktur des Proteinase-Inhibitors wird von den drei Disulfidbrücken S_1 [5 \leftrightarrow 55] zwischen den beiden α -Helices α_1 und α_2 , S_2 [30 \leftrightarrow 51] zwischen der Helix α_2 und dem β -Strang β_2 sowie S_3 [14 \leftrightarrow 38], eine Verknüpfung der beiden konvexen Proteinase-Bindungsschlaufen (reaktive Seite), stabilisiert. Das 6511 Da schwere Protein besitzt einen kompakten und äußerst stabilen hydrophoben Kern, in dem sich alle vier aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe4, Phe22, Phe33 und Phe45) wiederfinden. Drei der gerade für diese Arbeit interessanten Tyrosine sind Bestandteil der β -Faltblatt-Struktur (Tyr21 und Tyr23 in β_1 und Tyr35 in β_2), während ein viertes Residuum (Tyr10) in der flexiblen Schlaufenregion unweit der Bindungsstelle liegt. Zur visuellen Darstellung von BPTI wurde auf eine Struktur aus der Brookhavener Protein-Datenbank (PDB-Code: 1BPI), die mittels Röntgenbeugung bei 125 K mit einer Auflösung von 1.1 Å von S. Parkin et al. (68) erzielt wurde, zurückgegriffen.

Molekulare Funktion von BPTI

Die eigentliche Aufgabe von BPTI besteht in der Blockade der proteolytischen Wirkung von Trypsin. Es wird zusammen mit der inaktiven Vorstufe des Verdauungsenzyms Trypsin, dem sogenannten Trypsinogen, im Pankreas (Bauchspeicheldrüse) bei einem pH von etwa 8 gebildet. Die Aktivierung der Protease Trypsin erfolgt im Darmlumen in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen durch das Enzym Enteropeptidase und/oder bereits vorhandenes enzymatisch aktives Trypsin über die Abspaltung eines Propeptids aus sechs Aminosäuren (Hexapeptid, Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). Eine anschließende Konformationsänderung führt die am aktiven Zentrum beteiligten Seitenketten näher zusammen. Trypsin arbeitet bei einem pH-Optimum von 7.5 bis 8.5 und spaltet, besonders effizient bei bereits denaturierten Proteinen, die Peptidbindung nach Arginin- und Lysin-Resten. BPTI kommt vor allem in den sekretbildenden Zellen des Pankreas, im Blutplasma und in zahlreichen Organen vor, um eine Eigenverdauung zu vermeiden.

Die irreversible Komplexbildung erfolgt mit hoher Affinität zwischen dem Asp189 in der Trypsin-Tasche und dem Lys15 in der Bindungsschlaufen-Region des Protease-Inhibitors durch eine elektrostatische Bindung. Zahlreiche Wasserstoff-Brücken zwischen den benachbarten Residuen beider Seiten stabilisieren den Komplex und verhindern ein Wiederauflösen.

4.2 Probenpräparation

Phenylalanin

L-Phenylalanin wurde von Aldrich-Deutschland bezogen und ohne jegliche Behandlung verwendet. Für die *Titrationsexperimente* wurde die Substanz in Wasser gelöst und davon zwei Volumenanteile mit drei Volumenanteilen Glycerin vermischt, sodaß die Endkonzentration von Phenylalanin 50.6 mM betrug. Ausgehend von dieser Stammlösung wurden in zwei getrennten Messungen Titrationen mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH durchgeführt (siehe Kap. 4.3).

Für die *Lochbrenn-Experimente* wurde Phenylalanin in einem 0.25 M K_2HPO_4 / KH_2PO_4 -Puffer gelöst, von dem wiederum zwei Volumenteile zu drei Volumenteilen Glycerin gegeben wurden und sich eine endgültige Konzentration 50.6 mM Phenylalanin in Wasser-Glycerin ergab. Mit Hilfe des Kalium-Puffersystems konnten Proben mit verschiedenen pH-Werten zwischen 4 und 9 erstellt werden. Für Werte unter 4 bzw. über 9 wurden entsprechende Mengen 1 M HCl bzw. 1 M NaOH dazugegeben.

Tyrosin

L-Tyrosin wurde von Aldrich-Deutschland als kristallines Pulver¹ bezogen und ohne jegliche Weiterbehandlung verwendet. Im Gegensatz zu Phenylalanin ist eine vollständige Auflösung von Tyrosin in Wasser nahezu unmöglich. Dieses Problem wird auch in der Physiologischen Chemie beschrieben: Die Löslichkeit von Aminosäuren ist von ihrem Ionisierungsgrad abhängig und infolge dessen am isoelektrischen Punkt am niedrigsten. Cystin und Tyrosin sind besonders in ihrer zwitter-ionischen Form schlecht in wässrigen Medien löslich, wogegen sie in sauren bzw. alkalischen Lösungen, wo sie als Kationen bzw. Anionen vorliegen, gute Löslichkeitseigenschaften zeigen. Da sich der Zwitterionenbereich mit dem physiologischen pH-Bereich überschneidet, neigen Cystin und Tyrosin bei pathologischen Zuständen (Konzentrations- und pH-Änderungen) in physiologischen Flüssigkeiten auszukristallisieren (69).

Für die *Titrationsexperimente* wurde Tyrosin aufgrund der Löslichkeitsprobleme zunächst in 1 M HCl gegeben und anschließend soweit verdünnt, bis sich eine Tyrosinkonzentration von 9.7 mM einstellte. Zwei Volumenteile dieser wässrigen Lösung wurden mit drei Volumenteilen Glycerin vermischt und ergaben schließlich eine endgültige Konzentration der Stammlösung von 3.9 mM bei einem pH-Wert² von 1.65. Diese Stammlösung war Ausgangspunkt der Titration, die mit 1 M NaOH bewerkstelligt wurde.

¹Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Phenylalanin und Tyrosin in Pulverform zeigen eine eher amorphe Modifikation bei Phenylalanin bzw. eine eindeutige kristalline Form des Tyrosins. Mit diesem Wissen lassen sich auch die unterschiedlichen Lösungseigenschaften der beiden Aminosäuren verstehen.

²Für alle pH-Messungen wurde eine Elektrode ohne Diaphragma für zähe Flüssigkeiten verwendet. Glycerin verschiebt die pH-Werte der wässrigen Lösungen stets zu neutralen Werten hin.

Für die *Lochbrenn-Experimente* wurde in gleicher Weise verfahren. Um weitere pH-Proben zu erhalten, wurden der Stammlösung tröpfchenweise 1 M NaOH bzw. 0.5 M Tris zugegeben. Wiederum ergaben zwei Volumenteile dieser wässrigen Lösung vermischt mit drei Volumenteilen Glycerin die endgültigen Proben für die spektroskopischen Untersuchungen. Durch die Titration mit NaOH wurden Proben der pH-Werte 3.5, 5.5, 7.5, 9.0 und 10.93 erstellt, die Titration mit Tris ergab pH-Proben mit 3.7, 5.45, 7.45 und 9.0. Alle pH-Angaben wurden bei Raumtemperatur ausgeführt.

Tryptophan

L-Tryptophan wurde von der Feinchemikalienfirma Aldrich-Deutschland erworben ohne weitere Behandlung verwendet. Für die Erstellung der drei pH-Proben wurde Tryptophan in H₂O, 1 M HCl bzw. 1 M NaOH gelöst. Von der so entstandenen wässrigen Lösung wurden zwei Volumenanteile mit drei Volumenanteilen Glycerin vermischt, um bei tiefen Temperaturen von einigen Kelvin eine glasartige Struktur zu erhalten. Die auf diese Weise erzeugten Proben hatten eine Endkonzentration von 1.18 mM Tryptophan und pH-Werte von 0.3, 7.0 und 12.3.

BPTI, Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor

BPTI wurde in hoher Reinheit als getrocknetes Pulver von Sigma-Deutschland bezogen und ohne weitere Behandlung eingesetzt. Für das Absorptionsspektrum und die Lochbrennexperimente wurde das Protein in einem 0.1 M Tris/HCl-Puffer bei einem pH von 8.0 gelöst und davon wieder wie üblich zwei Volumenanteile mit drei Volumenanteilen Glycerin vermischt. Die endgültige Proteinkonzentration betrug $8.79 \cdot 10^{-4}$ M. Für das Emissionsspektrum und weitere Lochbrenn-Testversuche wurde eine zweite Probe mit 0.1 M Tris/HCl-Puffer bei einem pH-Wert von 5.5 erstellt, dessen finale Proteinkonzentration einen 2.5-fachen Wert der obigen Probe annahm: $2.20 \cdot 10^{-3}$ M.

4.3 pH und tiefe Temperaturen

4.3.1 Titrationsexperimente

Aminosäuren besitzen aufgrund ihrer Struktur sowohl basische als auch saure Eigenschaften und zählen deshalb zu den Ampholyten. Ähnlich der Autoprotolyse des Wassers ist bei ihnen eine intramolekulare Neutralisation möglich, die zu einem sogenannten *Zwitterion* (Betain) führt. Je nach pH-Wert können Aminosäuren in insgesamt vier verschiedenen Formen erscheinen: dem positiv geladenen Ion bei saurem pH ($\text{NH}_3^+ - \text{CHR} - \text{COOH}$, \oplus), dem negativ geladenen Ion in basischem Milieu ($\text{NH}_2 - \text{CHR} - \text{COO}^-$, \ominus) sowie einer ungeladenen Modifikation ($\text{NH}_2 - \text{CHR} - \text{COOH}$, \odot) und der Zwitterionenform ($\text{NH}_3^+ - \text{CHR} - \text{COO}^-$, \otimes) im neutralen Bereich (siehe dazu Beispiele von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan bei verschiedenen pH-Werten in den Abbildungen 4.8, 4.11 und 4.14). In wässriger Lösung ist die $-\text{NH}_3^+$ -Gruppe die sauer wirkende Gruppe der Aminosäure mit dem $\text{pK}_{\text{S}2}$ als Maß für die Säurenstärke der Gruppe. Der $\text{pK}_{\text{S}1}$ -Wert einer Aminosäure bezieht sich in entsprechender Weise auf die basische Wirkung der $-\text{COO}^-$ -Gruppe. Die Säuren- und Basenstärken sind jedoch nicht für alle Aminosäuren gleich, sondern hängen von deren Seitenkette ab (siehe Tab. 4.1). Es gibt jedoch in Abhängigkeit vom pH-Wert einen Punkt, bei dem die intramolekulare Neutralisation vollständig ist: Der sogenannte *isoelektrischen Punkt* (I.P.). Er ist dadurch gekennzeichnet, daß im elektrischen Feld keine Ionenwanderung mehr stattfindet und die Löslichkeit der Aminosäuren ein Minimum erreicht (als Beispiel siehe Löslichkeitsprobleme von Tyrosin im neutralen pH-Bereich in Kapitel 4.2).

In Abb. 4.5 (a) ist eine Titrationskurve von Phenylalanin zu sehen, aus der beide pK_{S} -Werte und der isoelektrische Punkt entnommen werden können. Im Bereich der beiden pK_{S} -Werte übernimmt die Aminosäure leichte Pufferungseigenschaften, gekennzeichnet durch die geringsten Steigungen innerhalb der Titrationskurve.

Phenylalanin			Tyrosin				Tryptophan			
I.P.	$\text{pK}_{\text{S}1}$	$\text{pK}_{\text{S}2}$	I.P.	$\text{pK}_{\text{S}1}$	$\text{pK}_{\text{S}2}$	$\text{pK}_{\text{S}3}$	I.P.	$\text{pK}_{\text{S}1}$	$\text{pK}_{\text{S}2}$	Zitat
5.91	2.58	9.24		2.20		10.07		2.43	9.44	
5.48	1.83	9.13		2.2	9.1	10.1		2.38	9.39	(70)
										(71)
										(72)
5.45	1.8	9.1		2.2	9.1	10.9				(73)

Tabelle 4.1: pK_{S} -Werte und isoelektrische Punkte der drei aromatischen Aminosäuren aus verschiedenen Quellen, in der Regel auf eine Temperatur von 25°C bezogen.

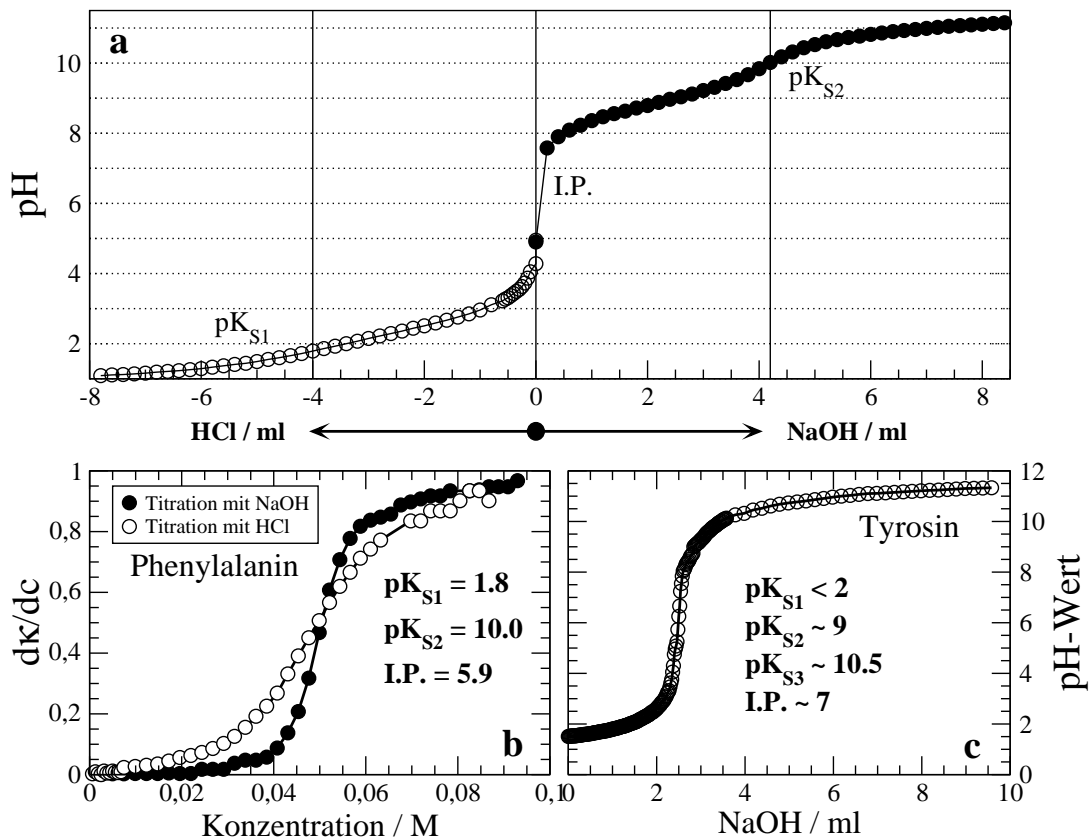


Abbildung 4.5: (a) Titrationskurve von Phenylalanin in einem Wasser-Glycerin-Gemisch bei Raumtemperatur. Neben den beiden pK_S -Werten ist auch der isoelektrische Punkt mit eingezeichnet. (b) Die erste Ableitung der Leitfähigkeit κ als Funktion der entsprechenden Titer-Konzentration von HCl bzw. NaOH. Die beiden pK_S -Werte ergeben sich zu $pK_{S1} = 1.8$ und $pK_{S2} = 10.0$, der isoelektrische Punkt liegt bei I.P. = 5.9. (c) Titrationskurve von Tyrosin in einem Wasser-Glycerin-Gemisch bei Raumtemperatur. Die mit HCl auf einen pH-Wert von 1.65 eingestellte Ausgangslösung wurde mit 1 M NaOH titriert.

Da spektrales Lochbrennen an amorphen Strukturen bei tiefsten Temperaturen durchgeführt wird, muß den wässrigen Lösungen der aromatischen Aminosäuren ein Glasbildner wie beispielsweise Glycerin in einem bestimmten Volumenverhältnis beigemischt werden. Doch, wie verhält sich nun der pH, der streng genommen in der bekannten Weise nur für verdünnte wässrige Lösungen bei etwa Raumtemperatur definiert ist? Das zähflüssige Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol ($CH_2OH - CHOH - CH_2OH$) und ist damit in der Lage, in alkalischem Milieu in einem dreistufigen Prozeß Protonen abzugeben. Um die pH-Abhängigkeit eines Wasser-Glycerin-Gemisches zu ermitteln, wurden für Phenylalanin und Tyrosin Titrationsexperimente unternommen.

Titrationsexperiment mit Phenylalanin

Während der Titration von Phenylalanin mit 1 M HCl bzw. 1 NaOH wurden folgende Meßgrößen aufgenommen: Die zugeführte Menge des Titers in ml, die Leitfähigkeit κ , der pH-Wert und die Temperatur der Lösung in °C. In Abb. 4.5 (a) ist die Titrationskurve von Phenylalanin dargestellt. Gut erkennbar ist das amphotere Verhalten der Aminosäure durch die Ausbildung zweier Pufferbereiche um die pK_S -Werte und dem raschen pH-Anstieg zwischen ihnen, gekennzeichnet durch den isoelektrischen Punkt. Die Zugabe von HCl bzw. NaOH erhöht den Anteil an Ladungsträgern in der Lösung und damit im gleichen Maße auch die Leitfähigkeit κ . Durch die Umladungsprozesse in der Aminosäuren-Kopfgruppe nimmt der Anteil an geladenen Aminosäuren mit der Erhöhung der Titriersubstanzen in der Umgebung der beiden pK_S -Werte markant zu. Trägt man die erste Ableitung der Leitfähigkeit κ als Funktion der Konzentration des entsprechenden Titers HCl bzw. NaOH auf, lassen sich die beiden pK_S -Werte aus den Wendepunkten ermitteln (siehe Abb. 4.5 (b)): $pK_{S1} = 1.8$ bzw. $pK_{S2} = 10.0$ und der sich daraus ergebende isoelektrische Punkt I.P. = 5.9. Vergleicht man diese Werte mit den Angaben aus Tabelle 4.1, so stellt man lediglich eine leichte Verschiebung des pK_{S2} in den basischen Bereich fest, der aufgrund der Eigenschaften von Glycerin als schwache dreiprotonige Säure zustande kommt.

Titrationsexperiment mit Tyrosin

Aufgrund der von Anfang an bereits hohen Ladungsträgeranzahl (Stammlösung von Tyrosin in HCl) ergab die Leitfähigkeitsmessung keine aussagekräftigen Ergebnisse, da der Anteil der geladenen Aminosäuren an der Gesamtladungsträgerzahl zu gering war. Die drei pK_S -Werte können aus der Abb. 4.5 (c) nur näherungsweise entnommen werden. Mit den Literaturwerten stimmen sie ungefähr überein: $pK_{S1} < 2$, $pK_{S2} \simeq 9$ und pK_{S3} irgendwo zwischen 10 und 11.

4.3.2 pH-Wert bei tiefen Temperaturen

Lochbrennexperimente werden bei tiefen Temperaturen von wenigen Kelvin ausgeführt. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit sich der pH-Wert der Probe beim Abkühlen von Raumtemperatur auf etwa 4 K verändert. Die Bestimmung des pH-Wertes bei Raumtemperatur mit Hilfe einer pH-Elektrode ist unproblematisch. Doch auf welche Weise könnte er bei tiefen Temperaturen gemessen werden? In der Zellbiologie werden pH-Änderungen an lebenden Organismen durch die Benutzung von Farbstoffen studiert, deren Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften in empfindlicher Weise vom pH-Wert abhängen. Mit Hilfe eines solchen spektralen Indikators sollte es also möglich sein, die pH-Werte bei tiefen Temperaturen zu bestimmen und mit den Raumtemperatur-Daten zu vergleichen. In Abb. 4.6 ist der verwendete Farbstoff Fluorescein in seinen vier pH-abhängigen Formen abgebildet: Das zweifach negativ geladene Dianion protoniert bei Zugabe einer Säure zuerst den Phenolring zum Monoanion ($pK_S \simeq 6.4$), gelangt darauf-

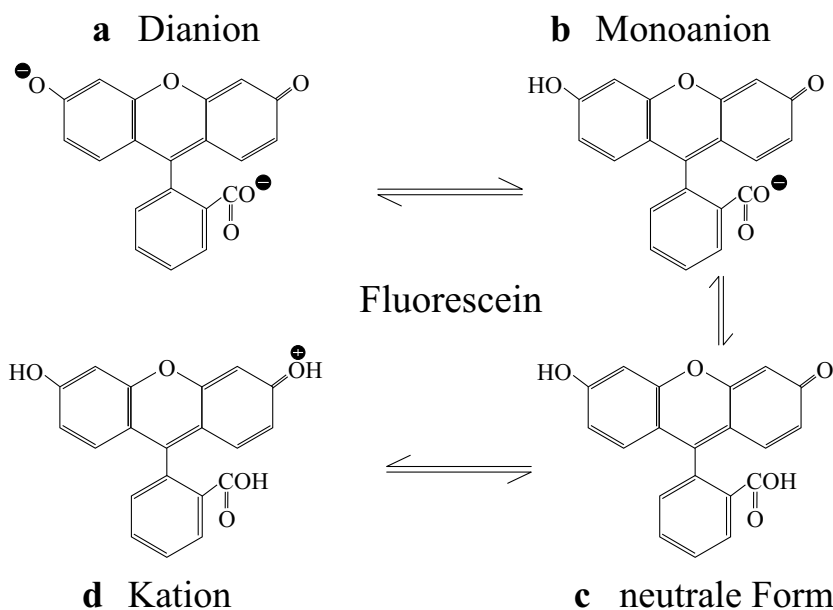


Abbildung 4.6: Die vier vom pH-Wert abhängigen Formen des Fluoreszenz-Farbstoffes Fluorescein: (a) Dianion, (b) Monoanion, (c) neutrale Form und (d) Kation.

hin durch Protonierung der Carboxylgruppe in die neutrale Form ($pK_S < 5$), um sich schließlich bei weiterer Säurezufuhr in das Kation zu verwandeln ($pK_S \approx 2.1$) (74). Ausschließlich die mono- bzw. dianionische Form des Farbstoffes fluoresziert mit Quantenausbeuten von 0.37 und 0.93. Bei Anregung der neutralen Form oder des Kations emittiert Fluorescein aus dem Monoanion mit einer Quantenausbeute von 0.31 bzw. 0.18 (74). Das Absorptionsspektrum von Fluorescein ist durch eine Bande bei $\approx 21000 \text{ cm}^{-1}$ charakterisiert, die durch das Dianion dominiert wird, begleitet von einer kleineren seitlich verschobenen Bande des Monoanions bei etwa 21700 cm^{-1} .

pH	Raumtemperatur			Heliumtemperatur		
	B1	B2	B2 / B1	B1	B2	B2 / B1
6.0	0.841	0.505	0.600	0.220	0.416	1.891
6.5	0.610	0.673	1.103	0.295	0.650	2.203
7.0	0.373	0.798	2.139	0.352	1.030	2.926
7.5	0.400	0.913	2.283	0.843	0.992	1.177
8.0	0.471	0.903	1.917	0.471	1.657	3.518

Tabelle 4.2: Bandenhöhe der mono- bzw. dianionischen Form von Fluorescein B1 bzw. B2 (in Optischer Dichte) und deren Verhältnis für Raum- bzw. Heliumtemperatur. Der pH-Wert bezieht sich jeweils auf Raumtemperatur.

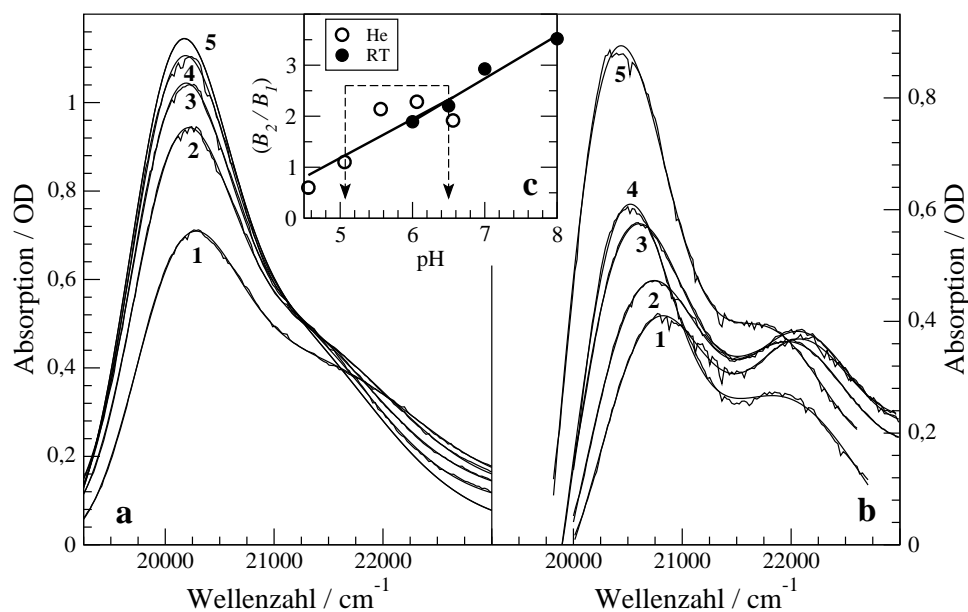


Abbildung 4.7: (a) Absorptionsspektren von Fluorescein in Wasser-Glycerin mit gaußförmiger Anpassung bei Raumtemperatur. Die fünf verschiedenen Proben haben pH-Werte von 6.0 (1), 6.5 (2), 7.0 (3), 7.5 (4) und 8.0 (5). (b) Entsprechende Fluoresceinspektren bei Heliumtemperatur (4.2 K). (c) Das Verhältnis der Bandenhöhen B_2/B_1 der mono- bzw. dianionischen Form von Fluorescein als Funktion des pH. Aus dieser Auftragung ergibt sich eine Verschiebung des pH-Wertes bei tiefen Temperaturen von etwa 1.5 Stufen zu sauren Werten.

Fluorescein wurde von MolecularProbes-Deutschland bezogen und aufgrund seiner hohen Lichtempfindlichkeit in der Dunkelkammer verarbeitet. Der Chromophor wurde in einem 0.25 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffersystem gelöst und wie üblich zwei Volumenteile davon mit drei Volumenteilen Glycerin versetzt, so daß die finale Fluorescein-Konzentration bei $6.9 \cdot 10^{-5}$ M lag. Es wurden fünf verschiedene pH-Proben mit den Werten von 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 und 8.0 erstellt. Anschließend wurden Absorptionsspektren von diesen fünf Proben bei Raumtemperatur und 4.2 K aufgenommen und mit zwei Gaußkurven angepaßt (siehe Tabelle 4.2). Das Verhältnis der Höhe der beiden Banden als Funktion des pH-Wertes nahm mit steigendem pH für beide Temperaturen zu. Aus Abb. 4.7 ergibt sich eine Verschiebung des pH-Wertes bei Heliumtemperaturen von etwa 1.5 pH-Stufen in den sauren Bereich.

4.4 Phenylalanin

4.4.1 Absorptionsspektrum

Phenylalanin zeigt ein relativ strukturiertes Absorptionsspektrum. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, denkt man an ein Benzol-Derivat mit dem Substituenten $-\text{CH}_2 - \text{C}_\alpha\text{H} - \text{COOH} - \text{NH}_2$, dessen Wechselwirkung mit dem Ring offensichtlich schwach ist. Benzolspektren in Hexan zeigen scharfe Bandenstrukturen mit mehreren einzelnen Schwingungsbanden, die im Falle von Toluol im gleichen Lösungsmittel bereits durch den Substituenten $-\text{CH}_3$ einige ihrer Details einbüßen und um mehr als 1000 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben werden (75). Betrachtet man Absorptionsspektren von Phenylalanin in Wasser, so bewirkt der für die Aminosäuren typische Substituent einen weiteren Verlust der Feinstruktur und man erkennt nur noch sieben einzeln aufgelöste Schwingungsbanden (76), während die spektrale Position bezüglich Toluol beibehalten wird. In Abb. 4.8 sind Spektren von Phenylalanin in einem Wasser-Glycerin Glas bei tiefen Temperaturen (4.2 K) gezeigt, die nur sechs Banden aufweisen, da der energiereichste Übergang nicht mehr aufgelöst werden konnte. Vergleicht man das Absorptionsspektrum von Phenylalanin in Wasser mit den in Abb. 4.8 gezeigten Spektren, so stellt man eine Lösungsmittelverschiebung von etwa 50 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen fest.

Die Variation des pH-Wertes durch die Zugabe von HCl bzw. NaOH in das System Phenylalanin / Wasser bewirkt eine leichte Verschiebung des Absorptionsspektrums um im Mittel 80 cm^{-1} zu niedrigeren Übergangsenergien, verbunden mit einer gleichzeitigen leichten Erhöhung der Extinktion um $\simeq 10 \%$ (76). Beide Trends sind auch für die Lösungsumgebung Wasser-Glycerin in Abb. 4.8 (a)-(c) zu beobachten.

4.4.2 Starkeffekt

Alle Starkeffekt-Experimente wurden unterhalb des λ -Punktes von Helium bei 2 K ausgeführt. Die spektralen Löcher wurden durch Bestrahlung von einigen Minuten mit Hilfe eines UV-Lasers mit einer Leistungsdichte von $3.2 \cdot 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ auf der Probe erzeugt und durch eine Reduzierung der Laserleistung um den Faktor 10^3 ausgelesen. Die Löcher erreichten eine relative Tiefe von etwa 20%.

Die Probe befand sich in einer 2 mm dicken Quarzküvette, die in einen Probenhalter eingebaut wurde, der auch die beiden, durch einen Abstand von 10 mm getrennten Stark-Elektroden enthielt (siehe Abb. 3.3). Das Starkfeld \vec{E}_S wird aus der Differenz des Feldes beim Brennvorgang und dem jeweils aktuellen Feld zwischen den beiden Elektroden gebildet. Durch die Kombination zweier Hochspannungsgeräte konnten mit dem Abstand von $d = 10 \text{ mm}$ zwischen den beiden

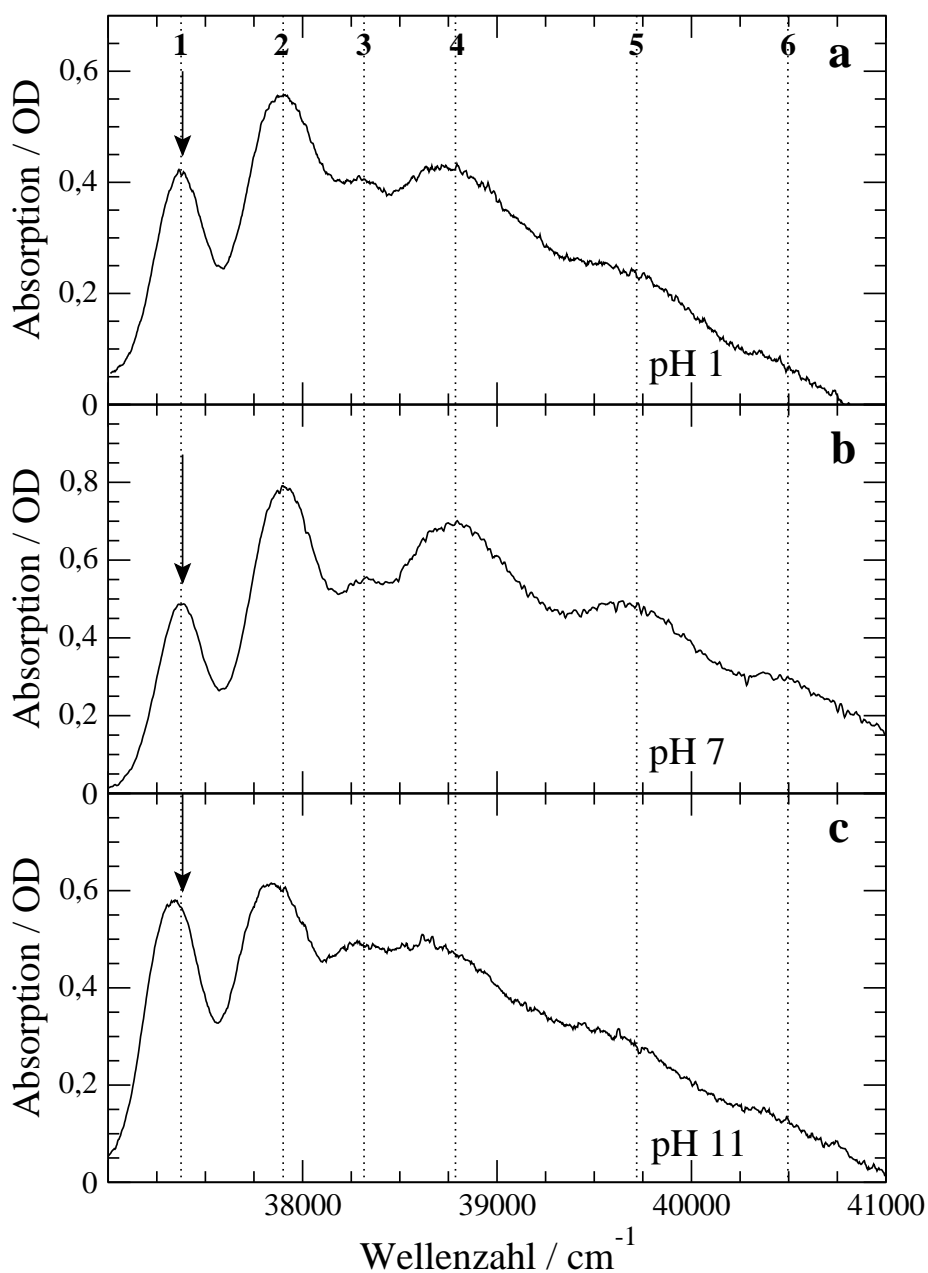


Abbildung 4.8: Absorptionsspektren von Phenylalanin in einem Wasser-Glycerin Glas bei verschiedenen pH-Werten und einer Temperatur von 4,2 K. Die gepunkteten Linien beziehen sich auf die Banden der neutralen Probe und sollen die leichte spektrale Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen bei hohem pH verdeutlichen. Die Pfeile bei 37373 cm^{-1} markieren die spektrale Position, bei der Löcher gebrannt wurden. Der pH-Wert bezieht sich auf die Probenpräparation bei Raumtemperatur.

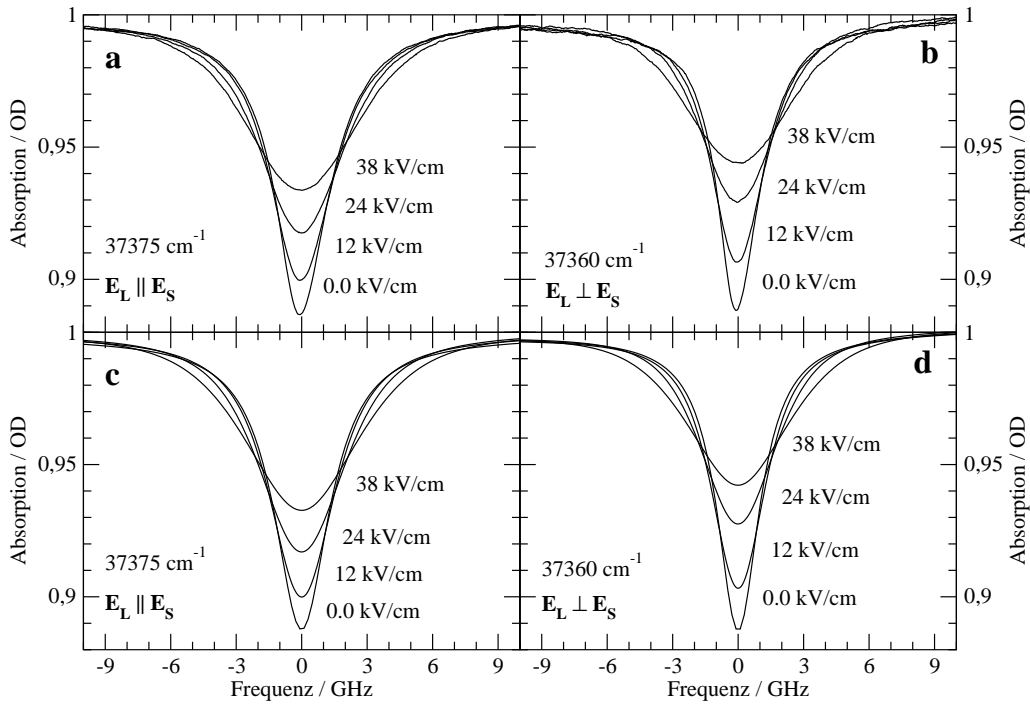


Abbildung 4.9: Starkeffekt an spektralen Löchern für die beiden unterschiedlichen Polarisationsgeometrien $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ bei 37375 cm^{-1} (a) bzw. $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ bei 37360 cm^{-1} (b) und ihre entsprechenden Fitkurven in (c) bzw. (d) für Phenylalanin in einem Wasser-Glycerin Glas bei einem pH von 7.0 sowie einer Temperatur von 2 K.

Starkplatten Felder von bis zu 38 kV/cm erreicht werden. Zwei Messreihen mit den unterschiedlichen Polarisationsgeometrien $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ und $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ waren nötig, um durch simultanes Anpassen der Spektren pro Feldstärke die für den Stark-effekt interessanten Parameter zu erlangen. Im Falle von Phenylalanin konnte keine Aufspaltung Δ der Lochspektren beobachtet werden, so daß das auf den Formeln von Schätz und Maier (15) beruhende Fitprogramm (40) ausschließlich die feldinduzierte Verbreiterung σ berücksichtigte und die durch die Umgebung des aromatischen Rings hervorgerufene gemittelte induzierte Dipolmoment-Differenz $(f/h)\langle\Delta\mu_i\rangle$ berechnete.

Abb. 4.9 (a) und (b) zeigen typische Lochspektren von Phenylalanin (hier für einen pH-Wert von 7.0) in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K, die für verschiedene Feldstärken in den beiden Polarisationsgeometrien $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ bei 37375 cm^{-1} und $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ bei 37360 cm^{-1} erhalten wurden. In Abb. 4.9 (c) und (d) sind die jeweiligen Fitkurven abgebildet. Wie den Spektren gut zu entnehmen ist, wird bis zu einer Feldstärke von bis zu 38 kV/cm keinerlei Aufspaltung beobachtet: Die Löcher verbreitern symmetrisch. Dieses Verhalten deutet auf ein nahezu zentrosymmetrisches π -Elektronensystem hin, das über kein permanentes Dipolmoment verfügt.

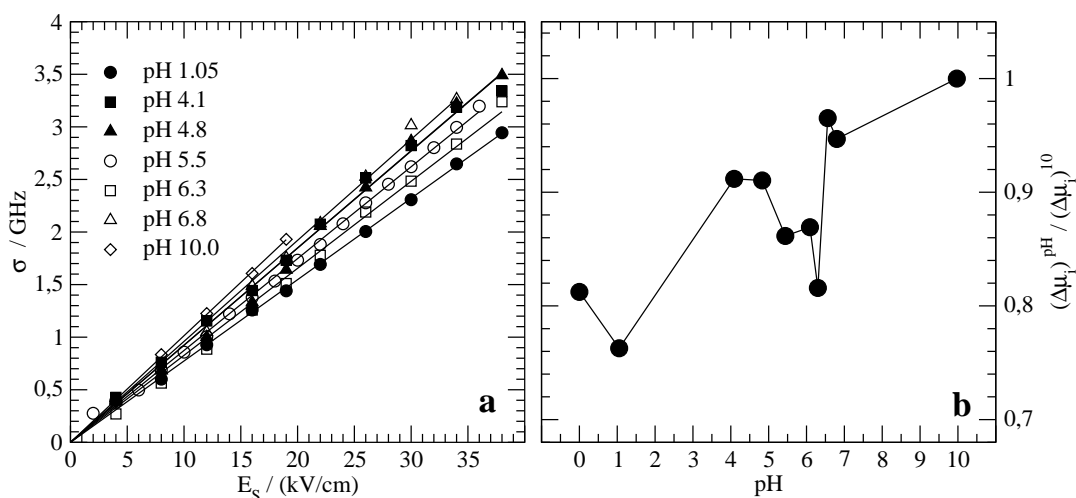


Abbildung 4.10: (a) Die Verbreiterung σ der spektralen Löcher bei verschiedenen pH-Werten als Funktion des Starkfelds \vec{E}_S bei einer Temperatur von 2 K. Die pH-Werte sind für Heliumtemperaturen korrigiert (siehe Kapitel 4.3). (b) Relative Werte der induzierten Dipolmoment-Differenzen als Funktion des pH-Wertes, wobei der Datenpunkt bei pH 10.0 willkürlich auf 1 normiert wurde. Auch in (b) sind die pH-Angaben für Heliumtemperaturen korrigiert.

Das wesentliche Ergebnis der Phenylalanin-Studien ist Abb. 4.10 (a) zu entnehmen: Der Starkeffekt, in diesem Falle durch die feldinduzierte Verbreiterung σ hervorgerufen, ist bis zu einer maximalen Feldstärke von 38 kV/cm perfekt linear. Es ist lediglich ein schwacher Einfluß des pH-Wertes auf die elektrostatischen Eigenschaften des aromatischen Rings zu beobachten, obwohl die Amino- bzw. die Carboxylgruppe innerhalb des hier betrachteten pH-Bereichs Protonierungs- bzw. Deprotonierungsvorgängen unterliegt. Die Ladungsänderungen in der Kopfgruppe der Aminosäure führen offensichtlich nicht zu einer bemerkenswerten Reorganisation der Elektronendichte in dem aromatischen System des Chromophors. Wenn gleich der pH-Einfluß als nur mäßig einzustufen ist, ergibt sich bei näherer Betrachtung eine interessante Beobachtung: Die induzierte Dipolmoment-Differenz nimmt nicht ausschließlich monoton mit steigendem pH-Wert zu, sondern verursacht bei pH 6 eine Vertiefung in der Größenordnung von 15%. Verglichen mit den relativen pH-Schwankungen ergibt sich für die Vertiefung gar ein Wert von etwa 40% (siehe Abb. 4.10 (b)).

Daß in beiden Polarisationen die spektralen Löcher in gleicher Weise verbreitern und ihre glockenförmige Form beibehalten, ohne jeglichen Hinweis auf eine Abplattung oder gar Aufspaltung bis zu Feldstärken von bis zu 38 kV/cm, ist ein deutlicher Hinweis, daß die elektronischen Zustände des Übergangs $S_0 \mapsto S_0$ nahezu zentrosymmetrisch sind. Aufgrund dessen existiert auch kein signifikantes

pH 293K	pH 2K	Formen ^{a b c d}	Bemerkung
1.11	0	überwiegend \oplus	unterhalb pK_{S1}
2.55	1.05	\oplus und \otimes , \odot	nahe $\text{pK}_{\text{S1}} = 1.8$
5.59	4.09	Zunahme von \otimes , \odot	
6.33	4.83	Zunahme von \otimes , \odot	
6.94	5.44	\otimes , \odot	nahe I.P. = 5.9
7.59	6.09	Abnahme von	
7.80	6.30	\otimes , \odot	
8.06	6.56	Zunahme von	
8.30	6.80	\ominus	
11.47	9.97	\otimes , \odot und \ominus	nahe $\text{pK}_{\text{S2}} = 10.0$

^a \oplus positiv geladene Form: $\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CHR} - \text{COOH}$

^b \ominus negativ geladene Form: $\text{H}_2\text{N} - \text{CHR} - \text{COO}^-$

^c \otimes zwitterionische Form: $\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CHR} - \text{COO}^-$

^d \odot neutrale Form: $\text{H}_2\text{N} - \text{CHR} - \text{COOH}$

Tabelle 4.3: Die verschiedenen für die Starkeexperimente verwendeten Proben und ihre pH-Werte gemessen bei Raumtemperatur bzw. der geschätzte Wert für tiefe Temperaturen. Die aufgrund der Kenntnis der beiden pK_{S} -Werte und des isoelektrischen Punktes vorliegenden unterschiedlich geladenen Formen von Phenylalanin in den entsprechenden pH-Bereichen sind in einer weiteren Spalte angegeben.

permanentes Dipolmoment, obwohl die Seitenkette von Phenylalanin ein, wenn auch kleines, Dipolmoment besitzt (77; 78). Um sicher zu gehen, wurden die Daten nochmals mit Berücksichtigung eines permanenten Dipolmoments in der speziellen Konfiguration $\Delta\vec{\mu}_0$ parallel zum Übergangsdipolmoment³ gefittet, doch ergaben sich für $\Delta\vec{\mu}_0$ eine Größenordnung geringere Werte, als für die induzierte Dipolmoment-Differenz. Dies ist in der Tat überraschend, da im Falle von Phenylalanin der aromatische Chromophor bei neutralem pH mit $\text{NH}_3^+ - \text{CHR} - \text{COO}^-$ einen polaren Substituenten besitzt. Weitaus interessanter ist die Tatsache, daß der pH der Lösung die elektrostatischen Eigenschaften von Phenylalanin, die mit einem optischen Experiment gemessen wurden, in nur geringem Maße beeinflusst. Die durch Titrationsmessungen in Kap. 4.3 ermittelten pK_{S} -Werte für Phenylalanin in Wasser-Glycerin von $\text{pK}_{\text{S1}} = 1.8$ und $\text{pK}_{\text{S2}} = 10.0$ werden durch die Starkeffekt-Experimente mit abgedeckt (siehe Tabelle 4.3), d.h. alle möglichen Protonierungszustände der aromatischen Aminosäure Anion, Kation, Zwitterion und die neutrale Form wurden experimentell erfaßt. Die Ladungen der Amino- bzw. der Carboxylgruppe sind nicht in der Lage, das aromatische Ringsystem in *signifikanter* Weise zu polarisieren.

³Die Verbreiterung der Lochspektren erfolgt in der Polarisationsgeometrie $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ etwas stärker, ist somit, wenn überhaupt, ein wahrscheinlicher Kandidat für eine Aufspaltung.

pH 293K	pH 2K	$(f/h) \cdot \Delta\mu_i$ in GHz · cm/kV	$f \cdot \Delta\mu_i$ in Debye
1.11	0	0.0824	0.164
2.55	1.05	0.0774	0.154
5.59	4.09	0.0925	0.184
6.33	4.83	0.0923	0.183
6.94	5.44	0.0874	0.174
7.59	6.09	0.0881	0.175
7.80	6.30	0.0827	0.164
8.06	6.56	0.0979	0.194
8.30	6.80	0.0960	0.191
11.47	9.97	0.1014	0.201

Tabelle 4.4: Auflistung aller induzierten Dipolmoment-Differenzen $(f/h) \cdot \Delta\mu_i$ in GHz · cm/kV bzw. $f \cdot \Delta\mu_i$ in Debye für alle in diesem Experiment verwendeten pH-Proben.

Über den pseudolinearen Starkeffekt könnte Phenylalanin somit als optische Sonde mit Inversionssymmetrie verwendet werden, um lokale Felder in Proteinen direkt auszumessen. Die durch den pseudolinearen Starkeffekt hervorgerufene Verschiebung $(f/h) \cdot \langle (\vec{E}_M \Delta \vec{\alpha} \vec{E}_S)^2 \rangle^{\frac{1}{2}}$ ist nicht nur in dem externen Starkfeld \vec{E}_S , sondern auch in dem durch die Matrix verursachten Feld \vec{E}_M linear. Könnten der Lorentzfaktor f und die Änderung der Polarisierbarkeit bei der $S_0 \mapsto S_1$ -Anregung $\Delta \vec{\alpha}$ beispielsweise durch quantenchemische Berechnungen ermittelt werden, wäre prinzipiell eine absolute Bestimmung von \vec{E}_M denkbar. In ungeordneten Matrices wie Wasser-Glycerin sind die elektrischen Felder \vec{E}_M statistisch verteilt und führen ausschließlich zu einer Verbreiterung der Spektren. In Proteinen jedoch ist ein völlig unterschiedliches Szenario denkbar: Die hohe Organisation in der lokalen Umgebung des Chromophors könnte zu wohldefinierten Richtungen von \vec{E}_M bezüglich der verwendeten Sonde führen (48; 56; 79; 80) und eine Aufspaltung der Lochspektren herbeiführen.

Das gute Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Starkeffekt-Experimente (siehe experimentelle Spektren und ihre entsprechenden Fitkurven in Abb. 4.9) ermöglicht eine hervorragende Anpassung der Spektren und liefert infolgedessen präzise Werte für die induzierten Dipolmoment-Differenzen, hervorgerufen durch die perfekte Linearität in Abb. 4.10 (a). In Tab. 4.4 sind die Werte von $(f/h) \langle \Delta\mu_i \rangle$ in GHz · cm/kV⁴ und $f \langle \Delta\mu_i \rangle$ in Debye⁵ der entsprechenden pH-Proben aufgelistet, während in Abb. 4.10 (b) die relativen Größen als Funktion des pH-Wertes dargestellt sind. Obwohl die Differenz der induzierten Dipolmomente mit zuneh-

⁴Die Angabe von $(f/h) \cdot \Delta\mu_i$ erfolgt in GHz · cm/kV. Bei Mitberücksichtigung der Planck-Konstante $h = 6.62517 \cdot 10^{-34}$ Js ergeben sich Werte in Cm, die üblicherweise in der Größenordnung von 10^{-30} Cm liegen.

⁵Für die Umrechnung von Cm in Debye gilt: 1 D \doteq $3.33564 \cdot 10^{-30}$ Cm

mentem pH ansteigt, geschieht dies in nicht monotoner Weise: Bei einem pH-Wert von etwa 6.3 erscheint eine Vertiefung von ca. 15%. Da keine Anzeichen auf eine Änderung der Leitfähigkeit in dieser pH-Region bestehen, kann diese Vertiefung als der Übergang von der zwitterionischen in die neutrale Form interpretiert werden. Auch wenn sich bei diesem Übergang die Gesamtladung des Moleküls nicht ändert, so besteht dennoch ein Unterschied zwischen der geladenen bzw. ungeladenen Konfiguration, die sich auf das π -Elektronensystem des aromatischen Rings auswirkt und im Starkeffekt sichtbar wird. Diese Beobachtung steht keinesfalls im Widerspruch zu obiger Diskussion, daß die pH-Änderung nur im geringen Maße die Elektronendichte des Aromaten beeinflusst: Es ist definitiv eine Wirkung des pH vorhanden, wenn auch sehr schwach. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten wäre durch die Abschirmung der geladenen Kopfgruppen der Aminosäure durch Wassermoleküle der Lösung in hohem Maße denkbar, denn die π -Elektronen der Phenylgruppe werden durch sie kaum polarisiert. Findet ein Protonentransfer von der Amino- zur Carboxylgruppe statt, mit dem Ziel einer Neutralisierung der Ladungen in der Aminosäure-Kopfgruppe, dann geschieht eine Umlagerung der Wassermoleküle mit einer gleichzeitigen Veränderung von \vec{E}_M und führt zu den in Abb. 4.10 (b) dargestellten Änderungen des Starkeffekts.

Kurze Zusammenfassung

Phenylalanin ist aufgrund seiner de-facto Inversionssymmetrie als eine Sonde für elektrostatische Felder in ihrer unmittelbaren Umgebung zu betrachten (81) und dürfte daher feinfühlig auf die symmetriebrechenden Matrixfelder reagieren, wie sie beispielsweise in Proteinen vorherrschen.

4.5 Tyrosin

4.5.1 Absorptions- und Emissionsspektren

Tyrosin besitzt im Vergleich zu Phenylalanin eine OH-Gruppe am aromatischen Ring in para-Stellung. Dieser Substituent bewirkt einen deutlichen Eingriff in das π -Elektronensystem des aromatischen Rings: Eine Rot-Verschiebung um mehr als 2000 cm^{-1} und ein markanter Verlust der Feinstruktur auf lediglich zwei deutlich getrennte Schwingungsbanden und einer Schulter auf der höherenergetischen Flanke des elektronischen Bandensystems. Eine signifikante Verschiebung der Absorptionslinien infolge der Substitution einer OH-Gruppe am aromatischen Ringssystem wird auch bei den Spektren von Phenol bzw. Tyrosin in Wasser beobachtet (75). Beim Vergleich der Tyrosinspektren in Wasser mit den in Abb. 4.11 (a) gezeigten Bandenstruktur in einem Wasser-Glycerin Glas bei 4.2 K, wird wieder die übliche bathochrome Verschiebung durch die Lösungsmittelkomponente Glycerin erkennbar. Die Polarität des Lösungsmittels auf den Chromophor wirken sich deutlich auf die Feinstruktur aus: Je unpolarer das Lösungsmittel, desto detaillierter die Struktur des Absorptionsspektrums (82). So besitzt p-Cresol, ein Phenol-Molekül mit einer Methylgruppe in para-Stellung, in iso-Oktan ein reich strukturiertes Absorptionbandensystem, das durch Zugabe von polaren Lösungsmitteln deutlich an Details verliert.

Mit einem kleinen Gitter-Monochromator wurden zusätzlich Emissionsspektren bei tiefen Temperaturen (4.2 K) aufgezeichnet, wobei mit einem Laser schmalbandig in die langwellige Flanke der Tyrosinabsorptionsbande bei 35088 cm^{-1} eingestrahlt wurde. Das so angeregte Ensemble von Molekülen erzeugte eine überraschend deutliche vibronische Unterstruktur in Fluoreszenz und Phosphoreszenz (siehe Abb. 4.11 (a)). Weiterhin ist die relativ starke Phosphoreszenz bemerkenswert, die auf eine ausgeprägte Besetzung des Triplett-Zustandes weist.

Im Gegensatz zu Phenylalanin ist die pH-Abhängigkeit von Tyrosin aufgrund der Deprotonierbarkeit der OH-Gruppe, die direkt an das π -Elektronensystem des aromatischen System koppelt, äußerst markant in den Spektren ersichtlich. Während zwischen den pH-Werten von 1.65 und 7.5 (siehe 4.11 (a) und (b)), wenn überhaupt, eine leichte Rotverschiebung der Absorption und Emission durch die Umladung der Carboxyl- bzw. Aminogruppe zustande kommt, verändern sich die Spektren bei einem pH-Wert von 10.93 (Abb. 4.11 (d)) in signifikanter Weise: Neben einer Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen um etwa 1000 cm^{-1} geht jegliche Feinstruktur verloren. In Abb. 4.11 (c) bei einem pH-Wert von 9.0 ist besonders gut der Übergang des Tyrosins (protonierte OH-Gruppe) zum Tyrosinat-Ion (deprotonierte OH-Gruppe) zu erkennen, sowohl in der Absorption, als auch in Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Selbst die Entvölkerung des Triplett-Zustands, näherungsweise durch einen mono-exponentiellen Zerfall angepaßt, spiegelt die Deprotonierung der OH-Gruppe am aromatischen Ring des

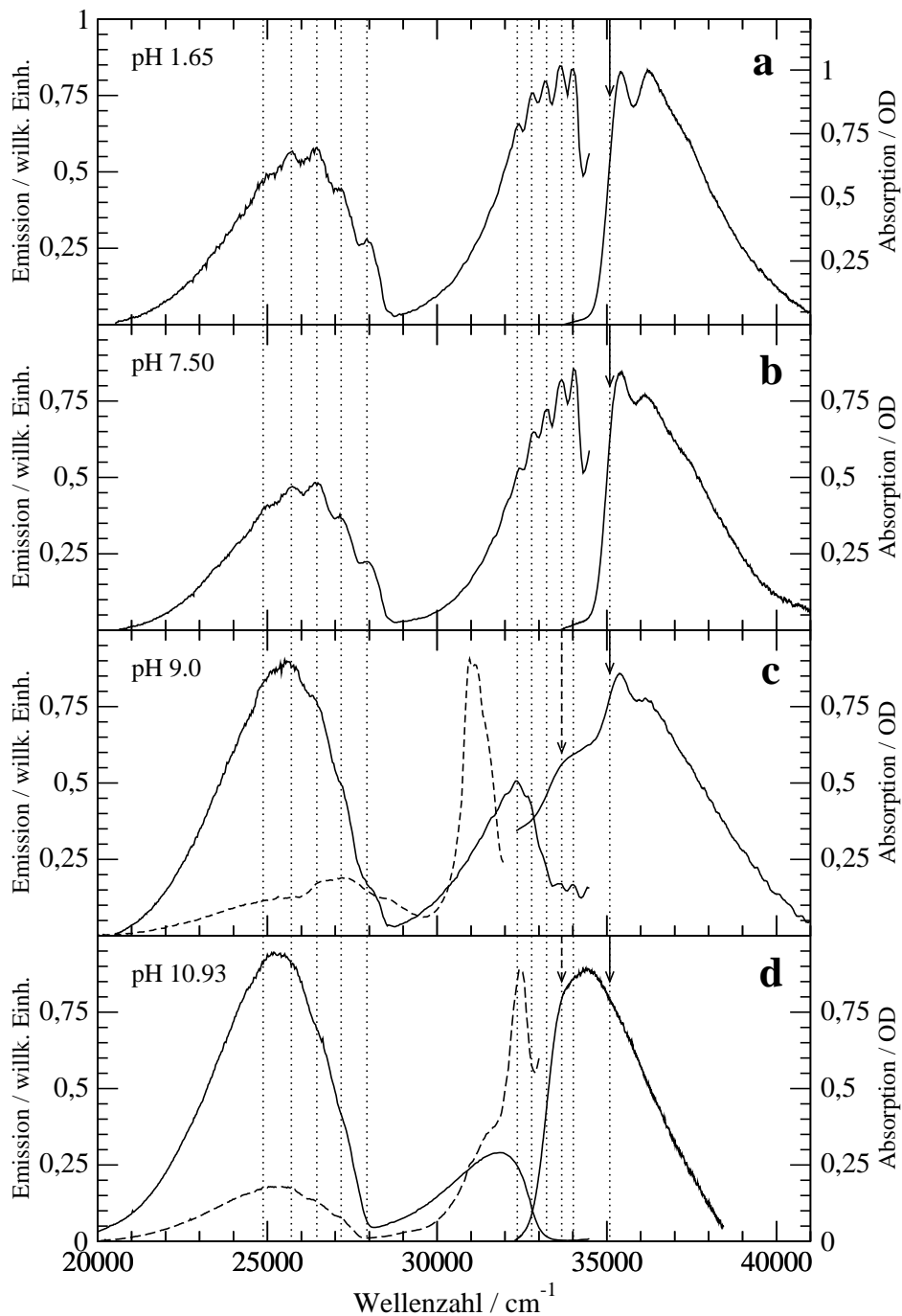


Abbildung 4.11: Absorptions- und Emissionsspektren von Tyrosin in einem Wasser-Glycerin Glas bei verschiedenen pH-Werten und einer Temperatur von 4.2 K. **(a)** Tyrosin bei pH 1.65. Emissionsspektren entstehen durch schmalbandige Laser-Anregung bei 35088 cm^{-1} . **(b)** Bis zu einem pH-Wert von 7.5 (Zugabe von NaOH) sind nahezu keine Änderungen feststellbar. **(c)** Übergangsregion Tyrosin \leftrightarrow Tyrosinat-Ion bei pH 9.0. (Emission durch Anregung bei 35088 cm^{-1} (durchgezogene Linie) und 33629 cm^{-1} (gestrichelte Linie)). **(d)** Nahezu komplett deprotonierte Form des Tyrosins. Anregung wie bei (c). Fluoreszenz-Überhöhung wird durch Laserlicht verursacht.

Tyrosins zu hohen pH-Werten wieder: Während zwischen den pH-Werten von 1.65 und 7.5 die Zerfallszeit konstant bei etwa 2.9 s liegt, fällt sie bei 10.93 auf eine Zeit von $\simeq 1.57$ s ab. Die in Abb. 4.11 wiedergegebenen Spektren wurden durch Titration von NaOH zu einer Ausgangslösung von Tyrosin in 0.04 M HCl und einem pH-Wert von 1.65 erzielt. Führt man allerdings die Titration anstatt NaOH mit Tris durch, stellt man eine Verschiebung der Deprotonierung der OH-Gruppe des Tyrosins um 1.5 pH-Stufen früher, also saurer, fest. Die pH-Abhängigkeit der Spektren des Tyrosins wird von zwei Prozessen hervorgerufen: (a) Der Umladung der Aminosäure-Kopfgruppen und (b) der Deprotonierung der OH-Gruppe des aromatischen Rings, wobei die Bildung des Tyrosinat-Ions die Ionisierung der Carboxyl- bzw. Aminogruppe deutlich spektral dominiert.

4.5.2 Starkeffekt

Typische Leistungsdichten lagen für die Tyrosinproben mit 0.03 W/cm^2 eine Größenordnung höher, als für Phenylalanin und doch konnten nur 8% tiefe Löcher während einer Brenndauer von wenigen Minuten erzeugt werden. Dies ist einer der Gründe, warum die Spektren ein vergleichsweise schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen. Alle Starkspektren wurden bei Temperaturen von 2 K aufgenommen.

Tyrosin bei pH 1.65

In Abb. 4.12 sind typische Lochspektren für Tyrosin (hier bei einem pH von 1.65) in einem Wasser-Glycerin Glas zu sehen, die sich unter dem Einfluß eines externen elektrischen Feldes in Abhängigkeit ihrer Polarisationsgeometrie verändern. Ist die Laserpolarisation des Brenn- und Auslesestrahls \vec{E}_L parallel zum Starkfeld \vec{E}_S orientiert (siehe Abb. 4.12 (a)), wird die glockenartige Linienform mit ansteigender Feldstärke beibehalten. Für $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ erscheint allerdings für höhere Feldstärken nach vorausgehender Abplattung der Lochspektren eine Vertiefung im Zentrum (siehe Abb. 4.12 (b)), die unmißverständlichen Anzeichen für eine Aufspaltung. In Abb. 4.12 (c) wird die Aufspaltung $\Delta = (f/h) \cdot \vec{E}_S \cdot \Delta\vec{\mu}_0$ als Funktion des Starkfeldes \vec{E}_S gezeigt, die eine perfekte Linearität bis zu einer in diesem Experiment maximalen Feldstärke von 27 kV/cm aufweist. Desweiteren ist der Gaußsche Verbreiterungskern der Breite $\sigma = (f/h) \cdot \langle (\vec{E}_S \Delta\vec{\alpha} \vec{E}_M)^2 \rangle^{\frac{1}{2}}$ als Funktion des externen Feldes \vec{E}_S zu sehen. Er entsteht durch die statistische Verteilung der durch lokale Matrixfelder \vec{E}_M induzierten Dipolmoment-Differenzen. Die Tyrosin-daten bei einem pH-Wert von 1.65 sind durch die entsprechende Verbreiterung von Phenylalanin bei pH 2.55 (pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur) ergänzt (siehe Abb. 4.12 (c)) und veranschaulichen in eindrucksvoller Weise die deutlich markantere, durch die OH-Gruppe hervorgerufene, pH-Abhängigkeit von Tyrosin bzgl. des inversionssymmetrischen Chromophors von Phenylalanin.

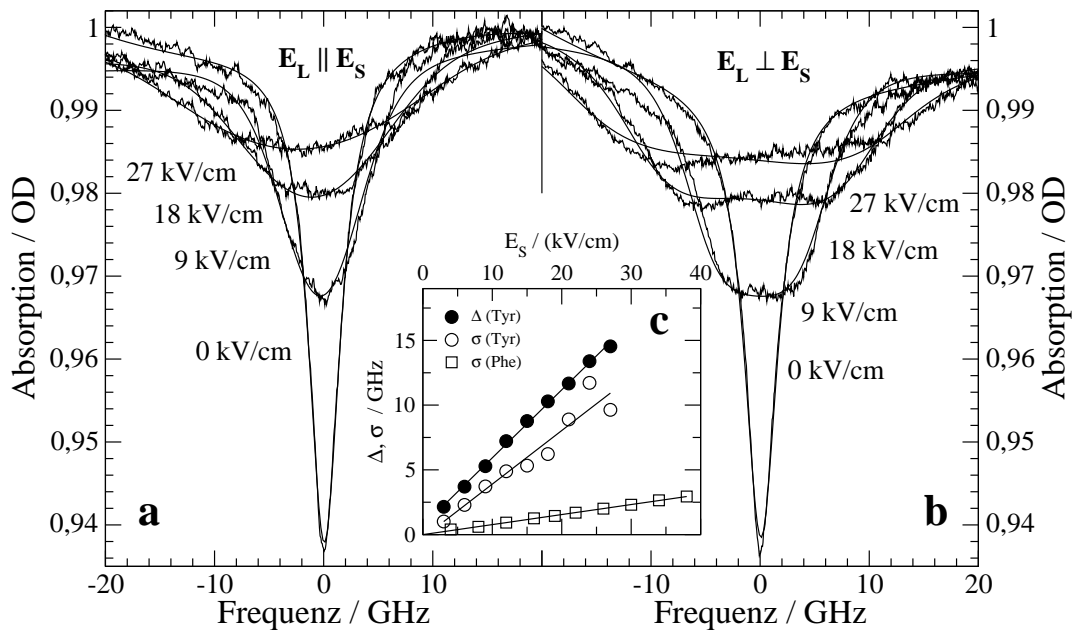


Abbildung 4.12: Spektrale Löcher unter dem Einfluß eines statischen elektrischen Feldes \vec{E}_S . Tyrosin in einem Wasser-Glycerin Glas bei einem pH von 1.65 (bei Raumtemperatur bestimmt) und einer Temperatur von 2 K. **(a)** Parallele Polarisationsanordnung: $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ bei 35074 cm^{-1} . **(b)** Senkrechte Polarisationsanordnung: $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ bei 35063 cm^{-1} . **(c)** Aufspaltung Δ und Verbreiterung σ der Löcher als Funktion des Starkfeldes \vec{E}_S . Ergänzend ist die Verbreiterung σ von Phenylalanin bei einem auf Raumtemperatur bezogenen pH von 2.55 gezeigt.

Tyrosin bei höherem pH

Um Tyrosin-Proben mit höheren pH-Werten zu erstellen, wurde mit den zwei Substanzen 1 M NaOH und 0.5 M Tris titriert. Jedoch ergaben sich mit steigenden Titerkonzentrationen zwei gravierende Schwierigkeiten:

1. Die Qualität des bei tiefen Temperaturen entstehenden Glases wurde durch eine sich vergrößernde Anzahl von Sprüngen zunehmend schlechter und zeigte ungünstige Auswirkung auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis.
2. Die Phosphoreszenz wurde mit zunehmenden pH-Werten immer dominanter und beeinflusste die Basislinie der Lochspektren, was die Auswertung und die Fitprozedur erschwerte.

Bei genauerer Betrachtung ist die Phosphoreszenz abhängig von der Glasqualität: Die zunehmenden Sprünge streuen Laserlicht in die umgebenden Bereiche, die ihrerseits zur Gesamtphosphoreszenz beitragen. In Abb. 4.13 sind Spektren von Tyrosin in Wasser-Glycerin bei einem pH von 7.5 gezeigt.

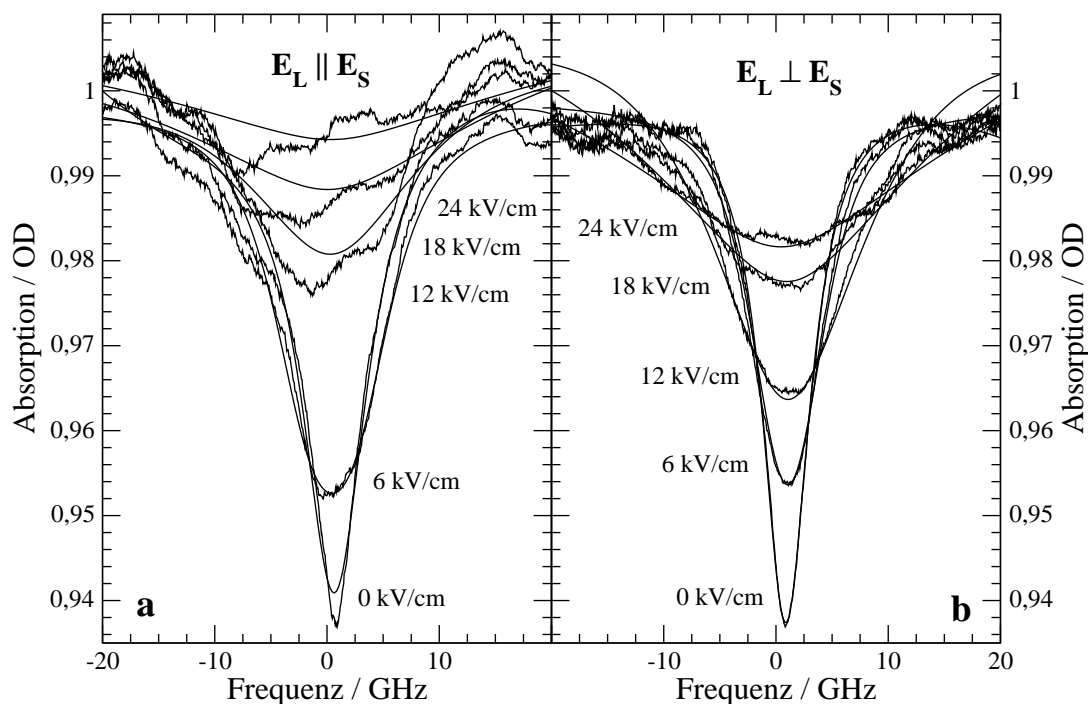


Abbildung 4.13: Starkeffekt an spektralen Löchern von Tyrosin in einem Wasser-Glycerin Gemisch bei einem pH-Wert von 7.5 (gemessen bei Raumtemperatur) und einer Temperatur von 2 K. (a) Laserfeld \vec{E}_L und Starkfeld \vec{E}_S sind parallel angeordnet. Das ursprüngliche Loch wurden bei 35052 cm^{-1} gebrannt. (b) Laserfeld \vec{E}_L und Starkfeld \vec{E}_S sind senkrecht angeordnet. Das ursprüngliche Loch wurden bei 35054 cm^{-1} gebrannt. Deutlich ist hier die Beeinflussung der Basislinie zu sehen, die in diesem Falle eine vernünftige Auswertung unmöglich machte.

Während die Titration von Tyrosin in Wasser-Glycerin mit NaOH die Absorptions- und Emissionsspektren zwischen den pH-Werten von 1.65 und 7.50 nicht merklich ändert, wird der Übergang in die deprotonierte Tyrosinat-Form für pH-Werte über 7.5 spektral klar wahrgenommen (siehe Abb. 4.11). Führt man entsprechende Experimente mit der Titersubstanz Tris durch, geschieht dieser Übergang überraschenderweise schon ab einem pH von 7.54. Da Lochbrennen im Tyrosinat-Ion unmöglich war, wurden Starkeffekt-Messungen in Tyrosinproben mit folgenden pH-Werten durchgeführt:

- pH 1.65 mit HCl (Stammlösung)
- pH 3.5, 5.5 und 7.5 mit HCl, Titration mit NaOH
- pH 3.7 und 5.5 mit HCl, Titration mit Tris

pH ^a	Titer	$(f/h)\Delta\mu_0$ in GHz · cm/kV	$f \cdot \Delta\mu_0$ in Debye	θ
1.65		0.524 ± 0.009	1.041 ± 0.019	75°
3.5	NaOH	0.517 ± 0.005	1.027 ± 0.010	70°
3.7	Tris	0.490 ± 0.025	0.973 ± 0.050	65°
5.5	NaOH	0.456 ± 0.023	0.906 ± 0.046	70°
5.5	Tris	0.487 ± 0.026	0.967 ± 0.052	65°
pH	Titer	$(f/h)\Delta\mu_i$ in GHz · cm/kV	$f \cdot \Delta\mu_i$ in Debye	
1.65		0.445 ± 0.044	0.884 ± 0.087	
3.5	NaOH	0.130 ± 0.018	0.258 ± 0.036	
3.7	Tris	0.137 ± 0.023	0.272 ± 0.046	
5.5	NaOH	0.122 ± 0.017	0.242 ± 0.034	
5.5	Tris	0.133 ± 0.055	0.264 ± 0.110	

^agemessen bei Raumtemperatur

Tabelle 4.5: Parameter der Starkeffekt-Messungen für verschiedene pH-Werte (gemessen bei Raumtemperatur) und Titer-substanzen. Die Aufspaltung Δ und die Verbreiterung σ sind in GHz · cm/kV und Debye angegeben. Der Winkel θ zwischen den beiden Vektoren $\Delta\vec{\mu}_0$ und dem Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ ist in Grad aufgelistet. f ist die Lorentzfeld-Korrektur, h die Planck-Konstante.

In Tab. 4.5 sind die Parameter der Stark-Experimente für verschiedene pH-Werte und Titer-substanzen aufgelistet. Spektren und Ergebnisse für die Titration mit NaOH bzw. Tris sind etwas unterschiedlich. Die Dipolmoment-Differenzen sind in GHz · cm/kV und Debye angegeben. Der Winkel θ wird durch die beiden Vektoren $\Delta\vec{\mu}_0$ und dem Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ gebildet und ist in Grad dargestellt. Die pH-Werte beziehen sich wieder wie üblich auf Raumtemperatur.

Während $\Delta\mu_0$ in beiden Pufferlösungen bis zu einem Wert von 5.5 nahezu unabhängig vom pH ist, sinkt $\Delta\mu_i$ zunächst von 1.65 bis 3.5 auf ein Drittel seines Wertes, um anschließend dieses Niveau beizubehalten.

Tyrosin-Wasser Wechselwirkung

Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung berichtet über bemerkenswerte Eigenschaften des Tyrosin-Chromophors Phenol in Wasser (83). Zunächst gilt isoliertes Phenol als ein ziemlich unpolares Molekül mit einem Dipolmoment von 1 D im elektronischen Grundzustand. Interessanter Weise ist dieses Dipolmoment im angeregten Zustand jedoch dasselbe wie im Grundzustand und dürfte somit erwartungsgemäß nur einen äußerst schwachen linearen Starkeffekt zeigen. Befinden sich allerdings Wassermoleküle in der lokalen Umgebung, bildet Phenol verschiedenartige Komplexe aus. In Hinblick auf die Lochbrenn-Experimente mit Tyrosin erscheint der Komplex mit *einem* Wassermolekül, Phenol-H₂O, eine wesentliche Rolle zu spielen: Dieser Komplex besitzt nämlich bereits im Grundzustand eine

starke Wasserstoffbrücken-Bindung. In diesem Falle existiert eine Dipolmoment-Differenz zwischen S_0 und S_1 in der, wenn auch geringen, Größenordnung von etwa 1 D und sollte somit zu einem klar ersichtlichen linearen Starkeffekt führen. Wie aus Tab. 4.5 ersichtlich, ergibt sich für die Dipolmoment-Differenz $f \cdot \Delta\mu_0$ für Tyrosin ein Wert von $\simeq 1.1$ D. Verwendet man für die relative Dielektrizitätskonstante ε Werte zwischen 2 und 4, eine durchaus realistische Annahme für tief gefrorene Materialien (84), ergeben sich für die nicht genau bekannte Lorentz-Feldkorrektur für tiefe Temperaturen Zahlenwerte in der Größenordnung von etwa 1. Wird eine größere Anzahl von Wassermolekülen in der näheren Umgebung der OH-Gruppe des Phenols in Betracht gezogen, ergeben sich weitaus höhere Dipolmomente, die für das Verständnis der Lochbrennstudien an Tyrosin nicht relevant erscheinen.

Dipolmomente und pH-Effekt

Die experimentellen Werte der induzierten Dipolmoment-Differenzen $\Delta\mu_i$ von Tyrosin bzw. Phenylalanin zeigten einen 5-fachen größeren Wert für Tyrosin und deuten auf eine weitaus größere Polarisierbarkeit von Tyrosin gegenüber Phenylalanin hin. Dies ist verständlich, wenn man die OH-Gruppe als Elektronen-Donor des aromatischen Rings in Betracht zieht: Die hohe Elektronendichte des Sauerstoffatoms schiebt Ladungen in das aromatische Ringsystem zurück. Eine höhere Ladungsdichte bedingt eine größere Polarisierbarkeit α , die ihrerseits wiederum für eine größere Differenz $\Delta\vec{\alpha}$ sorgen kann. Berechnungen von X. Song (85) ergeben für Tyrosin eine Polarisierbarkeit α_0 im Grundzustand, die den entsprechenden Wert für Phenylalanin um einen Faktor 5 übertrifft und mit den mittels spektralen Lochbrennens erzielten Ergebnissen gut übereinstimmt.

Die Polarisierbarkeitsdifferenz $\Delta\vec{\alpha}$ nimmt im beträchtlichen Maße mit zunehmendem pH-Niveau ab (da $\Delta\alpha \propto \Delta\mu_i$ gilt, siehe Tabelle 4.5, pH 1.65 \mapsto 3.5). Mit obiger Argumentation wird mit zunehmenden pH-Werten Ladung aus dem aromatischen Ringsystem zum Sauerstoffatom hin abgezogen und dadurch die Polarisierbarkeit α erniedrigt. Diese Ladungsverschiebung ist für eine Zunahme der Polarität der OH-Bindung gut vorstellbar. Wie sich aus den Berechnungen von A. L. Sobolewski und W. Domcke (83) ergibt, erhält der $\pi\sigma^*$ -Zustand (S_2) seine starke Polarität durch eine Verlagerung des Wasserstoffatoms der OH-Gruppe zu einem benachbarten Wassermolekül. Dieser Prozeß erscheint für höhere pH-Werte wahrscheinlicher als für niedrige. Die Vermischung der beiden Zustände $\pi\pi^*$ (S_1) und $\pi\sigma^*$ (S_2) durch die Wechselwirkung der betrachteten Tyrosinmoleküle mit ihrer Lösungsumgebung wird bei steigenden pH-Werten verstärkt und verursacht eine intensive Polarisierung der OH-Bindung. Die Verlagerung des Wasserstoffatoms erniedrigt die Elektronendichte des Sauerstoffatoms und führt zu einem Abfließen von Elektronen des aromatischen Rings zum Sauerstoff hin und erzeugt deshalb eine Abnahme der Polarisierbarkeit α .

Zusammenfassung

Die UV-Lochbrenn-Experimente an Tyrosin in einem Wasser-Glycerin Glas unterhalb eines pH von 7 erlaubten die Bestimmung der molekularen Dipolmoment-Differenz $f \cdot \Delta\mu_0$ sowie der durch die Matrix induzierten Dipolmoment-Differenzen $f \cdot \Delta\mu_i$ und führten zu der Annahme der Bildung eines Komplexes von Tyrosin mit Wasser (86). Da bereits detaillierte theoretische Studien derartiger Komplexe zur Verfügung standen (83), konnten die entsprechenden spektralen Eigenschaften, wie z.B. die gemessenen $f \cdot \Delta\mu$ -Werte oder der Einfluß des pH-Wertes, den jeweiligen Eigenschaften des Komplexes zugeordnet werden. Oberhalb eines pH-Wertes von 7 ändern sich die Tyrosin-Spektren dramatisch durch die neu hinzukommende bathochrome Komponente des Tyrosinat-Ions, in der kein Lochbrennen möglich war.

4.6 Tryptophan

Absorptionsspektren, Emissionsspektren

Indol, der aromatische Chromophor der Aminosäure Tryptophan, zeigt in den Lösungsmitteln Heptan (75) und Oktan (82) mehr als fünf deutlich trennbare Absorptionsbanden, die durch die Verwendung von polaren Lösungsmitteln teilweise ineinander übergehen. Der Substituent $-\text{CH}_2 - \text{C}_\alpha\text{H} - \text{COOH} - \text{NH}_2$ am Indol-Ring bewirkt, wie bereits für Benzol (Phenylalanin) und Phenol (Tyrosin) besprochen, eine Rotverschiebung der Absorption von einigen hundert cm^{-1} , begleitet von einem Verlust der Feinstruktur durch das polare Lösungsmittel Wasser. Die in Abb. 4.14 wiedergegebenen Spektren für Tryptophan in einer Wasser-Glycerin Mischung bei 4.2 K erfahren durch Glycerin wiederum eine leichte Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen und zeigen lediglich drei gut zu unterscheidende Banden. Die pH-Abhängigkeit des Tryptophans läßt sich wieder auf ähnliche Weise wie für die Aminosäure Phenylalanin beschreiben: Die Zunahme des pH-Wertes verursacht durch die Umladung der Aminosäure-Kopfgruppen eine Beeinflussung des π -Elektronensystems und führt zu einer leichten bathochromen Verschiebung in Absorption und Emission. Die Phosphoreszenzlebensdauer wurde wieder näherungsweise mit einem mono-exponentiellen Zerfall für die neutrale Probe bei Heliumtemperaturen angepaßt und ergab einen Wert von etwa 7 s, deutlich länger als für Tyrosin.

Lochbrenn-Versuche

Für Tryptophan konnten leider keine erfolgreichen Lochbrenn-Experimente ausgeführt werden, da in die Absorptionsbande keine spektralen Löcher eingebrannt werden konnten. Dies zeigten Lochbrenn-Versuche auf der gesamten langwelligen Bande von 34700 bis 33550 cm^{-1} mit Brenndauern von mehr als 30 min. Hohe Elektron-Phonon-Kopplungen unterbinden die Möglichkeit der Erzeugung spektraler Löcher zur Nutzung von Tryptophan als intrinsische Sonde.

Die spektroskopischen Eigenschaften von Tryptophan, Indol und seine entsprechenden Derivate werden durch die zwei sich überlappenden Übergänge 1L_a und 1L_b bestimmt. Das Übergangsdipolmoment in den 1L_a -Zustand bildet einen Winkel von etwa 50° zur Längsachse des Indol-Chromophores und weist in Richtung des Stickstoffatoms des aromatischen Ringsystems (siehe Abb. 4.2 (c)). Die beiden Übergangsdipolmomente von 1L_a und 1L_b liegen näherungsweise senkrecht aufeinander (67).

Die Fluoreszenz dieser aromatischen Aminosäure hängt in empfindlicher Weise von ihren Lösungsmiteleigenschaften ab. Dies ist auch der Grund, warum Tryptophan häufig als intrinsische Sonde zur Untersuchung unterschiedlicher lokaler Umgebungen eingesetzt wird. Im Gegensatz zum 1L_b -Übergang zeigt der 1L_a -Übergang eine deutliche Lösungsmittelabhängigkeit, die sich sowohl in den Absorptions- als auch in den Emissionsspektren äußert (67). In nichtpolaren

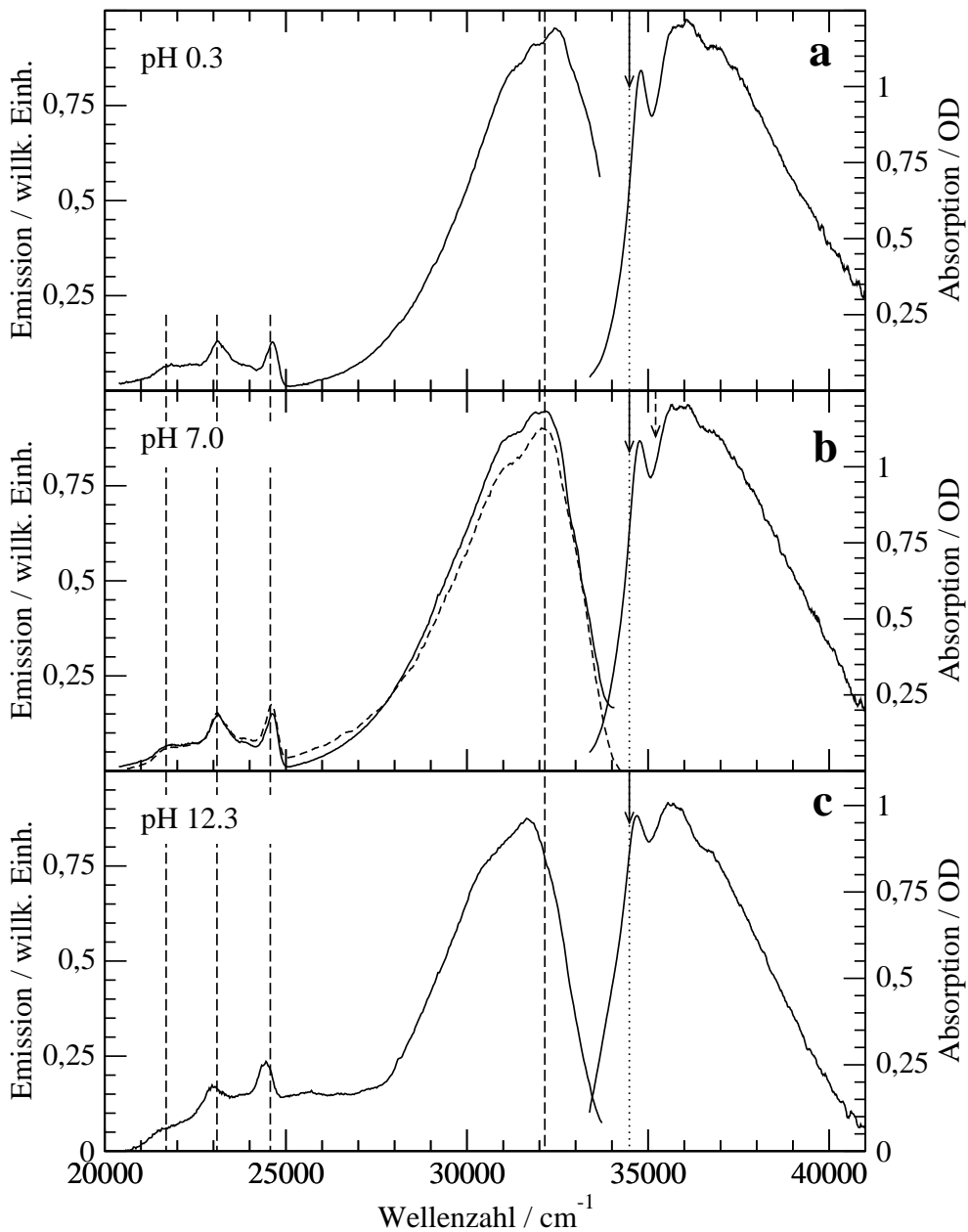


Abbildung 4.14: Absorptions- und Emissionsspektren von Tryptophan in einem Wasser-Glycerin Glas bei verschiedenen pH-Werten und einer Temperatur von 4.2 K. **(a)** Tryptophan mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 0.3 eingestellt. Das Emissionsspektrum wurde durch schmalbandige Laseranregung bei 34487 cm^{-1} erzeugt. Die gestrichelten Linien in den Emissionsbanden dienen der Orientierung. **(b)** Tryptophan bei neutralem pH. Die beiden Emissionsspektren wurden durch Anregung bei 34487 cm^{-1} (durchgezogene Linie) bzw. 35199 cm^{-1} (gestrichelte Linie) gewonnen. **(c)** Durch Zugabe von 1 M NaOH auf den pH-Wert von 12.3 eingestellte Tryptophan-Probe.

Lösungsmittel, wie beispielsweise Cyclohexan, dominiert der 1L_b -Zustand und wird durch eine strukturierte Emission angezeigt. Dagegen wird in polaren Lösungsmitteln die Fluoreszenz des Tryptophan-Chromophors von der unstrukturierten Emission der 1L_a -Bande überlagert. Diese bathochrome Verschiebung des 1L_a -Übergangs infolge stärkerer Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen des Indol-Stickstoffs mit der Umgebung wird durch das erheblich größere Dipolmoment im angeregten Zustand von 6 D (67) verursacht.

Als Lösungsmittel für die Lochbrenn-Experimente diente eine Mischung aus Wasser und Glycerin mit bekanntlich deutlich polaren Eigenschaften. Der 1L_a -Zustand wird nun gegenüber dem 1L_b -Zustand energetisch abgesenkt und dominiert die Absorptions- und Emissionsspektren. Die Intensivierung der Wechselwirkung der H-Brücke zwischen dem Indol-Stickstoff mit seiner Umgebung sorgt für eine bessere Elektron-Phonon-Kopplung, die wiederum die Effizienz des Lochbrennens absenkt oder gar unterbindet.

4.7 BPTI

4.7.1 Absorptions- und Emissionsspektren

Das in Abb. 4.15 (c) gezeigte Absorptionsspektrum des Proteins BPTI wird durch Beiträge von vier Tyrosinen (Tyr10, Tyr21, Tyr23 und Tyr35), von weiteren vier Phenylalaninen im hydrophoben Kern (Phe4, Phe22, Phe33 und Phe45) sowie von drei Disulfidbrücken und einem Methionin an der Position 52 bestimmt. Aufgrund seiner hohen Extinktionswerte wird der wesentliche Bestandteil der BPTI-Absorption aus den vier Tyrosinresten im Bereich zwischen 34000 und 37000 cm^{-1} gebildet. Die Phenylalanine erscheinen als kleine Erhebung in der energiereichen Flanke von 37000 bis 40000 cm^{-1} . Methionin trägt nur schwach oberhalb 40000 cm^{-1} zur Gesamtabsorption bei, während die Disulfidbrücken über einen großen Bereich von 33000 bis 41000 cm^{-1} einen leichten Untergrund bilden. Theoretische Berechnungen der Übergangsenergien $S_0 \mapsto S_1$ von Tyrosin in der jeweiligen lokalen Umgebung von BPTI ergeben folgende Anordnung: Tyr23 bei 49361 $\text{cm}^{-1} \mapsto$ Tyr21 bei 49522 $\text{cm}^{-1} \mapsto$ Tyr10 und Tyr35 bei 50571 cm^{-1} (87). Obwohl diese Energien riesige Abweichungen von den gemessenen Spektren zeigen, kann man ihre relativen Energien zur Zuordnung benutzen: Tyr23 in der roten Flanke bei etwa 33550 cm^{-1} gefolgt von Tyr21 bei 34475 cm^{-1} sowie Tyr35 und Tyr10 in dem plateauartigen Bereich um 35200 cm^{-1} . Bemerkenswert hierbei ist die Beobachtung, daß spektrale Löcher nur in einem relativ schmalen Gebiet zwischen 34600 und 35700 cm^{-1} gebrannt werden können.

4.7.2 Starkeffekt

Die Lochbrennexperimente an BPTI wurden wieder wie üblich bei einer Temperatur von 2 K ausgeführt. Mit Hilfe eines UV-Lasersystem wurden spektrale Löcher erzeugt, wobei auf der Probe typische Leistungsdichten von etwa 0.03 W/cm^2 bei einigen Minuten Brenndauer erreicht wurden. Die Tiefe der Löcher, die nur in einem Bereich von 34600 bis 35700 cm^{-1} gebrannt werden konnten, betrug lediglich $\simeq 2.5\%$. Durch die Übernahme einer Idee aus der Probenpräparation zum Druckeffekt, konnten durch die Einschweißung der Probe in ein Plastikbeutelchen, die Qualität der Spektren durch die Bildung eines klaren Tieftemperaturglases entscheidend verbessert werden.

In Abb. 4.16 sind die Starkspektren der beiden Polarisationsgeometrien $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ (a) und $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ (b) des Proteins BPTI in einem Wasser-Glycerin Glas mit einem pH-Wert von 8.0 (gemessen bei Raumtemperatur) bei Temperaturen von 2 K gezeigt. Die geringe Lochtiefe und die nicht zu vernachlässigende Phosphoreszenz sind die Ursachen für die mäßige Qualität der Lochspektren. Aus diesem Grunde konnten für BPTI nur die permanente Dipolmoment-Differenz $\Delta = (f/h) \cdot \Delta\vec{\mu}_0 \cdot \vec{E}_S$ zuverlässig ausgewertet werden. Dem freien Tyrosin ähnlich, läßt sich das Verhal-

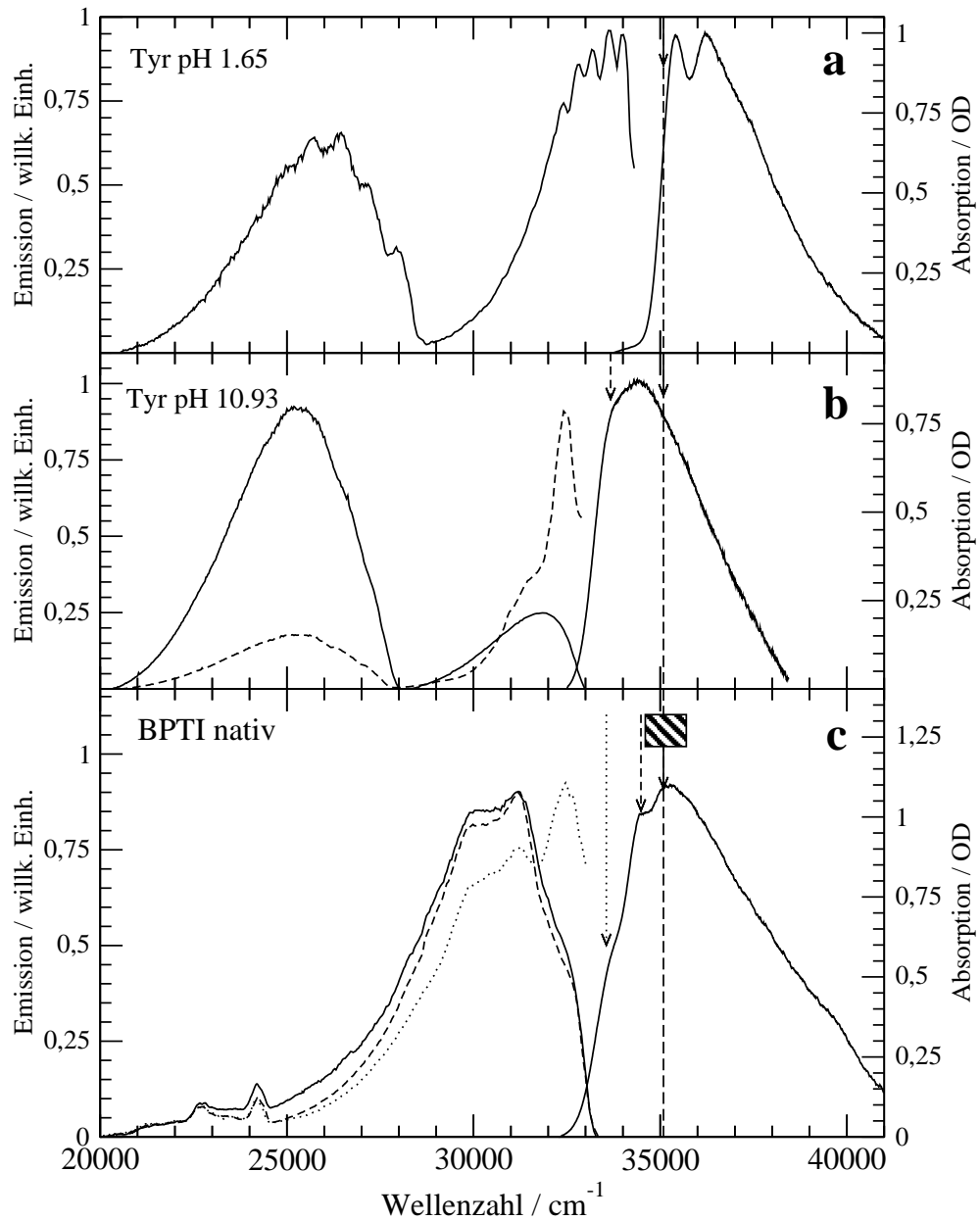


Abbildung 4.15: Absorptions- und Emissionsspektren von Tyrosin und nativen BPTI in einem Wasser-Glycerin Glas bei 4.2 K. **(a)** Tyrosin bei einem pH von 1.65. Die Lochbrenn-Experimente wurden bei 35088 cm⁻¹ ausgeführt. **(b)** Tyrosinat-Ion bei einem pH von 10.93. Die Emissionsspektren sind durch schmalbandige Laseranregung bei 35088 cm⁻¹ (durchgezogene Linie) und 33629 cm⁻¹ (gestrichelte Linie) entstanden. Die Überhöhung in der Fluoreszenz wurde durch Laserlicht verursacht. **(c)** BPTI Absorptionsspektrum bei einem pH von 8.0. Der schraffierte Balken deutet die Region an, in der spektrale Löcher gebrannt werden konnten. Emissionsspektren von BPTI bei pH 5.5. Die drei verschiedenen Emissionsspektren wurden durch Laseranregung bei 35050 cm⁻¹ (durchgezogene Linie), 34474 cm⁻¹ (gestrichelte Linie) und 33550 cm⁻¹ (gepunktete Linie) aufgezeichnet. Die Fluoreszenz-Überhöhung wird wieder durch das Anregungslicht des Laser verursacht.

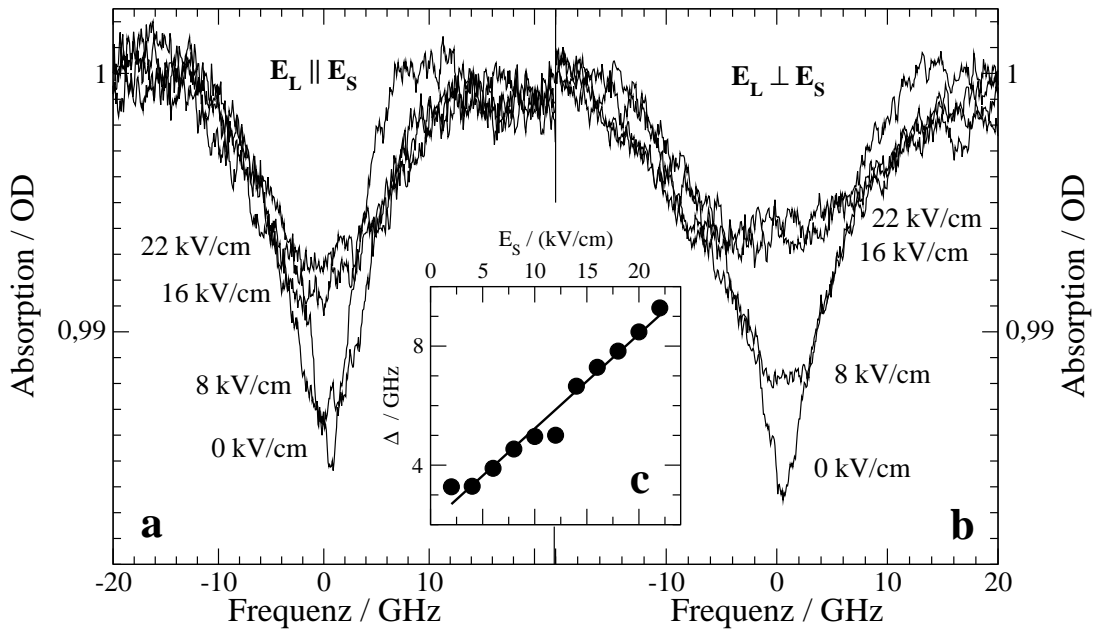


Abbildung 4.16: Spektrale Löcher unter dem Einfluß eines statischen elektrischen Feldes \vec{E}_S bei tiefen Temperaturen von 2 K. BPTI in einem Glycerin-Wasser Glas mit einem bei Raumtemperatur gemessenen pH-Wert von 8.0. (a) Parallele Anordnung von Laser-Feld \vec{E}_L und Stark-Feld \vec{E}_S bei 35045 cm^{-1} . (b) Senkrechte Anordnung von Laser-Feld \vec{E}_L und Stark-Feld \vec{E}_S bei 35050 cm^{-1} . (c) Die Aufspaltung Δ der spektralen Löcher als Funktion des Stark-Feldes \vec{E}_S . Im Falle von BPTI war es leider nicht möglich, die Verbreiterung σ zu bestimmen.

ten des angeregten Tyrosins in BPTI beschreiben: Die Aufspaltung Δ wird wieder für die senkrechte Polarisationsanordnung $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ beobachtet und verhält sich linear bezüglich des Starkfeldes \vec{E}_S (siehe Abb. 4.16 (c)). Verglichen mit freiem Tyrosin in Lösung (siehe Abb. 4.12 (c)) ist die Aufspaltung Δ in BPTI um 40% geringer. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß der Winkel θ zwischen $\Delta\vec{\mu}_0$ und dem Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ für Tyrosin in Lösung und in BPTI in derselben Größenordnung von etwa 70° liegt.

Eingeschränkter Bereich für spektrales Lochbrennen

Für Phenol, dem eigentlichen Chromophor des Tyrosins, liegt der $\pi\sigma^*$ -Zustand dem $\pi\pi^*$ - S_1 -Zustand relativ nahe und wird durch ein sehr großes Dipolmoment charakterisiert. Die Tyrosinmoleküle in der langwelligen Region des Absorptionsspektrums von BPTI gehen eine starke Wechselwirkung mit ihrer Umgebung ein, da sie bezüglich des freien Tyrosins in Lösung eine erhebliche bathochrome Verschiebung aufweisen (siehe Abb. 4.15). Diese Wechselwirkung verursacht eine Mischung der niedrigsten Zustände $\pi\sigma^*$ und $\pi\pi^*$ und wird beispielsweise durch strukturelle Einschränkungen (Abweichung von der Planarität) hervorgerufen, die infolgedessen zu einer starken Polarität des angeregten Zustandes führen. So-

mit ergibt sich eine starke Ankopplung an niederfrequente Schwingungen, die für eine Intensitäts-Unterdrückung der Nullphononen-Linie sorgen und spektrales Lochbrennen verhindert. Die experimentelle Beobachtung, daß nur innerhalb eines Bereichs von 34600 und 35700 cm^{-1} Löcher gebrannt werden konnten, läßt sich mit obigen Gedanken vereinbaren. Der wahrscheinlichste Kandidat der vier Tyrosin-Residuen des BPTI-Proteins für das Lochbrennen ist das in dieser spektralen Region liegende Tyr10 (87), daß die größte Bewegungsfreiheit der vier aromatischen Aminosäuren Tyrosin genießt (68) (siehe Abb. 4.19). Aus diesem Grunde sind die spektralen Eigenschaften von Tyr10 in BPTI denen des freien Tyrosins in Lösung ähnlich.

Dipolmomente und pH-Effekt

Vergleicht man freies Tyrosin in Lösung mit Tyrosin in BPTI bezüglich ihres elektrostatischen Verhaltens, lassen sich einige bemerkenswerten Eigenschaften festhalten:

1. $\Delta\mu_0$ des freien Tyrosins ist nahezu pH-unabhängig;
2. $\Delta\mu_i$ von Tyrosin ist um den Faktor 5 größer als für Phenylalanin;
3. $\Delta\mu_i$ im freien Tyrosin ist im starken Maße vom pH-Wert abhängig;
4. $\Delta\mu_0$ des spektral angeregten Tyrosins in BPTI ist signifikant kleiner als für freies Tyrosin.

Der Starkeffekt an BPTI resultierte in einer signifikanten Abnahme der permanenten Dipolmoment-Differenz $\Delta\mu_0$ im Vergleich zu freiem Tyrosin in Lösung. Da mehr als die Hälfte der Moleküloberfläche von Tyr10 dem umgebenden Lösungsmittel Wasser-Glycerin ausgesetzt ist, läßt sich die Abnahme von $\Delta\mu_0$ sicher nicht ausschließlich durch die Änderung des Lorentz-Faktors f innerhalb des Proteins erklären. Außerdem ist es unrealistisch, kleinere f -Werte in Proteinen anzunehmen. Eine mögliche Erklärung bestünde jedoch in der Annahme eines wohl definierten protein-internen elektrischen Feldes, daß ein entsprechendes Dipolmoment induziert und sodann mit $\Delta\mu_0$ in Wechselwirkung tritt. Bemerkenswerter Weise wird die Orientierung des totalen Dipolmomentes im Molekülkoordinatensystem von Tyrosin nicht verändert. Der Winkel θ zwischen dem Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ und $\Delta\vec{\mu}$, der mit Hilfe des Auswerteprogramms berechnet wurde, lag stabil in der Gegend von 70° (vergleiche dazu auch die Winkel des freien Tyrosins in Tabelle 4.5). Als Schlußfolgerung ergibt sich eine entgegengesetzte Orientierung des internen Feldes gegenüber der Richtung von $\Delta\vec{\mu}_0$, daß beispielsweise durch benachbarte Aminosäure-Residuen oder durch die Hydrathülle am Ort des Tyr10 erzeugt wird. Um die Größenordnung des induzierten Dipolmomentes abzuschätzen, wird die Annahme eines konstanten f -Faktors vorausgesetzt: $f \cdot \mu_i \simeq 0.6 \cdot \mu_0 = 1.1$ D. Leider ist die Ermittlung der statistischen Komponente des pseudolinearen Starkeffekts aufgrund des niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses derzeit noch nicht

gegeben.

Kurze Zusammenfassung

Die aromatische Aminosäure Tyrosin kann prinzipiell als intrinsische Sonde für Starkeffekt-Messungen an Proteinen dienen, wie in dieser Arbeit an dem kleinen BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) demonstriert wurde (86). Obwohl die Spektren sehr verrauscht waren, konnte eine Auswertung erfolgen. Während die $f \cdot \Delta\mu$ -Werte signifikant im Vergleich mit den Messungen an freiem Tyrosin in Lösung abnahmen, änderte sich die auf das Molekülkoordinatensystem bezogene relative Orientierung jedoch nicht. Die Gründe für das niedrige Signal-zu-Rausch-Verhältnis liegen auf der Hand: Nur ein geringer Prozentsatz von etwa 2% der Absorption konnten zum Lochbrennen genutzt werden. Die spektralen Löcher in BPTI werden dem Tyrosin-Residuum mit dem größten Bewegungsspielraum Tyr10 zugeordnet. Zusätzlich zu den Tyrosin-Molekülen tragen in dieser spektralen Region noch die drei Disulfidbrücken zur Gesamtabsorption bei und sorgen für einen beachtlichen, für das Lochbrennen unnützlichen, spektralen Hintergrund. In Zukunft lassen sich auf diese Weise elektrostatische Berechnungen experimentell überprüfen.

4.7.3 Druckeffekt

In Abb. 4.17 (a) ist das druckabhängige Verhalten spektraler Löcher für freies Tyrosin zu sehen, dessen Druckverschiebung stets zu niedrigen Frequenzen erfolgt und ein perfekt lineares Verhalten aufweist (Abb. 4.17 (b)). Trägt man die Druckverschiebung ($s_p/\Delta p$) als Funktion der Brennwellenzahl auf, die sich innerhalb der inhomogen verbreiterten langwelligen Absorptionsbande befindet, ergibt sich wiederum eine streng lineare Abhängigkeit (siehe Abb. 4.17 (c)). Die entsprechenden spektralen Löcher sowie ihre Druckabhängigkeiten sind für das Protein BPTI in Abb. 4.18 dargestellt. Hierbei ist die Tatsache bemerkenswert, daß für die Löcher keine Aufspaltung unter Druckanwendung beobachtet wurde. Da vier Tyrosin-Residuen mit unterschiedlichen lokalen Umgebungen innerhalb des Proteins existieren, würde das gleichzeitige Brennen mehrerer dieser Residuen bei Druckanwendung zu unterschiedlichen Verschiebungen führen, die in den Lochspektren in der Regel durch eine Aufspaltung angezeigt würden (19). Diese Beobachtung stellt sicher, daß nur ein einziges der vier möglichen Tyrosinmoleküle durch den Lochbrennprozeß ausgewählt wurde. Ein interessantes Ergebnis der Druckeffekt-Experimente von Tyrosin und BPTI sind die ähnlichen Werte für Vakuumwellenzahl ν_{vac} und die Steigung der Geraden in Abb. 4.17 (c) und 4.18 (c).

Diskussion und Interpretation der Ergebnisse des Druckeffekts

Es ist überraschend, daß die Ergebnisse der Druckeffekt-Messungen für Tyrosin in freier Lösung bzw. innerhalb des Proteins sich in einem derartig schmalen Rahmen bewegen. Beispielsweise ergaben sich bei Untersuchungen der Kompressibilitäten von Häm-Proteinen ziemlich große Fluktuationen, die in hohem Maße vom strukturellen Zustand des beobachteten Proteins abhängig waren (19). Die ähnlichen Werte für die Vakuumwellenlänge ν_{vac} beider Systeme im vorliegenden Experiment läßt sich mit der strukturellen Ähnlichkeit des angeregten Tyrosin-Residuums in BPTI und des freien, in Lösung befindlichen Tyrosins, begründen (siehe Abb. 4.17 (c) und 4.18 (c)). Wie bereits bei den Starkeffekt-Experimenten ist auch hier Tyr10 der wahrscheinlichste Kandidat der vier Tyrosin-Moleküle in BPTI: Tyr10 ist mit 50% seiner Moleküloberfläche am intensivsten dem umgebenden Lösungsmittel ausgesetzt und besitzt zudem genügend Bewegungsspielraum in seiner lokalen Proteinumgebung (siehe Abb. 4.19). Dies ist auch experimentell gut ersichtlich, da es in der gleichen spektralen Region absorbiert wie die freie Aminosäure.

Die Gleichheit der beiden Kompressibilitäten ist nicht sofort leicht und klar ersichtlich und erfordert einige Vorüberlegungen. Werden die Ergebnisse des Druckeffekts mit $n = 6$ (siehe Kapitel 2.3) ermittelt, erreicht die Kompressibilität für BPTI einen Wert von 0.06 GPa^{-1} und stimmt grundsätzlich gut mit experimentellen Ergebnissen aus Ultraschallmessungen durch K. Gekko und Y. Hasegawa (88) und theoretischen Berechnungen von V. M. Dadarlat und C. B. Post (89)

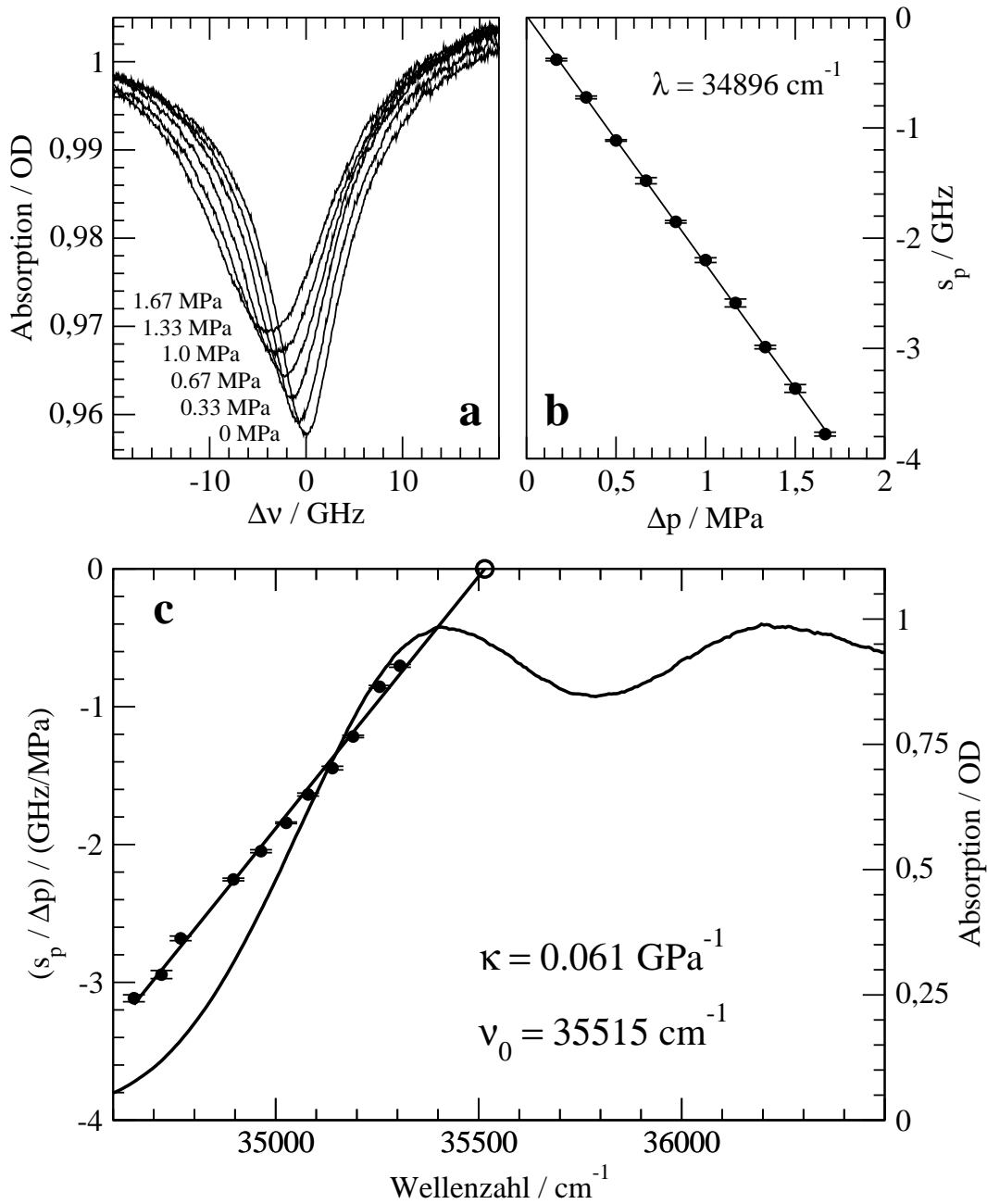


Abbildung 4.17: (a) Druckabhängiges Verhalten spektraler Löcher von Tyrosin in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K. (b) Lineare Druckverschiebung exemplarisch für 34896 cm^{-1} . (c) Druckverschiebung als Funktion der Brennwellenzahl mit Angabe der Kompressibilität κ und der Vakuumwellenzahl ν_{vac} . Der entsprechende Bereich des Absorptionsspektrums von Tyrosin ist hinterlegt.

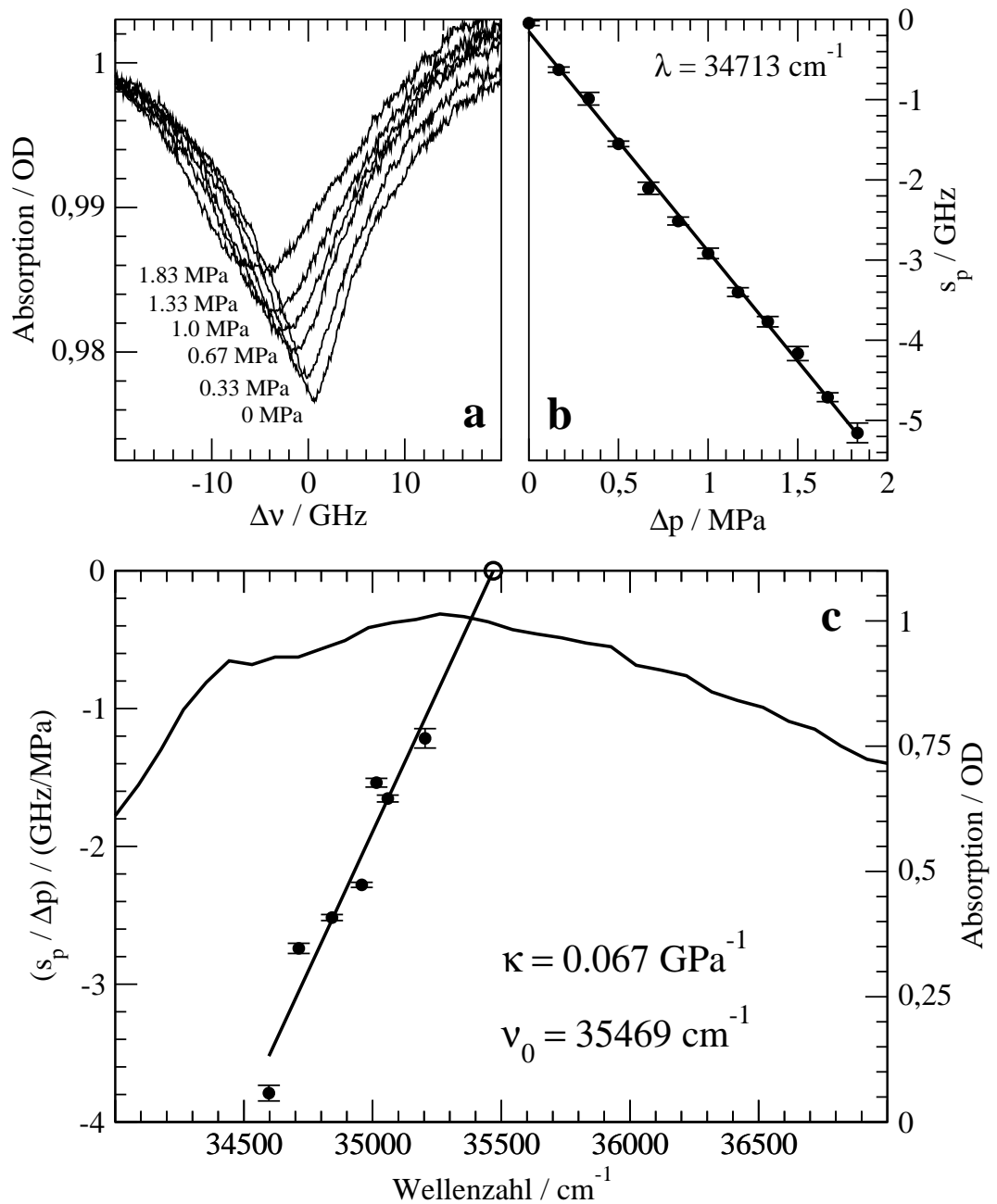


Abbildung 4.18: (a) Druckabhängiges Verhalten spektraler Löcher von BPTI in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K. (b) Lineare Druckverschiebung exemplarisch für 34713 cm^{-1} . (c) Druckverschiebung als Funktion der Brennwellenzahl mit Angabe der Kompressibilität κ und der Vakuumwellenzahl ν_{vac} . Der entsprechende Bereich des Absorptionsspektrums von BPTI ist hinterlegt.

überein. Andererseits jedoch wird mittels Lochbrennspektroskopie für freies Tyrosin in Wasser-Glycerin dieselbe Kompressibilität gemessen. Der naheliegende Schluß, Protein und Umgebung hätten gleiche κ -Werte, erscheint zwar prinzipiell möglich, ist eine jedoch eher unbefriedigende Erklärung. Die Tatsache, daß nicht nur die Werte für κ , sondern auch für ν_{vac} übereinstimmen, kann ebenso durch die gleiche lokale Umgebung beider Proben begründet werden. In der Tat, wie bereits zuvor erwähnt, sind fast 50% des aromatischen Ringsystems von Tyr10 dem Lösungsmittel ausgesetzt und bestehen größtenteils aus Wassermolekülen der umgebenden Hydrathülle. Die polare OH-Gruppe zeigt direkt in diese Hydrathülle und polarisiert die benachbarten Wassermoleküle. Die entsprechende Wechselwirkung vom Typ Dipol \leftrightarrow induzierter Dipol unterstützt den Exponenten $n = 6$ in der Gleichung 2.29.

Elektrostatische Wechselwirkungen können sowohl bathochrome als auch hypsochrome Verschiebungen der Spektren verursachen, je nachdem, ob das Dipolmoment im angeregten Zustand die Wechselwirkung des Grundzustandes stärkt oder schwächt. Die Dispersions-Wechselwirkung sorgt stets aufgrund der höheren Polarisierbarkeit im angeregten Zustand für eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen, so daß die beiden Wechselwirkungen sich gegenseitig kompensieren können und eine verschwindende Lösungsmittelverschiebung hervorrufen. Daß eine derartige Situation auf Tyrosin in einem Wasser-Glycerin Glas zutrifft, ist aus Abb. 4.17 (c) offensichtlich zu entnehmen: Die Wellenzahl ν_{vac} , bei der keine Druckverschiebung zu beobachten ist (35515 cm^{-1}), liegt innerhalb der inhomogenen Bande in der Nähe des Absorptionsmaximums ν_0 . Daraus läßt sich für die mittlere Lösungsmittelverschiebung, die sich beispielsweise aus der Differenz von ν_{vac} und ν_0 berechnen läßt, ein relativ kleiner Wert von etwas mehr als 100 cm^{-1} ermitteln.

Mit den Druckeffekt-Experimenten mittels spektralen Lochbrennens können lokale Kompressibilitäten vermessen werden. Beispielsweise lassen sich mit dieser Methode die Kompressibilitäten *der* Volumina um das zur spektralen Detektion verwendeten Farbstoffmoleküls bestimmen, dessen mittlere Reichweite durch die Wechselwirkung zwischen Sonde und Lösungsmittel zustande kommt. Ein großer Teil dieses Volumens befindet sich für das Tyrosinmolekül in BPTI innerhalb der Hydrathülle und besteht infolgedessen aus Wassermolekülen. Konsequenterweise müssen gleiche Überlegungen auch für freies Tyrosin in einem Wasser-Glycerin Glas gelten, gesetzt den Fall, die entsprechende Mikro-Umgebung wäre nahezu von gleicher Zusammensetzung, wie man auch aus den sehr ähnlichen Werten für κ und ν_{vac} schließen kann. Tyrosin müßte demzufolge offensichtlich eine Mikro-Phasentrennung in dem Sinne verursachen, daß Wassermoleküle der Wasser-Glycerin Lösung eine Art geordneten Lösungsmittelkäfig um die Tyrosinsonde aufbauen, dessen niedrigere Entropie durch die Bildung stärkerer Wasserstoff-Brücken kompensiert wird. Ist die Stärke der Wasserstoff-Brückenbindungen verglichen mit den van-der-Waals-Wechselwirkungen groß, dürften sie durch Drücke in der Größenordnung von 1 MPa, wie in dieser Arbeit verwendet, kaum beein-

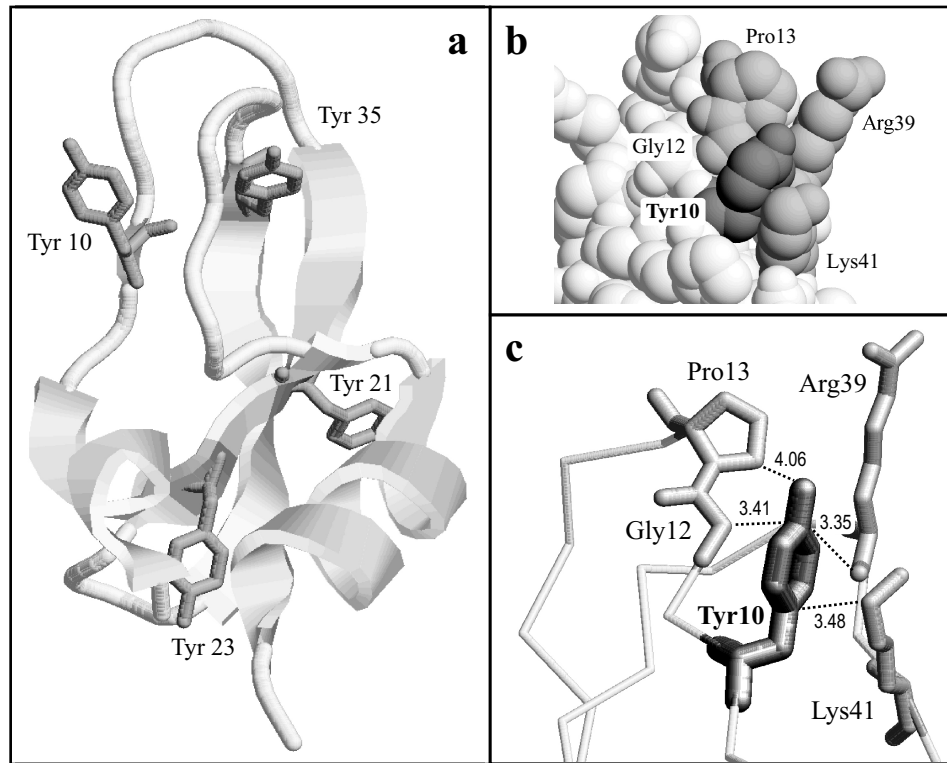


Abbildung 4.19: Räumliche Darstellung des Proteins BPTI aus der Röntgenstruktur 1BPI (PDB-Code) (68) mit RasMol gezeichnet (a). In (b) und (c) sind Details der Umgebung von Tyr10 gezeigt. Die Abstände sind in Å angegeben.

flußt werden. Dieses Argument dürfte die niedrige Kompressibilität κ im Vergleich zu anderen Systemen erklären, die mit der gleichen Technik erhalten wurden (90).

Um die Volumenfluktuationen $\Delta V/V = (k_B \kappa T/V)^{1/2}$ abschätzen zu können, muß das totale Volumen V bekannt sein. Im BPTI-Experiment wird das entsprechende Volumen durch den Wechselwirkungsradius zwischen Sonde und Umgebung bestimmt. Liegt dieses Volumen innerhalb des Proteins und stellt die optisch ermittelte Kompressibilität ein realistisches Mittelmaß für das gesamte Protein dar, können die Volumenfluktuationen mit dem Wissen der entsprechenden Dimensionen berechnet werden. Da im Falle des UV-Lochbrenn-Experimentes an BPTI nur ein lokales Volumen in der Hydrathülle um die entsprechende Tyrosinsonde betrachtet wurde, ist eine Bestimmung der Volumenfluktuationen des gesamten Proteins nicht möglich. Allerdings kann die Dimension des Wechselwirkungsvolumens abgeschätzt werden. Aus Abb. 4.19 wird ein mittlerer Abstand zwischen Sonde und Protein von 3.5 Å angenommen, eine obere Grenze der linearen Ausdehnung des Wechselwirkungsvolumens, der zu einer Berechnung der Volumenfluktuationen von 3% führt. Hierbei muß jedoch angemerkt werden, daß die relevanten Volumenfluktuationen auf eine Temperatur von 200 K, dem

Glasübergangspunkt von Wasser-Glycerin, bezogen wurden, wo diese Fluktuationen eingefroren werden. Der relativ große Wert der Volumenfluktuationen kommt durch das entsprechend kleine betrachtete Volumen zustande.

Kurze Zusammenfassung

Spektrales Lochbrennen an Proteinen mit einer aromatischen Aminosäure als intrinsische Sonde kann für Druckeffekt-Messungen verwendet werden (91). Am Beispiel des kleinen Proteins BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) konnte die lokale Kompressibilität um das aktive Tyrosinmolekül an Position 10 der Polypeptidkette gemessen werden. Der entsprechende Wert für κ ist relativ klein und dem der freien Aminosäure in Wasser-Glycerin ähnlich. Dieses Verhalten spricht für einen durch starke Wasserstoff-Brücken gebildeten Lösungsmittelkäfig aus Wassermolekülen rund um das Sondenmolekül.

4.8 Zusammenfassung

Am Ende dieses Kapitel sollen die wichtigsten Resultate nochmals in knapper und übersichtlicher Form aufgeführt werden.

1. pH und tiefe Temperaturen

- **Titration von Phenylalanin und Tyrosin:** Die guten Löslichkeits-eigenschaften von Phenylalanin im neutralen pH-Bereich erlauben eine saure sowie eine basische Titration zur Bestimmung der beiden pK-Werte. Für Tyrosin wird jedoch 1 M HCl zum Auflösen benötigt, sodaß ausgehend von einer sauren Stammlösung nur eine basische Titration verbleibt. Desweiteren wird die Interpretation der Titrationsmessung an Tyrosin durch die Tatsache erschwert, daß der Anteil an geladenen Aminosäuren bezüglich der Gesamtladungsträgerzahl zu niedrig ist.
- **Glycerin:** Die Definition des pH-Werts ist streng genommen nur für verdünnte wässrige Lösungen gültig. Für die Lochbrenn-Experimente wurde jedoch stets eine Wasser-Glycerin-Mischung verwendet. Die Titrationsexperimente an Phenylalanin und Tyrosin zeigen nur eine leichte Verschiebung des pK_{S2}-Werts in den basischen Bereich. Dies wird durch die Eigenschaft des Glycerins, als schwache dreiprotonige Säure zu wirken, verursacht.
- **Tiefe Temperaturen:** Das Verhalten des pH-Wertes für eine Wasser-Glycerin Mischung bei einer Temperatur von wenigen Kelvin konnte durch den pH-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff *Fluorescein* untersucht werden. Im Vergleich zur Raumtemperatur wurde für 4 K eine Verschiebung des pH-Wertes von 1.5 Stufen in den sauren Bereich ermittelt.

2. Phenylalanin

- Phenylalanin besitzt kein merkliches permanentes Dipolmoment und zeigt aus diesem Grunde nur einen pseudolinearen Starkeffekt. Offensichtlich stört der Substituent $-\text{CH}_2 - \text{C}_\alpha\text{H} - \text{COOH} - \text{NH}_2$ das π -Elektronensystem des aromatischen Systems nicht signifikant.
- pH-Änderungen bewirken Umladungsprozesse der Carboxyl- bzw. Aminogruppe der Aminosäure. Die Ladungsänderungen in der Kopfgruppe von Phenylalanin beeinflussen das nahezu inversionssymmetrische π -Elektronensystem des aromatischen Rings jedoch kaum.
- Aus der schwachen pH-Abhängigkeit der Meßergebnisse von Phenylalanin läßt sich der Übergang von der Zwitterionenform in die neutrale Form ersehen.
- Die Pseudo-Inversionssymmetrie von Phenylalanin macht diese Aminosäure zu einer Sonde für lokale elektrische Felder.

3. Tyrosin

- Im Tyrosinat-Ion (deprotonierte Hydroxylgruppe des Phenolchromophors) ist das Erzeugen spektraler Löcher unmöglich. Die Erkenntnis der Verschiebung des pK_{S3} -Wertes von etwa 10 im elektronischen Grundzustand auf etwa 4 im angeregten Zustand (67) deutet auf einen photochemischen Lochbrennprozeß über die Hydroxylgruppe hin.
- Die Existenz eines permanenten Dipolmoments in Tyrosin ergibt sich aus der Beobachtung eines linearen und pseudolinearen Starkeffekts. Im Vergleich zu Phenylalanin besitzt Tyrosin einen fünffach höheren Wert für die induzierte Dipolmoment-Differenz.
- Theoretische Studien zu verschiedenen Tyrosin-Wasser-Komplexen erlauben eine Interpretation der Starkeffekt-Messungen sowie seiner pH-Abhängigkeit durch die Wechselwirkung von Tyrosin mit *einem* Wassermolekül.

4. Tryptophan

Für Tryptophan in einer Wasser-Glycerin Mischung war spektrales Lochbrennen unmöglich. Aufgrund der Polarität des verwendeten Lösungsmittels wird eine Absenkung des 1L_a -Zustandes erreicht und führt zu einer Überlappung mit dem 1L_b -Zustand. Der nun spektral über den 1L_b -Übergang dominierende 1L_a -Übergang bewirkt durch ein hohes Dipolmoment im angeregten Zustand von 6 D (67) im vorliegenden Fall eine Erhöhung der Elektron-Phonon-Kopplung und verhindert somit spektrales Lochbrennen.

5. BPTI

- Die aromatische Aminosäure Tyrosin konnte in BPTI als intrinsische Sonde für Stark- und Druckeffekt-Experimente genutzt werden. Die Erzeugung spektraler Löcher war auf einen Bereich von 34600 bis 35700 cm^{-1} beschränkt.
- Durch Vergleiche mit den Starkeffekt-Experimenten des freien Tyrosins wird für die Tyrosinsonde in BPTI ein schwächerer Starkeffekt beobachtet. Der Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment und der permanenten Dipolmoment-Differenz bewegt sich für beide Fälle im gleichen Rahmen. Als Schlußfolgerung ergibt sich eine entgegengesetzte Orientierung des internen Feldes bezüglich der Richtung der permanenten Dipolmoment-Differenz $\Delta\vec{\mu}_0$, das beispielsweise durch benachbarte Aminosäure-Residuen oder von einer Hydrathülle am Ort des Sondenmoleküls erzeugt wird.
- Mit Tyrosin als Sondenmolekül konnte für das kleine Protein BPTI die lokale Kompressibilität κ bestimmt werden. Der entsprechende Wert

ist relativ klein und mit freiem Tyrosin vergleichbar. Dieses Verhalten spricht für die Bildung eines durch starke H-Brücken stabilisierten Lösungsmittelkäfigs aus Wassermolekülen rund um das Sondenmolekül.

Ausblick

Um Tryptophan vielleicht doch für Lochbrenn-Experimente zu gewinnen, wären Versuche mit weniger polaren Lösungsmitteln denkbar. Die Anwendung von Tyrosin als intrinsische Sonde läßt sich sicherlich auch auf andere kleine Proteine, wie z.B. Insulin übertragen. Die Verwendung von BPTI-Mutanten und Denaturierungsstudien sind weitere interessante Fragestellungen. Ein Hauptproblem für die Zukunft besteht jedoch in der experimentellen Überprüfung theoretischer Berechnungen elektrostatischer Felder und lokaler Kompressibilitäten mit Hilfe hochauflösender spektroskopischer Methoden wie z.B. des spektralen Lochbrennens, um zur Interpretation relevanter Fragestellungen beizutragen.

Kapitel 5

Farbstoff-DNA-Komplexe

Ein zweiter Schwerpunkt in dieser Arbeit ist ausgewählten Oligonucleotiden gewidmet, die durch kovalente Verknüpfung mit einem speziellen Sondenmolekül für spektroskopische Experimente im sichtbaren Spektralbereich zur Verfügung standen. Mit Hilfe der Methode des Stark- und Druckeffekts spektraler Löcher konnten somit detaillierte Kenntnisse aus den Wechselwirkungen zwischen Chromophor, den unterschiedlichen DNA-Molekülen und ihrer gemeinsamen Glasumgebung gewonnen werden. Ein einführender Abschnitt befaßt sich zunächst mit Aufbau und Funktion der *Desoxyribonucleinsäure* DNA, gefolgt von einer näheren Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide und deren strukturellen und spektralen Eigenschaften. Nach Vorstellung und Diskussion der Meßergebnisse aus den Stark- und Druckeffekt-Experimenten wird das Kapitel über Farbstoff-DNA-Komplexe sodann durch eine kurze Zusammenfassung abgeschlossen.

5.1 Einleitung

5.1.1 Aufbau und Struktur der DNA

Purin- und Pyrimidinbasen

Schon bei den ersten Versuchen zur Charakterisierung der Nucleinsäuren wurde ein sich stetig wiederholendes Grundelement in dem kettenförmigen Makromolekül festgestellt, daß sich aus einer stickstoffhaltigen organischen Base, einer Pentose sowie einem Phosphorsäuremolekül zusammensetzt. In Abb. 5.1 sind die vier verschiedenen *Basen der DNA* gezeigt: (a) die beiden Purin-Derivate *Adenin* (A) und *Guanin* (G) sowie (b) die beiden Pyrimidin-Derivate *Cytosin* (C) und *Thymin* (T). Die Kohlenstoff- bzw. Stickstoffatome des Ringsystems werden fortlaufend durchnummeriert. Diese stickstoffhaltigen Basen besitzen einen ausgesprochen aromatischen Charakter und absorbieren Licht zwischen 260 und 280 nm. Anhand von Röntgenbeugungsdaten erhält man für die Pyrimidine eine absolut planare dreidimensionale Struktur, während die Purine leicht nichtplanar vorliegen.

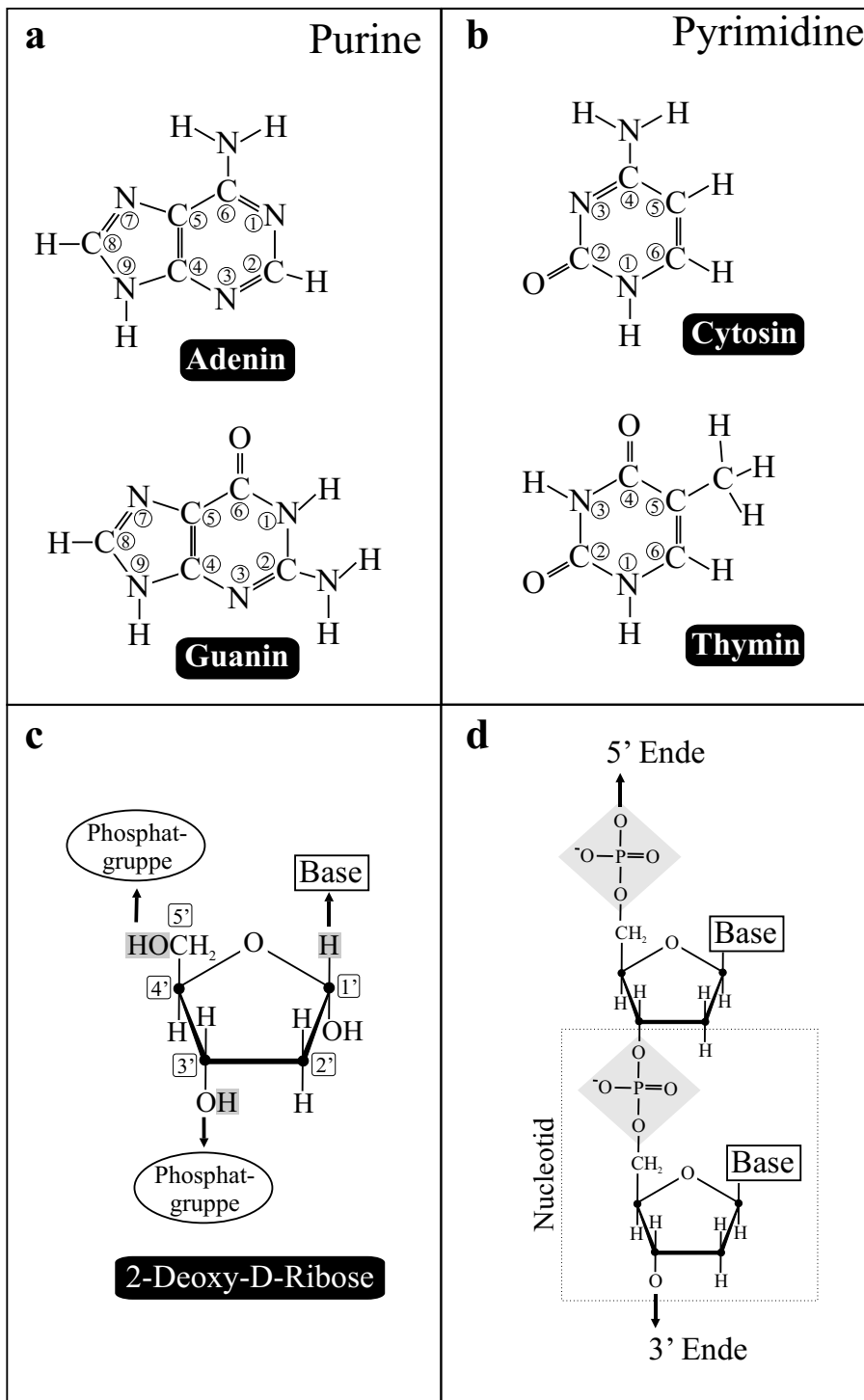


Abbildung 5.1: (a) Struktur der Purin-Basen Adenin und Guanin. (b) Struktur der Pyrimidin-Derivate Cytosin und Thymin. (c) Die Pentose 2-Deoxy-D-Ribose als zentrales Bauelement der DNA. (d) Aufbau der Nucleinsäure aus der Verknüpfung einzelner Nucleotide durch die Phosphodiesterbrücke.

Nucleosid, Nucleotid und Nucleinsäure

In Abb. 5.1 (c) ist das zentrale Strukturelement, ein aus fünf Kohlenstoffatomen bestehendes Zuckermolekül (Pentose) dargestellt. Die Ringatome der als *2-Deoxy-D-Ribose* bezeichneten Pentose werden hier im Unterschied zu den Basen mit gestrichelten Ziffern durchnummeriert. Durch die Verknüpfung der Pentose mit einer Base durch eine β -N-Glykosidbindung wird ein sogenanntes *Nucleosid* gebildet, daß durch Verknüpfung der Position 1' des Zuckers mit den Stickstoffatomen an Position 9 der Purine Adenin und Guanin bzw. an Position 1 der Pyrimidine Cytosin und Thymin geschieht. Wird dieses Nucleosid nun zusätzlich an der Position 5' des Zuckergerüsts mit einer Phosphatgruppe verestert, entsteht die Monomereinheit der Nucleinsäure, daß sogenannte *Nucleotid*.

Die aromatischen Basen verleihen den Nucleotiden die Fähigkeit, Licht im ultravioletten Spektralbereich zwischen 250 und 280 nm zu absorbieren. Mit Extinktionskoeffizienten je nach Base von etwa 9000 bis 16000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (92) sind sie hervorragend zur quantitativen Analyse geeignet. Auf der anderen Seite jedoch führen diese spektralen Eigenschaften auch zu chemischen Zerstörungseffekten und können Hautkrebs auslösen. Die Evolution entwickelte jedoch Abwehrstrategien, um der gefährlichen UV-Strahlung Herr zu werden. Ein bislang noch unverstandener Mechanismus sorgt für eine Erniedrigung der Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-Quantenausbeute über einen effektiven Quenchingprozeß durch interne Konversion in den Grundzustand (93; 94). Bereits geschädigte DNA-Basen werden mittels molekularer Erkennungsprozesse ausfindig gemacht, herausgeschnitten und durch intakte Moleküle ersetzt (95).

Nucleotide werden durch die *Phosphodiester-Brücke* miteinander verknüpft, indem eine kovalente Bindung zwischen der 3' bzw. 5'-Hydroxyl-Gruppe der beiden beteiligten Nucleotide zustande kommt (siehe Abb. 5.1 (d)). Das dabei entstehende Rückgrat des Biopolymers wird alternierend aus Phosphat- und Pentose-Gruppen gebildet, deren Zusammenhalt auf den Phosphodiesterbrücken beruht. Die Purin- und Pyrimidenbasen der Nucleotide sind nicht am Aufbau des Rückgrats beteiligt und stellen ähnlich wie die Aminosäuren-Reste in Proteinen die Seitengruppen dar. Auch die Abfolge dieser Seitengruppen wird wie schon bei den Proteinen als *Primärstruktur* bezeichnet und erfolgt stets vom 5' zum 3'-Ende.

Konformation der Nucleinsäuren

Wasserstoffbrücken-Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen einzelnen Gliedern des DNA-Moleküls führen zu einer genau definierten räumlichen Struktur. Die zusätzliche Kenntnis der konstanten Basenverhältnisse zwischen Adenin und Thymin einerseits sowie Guanin und Cytosin andererseits und der Röntgenstrukturanalyse führte J. D. Watson und F. H. C. Crick zu ihrer historischen Annahme der dreidimensionalen Struktur der Desoxyribonucleinsäure. Zwei

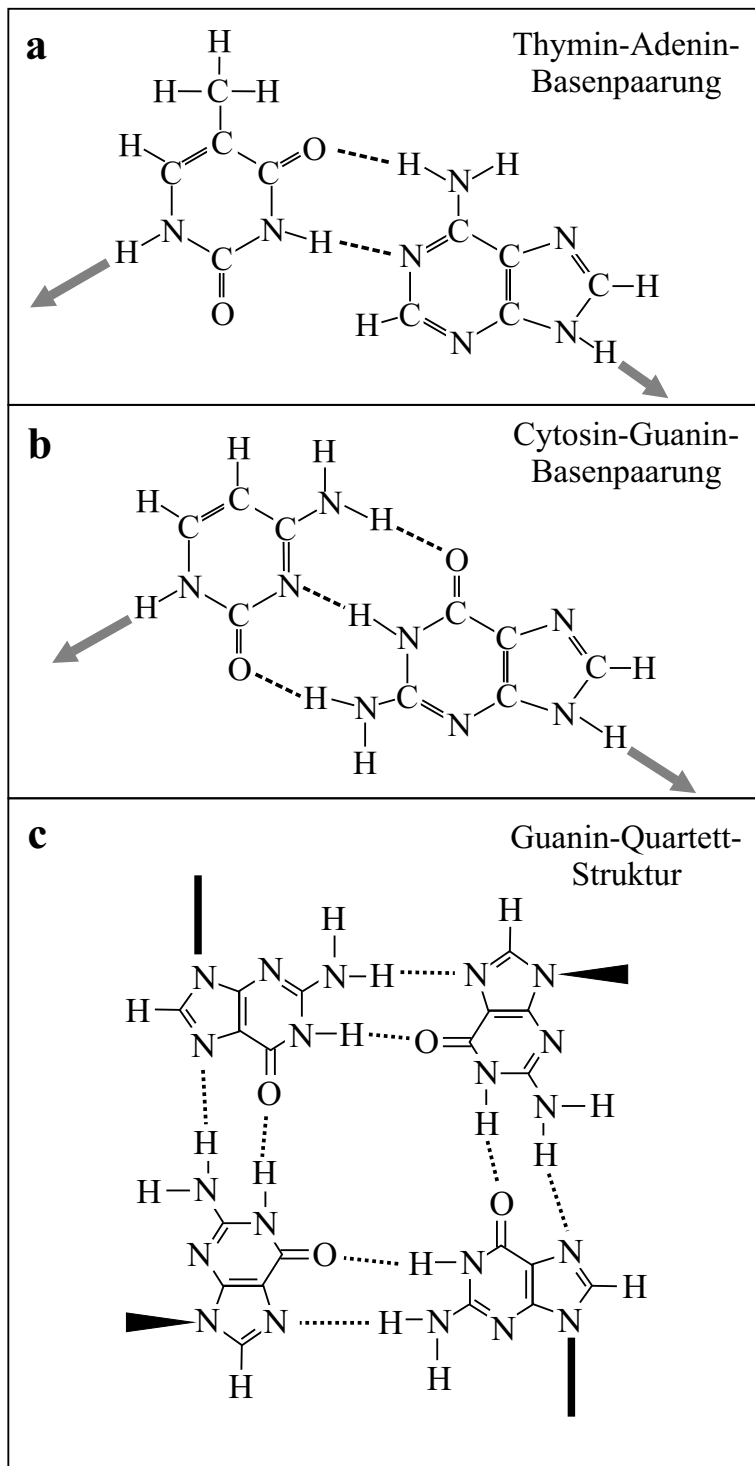


Abbildung 5.2: (a) Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Thymin und Adenin. (b) Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Cytosin und Guanin. (c) Bildung der Guanin-Quartett-Struktur durch Hoogsteen-Basenpaarung zwischen Guanin-Basen.

Nucleotidstränge bilden einen gemeinsamen Doppelstrang, wobei sich die durch die Phosphodiesterbrücken verknüpften hydrophilen Zuckerreste an der Außenseite befinden, während die hydrophoben Purin- und Pyrimidinbasen nach innen zeigen und sich gegenseitig durch Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisieren. In Abb. 5.2 sind die beiden Basenpaarungen zwischen (a) Thymin und Adenin (mit zwei Wasserstoff-Brücken) sowie (b) Cytosin und Guanin (mit drei Wasserstoff-Brücken) gezeigt. Diese Basenpaarung, die obligat eingehalten werden muß, hat zur Folge, daß die Primärstruktur des einen Strangs die des anderen vollständig bestimmt oder zu ihr *komplementär* ist. Zudem verlaufen die beiden Stränge zueinander *antiparallel*, d.h. die Nucleotid-Sequenz erfolgt in einem Strang in umgekehrter Richtung. Wasserstoffbrücken-Bindungen sowie Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Basen ergeben eine Verdrillung des Doppelstranges. Dadurch entsteht die bekannte dreidimensionale Struktur einer *Doppelhelix* mit einem Durchmesser von 2 nm. Pro Umdrehung finden sich 10 Basenpaare, die eine Ganghöhe von 3.4 nm erzeugen.

5.1.2 Telomere und Krebsforschung

Die Replikation, d.h. die Verdopplung des genetischen Erbgutes bei der Zellteilung, ist ein äußerst komplexer Vorgang auf molekularer Ebene, bei der eine große Vielfalt an Biomolekülen zugegen ist. Bei der Zellteilung wird zunächst die DNA im Zellkern komplett kopiert, anschließend schnürt sich die Zelle ein und es entstehen zwei neue eigenständige Zellen. Die gesamte Erbinformation einer Zelle liegt etwa nicht als ein einziges lineares Riesenmolekül vor, sondern ist auf mehrere Moleküle aufgeteilt: Den sogenannten *Chromosomen*. Dort ist die DNA durch Wechselwirkung mit Proteinkomplexen, den *Histonen*, in effizienter Weise dicht gepackt. Wenn nun eine Verdopplung des Erbguts vorgenommen werden soll, müssen zunächst Moleküle dafür Sorge tragen, das 3'-Ende zu finden und die Doppelhelix durch das Brechen der Basenpaarungen zu entdrillen. Die beiden nun entstandenen Einzelstränge werden nun einfach durch einen Proteinkomplex, der *DNA-Polymerase III*, wieder durch die Ergänzung von Komplementärsträngen vervollständigt. Die DNA-Polymerase III kann allerdings ihre Aufgabe nur am 3'-Ende einer linearen DNA-Kette beginnen. Für den Einzelstrang mit dem 3'-Ende des aufgezwickelten DNA-Moleküls erfolgt die Erzeugung des Komplementärstranges problemlos in $3' \mapsto 5'$ Richtung. Auf der gegenüberliegenden Seite müssen jedoch von Zeit zu Zeit sogenannte *RNA-Primer* als Initiierungspunkte gesetzt werden, die der DNA-Polymerase III als Startpunkt für den Kopiermechanismus dienen. Hierbei erfolgt die Erzeugung des Komplementärstranges allerdings in der entgegengesetzten Richtung ($5' \mapsto 3'$).

Dieser Replikationsprozeß arbeitet sich wie bei einem Reißverschluß nun in $3' \mapsto 5'$ Richtung fort. Während auf der einen Seite kontinuierlich der DNA-Einzelstrang ergänzt wird, werden auf der gegenüberliegenden Seite stets RNA-Primer ge-

Organismus	Sequenz
Tetrahymena thermophila (Bakterium)	TTGGGG
Oxytricha nova (Einzeller)	TTTTGGGG
Arabidopsis thaliana (Pflanze)	TTAGGG
Bombyx mori (Seidenraupe)	TTAGG
Mensch	TTAGGG

Tabelle 5.1: Typische telomere Sequenzen verschiedener Organismen (99).

setzt und der Abschnitt zwischen zwei Primern mit der DNA-Polymerase III zu einem Kompletärstrang ergänzt. Die RNA-Primer der so entstehenden *Okazaki-Fragmente* (96) werden anschließend durch die *DNA-Polymerase I* in DNA übersetzt und die *DNA-Ligase* verknüpft alle Teilabschnitte zu einem kompletten Strang.

Ist die Replikationsgabel schließlich am anderen Ende des DNA-Molekül angelangt, hat die Verdopplung des DNA-Moleküls in zwei Tochtermoleküle stattgefunden. Während die eine Seite der ursprünglichen DNA komplett vervollständigt wurde, fehlt auf der gegenüberliegenden Seite am 5'-Ende ein kleiner Abschnitt, der durch den zuletzt gesetzten RNA-Primer verursacht wurde: Der sogenannte *Primer-gap*. Von Zellteilung zu Zellteilung geht somit immer ein Teil der endständigen DNA-Sequenz verloren.

In eukaryontischen Zellen wird dieses Problem durch das Anfügen von *telomeren Sequenzen* am Ende eines Chromosoms gelöst (97; 98). *Telomere* bestehen aus informationslosen sich wiederholenden Motiven von DNA-Basen, wobei der eine Strang typischerweise viele Guanin-Basen, der Komplementärstrang entsprechend viel Cytosin enthält. Der guaninreiche Strang erzeugt am 3'-Ende einen Überhang aus etwa 15 Residuen, der mit Hilfe des Enzymes *Telomerase* immer wieder verlängert wird. Diese Elongation ermöglicht, daß der letzte RNA-Primer im Überhang des Chromosomen-Endes gesetzt werden kann und somit zur vollständigen Duplizierung des DNA-Moleküls sorgt. Typische telomere Sequenzen sind in Tab. 5.1 zu ersehen.

Die Aufgabe der Telomere als End- oder Schutzkappen der Chromosome besteht hauptsächlich aus folgenden Punkten:

- Verhinderung der Verkürzung von Chromosomen;
- Schutz vor ungewollter Verschmelzung mit anderen Chromosomen;
- Mitwirkung bei genetischen Vorgängen wie Rekombination (Vererbung), Replikation (Verdopplung der DNA bei der Zellteilung) und Transkription (Proteinbiosynthese).

Eine besondere Eigenschaft von guaninreichen Sequenzen ist die Bildung der sogenannten Guanin-Quartett-Struktur, wie sie in Abb. 5.2 (c) dargestellt ist. Mit Hilfe des G-Quartetts können telomere Einzelstrangbereiche der Chromosomenenden mit eigenen Nachbarbasen stabile dreidimensionale Strukturen bilden. Bereits seit einigen Jahren sind derartige DNA-Strukturen beliebte Untersuchungsobjekte. Beispielsweise ist es möglich, mittels UV-Spektroskopie die Bildung des G-Quartetts verschiedener guaninreicher Sequenzen zu beobachten (100) oder die genaue räumliche Struktur sowie dessen Beeinflussung durch gewisse nachbarschaftliche Basen oder Ionen mittels NMR-Spektroskopie zu untersuchen (101; 102). Die spezielle Bedeutung der Guanin-Quartette in den Telomeren gab den Anlaß zu theoretischen Studien von ähnlichen Quartettstrukturen zwischen Thymin (T·T·T·T) (103), Uracil (U·U·U·U) (103) oder zwischen Guanin und Cytosin (G·C·G·C) (104). Desweiteren ist die bevorzugte Bindung spezifischer Proteine an die Guanin-Quartett-Struktur bekannt. Zwischen dem Prozeß des Alterns von Organismus bzw. einzelner Zellen und dem niedrigen Pegel von Telomerase scheint eine starke Korrelation zu bestehen. Umgekehrt können Zellkulturen immortalisiert, d.h. unsterblich gemacht werden, wenn aktive Telomerase-Gene eingeführt werden. Diese Beobachtungen führten zusammen mit der Entdeckung, daß bösartige Tumorzellen ein gleichbleibend hohes Niveau an Telomerase besitzen, zur einer Intensivierung in der Erforschung der Telomerase-Hemmung als mögliche Krebstherapie (105; 106; 107).

5.1.3 Thrombin-Aptamer und Blutgerinnung

Als *Aptamer* bezeichnet man ein DNA- oder RNA-Molekül, daß eine spezifische Bindung mit einem Zielmolekül (z.B. einem Protein) eingeht und evtl. dessen Wirkung beeinflußt. Der *Thrombin-Aptamer*, eine Einzelstrang-DNA, bindet mit hoher Affinität an Thrombin und hemmt dessen enzymatische Aktivität (108). Er wurde im Jahre 1992 entdeckt (109) und erfüllte mit Abstand aus einem Vorrat von etwa 10^{13} verschiedenen DNA-Sequenzen in hohem Maße die beiden zuvor genannten Kriterien. Das Molekül besteht aus 15 Basen und bildet mit seinen zwei Guanin-Quartetten eine kompakte räumliche Struktur (110; 111; 112) (siehe dazu auch Abb. 5.3 (e)).

Das Enzym Thrombin spielt in der Blutgerinnung eine wesentliche Rolle. Bei Gewebeerletzungen werden meist auch kleinere Gefäße verletzt und geöffnet. Als Folge der Verletzung kommt es zu einer reflektorischen Gefäßkontraktion und der Blutstrom wird in dieser Region verlangsamt. Nun kann die zelluläre Blutstillung einsetzen. Thrombocyten (Blutplättchen) bleiben nun an den geschädigten Gefäßen hängen und haften sich an die freiliegenden Bindegewebefasern. Nach dieser erfolgten Plättchenadhäsion verändern die Thrombocyten ihre Form und veranlassen weitere Thrombocyten, sich anzulagern. Der durch diese plasmatische Gerinnung entstehende Pfropf (Thrombus) kann das Gefäß jedoch nur

dann dauerhaft verschließen, wenn ihm durch die anschließenden plasmatischen Vorgängen eine ausreichende Festigkeit verliehen wird. An dem plasmatischen Gerinnungsprozeß sind vier Gerinnungsfaktoren beteiligt, von denen drei, nämlich *Calcium-Ionen* (Faktor IV) und die beiden in den Leberparenchymzellen gebildeten Plasmaproteine *Fibrinogen* (Faktor I) und *Prothrombin* (Faktor II) ständig im Blut zirkulieren. Diese Faktoren können eine Gerinnung jedoch nur dann in Gang setzen, wenn bei Gewebeerletzungen der als *Gewebethromboplastin* bezeichnete Faktor III ins Blut übertritt. Dieser Faktor führt in Gegenwart von Calcium-Ionen das Proenzym Prothrombin in *Thrombin* über, ein hochaktives Enzym, das in kurzer Zeit große Mengen Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Fibrinogen ist ein längliches Protein, daß aus zwei identischen Untereinheiten besteht. Thrombin legt nun durch Herausschneiden von kleinen Peptidketten in dem Fibrinogen-Molekül Bereiche frei, die eine Zusammenlagerung der entstandenen Fibrin-Monomeren zu Polymeren erlauben. Dadurch entstehen nun netzartige Strukturen, die dem Wundverschluß seine Festigkeit verleihen. Damit solche Blutpfropfen und Fibrin-Polymere nicht in den Blutkreislauf gelangen und damit wichtige Versorgungsleitung blockieren, muß es auch den umgekehrten Prozeß geben, der das Fibrin wieder in harmloses Fibrinogen zurückverwandelt und das hochaktive Enzym Thrombin wieder abschaltet. Das Wissen um die Vorgänge der Blutgerinnung ist gerade für Herzinfarkt, Schlaganfall und Thrombose unerläßlich. Die Entdeckung des Thrombin-Aptamers hat gerade im Zusammenhang mit der Entwicklung von Therapeutika zu einem regen wissenschaftlichen Interesse an dem DNA-Molekül geführt.

5.2 BODIPY-DNA-Systeme

Um mit spektroskopischen Methoden die Eigenschaften derartige DNA-Sequenzen studieren zu können, wird ein Farbstoff als Sondenmolekül benötigt. Diese Sonde kann entweder als freier Chromophor vorliegen oder kovalent an die Nucleotid-Kette gebunden sein. Auf diese Weise konnten bereits Wechselwirkungen zwischen guaninreichen Oligonucleotiden und den eingesetzten Farbstoffsonden untersucht werden: Die kationische Form eines Carbocyanin-Derivats diente in (113; 114) als freier Chromophor während in (10; 115) die Sonde BODIPY kovalent an das Oligonucleotid gebunden war. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoff-DNA-Systeme stammen alle aus dem Labor der Arbeitsgruppe um T.-C. Chang des *Institute for Atomic and Molecular Sciences* der Academia Sinica in TaiPei (Tai-Wan) und sollen nun der Reihe nach vorgestellt werden.

5.2.1 Der BODIPY-Farbstoff

Die außerordentlich guten Fluoreszenzeigenschaften der BODIPY-Farbstoffe haben bereits für zahlreiche Anwendungen in Biochemie und molekularer Biologie gesorgt. Das zentrale Strukturelement dieser Farbstoffgruppe, bestehend aus drei aneinandergefügten aromatischen Ringen mit einer N_2BF_2 -Gruppe, ist in Abb. 5.3 (a) zu sehen. Mittels chemischer Synthese lassen sich eine Vielzahl von BODIPY-Derivaten erzeugen, die in einem spektralen Bereich von etwa 450 bis 700 nm absorbieren bzw. fluoreszieren können. Die äußerst photostabilen Farbstoffe erreichen bei $S_0 \mapsto S_1$ -Anregung Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} von etwa 50.000 bis über 100.000 $M^{-1} cm^{-1}$, die Fluoreszenz-Quantenausbeuten Φ überdecken einen Bereich von ca. 0.3 bis nahezu 1, abhängig von Derivat und Lösungsmittel und besitzen Fluoreszenz-Lebensdauern von einigen Nanosekunden (116; 117).

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit dem Farbstoff¹ BODIPY^{581/591} gearbeitet, der von der Firma Molecular Probes bezogen wurde. Folgende spektroskopischen Eigenschaften werden vom Hersteller angegeben und gelten für das Lösungsmittel Methanol bei Raumtemperatur: Bei $S_0 \mapsto S_1$ -Anregung ergibt sich für das Absorptionsmaximum eine Wellenlänge von 581 nm ($17211 cm^{-1}$), das Fluoreszenzmaximum liegt bei 591 nm ($16920 cm^{-1}$). Die chemische Struktur ist Abb. 5.3 (a) zu entnehmen. Im Folgenden wird diese Farbstoffsonde stets mit BP abgekürzt. Für die Lochbrenn-Experimente wurde der Chromophor (Molekulargewicht: 489.28 g/mol) ohne weitere Behandlung in einem 0.01 M Tris/HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7.5 aufgelöst und anschließend davon vier Volumenanteile mit fünf Volumenanteilen Glycerin vermischt, so daß die Probe (max. Extinktion: $136.000 M^{-1} cm^{-1}$) eine optische Dichte von etwa 1 erreichte. In Abb. 5.4 (a) ist das Absorptionsspektrum von BP in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K

¹Die ausführliche chemische Bezeichnung des Fluoreszenzfarbstoffes lautet: 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid, succinimidyl ester.

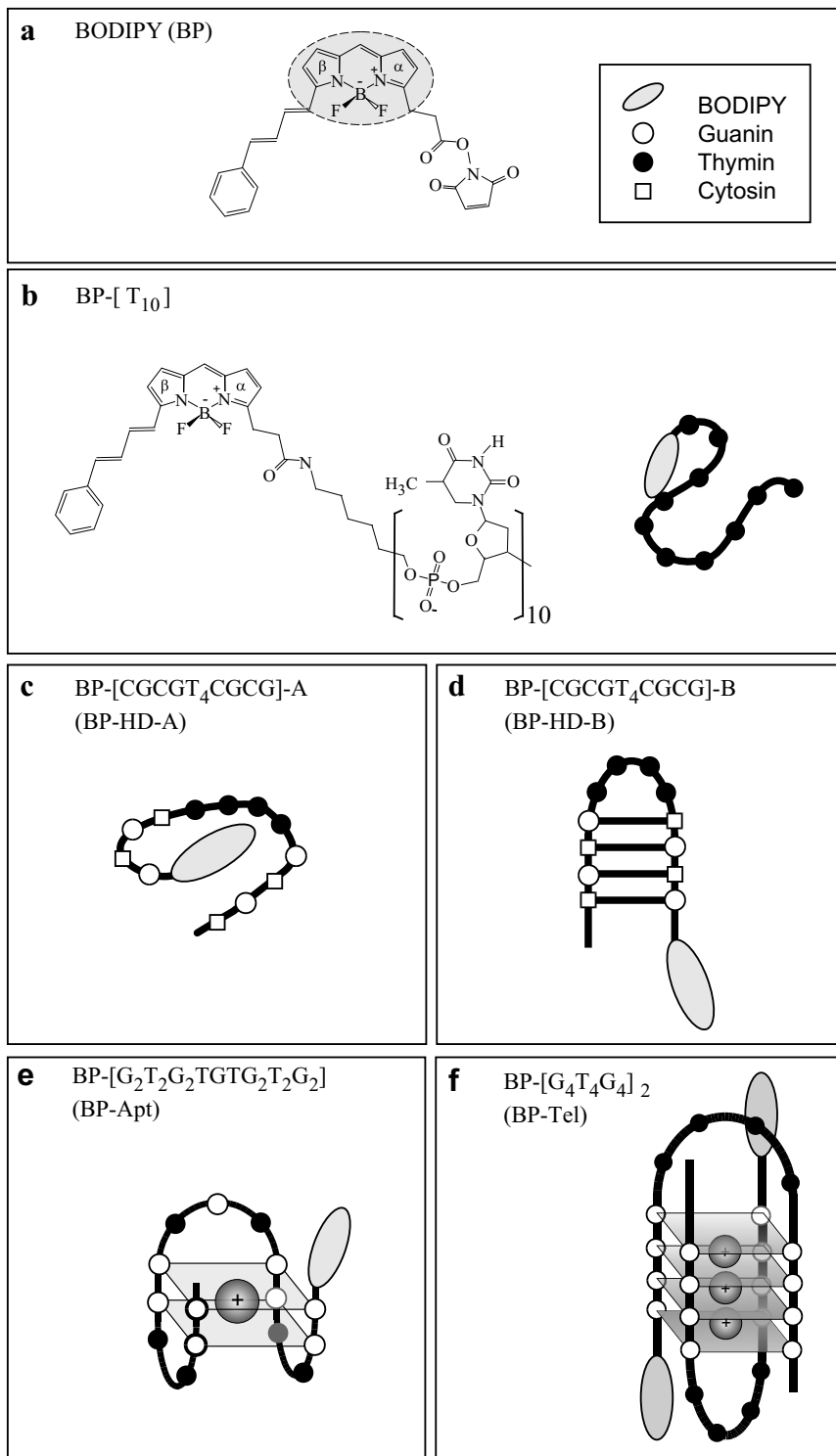


Abbildung 5.3: (a) Chemische Struktur des Farbstoffs BODIPY^{581/591}. (b) Kovalente Verknüpfung von BP mit einem Oligonucleotid aus zehn Thymin-Nucleotiden. (c) und (d) Die beiden unterschiedlichen Konformationen der Watson-Crick-Haarnadelstruktur. (e) und (f) Schematische Darstellungen der beiden durch positiv geladene Ionen stabilisierten G-Quartett-Strukturen BP-Aptamer und BP-Telomer.

gezeigt. Im Vergleich zum Lösungsmittel Methanol bei Raumtemperatur ergibt sich in einem Wasser-Glycerin Gemisch für das Absorptionsmaximum eine bathochrome Verschiebung von etwa 404 cm^{-1} und liegt nun bei 16808 cm^{-1} . Weitere Schwingungsbanden erscheinen bei 18015 cm^{-1} und 18352 cm^{-1} .

5.2.2 BP-Thymin-Komplex

Die kovalente Verknüpfung des BODIPY-Farbstoffes mit verschiedenen DNA-Sequenzen geschieht immer in der gleichen Weise nach einem besonderen Verfahren, daß in der Gruppe von T.-C. Chang in TaiPei entwickelt wurde (118; 119). Nach der chemischen Verbindung von Chromophor und DNA schließt sich eine Reinigung der Lösung mit Hilfe der HPLC an und wird schließlich in einer Zentrifuge unter Vakuum eingetrocknet. Die so aus TaiWan erhaltenen Proben wurden in $100\text{ }\mu\text{l}$ des bereits für den einzelnen Chromophor verwendeten Puffer-Glycerin Gemisches (0.01 M Tris/HCl pH 7.5, 4 : 5 vol/vol mit Glycerin) gegeben und auf einem Rüttler über Nacht aufgelöst.

Die erste relativ einfache DNA-Sequenz bestand aus einer linearen Kette von zehn Thymin-Nucleotiden (Abkürzung: BP-[T₁₀]), an dessen 5'-Ende der Farbstoff BP angebracht war (siehe Abb. 5.3 (b)). Während Guanin-Nucleotide untereinander Basenpaarungen aufbauen können, gehen Thymin-Nucleotide nur schwache Wechselwirkung mit ihresgleichen ein (7). Wie die Analyse der Satellitenlochspektren aus nichtresonanten Lochbrenn-Experimenten und der Vergleich mit Normalmoden-Berechnungen gezeigt haben, neigt jedoch der Farbstoff BP zu einer Stappellung mit den Thymin-Basen der eigenen Kette (120). Dies ist auch schematisch in Abb. 5.3 (b) angedeutet: Der Chromophor BP geht eine Wechselwirkung mit Thyminbasen der eigenen, weitgehend unstrukturierten Kette ein. Diese Interpretation wird auch durch ein Folgeexperiment mit dem BODIPY^{493/503}-Derivat erhärtet, daß durch seine vier Methylgruppen an den Ecken des zentralen Strukturelements eine Stappellung aus sterischen Gründen unmöglich machen sollte: Der Vergleich der Satellitenlochspektren mit Normalmoden-Berechnungen bestätigt diese Sichtweise (9). Wie aus Abb. 5.3 (b) und Tab. 5.2 ersichtlich, ergibt sich für den BP-[T₁₀]-Komplex nur eine leichte hypsochrome Verschiebung von wenigen Wellenzahlen.

5.2.3 BP-Haarnadelstrukturen

Aus der Abfolge der DNA-Basen CGCG-TTTT-CGCG läßt sich relativ schnell auf die räumliche Anordnung schließen: Die beiden Schenkel bilden Watson-Crick-Basenpaarungen aus, die durch eine Schlaufe aus vier Thymin-Nucleotiden ermöglicht wird. Nach der Bildung des BP-[CGCGT₄CGCG]-Komplexes ergaben sich nach der HPLC zwei unterschiedliche Fraktionen, die mit Hilfe der nichtresonanten Lochbrennspektroskopie untersucht wurden (7). In Abb. 5.3 (c) und

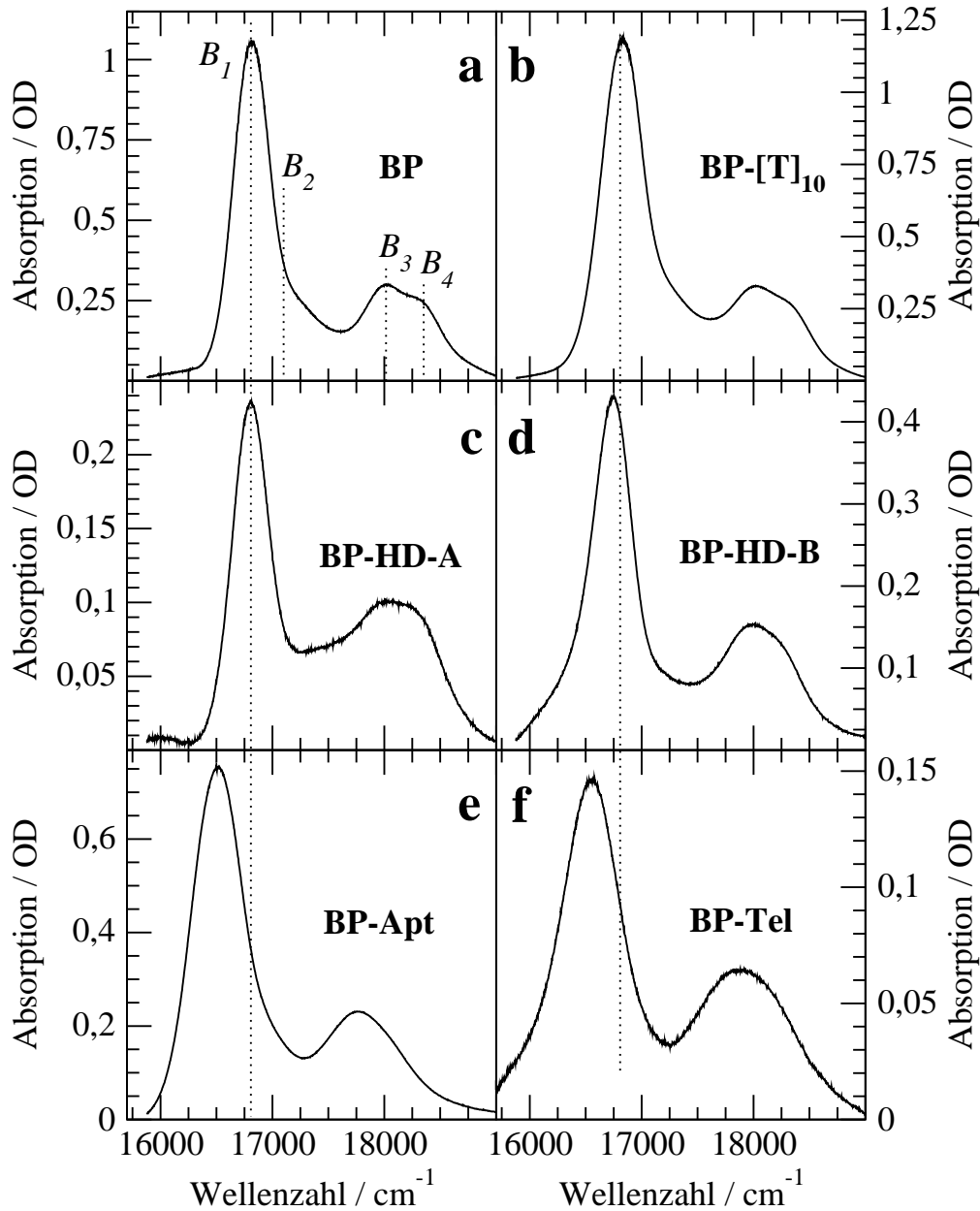


Abbildung 5.4: Absorptionsspektren der BP-DNA-Systeme in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K. **(a)** Der freie Chromophor BODIPY^{581/591}. **(b)** BP – [T]₁₀. **(c)** und **(d)** Watson-Crick-Haarnadelstrukturen BP – HD – A und BP – HD – B. **(e)** und **(f)** Die beiden G-Quartett-Strukturen BP – Apt und BP – Tel.

BP	ν_0	σ_0	BP-[T₁₀]	ν_0	σ_0
B_1	16808	355	B_1	16817	405
B_2	17100	629	B_2	17215	593
B_3	18015	377	B_3	18011	374
B_4	18352	313	B_4	18341	352
BP-HD-A	ν_0	σ_0	BP-HD-B	ν_0	σ_0
B_1	16793	369	B_1	16737	355
B_2	17118	610	B_2	18029	635
B_3	18000	534	B_3	17969	498
B_4	18357	414	B_4	18307	399
BP-Apt	ν_0	σ_0	BP-Tel	ν_0	σ_0
B_1	16489	496	B_1	16552	529
B_2	16802	759	B_2	17771	720
B_3	17685	436	B_3	17720	534
B_4	17984	544	B_4	18116	634

Tabelle 5.2: Zentrumsfrequenzen ν_0 in cm^{-1} und inhomogene Breiten σ_0 in cm^{-1} der in Abb. 5.4 dargestellten BP-DNA-Systeme (gaußförmige Anpassung).

(d) sind die beiden Strukturen schematisch dargestellt: Während bei der ersten Fraktion BP-HD-A der Chromophor eine Wechselwirkung mit der Thyminschleife eingeht (vgl. BP-[T₁₀]) und dadurch eine Watson-Crick-Basenpaarung verhindert, kann im Falle von BP-HD-B eine komplette Haarnadel mit Cytosin-Guanin-Basenpaarungen ausgebildet werden. Betrachtet man die entsprechenden Absorptionsspektren in Abb. 5.4 (c) und (d), stellt man lediglich eine leichte bathochrome Verschiebung von BP-HD-B im Vergleich zu BP-HD-A fest.

5.2.4 BP-Aptamer

Die Nucleotid-Sequenz des Thrombin-Aptamers (BP-Apt) kann auf folgende Weise geschrieben werden: BP-[G₂T₂G₂TG₂G₂T₂G₂]. Der Farbstoff ist wiederum am 5'-Ende des Oligonucleotids angebracht. Die schematische Darstellung des BP-Aptamer-Komplexes kann Abb. 5.3 (e) entnommen werden. Zwei kleine Thymin-Schleifen (-T₂-) und eine weitere etwas größere Schleife (-TGT-) ermöglichen zwei übereinanderliegende Guanin-Quartett-Strukturen. Das an einen Schaukelstuhl erinnernde Gebilde besteht aus einer linearen Nucleotidkette und wird durch das Einbringen von positiv geladenen Ionen stabilisiert (121; 122).

Um die BP-Aptamer-Struktur durch positiv geladene Natrium-Ionen zu stabilisieren, wurden 0.15 M NaCl zu 100 μl Tris/HCl-Puffer (pH 7.5) der Konzentration von 0.01 M gegeben. Von dieser Lösung wurden wiederum vier Volumenanteile mit fünf Volumenanteilen Glycerin vermischt. In Abb. 5.4 (e) ist

das entsprechende Absorptionsspektrum bei 2 K gezeigt. Neben einer deutlichen bathochromen Verschiebung läßt sich eine zusätzliche Verbreiterung der Banden auf Kosten vibratorischer Unterstruktur feststellen. Auch hierzu existieren Satellitenlochbrenn-Experimente, die Vergleiche zwischen den Systemen BP-Aptamer und BP-Aptamer-Thrombin anstellen (8).

5.2.5 BP-Telomer

Die telomere Sequenz des Einzellers *Oxytricha nova* besteht aus der Wiederholungseinheit GGGG-TTTT-GGGG, die durch Hoogsteen-Basenpaarungen zwischen zwei Guanin-Nucleotiden eine durch die Thymin-Schleife begünstigte Haarnadelstruktur ausbildet. Zwei derartige Haarnadelstrukturen lagern sich zu einer Quadruplex-Struktur zusammen, deren vier übereinandergestapelte Guanin-Quartette von den beiden Thymin-Schleifen gekreuzt werden (siehe schematische Darstellung in Abb. 5.3 (f)). Die BP-Chromophore befinden sich wieder wie üblich am 5'-Ende der Einzelstrang-DNA. Zur Stabilisierung des dimeren DNA-Komplexes (BP-Tel) werden positiv geladene Natrium-Ionen verwendet (123), die wie im Falle von BP-Apt durch Zugabe von 0.15 M NaCl in 100 μ l Tris/HCl-Puffer (pH 7.5) der Konzentration 0.01 M in das BP-DNA-System gelangen. Wie bereits für die andere Guanin-Quartettstruktur BP-Apt gesehen, ist auch das Absorptionsspektrum von BP-Tel markant bathochrom verschoben und verbreitert.

5.3 Starkeffekt

Alle Starkeffekt-Messungen der BP-DNA-Komplexe fanden bei einer Temperatur von 2 K statt. Die spektralen Löcher wurden mit Laserleistungen in der Größenordnung von μW mit einigen Minuten Brenndauer erzeugt. Für den Auslesevorgang der Lochspektren wurden stets verminderte Laserleistungen in der Größenordnung von nW verwendet. Für den Abstand d zwischen den beiden Stark-Elektroden ergab sich ein Wert von 10.8 mm. Für die beiden Polarisationsgeometrien $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ und $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ wurde je ein spektrales Loch gebrannt, dessen Lochform durch ein externes elektrisches Feld \vec{E}_S mit Feldstärken von bis zu maximal 4 kV/cm beeinflusst wurde. Zur Anpassung der Lochspektren wurden wiederum simultan beide Polarisationsanordnungen herangezogen und für jeden Feldstärke-Wert \vec{E}_S ausgewertet.

In Abb. 5.5 sind typische Starkspektren gezeigt, wie sie mehr oder weniger für alle BP-DNA-Komplexe beobachtet wurden. In diesem Falle handelt es sich um das System BP-[T₁₀], dessen spektrale Löcher für die beiden Polarisationsgeometrien $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$ bzw. $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ bei 16660 cm^{-1} bzw. 16658 cm^{-1} erzeugt wurden. Während in der parallelen Polarisationsanordnung für zunehmende Feldstärken neben einer Verbreiterung eine deutliche Aufspaltung der Lochspektren zu erkennen ist (Abb. 5.5 (a)), gehen die Löcher der senkrechten Polarisation lediglich eine Verbreiterung ein (Abb. 5.5 (b)). Die Fitkurven sind zusammen mit den gemessenen Spektren abgebildet und lassen sich kaum voneinander unterscheiden. Desweiteren verhalten sich, wie in Abb. 5.5 (c) ersichtlich, Aufspaltung Δ und Verbreiterung σ exakt linear zum angelegten Starkfeld \vec{E}_S .

In Abb. 5.6 bis 5.10 werden die durch ein äußeres elektrisches Feld hervorgerufenen spektroskopischen Veränderungen in Abhängigkeit der spektralen Position der Löcher innerhalb der inhomogenen Absorptionsbande gezeigt, die sich aus den verschiedenen molekularen Eigenschaften der unterschiedlichen BP-DNA-Systeme ergeben. Dabei können drei offensichtliche Aspekte herausgegriffen werden:

1. Für $\Delta\vec{\mu}_0$ wird ein signifikanter Farbeffekt beobachtet: Mit abnehmenden Wellenzahlen wächst $\Delta\vec{\mu}_0$ an. Der Dipolmoment-Differenzvektor nimmt im Koordinatensystem des Chromophors eine eindeutige Orientierung ein.
2. Die Stärke des Farbeffekts ist für das untersuchte DNA-System spezifisch.
3. Der Farbeffekt des induzierten Dipolmoments ist vergleichsweise schwach und zeigt sogar einen gegenläufigen Trend: Für kleiner werdende Wellenzahlen nimmt $\Delta\vec{\mu}_i$ ab.

Im Folgenden sollen die spektroskopischen Beobachtungen mit den strukturellen Eigenschaften der DNA-Systeme in Einklang gebracht werden.

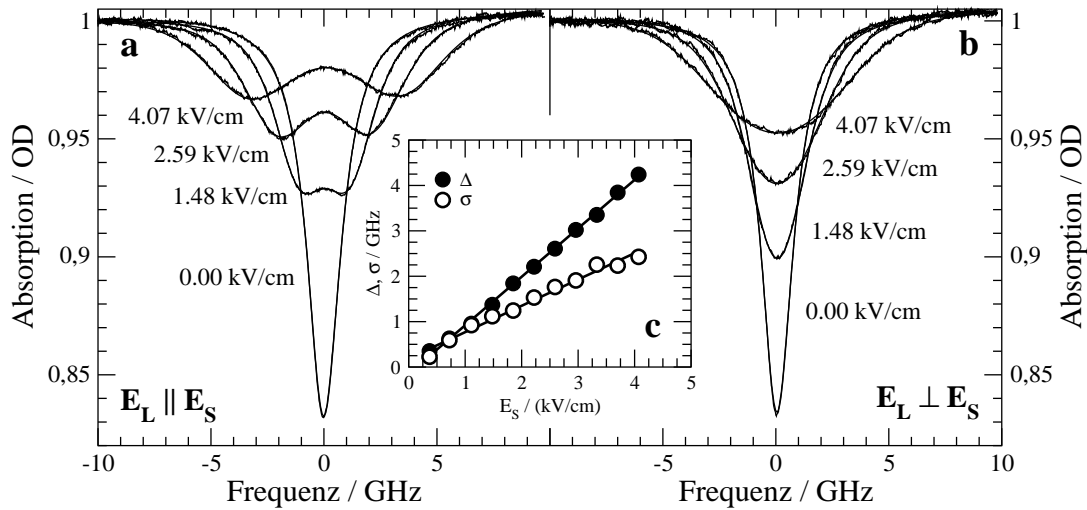


Abbildung 5.5: Typische Starkeffekt-Lochspektren eines BP-DNA-Komplexes, deren Lochform durch die Änderung des angelegten elektrischen Felds \vec{E}_S beeinflusst wird. (a) Das Laserfeld \vec{E}_L ist parallel zum Starkfeld \vec{E}_S orientiert. Mit steigender Feldstärke wird eine klare Aufspaltung beobachtet, begleitet von einer zusätzlichen Verbreiterung der Löcher. (b) \vec{E}_L ist senkrecht zu \vec{E}_S angeordnet. Die spektralen Löcher gehen mit steigender Feldstärke \vec{E}_S lediglich eine Verbreiterung ein. (c) Aufspaltung Δ sowie Verbreiterung σ zeigen ein exakt lineares Verhalten mit steigendem Starkfeld E_S .

Stark-Spektroskopie

Die Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ nimmt im Koordinatensystem des Chromophors eine wohldefinierte Orientierung ein. Betrachtet man in Abb. 5.3 (a) die chemische Struktur des Farbstoffs BODIPY^{581/591}, so fällt einem sofort die in der Abbildung grafisch hervorgehobene, zentrale aromatische BODIPY-Einheit ins Auge, die aus drei aneinandergesetzten Einzelringen besteht. Die stark polare BF₂-Gruppe im Zentrum des Farbstoffmoleküls besitzt eine negative Teilladung δ^- . Die beiden benachbarten Stickstoffatome tragen aus Mesomeriegründen je eine halbe positive Partialladung $\frac{1}{2}\delta^+$. Als Konsequenz ergibt sich ein starkes Dipolmoment entlang der Symmetrieachse der zentralen BODIPY-Einheit. Obwohl die Symmetrie des π -Elektronensystems des Chromophors durch die verschiedenen kovalent gebundenen Oligonucleotide gestört wird, bleibt die Lage des Dipolmoments in erster Linie entlang der Symmetrieachse bestehen. Selbst nach elektronischer Anregung $S_0 \mapsto S_1$ wird die Orientierung des Dipolmoments kaum verändert, da auch im angeregten Zustand die BF₂-Gruppe die stärkste polare Gruppe bleibt.

In einer kürzlich erschienen Veröffentlichung (124) wurden mit Hilfe von elektrooptischen Absorptionsmessungen mit ergänzenden Berechnungen die Dipolmomente für den Grund- und Anregungszustand $\vec{\mu}_0^0$ und $\vec{\mu}_0^*$, darausfolgend die Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ sowie das Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ für den Farbstoff TM-BODIPY (*Tetramethyl-BODIPY*) ermittelt. Dieser Chromophor-Typ

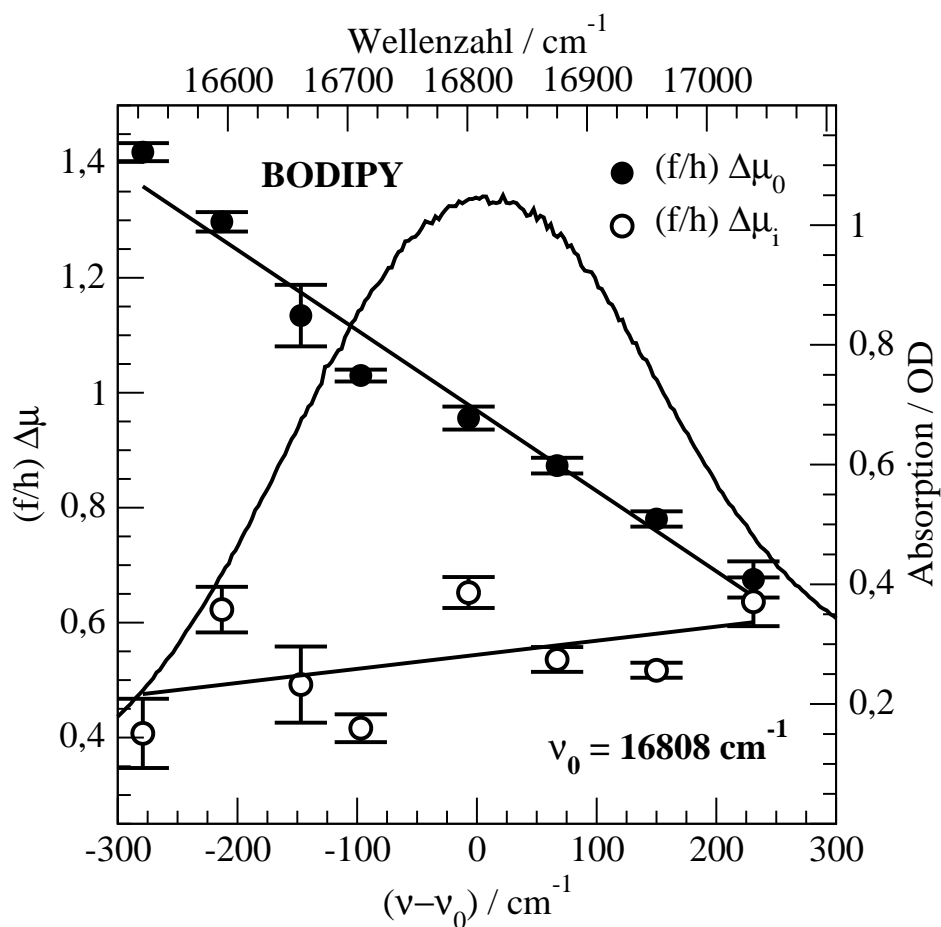


Abbildung 5.6: Starkeffekt des freien Chromophor BODIPY (BP) in einem Wasser-Glycerin Glas als Funktion der Lochbrenn-Position bei 2 K. Gezeigt werden neben der inhomogenen Absorptionsbande die Frequenzabhängigkeit von $(f/h) \cdot \Delta\mu_0$ (ausgefüllte Symbole) sowie $(f/h) \cdot \Delta\mu_i$ (offene Symbole). ν_0 bezeichnet das Absorptionsmaximum.

besitzt im Vergleich zu der zuvor beschriebenen zentralen BODIPY-Einheit noch zusätzlich vier Methylgruppen an den vier Ecken des aromatischen Systems. Als Resultat ergaben sich folgende Orientierungen für die entsprechenden Dipolmomente: Die permanenten Dipolmomente des Chromophors im Grund- bzw. Anregungszustand $\vec{\mu}_0^0$ und $\vec{\mu}_0^*$ einschließlich der daraus gebildeten Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ befinden sich alle parallel zur Symmetrieachse des Moleküls, während das Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{01}$ senkrecht dazu in der Längsachse des Farbstoffs zu liegen kommt.

Alle Starkeffekt-Experimente der BP-DNA-Komplexe wurden jedoch mit dem Farbstoff BODIPY^{581/591} (siehe Abb. 5.3 (a) bzw. (b)) ausgeführt und ergaben eine relativ starke Aufspaltung der spektralen Löcher in der parallelen Polarisationsgeometrie. Dies deutet auf einen großen Wert von $\Delta\vec{\mu}_0$ hin, da die Aufspaltung

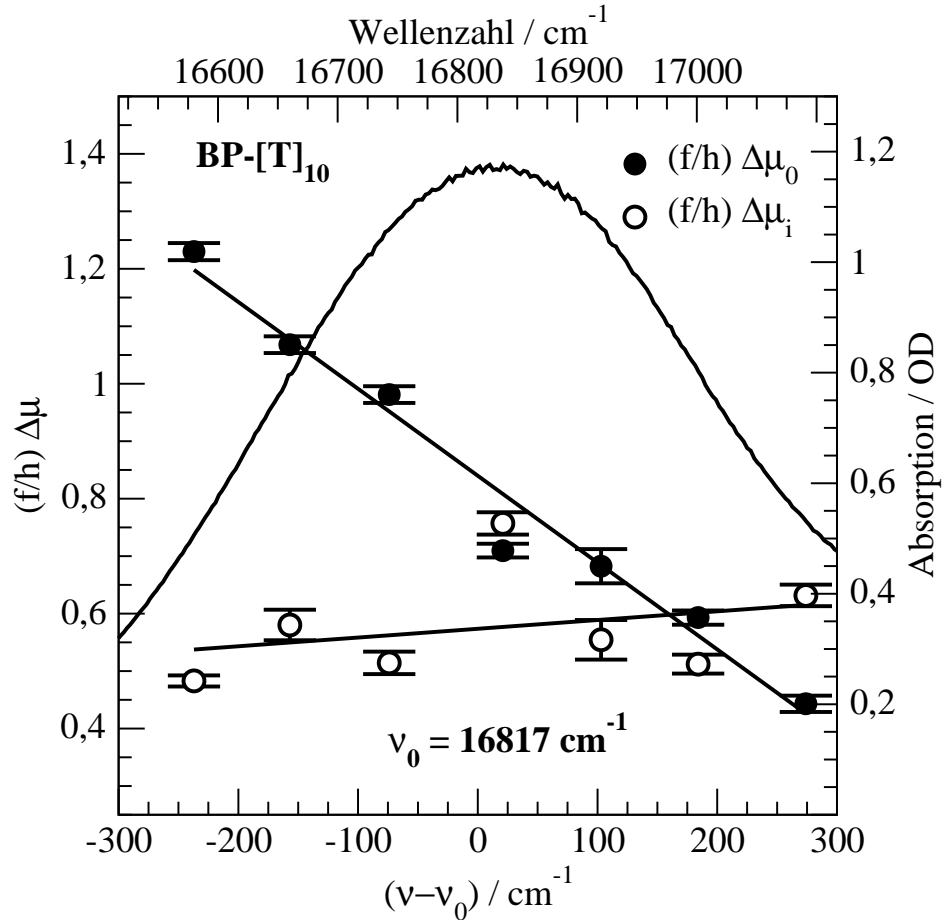


Abbildung 5.7: Starkeffekt des BP-[T]₁₀-Komplexes. Erläuterungen wie in Abb. 5.6.

als Maß für den Betrag von $\Delta\vec{\mu}_0$ angesehen werden kann und im übrigen für *alle* DNA-Proben beobachtet wurde. In Kapitel 2.2.2 wurden zur Veranschaulichung des Starkeffekts spektrale Löcher vier Fallbeispiele dargestellt. Für die Farbstoff-DNA-Systeme kommt aufgrund der Aufspaltung der Lochspektren in der parallelen Polarisation Fall (a) mit der entsprechenden Gleichung 2.11 auf S. 17 in Frage (vergleiche auch Abb. 2.4 (a) und zugehörige Simulationsspektren in Abb. 2.5 (a)). Dort befinden sich jedoch die beiden Vektoren des Übergangsdipolmomentes $\vec{\mu}_{01}$ und der Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ in einer parallelen Anordnung zueinander. Wie kann nun dieser scheinbare Widerspruch zwischen den Starkeffekt-Messungen an dem Farbstoff BODIPY^{581/591} und den Ergebnissen aus (124) an TM-BODIPY entkräftet werden?

Der erste Punkt betrifft den Winkel θ zwischen $\vec{\mu}_{01}$ und $\Delta\vec{\mu}_0$: Während für das Fallbeispiel (a) ein Winkel von 0° angenommen wurde, ergaben die Starkeffekt-Experimente Winkel um die 30° . Desweiteren besitzt der Farbstoff BODIPY^{581/591} eine Erweiterung des π -Elektronensystems (siehe Abb. 5.3 (a)), die aus Symme-

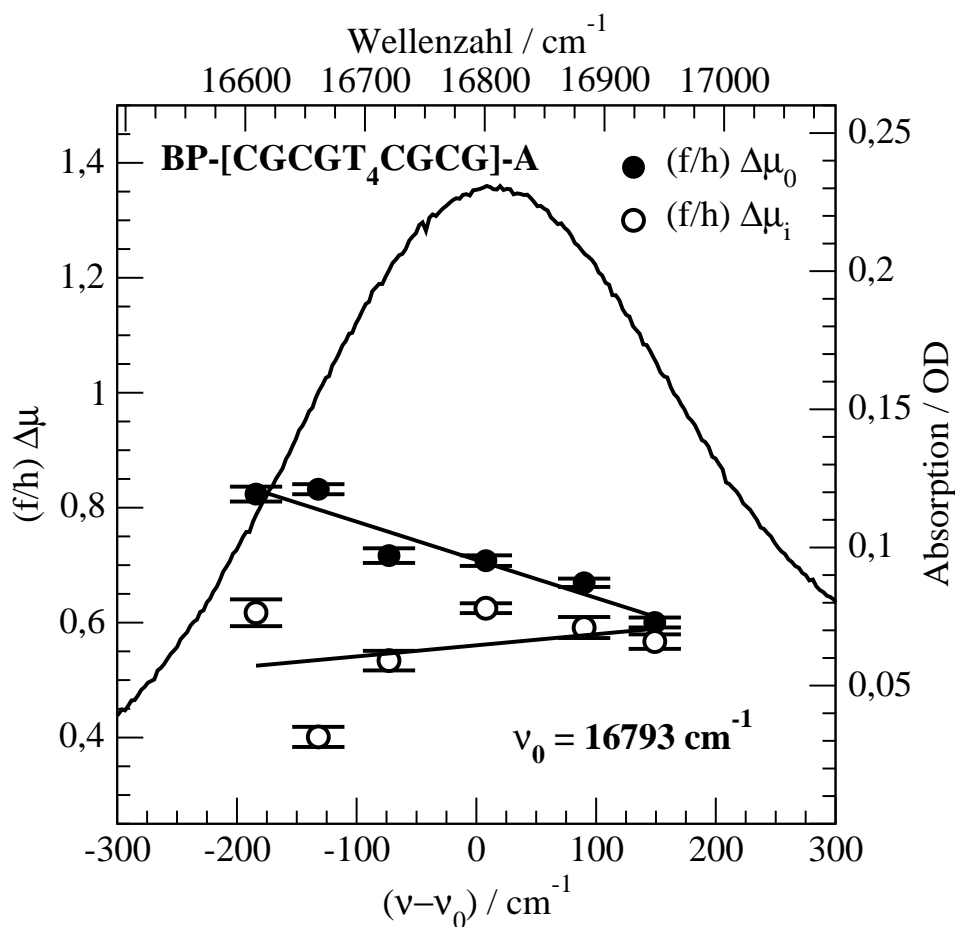


Abbildung 5.8: Starkeffekt des BP-HD-A-Komplexes (BP-[CGCGT₄CGCG]-A). Erläuterungen wie in Abb. 5.6.

triergründen für Richtungsänderungen der entsprechenden Dipolmomente sorgt. Durch die Berücksichtigung dieser Überlegungen kann obiger Widerspruch in dem Sinne aufgelöst werden, daß für die Orientierung der Dipolmomente eine entsprechende plausible Lösung konstruiert werden kann.

Für die senkrechte Polarisationsgeometrie $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ gilt analog Fallbeispiel (b) mit der Gleichung 2.12 auf S. 19 (vergleiche auch Abb. 2.4 (b) und zugehörige Simulationsspektren in Abb. 2.5 (b)) und führt ausschließlich zu einer Verbreiterung der spektralen Löcher (siehe Abb. 5.5 (b)).

Im Gegensatz zu $\Delta\vec{\mu}_0$ sind die induzierten Dipolmoment-Differenzen $\Delta\vec{\mu}_i$ in einer ungeordneten Matrix bezüglich der Polarisationsrichtung von \vec{E}_L stets statistisch orientiert und tragen folglich nur zur Verbreiterung bei. Mit dem Datenauswerteprogramm werden die Verbreiterungen σ direkt aus den Linienformen gewonnen.

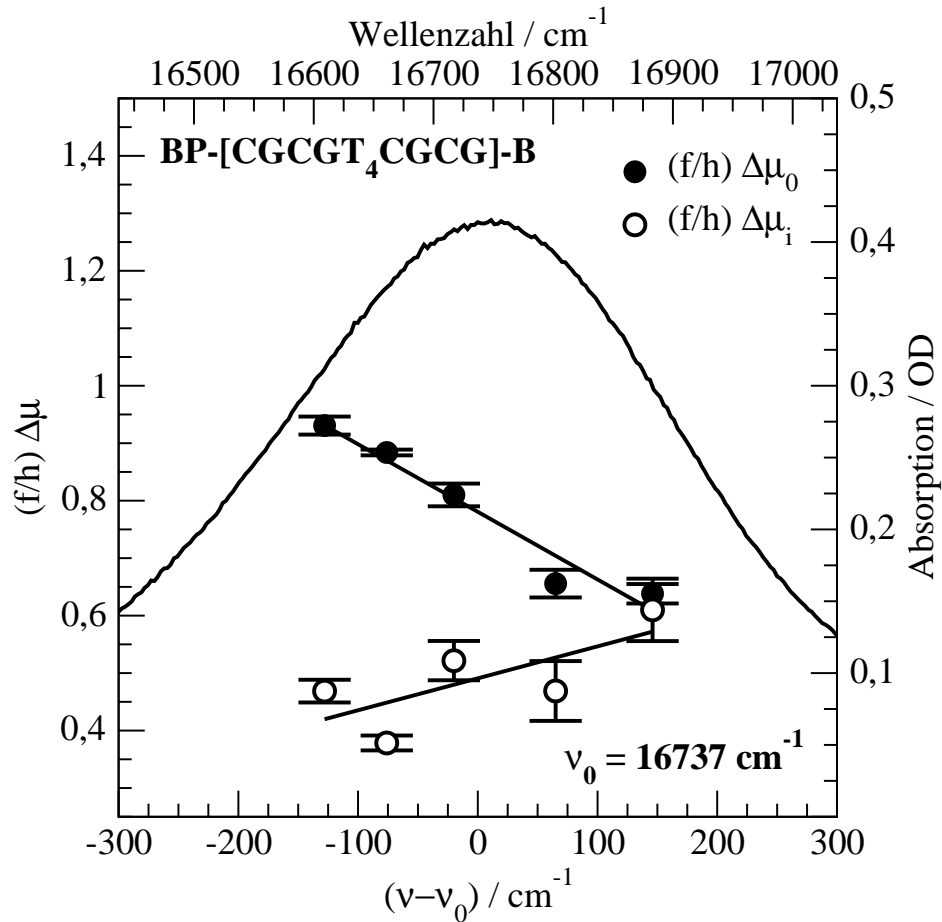


Abbildung 5.9: Starkeffekt des BP-HD-B-Komplexes (BP-[CGCGT₄CGCG]-B). Erläuterungen wie in Abb. 5.6.

Eine neue interessante Beobachtung besteht in der Tatsache, daß die molekulare Größe $\Delta\vec{\mu}_0$ in den Starkeffekt-Experimenten einen signifikanten Farbeffekt aufweist, während für die matrixabhängige Größe $\Delta\vec{\mu}_i$ nur ein schwacher derartiger Effekt beobachtet wurde.

Der Farbeffekt spektraler Löcher

Die Entwicklung frequenz-selektiver Techniken, wie beispielsweise die Fluoreszenzlinienverschmälerung oder das spektrale Lochbrennen, ermöglichte die Untersuchung von Farbeffekten in optischen Spektren (23; 125; 126; 127). Das erste theoretische Modell zur Beschreibung des Farbeffekts, das von B. B. Laird und J. L. Skinner entwickelt (27) und von der Arbeitsgruppe um D. Haarer experimentell bestätigt wurde (128), betraf die Verschiebung spektraler Löcher unter Einfluß eines äußeren Drucks. Später wurde die Laird-Skinner-Theorie von L. Kador modifiziert, um die Farbeffekte in den elektrostatischen Eigenschaften des Sondenmoleküls zu beschreiben, die durch Starkeffekt-Experimente entdeckt wurden

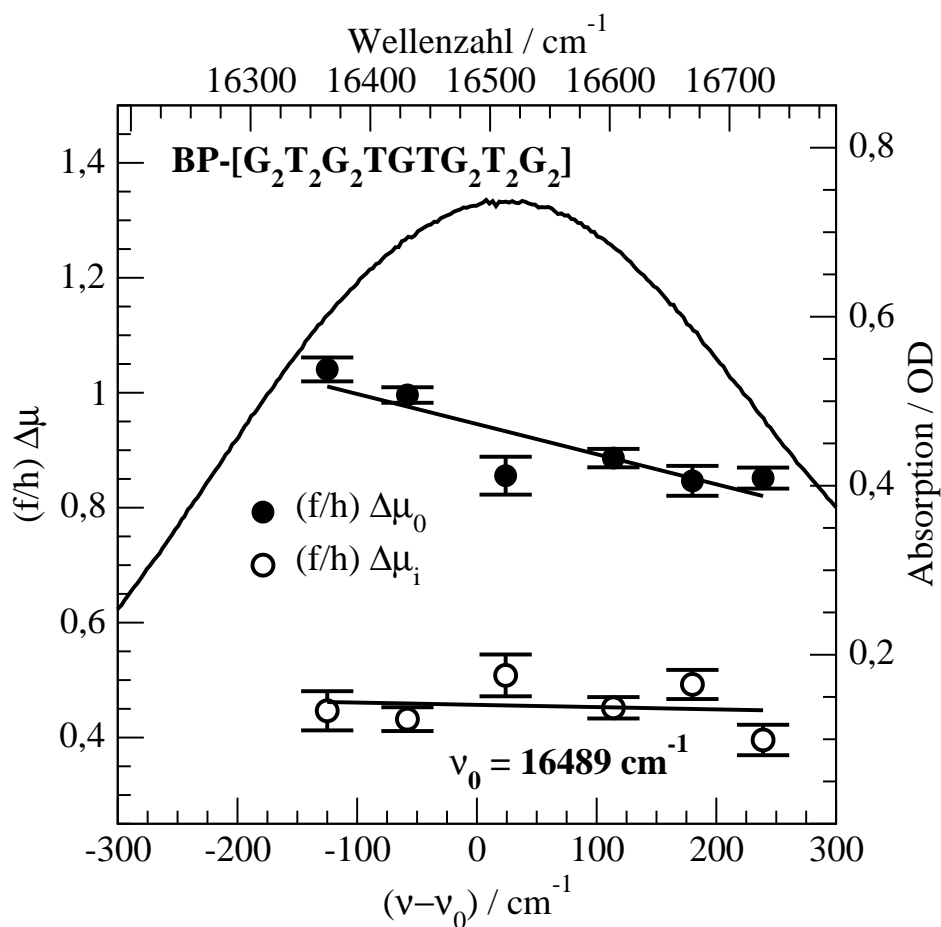


Abbildung 5.10: Starkeffekt des BP-Apt-Komplexes (BP-[G₂T₂G₂TGTG₂T₂G₂]). Erläuterungen wie in Abb. 5.6.

(129; 130; 131). Die Hauptaussage dieser Untersuchungen betraf das Quadrat des induzierten Dipolmoments μ_i^2 , das sich beim Durchstimmen der Lochbrennwellenlänge vom langwelligen in den kurzwelligen Spektralbereich innerhalb der inhomogenen Bande des Farbstoffs vergrößerte. Zudem wird mit dieser Theorie die Existenz einer elektrostatischen Vakuumfrequenz ν_{vac}^E beschrieben, an der \vec{E}_M und entsprechend μ_i^2 verschwinden (125). Die Aussagen dieses Modells wurden durch Experimente und Berechnungen untermauert. Die beobachteten Farbeffekte waren jedoch nicht besonders markant, was sich auf die Verwendung relativ apolare Matrices zurückführen läßt.

Der für die BP-DNA-Systeme beobachtete Farbeffekt ist neuartig. Er betrifft eine molekulare Größe $\Delta\vec{\mu}_0$, die eigentlich von der Umgebung nicht beeinflusst werden sollte. Dieser Farbeffekt läßt sich auf folgende Weise verstehen: Die Änderungen von $\Delta\vec{\mu}_0$ innerhalb der inhomogenen Bande haben auch gleichzeitig Änderungen der strukturellen Eigenschaften des Chromophors zur Folge. Im Gegensatz hierzu

wird der Farbeffekt von μ_i^2 nur durch Umlagerungsprozesse der Lösungsmittelmoleküle in der Umgebung der Sonde bewirkt. Solche Veränderungen struktureller Eigenschaften des BP-Farbstoffs ergeben sich beispielsweise durch Konformationsänderung der BP-Substituenten. Allerdings ist nur schwer ersichtlich, wie eine derartige Beeinflussung des entsprechenden Dipolmomentes zustande kommen könnte. Der beobachtete Farbeffekt von $\Delta\vec{\mu}_0$ beruht deshalb in erster Linie auf der Änderung von Wasserstoff-Brückenbindungen der BF_2 -Untereinheit des BP-Chromophors. Die Wassermoleküle des verwendeten Lösungsmittels sind bestrebt, H-Brücken mit den Fluoratomen von BP einzugehen. Sind die Wasserstoffatome der entsprechend gebildeten H-Brücken polar, können sie zumindest teilweise für eine Kompensation der starken Dipolmomente des freien Chromophors sorgen. Betrachtet man die Meßergebnisse der verschiedenen BP-DNA-Komplexe (siehe Abb. 5.6 bis 5.10), so stellt man für $\Delta\vec{\mu}_0$ einen Anstieg zu kleineren Wellenzahlen fest. Mit obigen Überlegungen läßt sich nun folgender Schluß ziehen: Die relativ großen Dipolmoment-Differenzen $\Delta\vec{\mu}_0$ auf der bathochromen Seite der inhomogenen Bande werden durch schwache Wasserstoff-Brücken verursacht, hingegen sorgen auf der hypsochromen Seite der Absorptionsbande vergleichsweise starke Wasserstoff-Brücken für schwache Dipolmoment-Differenzen $\Delta\vec{\mu}_0$.

Qualitativ lassen sich die soeben ausgeführten Gedanken auch mit dem Einfluß von Wasserstoff-Brücken auf die Lösungsmittelverschiebung in Einklang bringen. Bezügliches eines Farbstoffmoleküls im Vakuum verursacht eine H-Brücke in der Regel eine hypsochrome Verschiebung des elektronischen Übergangs, da die entsprechende Bindung im Grundzustand stärker ist als im angeregten Zustand. Dies führt zu einer intensiveren Ausbildung von H-Brücken auf der energiereichen Seite der inhomogenen Bande.

Weitere Folgerungen können aus der experimentellen Beobachtung der bathochromen Zunahme von $\Delta\vec{\mu}_0$ innerhalb der inhomogenen Bande gezogen werden: Das Dipolmoment im angeregten Zustand $\vec{\mu}_0^*$ muß größer sein, als im Grundzustand $\vec{\mu}_0^0$ und zusätzlich müssen beide die gleiche Orientierung besitzen. Die strukturellen Eigenschaften der zentralen BODIPY-Einheit scheinen diese Situation zu unterstützen: Im angeregten Zustand besitzen die π -Elektronen eine größere Polarisierbarkeit, werden dadurch leichter durch die BF_2 -Gruppe angezogen und resultieren schließlich in einem größeren μ_0^* . Hierbei wird auch die dominierende Rolle von Wasserstoff-Brücken und elektrostatischen Wechselwirkungen deutlich, die zwischen Sondenmolekül und Lösungsmittel herrschen. Diese Sichtweise ist neben den Starkeffekt-Experimenten auch für den Druckeffekt spektraler Löcher von Bedeutung: Für die später noch zu besprechenden Druckeffekt-Ergebnisse der BP-DNA-Komplexe wurde eine bathochrome Lösungsmittelverschiebung von wenigen hundert Wellenzahlen ermittelt, die hinsichtlich vorausgegangener Diskussion auf die beiden konkurrierenden Wechselwirkungen deutet.

Mit diesen Kenntnissen kann auch schließlich die Ursache des schwachen Farbeffekts von $\Delta\vec{\mu}_i$ und sein anomales Verhalten verstanden werden. Zunächst sei darauf verwiesen, daß für alle BP-DNA-Komplexe, außer BP-Apt, der separat besprochen wird, auf der hypsochromen Seite der Absorptionsbande die Werte von $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\Delta\vec{\mu}_i$ die gleiche Größenordnung besitzen. Anschließend fallen die $\Delta\vec{\mu}_i$ -Werte mit zunehmenden Wellenlängen stückweise ab, wobei die relative Änderung jedoch schwach ist. Erinnerung man sich an den Zusammenhang zwischen $\Delta\vec{\mu}_i$ und $\Delta\vec{\alpha}$ in Gleichung 2.5 auf S. 12, so ist der Trend des sich abschwächenden $\Delta\vec{\mu}_i$ gleichbedeutend mit einem abfallenden $\Delta\vec{\alpha}$ zu sehen. Eine sich abschwächende Polarisierbarkeit deutet aber wiederum auf eine stärker werdende Lokalisierung der Elektronen hin. Hiermit läßt sich das gleichzeitige Anwachsen der permanenten Dipolmomentdifferenz erklären: Je mehr Ladung in der BF_2 -Gruppe konzentriert wird, desto weiter gelangt man in Richtung langwelliger Flanke der Absorptionsbande. Die Anhäufung an Ladung übt eine zunehmende Kraft auf die π -Elektronen aus und verursacht eine geringere Elektronen-Beweglichkeit samt einer damit verbundenen geringeren Polarisierbarkeit bezüglich des Matrixfeldes. Zusammenfassend scheint der anomale Farbeffekt des induzierten Dipolmoments eine direkte Konsequenz aus dem Farbeffekt des permanenten Dipolmoments zu sein und aus der stückweise anwachsenden Stärke zwischen den Wasserstoffbrücken und der BF_2 -Gruppe des BODIPY-Farbstoffs zu entstehen.

Einfluß der spezifischen strukturellen Eigenschaften der DNA-Systeme

Die Interpretation der charakteristischen spektralen Eigenschaften der verschiedenen BP-DNA-Komplexe basiert auf dem Wasserstoff-Brücken-Model, um den Farbeffekt der permanenten Dipolmoment-Differenz $\Delta\vec{\mu}_0$ besser zu verstehen. In allen Proben wird derselbe Chromophor und das gleiche Lösungsmittel verwendet. Die einzigen Unterschiede bestehen in den verschiedenen Sequenzen des kovalent mit dem Farbstoff verbundenen Oligonucleotids. Konsequenterweise müssen die Unterschiede in den spektralen Eigenschaften ihren Ursprung in den verschiedenen DNA-Sequenzen haben. Im Folgenden werden die absoluten und relativen Werte des Farbeffekts von $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\Delta\vec{\mu}_i$ miteinander verglichen. Die Ergebnisse für $\Delta\vec{\mu}_i$ zeigen keine signifikanten Änderungen, was die absoluten Werte und den Farbeffekt betrifft. Daraus läßt sich schließen, daß die Oligonucleotide nur einen geringen Einfluß auf die lokalen elektrischen Felder am Ort des Chromophores BODIPY nehmen.

Für die permanente Dipolmoment-Differenz ergibt sich ein völlig anderes Bild. Der Farbeffekt im BP-[T₁₀]-Komplex ist der gleiche, wie im freien Chromophor, wenn auch der Betrag von $\Delta\vec{\mu}_0$ ein wenig geringer ausfällt. Die Tendenz eines geringeren $\Delta\vec{\mu}_0$ im Zentrum der inhomogenen Absorptionsbande wird für alle DNA-Sequenzen beobachtet. Der Vergleich von Ergebnissen aus nicht-resonanten Lochbrenn-Experimenten mit der Analyse der in Frage kommenden Schwingungen des Sondenmoleküls konnten als Stappellung der BODIPY-Einheit mit einer Thymin-Base interpretiert werden, wobei zwischen beiden Molekülen Wasserstoff-

brücken-Bindungen ausgebildet werden (120).

Eine Schlußfolgerung ist offensichtlich: Wenn der Farbeffekt von einer Abnahme der H-Brückenstärke innerhalb der inhomogenen Bande herrührt, muß die lokale Geometrie der BODIPY-Sonde in BP-[T₁₀] eine große Variationsbreite besitzen, um die postulierte Vielzahl an H-Brückenstärken zu erklären. Ein so großes Molekül wie BP-[T₁₀] besitzt eine signifikante Konfigurationsentropie. Wasserstoffbrücken zwischen der BF₂-Gruppe und Thymin senkt die Entropie ab. Auf der anderen Seite jedoch besteht zwischen der BF₂-Gruppe und den Lösungsmittelmolekülen eine weniger bevorzugte Änderung der Enthalpie, die letztendlich zu einer deutlich günstigeren Entropieänderung führt. Somit wird der Wettstreit zwischen internen (z.B. mit Thymin) und externen (z.B. mit dem Lösungsmittel) Wasserstoffbrücken deutlich, der schließlich für große Variationsbreiten in struktureller Hinsicht und in den H-Brücken sorgt. Dadurch erhält das Molekül genügend Freiraum, seine elektrostatischen Eigenschaften innerhalb der inhomogenen Bande zu verändern, wie sich auch in den Lochbrenn-Experimenten zeigt.

Die beiden Haarnadelstrukturen BP-[CGCGT₄CGCG] (7) zeigen einen deutlich schwächeren Farbeffekt als der freie Chromophor und BP-[T₁₀] mit seiner unstrukturierten linearen Kette. Offenbar ist es für diese Oligonucleotid-Komplexe schwieriger, die Stärke der H-Brücken an der BF₂-Untereinheit zu verändern. Für BP-HD-A ist dieses Verhalten aufgrund seiner vorgeschlagenen Struktur leicht zu verstehen (siehe Abb. 5.3 (c)). Der Chromophor BP wird dort durch die DNA-Kette umschlungen und zu einem gewissen Teil vom Lösungsmittel abgeschirmt. Das betrifft folglich die Affinität der Wasserstoff-Brücken, da ein Austausch von freien Wassermolekülen unterbunden wird.

Im entsprechenden Haarnadelkomplex BP-[CGCGT₄CGCG]-B (siehe Abb. 5.3 (d)), der eine vollständige Watson-Crick-Basenpaarung eingeht, ist der Farbeffekt und auch der Betrag von $\Delta\vec{\mu}_0$ stärker als in BP-HD-A. Dieses Verhalten läßt sich auch mit dem vorgeschlagenen Wasserstoffbrücken-Modell vereinbaren, denn im BP-HD-B-Komplex ist die BF₂-Gruppe des Sondenmoleküls BP dem Lösungsmittel stärker preisgegeben und ermöglicht dementsprechend eine leichtere Wechselwirkung mit den Wassermolekülen des Lösungsmittels als im BP-HD-A-Komplex.

Der Thrombin-Aptamer-Komplex (8) zeigt im Vergleich mit den bisher betrachteten Farbstoff-DNA-Systemen ein unterschiedliches elektrostatisches Verhalten: Während der Farbeffekt am schwächsten ist, nimmt der Betrag von $\Delta\vec{\mu}_0$ am Absorptionsmaximum der inhomogenen Bande ν_0 den größten Wert an. Desweiteren ist $\Delta\vec{\mu}_i$ deutlich geringer als $\Delta\vec{\mu}_0$ und innerhalb der gesamten inhomogenen Bande nahezu konstant. Auch diese Beobachtung läßt sich in guter Übereinstimmung mit dem H-Brücken-Modell erläutern: Die Farbeffekte in $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\Delta\vec{\mu}_i$ deuten auf ein gegensätzliches korreliertes Verhalten hin. Ein schwacher positiver Farbeffekt

Probe	$f \cdot \Delta\mu_0/\nu$ in $10^{-3}\text{D}/\text{cm}^{-1}$	$\nu_{vac}^{E,0}$ in cm^{-1}	$f \cdot \Delta\mu_i/\nu$ in $10^{-3}\text{D}/\text{cm}^{-1}$	$\nu_{vac}^{E,i}$ in cm^{-1}
BP	-2.78 ± 0.20	17501	0.49 ± 0.39	14585
BP-[T ₁₀]	-3.00 ± 0.22	17373	0.30 ± 0.43	13042
BP-HD-A	-1.31 ± 0.20	17863	0.38 ± 0.61	13896
BP-HD-B	-2.34 ± 0.30	17401	1.10 ± 0.62	15854
BP-Apt	-1.03 ± 0.30	18293	0.08 ± 0.29	27998

Tabelle 5.3: Starkeffekt-Resultate der verschiedenen BP-DNA-Komplexe: Stärke des Farbeffekts für $\Delta\vec{\mu}_0$ bzw. $\Delta\vec{\mu}_i$ in Debye/ cm^{-1} sowie die jeweiligen elektrostatischen Vakuumfrequenzen in cm^{-1} .

von $\Delta\vec{\mu}_0$ korreliert mit einem schwachen negativen Farbeffekt von $\Delta\vec{\mu}_i$.

Die typische dreidimensionale Struktur des Thrombin-Aptamers, die an einen Schaukelstuhl erinnert, wird durch eine positive Ladung im Zentrum zwischen den beiden Guanin-Quartett-Ebenen stabilisiert (siehe Abb. 5.3 (e)). Diese Ladung beeinflusst den Starkeffekt in der Weise, daß durch sie ein starkes lokales Feld erzeugt wird. Zwischen dieser positiven Ladung und der negativ geladenen BF_2 -Gruppe des Sondenmoleküls besteht eine attraktive Wechselwirkung und sorgt für eine teilweise Ausrichtung der BF_2 -Untereinheit. Mit anderen Worten wird der Konformationsphasenraum des Farbstoffmoleküls BODIPY verringert und wirkt der Bildung von H-Brücken mit Lösungsmittelmolekülen entgegen. Aus diesem Grunde wird auch nur ein schwacher Farbeffekt von $\Delta\vec{\mu}_0$ beobachtet. Die starke Polarisation der π -Elektronen durch die nahe Punktladung bedingt den höheren Betrag von $\Delta\vec{\mu}_0$. Desweiteren ist die starke Coulomb-Wechselwirkung als Ursache der deutlich bathochromen Verschiebung des gesamten Absorptionsspektrums von etwa 300 cm^{-1} zu sehen. Eine weitere interessante Beobachtung betrifft die inhomogene Breite des BP-Aptamer-Systems, die signifikant größer als in den anderen Proben ist. Eine Zunahme der inhomogenen Breite ist direkt mit einer entsprechenden Zunahme der Lösungsmittelverschiebung verknüpft. Dies impliziert jedoch eine durch relative Umlagerungen von Ladung und Farbstoff verursachte große strukturelle Dispersion, die schließlich zu der markanten spektralen Dispersion führt.

Kurze Zusammenfassung

Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Sondenmolekül BODIPY und den kovalent damit verknüpften unterschiedlichen Oligonucleotiden werden in einer speziellen Art und Weise von der Abfolge der Nucleotide (Primärstruktur) und dem darausfolgenden räumlichen Aufbau (Tertiärstruktur) beeinflusst. Mit der Methode des Starkeffekts spektraler Löcher konnten diese Wechselwirkungen detailliert untersucht werden. Erstmals wurde für die permanente Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ eine Frequenzabhängigkeit (Farbeffekt) beobachtet, dessen Stärke von der jeweiligen DNA-Probe abhängig war (132). Für die Interpretation des Farbeffekts wurden unterschiedlich starke Wasserstoff-Brücken herangezogen, die zwischen Farbstoff und seiner Umgebung ausgebildet werden. Die Stärke dieser Brückenbindungen, ausgehend von der polaren Seite des Sondenmoleküls, nehmen stückweise von der bathochromen zur hypsochromen Seite der inhomogenen Bande ab und führen demzufolge zu einer stetigen Zunahme der relevanten Dipolmomente.

5.4 Druckeffekt

Alle Druckeffekt-Experimente der BP-DNA-Komplexe fanden bei einer Temperatur von 2 K statt. Für die Erzeugung der spektralen Löcher wurden typische Laserleistungen in der Größenordnung von μW benutzt, während für den Ausleseprozeß stets Lichtleistungen im nW-Bereich verwendet wurden. Die relative Tiefe der Lochspektren bewegte sich in einem Rahmen von 30 bis 60% und war von der jeweils untersuchten DNA-Probe sowie der Brennfrequenz innerhalb der inhomogenen Absorptionsbande abhängig. In den Experimenten wurden die BP-DNA-Systeme mit hydrostatischen Drücken mittels Heliumgas von bis zu 1.6 MPa beaufschlagt. Dadurch ergaben sich perfekt lineare druckinduzierte Verschiebungen der Lochspektren mit ihren entsprechenden Verbreiterungen (siehe Abb. 5.11 (b) und (c)). Alle Proben wurden in kleine Plastikbeutelchen eingeschweißt, um eine isotrope Druckverteilung in der Druckzelle zu gewährleisten.

Während alle Anfangslöcher einer Meßreihe mit Lorentzprofilen angepaßt werden können, entwickeln sich die druckinduzierten Lochspektren mit einem gaußförmigen Druckkern (siehe Gleichung 2.18 auf S. 24) weiter und benötigen zur exakten Beschreibung der Lochform, also der Verschiebung s_p und Verbreiterung σ_p , aus diesem Grunde voigtförmige Lochprofile für die Fitprozedur. Die Druckverbreiterung σ_p bezieht sich auf die Wendepunkte des Voigtprofils.

Molekulare Wechselwirkungen der BP-DNA-Komplexe

Wirft man einen Blick auf Abb. 5.3, dann wird einem die große Anzahl an unterschiedlichen molekularen Wechselwirkung bewußt, die sich zwischen dem Chromophor BODIPY und seiner jeweiligen Umgebung ausbilden können. Das Sondenmolekül selbst besitzt aufgrund seiner stark polaren BF_2 -Gruppe ein starkes Dipolmoment. Die DNA-Ketten tragen eine negative Gesamtladung. Die beiden Guanin-Quartett-Strukturen BP-Apt und BP-Tel werden durch positive Ionen stabilisiert (121). Zwischen dem Farbstoff und seinen benachbarten Lösungsmittelmolekülen bestehen eine Vielzahl an unterschiedlichen Wechselwirkungen: Elektrostatische und signifikante disperive Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Wie die meisten aromatischen π -Elektronensysteme besitzt auch der BODIPY-Chromophor einen hydrophoben Charakter². Diese verschiedenartigen Wechselwirkungstypen beeinflussen auch auf irgendeine Weise sowohl die Lösungsmittelverschiebung als auch die inhomogene Linienbreite der untersuchten DNA-Proben. Solange die Orientierung der Dipole willkürlich ist, tragen sowohl Dipol-Dipol-, als auch Ion-Dipol-Wechselwirkungen *nicht* zur Lösungsmittelverschiebung bei. Zwei Gründe, für eine Brechung einer isotropen Symmetrie, können aber geltend gemacht werden: Die Existenz von strukturellen Korrelationen zwischen Chromophor und DNA sowie eine Polarisierung des Lösungsmittels durch das Farbstoffmolekül. Die Energieskala für die Polarisierung des

²Die hydrophobe Natur des freien Chromophors BODIPY^{581/591} wurde auch durch die schwere Löslichkeit in Wasser bei der Herstellung der BP-Probe deutlich.

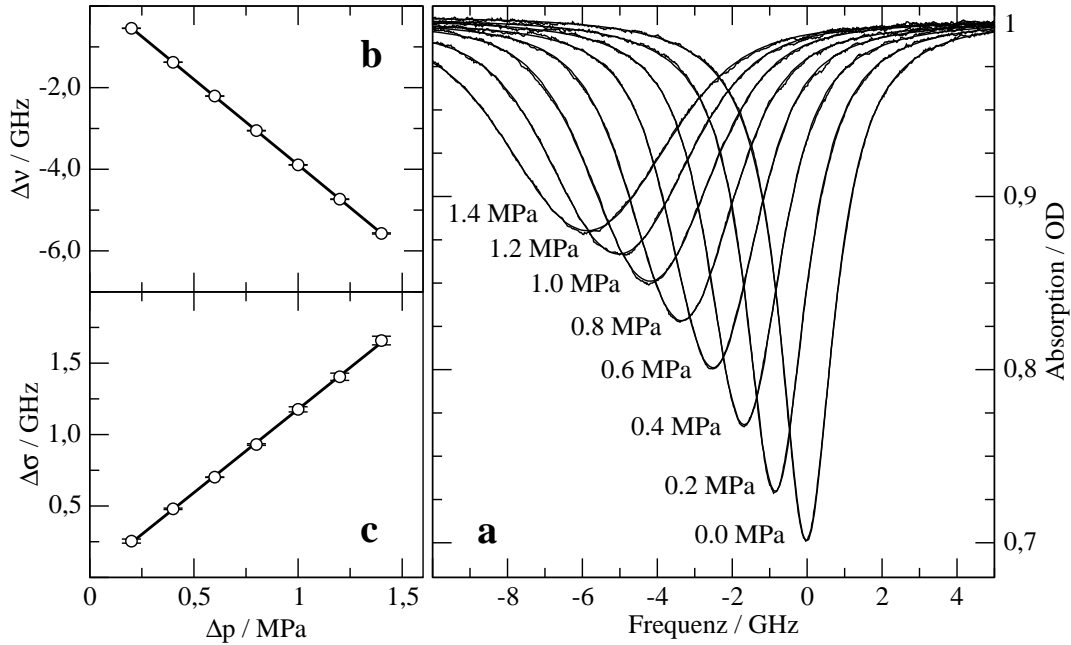


Abbildung 5.11: (a) Verhalten eines spektralen Lochs unter Druck. Die angegebenen Werte beziehen sich auf Atmosphärendruck. (b) Die Verschiebung der Zentrumsfrequenz des spektralen Lochs sowie die entsprechende Verbreiterung (c) verhalten sich perfekt linear mit zunehmenden Druck. Das hier präsentierte Beispiel wurde an BP-[T₁₀] bei einer Wellenlänge von 16713 cm⁻¹ in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K aufgenommen.

Lösungsmittels wird durch die Glasübergangstemperatur T_g bestimmt, da für niedrigere Temperaturen die Moleküle eingefroren sind und eine weitere Ausrichtung unmöglich wird. Für den Fall der dominierenden Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Sondenmolekül und Lösungsmittel wurde von R. F. Loring (133) eine einfache Beziehung zwischen dem Quadrat der inhomogenen Breite σ_0^2 und der Lösungsmittelverschiebung s_0 aufgestellt:

$$\frac{\sigma_0^2}{s_0} = kT_g \frac{|\Delta\vec{\mu}|^2}{\vec{\mu}_0\Delta\vec{\mu}} \quad (5.1)$$

$\Delta\vec{\mu}$ beschreibt die Änderung des Dipolmoments der Lösung nach elektronischer Anregung. Das entsprechende Dipolmoment im Grundzustand wird mit $\vec{\mu}_0$ bezeichnet. Die Polarisierung des gelösten Stoffes durch das Lösungsmittel wird von einer Dipol-induzierte Dipol-Wechselwirkung bestimmt, die ebenso wie die Dispersionswechselwirkung einer R^{-6} Abstandsabhängigkeit gehorcht. Repulsive Wechselwirkungen sollen für die Beschreibung der gegenwärtigen Experimente außer Acht gelassen werden, da hierfür nur zum Chromophor benachbarte Moleküle in Frage kommen, diese aber relativ zum Chromophor in einem Potentialminimum sitzen und somit erst in höherer Ordnung (in Δp) zum Druckeffekt

Probe	σ_0 in cm^{-1}	s_0 in cm^{-1}	$(s_p(\nu_0)/\Delta p)$ in GHz/MPa	σ_0^2/s_0
BODIPY	370	865	-4.75	158
BP-[T ₁₀]	409	1081	-4.32	155
BP-HD-A	366	909	-4.55	147
BP-HD-B	378	957	-4.88	149
BP-Apt	520	1425	-5.18	190
BP-Tel	514	1509	-5.05	175

Tabelle 5.4: Inhomogene Breite σ_0 , mittlere Lösungsmittelverschiebung s_0 mit $s_0 = |\nu_0 - \nu_{vac}|$, mittlere Druckverschiebung $(s_p(\nu_0)/\Delta p)$ und das Verhältnis σ_0^2/s_0 der verschiedenen Farbstoff-DNA-Komplexe.

beitragen.

In Abb. 5.11 ist der Druckeffekt spektraler Löcher für BP-[T₁₀] gezeigt, der repräsentativ für alle BP-DNA-Komplexe steht. Die Anwendung hydrostatischer Drücke bewirkt neben einer bathochrome Verschiebung der Lochspektren von etwa 4 GHz/MPa eine zusätzliche Lochverbreiterung von ca. 1 GHz/MPa (siehe Abb. 5.11 (a)). Sowohl Verschiebung (Abb. 5.11 (b)) als auch Verbreiterung (Abb. 5.11 (c)) zeigen ein exakt lineares Verhalten mit ansteigenden Drücken. Diese bathochromen Druck-Verschiebungen werden für alle untersuchten Chromophor-DNA-Systeme beobachtet. Die entsprechenden Werte im Absorptionsmaximum der inhomogenen Bande $(s_p(\nu_0)/\Delta p)$ verhalten sich für die verschiedenen DNA-Proben erstaunlich konstant (siehe Tab. 5.4).

In Abb. 5.12 bis 5.17 sind neben den inhomogenen Absorptionsspektren auch die frequenzabhängige Druck-Verschiebung sowie -Verbreiterung der verschiedenen Chromophor-DNA-Systeme dargestellt. Gemäß der Vorhersage durch die Laird-Skinner-Theorie nimmt die normalisiert Druck-Verschiebung für alle untersuchten Fällen in lineare Weise mit fallenden Wellenzahlen ab. Die Steigung der jeweiligen Gerade ist für die verschiedenen Komplexe charakteristisch. Die normalisierten Druck-Verbreiterungen stehen jedoch im Gegensatz zur Vorhersage der Laird-Skinner-Theorie, da sie eine signifikante Frequenzabhängigkeit aufweisen. Für manche DNA-Proben (z.B. BP-HD-B) ist diese Abhängigkeit durchaus stark, während wiederum andere DNA-Systeme (z.B. BP-Apt, BP-Tel) nur eine schwache Ausprägung zeigen. Diese Frequenzabhängigkeit in der Druck-Verbreiterung weist auf einen Zusammenbruch der Gaußschen Näherung hin. In allen Fällen nimmt die Druck-Verbreiterung zur langwelligen Seite der inhomogenen Absorptionsbande zu.

Aufgrund des exakt linearen Verhaltens der Druck-Verschiebung mit der Frequenz, lassen sich für alle BP-DNA-Komplexe Vakuumfrequenzen (oder Wellenzahlen) ν_{vac} bestimmen, an der die Druck-Verschiebung gerade verschwindet.

Probe	κ in GPa $^{-1}$	ν_{vac} in cm $^{-1}$
BODIPY	0.092	17664
BP-[T ₁₀]	0.066	17888
BP-HD-A	0.084	17704
BP-HD-B	0.085	17672
BP-Apt	0.061	17913
BP-Tel	0.056	18064

Tabelle 5.5: Kompressibilitäten κ und Vakuumwellenzahlen ν_{vac} der verschiedenen Farbstoff-DNA-Systeme, die aus den Lochbrenn-Experimenten ermittelt wurden.

Mit Hilfe dieser Frequenz ν_{vac} und dem Absorptionsmaximum der entsprechenden inhomogenen Bande ν_0 ergibt sich die mittlere Lösungsmittelverschiebung zu $s_0 = |\nu_0 - \nu_{vac}|$. Während für die beiden G-Quartett-Strukturen Werte von etwa 1500 cm $^{-1}$ erreicht werden, liegen alle anderen Strukturen bei etwa 1000 cm $^{-1}$. Die entsprechenden Parameter werden zusammen mit σ_0 , $(s_p(\nu_0)/\Delta p)$ und σ_0^2/s_0 in Tab. 5.4 aufgeführt. Die jeweiligen Kompressibilitäten κ und Vakuumwellenzahlen ν_{vac} können Tab. 5.5 entnommen werden.

Die dominante Wechselwirkung in BODIPY

Die Starkeffekt-Experimente an den unterschiedlichen BP-DNA-Komplexen und das zu deren Interpretation notwendige Wasserstoff-Brücken-Modell bilden auch die Grundlage für die Diskussion der Druckeffekt-Resultate. Wie bereits zuvor angesprochen, scheint der repulsive Anteil des Potential bei der Interpretation des Druckeffekts keine führende Rolle zu spielen, da davon nur die nächsten Nachbarmoleküle um den Chromophor betroffen würden. Diesbezüglich spielen nur die Terme der zweiten Ableitung der entsprechenden Druckstörung eine Rolle, die auch vernachlässigt werden können. Aufgrund dieser Überlegungen hat die Beeinflussung des Drucks auf die Verschiebung der spektralen Löcher seinen Ursprung im attraktiven Teil des Potentials und führt im freien Farbstoff zu einer Dipol-induzierten Dipol-Wechselwirkung, die mit der Entfernung von der Probe mit R^{-6} abfällt. Eine zusätzliche Verteilung der Dispersions-Wechselwirkung beeinflusst die Abstandsabhängigkeit in keiner Weise. Somit kann mit Hilfe der Beziehung $s_p = (n/3) \cdot \kappa \cdot (\nu - \nu_{vac})$ die Größe κ aus der Geradensteigung in Abb. 5.11 (b) ermittelt werden. Für alle BP-DNA-Komplexe ergeben sich für die lokale Größe κ Werte von etwa 0.1 GPa $^{-1}$, die im Rahmen für bereits bekannte Materialien wie organische Gläser, Polymere und Biopolymere (4; 18) liegen. Da κ von den jeweiligen Details der Wechselwirkungen und dem verwendeten Model abhängt, ist es besser, von einer apparenten Kompressibilität zu sprechen.

Desweiteren läßt sich aus den Druckeffekt-Experimenten mit dem Wissen der Vakuumwellenzahl ν_{vac} die mittlere Lösungsmittelverschiebung s_0 bestimmen (siehe Tab. 5.5). Sie liegt in der Größenordnung von etwa 1000 cm $^{-1}$ und besitzt eine

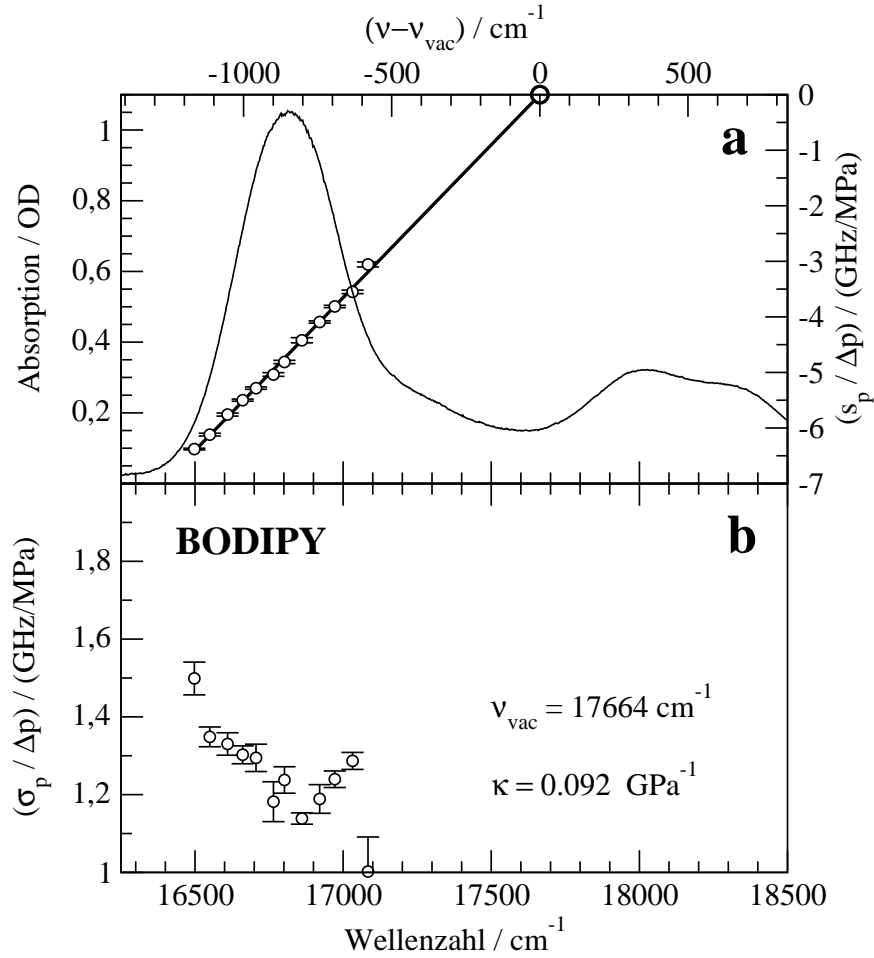


Abbildung 5.12: Absorptionsspektrum, Druckverschiebung ($s_p/\Delta p$) sowie Breite ($\sigma_p/\Delta p$) des gaußförmigen Druckkerns als Funktion der Brennwellenzahl. Der freie Chromophor BODIPY (BP) in einem Wasser-Glycerin Glas bei 2 K.

bathochrome Verschiebung. Ist die Wechselwirkung zwischen Sondenmolekül und Lösungsmittel elektrostatischer Natur, ergibt sich eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen nur dann, wenn das Dipolmoment im angeregten Zustand $\vec{\mu}_0^*$ mehr oder weniger parallel zu dem Dipolmoment im Grundzustand $\vec{\mu}_0$ ausgerichtet ist. In allen anderen Fällen würde man eine hypsochrome Verschiebung erwarten (30; 31). Mit Gleichung 5.1 auf S. 122 ist es nun möglich, die Änderungen des Dipolmoments nach elektronischer Anregung zu berechnen: Sind die beiden Vektoren $\vec{\mu}_0$ und $\Delta\vec{\mu}_0$ größtenteils parallel angeordnet, kann die Loring-Gleichung 5.1 folgendermaßen vereinfacht werden:

$$\frac{\sigma_0^2}{s_0} = kT_g \frac{\Delta\mu}{\mu_0} \quad (5.2)$$

Verwendet man hierfür die spezifischen Größen des BODIPY-Chromophors, nämlich $\sigma_0 = 355 \text{ cm}^{-1}$, $s_0 = 850 \text{ cm}^{-1}$ (siehe Abb. 5.12 (a) und (b) und $kT_g =$

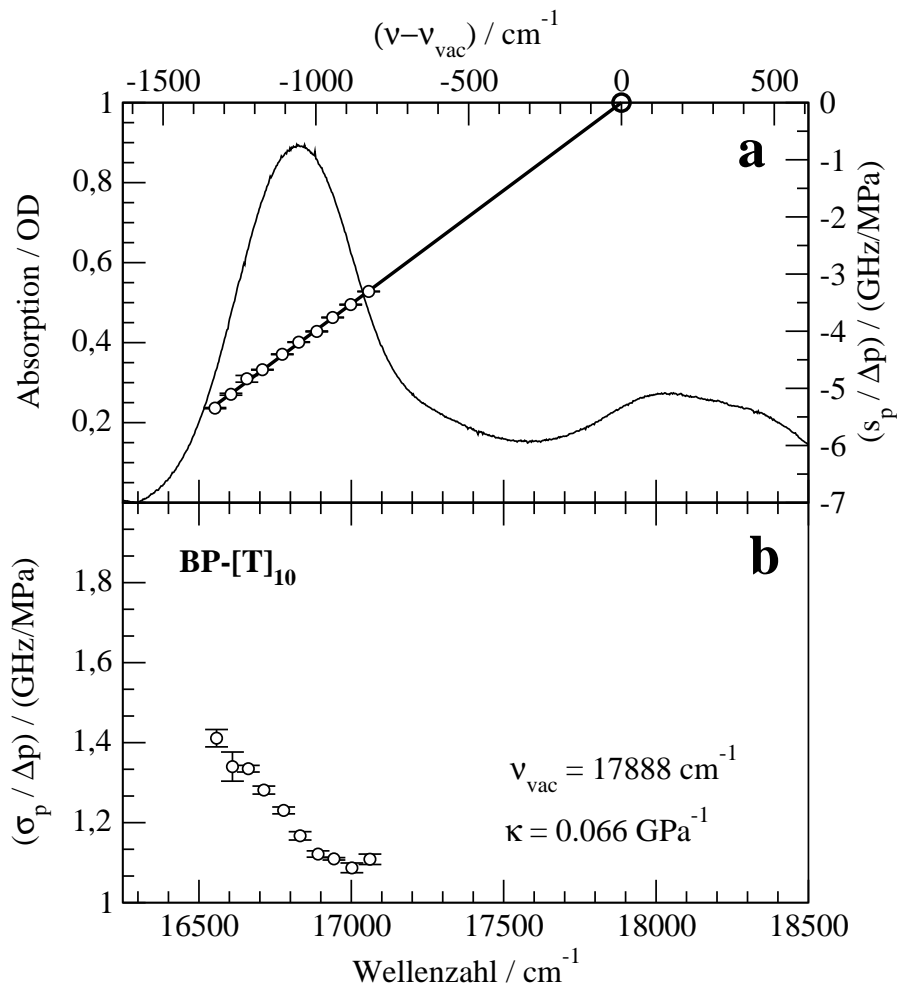


Abbildung 5.13: Wie Abb. 5.12. Das Sondenmolekül BP ist kovalent an die unstrukturierte lineare Kette aus zehn Thymin-Nucleotiden gebunden: BP-[T]₁₀.

140 cm^{-1} (mit der Annahme, daß sich für Wasser-Glycerin die Glasübergangstemperatur bei etwa 200 K befindet), ergibt sich für das Verhältnis $\Delta\mu/\mu_0$ ein Wert von etwa 1. Im Mittel ist also das Dipolmoment im angeregten Zustand etwa zweimal größer, als das entsprechende Grundzustands-Dipolmoment.

Eine markante Änderung des Dipolmomentes nach optischer Anregung geht häufig mit einer großen Elektron-Phonon-Kopplung einher und kann durch eine Anregung in einen vorzugsweise hochangeregten Phononzustand des Gitters gedeutet werden. In diesem Falle wird die relative Intensität der Nullphononenlinie (der Debye-Waller-Faktor) sehr niedrig und schmale Lochbreiten können beim spektralen Lochbrennen erwartet werden (134). Obwohl in den spektroskopischen Experimenten mit den BP-DNA-Komplexen ein sehr effizienter Lochbrenn-Prozess beobachtet wurde, besteht jedoch kein Widerspruch zu einer großen Änderung des

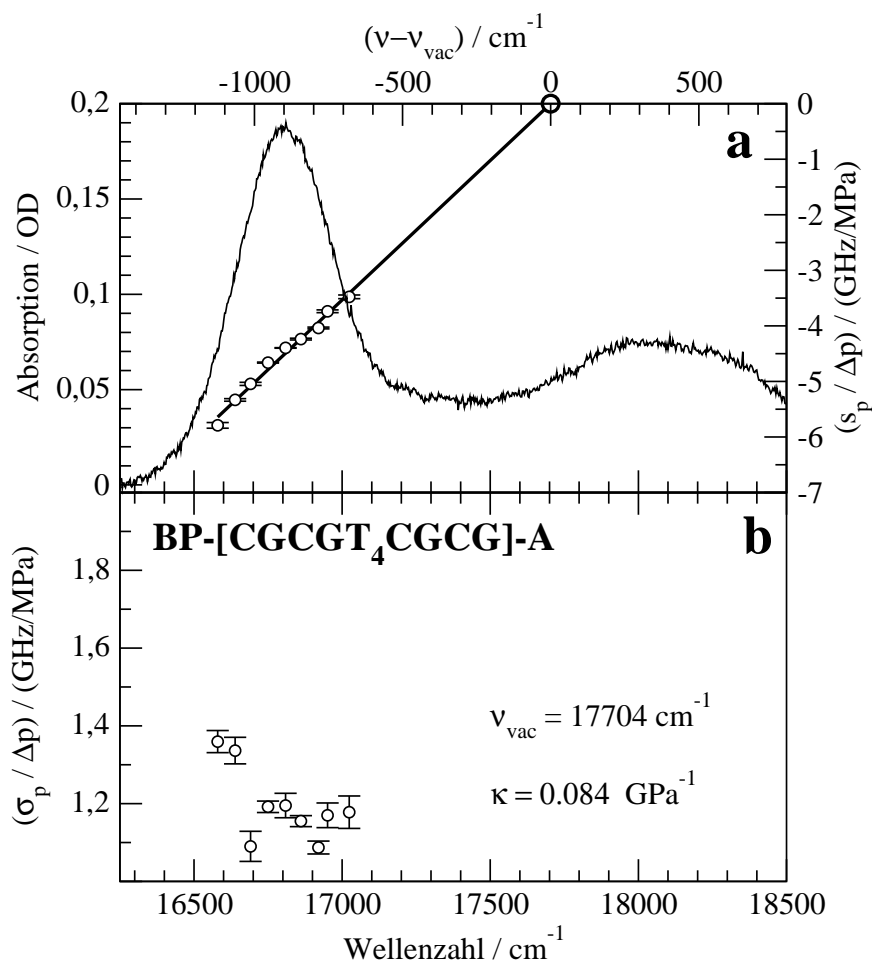


Abbildung 5.14: Wie Abb. 5.12. Kovalente Verknüpfung des Farbstoffs BP an das Oligonucleotid [CGCGT₄CGCG]: BP-HD-A.

Dipolmoments nach elektronischer Anregung, solange nur $\Delta\vec{\mu}$ und $\vec{\mu}_0$ parallel ausgerichtet und $\vec{\mu}_0$ genügend groß ist. Die Änderung der Gleichgewichtsposition der Lösungsmittelmoleküle ist deswegen im angeregten Zustand des Sondenmoleküls ziemlich moderat, da sie bereits hoch polarisiert vorliegen und die entsprechende Orientierung sich nicht ändert. Je größer der Chromophor ist, desto geringer ändern sich die Gleichgewichtslagen der Gitterkoordinaten.

DNA-Komplexe unter Druck

Obwohl die Beziehungen für Druck-Verschiebung bzw. -Verbreiterung des Laird-Skinner-Modells für ein apolares Molekül in einem apolaren Lösungsmittel berechnet wurden, können sie als Richtlinie auch für die bei weitem komplexeren Wechselwirkungen der DNA-Proben herangezogen werden. Betrachtet man die experimentellen Daten zu den BP-DNA-Komplexen näher, werden neben einigen Gemeinsamkeiten auch spezifische Unterschiede sichtbar. Zunächst gilt für

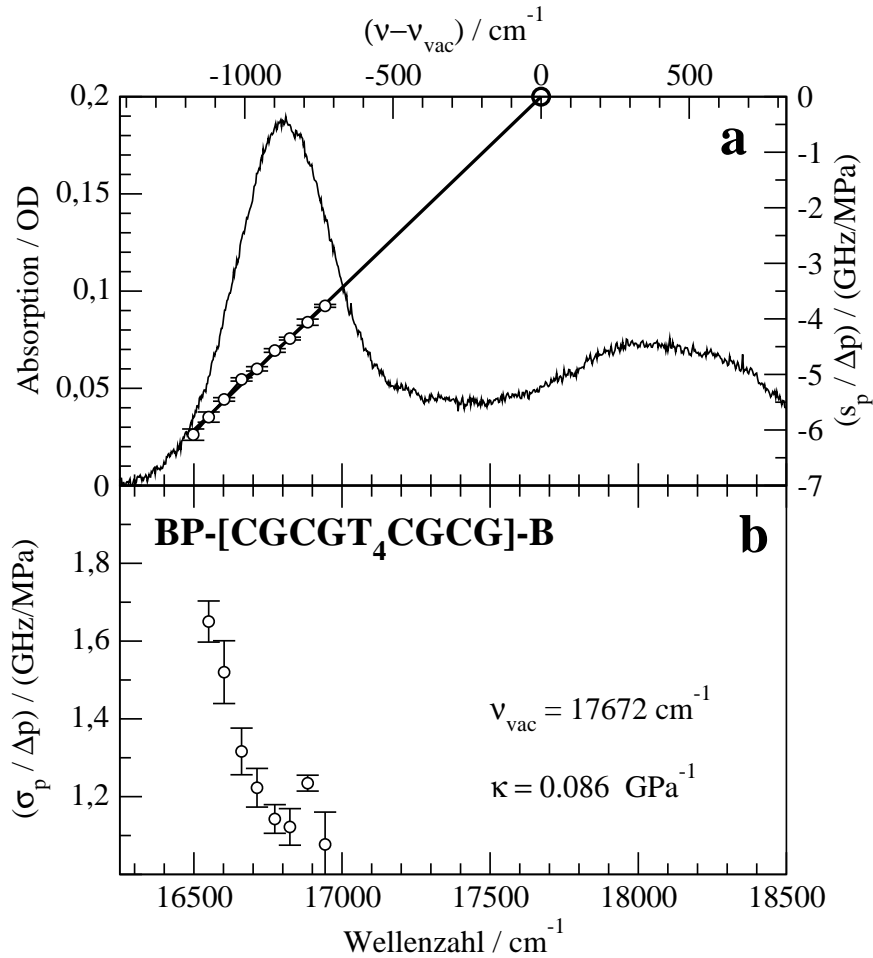


Abbildung 5.15: Wie Abb. 5.12. Kovalente Verknüpfung des Farbstoffs BP an das Oligonucleotid [CGCGT₄CGCG]: BP-HD-B.

alle DNA-Proben eine bemerkenswerte Linearität in Δp und ν . Diese Linearität verbunden mit der Beobachtung, daß die spektralen Löcher unter Anwendung hydrostatischen Drucks keine Aufspaltung zeigen, läßt folgenden Schluß zu: Die jeweiligen optischen Banden bestehen *nicht* aus einer Überlagerung von einigen wenigen, strukturell unterschiedlichen Spezies. Eine weitere Gemeinsamkeit betrifft die mittlere Druckverschiebung $(s_p(\nu_0)/\Delta p) = (n/3) \cdot \kappa \cdot |\nu_0 - \nu_{\text{vac}}|$ der verschiedenen BP-DNA-Systeme: Wie aus Tabelle 5.4 zu entnehmen, zeigen sich für alle Proben ähnliche Werte, die sich innerhalb eines Rahmens von $\pm 10\%$ bewegen. Ähnliches gilt für σ_0^2/s_0 in Gleichung 5.2, dessen Maxima um $\pm 17\%$ variieren. Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß sich die Druck-Verschiebungen aller DNA-Komplexe auf dieselbe Haupt-Wechselwirkung zurückführen lassen.

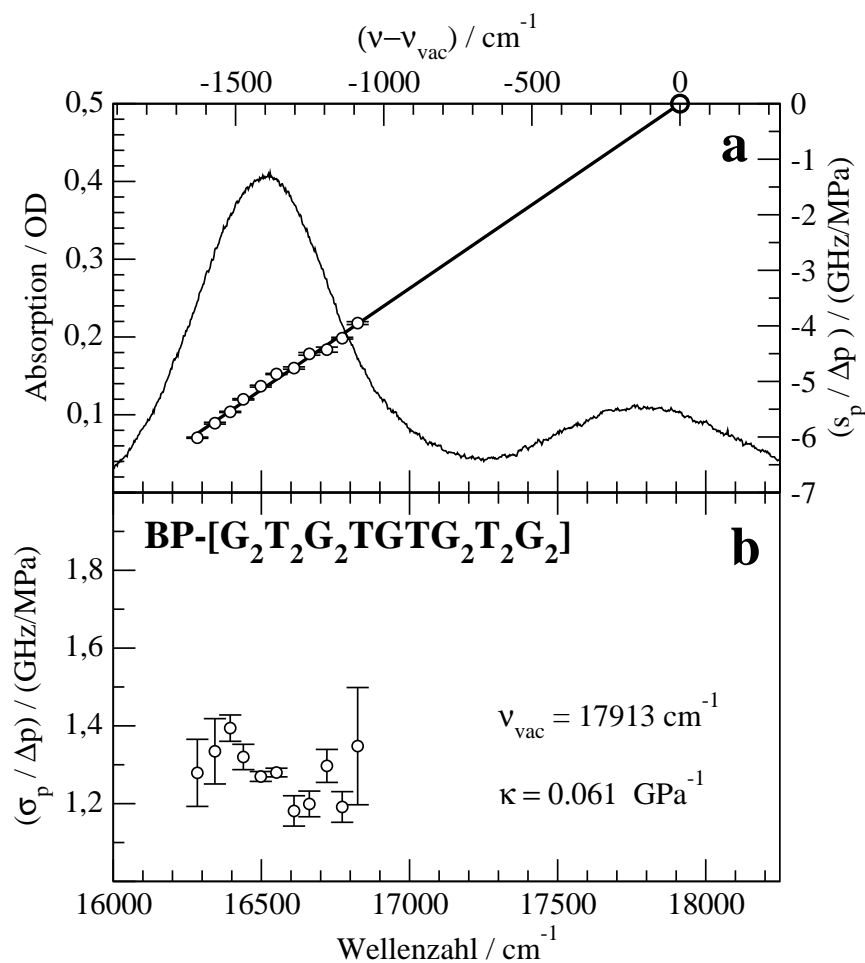


Abbildung 5.16: Wie Abb. 5.12. Kovalente Verknüpfung des Farbstoffs BP mit dem Oligonucleotid der Sequenz [G₂T₂G₂TGTG₂T₂G₂]: BP-Apt.

Unterschiede lassen sich beispielsweise für die Steigungen der frequenzabhängigen Größen in den Druckeffekt-Messungen finden. Die jeweiligen Schwankungen machen zum Teil mehr als 60% aus. Da in allen Experimenten das gleiche Lösungsmittel und das gleiche Sondenmolekül verwendet wurde, müssen die unterschiedlichen spektralen Eigenschaften von den kovalent an den Chromophor gebundenen DNA-Sequenzen stammen. Für die Verbindung der individuellen Merkmale der Farbstoff-DNA-Komplexe mit der Druckabhängigkeit der spektralen Löcher bestehen mehrere Möglichkeiten:

1. Änderung der Kompressibilität κ : In diesem Fall muß allerdings berücksichtigt werden, daß κ als lokale Größe die elastischen Eigenschaften der Umgebung des Sondenmoleküls widerspiegelt und dessen Skala durch die Reichweite der relevanten Wechselwirkungen bestimmt wird. Die Nahumgebung kann sogar durch den Einfluß der Sonde modifiziert werden. Größere Anteile der Nucleotid-Sequenz befinden sich sicherlich innerhalb dieses Be-

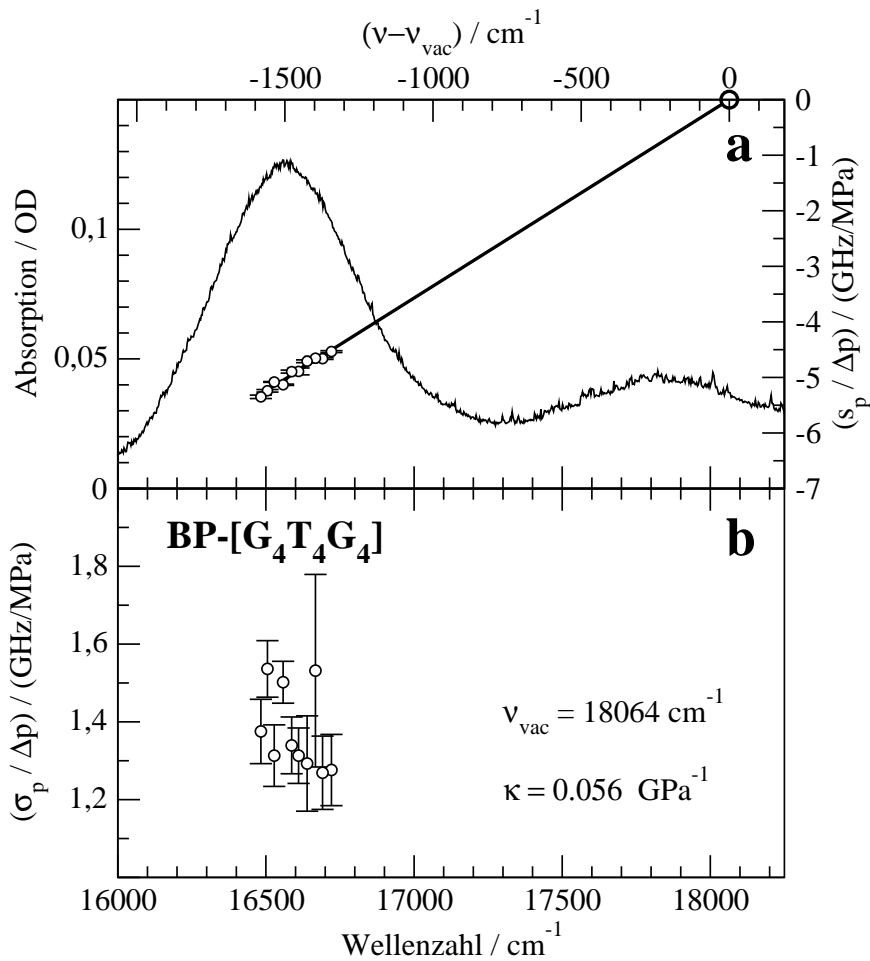


Abbildung 5.17: Wie Abb. 5.12. Kovalente Verknüpfung des Farbstoffs BP an das Oligonucleotid [G₄T₄G₄]: BP-Tel.

reichs und auch wenn einige der DNA-Stränge eine lockere Struktur besitzen, kann der Komplex komprimiert werden und die gemessene Kompressibilität beeinflussen.

2. Änderung der auf Druck sensibel reagierenden Wechselwirkung.
3. Änderung der Korrelation zwischen $\alpha(R)$ und $\nu(R)$, beschrieben durch den Korrelationsfaktor $\langle \alpha \cdot \nu \rangle$. Dies wäre beispielsweise der Fall, wenn Druck-Verschiebung und Lösungsmittel-Verschiebung teilweise unabhängig voneinander wären.

In den Lochbrenn-Experimenten ist nicht der absolute Wert von κ von Interesse, sondern die relative Änderung zwischen den untersuchten DNA-Strängen. Wie aus Tab. 5.5 ersichtlich ist, sinkt die Geradensteigung ausgehend von dem freien Chromophor BODIPY zu den relativ stabilen G-Quartett-Strukturen stetig ab

(siehe Abb. 5.12 bis 5.17). Der signifikante Beitrag von $\nu(R)$ in den G-Quartett-Strukturen rührt von den lokalen elektrischen Feldern der zur Stabilisierung der hochgeordneten Biomoleküle notwendigen Metall-Ionen her. Sie steuern einen erheblich Beitrag zur Lösungsmittelverschiebung bei. Dies ist aus der entsprechend markanten bathochromen Verschiebungen in Bezug auf die anderen DNA-Systeme ersichtlich (siehe Abb. 5.4). Zudem sind sie auch mit einem nicht zu vernachlässigendem Anteil an der Zunahme der inhomogenen Linienbreite beteiligt. Allerdings wird die durch die positiven Metall-Ionen hervorgerufene Wechselwirkung wahrscheinlich nur geringfügig von den in den Experimenten verwendeten kleinen Drücke modifiziert, da sich die Ionen innerhalb der starren Quadruplex-Strukturen (siehe Abb. 5.3 (e) und (f)) befinden. Die bemerkenswert konstanten Werte der mittleren Druck-Verschiebung ($s_p(\nu_0)/\Delta p$) innerhalb der untersuchten BP-DNA-Komplexe (siehe Tabelle 5.4) zeigen, daß die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Lösungsmittel kaum geändert werden.

Interessanter Weise unterscheiden sich die Farbeffekte von BP-HD-A und BP-HD-B nur marginal von dem entsprechenden Farbeffekt des freien Chromophors BODIPY (siehe Tab. 5.5). Offenbar wird das Sondenmolekül nur schwach von den DNA-Strängen abgeschirmt. Ganz anders verhält es sich dagegen mit BP-[T_{10}]: Die lokale Kompressibilität ist deutlich schwächer. Dies könnte auf strukturelle Ursachen zurückzuführen sein: Die Analyse von entsprechenden Normalschwingungsmoden deuten auf eine Wechselwirkung des Chromophors mit den Nucleotiden der eigenen DNA-Sequenz in Form einer Stapelung der BF_2 -Einheit von BP mit einer Thymin-Base hin (120). Ein niedriger Wert der lokalen Kompressibilität des BP-[T_{10}]-Komplexes wird somit vermutlich durch eine teilweise Abschirmung des Sondenmoleküls vom Lösungsmittel verursacht.

Vergleiche zwischen Stark- und Druckeffekt

Natürlich ist es interessant, die Frequenzabhängigkeit von Stark- und Druckeffekt miteinander zu vergleichen. Zunächst zeigen beide Methoden ein paralleles Verhalten: Eine lineare Frequenzabhängigkeit begleitet von einer bathochromen Erniedrigung des Effekts innerhalb der inhomogenen Absorptionsbande. Desweiteren werden für diese beiden Methoden auch charakteristische Unterschiede bezüglich der jeweiligen kovalent verknüpften DNA-Sequenz beobachtet. Betrachtet man allerdings die einzelnen Geradensteigungen der unterschiedlichen DNA-Proben miteinander, so ergeben sich nicht immer parallele Verhaltensweisen. Beispielsweise ist der Farbeffekt für BP-[T_{10}] im Vergleich zum freien Chromophor BP in einem externen elektrischen Feld stärker ausgeprägt, als für die Anwendung eines hydrostatischen Drucks. Für die beiden Haarnadelstrukturen BP-HD-A und BP-HD-B verhält es sich gerade umgekehrt. Mit beiden Methoden werden für die G-Quartett-Strukturen BP-Apt und BP-Tel jeweils die geringsten Farbeffekt erzielt.

Welche Erkenntnisse können aus einem solchen Verhalten gewonnen werden?

Die Frequenzabhängigkeit des Starkeffekts der untersuchten BP-DNA-Komplexe äußerte sich in einer bathochromen Zunahme des permanenten Dipolmoments und zeigt eine gewisse Sensitivität auf die Eigenschaften des Sondenmoleküls BODIPY. Durch den Farbeffekt in der Druck-Verschiebung wird im einfachsten Fall die lokale Kompressibilität κ als Eigenschaft des Lösungsmittels beschrieben. Natürlich besteht kein zwingender Grund, daß diese beiden Eigenschaften strikt miteinander korreliert sind. Dies wird auch durch die bereits erwähnten Variationen im Verhalten der DNA-Proben für Stark- und Druckeffekt deutlich. Dennoch kann ein übergeordneter Parallelismus ausgemacht werden. Da in der einfachsten Form ein Zusammenhang zwischen Druck- und Lösungsmittel-Verschiebung besteht (siehe Gleichung 2.29), bewirkt deren Zunahme für konstante molekulare Kopplungsparameter eine geringere Distanz zwischen Sonden- und Lösungsmittelmolekülen. Für die parallele Verhaltensweise von Stark- und Druckeffekt bedeutet dies nun, daß der kürzere Abstand zwischen Chromophor und Lösungsmittelmolekülen in einem stärkeren Dipolmoment der Sonde resultiert. Dies erscheint plausibel, da ein größeres Dipolmoment des Farbstoffmoleküls auch in attraktiver Weise auf die Dipole der umgebenden Lösungsmittelmoleküle wirkt.

Der Farbeffekt in der Druckverbreiterung

Die Verwendung der Gaußschen Näherung in der Beschreibung des Druckeffekts spektraler Löcher sollte eigentlich keinen Farbeffekt in der Druck-Verbreiterung zulassen. Die Beobachtung eines derartigen Farbeffekts für die untersuchten BP-DNA-Systeme deutet deshalb auf einen Zusammenbruch dieser Approximation hin. Die Auswirkung des Zusammenbruchs der Gaußschen Näherung wurde bereits 1991 von L. Kador für eine apolare Sonde in einem apolaren Medium diskutiert (135). In diesen Berechnungen nimmt die Breite von der langwelligen zur kurzwelligen Flanke innerhalb der inhomogenen Bande in linearer Weise zu, während die absoluten Beträge der Änderungen mit 10% relativ gering ausfallen.

Für die hier untersuchten DNA-Proben verhält es sich jedoch anders. Für einige DNA-Proben fällt die Änderung der Lochbreite relativ groß aus (siehe z.B. in Abb. 5.15 (b)). In den meisten Fällen zeigt sich ein deutlich nichtlineares Verhalten in der Frequenzabhängigkeit der Druck-Verbreiterung. Ein Zusammenbruch der Gaußschen Näherung erfolgt gerade dann, wenn die Wechselwirkungen zwischen Sonde und Lösungsmittel von unterschiedlicher Herkunft mit gleichzeitig jeweils unterschiedlicher Druck-Empfindlichkeit sind und sich geordnete Strukturen rund um das Sondenmolekül bilden können. In diesem Fall sind die Nahumgebungen der Sondenmoleküle nicht mehr durch statistische Fluktuationen einer großen Anzahl von wechselwirkenden Lösungsmittelmolekülen bestimmt. Eine ähnliche Situation mag für hydrophobe Moleküle in wässrigen Lösungen gelten. Trotz der polaren BF_2 -Untereinheit, fällt der BODIPY-Chromophor in diese Klasse von Molekülen. Der Verlust an Entropie wird durch die Bildung starker Wasserstoff-Brücken kompensiert.

Das entsprechende Netzwerk intensiver Wasserstoff-Brücken läßt sich allerdings nicht so einfach zusammenpressen, wie eine ungeordnete glasartige Struktur, da die ermittelten Werte der lokalen Kompressibilität bereits in der unteren Region dessen liegen, was für organische Lösungen bisher bekannt ist. Desweiteren wäre ein Eingriff der DNA-Stränge in die Ausbildung geordneter Lösungsmittelkäfige vorstellbar, die für charakteristische Modifikationen in der jeweiligen Mikro-Umgebung sorgen und zu einem entsprechenden Verhalten spektraler Löcher unter Druck führen.

Kurze Zusammenfassung

Die untersuchten BP-DNA-Komplexe zeigen ein komplexes Szenario aus verschiedenartigen Wechselwirkungen,

- die sich aus der polaren sowie hydrophoben Natur des Chromophores ergeben,
- die von dem Wasser-Glycerin Lösungsmittel bestimmt werden und möglicherweise geordnete Lösungsmittelkäfige aufbauen und
- durch die individuellen Strukturen der jeweiligen DNA-Stränge.

Dieses Verhalten äußert sich in einem Farbeffekt spektraler Löcher in einem externen elektrischen Feld oder durch die Einwirkung eines hydrostatischen Drucks und führt zu einem Zusammenbruch der Gaußschen Näherung (136).

5.5 Zusammenfassung

Mit Hilfe des kovalent an verschiedene Oligonucleotide verknüpften Sondenmoleküls BODIPY konnten die komplexen Wechselwirkungen zwischen Farbstoff, Lösungsmittel und DNA-Strang untersucht werden. Das zentrale Strukturelement des Farbstoffs besteht aus der polaren BF_2 -Gruppe, die für ein ausgeprägtes Dipolmoment des Chromophors sorgt und durch die beiden Fluoratome zu Wechselwirkungen mit der Umgebung mittels H-Brücken führt. Neben dem freien Chromophor in einem Wasser-Glycerin Glas wurden fünf verschiedene DNA-Moleküle untersucht: eine freie Kette aus zehn Thymin-Basen, einer Haarnadelstruktur, die einerseits eine Watson-Crick-Basenpaarung aufbauen konnte und andererseits durch den kovalent verbundenen Farbstoff daran gehindert wurde, sowie zweier kompakter, durch positive Ionen stabilisierter Guanin-Quartett-Strukturen.

1. Starkeffekt:

- Für die permanente Dipolmoment-Differenz wurde erstmalig eine Frequenzabhängigkeit (Farbeffekt) beobachtet, dessen Stärke von Oligonucleotid zu Oligonucleotid wechselte. Die Ursache läßt sich durch unterschiedlich ausgebildete Wasserstoff-Brücken zwischen Farbstoff und spezifischer Umgebung (Lösungsmittel und DNA-Strang) interpretieren. Die Stärke dieser Brückenbindungen nimmt ausgehend von der polaren Seite des Sondenmoleküls von der langwelligen zur kurzwelligen Seite der inhomogenen Bande ab und führt gleichzeitig zu einer stetigen Zunahme des relevanten Dipolmoments im Farbstoffmolekül.
- Der schwache, gegenläufige Farbeffekt der induzierten Dipolmomente läßt sich ebenfalls mit obigen Wasserstoff-Brückenmodell vereinbaren und beschreibt die unterschiedliche Ausprägung der Polarisierbarkeiten der Chromophor-DNA-Systeme.

2. Druckeffekt:

- Für die verschiedenen Farbstoff-DNA-Systeme werden unterschiedliche Kompressibilitäten κ und Vakuumfrequenzen ν_{vac} gemessen. Die Einordnung der Resultate erfolgt wiederum unter Zuhilfenahme des obigen Wasserstoff-Brückenmodells. Die deutlich geringen Werte für die Aptamer- bzw. Telomer-Strukturen kommen durch die zur Strukturstabilisierung in die Guanin-Quartette eingebauten positiven Ionen zustande.
- Die Beobachtung eines Farbeffekts in der Druckverbreiterung deutet auf einen Zusammenbruch der Gaußschen Näherung hin: Die Wechselwirkungen zwischen Sonde und Lösungsmittel haben unterschiedliche Ursprünge mit gleichzeitig unterschiedlicher Druckempfindlichkeit und es können sich geordnete Strukturen rund um das Sondenmolekül bilden.

Ausblick

Für weiterführende Experimente wäre die direkte Adressierung einzelner DNA-Basen durch Anregung im ultravioletten Spektralbereich als intrinsische Sonde denkbar.

Anhang A

Abkürzungen

B_1, B_2, B_3, \dots	Teilbanden eines Absorptionsspektrums
d	Abstand der Elektroden im Starkeffekt-Experiment
\vec{E}	elektrisches Feld
\vec{E}_L	Laserfeld
\vec{E}_M	von der Matrix erzeugtes elektrisches Feld
\vec{E}_S	äußeres elektrisches Feld (Starkfeld)
f	Lorentz-Korrekturfaktor
$f(\nu' \nu, \Delta p)$	Wahrscheinlichkeit, daß ein bei ν absorbierendes Molekül durch Druckänderung Δp nach ν' verschoben wird
$g(\vec{R})$	Verteilungsfunktion der Position eines Lösungsmittelmoleküls bzgl. eines Farbstoffmoleküls
h	Plancksche Konstante
HPLC	High Performance Liquid Chromathographie
$i(\nu)$	Lochprofil
$I(\nu)$	Verteilung der Frequenzverschiebungen ν
k_B	Boltzmannfaktor
n	Exponent der Abstandsabhängigkeit der Chromophor-Matrix-Wechselwirkung
N	Anzahl der mit einem Farbstoffmolekül wechselwirkenden Lösungsmittelmoleküle
$P(\vec{R}_1, \dots, \vec{R}_N)$	Verteilungsfunktion der Positionen von N Lösungsmittelmolekülen bzgl. eines Farbstoffmoleküls
\vec{R}	Position eines Lösungsmittelmoleküls bzgl. eines Farbstoffmoleküls
s_p	Druckverschiebung
s_0	mittlere Lösungsmittelverschiebung
T	Temperatur

T_g	Glasübergangstemperatur
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$
T_1	Energierelaxationszeit
T_2	Lebensdauer der Kohärenz des angeregten Zustands
T_2^*	Phasenrelaxationszeit
V	Volumen der mit einem Farbstoffmolekül wechselwirkenden Matrix
α	Debye-Waller-Faktor
$\alpha(\vec{R})$	linearer Entwicklungskoeffizient der Frequenzverschiebung $\nu' - \nu$ aufgrund der Druckänderung Δp
β	Winkel zwischen $\vec{\mu}_{01}$ und \vec{E}_L
γ_h	homogene Linienbreite
γ_0	natürliche Linienbreite
Δ	Starkaufspaltung
Δp	Druckänderung im Druckeffekt-Experiment
$\Delta\vec{\alpha}$	Polarisierbarkeitsdifferenz zwischen Grund- und Anregungszustand
$\Delta\vec{\mu}$	Gesamt-Dipolmomentdifferenz zwischen Grund- und Anregungszustand
$\Delta\vec{\mu}_i$	induzierte Dipolmomentdifferenz
$\Delta\vec{\mu}_i^f$	molekülfester Anteil von $\Delta\vec{\mu}_i$
$\Delta\vec{\mu}_i^{stat}$	statistischer Anteil von $\Delta\vec{\mu}_i$
$\Delta\vec{\mu}_0$	intrinsische Dipolmomentdifferenz
$\Delta\nu$	Frequenzverschiebung
ϵ	Dielektrizitätskonstante
θ	Winkel zwischen $\vec{\mu}_{01}$ und $\Delta\vec{\mu}_0$
κ	isotherme Kompressibilität
$\vec{\mu}$	elektrisches Dipolmoment
μ_i^2	Betragsquadrat des induzierten Dipolmoments
$\vec{\mu}_{01}$	Übergangsdipolmoment
$\vec{\mu}_0^0, \vec{\mu}_0^*$	elektrisches Dipolmoment im Grund- bzw. Anregungszustand
ν_B	Brennfrequenz
ν_{max}	Frequenz des Extinktionsmaximums
ν_{vac}	Vakuumfrequenz (Druckeffekt)
$\nu_{vac}^{E,0}, \nu_{vac}^{E,i}$	permanente bzw. induzierte elektrostatische Vakuumfrequenz
ν_0	Absorptionsmaximum
σ_p	Druckverbreiterung
σ_0	inhomogene Bandenbreite
ϕ, ϕ'	Winkel zwischen \vec{E}_S und $\Delta\vec{\mu}_0$ bzw. $\Delta\vec{\mu}_i$

Literaturverzeichnis

- [1] J. Friedrich und D. Haarer.
„Photochemisches Lochbrennen und optische Relaxationsspektroskopie in Polymeren und Gläsern.“
Angew. Chem., **96**, 96–123 (1984).
- [2] A. A. Gorokhovskii, R. K. Kaarli und L. A. Rebane.
„Hole burning in the contour of a pure electronic line in a Shpol'skiĭ system.“
JETP Lett., **20**, 216–218 (1974).
- [3] B. M. Kharlamov, R. I. Personov und L. A. Bykovskaya.
„Stable “gap” in absorption spectra of solid solutions of organic molecules by laser irradiation.“
Opt. Commun., **12**, 191–193 (1974).
- [4] M. Köhler, J. Friedrich und J. Fidy.
„Proteins in electric fields and pressure fields: Basic aspects.“
Biochim. Biophys. Acta, **1386**, 225–288 (1998).
- [5] A. Szabo.
„Observation of hole burning and cross relaxation effects in ruby.“
Phys. Rev. B, **11**, 4512–4517 (1975).
- [6] J. Friedrich und D. Haarer.
„Correlation effects in vibrational hole burning.“
J. Chem. Phys., **79**, 1612–1615 (1983).
- [7] T.-C. Chang, C.-T. Kuo, C.-C. Chiang *et al.*
„Investigation of guanine-rich DNA telomeric structure by a covalently linked BODIPY dye.“
Phys. Chem. Chem. Phys., **1**, 3783–3787 (1999).
- [8] T.-C. Chang, K.-C. Lin, C.-C. Chiang, Y.-P. Yang und W.-S. Chang.
„Satellite hole spectroscopy of thrombin-aptamer complexes.“
Chem. Bio. Chem., **3**, 197–200 (2000).
- [9] Y.-P. Yang, C.-T. Kuo, C.-S. Yan *et al.*
„Different binding structures of a covalently linked BODIPY-493/503 dye to an oligonucleotide investigated by satellite hole spectroscopy.“

- Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2**, 5271–5274 (2000).
- [10] T.-C. Chang, J.-J. Lin, K.-C. Lin *et al.*.
„Investigation of DNA-protein recognition by satellite hole spectra of labeling dye.“
J. Luminescence, **98**, 149–152 (2002).
- [11] P. Geissinger, B. E. Kohler und J. C. Woehl.
„Electric field and structure in the myoglobin heme pocket.“
J. Phys. Chem., **99**, 16527–16529 (1995).
- [12] J. Gafert, J. Friedrich und F. Parak.
„Stark-effect experiments on photochemical holes in chromoproteins: Protoporphyrin IX substituted myoglobin.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 2116–2120 (1995).
- [13] D. W. Pierce und S. G. Boxer.
„Stark effect spectroscopy of tryptophan.“
Biophys. J., **68**, 1583–1591 (1995).
- [14] M. Orrit, J. Bernard, A. Zumbusch und R. I. Personov.
„Stark effect on single molecules in a polymer matrix.“
Chem. Phys. Lett., **196**, 595–600 (1992).
- [15] P. Schätz und M. Maier.
„Calculations of electric field effects on persistent spectral holes in amorphous host-guest systems.“
J. Chem. Phys., **87**, 809–820 (1987).
- [16] H. E. Lessing und A. von Jena.
„Separation of rotational diffusion and level kinetics in transient absorption spectroscopy.“
Chem. Phys. Lett., **42**, 213–217 (1976).
- [17] J. Zollfrank, J. Friedrich, J. Fidy und J. M. Vanderkooi.
„Photochemical holes under pressure: Compressibility and volume fluctuations of a protein.“
J. Chem. Phys., **94**, 8600–8603 (1991).
- [18] J. Zollfrank und J. Friedrich.
„Spectral holes under pressure: Proteins and glasses.“
J. Opt. Soc. Am. B, **9**, 956–961 (1992).
- [19] J. Friedrich, J. Gafert, J. Zollfrank, J. M. Vanderkooi und J. Fidy.
„Spectral hole burning and selection of conformational substates in chromoproteins.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 1029–1033 (1994).

- [20] K. Heremans und L. Smeller.
„Protein structure and dynamics at high pressure.“
Biochim. Biophys. Acta, **1386**, 353–370 (1998).
- [21] H. Lesch, H. Stadlbauer, J. Friedrich und J. M. Vanderkooi.
„Stability diagram and unfolding of a modified cytochrome c: What happens in the transformation regime?“
Biophys. J., **82**, 1644–1653 (2002).
- [22] H. Li, H. Yamada und K. Akasaka.
„Effect of pressure on the tertiary structure and dynamics of folded basic pancreatic trypsin inhibitor.“
Biophys. J., **77**, 2801–2812 (1999).
- [23] T. Sesselmann, W. Richter, D. Haarer und H. Morawitz.
„Spectroscopic studies of guest-host interactions in dye-doped polymers: Hydrostatic pressure effects versus temperature effects.“
Phys. Rev. B, **36**, 7601–7611 (1987).
- [24] J. Gafert, J. Friedrich und F. Parak.
„A comparative pressure tuning hole burning study of protoporphyrin IX in myoglobin and in a glassy host.“
J. Chem. Phys., **99**, 2478–2486 (1993).
- [25] J. Zollfrank, J. Friedrich und F. Parak.
„Spectral hole burning study of protoporphyrin IX substituted myoglobin.“
Biophys. J., **61**, 716–724 (1992).
- [26] J. Gafert, J. Friedrich, F. Parak und J. Fidy.
„Hole burning and pressure phenomena in chromoproteins.“
J. Lumin., **56**, 157–164 (1993).
- [27] B. B. Laird und J. L. Skinner.
„Microscopic theory of reversible pressure broadening in hole-burning spectra of impurities in glasses.“
J. Chem. Phys., **90**, 3274–3281 (1989).
- [28] A. M. Stoneham.
„Shapes of inhomogeneously broadened resonance lines in solids.“
Rev. Mod. Phys., **41**, 82–108 (1969).
- [29] W. Liptay.
„Die Lösungsmittelabhängigkeit der Wellenzahl von Elektronenbanden und die chemisch-physikalischen Grundlagen.“
Z. Naturforschg., **20a**, 1441–1471 (1965).

- [30] N. S. Bayliss.
„The effect of the electrostatic polarization of the solvent on electronic absorption spectra in solution.“
J. Chem. Phys., **18**, 292–296 (1950).
- [31] N. S. Bayliss und E. G. McRae.
„Solvent effects in organic spectra: Dipole forces and the franck-condon principle.“
J. Phys. Chem., **58**, 1002–1006 (1954).
- [32] J. Zollfrank und J. Friedrich.
„Pressure shift and solvent shift: A hole-burning study of resorufin-doped glasses.“
J. Phys. Chem., **96**, 7889–7895 (1992).
- [33] G. Gradl, A. Feis und J. Friedrich.
„Pressure tuning of spectral holes in organic crystalline materials: Irreversible effects.“
- [34] P. Schellenberg, J. Friedrich und J. Kikas.
„Spectral hole burning in polymorphic systems: Single site pressure phenomena and glassy behavior.“
J. Chem. Phys., **100**, 5501–5507 (1994).
- [35] H. Pschierer, J. Friedrich, H. Falk und W. Schmitzberger.
„Molecular interactions and correlation phenomena between pressure shift and solvent shift: A spectral hole-burning study.“
J. Phys. Chem., **97**, 6902–6906 (1993).
- [36] G. Gradl, J. Zollfrank, W. Breinl und J. Friedrich.
„Color effects in pressure-tuned hole-burned spectra.“
J. Chem. Phys., **94**, 7619–7624 (1991).
- [37] B. Gavish, E. Gratton und C. J. Hardy.
„Adiabatic compressibility of globular proteins.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 750–754 (1983).
- [38] D. P. Kharakoz und A. P. Sarvazyan.
„Hydrational and intrinsic compressibilities of globular proteins.“
Biopolymers, **33**, 11–26 (1993).
- [39] W. Doster, B. Simon, G. Schmidt und W. Mayr.
„Compressibility of lysozyme in solution from time-resolved Brillouin difference spectroscopy.“
Biopolymers, **24**, 1543–1548 (1985).

- [40] J. Gafert.
Festkörpereigenschaften von Chromoproteinen: Eine Untersuchung mit verschiedenen Varianten der Lochbrenn-Spektroskopie.
Dissertation, Universität Bayreuth (1994).
- [41] *IMSL, Fortran Subroutines for Statistical Analysis* (1987).
- [42] J. Schlichter, J. Friedrich, L. Herenyi und J. Fidy.
„Protein dynamics at low temperatures.“
J. Chem. Phys., **112**, 3045–3050 (2000).
- [43] G. N. Ramachandran und V. Sasisekharan.
„Conformation of polypeptides and proteins.“
Adv. Prot. Chem., **28**, 283–437 (1968).
- [44] C. Branden und J. Tooze.
Introduction to protein structure.
Garland, New York (1999).
- [45] L. Pauling, R. B. Corey und H. R. Branson.
„The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37**, 205–211 (1951).
- [46] B. E. Cohen, T. B. McAnaney, E. S. Park *et al.*.
„Probing protein electrostatics with a synthetic fluorescent amino acid.“
Science, **296**, 1700–1703 (2002).
- [47] R. B. Altmann, D. Haarer und I. Renge.
„Stark-effect on spectral holes of chlorophyll a at 2 K.“
Chem. Phys. Lett., **216**, 281 – 285 (1993).
- [48] D. S. Gottfried, M. A. Steffen und S. G. Boxer.
„Large protein-induced dipoles for a symmetric carotenoid in a photosynthetic antenna complex.“
Science, **251**, 662–665 (1991).
- [49] W. Köhler, J. Friedrich, R. Fischer und H. Scheer.
„High resolution frequency selective photochemistry of phycobilisomes at cryogenic temperatures.“
J. Chem. Phys., **89**, 871–874 (1988).
- [50] J. Friedrich, H. Scheer, B. Zickendraht-Wendelstadt und D. Haarer.
„High-resolution optical studies on c-phycoyanin via photochemical hole burning.“
J. Am. Chem. Soc., **103**, 1030–1035 (1981).

- [51] T. M. H. Creemers, C. A. D. Caro, R. W. Visschers, R. van Grondelle und S. Völker.
„Spectral hole burning and fluorescence line narrowing in subunits of the light-harvesting complex LH1 of purple bacteria.“
J. Phys. Chem. B, **103**, 9770–9776 (1999).
- [52] M. L. Groot, J. P. Dekker, R. van Grondelle, F. T. H. den Hartog und S. Völker.
„Energy transfer and trapping in isolated photosystem II reaction centers of green plants at low temperature. A study by spectral hole burning.“
J. Phys. Chem., **100**, 11488–11495 (1996).
- [53] M. Rätsep, T. W. Johnson, P. R. Chitnis und G. J. Small.
„The red-absorbing chlorophyll a antenna states of photosystem I: A hole-burning study of *synechocystis* sp. PCC 6803 and its mutants.“
J. Phys. Chem. B, **104**, 836–847 (2000).
- [54] H.-M. Wu, M. Rätsep, C. S. Young *et al.*
„High-pressure and stark hole-burning studies of chlorosome antennas from *chlorobium tepidum*.“
Biophys. J., **79**, 1561–1572 (2000).
- [55] J. Pahapill und L. Rebane.
„Persistent spectral hole-burning in heme proteins: Cytochrome *c* and myoglobin.“
Chem. Phys. Lett., **158**, 283–288 (1989).
- [56] M. Köhler, J. Gafert, J. Friedrich, J. M. Vanderkooi und M. Laberge.
„Stark-effect experiments in cytochrome *c*-type proteins: Structural hierarchies.“
Biophys. J., **71**, 77–85 (1996).
- [57] J. Schlichter, K.-D. Fritsch, J. Friedrich und J. M. Vanderkooi.
„Conformational dynamics of a low temperature protein: Free base cytochrome-*c*.“
J. Chem. Phys., **110**, 3229–3234 (1999).
- [58] M. Laberge, M. Köhler, J. M. Vanderkooi und J. Friedrich.
„Sampling field heterogeneity at the heme of *c*-type cytochromes by spectral hole burning spectroscopy and electrostatic calculations.“
Biophys. J., **77**, 3293–3304 (1999).
- [59] J. Schlichter, J. Friedrich, L. Herenyi und J. Fidy.
„Trehalose effect on low temperature protein dynamics: Fluctuation and relaxation phenomena.“
Biophys. J., **80**, 2011–2017 (2001).

- [60] J. Schlichter, J. Friedrich, L. Herenyi und J. Fidy.
„Deuteration effects on the conformational dynamics of proteins in a trehalose glass.“
J. Phys. Chem. B, **106**, 3510–3514 (2002).
- [61] R. Y. Tsien.
„The green fluorescent protein.“
Ann. Rev. Biochem., **67**, 509–544 (1998).
- [62] K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts *et al.*.
„Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the aequorea victoria green fluorescent protein.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 2306–2311 (1997).
- [63] C. Seebacher, F. W. Deeg, C. Bräuchle, J. Wiehler und B. Steipe.
„Stable low-temperature photoproducts and hole burning of green fluorescent protein (GFP).“
J. Phys. Chem. B, **103**, 7728–7732 (1999).
- [64] T. M. H. Creemers, A. J. Lock, V. Subramaniam, T. M. Jovin und S. Völker.
„Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning.“
Nature Structural Biology, **6**, 557–560 (1999).
- [65] M. Stübner und P. Schellenberg.
„Low temperature photochemistry and photodynamics of the chromophore of green fluorescent protein GFP.“
J. Phys. Chem., eingereicht (2002).
- [66] N. Sreerama, M. C. Manning, M. E. Powers *et al.*.
„Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: Circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor.“
Biochemistry, **38**, 10814–10822 (1999).
- [67] J. R. Lakowicz.
Principles of Fluorescence Spectroscopy.
Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York (1999).
- [68] S. Parkin, B. Rupp und H. Hope.
„Structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 125 K definition of carboxyl-terminal residues Gly57 and Ala58.“
Acta Cryst. D, **52**, 18–29 (1996).
- [69] G. Löffler und P. E. Petrides.
Physiologische Chemie.
Springer, Berlin (1988).

- [70] D. V. Bent und E. Hayon.
„Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. II.
Phenylalanine.“
J. Am. Chem. Soc., **97**, 2606–2612 (1975).
- [71] D. V. Bent und E. Hayon.
„Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. I.
Tyrosine.“
J. Am. Chem. Soc., **97**, 2599–2606 (1975).
- [72] D. V. Bent und E. Hayon.
„Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III.
Tryptophan.“
J. Am. Chem. Soc., **97**, 2612–2619 (1975).
- [73] L. Stryer.
Biochemistry.
Freeman and Company, San Francisco (1981).
- [74] R. Sjoback, J. Nygren und M. Kubista.
„Absorption and fluorescence properties of fluorescein.“
Spectrochim. Acta A, **51**, 7–21 (1995).
- [75] H. H. Perkampus.
UV-VIS Atlas of Organic Compounds.
VCH, Weinheim (1992).
- [76] G. H. Beaven und E. R. Holiday.
„Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids.“
Adv. Prot. Chem., **7**, 319–386 (1952).
- [77] C. Chipot, J. G. Angyan, B. Maigret und H. A. Scheraga.
„Modeling amino acid side chains. 2. Determination of point charges from
electrostatic properties: Towards transferable point charge models.“
J. Phys. Chem., **97**, 9788–9796 (1993).
- [78] Z.-H. Wang und H. C. Lee.
„Origin of the native driving force for protein folding.“
Phys. Rev. Lett., **84**, 574–577 (2000).
- [79] M. A. Steffen, K. Lao und S. G. Boxer.
„Dielectric asymmetry in the photosynthetic reaction center.“
Science, **264**, 810–816 (1994).
- [80] M. Köhler, J. Friedrich, E. Balog und J. Fidy.
„Symmetry breaking by the heme pocket in horseradish peroxidase as re-
vealed by Stark spectroscopy.“
Chem. Phys. Lett., **277**, 417–422 (1997).

- [81] M. Stübner, E. Schneider und J. Friedrich.
„Hole burning stark-effect studies on aromatic aminoacids: I. Phenylalanine in a glycerol-water glass.“
Phys. Chem. Chem. Phys., **3**, 5369–5372 (2001).
- [82] D. A. Chignell und W. B. Gratzer.
„Solvent effects on aromatic chromophores and their relation to ultraviolet difference spectra of proteins.“
J. Phys. Chem., **72**, 2934–2941 (1968).
- [83] A. L. Sobolewski und W. Domcke.
„Photoinduced electron and proton transfer in phenol and its clusters with water and ammonia.“
J. Phys. Chem. A, **105**, 9275–9283 (2001).
- [84] R. B. Altmann, I. Renge, L. Kador und D. Haarer.
„Dipole moment differences of nonpolar dyes in polymeric matrices: Stark-effect and photochemical hole burning.“
J. Chem. Phys., **97**, 5316 (1992).
- [85] X. Song.
„An inhomogeneous model of protein dielectric properties: Intrinsic polarizabilities of amino acids.“
J. Chem. Phys., **116**, 9359–9363 (2002).
- [86] M. Stübner, C. Hecht, E. Schneider und J. Friedrich.
„Hole burning stark-effect studies on aromatic aminoacids: II. A comparative investigation of tyrosine and the BPTI-protein.“
Phys. Chem. Chem. Phys., **4**, akzeptiert (2002).
- [87] A. Smolyar und C. F. Wong.
„Theoretical studies of the spectroscopic properties of tryptamine, tryptophan and tyrosine.“
J. Mol. Struct., **488**, 51–67 (1999).
- [88] K. Gekko und Y. Hasegawa.
„Compressibility structure relationship of globular-proteins.“
Biochemistry, **25**, 6563–6571 (1986).
- [89] V. M. Dadarlat und C. B. Post.
„Insights into proteins compressibility from molecular dynamics simulations.“
J. Phys. Chem. B, **105**, 715–724 (2001).
- [90] J. Fidy, E. Balog und M. Köhler.
„Proteins in electric fields and pressure fields: Experimental results.“
Biochim. Biophys. Acta, **1386**, 289–303 (1998).

- [91] M. Stübner, C. Hecht und J. Friedrich.
„Labeling proteins via hole burning of their aromatic amino acids: Pressure tuning spectroscopy of BPTI.“
Biophys. J., akzeptiert (2002).
- [92] A. L. Lehninger.
Biochemie.
VCH, Weinheim (1987).
- [93] J. Andreasson, A. Holmen und B. Albinsson.
„The photophysical properties of the adenine chromophore.“
J. Phys. Chem. B, **103**, 9782–9789 (1999).
- [94] E. Nir, K. Kleinermanns, L. Grace und M. S. de Vries.
„On the photochemistry of purine nucleobases.“
J. Phys. Chem. A, **105**, 5106–5110 (2001).
- [95] J. V. Kosmoski, E. J. Ackerman und M. J. Smerdon.
„DNA repair of a single UV photoproduct in a designed nucleosome.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 10113–10118 (2001).
- [96] A. Sugino, S. Hirose und R. Okazaki.
„RNA-linked nascent DNA fragments in *E. coli*.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 1863–1867 (1972).
- [97] D. Kipling.
The Telomere.
Oxford University Press, Oxford (1996).
- [98] K. Muniyappa und K. M. Kironmai.
„Telomere structure, replication, and length maintenance.“
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **33**, 297–336 (1998).
- [99] C. K. Mathews, K. E. van Holde und K. G. Ahern.
Biochemistry.
Addison-Wesley, San Francisco (2000).
- [100] J.-L. Mergny, A.-T. Phan und L. Lacroix.
„Following G-quartet formation by UV-spectroscopy.“
FEBS Lett., **435**, 74–78 (1998).
- [101] M. A. Keniry, E. A. Owen und R. H. Shafer.
„The contribution of thymine-thymine interaction to the stability of folded dimeric quadruplexes.“
Nuc. Acids Res., **25**, 4389–4392 (1997).

- [102] G. D. Strahan, M. A. Keniry und R. H. Shafer.
„NMR structure refinement and dynamics of the K^+ -[d(G₃T₄G₃)]₂ quadruplex via particle mesh ewald molecular dynamics simulations.“
Biophys. J., **75**, 968–981 (1998).
- [103] J. Gu und J. Leszczynski.
„A theoretical study of thymine and uracil tetrads: Structures, properties, and interactions with the monovalent K^+ cation.“
J. Phys. Chem. A, **105**, 10366–10371 (2001).
- [104] J. Gu und J. Leszczynski.
„Structures and properties of the planar G · C · G · C tetrads: Ab initio HF and DFT studies.“
J. Phys. Chem. A, **104**, 7353–7358 (2000).
- [105] H. Y. Han und L. H. Hurley.
„G-quadruplex DNA: A potential target for anti-cancer drug design.“
Trends Pharm. Sci., **21**, 136–142 (2000).
- [106] S. Neidle und M. A. Read.
„G-quadruplexes as therapeutic targets.“
Biopolymers, **56**, 195–208 (2000).
- [107] L. H. Hurley.
„Secondary DNA structures as molecular targets for cancer therapeutics.“
Biochem. Soc. Trans., **29**, 692–696 (2001).
- [108] L. R. Paborsky, S. N. McCurdy, L. C. Griffin, J. J. Toole und L. L. K. Leung.
„The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin.“
J. Biol. Chem., **268**, 20808–20811 (1993).
- [109] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas und J. J. Toole.
„Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin.“
Nature, **355**, 564–566 (1992).
- [110] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe und J. Feigon.
„Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 3745–3749 (1993).
- [111] K. Y. Wang, S. H. Krawczyk, N. Bischofsberger, S. Swaminathan und P. H. Bolton.
„The tertiary structure of a DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin determines activity.“
Biochemistry, **32**, 11285–11292 (1993).

- [112] P. Schultze, R. F. Macaya und J. Feigon.
„Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG).“
J. Mol. Biol., **235**, 1532–1547 (1994).
- [113] Q. Chen, I. D. Kuntz und R. H. Shafer.
„Spectroscopic recognition of guanine dimeric hairpin quadruplexes by a carbocyanine dye.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 2635–2639 (1996).
- [114] J.-Y. Cheng, S.-H. Lin und T.-C. Chang.
„Vibrational investigation of DODC cation for recognition of guanine dimeric hairpin quadruplex studied by satellite holes.“
J. Phys. Chem. B, **102**, 5542–5546 (1998).
- [115] C.-C. Chiang, J.-Y. Cheng und T.-C. Chang.
„Satellite hole spectral method and its applications to dye-DNA complexes.“
Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(A), **23**, 679–694 (1999).
- [116] B. P. Wittmershaus, J. J. Skibicki, J. B. McLafferty, Y.-Z. Zhang und S. Swan.
„Spectral properties of single BODIPY dyes in polystyrene microspheres and in solutions.“
J. Fluorescence, **11**, 119–128 (2001).
- [117] A. Burghart, H. Kim, M. B. Welch *et al.*
„3,5-Diaryl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes: Synthesis, spectroscopic, electrochemical, and structural properties.“
J. Org. Chem., **64**, 7813–7819 (1999).
- [118] T.-C. Chang, C. C. Chiang und K. Peck.
„Hydrogen-bond effect on the chromophore-oligonucleotide conformational structure studied by nonphotochemical hole-burning spectroscopy.“
J. Am. Chem. Soc., **117**, 7576–7577 (1995).
- [119] T.-C. Chang, C. C. Chiang, S. H. Chou und K. Peck.
„Thermally activated hole filling of dye and dye-oligonucleotide doped into polymer-films.“
J. Phys. Chem., **99**, 6620–6627 (1995).
- [120] C.-T. Kuo, C.-C. Chiang, J. Yu, K. Peck und T.-C. Chang.
„Satellite hole investigation of binding mechanism of dipyrrometheneboron difluoride derivative and oligonucleotide in glycerol-water glass.“
J. Chem. Soc. Faraday Trans., **94**, 1989–1994 (1998).

- [121] H. Deng und W. H. Braunlin.
„Kinetics of sodium ion binding to DNA quadruplexes.“
J. Mol. Biol., **255**, 476–483 (1996).
- [122] V. M. Marathias und P. H. Bolton.
„Structures of the potassium-saturated, 2:1, and intermediate, 1:1, forms of a quadruplex DNA.“
Nuc. Acids Res., **28**, 1969–1977 (2000).
- [123] P. Schultze, N. V. Hud, F. W. Smith und J. Feigon.
„The effect of sodium, potassium and ammonium ions on the conformation of the dimeric quadruplex by the *Oxytricha nova* telomere repeat oligonucleotide d(G₄T₄G₄).“
Nuc. Acids Res., **27**, 3018–3028 (1999).
- [124] F. Bergström, I. Mikhalyov, P. Hägglöf *et al.*
„Dimers of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) with light spectroscopic applications in chemistry and biology.“
J. Am. Chem. Soc., **124**, 196–204 (2002).
- [125] L. Kador, S. Jahn, D. Haarer und R. Silbey.
„Contributions of the electrostatic and the dispersion interaction to the solvent shift in a dye-polymer system, as investigated by hole-burning spectroscopy.“
Phys. Rev. B, **41**, 12215–12226 (1990).
- [126] I. Renge.
„Pressure shift mechanisms of spectral holes in the optical spectra of dyes in polymer host matrices.“
J. Phys. Chem., **104**, 3869–3877 (2000).
- [127] I. Renge und U. P. Wild.
„Inhomogeneous broadening and pressure shifts of the optical spectra in organic glasses at low temperatures.“
J. Luminescence, **3**, 241–247 (1992).
- [128] S. Reul, W. Richter und D. Haarer.
„Spectroscopic studies of the solute–solvent interaction in dye-doped polymers: frequency-dependent pressure shifts.“
Chem. Phys. Lett., **180**, 1–5 (1991).
- [129] L. Kador.
„Electric-field effects on hole spectra: Method for studying dye-matrix interactions in doped polymers.“
J. Opt. Soc. Am. B, **9**, 962–966 (1992).

- [130] L. Kador.
„Spectroscopic characteristics of dye-matrix interaction in amorphous solids.“
Mol. Cryst. Liq. Cryst., **217**, 187–192 (1992).
- [131] L. Kador.
„Wavelength dependence of external-field effects on persistent hole-burning spectra: Analytical approximation.“
J. Chem. Phys., **99**, 7–11 (1993).
- [132] M. Stübner, J. Friedrich, Y.-P. Yang und T.-C. Chang.
„Using external field effects for elucidating specific features in dye-DNA interaction.“
J. Luminescence, **98**, 153–161 (2002).
- [133] R. F. Loring.
„Statistical mechanical calculation of inhomogeneously broadened absorption line shapes in solution.“
J. Phys. Chem., **94**, 513–515 (1990).
- [134] J. Friedrich, J. D. Swalen und D. Haarer.
„Electron-phonon coupling in amorphous organic host materials as investigated by photochemical hole burning.“
J. Chem. Phys., **73**, 705–711 (1980).
- [135] L. Kador.
„Pressure effects on hole-burning spectra in glasses: Calculation beyond the Gaussian approximation.“
J. Chem. Phys., **95**, 846–853 (1991).
- [136] Y.-P. Yang, T.-C. Chang, M. Stübner und J. Friedrich.
„Probing molecular interactions in dye-DNA-supermolecules via pressure tuning hole burning spectroscopy.“
J. Phys. Chem., akzeptiert (2002).

Nachwort

Die Zeit am Lehrstuhl für Physik Weihenstephan wird mir in äußerst angenehmer Erinnerung bleiben. Gerade die tatkräftige Unterstützung und Hilfe, die ich von meinen Kolleginnen und Kollegen erfahren durfte, trugen in Verbindung mit einem hervorragenden Arbeitsklima zu einem guten Gelingen der Dissertation bei. Aus diesem Grunde möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Weihenstephaner Arbeitskreises bedanken:

- **Prof. Josef Friedrich:** Eine Begeisterung für die Physik, die unweigerlich zur Ansteckung führt, die selbst während langer experimenteller Durststrecken immer wieder frisch motiviert. Ein nie zu versiegen scheinender Wissensvorrat und ein stets offenes Ohr für Probleme aller Art. Ein Chef also, wie man ihn sich eigentlich nur wünschen kann.
- **Erika Bischofs:** Daß am Lehrstuhl immer alles gut klappt und funktioniert, ist zu einem großen Teil unserer Sekretärin zu verdanken, die mit ihrer guten Laune und ungetrübten Fröhlichkeit stets für eine positive Grundstimmung sorgt.
- **Ellen Schneider:** Ein Garant für gute Proben aller Art in tausend verschiedenen Puffersystemen, eine sprudelnde Quelle kreativer Ideen und nebenbei eine kritische Spezialistin in Bezug auf Layout- und Design-Fragen.
- **Ludwig Hütt:** Unmögliches wird sofort erledigt, Wunder dauern etwas länger: Vieles wäre bei der technischen Realisierung am Experiment gar nicht erst möglich gewesen, wäre nicht sein handwerkliches Geschick und seine erstaunliche feinmechanische Präzision gewesen.
- **Jörg Schlichter** und **Martin Pinsker:** Die beiden Doktoranden, die wohl am intensivsten mit Umzug und Aufbau des Laserlabors beschäftigt waren. Von ihnen habe ich vielleicht am meisten gelernt: Von der Laserjustage über das Heliumfüllen bis zu Elektronik- und Computerfragen.
- **Harald Lesch:** Von der Organik zur Naturstoff-Chemie: Als wandelnde Ausgabe eines Chemie-Lexikons konnte ich häufig dankenswerter Weise profitieren.

- **Christoph Hecht:** Als kompetenter Mitstreiter unserer gemeinsamen Tyrosin- und BPTI-Experimente erlebte ich eine außerordentlich effiziente Zusammenarbeit, angefangen von der Durchführung der Messungen bis hin zur Auswertung der Ergebnisse.
- **Thomas Benda, Tarekegn Chimdi Yarimo, Armin Forster, Jürgen Friebel, Axel Parbel, Vladimir Ponkratov, Alfred Sigl, Christoph Schnell:** Wenn hier keine Erfahrungen für interdisziplinäre und internationale Teamarbeit sammeln, wo dann? Außerdem habe ich eine angenehme Gruppen-Atmosphäre im Gemeinschaftslabor und bei diversen Feierlichkeiten und Besuchen der Freisinger Kneipenszene erfahren.
- **Helene Budjarek, Konrad Loher, Christina Scharnagl, Josef Skreb-sky, Hans Stadlbauer, Johannes Wiedersich und Thomas Zeitler:** Neben der bereits vielgepriesenen ausgezeichneten Lehrstuhl-Atmosphäre sind mir die vielen schönen Betriebsausflüge und rauschenden Feste in bleibender Erinnerung.
- **Andy Fräbel und Bianca Klein:** Einen ziemlichen Schock versetzte mir die Nachricht vom tödlichen Unfall von Andy und Bianca im November 2001, den ich nicht vergessen kann.
- **Dr. Ta-Chau Chang und Dr. Yih-Pey Yang:** Eine besondere Erfahrung war für mich der Auslandsaufenthalt am *Institute for Atomic and Molecular Sciences* der *Academia Sinica* in TaiPei (TaiWan), wo ich freundlich aufgenommen wurde und die vorzügliche chinesische Gastfreundschaft genießen konnte.
- **Meine Eltern:** Last but not least natürlich meine Eltern, die mich zu diesem Schritt ermutigt haben und mich fortwährend darin unterstützten.