

(Bakterio-)Chlorophyll-Modifikationen zur
Einlagerung in synthetische Peptide

Darstellung und Bindungsstudien von
(Bakterio-)Chlorophyll-Derivaten an synthetische,
modulare Proteine und den LH1-Komplex von
Rhodobacter sphaeroides

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

vorgelegt von
Heike Snigula
aus München

2003

1. Berichtstatter: Prof. Dr. H. Scheer

2. Berichtstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1997 bis Juli 2003 am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Scheer angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt:

- Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Scheer für die Bereitstellung eines interessanten Themas, für seine Anleitung und stete Bereitschaft zur Diskussion und für die Freiheit bei der Anfertigung dieser Arbeit
- Herrn Prof. Dr. W. Haehnel (Universität Freiburg) für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die Bereitstellung der synthetischen, modularen Proteine. Herrn Dr. H. Rau, Herrn Dr. B. Monien, Frau C. Reichenbach, Herrn Dr. F. Drepper und Herrn P. Hoerth für die konstruktive Zusammenarbeit
- Herrn Prof. Dr. M. Zenk (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) für die Dauerleihgabe des Ozongenerators
- Herrn Dr. P. Köhler und Frau I. Otte (Technische Universität München) für die Messung der Massenspektren, Herrn Dr. M. Reiner für die Aufnahme der ESR- und Mößbauerspektren und Frau Dr. O. Iakovleva für die Hilfe bei der Interpretation dieser Spektren
- Frau C. Bubenzer-Hange für die Aufzucht der Bakterienstämme, Frau B. Strohmann für die Hilfe bei Titrationsen der Fe-Komplexe, Frau C. Reindl für ihre Mitwirkung im Rahmen ihrer Diplomarbeit und Herrn Dr. L. Fiedor für die Einweihung in die Kenntnisse der LH1-Rekonstitution
- Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises für ihre Freundschaft, für ihre Geduld beim Üben der Vorträge, für konstruktive und aufbauenden Kaffeepausen und stete Hilfe bei Problemen

Ferner bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung und für das Interesse an meiner Arbeit bei der Hans-Fischer-Gesellschaft.

Mein Dank geht auch an meine Eltern, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium ermöglicht haben und an meinen Freund, der mir speziell in der Endphase des Zusammenschreibens immer zur Seite stand.

Abkürzungsverzeichnis

AcOH	Essigsäure
Ac	Acetyl-Rest
Acm	Acetamidomethyl-Rest
analyt.	Analytisch
BChl	Bakteriochlorophyll
Bphe	Bakteriopheophytin
Bpheid	Bakteriopheophorbid
Chl	Chlorophyll
DC	Dünnschichtchromatographie
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzochinon
DE	Diethylether
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	Dimethylformamid
ESI	Elektronen Spray Ionisation
ESR	Elektronenspin Resonanz
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HPTLC	High Precision Thinlayer Chromatographie
iProp	iso-Propanol
KG	Kieselgel
LH1, 2	Lichtsammlerkomplex 1, 2 aus Purpurbakterien
LHC	Lichtsammlerkomplex aus oxygenen Organismen
LM	Lösungsmittel
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MeOH	Methanol
MO	Molekülorbital
MOP	modulares Protein
Mp	Maleinimidopropionyl-Rest
MS	Massenspektrum
MW	Molekulargewicht
NIR	nahes Infrarot
OD	optische Dichte
Odml	Produkt aus Optischer Dichte und Volumen ($\hat{=}$ Mengenangabe)

β -OG	<i>n</i> -Octyl- β -glucopyranosid
p.a.	Analysenrein
Phe	Pheophytin
Pheid	Pheophorbid
PSI, PSII	Photosystem I, Photosystem II
Pyr	Pyridin
<i>Rb.</i>	<i>Rhodobacter</i>
RC	Reaction center, Reaktionszentrum
R_f	Retentionsfaktor
<i>Rs.</i>	<i>Rhodospirillum</i>
RP	reversed phase
<i>Rps.</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
SAT	Sitting atop
SBU [†]	tertiär-Butylthio-Rest
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
Tris	Tris(hydroxymethylamin)methan
TFA	Trifluoressigsäure
UV/Vis	Ultraviolett/visible

Pigmentverzeichnis:

[3-Acetyl]-Chl <i>a</i>	3-Devinyl-3-acetyl-chlorophyll <i>a</i>	Kap. F-3.1
[3-Acetyl]-Phe <i>a</i>	3-Devinyl-3-acetyl-pheophytin <i>a</i>	Abb. C-40
[3-Acetyl]-Ethanal-Pheid <i>a</i>	3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -(ethanal-2-yl)ester	Abb. C-40
[3-Acetyl]-Me-Pheid <i>a</i>	3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Kap. F-3.1
13 ² -OH-BChl <i>a</i>	13 ² -Hydroxy-bakteriochlorophyll <i>a</i>	Kap. F-3.2
13 ² -OH-Phe <i>a</i>	13 ² -Hydroxy-pheophytin <i>a</i>	Kap. F-3.1
3 ¹ -OH-BChl <i>a</i>	3-Deacetyl-3 ¹ -hydroxyethyl-bakteriochlorophyll <i>a</i>	Abb. C-43
3 ¹ -OH-Me-BPheid <i>a</i>	3-Deacetyl-3 ¹ -hydroxyethyl-bakteriopheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Kap. F-3.2
3 ¹ -OH-Pyro-BChl <i>a</i>	3-Deacetyl-3 ¹ -hydroxyethyl-13 ² -demethoxycarbonyl bakteriochlorophyll <i>a</i>	Kap. F-3.2
3 ¹ -OH-BPhe <i>a</i>	3-Deacetyl-3 ¹ -hydroxyethyl-bakteriopheophytin <i>a</i>	Abb. C-45

[3-Formyl]-Ethanal-Pheid <i>a</i>	3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -(ethanal-2-yl)ester	Abb. C-41
[3-Formyl]-Me-BPheid <i>a</i>	3-Devinyl-3-formyl-bakteriopheophorbid <i>a</i>	Kap. F-3.2
[3-Formyl]-Me-Pheid <i>a</i>	3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid <i>a</i>	Abb. C-35
[3-Formyl]-Phe <i>a</i>	3-Devinyl-3-formyl-pheophytin <i>a</i>	Abb. C-41
[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid <i>a</i>	3-Devinyl-3-formyl-13 ² -demethoxycarbonylpheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Abb. C-35
[3-Vinyl]-BChl <i>a</i>	3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriochlorophyll <i>a</i>	Abb. C-43
[3-Vinyl]-BPhe <i>a</i>	3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophytin <i>a</i>	Abb. C-44
[3-Vinyl]-Me-BPheid <i>a</i>	3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Abb. C-44
BChl <i>a</i>	Bakteriochlorophyll <i>a</i>	Abb. C-1
BPhe <i>a</i>	Bakteriopheophytin <i>a</i>	Abb. C-5
BPheid <i>a</i>	Bakteriopheophorbid <i>a</i>	Abb. C-54
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>	Abb. C-1
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>	Kap. F-3.1
Cd-BPheid <i>a</i>	Cd-Bakteriopheophorbid <i>a</i>	Kap. F-3.2
Ethanal-Pheid <i>a</i>	Pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -(ethanal-2-yl)ester	Abb. C-41
Fe-[3-Acetyl]-Phe <i>a</i>	Fe-3-Devinyl-3-acetyl-pheophytin <i>a</i>	Kap. F-3.1
Fe-BPhe <i>a</i>	Fe-Bakteriopheophytin <i>a</i>	Abb. C-5
Fe-BPheid <i>a</i>	Fe-Bakteriopheophorbid <i>a</i>	Abb. C-56
Fe ^(II) BPhe <i>a</i>	Fe-Bakteriopheophytin <i>a</i> , zweiwertiger Komplex	Kap. F-3.2
Fe-Phe <i>a</i>	Fe-Pheophytin <i>a</i>	Abb. C-4
Fe ^(II) Phe <i>a</i>	Fe-Pheophytin <i>a</i> , zweiwertiger Komplex	Kap. F-3.2
(Fe ^(III) BPhe <i>a</i>)Cl	(Fe ^(III) Bakteriopheophytin <i>a</i>)Chlorid, dreiwertiger Komplex mit Cl ⁻ als Gegenion	Abb. C-5
(Fe ^(III) Phe <i>a</i>)Cl	(Fe ^(III) Pheophytin <i>a</i>)Chlorid, dreiwertiger Komplex mit Cl ⁻ als Gegenion	Abb. C-4
(Fe ^(III) BPhe <i>a</i>) ₂ ^o	μ-oxo-(Fe-Bakteriopheophytin <i>a</i>)	Abb. C-8
(Fe ^(III) Phe <i>a</i>) ₂ ^o	μ-oxo-(Fe-Pheophytin <i>a</i>)	Abb. C-8

(Fe ^(III) Me-Pheid <i>a</i>)Cl	(Fe ^(III) Pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester)Chlorid	Kap. F-3.1
Me-BPheid <i>a</i>	Bakteriopheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Kap. F-3.2
Me-Pheid <i>a</i>	Pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Abb. C-34
Ni-[3-Acetyl]-Pheid <i>a</i>	Ni-3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Kap. F-3.1
Ni-[3-Formyl]-Me-Pheid <i>a</i>	Ni-3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Kap. F-3.1
Ni-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid <i>a</i>	Ni-3-Devinyl-3-formyl-13 ² -demethoxycarbonylpheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Kap. F-3.1
Zn-BPheid <i>a</i>	Zn-Bakteriopheophorbid <i>a</i>	Abb. C-56
Phe <i>a</i>	Pheophytin <i>a</i>	Abb. C-4
Pheid <i>a</i>	Pheophorbid <i>a</i>	Kap. F-3.1
Proto-IX-DME	Protoporphyrin-IX-Dimethylester	Abb. C-2
Pyro-Me-Pheid <i>a</i>	13 ² -Demethoxycarbonylpheophytin <i>a</i> -17 ³ -methylester	Abb. C-34
Pyro-Phe <i>a</i>	13 ² -Demethoxycarbonylpheophytin <i>a</i>	Kap. F-3.1
Zn-[3-Formyl]-Me-Pheid <i>a</i>	Zn-3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Kap. F-3.1
Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid <i>a</i>	Zn-3-Devinyl-3-formyl-13 ² -demethoxycarbonylpheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	Kap. F-3.1
Ni-BPheid <i>a</i>	Ni-Bakteriopheophorbid <i>a</i>	Abb. C-56

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
B. Material und Methoden.....	18
1 Spektroskopische Methoden.....	18
1.1 UV/Vis-Spektroskopie	18
1.2 Fluoreszenzspektroskopie.....	18
1.3 Massenspektroskopie	19
1.4 Mößbauer-Spektroskopie	19
1.5 ESR-Spektroskopie.....	19
2 Chromatographische Methoden.....	19
2.1 Analytische Dünnschichtchromatographie.....	19
2.2 Präparative Chromatographie	20
2.2.1 Dünnschichtchromatographie	20
2.2.2 Säulenchromatographie.....	20
2.3 HPLC-Analyse	21
3 Darstellung der Pigmente.....	23
3.1 Standardmethoden.....	23
3.1.1 Generelle Arbeitsbedingungen	23
3.1.2 Standardaufarbeitung der Reaktionen	24
3.2 Gewinnung der Edukte Bakteriochlorophyll a, Chlorophyll a Bakteriopheophytin a und Pheophytin a	24
3.2.1 Isolierung von Bakteriochlorophyll a aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	24
3.2.2 Isolierung von Chlorophyll a aus <i>Spirulina platensis</i>	24
3.2.3 Pheophytinisierung	25
3.3 Modifikationen an der Peripherie.....	26
3.3.1 (Bakterio-)pheophorbid a-17 ³ -methylester	26
3.3.2 13 ² -Demethoxycarbonylpheophytin a und 13 ² -Demethoxycarbonyl-pheophorbid a –17 ³ -methylester.....	26
3.3.3 (Bakterio-)Pheophorbid a.....	27
3.3.4 3-Devinyl-3-acetyl-pheophytin a	28
3.3.5 3-Deacetyl-3 ¹ -hydroxyethyl-bakteriochlorophyll a und 3-Deacetyl-3 ¹ -hydroxyethyl-bakteriopheophytin a	28

3.3.6	3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriochlorophyll <i>a</i> und 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophytin <i>a</i>	29
3.4	Ozonolyse-Reaktionen	31
3.4.1	3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester und 3-Devinyl-3-formyl-13 ² -demethoxycarbonylpheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	31
3.4.2	3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -(ethanal-2-yl)ester und Pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -(ethanal-2-yl)ester.....	32
3.4.3	Ozonolyse des 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylesters.....	33
3.5	Metallierungsreaktionen	34
3.5.1	Metallierung von 3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester und 3-Devinyl-3-formyl-13 ² -demethoxycarbonylpheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester mit Zn ²⁺ und Ni ²⁺	34
3.5.2	Ni-Bakteriopheophorbid <i>a</i>	35
3.5.3	Metallierung von Pheophytin <i>a</i> - und Bakteriopheophytin <i>a</i> -Derivaten mit Fe	36
3.5.3.1	Darstellung von (Fe ^(III) Pheophytin <i>a</i>)Chlorid unter Verwendung von FeCl ₂ ...	36
3.5.3.2	Darstellung von (Fe ^(III) Bakteriopheophytin <i>a</i>)Chlorid unter Verwendung von FeCl ₂	37
3.5.3.3	Darstellung von (Fe ^(III) Pheophytin <i>a</i>)Chlorid unter Verwendung von (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	38
3.5.3.4	Darstellung von (Fe ^(III) Bakteriopheophytin <i>a</i>)Chlorid unter Verwendung von (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	39
3.5.3.5	Synthese von ⁵⁷ Fe-Pheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylester	40
4	Spektroskopische Untersuchungen von Fe-Pheophytin <i>a</i> und Fe-Bakteriopheophytin <i>a</i>.....	41
4.1	Säure-Base-Titration	41
4.2	Reduktion von (Fe ^(III) Pheophytin <i>a</i>)Chlorid und (Fe ^(III) Bakteriopheophytin <i>a</i>)Chlorid unter Bildung des Fe ^(II) (Bakterio)Pheophytin <i>a</i>	41
4.3	Probenvorbereitung für ESR- und Mößbauer-Spektroskopie.....	42
5	Spektroskopische Untersuchungen von Ni-, Zn- und Fe-Bakteriopheophorbid <i>a</i>..	42
5.1	Titration von Ni-Bakteriopheophorbid <i>a</i> und Fe-Bakteriopheophorbid <i>a</i> mit Imidazol ..	42
5.2	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Ni-Bakteriopheophorbid <i>a</i> in Tris/DMF (4:1).....	42
5.3	Bestimmung der Nachweisgrenze des Oxidationsproduktes Ni-3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid <i>a</i> durch die Bildung der zweiten Ableitung des Absorptionsspektrums ...	43
6	LH1-Rekonstitution	43
6.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	43
6.2	Isolierung der Antennenbestandteile des LH1	44

6.3	Rekonstitution des LH1-Komplexes.....	44
6.3.1	Puffer.....	44
6.3.2	Entfernen des organischen Lösungsmittel	45
6.3.3	Rekonstitution.....	45
6.3.4	Chromatographie.....	46
6.4	Pigment-Extraktion über DEAE-Sephrose-Säule.....	46
6.5	HPLC-Analyse des Pigment-Extrakts.....	47
6.6	Pigment-Extraktion und Nachweis des (Fe ^(III) Bakterio-pheophytin a)Chlorid über Absorptions-Differenzspektren.....	47
7	Synthetische Vier-Helix-Bündel-Protein-Pigment-Komplexe.....	48
7.1	Kovalente Bindung.....	48
7.1.1	Aminosäuresequenzen der verwendeten Vier-Helix-Bündelproteine.....	48
7.1.2	Bindung von Formyl-Chlorophyll-Derivaten.....	48
7.2	Nicht-kovalente Bindung	49
7.2.1	Synthese und Aminosäuresequenzen der Vier-Helix-Bündel-Proteine.....	49
7.2.2	Einlagerung von Ni-, Zn- und Fe-Bakteriopheophorbid a in synthetische, membranegebundene Peptide.....	50
7.3	Analyse der Absorptionsspektren.....	51
C.	Ergebnisse und Diskussion.....	53
1	Synthese von Fe-Pheophytin a und Fe-Bakteriopheophytin a.....	53
1.1	Einführung.....	53
1.2	Metallierungsreaktionen mit Fe	55
1.2.1	Allgemeine Metallierungsreaktionen von Porphyrinen, Chlorinen und Bakteriochlorinen.....	55
1.2.2	Metallierung von Porphyrinen mit Fe	57
1.2.3	Metallierung von Chlorinen	58
1.2.4	Metallierung von Bakteriochlorinen.....	61
1.2.5	Diskussion	64
1.2.6	Chromatographie.....	66
1.2.7	Massenspektren	69
1.2.8	Absorptionsspektrum.....	72
1.3	Spektroskopische Untersuchung des (Fe ^(III) Pheo-phytin a)Chlorid und (Fe ^(III) Bakteriopheophytin a)Chlorid.....	74
1.3.1	Einführung	74
1.3.1.1	Bildung von μ -oxo-Komplexen von Fe-Porphyrinen.....	74
1.3.1.2	Reduktion des Fe ³⁺ in Fe-Porphyrinen und (Fe ^(III) Pheophytin a)Chlorid	77
1.3.2	Absorptionsspektroskopie.....	78

1.3.2.1	Monomer - μ -oxo-Dimer-Gleichgewicht	78
1.3.2.2	Reduktion mit Na-Dithionit und Pyridin	80
1.3.2.3	Verschiebung der Q_x -Bande	84
1.3.3	ESR-Spektroskopie	87
1.3.3.1	Grundlagen.....	87
1.3.3.2	ESR-Spektroskopie an ($Fe^{(III)}$ Pheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylester)Chlorid, μ -oxo- $Fe^{(III)}$ Pheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylester, $Fe^{(II)}$ Pheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylester, ($Fe^{(III)}$ Bakteriopheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylester)Chlorid, μ -oxo- $Fe^{(III)}$ Bakteriopheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylester) und $Fe^{(II)}$ Bakteriopheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylester <i>a</i>	90
1.3.4	Mößbauerspektroskopie	92
1.3.4.1	Grundlagen.....	92
1.3.4.2	Mößbauer-Spektroskopie an ^{57}Fe -Pheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylester	94
2	Rekonstitution des Lichtsammlerkomplex 1 mit Fe-Bakteriopheophytin <i>a</i>.....	98
2.1	Einführung.....	98
2.2	Extraktion und Rekonstitution des LH1.....	99
2.3	Erste LH1-Rekonstitutionsversuche	101
2.4	Rekonstitution mit zwei Chromatographieschritten	104
2.4.1	Absorptionsspektren.....	104
2.4.2	Fluoreszenz.....	105
2.4.3	Diskussion	106
2.5	Quantifizierung des Fe-Bakteriopheophytin <i>a</i> -Gehalts	108
2.5.1	Einführung	108
2.5.2	HPLC-Analyse.....	108
2.5.3	Problematik der Pigment-Extraktion nach Standard-Methode.....	110
2.5.4	Nachweis über Differenz-Absorptions-Spektroskopie	111
3	Formyl-Derivate der (Bakterio)Chlorophylle	116
3.1	Einführung.....	116
3.2	Syntheseplanung	116
3.3	Ozonolyse-Reaktionen.....	119
3.3.1	Mechanismus der Ozonolyse.....	119
3.3.2	Ozonolyse der 3-Vinyl-Doppelbindung des Pheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylesters und 13^2 -Demethoxycarbonylpheophorbid <i>a</i> - 17^3 -methylesters.....	120
3.3.2.1	Darstellung der Ausgangsverbindungen und Ozonolyse-Reaktion	120
3.3.2.2	Absorptionsspektren.....	122
3.3.2.3	Metallierung des [3-Formyl]-Me-Pheid <i>a</i> mit Zn^{2+} und Ni^{2+}	125

3.3.3	Ozonolyse der Doppelbindung des Phytyl-Restes von 3-Devinyl-3-acetylpheophytin <i>a</i> und Pheophytin <i>a</i>	126
3.3.4	Ozonolyse von 3-Deacetyl-3-vinyl-bacteriopheophorbid <i>a</i> –17 ³ -methylester.....	131
3.3.4.1	Synthese der Ausgangsverbindung 3-Deacetyl-3-vinyl-bacteriopheophorbid <i>a</i> –17 ³ -methylester.....	131
3.3.4.2	Ozonolyse des 3-Deacetyl-3-vinylbacteriopheophorbid <i>a</i> -17 ³ -methylesters	134
4	Bindung von (Bakterio-)Chlorophyll-Derivaten an synthetische modulare Proteine	137
4.1	Einführung.....	137
4.2	Kovalente Bindung von Chlorophyll-Derivaten an modulare Proteine.....	139
4.3	Peptid-Design und Modellierung der modularen Proteine für die nicht-kovalente Bindung von [M]-Bakteriochlorophyllen (M = Ni, Zn und Fe).....	143
4.4	Wahl und Darstellung der Bakteriochlorophyll-Derivate zur nicht-kovalenten Bindung in modularen Proteinen	147
4.5	Nicht-kovalente Pigment-Bindung	148
4.6	Absorptionsspektroskopische Analyse der nicht-kovalent gebundenen [M]-Bakteriochlorophyll-Protein-Komplexe (M = Ni, Zn und Fe).....	150
4.6.1	Überblick über die charakteristischen Parameter der absorptionsspektroskopischen Analyse	150
4.6.2	Ni-Bacteriopheophorbid <i>a</i>	152
4.6.2.1	Untersuchungen in Lösung.....	152
4.6.2.1.1	Titration mit Imidazol	152
4.6.2.1.2	Bestimmung der Nachweisgrenze des Oxidationsproduktes Ni-3-Devinyl-3-acetylpheophorbid <i>a</i>	156
4.6.2.1.3	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Ni-Bacteriopheophorbid <i>a</i> in Tris/DMF	157
4.6.2.1.4	Vergleich der Absorption von Ni-Bacteriopheophorbid <i>a</i> in verschiedenen Lösungsmitteln	159
4.6.2.2	Absorption der Ni-BPheid <i>a</i> -Protein-Komplexe	160
4.6.2.2.1	Lage der Absorptionsbanden	160
4.6.2.2.2	Analyse der Koordination des Ni in den Ni-BPheid <i>a</i> -Protein-Komplexen	161
4.6.2.2.3	Analyse der Q _y -Absorptionsbande	166
4.6.2.2.4	Diskussion.....	171
4.6.3	Zn-Bacteriopheophorbid <i>a</i>	173
4.6.4	Fe-Bacteriopheophorbid <i>a</i>	178
4.6.5	Diskussion	184

D. Zusammenfassung	185
E. Literaturverzeichnis	188
F. Anhang	203
1 Verwendung der Einheit OD und ODml	203
2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Fe-Phe und Fe-BPhe	204
3 Pigmentübersicht	205
3.1 Chlorin-Derivate	205
3.2 Bakteriochlorin-Derivate	207
4 Verwendete Extinktionskoeffizienten	209

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Snigula, H., Monien, B., Drepper, F., de Jonge, N., Haehnel, W., & Scheer, H. (2003) Tetrapyrrole binding by modular proteins: Non-covalent binding of bacteriochlorophyllides with different central metals by modular proteins: a combinatorial approach. *Biochemistry*, (eingereicht).
2. Rau, H.K. , Snigula, H., Struck, A., Robert, B., Scheer, H., & Haehnel, W. (2001) Design, synthesis and properties of synthetic chlorophyll proteins. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3284-3295.
3. Struck, A., Snigula, H., Rau, H.-K., Hörth, P., Winkler, D., Scheer, H., Haehnel, W. (1999) Synthetic four-helix bundle proteins with chlorophyll derivatives. In *Peptides*. Bajusz, S. and Hudecz, F. (Hrsg.) Adadémiai Kiadó, Budapest, S. 456-457.
4. Struck, A., Snigula, H., Rau, H.-K., Hörth, P., Scheer, H., & Haehnel, W. (1998) Synthetic four-helix bundle protein carrying 1 or 2 chlorophyll derivatives. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Proc. Int. Congr. Photosynth. 11th*. Garab. G. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 4213-4216.

A. Einleitung

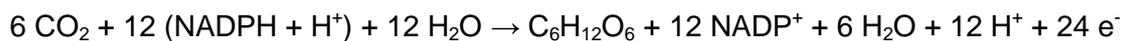
Der Chemiker Primo Levi beschreibt in seinem Buch „Das periodische System“ die Photosynthese nach dem damaligen Wissensstand folgendermaßen [Levi, 1987]:

„...[Das Kohlendioxid] hatte das Glück, ein Blatt zu streifen, in dieses einzudringen und von einem Sonnenstrahl darin festgenagelt zu werden. Wenn ich mich hier ungenau und in Andeutungen ausdrücke, dann liegt das nicht nur an meiner Unwissenheit: dieses entscheidende Ereignis, diese blitzschnelle Arbeit zu dritt, von Kohlendioxyd, Licht und Pflanzengrün, ist bisher noch nicht genau beschrieben und wird es wohl so bald nicht werden, so sehr unterscheidet es sich von der übrigen „organischen Chemie“, die das kolossale, langsame, mühselige Werk des Menschen ist: und doch wurde jene feinsinnige, flinke Chemie bereits vor zwei, drei Milliarden Jahren von unseren schweigsamen Schwestern, den Pflanzen, „erfunden“, die nicht experimentieren und diskutieren und deren Temperatur genau mit der Temperatur der Umwelt übereinstimmt. Wenn verstehen sich ein Bild machen heißt, dann werden wir uns wohl nie ein Bild machen können von einem Geschehnis, das auf einem millionstel Millimeter im Tempo einer millionstel Sekunde vor sich geht und bei dem die Akteure unsichtbar sind. [...] wenn wir lernen werden, es ihm gleichzutun, werden wir *sicut Deus* sein und auch das Problem des Hungers in der Welt gelöst haben.“

Das bei Levi beschriebene Bild ist heute noch z.T. gültig. Zwar können wir uns mittlerweile ein Bild machen von diesem wichtigsten Energiegewinnungsprozess der Erde, denn nahezu die gesamte Biomasse ist letztendlich ein Produkt der Photosynthese. Nachbilden können wir die hochkomplexen Photosysteme im Labor aber noch nicht.

Aufgrund der Bedeutung der Lichtenergie zur Energiegewinnung wurden Systeme (Solarzellen) entwickelt, mit denen die Lichtenergie in nutzbare Energie umgewandelt wird (Photovoltaik). Solche Solarzellen erreichen einen Wirkungsgrad von 4 bis maximal 16 %.

Zur Bestimmung der Effizienz der Photosynthese können verschiedene Methoden angewendet werden. Berechnet man die Effizienz der Photosynthese bei Grünpflanzen als Verhältnis der gebildeten Biomasse zur absorbierten Sonnenenergie, so liegt sie unterhalb von 1 %. Zieht man die Energiebilanz der Summgleichung der Photosynthese für die Bildung von 1 Mol Glucose zur Bestimmung des Wirkungsgrades heran, ergibt sich ein anderes Bild:



Zur Bildung von 12 (NADPH + H⁺) werden 8 Elektronen benötigt, was im einfachsten Fall 8 Lichtquanten entspräche, die bei einer Wellenlänge von 700 nm eine Energie von 8·176 kJ/Mol haben. Mit einem Energieverbrauch von 478 kJ/Mol, der für die Reduktion des CO₂ auf die Oxidationsstufe der Glucose benötigt wird, erhält man einen Wirkungsgrad von:

$$\text{Wirkungsgrad} = \frac{\text{Energieverbrauch}}{\text{aufgenommene Energie}} = \frac{478 \text{ kJ/Mol}}{8 \cdot 176 \text{ kJ/Mol}} = 0,34.$$

Dieser Wirkungsgrad von 34 % wird aber nur unter optimalen Bedingungen erreicht.

Betrachtet man photosynthetischen Primärprozesse, beginnend mit der Absorption eines Photons und endend mit einem stabilen ladungstrennten Zustand, so liegt die Quantenausbeute bei 95 % [Pullerits und Sundström, 1996].

Es hat deshalb nicht an Versuchen gefehlt, sich das Prinzip der Photosynthese zur hocheffizienten Energiegewinnung nutzbar zu machen. Hierfür ist es notwendig, die einzelnen Prozesse und photosynthetischen Komplexe strukturell und funktionell zu verstehen. Obwohl viele photosynthetische Komplexe strukturell aufgeklärt sind, bedürfen die Pigment-Protein- und Pigment-Pigment-Wechselwirkungen noch der funktionellen Analyse. Zur Lösung dieser Probleme werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste basiert auf der detaillierten Untersuchung dieser Wechselwirkungen direkt in den

photosynthetischen Komplexen, der zweite versucht diese Frage mit Hilfe von Modellsystemen zu erklären. Diese beiden Ansätze sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Der bakterielle Photosyntheseapparat ist aufgrund seines relativ einfachen Aufbaus und weitgehend gelöster Strukturen ein gutes Modell, um die Primärprozesse der Photosynthese, wie Lichtabsorption, Energietransfer und Erzeugung eines stabilen ladungstrennten Zustandes zu untersuchen.

Primärprozesse und Photosynthetische Komplexe am Beispiel von Purpurbakterien

Der photosynthetische Apparat der Purpurbakterien besteht aus spezialisierten Membran-Pigment-Protein-Komplexen, die es ihnen ermöglichen, noch effizient Licht geringer Energie (mit Wellenlängen bis $1050 \text{ nm} \approx 9500 \text{ cm}^{-1}$) zu nutzen, in einem Wellenlängenbereich, in dem oxygene Photosysteme ineffektiv sind. Der erste Schritt der Photosynthese besteht darin, Licht (Photonen) zu absorbieren. Dies geschieht mit einem System aus zumeist zwei Antennenkomplexen (Lichtsammlerkomplex 1 und 2 (LH1 und LH2)), die das Licht effektiv absorbieren und die Anregungsenergie zum Reaktionszentrum (RC) weiterleiten. Dort wird es in ein elektrochemisches Potential durch ultraschnelle und langlebige Ladungstrennung über die photosynthetische Membran umgewandelt.

Rhodobacter (Rb.) sphaeroides hat, wie die meisten Purpurbakterien, zwei Typen von Lichtsammlerkomplexen. Gemäß ihrer NIR-Absorptionsmaxima heißt der LH1-Komplex auch B875, mit einem Absorptionsmaximum bei 875 nm, der LH2-Komplex auch B800-B850 mit Absorptionsmaxima bei 800 und 850 nm. LH1 ist eng assoziiert mit dem RC, die zusammen den sogenannten Kernkomplex bilden, während die LH2-Antenne keinen direkten Kontakt zum RC besitzt (Abb. A-1). In einigen Spezies, wie *Rhodospirillum (Rs.) molischianum* ist die Assoziation von LH1 und RC so stark, dass das LH1 nicht ohne Verlust seiner spektralen Eigenschaften vom RC getrennt werden kann [Boonstra et al., 1994], in anderen Spezies, wie *Rb. sphaeroides* [Boonstra et al., 1993; Hu und Schulten, 1998] und *Rs. rubrum* [Ghosh et al., 1988; Loach und Parkes-Loach, 1995] kann der LH1-Komplex homogen isoliert werden. Das Verhältnis von LH2 zum Kernkomplex ist variabel und hängt von den Wachstumsbedingungen wie Lichtintensität und Temperatur ab [Aagaard und Sistrom, 1972].

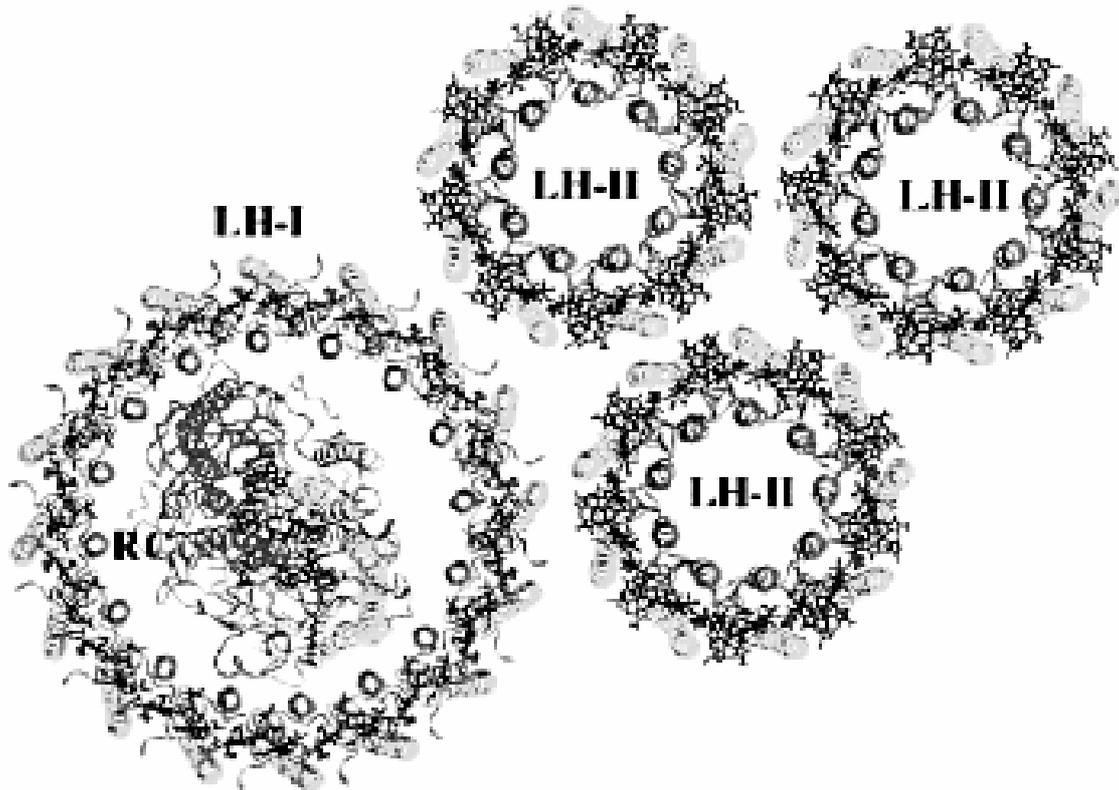


Abb. A-1: Modell der Anordnung der Pigment-Protein-Komplexe der bakteriellen photosynthetischen Einheit mit den Antennenkomplexen LH2 und LH1 und dem Reaktionszentrum (RC) von *Rb. sphaeroides* (entnommen aus [Schulten, 1999])

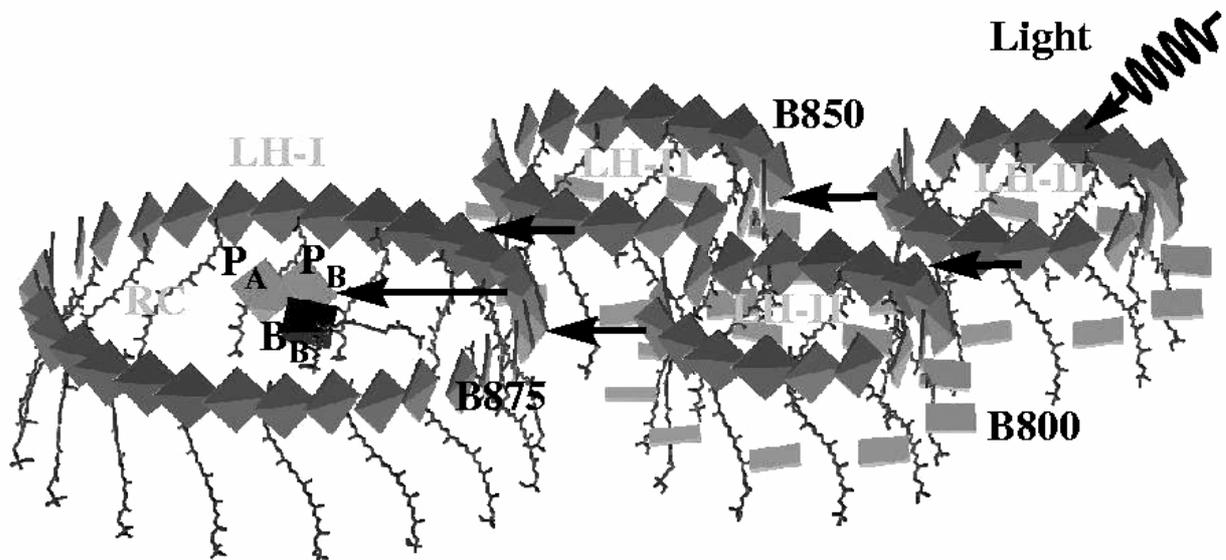


Abb. A-2: Modell des Energietransfers in der bakteriellen photosynthetischen Einheit. LH2 enthält zwei Typen von Bakteriochlorophyllen (BChl), bezeichnet als B800 und B850, entsprechend ihrem langwelligem Absorptionsmaximum. Die BChl im LH1 absorbieren bei 875 nm, bezeichnet als B875. P_A und P_B bezeichnen das special pair des RC und B_A bzw. B_B sind die sog. „akzessorischen“ BChl im RC (entnommen aus [Hu et al., 1998]).

Ein kaskadenartiger, gerichteter Energietransfer von LH2 über LH1 zum RC ist durch die Anordnung der Antennenpigmente mit abnehmender Absorptionsenergie zum RC hin gewährleistet, von 800/850 nm im LH2 zu 875 nm im LH1 (Abb. A-2). Obwohl beide LH die gleichen Pigmente enthalten, variieren ihre Absorptionseigenschaften durch unterschiedliche Wechselwirkung mit dem sie umgebenden Protein und durch excitonische Wechselwirkungen mit Nachbarpigmenten.

Alle bekannten Antennenkomplexe von Purpurbakterien zeigen einen auffallend ähnlichen Aufbau [Zuber, 1985; Zuber und Brunisholz, 1991]. Die Grundeinheit bildet ein Heterodimer aus zwei kurzen Polypeptiden, den α - und β -Apoproteinen, die die Bakteriochlorophylle (BChl) und Carotinoide nicht-kovalent binden. Die Heterodimere assoziieren zu den ringförmigen funktionalen Antennenkomplexen. Dabei ist LH1 größer als LH2, die genaue Größe der Komplexe ist von der Spezies abhängig.

Die LH2-Struktur von *Rs. molischianum* [Koepke et al., 1996] und *Rhodopseudomonas (Rps.) acidophila* [McDermott et al., 1995] wurden röntgenkristallographisch mit atomarer Auflösung bestimmt. Bei *Rs. molischianum* wird der Ring aus acht α,β -Heterodimeren gebildet, bei *Rps. acidophila* aus neun Untereinheiten. Pro Untereinheit sind drei BChl und ein, möglicherweise zwei Carotinoide gebunden. Die BChl bilden zwei Ringe. Die B850-BChl sind über Histidin an das Protein gebunden, schindelförmig, nahezu koplanar zu den nächsten Nachbarn, mit einem kurzen Mg-Mg-Abstand (9 Å) angeordnet und liegen senkrecht zur Membranebene. Der kurze Abstand der BChl führt zu starken excitonischen Wechselwirkungen [Pullerits und Sundström, 1996; Ketelaars et al., 2001; Matsushita et al., 2001; Fiedor et al., 2000; Fiedor et al., 2001; Braun und Scherz, 1991], wobei die Zahl der gekoppelten Pigmente, die sog. Excitonenlänge, umstritten ist. Die B800-BChl sind parallel zur Membranebene angeordnet, über Methionin an das Protein gebunden mit einem Mg-Mg-Abstand von ca. 18 Å [McDermott et al., 1995], ihre Kopplung ist schwach.

Struktur des Lichtsammler-Komplexes LH1:

Eine hochaufgelöste Struktur von LH1 ist bisher noch nicht verfügbar, bisher sind lediglich elektronenmikroskopische Aufnahmen mit einer Auflösung von 8,5 Å publiziert [Karrasch et al., 1995]. Diese weist stark darauf hin, dass der isolierte Komplex ein $(\alpha\beta)_{16}\text{BChl}_{32}$ -Aggregat ist. Der Ring aus 32 BChl ist größer, aber ansonsten dem Ring im LH2 aus 18 stark gekoppelten BChl sehr ähnlich. Hu und Schulten [Hu und Schulten, 1998] stellten ein Computermodell des LH1 auf, basierend auf der Homologie des Heterodimers des LH1 von *Rb. sphaeroides* zu dem des LH2 aus *Rs. molischianum*. Dies führte zu einer Elektronendichteverteilung des LH1 in Übereinstimmung mit der elektronenmikroskopischen Aufnahme aus ebenfalls einem Hexadekamer der $\alpha\beta$ -Heterodimeren (Abb. A-3).

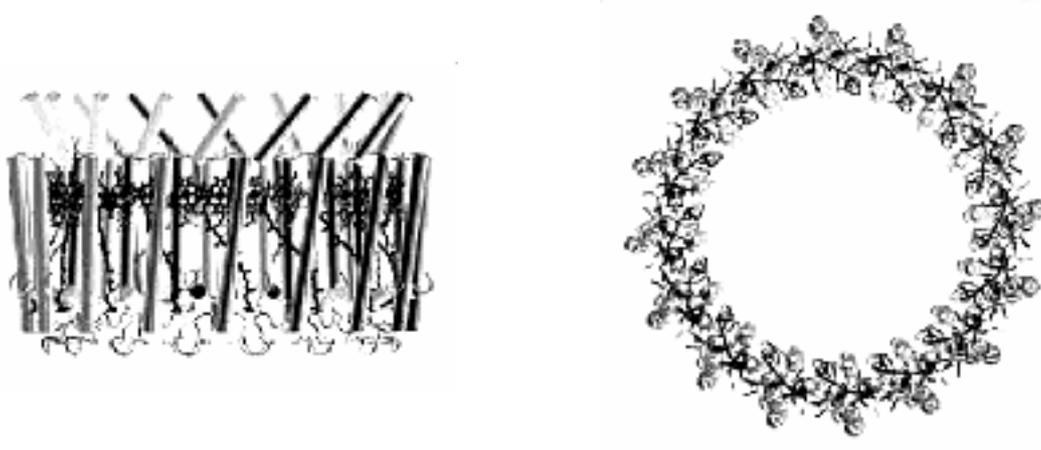


Abb. A-3: Modell-Struktur von LH1 (entnommen aus [Hu und Schulten, 1998]), links Seitenansicht; rechts Aufsicht auf die Membranebene

Der innere Durchmesser des LH1-Rings ist 78 Å, so dass das RC genau darin Platz findet. Die BChl sind wie im LH2 nicht-kovalent über Histidin an das Protein gebunden, welches als Ligand zum zentralen Mg fungiert, mit einem Mg-Mg-Abstand von ca. 9 Å. Zusätzlich wird das BChl über eine H-Brücke zwischen der C-3-Acetyl-Gruppe und einem Tryptophan fixiert, auch dies findet sich im LH2 [Koepeke et al., 1996].

Der Carotinoid-haltige LH1-Komplex kann, im Gegensatz zu LH2, reversibel unter Verwendung eines Detergenz in $(\alpha\beta)\text{BChl}_2$ -Untereinheiten dissoziiert werden, genannt B820 entsprechend dem langwelligen Absorptionsmaximum [Meadows et al., 1998] (vg. auch Kap. C-2). Die Hauptursache hierfür ist, dass die Hauptwechselwirkungen, die das LH1 stabilisieren, innerhalb dieser $(\alpha\beta)\text{BChl}_2$ -Untereinheit stattfinden. Im Gegensatz dazu existieren im LH2 H-Brückenbindungen zwischen Aminosäuren und BChl in benachbarten Untereinheiten [van Grondelle und Novoderezhkin, 2001]. *In vivo* bildet das LH1 wahrscheinlich keinen vollständigen Ring [Jungas et al., 1999]. Es wird vermutet, dass das

PufX-Protein ein oder mehrere α,β -Heterodimere des LH1 ersetzt, um den Ring zu öffnen und um so den Chinon-Fluss (Q_B/Q_BH_2) zwischen RC und dem Cytochrom bc_1 -Komplex zu erleichtern [Mcglynn et al., 1994], [Frese et al., 2000], [Francia et al., 1999]. Dies bestätigt auch die seit Kurzem gelöste Struktur eines Kern-Komplexes (LH1 + RC), nach der das LH1 nicht circular aufgebaut ist, sondern eher oval mit einer Lücke (Cogdell et al., unveröffentlicht).

Struktur und Absorption der Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine

Alle (Bakterio-)Chlorophylle ((B)Chl) sind *in vivo* proteingebunden. Abhängig von ihrer Funktion weisen sie charakteristische optische Spektren, Oxidations- und Reduktionspotentiale auf, die auch spezies- oder photosystemabhängig sein können und die entscheidend von denen isolierter Moleküle in Lösung abweichen können. Die elektronischen Eigenschaften von (B)Chl entstehen aus den relativen Energien und Elektronenkonfigurationen ihrer Molekülorbitale (MOs). (B)Chl kann *in vivo* verschiedene Funktionen ausführen, wie die Lichtaufnahme und Energietransfer als Antenne, die Funktion als primärer Elektronen-Donor und Elektronen-Akzeptor in Photosystem I und II und bakteriellen RC. Dies reflektiert die Empfindlichkeit der MOs gegenüber Veränderungen der lokalen (Protein-)Umgebung und des Aggregationszustand der Pigmente.

Chlorophylle (Chl) und Bakteriochlorophylle gehören, wie die Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine zur Gruppe der zyklischen Tetrapyrrole (Abb. A-4). Porphyrine sind weitgehend ungesättigt (nur zwei Wasserstoffatome an den zentralen Stickstoffatomen), Chlorine haben einen gesättigten Pyrrol-Ring (Ring D) und Bakteriochlorine haben, bedingt durch sequentielle Hydrierung der C7-C8- und C17-C18-Doppelbindungen zwei gegenüberliegende gesättigte Pyrrolringe (Ringe B und D) (Abb. A-5). Zusätzlich zu diesen Änderungen im π -System besitzen alle (B)Chl einen ankondensierten isozyklischen Pentanonring (Ring E), der biosynthetisch aus dem C-13-Propionsäure-Rest des Protoporphyrin IX entsteht, die freie Propionsäure an C-17 ist mit einem großen, unpolaren C_{20} -Terpen-Alkohol, z.B. Phytol, verestert, der an der Verankerung des Pigments im Proteingerüst beteiligt ist. Das Zentralmetall der Chlorophylle und Bakteriochlorophylle ist Mg, in Ausnahmefällen auch Zn [Kobayashi et al., 1998], demgegenüber ist es im Häm Fe. Die verschiedenen (B)Chl unterscheiden sich außer in der Anzahl der π -Elektronen noch in den Substituenten, vor allem an den Positionen C-3 und C-7. Chl *a* enthält eine C-3-Vinyl-Gruppe, Chl *b* eine C-7-Formyl-Gruppe und BChl *a* eine C-3-Acetyl-Gruppe.

Für die optischen Spektren der Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine ist in erster Linie der elektronische Kern mit 11, 10 bzw. 9 konjugierten Doppelbindungen verantwortlich. Die Reduktion der Doppelbindungen führt zu einer beachtlichen Änderung der Absorptionsspektren und damit der angeregten Zustände. Mit zunehmender Hydrierung, d.h. in der Reihe Porphyrin, Chlorin, Bakteriochlorin gewinnt die Q_y -Bande zunehmend an Intensität und zeigt eine Rotverschiebung, während sich die Soret-Bande ins Blaue verschiebt [Scheer und Inhoffen, 1978]. Weitere Verschiebungen können durch die unterschiedlichen Substituenten, das Zentralmetall und seine Koordination auftreten [Weiss, 1972; Hanson, 1991].

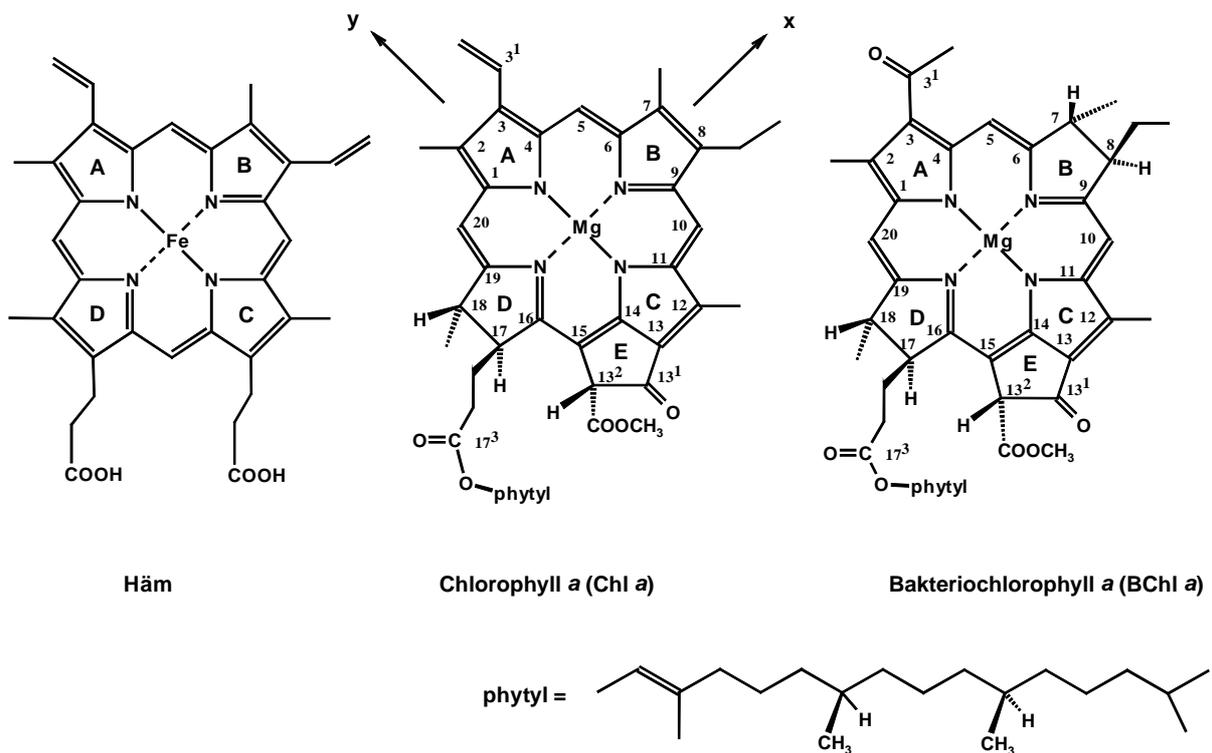


Abb. A-4: Strukturen von Proto-Häm (links), Chlorophyll a (Mitte) und Bakteriochlorophyll a (rechts)

Das absorptionsspektroskopische Verhalten der Porphyrine, Chlorophylle und Bakteriochlorophylle lässt sich qualitativ gut mit der 4-Orbital-Theorie von Goutermann [Goutermann, 1978] beschreiben. Dieses Modell wurde zuerst für hochsymmetrische Metallo-Porphyrine (D_{4h} -Symmetrie) entwickelt und dann für die Chlorin- und Bakteriochlorin-Gerüste mit geringerer Symmetrie modifiziert.

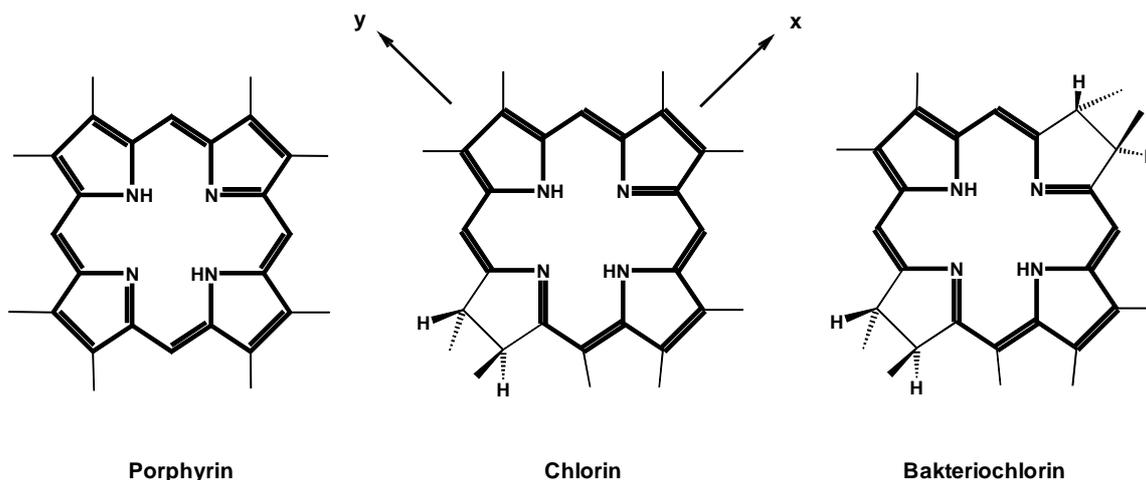


Abb. A-5: Vergleich der π -Systeme (fett) von Porphyrin, Chlorin und Bakteriochlorin mit 11, 10 bzw. 9 konjugierten Doppelbindungen

Man erhält zwei vollständig besetzte Orbitale $a_{2u}(\pi)$ und $a_{1u}(\pi)$ (HOMO und HOMO - 1) und zwei unbesetzte Orbitale $e_{gx}(\pi^*)$ und $e_{gy}(\pi^*)$ (LUMO und LUMO + 1). Die Absorptionsbanden im UV/Vis/NIR-Bereich entstehen durch Übergänge zwischen diesen Orbitalen. Es kommt zu vier möglichen Übergängen, von denen zwei x-polarisiert sind ($a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$, $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$) und zwei y-polarisiert ($a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$, $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$) sind. Die Nomenklatur der Übergänge als B für die hochenergetischen Übergänge $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$ (B_y) und $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gy}(\pi^*)$ (B_x) und Q für die niederenergetischen Übergänge $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$ (Q_x) und $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_{gx}(\pi^*)$ (Q_y) ist historisch bedingt. Die Indizes x und y deuten an, dass die senkrecht zueinander stehenden Übergangsdipolmomente entlang der N-Atome der Pyrrolringe A und C (y-polarisiert) bzw. B und D (x-polarisiert) liegen (Abb. A-4,5). Die vier MOs für Porphyrin sind in Abb. A-6 dargestellt. In der D_{4h} -Symmetrie liegen die HOMOs ($a_{2u}(\pi)$ und $a_{1u}(\pi)$) nah beieinander und die zwei LUMOs ($e_{gx}(\pi^*)$ und $e_{gy}(\pi^*)$) sind entartet (Abb. A-7). Eine Hydrierung der C-C-Doppelbindung an Ring D führt zu einem Chlorin und verringert die Symmetrie des Systems. Dies bewirkt, dass die LUMOs nicht länger entartet sind, die MOs e_{gy} und a_{1u} destabilisiert und somit energetisch angehoben werden, wohingegen das $a_{2u}(\pi^*)$ und $e_{gx}(\pi)$ davon nicht betroffen sind. Eine weitere Sättigung an Ring B verstärkt diese Effekte.

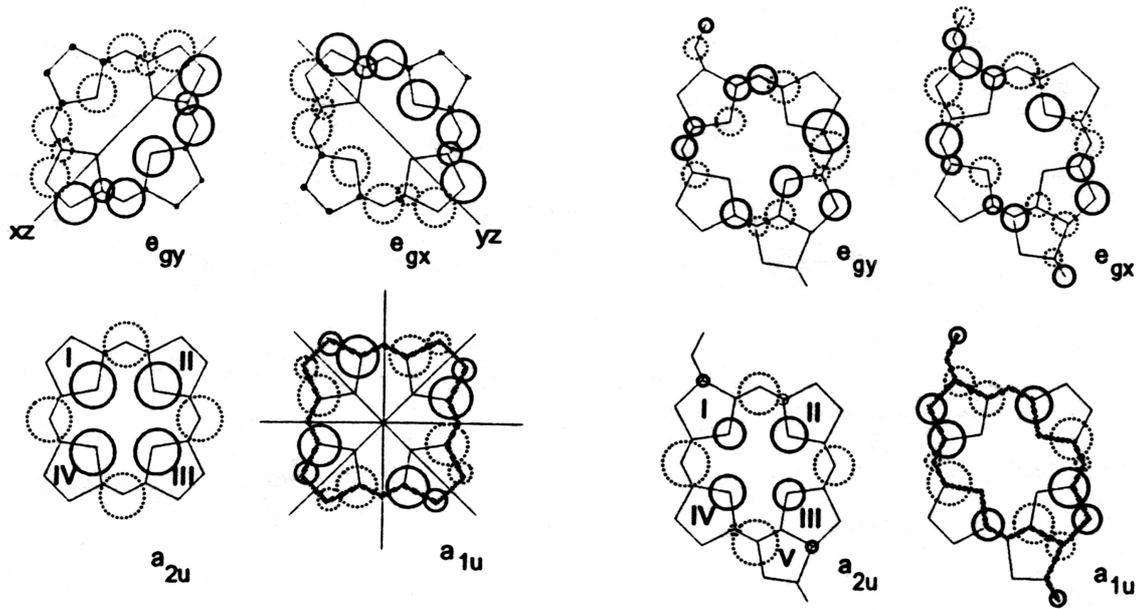


Abb. A-6: Elektronendichteverteilung der einzelnen Orbitale von Porphyrin (links) und Bakteriochlorin (rechts) (aus [Hartwich, 1994])

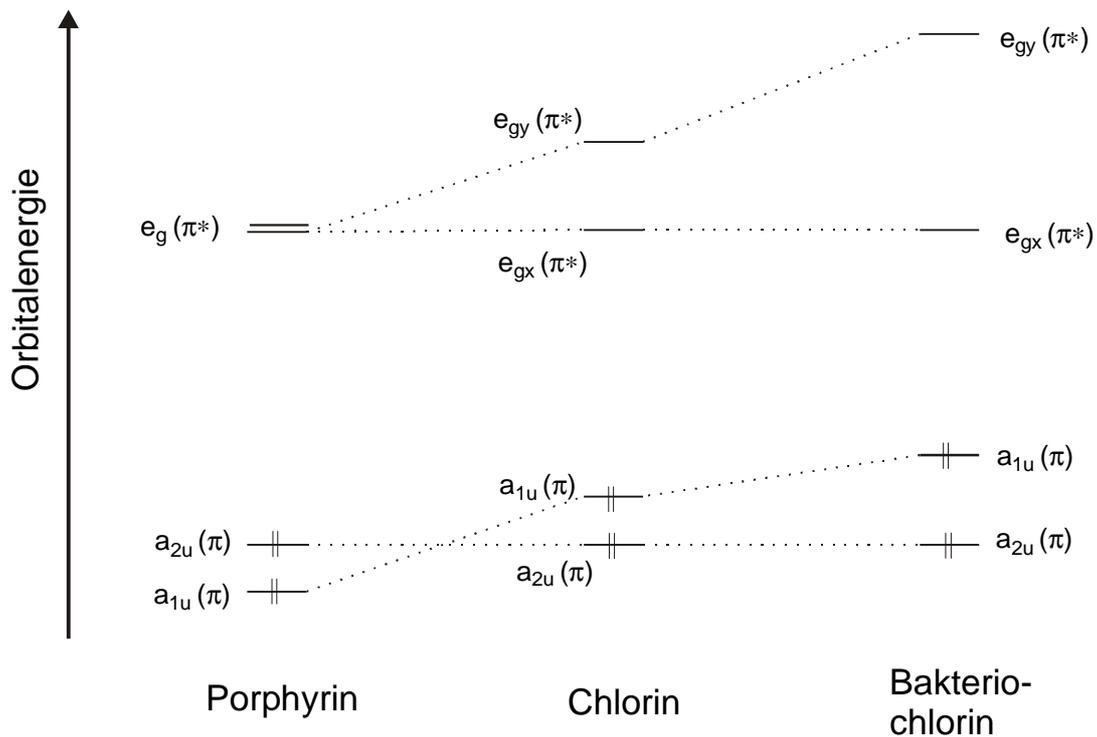


Abb. A-7: Schematische Darstellung der Energie der Molekülorbitale der Porphyrine, Chlorine und Bakteriochlorine [Hanson, 1991].

Die Erhöhung der Energie der MOs führt zu Änderungen der Übergangsenergie der entsprechenden Übergänge. Die in Tab. A-1 aufgeführten Energien dieser Übergänge

wurden von Hasegawa et al. für das unsubstituierte, nicht-metallierte Porphin, Chlorin und Bakteriochlorin berechnet [Hasegawa et al., 1998].

Bande [Übergangsenergie]	B_y		B_x		Q_x		Q_y	
	$[10^3 \cdot \text{cm}^{-1}]$	[nm]						
Porphin		25,4	394		19,3	518	17,7	564
Chlorin		25,7	388		18,5	541	15,6	639
Bakteriochlorin	27,4	366	25,8	387	18,5	539	12,9	774

Tab. A-1: Theoretisch berechnete Energien (in cm^{-1}) der elektronischen Übergänge von unsubstituierten Porphyrinen, Chlorinen und Bakteriochlorinen [Hasegawa et al., 1998]

Pigment-Protein-Wechselwirkungen und ihre Untersuchungsmethoden:

Die Mg-Komplexe Chl und BChl liegen in den photosynthetischen Komplexen genau wie andere Tetrapyrrol-Metallkomplexe Häm ($M = \text{Fe}$), Vitamin B_{12} ($M = \text{Co}$), F430 ($M = \text{Ni}$) fast immer proteingebunden vor. Die Orientierung und Positionierung des Chromophors wird durch Wechselwirkung mit dem Protein vorgegeben, wodurch die vielseitigen Funktionen festgelegt werden, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind:

Chromophor	Protein	Funktion
Chlorophylle	LHC, PSI, PSII	Lichtabsorption, Energietransfer Elektronentransfer, Ladungstrennung
Bakteriochlorophylle	LH1, LH2 bakt. RC	Lichtabsorption, Energietransfer Elektronentransfer, Ladungstrennung
Häm	Cytochrome, Oxidasen, Peroxidasen, Hämoglobin, Myoglobin	Redoxreaktionen, Elektronentransport, Oxygenierungen, Sauerstoffbindung und Transport
Vitamin B_{12} (Cobalmin)	Methylmalonyl-CoA- Mutase	Umlagerung von C-C-Bindungen
Ni-Porphyrin F430	Methyl-CoM-Reduktase	Methanbildung

Tab. A-2: Metallkomplexe zyklischer Tetrapyrrole, ihre Proteinkomplexe und Funktionen.

Die verschiedenen chemischen und spektroskopischen Eigenschaften werden durch spezifische Chromophor-Protein- und, insbesondere bei Chlorophyllen, auch durch

Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen erreicht. Diese Wechselwirkungen beinhalten eine Vielzahl von Parametern, wie z.B. die Stereochemie des Makrozyklus (Abweichung von der Planarität) [Ma et al., 1998] und der Substituenten [McLuskey Karen et al., 1999], die Hydrophobizität der Umgebung [Hauksson et al., 1990] und die Zahl und den Typ von zusätzlichen Liganden. Dieser Faktor ist wahrscheinlich der wichtigste zur Bestimmung der spektralen Eigenschaften, Redoxaktivität und Substratbindung der Hämproteine [Williams et al., 1997; Yeh et al., 1997]. In Chlorophyllproteinen gibt es zusätzliche Faktoren, wie Wasserstoffbrückenbindungen, um die Carbonylgruppen zu koordinieren [Ivancich et al., 1998] und Wechselwirkungen mit anderen Pigmenten [Sauer et al., 1996; Alden et al., 1997; Jimenez et al., 1996; Katz et al., 1976; Ketelaars et al., 2001; Matsushita et al., 2001; Fiedor et al., 2000; Fiedor et al., 2001; Braun et al., 2002].

Ein Ziel der Forschung ist deshalb die Untersuchung dieser auf Änderungen oft empfindlich reagierenden Struktur-Funktionsbeziehung mit Hilfe verschiedener Methoden, wie chemischen Pigmentmodifikationen (NaBH₄-Reduktion im Komplex [Ücker et al., 1998], Austausch von modifizierten Pigmenten [Hartwich, 1994; Meyer, 1997; Struck, 1990; Fiedor et al., 2001; Bandilla, 1995]) oder Mutationen der Proteinmatrix [Paulsen und Kuttkat, 1993; Meadows et al., 1995; Olsen et al., 1997; Braun et al., 2002]. Trotz einer umfangreichen Datenbasis lassen sich die Wirkungen derartiger Modifikationen auf die Systeme bisher nur unbefriedigend vorhersagen.

Ein alternativer Weg zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Pigment und Protein ist, anstatt die photosynthetischen Komplexe selbst mit den oben genannten Methoden zu modifizieren, neue, Chlorophyll-bindende Peptide zu entwerfen und auf ihre Eigenschaften zu untersuchen. Hinter diesem Konzept steht der Gedanke, dass man ein System erst richtig verstehen kann, wenn man es „synthetisch“ nachbilden kann. Von diesem Design synthetischer Chlorophyll-bindender Peptide verspricht man sich neue Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Struktur und Funktion der Chlorophyll-Proteine.

Die Methode des *de novo*-Designs ist erst in jüngster Zeit zur Synthese von Chl-Proteinen angewendet worden [Dudkowiak et al., 1998; Miyake et al., 1998; Struck et al., 1999], hingegen existieren zahlreiche Arbeiten zur Modellierung von Häm-Bindungstaschen [Rau et al., 2000; Rau und Haehnel, 1998; Shifman et al., 2000]. Dies begründet sich wohl in der unterschiedlichen Komplexität von (B)Chl- und Häm bzw. ihren Protein-Komplexen. Häme sind strukturell im Vergleich zu den (B)Chl einfacher aufgebaut (siehe Abb. A-4). Die Propionyl-Seitenketten sind nicht verestert, sie besitzen keinen isozyklischen Ring und das Tetrapyrrolgerüst ist vollständig hydriert, so dass dieses planar ist. Die Häm-Proteine binden

im einfachsten Fall nur ein Häm pro Protein (z.B. Myoglobin, Cytochrom c). In (B)Chl-Protein-Komplexen hingegen sind viele Chromophore gebunden und oft erst nach vollständiger Aggregation funktionell aktiv. Viele Häm-Proteine sind wasserlöslich, Chl-Proteine nur ausnahmsweise.

Gemeinsam ist den (B)Chl- und vielen Häm-Bindungstaschen, dass die Pigmente nicht-kovalent durch Koordination mit His oder anderen ligandierenden Aminosäuren gebunden werden. Bei den (B)Chl findet eine fünffache Koordination statt (ein zusätzlicher Ligand), bei den Hämen in der Regel eine sechsfache Koordination (zwei „Extra“-Liganden, z.B. Bis-Histidin-Ligandierung). Auch sind sich Häm und (B)Chl strukturell sehr ähnlich, so dass Chl-Derivate nach der Verseifung des Phytol-Restes von Häm-Bindungstaschen, wie z.B. Myoglobin oder Hämoglobin akzeptiert werden [Boxer et al., 1982; Kuki und Boxer, 1983; Moog R. S. et al., 1984].

Prinzipien des *de novo*-Designs

Da die Tetrapyrrol-Pigmente in natürlichen Komplexen meist von α -helicalen Bereichen umgeben und meist über Histidine oder andere ligandierende Aminosäuren an das Protein nicht-kovalent gebunden sind, werden im *de novo*-Design ebenfalls α -Helices verwendet. Ihr Design folgt der Anwendung von helixstabilisierenden Faktoren, die detailliert untersucht worden sind [Bryson et al., 1995; Bryson et al., 1998; Popot und Engelman, 2000]. Dazu gehören z.B. die Verwendung von Alanin-Resten, die die Helix-Bildung verstärken und Salzbrücken-bildende Aminosäurereste, die eine Helixwindung voneinander entfernt sind.

Ist die α -Helix amphiphil, d.h. auf einer Seite befinden sich hydrophobe, auf der anderen Seite hydrophile Aminosäurereste, so lagern sie sich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen in polaren Lösungsmitteln zu multimeren Strukturen, sogenannten coiled coils (Helix-Bündel) zusammen. Diese Helix-Bündel können sich aus zwei, drei und (sehr häufig) vier Helices bilden. Die Vier-Helix-Bündel können aus einzelnen Helices, Helix-Loop-Helix-Dimeren [Shifman et al., 2000; Sharp et al., 1998] oder Vier-Helix-Proteinen gebildet werden. Im Inneren dieser wasserlöslichen Multimere wird so eine hydrophobe Tasche gebildet, in der der Kofaktor gebunden wird. Dieses System ist besonders gut bei den Häm-bindenden synthetischen Proteinen untersucht worden. Die ersten Beispiele dieser Methode stammen von den Gruppen de Grado und Dutton [Robertson et al., 1994; Gibney et al., 1997]; sie wurden durch Dimerisierung von bis-helicalen Proteinen erhalten.

Eine Alternative zu solchen Strukturen, die eine spontane Aggregation erfordern und hohe Symmetrie aufweisen, ist die Fixierung von α -Helices durch ein Template [Mutter et al., 1988; Mutter und Vuilleumier, 1989], wobei z.B. vier Helices an ein Cyclopeptid gebunden werden. Bei der Synthese dieser sogenannten Vier-Helix-Bündel-Proteine oder TASP (template assembled synthetic proteins) ist es möglich, durch die Wahl geeigneter Schutzgruppen bis zu vier verschiedene α -Helices zu binden, gleichzeitig ist ein asymmetrisches Design mit parallelen oder antiparallelen Helices möglich.

Das Strukturprinzip der Vier-Helix-Bündel-Proteine ist in der Natur weit verbreitet. In den Cytochromen sitzt das Häm meist komplexiert von zwei Histidinen im Inneren von vier antiparallelen α -Helices. Aber auch beim bakteriellen Reaktionszentrum findet sich diese Strukturelement. In Abb. A-8. ist das RC dargestellt. In der Mitte befindet sich das special pair, das in nächster Umgebung von vier, gegeneinander verdrehten α -Helices liegt.

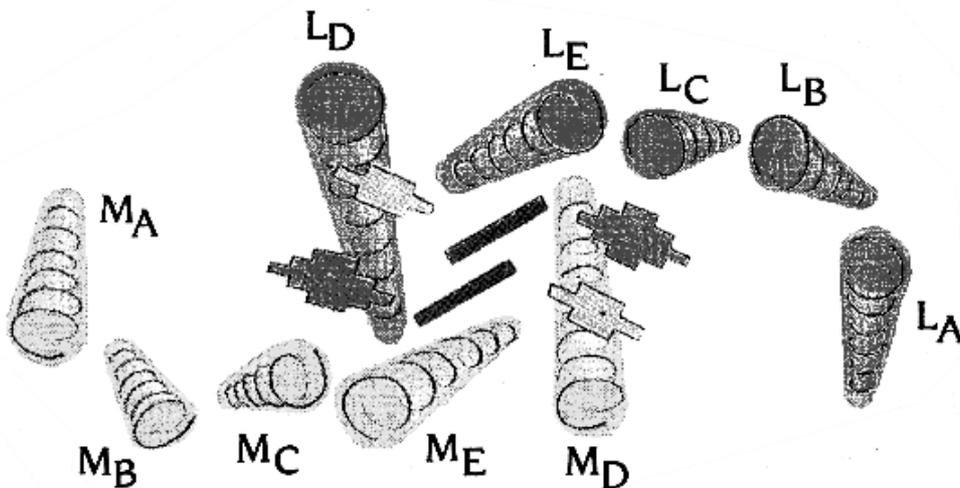


Abb. A-8: Schematische Darstellung des bakteriellen Reaktionszentrums. Die Helices sind als Zylinder dargestellt, die Pigmente als Rauten bzw. Balken (special pair).

Aufbauend auf einem modularen Design der oben beschriebenen orthogonaler Vier-Helix-Bündel-Proteine konnten Rau et al. Häm-bindende Proteine darstellen und durch geeignete Wahl der Aminosäurereste das Redoxpotential eines bis-Histidin-ligandierten Häm in einem Bereich von -90 bis -150 mV modulieren [Rau et al., 1999]. Sie verwendeten dabei ein symmetrisches Vier-Helix-Bündel aus zwei alternierenden, antiparallelen Helix-Typen, der das ligandierende His enthaltenden Bindehelix „B“, und der auf der Innenseite weitgehend hydrophoben Abschirmhelix „S“. Dieses Design ermöglicht auch die Bindung von zwei Häm in einer Bindungstasche durch die Verlängerung der Helices [Rau und Haehnel, 1998] als

Cytochrom *b*-Modell. Durch die kovalente Bindung eines weiteren Kofaktors, wie z.B. eines Ruthenium-Komplexes, lässt sich durch Licht ein Elektronentransfer induzieren (Abb. A-9) [Rau et al., 1998].

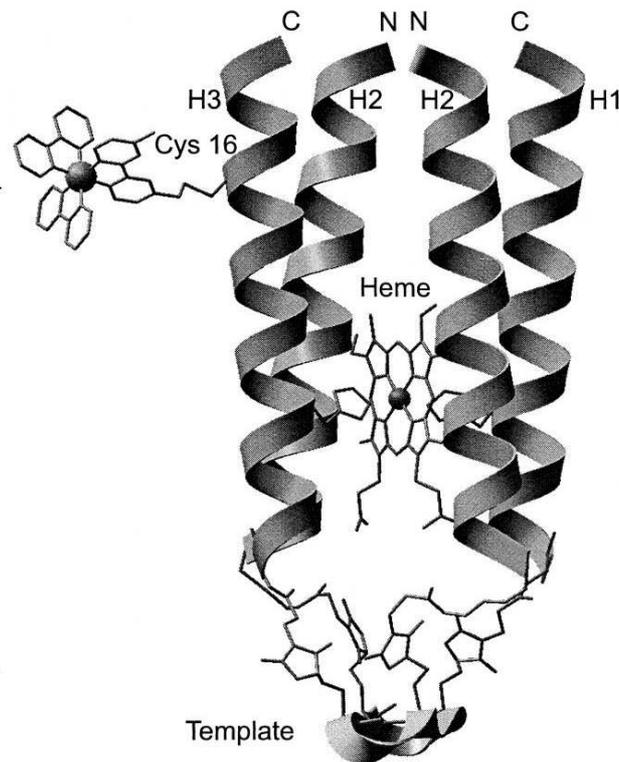


Abb. A-9: Strukturmodell eines Vier-Helix-Bündel-Proteins mit einem kovalent gebundenen Ruthenium-Komplex an der Außenseite und einem über zwei Histidine gebundenen Häm im hydrophoben Inneren (entnommen aus [Rau et al., 1998])

Um aus den weitreichenden Kenntnissen im *de novo*-Design von Häm-bindenden Proteinen für die Synthese von Chl-Bindungstaschen profitieren zu können, ist eine strukturelle, schrittweise Annäherung von (B)Chl in Richtung Häm eine mögliche Methode. Chemische Modifikationen des (B)Chl sind an der Peripherie denkbar, wie z.B. die oben erwähnte Abspaltung des Phytol-Restes. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungssituation (fünf- bzw. sechsfache Koordination) in (B)Chl- bzw. Hämproteinen ist ein Austausch des zentralen, sehr labil gebundenen Mg in den (B)Chl gegen stabiler gebundene Metalle wie z.B. Fe erstrebenswert, so dass die Kenntnisse der Häm-Ligandierung auch auf die (B)Chl-Bindung übertragen werden können.

Durch die Bindung von (B)Chl-Derivaten in für die Hämbindung konstruierten Proteine, erhält man Komplexe, in denen meist nur ein (B)Chl (abhängig von der Anzahl der vorgesehenen Bindungsstellen) gebunden ist. Dadurch verringert sich die Komplexität des Systems stark,

so dass sich Pigment-Protein- von Pigment-Pigment-Wechselwirkungen separieren lassen, da keine Chl-Chl-Wechselwirkungen, wie in den natürlichen Komplexen, auftreten und keine Carotinoide gebunden sind.

Aufgabenstellung:

Zur Bindung von (Bakterio-)Chlorophyll an synthetische Peptide können zwei Strategien verfolgt werden:

- 1) Eine kovalente Bindung fixiert das (Bakterio-)Chlorophyll am Protein, so dass die Bindung nicht mehr allein abhängig von assoziativen Wechselwirkungen ist. Dies kann in synthetischen Peptiden durch Einführung geeigneter nicht-natürlicher Aminosäuren über Formyl-Gruppen erreicht werden.
- 2) Eine nicht-kovalente Bindung durch Koordination des Zentralmetalls des (Bakterio-)Chlorophyll ermöglicht die Untersuchung dieser Koordination in Abhängigkeit vom Zentralmetall.

Ziel dieser Arbeit war es, Pigmente für die Einlagerung in synthetische Peptide bereitzustellen. Hierzu sollte das Spektrum der bereits bestehenden (Bakterio-)Chlorophyll-Modifikationen erweitert werden:

Die chemische Synthese von neuen (Bakterio-)Chlorophyll-Derivaten sollte

- a) die Einführung von Formyl-Gruppen an verschiedenen Positionen des Chlorophylls und Bakteriochlorophylls und
 - b) die Darstellung von Fe-Chlorophyll und Fe-Bakteriochlorophyll
- beinhalten.

Das Verhalten dieser neuen Verbindungen sollte in Lösung charakterisiert werden, um die gewonnenen Kenntnisse der Abhängigkeit ihrer spektralen Eigenschaften von der Umgebung auf die Interpretation von Pigment-Protein-Komplexen anzuwenden.

In Kooperation mit der AG Prof. W. Haehnel (Fakultät Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) sollten dann die Formyl-Chlorophyll-Derivate kovalent und das Fe-BChl, neben Ni- und Zn-BChl, nicht-kovalent an synthetische Proteine gebunden und die Eigenschaften dieser neuen Komplexe spektroskopisch untersucht werden.

In Fortsetzung früherer Arbeiten zur Bindung von transmetallierten und anderweitig modifizierten Bakteriochlorophyllen in photosynthetische Komplexe sollte das Fe-Bakteriopheophytin zur Untersuchung seiner Bindung in den Lichtsammelkomplex 1 von *Rb. sphaeroides* eingelagert werden.

B. Material und Methoden

1 Spektroskopische Methoden

1.1 UV/Vis-Spektroskopie

Elektronenabsorptionsspektren wurden mit einem Lambda 2 Spektralphotometer der Firma Perkin Elmer, mit der firmeneigenen Software PECSS 3.2 gemessen. Die Datenauswertung erfolgte nach Übertragung in das ASCII-Format (Programm von M. Bandilla, 1993) mit Origin (Version 5.0).

Die Absorptionsspektren der zellulosegebundenen metallierten (Bakterio-)Chlorophyll-Protein-Komplexe ([M]-(B)Chl) wurden direkt auf den Zellulosemembranen mit einem Mikrotiterplattenreader (Spectrafluor Plus, *Tecan*) kombiniert mit einem schnellen Dioden-Array-Spektrometer (Tidas, *J&M*, Aalen, spektrale Bandbreite 2 nm) im Durchlicht aufgenommen. Die Zellulosemembran wurde in transparente Polystyrolschalen im Mikrotiterplattenformat gelegt und mit ca. 3 mm 0,1 M Natrium-Phosphat (pH 7,0) überschichtet. Der Mikrotiterplattenreader war über optische Quarzfasern mit einer externen Halogenlichtquelle und einem externen Dioden-Array-Detektor verbunden. Das weiße Licht wurde von oben auf der Mikrotiterplatte über einem Spot auf der Zellulose fokussiert (~1 mm Durchmesser). Dieser Spot war im Fokus einer zweiten Linse, die 4 mm unterhalb der Mikrotiterplatte angebracht war. Dieser Aufbau ermöglichte die Messung von streuenden Proben.

Die Spektren wurden zwischen 300 und 900 nm mit einer Auflösung von 1,5 nm aufgenommen, jeweils fünf Messungen wurden mit einer Integrationszeit von 80 ms gemittelt. Mit diesen experimentellen Parametern war es möglich, die Spektren von allen 48 Spots auf einer Membran innerhalb von 2 min zu messen, mit einem ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis, um eine Analyse mit Hilfe der zweiten Ableitung durchzuführen.

1.2 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem Spex Fluorolog 221 Fluorimeter (Fa. Yobin-Yvon; Xenon-Lampe) mit laboreigener Software von Dr. Alexander Pazur bei Raumtemperatur in 1 cm Quarzküvetten gemessen. Detektiert wurde mit einem rot empfindlichen Hamamatsu Photomultiplier R 316 im Spektralbereich 600 – 1000 nm. Die Proben wurden auf eine Optische Dichte $< 0,12 \text{ cm}^{-1}$ bei 875 nm verdünnt.

1.3 Massenspektroskopie

Die „electron spray ionisation“ (ESI)-Massenspektren wurden von Dr. P. Köhler und I. Otte (AG Prof. P. Schieberle, Fakultät Lebensmittelchemie, Technische Universität München, Garching) mit einem LCQ-Massenspektrometer (ThermoFinnigan) gemessen. Die Proben wurden in Aceton gelöst, mit 8 μ l /min eingespritzt, zerstäubt und durch ein zwischen Düse und Vakuumkammer angelegtes hohes Spannungsfeld ionisiert.

1.4 Mößbauer-Spektroskopie

Die Mößbauer-Spektren wurden von Dr. Michael Reiner, AG Prof. F. Parak (Fakultät Physik, Technische Universität München, Garching) mit einem Halder MCA3/1 multichannel analyser aufgenommen. Der Probenhalter war 0,5 cm dick und hatte einen Durchmesser von 1,0 cm. Während die Quelle bei Raumtemperatur war, wurde die Probe in einem Kryostat-Bad gekühlt. Die Messungen wurden in flüssigem Stickstoff und in flüssigem Helium unter Verwendung einer $^{57}\text{CoRh}$ -Quelle durchgeführt. Ein schwaches Magnetfeld von ca. 20 mT wurde zur Verringerung der Spinrelaxation senkrecht zum γ -Strahl angelegt.

1.5 ESR-Spektroskopie

Das X-Band CW ESR-Experiment wurde an einem Bruker ESP580 durchgeführt, ausgestattet mit einem continuous-flow Helium-Kryostat (Oxford), mit einer Mikrowellenfrequenz von 9,47 MHz.

2 Chromatographische Methoden

2.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel (analyt. DC-KG):

Zur Charakterisierung und Reinheitsbestimmung von BPhe- und Phe-Derivaten wurden Kieselgel 60-HPTLC-Fertigplatten (10 cm x 10 cm) von Merck mit den jeweils in den Versuchsdurchführungen angegebenen Laufmitteln verwendet.

Analytische Dünnschichtchromatographie auf *reversed phase* (analyt. DC-RP):

Für (B)ChI-Derivate wurden zur Analyse C18-*reversed phase* HPTLC-Platten (10 cm x 10 cm) von Merck mit den jeweils in den Versuchsdurchführungen angegebenen Laufmitteln verwendet.

2.2 Präparative Chromatographie

2.2.1 Dünnschichtchromatographie

Für die präparative Dünnschichtchromatographie (präp. DC) wurden selbstgestrichene Kieselgel-Platten (20 cm x 20 cm) verwendet.

300 g Kieselgel 60 H (Merck) und 3 % Na-Ascorbat wurden in 750 ml dest. Wasser suspendiert und für mindestens 2 h gequollen. Die Glasplatten wurden mit einer Schichtdicke von 0,75 mm gestrichen. Die Kieselgelplatten ließ man vor der Verwendung 2 Tage an der Luft bei Raumtemperatur trocknen.

Das Pigment wurde möglichst konzentriert in dem unpolaren Lösungsmittelanteil des jeweiligen Laufmittelsystems (angegeben bei den jeweiligen Pigmenten) gelöst und auf die Platten in einer Bande aufgetragen. Bei den metallierten und nicht metallierten Bakteriopheophytin-Derivaten wurde die Kieselgelkammer vor und während des Laufens mit Argon gespült. Die Bande des gewünschten Produkts wurde feucht abgekratzt und in Aceton aufgeschlemmt. Die Suspension wurde nach Standardmethode aufgearbeitet (Kap.B- 3.1.2).

2.2.2 Säulenchromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie wurden Glassäulen mit Kieselgel 60 (Merck), Sepharose-CI-6B (Pharmacia) oder DEAE^[1]-Sepharose-CI-6B (Pharmacia), suspendiert in dem jeweiligen Laufmittel, gepackt. Das Pigment wurde konzentriert in dem gleichen Lösungsmittel gelöst, aufgetragen und unter eventueller Zugabe von polarerem Lösungsmittel eluiert. Die Produkte wurden fraktioniert aufgefangen und auf ihre Reinheit mittels Absorptionsspektroskopie und DC überprüft.

Vorbereitung der DEAE-Sepharose-CI-6B [Omata und Murata, 1983]:

Die DEAE-Sepharose-CI-6B wurde dreimal mit dest. Wasser gewaschen und dann, um sie in die Acetatform zu überführen, in 1 M Na-Acetat-Puffer (pH 7,0) aufgenommen und 3 min äquilibriert. Die Suspension wurde abgenutscht und erneut mit destilliertem Wasser gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Zur Umstellung auf das Laufmittel Aceton wurde das Säulenmaterial viermal in Aceton suspendiert und wieder abgenutscht. Dabei ist darauf zu achten, dass das Aceton nur sukzessive zugegeben wird, damit die DEAE-Sepharose-CI-6B nicht ausfällt. Nach Umstellung auf Aceton wurde eine Glassäule mit dem Säulenmaterial gepackt, die zu trennende Probe in Aceton aufgetragen und mit

^[1] DEAE = Diethylaminoethyl

Aceton oder einem Aceton/Methanol-Gemisch eluiert. Die Laufmittelsysteme sind bei den jeweiligen Pigmenten angegeben.

Regenerierung der DEAE-Sepharose-Cl-6B [Omata und Murata, 1983]:

Die oberste Schicht der DEAE-Sepharose-Cl-6B wurde von der Säule entfernt und verworfen. Dann wurde die Säule mit dem fünffachen Säulenvolumen einer Mischung aus 80 %igem wässrigen Aceton mit 1 % Ammoniumacetat (NH_4OAc) gewaschen. Das Säulenmaterial wurde aus der Säule entfernt, mit dest. Wasser gewaschen und zur Aufbewahrung in 2 M NaCl bei 4°C suspendiert.

Vorbereitung der Sepharose-Cl-6B [Omata und Murata, 1983]:

Die Sepharose-Cl-6B wurde abgenutscht und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach zweistündigem Quellen in dest. Wasser wurde das Säulenmaterial erneut abgenutscht und anschließend in Aceton suspendiert. Zur vollständigen Entfernung des Wassers und Umstellung auf Aceton wurde die Sepharose-Cl-6B mehrmals abgenutscht und in Aceton aufgenommen. Die Sepharose-Cl-6B lässt sich in Aceton im Kühlschrank mehrere Monate aufbewahren.

Vor Gebrauch wurde die Sepharose-Cl-6B zuerst mit Aceton/Hexan (2:1, v/v), dann mit Aceton/Hexan (2:1, v/v) und zuletzt mit Hexan durch Filtrieren und Resuspendieren gewaschen. Mit der Sepharose-Cl-6B in Hexan wurde die Säule gepackt und das zu trennende Pigment aufgetragen. Durch Zugabe von iso-Propanol (iProp) wurde die Laufgeschwindigkeit der Pigmente erhöht.

Die Laufmittelsysteme sind bei den jeweiligen Pigmenten angegeben.

Regenerierung der Sepharose-Cl-6B [Omata und Murata, 1983]:

Die Sepharose-Cl-6B wurde zuerst mit Aceton und dann mit Methanol gewaschen, dann aus der Säule herausgenommen, und als Suspension in Methanol gelagert.

2.3 HPLC-Analyse

Die verwendete 2-Pumpen-HPLC-Anlage mit programmierbarem Gradientenmischer stammte von der Firma Abimed Gilson (Dynamic Mixer 811 B, Manometric Module 805, Pumpen 305/306, 7125-Injector (Rheodyne)). Als Detektor diente ein TIDAS (J&M) Diodenarray-Photometer mit Spectralys Software Version 1.82 zur Auswertung der Daten. Die Absorptionsspektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 330 bis 900 nm aufgenommen. Als stationäre Phase wurde eine Kieselgelfertigsäule (Alltech Econosphere

Silica 5U Cart., 150 mm x 4,6 mm) verwendet. Alle Analysen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

System I:

Mobile Phase: Laufmittel A: Hexan/Toluol (1:1, v/v)

Laufmittel B: 60% Hexan/Toluol (1:1, v/v)

40% (Aceton/Methanol/iProp, 5:4:1, v/v/v)

Flußrate: 1,6 ml/min

Verwendete Gradienten (Übergänge jeweils linear): Die Prozent-Angaben entsprechen dem Gehalt an Laufmittel B, auf 100 fehlende Prozent dem Anteil an Laufmittel A.

G1: 0 min - 1 % / 5 min - 1 % / 15 min - 2,5 / 30 min - 6 % / 31 min - 100 % / 36 min - 100 % / 37 min - 0 % / 47 min - 0 %

Anwendung: Phe a, BPhe a, Pyro-Phe a, [3-Acetyl]-Phe a, 3¹-OH-BPhe a, [3-Vinyl]-BPhe a

G2: 0 min - 2 % / 5 min - 2 % / 25 min - 5 % / 26 min - 100 % / 31 min - 100 % / 32 min - 0 % / 42 min - 0 %

Anwendung: BChl a, Chl a, Me-Pheid a, Pyro-Me-Pheid a, [3-Vinyl]-BChl a, [3-Formyl]-Me-Pheid a, Zn-Phe a, Ni-Phe a

G3: 0 min - 4 % / 5 min - 4 % / 25 min - 7 % / 26 min - 100 % / 31 min - 100 % / 32 min - 0 % / 42 min - 0 %

Anwendung: 3¹-OH-BChl a, Zn-[3-Formyl]-Me-Pheid a, Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a,

G4 : 0 min - 1 % / 5 min - 1 % / 15 min - 2,5 % / 16 min - 8 % / 26 min - 9,5 % / 27 min - 100 % / 32 min - 100 % / 36 min - 0 % / 47 min - 0 %

Anwendung: [3-Acetyl]-Ethanal-Pheid a

G5: 0 min - 0 % / 1 min - 2 % / 3 min - 2 % / 5 min - 3 % / 11 min - 3 % / 12 min - 7 % / 14 min - 7 % / 16 min - 8 % / 21 min - 8 % / 22 min - 100 % / 27 min - 100 % / 28 min - 0 % / 38 min - 0 %

Anwendung: Ethanal-Pheid a

G6: 0 min - 47 % / 5 min - 47 % / 25 min - 50 % / 26 min - 100 % / 31 min - 100 % / 32 min - 0 % / 42 min - 0 %

Anwendung: Ni-BPheid a

G7: 0 min - 48 % / 5 min - 48 % / 25 min - 51 % / 26 min - 100 % / 31 min - 100 % / 32 min - 0 % / 42 min - 0 %

Anwendung: Zn-BPheid a

System II:

Mobile Phase: Laufmittel A: Toluol / Hexan (1:1, v/v)

Laufmittel B: 60 % Toluol / Hexan (1:1, v/v) / 40 % Aceton

Flußrate: 1,6 ml/min

A1: 0 min - 7 % / 5 min - 7 % / 25 min - 10 % / 26 min - 100 % / 31 min - 100 % / 32 min - 0 % / 42 min - 0 %

Anwendung: Me-BPheid a, Produkte der Ozonolyse von 3-Vinyl-Me-BPheid

3 Darstellung der Pigmente

3.1 Standardmethoden

3.1.1 Generelle Arbeitsbedingungen

Alle Arbeiten wurden bei Grünlicht durchgeführt. Es wurden ausschließlich analysenreine (p.a.) Chemikalien verwendet. Die Pigmente wurden in trockenem Zustand bei -20°C aufbewahrt.

Die Ausbeuten wurden absorptionsspektroskopisch über das Lambert-Beer'sche-Gesetz (vgl. Kap. F-1) bestimmt. Zum Teil wurden die Extinktionskoeffizienten ϵ von strukturell verwandten Verbindungen verwendet um die Ausbeuten zu extrapolieren. (siehe Kap. E-4). Deshalb wurden die eingesetzten Mengen und Ausbeuten zusätzlich in der laborinternen Einheit OD·ml (siehe Kap. F-1) angegeben, die bei unbekanntem Extinktionskoeffizienten einfache Quantifizierungen erlaubt. Dies entspricht der optischen Dichte im Maximum der Q_y -Bande (Bereich 650 – 800 nm), die die entsprechenden Pigmentmenge gelöst in 1 ml hätte. Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten ϵ gilt entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$\text{Menge [mg]} = \text{OD} \cdot \text{ml} \frac{\text{MW}}{\epsilon}$$

Für die Verfolgung der Reaktionen mittels Absorptionsspektroskopie oder DC wurden dem Reaktionsansatz kleine Proben entnommen und diese zwischen H_2O und Diethylether (DE) verteilt, und die organische Phase mit Wasser gewaschen, um eine Trübung der Probe durch Säure oder überschüssige Salze bzw. ein verändertes Laufverhalten zu vermeiden.

3.1.2 Standardaufarbeitung der Reaktionen

Der Reaktionsansatz wurde nach dem Abkühlen in einen Scheidetrichter überführt und mit Diethylether (DE) und Wasser im Verhältnis 1:2 (v/v) versetzt. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase noch drei- bis viermal mit Wasser gewaschen, anschließend über NaCl getrocknet, über Watte abfiltriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Letzte Wasserspuren wurden durch azeotrope Destillation entfernt, indem der trockene Rückstand in Toluol aufgenommen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen wurde.

3.2 Gewinnung der Edukte Bakteriochlorophyll a, Chlorophyll a Bakteriopheophytin a und Pheophytin a

3.2.1 Isolierung von Bakteriochlorophyll a aus *Rhodobacter sphaeroides*

[Omata und Murata, 1983; Steiner, 1981; Scheer, 1988; Struck, 1990; Svec, 1991]

Bakteriochlorophyll a (BChl a) wurde aus der carotinoidfreien Mutante R26 des Purpurbakteriums *Rhodobacter sphaeroides* isoliert. Hierzu wurden 100 g feuchte Zellen in 1 l Methanol (MeOH) 30 min gerührt, um die das BChl a aus den Zellen herauszulösen. Anschließend wurde die methanolische Suspension in 200 ml-Portionen mit gleichem Volumen DE nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Chromatographie [Struck, 1990]: Säulenchromatographisch (12 cm Länge; Ø 4 cm)

Stationäre Phase: Sepharose-CI6B

Mobile Phase: Hexan/iProp

Ausbeute nach Aufreinigung: ca. 10000 ODml (110 µmol, 100 mg) / 100 g feuchte Zellen

Analyt. DC-RP: Laufmittel MeOH, $R_f = 0,53$

HPLC: Gradient G2; Retentionszeit: BChl a'/a : 19,8 min / 21,2 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.): 357 (1,00), 577 (0,30), 769 (0,90)

3.2.2 Isolierung von Chlorophyll a aus *Spirulina platensis*

[Storch, 1993]

Chlorophyll a (Chl a) wurde aus der Blaualge *Spirulina platensis* isoliert. Hierzu wurden 30 g sprühgetrocknete Zellen (Behr, Bonn) in 200 ml MeOH aufgenommen und im Ultraschallbad

für 15 min aufgeschlossen. Anschließend wurde der Rückstand abgenutscht und mit 200 ml MeOH suspendiert. Dies wurde zweimal wiederholt. Die vereinigten MeOH-Fractionen wurden nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Chromatographie [Omata und Murata, 1983]: Säulenchromatographisch (4 cm Länge; Ø 1,5 cm)

Stationäre Phase: DEAE-Sepharose-CI-6B

Mobile Phase: Aceton; Stufengradient mit Aceton/MeOH (20-25 %)

Ausbeute nach Aufreinigung: 9000 ODml (82 µmol; 73 mg) / 30 g sprühgetrocknete Zellen

Analyt. DC-RP: Laufmittel MeOH, $R_f = 0,45$

HPLC: Gradient G2; Retentionszeit: Chl $a'/a = 8,1$ min / 10,8 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.): 409 (0,77), 428 (1,00), 532 (0,05), 575,06 (0,07), 613 (0,13)
660 (0,77)

3.2.3 Pheophytinisierung

[Rosenbach-Belkin, 1988]

Zur Darstellung von (Bakterio-)Pheophytin a ((B)Phe a) wurden 1000 ODml des, aus der Isolierung gewonnenen Chl a (9,1 µmol, 5,1 mg) bzw. BChl a (11,0 µmol, 10 mg) in Eisessig gelöst, was eine sofortige Entmetallierung bewirkt, die bei Chl a an einem Farbumschlag von grün nach braun und beim BChl a von blau nach violett-rosa zu erkennen ist. Nach Zugabe von dem gleichen Volumen Toluol wurde das Lösungsmittel als azeotropes Gemisch am Rotationsverdampfer entfernt. Die restliche Essigsäure wurde nach nochmaliger Zugabe von Toluol durch Abziehen des Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Chromatographie: Präp. DC

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase: Toluol/5 % Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung (Phe a): 460 ODml (8,2 µmol, 7,1 mg, 90 %)

(BPhe a): 650 ODml (9,7 µmol, 8,6 mg, 88 %)

Analyt. DC-KG: Laufmittel Toluol/5% Aceton, R_f (Phe a) = 0,54, R_f (BPhe a) = 0,37

HPLC: Gradient G1: Retentionszeit Phe a = 10,3 min, BPhe a = 13,6 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.):

Phe a : 408 (1,00), 505 (0,11), 533 (0,09), 609 (0,07), 667 (0,49)

BPhe a : 357 (1,00), 384 (0,56), 523 (0,24), 681 (0,10), 750 (0,62)

3.3 Modifikationen an der Peripherie

3.3.1 (Bakterio-)pheophorbid a-17³-methylester

[Scheer, 1991]

Zur Darstellung von (Bakterio-)pheophorbid a-17³-methylester (Me-(B)Pheid a) wurden 1000 ODml (B)Phe a (18,0 µmol, 15,7 mg Phe a; 14,8 µmol, 13,1 mg BPhe a) in 20 ml MeOH/5 % H₂SO₄ gelöst und unter Schutzgasatmosphäre 30 min auf 40°C (bei Phe a) bzw. auf 80°C (bei BPhe a) am Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe von DC verfolgt. Hierzu wurden dem Reaktionsgemisch alle 10 min 500 µl-Portionen entnommen, im Reagenzglas gegen Wasser/Ether ausgeschüttelt, um die Säure zu entfernen und auf die DC-Platte aufgetragen. Nach beendeter Reaktion erfolgte die Aufarbeitung nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2).

Chromatographie: Präp. DC

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase: Toluol/10 % Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung (Me-Pheid a): 880 ODml (15,8 µmol, 9,6 mg, 88 %)

(Me-BPheid a): 850 ODml (12,6 µmol, 7,8 mg, 85 %)

Analyt. DC-KG: Laufmittel Toluol/10% Aceton, R_f (Me-Pheid a) = 0,45,

R_f (Me-BPheid a) = 0,38

HPLC (Me-Pheid a): Gradient G2: Retentionszeit: Me-Pheid a' / a = 6,6 min / 9,2 min

HPLC (Me-BPheid a): Gradient A1: Retentionszeit: Me-BPheid a' / a = 12,95 min / 18,9 min

UV/Vis (DE): λ_{max} [nm] (rel. E.) in DE:

Me-Pheid a: 408 (1,00), 505 (0,11), 533 (0,09), 609 (0,07), 667 (0,49)

Me-BPheid a: 357 (1,00), 384 (0,56), 523 (0,24), 679 (0,09), 749 (0,60)

3.3.2 13²-Demethoxycarbonylpheophytin a und 13²-Demethoxycarbonyl-pheophorbid a-17³-methylester

[Pennington et al., 1964]

Zur Darstellung von 13²-Demethoxycarbonylpheophytin a (Pyro-Phe a) und 13²-Demethoxycarbonylpheophorbid a-17³-methylester (Pyro-Me-Pheid a) wurden 1000 ODml (18,0 µmol, 15,7 mg) Phe a bzw. (18,0 µmol, 10,9 mg) Me-Pheid a in 50 ml Pyridin gelöst und über Nacht am Rückfluss bei 110°C gekocht. Die Reaktion kann mittels DC verfolgt werden. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, das Pigment noch zweimal in Toluol aufgenommen und bis zur Trockene eingeengt.

Chromatographie: Präp. DC

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase (Pyro-Phe a): Toluol/5 % Aceton

Mobile Phase (Pyro-Me-Pheid a): Toluol/10 % Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung (Pyro-Phe a): 705 ODml (14,4 µmol, 11,7 mg, 80 %)

(Pyro-Me-Pheid a): 770 ODml (14,8 µmol, 8,1 mg, 82 %)

Analyt. DC-KG: Pyro-Phe a: Laufmittel Toluol/5 % Aceton, $R_f = 0,53$ Pyro-Me-Pheid a: Laufmittel: Toluol/10 % Aceton, $R_f = 0,43$ HPLC: Pyro-Phe a: Gradient G1; Retentionszeit: 8,9 min

Pyro-Me-Pheid a: Gradient G2; Retentionszeit: 6,3 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.):Pyro-Phe a: 317 (0,20), 409 (1,00), 506 (0,11), 535 (0,09), 609 (0,07),
667 (0,49)Pyro-Me-Pheid a: 317 (0,19), 409 (1,00), 505 (0,11), 534 (0,08),
609 (0,07), 667 (0,52)**3.3.3 (Bakterio-)Pheophorbid a**

[Helfrich, 1995]

Zur Darstellung von (Bakterio-)Pheophorbid a ((B)Pheid a) wurden 1000 ODml (B)Phe a (18,0 µmol, 15,7 mg Phe a bzw. 14,8 µmol, 13,1 mg BPhe a) in 3-5 ml Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen, so dass alles Pigment gelöst ist und fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde die TFA im Argonstrom abgedampft.

Chromatographie: Präp. DC

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase (Pheid a): Toluol/10 % Aceton

(BPheid a): Toluol / CHCl₃ / Aceton / MeOH / iProp

(90 : 80 : 15 : 12 : 3; v/v)

Ausbeute nach Aufreinigung: (Pheid a): 820 ODml (14,0 µmol, 8,3 mg, 78 %)

(BPheid a): 750 ODml (11,1 µmol, 6,8 mg, 75 %)

Analyt. DC-KG: Pheid a: Laufmittel: Toluol/ Aceton / MeOH/ iProp (40 : 5 : 4 : 1; v/v), $R_f = 0,28$ BPheid a: Laufmittel Toluol/10 % Aceton, $R_f = 0,38$

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.):

Pheid a: 408 (1,00), 505 (0,11), 533 (0,09), 609 (0,07), 667 (0,49)

BPheid a: 357 (1,00), 384 (0,56), 524 (0,24), 679 (0,09), 749 (0,60)

3.3.4 3-Devinyl-3-acetyl-pheophytin a

[Smith und Calvin, 1966]

Zur Darstellung von 3-Devinyl-3-acetyl-pheophytin a ([3-Acetyl]-Phe a) wurden 1000 ODml (14,8 μmol , 13,1 mg) BPhe a in 25 ml Aceton und 7 mg (30 μmol) 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-p-benzochinon (DDQ) in 15 ml Aceton gelöst und beide Lösungen mit Argon gespült. Die DDQ-Lösung wurde in 5 ml-Portionen zur Pigment-Lösung zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurde jeweils ein Absorptionsspektrum aufgenommen, um den Reaktionsverlauf zu überprüfen. Während der Reaktion verschwindet die Q_y -Bande des BPhe a bei 750 nm und es bildet sich eine neue Bande bei 683 nm, die Q_y -Bande des [3-Acetyl]-Phe a. Nach Beendigung der Reaktion (vollständiges Entfernen der Bande bei 750 nm) wurde der Reaktionsansatz nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Chromatographie: Präp. DC

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase: Toluol/5 % Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung: 460 ODml (10,4 μmol , 9,2 mg, 70 %)

Analyt. DC-KG: Laufmittel Toluol/5 % Aceton, $R_f = 0,40$

HPLC: Gradient G1; Retentionszeit: 13,6 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.): 380 (0,82), 411 (1,00), 511 (0,13), 542 (0,10), 623 (0,0652), 683 (0,55)

3.3.5 3-Deacetyl-3¹-hydroxyethyl-bakteriochlorophyll a und 3-Deacetyl-3¹-hydroxyethyl-bakteriopheophytin a

[Ditson et al., 1984]

Zur Darstellung von 3-Deacetyl-3¹-hydroxyethyl-bakteriochlorophyll a (3¹-OH-BChl a) wurden 1000 ODml (11,0 μmol , 10 mg) BChl a in 50 ml Ethanol (EtOH) gelöst, mit Argon gespült und auf 4°C gekühlt. Festes NaBH₄ wurde portionsweise zugegeben und nach 15-minütiger Inkubation wurde jeweils ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Die Reaktion ist beendet, wenn sich die Q_y -Bande des BChl a von 774 nm nach 715 nm (Angaben in EtOH) verschoben hat. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Chromatographie [Struck, 1990]: Säulenchromatographisch (4 cm Länge; Ø 3 cm)

Stationäre Phase: Sepharose-CI-6B

Mobile Phase: Hexan/iProp

Ausbeute nach Aufreinigung: 520 ODml (7,9 µmol, 7,2 mg, 72 %)

Analyt. DC-RP: Laufmittel MeOH, $R_f = 0,58$

HPLC: Gradient G3: Retentionszeit: 3¹-OH-BChl a' / a: 19,9 min / 20,8 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.): 345 (1,00), 557 (0,33), 726 (0,83)

3-Deacetyl-3¹-hydroxyethyl-bakteriopheophytin a (3¹-OH-BPhe a) wurde aus 3¹-OH-BChl a durch Pheophytinisieren mit Eisessig, wie in Kap. B-3.2.3 beschrieben, dargestellt. Die Synthese des 3¹-OH-BPhe a gelingt auch durch Reduktion der 3-Acetyl-Gruppe des BPhe a mit NaBH₄ unter den gleichen Bedingungen wie für BChl a.

Chromatographie: Präp. DC

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase: Toluol/7 % Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung: 300 ODml (7,2 µmol, 6,4 mg, 91 % bezogen auf 3¹-OH-BChl a)

Analyt. DC-KG: Laufmittel Toluol/7 % Aceton, $R_f = 0,23$

HPLC: Gradient G1: Retentionszeit: 3¹-OH-BPhe a' / a = 22,4 / 23,3 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.): 350 (1,0), 378 (0,67), 479 (0,09), 510 (0,37), 654 (0,16),
712 (0,47)

3.3.6 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriochlorophyll a und 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophytin a

Methode 1:

[Struck et al., 1992; Struck et al., 1990]

Zur Darstellung von 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriochlorophyll a ([3-Vinyl]-BChl a) wurden 1000 ODml (12,0 µmol, 10,7 mg) 3¹-OH-BChl a in 50 ml über CaCl₂ getrocknetem Toluol gelöst und mit Argon gespült. Das Gemisch wurde am Rückfluss für 1-2 h zum Sieden erhitzt. Die Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Die Q_y-Bande des 3¹-OH-BChl a bei 738 nm verschiebt sich bathochrom nach 750 nm. Nach vollständiger Reaktion wurde das Toluol am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

Chromatographie [Struck, 1990]: Säulenchromatographisch (4 cm Länge; Ø 3 cm)

Stationäre Phase: Sepharose-CI-6B

Mobile Phase: Hexan/iProp

Ausbeute nach Aufreinigung: 800 ODml (9,6 µmol, 8,6 mg, 80 %)

Analyt. DC-RP: Laufmittel MeOH, $R_f = 0,40$

HPLC: Gradient G2: Retentionszeit: 3-Vinyl-BChl *a'*/ *a* = 13,2 / 16,1 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.): 350 (1,00), 389 (0,62), 559 (0,32), 684 (0,17), 745 (0,94)

Das 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophytin *a* ([3-Vinyl]-BPhe *a*) wurde aus dem 3-Vinyl-BChl *a* durch Pheophytinisieren mit Eisessig (Kap. B-3.2.3) dargestellt.

Chromatographie: Präp. DC

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase: Toluol/5 % Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung: 310 ODml (8,6 µmol, 7,5 mg, 90 %)

Analyt. DC-KG: Laufmittel Toluol/ 5 % Aceton, $R_f = 0,38$

HPLC: Gradient G1: Retentionszeit: 12,5 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.): 353 (1,00), 380 (0,54), 482 (0,06), 513 (0,29), 662 (0,12), 724 (0,41)

Methode 2:

1000 ODml (24 µmol, 21,4 mg) 3¹-OH-BPhe *a* und 3,6 mg (10 µmol) Mg(ClO₄)₂ wurden in 50 ml über CaCl₂ getrocknetem Toluol gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min am Rückfluss zum Sieden erhitzt. Der Ablauf der Reaktion wurde wie bei Methode 1 absorptionspektroskopisch verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Reaktionsansatz nach Standardmethode Kap. B-3.1.2 ohne Zusatz von DE aufgearbeitet.

Die Chromatographie erfolgte wie bei Methode 1 beschrieben, die analytischen Daten entsprechen dem nach herkömmlicher Methode dargestellten [3-Vinyl]-BPhe *a*.

Ausbeute nach Aufreinigung: 690 ODml (19,2 µmol, 16,7 mg, 80 %)

3.4 Ozonolyse-Reaktionen

Als Ozonolyseapparat stand ein selbstgebautes Gerät von Prof. Zenk (Universität Halle) zur Verfügung, bei dem das Ozon durch stille elektrische Entladung generiert wird.

3.4.1 3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid *a*-17³-methylester und 3-Devinyl-3-formyl-13²-demethoxycarbonylpheophorbid *a*-17³-methylester

(Modifiziert nach [Fischer-Drsek, 1995])

Zur Darstellung von 3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid *a*-17³-methylester ([3-Formyl]-Me-Pheid *a*) und 3-Devinyl-3-formyl-13²-demethoxycarbonylpheophorbid *a*-17³-methylester ([3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*) wurden 1000 ODml (18,0 μ mol, 10,9 mg) Me-Pheid *a* bzw. 1000 ODml (19,2 μ mol, 10,5 mg) Pyro-Me-Pheid *a* in 15 ml CHCl₃, 15 ml MeOH und 1 ml konzentrierter H₂SO₄ gelöst. Die Lösung wurde auf -70°C gekühlt. Es wurde 3 min O₃ (Strömungsgeschwindigkeit ca. 500 ml/min) eingeleitet. Die Reaktionslösung wurde noch 8 min bei -70°C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l einer methanolischen 100 mM Dimethylsulfid-Lösung abgebrochen und innerhalb von 2 h auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt und mit gleichen Anteilen CHCl₃ und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde dreimal kräftig mit 6 %-iger HCl ausgeschüttelt, um die gebildeten Acetale zu spalten und anschließend zweimal mit Wasser neutral gewaschen. Die organischen Phasen wurden über NaCl getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt.

Chromatographie: Präp. DC

Stationäre Phase: Kieselgel

Mobile Phase: Toluol / Hexan / Aceton (2:2:3; v/v)

Ausbeute nach Aufreinigung: 1150 ODml (16,2 μ mol, 9,8 mg, 90 %)

Analyt. DC-KG: Laufmittel Hexan/Aceton (4:3, v/v), R_f ([3-Formyl]-Me-Pheid *a*) = 0,62

R_f ([3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*) = 0,68

HPLC: Gradient G2: [3-Formyl]-Me-Pheid *a*: Retentionszeit: 11,6 min

[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*: Retentionszeit: 8,4 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.):

[3-Formyl]-Me-Pheid *a*: 383 (0,89), 419 (1,00), 516 (0,15), 547 (0,16), 692 (0,83)

[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*: 384 (0,86), 419 (1,00), 517 (0,15), 548 (0,15), 690 (0,78)

MS (ESI): [3-Formyl]-Me-Pheid a: [C₃₅H₃₆N₄O₆; 609]:

m/z (%) Isotopenverteilung des Massenpeaks: 609 (100) [M⁺], 610 (38)

[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a: [C₃₃H₃₄N₄O₄; 551]:

m/z (%) Isotopenverteilung des Massenpeaks: 551 (100) [M⁺], 552 (36)

3.4.2 3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid a-17³-(ethanal-2-yl)ester und Pheophorbid a-17³-(ethanal-2-yl)ester

Zur Darstellung von 3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid a-17³-(ethanal-2-yl)ester ([3-Acetyl]-Ethanal-Pheid a) und Pheophorbid a-17³-(ethanal-2-yl)ester (Ethanal-Pheid a) wurden 1000 ODml (22,5 µmol, 19,9 mg) [3-Acetyl]-Phe a bzw. (18,0 µmol, 15,7 mg) Phe a in 15 ml CHCl₃, 15 ml MeOH und 1 ml H₂SO₄ gelöst. Die Lösung wurde auf -50°C gekühlt. Es wurde 40 s O₃ (Strömungsgeschwindigkeit 500 ml/min) eingeleitet. Die Reaktion wurde sofort durch Zugabe von 500 µl einer methanolischen 100 mM Dimethylsulfid-Lösung abgebrochen und innerhalb von 2 h auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt und mit gleichen Anteilen CHCl₃ und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde dreimal kräftig mit 6 %-iger HCl ausgeschüttelt, um die gebildeten Acetale zu spalten und anschließend zweimal mit Wasser neutral gewaschen. Die organischen Phasen wurden über NaCl getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

Chromatographie: präp. DC

stationäre Phase: Kieselgel

mobile Phase: Toluol / Hexan / Aceton (2:2:3; v/v)

Ausbeute nach Aufreinigung:

[3-Acetyl]-Ethanal-Pheid a: 560 ODml (12,6 µmol, 8,2 mg, 56 %); (330 ODml (7,4 µmol, 6,6 mg, 33 %) [3-Acetyl]-Phe a konnten zurückgewonnen werden)

Ethanal-Pheid a: 450 ODml (8,0 µmol, 5,1 mg, 44 %); (220 ODml (4 µmol, 3,5 mg, 22 %) nicht umgesetztes Phe a konnten zurückgewonnen werden;

Nebenprodukte der Reaktion: 35 ODml (0,8 µmol, 0,7 mg, 4 %) [3-Formyl]-Phe a, 140 ODml (3,2 µmol, 2,0 mg, 18 %) [3-Formyl]-Ethanal-Pheid a

analyt. DC-KG: [3-Acetyl]-Ethanal-Pheid a:

Laufmittel: Toluol/Aceton/ MeOH /iProp (80:10:8:2; v/v), R_f = 0,48

Ethanal-Pheid a:

Laufmittel: Toluol/Hexan (1:1; v/v)/20 % (Aceton/ MeOH /iProp (5:4:1; v/v)), R_f = 0,30

Nebenprodukte: Laufmittel: Toluol/Hexan (1:1; v/v)/20 % (Aceton/ MeOH /iProp (5:4:1; v/v))

[3-Formyl]-Ethanal-Pheid a: $R_f = 0,26$

[3-Formyl]-Phe a: $R_f = 0,77$

HPLC: [3-Acetyl]-Ethanal-Pheid a'/a: Gradient G4: Retentionszeit: 22,5/23,8 min

Ethanal-Pheid a'/a: Gradient G5: 17,3/18,0 min

Nebenprodukte: [3-Formyl]-Ethanal-Pheid a'/a: 19,7 /20,6 min

[3-Formyl]-Phe a: 9,2 min

Phe a'/a: 7,7/8,1 min

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.):

[3-Acetyl]-Ethanal-Pheid a: 380 (0,82), 411 (1,00), 511 (0,13), 542 (0,10),
623 (0,0652), 683 (0,55)

Ethanal-Pheid a: 408 (1,00), 505 (0,11), 533 (0,09), 609 (0,07), 667 (0,49)

MS (ESI): [3-Acetyl]-Ethanal-Pheid a: [$C_{37}H_{38}N_4O_7$, 650]

m/z (%): 651 [(M+H)⁺]

Ethanal-Pheid a: [$C_{37}H_{38}N_4O_7$, 634]

m/z (%): 635 [(M+H)⁺]

3.4.3 Ozonolyse des 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophorbid a-17³-methylesters

1000 ODml (27,8 μ mol, 16,9 mg) 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophorbid a-17³-methylester ([3-Vinyl]-Me-Pheid a) wurden in 15 ml $CHCl_3$, 15 ml MeOH und 3 % konzentrierter H_2SO_4 gelöst unter Zugabe von 1 mg Na-Ascorbat. Die Lösung wurde auf $-70^\circ C$ gekühlt. Es wurde 1 min 20 s O_3 (Strömungsgeschwindigkeit 500 ml/min) eingeleitet. Die Reaktionslösung wurde noch 1 min bei $-70^\circ C$ gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l einer methanolischen 100 mM Dimethylsulfid-Lösung abgebrochen, mit Argon begast und innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt und mit gleichen Anteilen $CHCl_3$ und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde dreimal kräftig mit 6 %-iger HCl ausgeschüttelt, um die gebildeten Acetale zu spalten und anschließend zweimal mit Wasser neutral gewaschen. Die organischen Phasen wurden über NaCl getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt.

Die HPLC-Analyse (Gradient A1) ließ mindestens fünf verschiedene Produkte erkennen, die nicht in ausreichenden Mengen für eine weitere Analyse isoliert werden konnten.

3.5 Metallierungsreaktionen

3.5.1 Metallierung von 3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid α -17³-methylester und 3-Devinyl-3-formyl-13²-demethoxycarbonylpheophorbid α -17³-methylester mit Zn²⁺ und Ni²⁺

[Urumov, 1975]

1000 ODml (22,5 μ mol, 13,7 mg) [3-Formyl]-Me-Pheid *a* bzw. [3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a* wurden in 20 ml Essigsäure (AcOH) mit einem 250-fachen molaren Überschuss (bezogen auf die Pigmentmenge) Zn(OAc)₂ (1,0 g) bzw. Ni(OAc)₂ (1,4 g), 100 mg NaOAc, und einer Spatelspitze Na-Ascorbat gelöst und 30-60 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion kann über DC verfolgt werden. Nach vollständiger Reaktion wurde der Reaktionsansatz nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Chromatographie: präp. DC

stationäre Phase: Kieselgel

mobile Phase: Toluol/6 % Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung: 700 ODml (Zn-Derivate), 750 ODml (Ni-Derivate)

analyt. DC-KG: Laufmittel Toluol/Aceton/ MeOH /iProp (40:5:4:1, v/v)

R_f (Zn-[3-Formyl]-Me-Pheid *a*) = 0,63

R_f (Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*) = 0,57

R_f (Ni-[3-Formyl]-Me-Pheid *a*) = 0,76

R_f (Ni-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*) = 0,79

UV/Vis (DE): λ_{\max} [nm] (rel. E.):

Zn-[3-Formyl]-Me-Pheid *a*: 386 (0,57), 437 (0,98), 536 (0,06), 577 (0,09), 628 (0,13),
678 (1,00)

Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*: 387 (0,45), 440 (0,99), 537 (0,05), 580 (0,08), 628 (0,12),
677 (1,00)

Ni-[3-Formyl]-Me-Pheid *a*: 380 (0,58), 409 (0,69), 431 (0,82), 509 (0,03), 557 (0,03),
669 (1,00)

Ni-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*: 381 (0,53), 411 (0,69), 432 (0,82), 511 (0,03), 557 (0,03),
668 (1,00)

Zn-Bakteriopheophorbid *a*

[Hartwich, 1994]

Die Darstellung von Zn-Bakteriopheophorbid *a* (Zn-BPheid *a*) erfolgte durch direkte Metallierung mit Zn^{2+} : 1000 ODml (14,8 μ mol, 13,1 mg) BPheid *a* wurde in 20 ml AcOH gelöst und nach Zugabe von einem 500-fachen molaren Überschuss $Zn(OAc)_2$ (1,36 g) und einer Spatelspitze Na-Ascorbat 1 h unter Argonatmosphäre bei 110 °C refluxiert.

Die Reaktion wird sowohl über DC als auch absorptionsspektroskopisch verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung wurde der Reaktionsansatz nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Chromatographie: präp. DC

stationäre Phase: Kieselgel

mobile Phase: Toluol / $CHCl_3$ /MeOH /Aceton (10:10:2:2; v/v)

Ausbeute nach Aufreinigung: 550 ODml (8,1 μ mol, 5,4 mg, 55 %)

analyt. DC-KG: Laufmittel Toluol / $CHCl_3$ /MeOH /Aceton (10:10:2:2; v/v)

$R_f = 0,25$

HPLC: Gradient G7: Retentionszeit Zn-BPheid *a*/*a* : 12,3/13,9 min

UV/Vis (DE): λ_{max} [nm] (rel. E.): 353 (0,94), 390 (0,66), 559 (0,28), 763 (1,00)

3.5.2 Ni-Bakteriopheophorbid *a*

Die Darstellung von Ni-Bakteriopheophorbid *a* (Ni-BPheid *a*) erfolgte durch Metallierung von BPheid *a* mit Ni^{2+} über den Cd-Komplex [Hartwich, 1994].

Cd-Bakteriopheophorbid *a* (Cd-BPheid *a*)

1000 ODml (14,8 μ mol, 13,1 mg) BPheid *a* wurde in 20 ml Dimethylformamid (DMF) aufgenommen. Die Lösung wurde mit Argon gespült und anschließend bis zur Sättigung mit getrocknetem $Cd(OAc)_2$ versetzt. Die Lösung wurde dann auf 80°C erhitzt und die Reaktion absorptionsspektroskopisch verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Reaktionsansatz nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet. Das gebildete Cd-Bakteriopheophorbid *a* (Cd-BPheid *a*) wurde ohne Aufreinigung weiter zum Ni-BPheid *a* umgesetzt.

Ni-BPheid a:

Das Cd-BPheid a wurde in 20 ml Aceton, das vorher über CaCl_2 getrocknet wurde gelöst und mit Argon gespült. Nach Zugabe von soviel getrocknetem NiCl_2 , dass die Lösung gesättigt ist, wurde das Reaktionsgemisch ~40 min am Rückfluss gekocht. Die Transmetallierungsreaktion ist spektroskopisch verfolgbar und verläuft vollständig (Farbumschlag von grün-blau nach violett-rosa bzw. Verschwinden der Cd-BPheid- Q_x - und Q_y -Absorption bei ~590 bzw. 770 nm bei gleichzeitigem Entstehen der Ni-BPheid Q_x - und Q_y -Absorption bei ~535 bzw. 780 nm).

Chromatographie: präp. DC

stationäre Phase: Kieselgel

mobile Phase: Toluol/Hexan (4:1; v/v) / 60 % (Aceton/ MeOH /iProp (5:4:1; v/v))

Ausbeute nach Aufreinigung: 490 ODml (7,8 μmol , 5,2 mg, 53 %)analyt. DC-KG: Laufmittel Toluol/Hexan (4:1; v/v) / 60 % (Aceton/ MeOH /iProp (5:4:1; v/v)), $R_f = 0,78$ HPLC: Gradient G6: Retentionszeit Ni-BPheid a'/a: 12,3/15,9 minUV/Vis (DE): λ_{max} [nm] (rel. E.): 336 (0,76), 391 (0,47), 531 (0,19), 780 (1,00)**3.5.3 Metallierung von Pheophytin a - und Bakteriopheophytin a-Derivaten mit Fe****3.5.3.1 Darstellung von ($\text{Fe}^{(III)}$ Pheophytin a)Chlorid unter Verwendung von FeCl_2**

(modifiziert nach [Urumov, 1975; Snigula, 1997])

Zur Darstellung von ($\text{Fe}^{(III)}$ Pheophytin a)Chlorid ($(\text{Fe}^{(III)}\text{Phe a})\text{Cl}$) wurden 1000 ODml (18,0 μmol , 15,7 mg) Phe a in 20 ml AcOH gelöst, und die Lösung mit Argon gesättigt. Nach Zugabe von 180 mg (900 μmol , 50-facher Überschuss) FeCl_2 , 150 mg (180 μmol , 100-facher Überschuss) NaOAc und einer Spatelspitze Na-Ascorbat wurde die Lösung auf 80°C erhitzt. Während der Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag von braun nach grün. Die Reaktion wird absorptionsspektroskopisch verfolgt. Die Q_y -Bande des Phe a bei 667 nm verschwindet, es entsteht eine neue Bande bei 620 nm. Die Soret-Bande bei 408 nm verschiebt sich kurzweilig nach 383 nm. Diese Angaben gelten für das Monomer ($\text{Fe}^{(III)}$ Phe a)Cl. Beim Ausschütteln der kleinen Proben für die Absorptionsmessung kann es zur Bildung des μ -oxo-Komplexes ($\text{Fe}^{(III)}\text{Phe a}$)₂O kommen, mit einem Q_y -Maximum bei 689 nm. Meist erscheint bei dieser Wellenlänge nur eine langwellige Schulter. Die Reaktionsdauer betrug bei Raumtemperatur 2h, bei 80°C 5 min. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionslösung nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Die Reaktion gelingt unter gleichen Bedingungen mit Phe α -Derivaten, wie z.B. Me-Pheid α , Pheid α oder [3-Acetyl]-Phe α .

Chromatographie: säulenchromatographisch (15 cm Länge; \varnothing 4 cm)

stationäre Phase: Kieselgel

mobile Phase: CHCl_3 mit 0,005 % c. HCl; polarer Anteil: Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung: 560 ODml (15,5 μmol , 14,3 mg, 86 %)

UV/Vis (DE): λ_{max} [nm] (rel. E.)^[2] :

monomer (Fe^{III} Phe α)Cl: 383 (1,00); 620 (0,38); 765 (0,09)

μ -oxo-Dimer (Fe^{III} Phe α)₂O: 318 (0,76); 392 (1,00); 690 (0,41)

MS (ESI); Fe-Phe α [$\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{N}_4\text{O}_5\text{Fe}$; 924]:

m/z (%) Isotopenverteilung des Massenpeaks: 922 (5); 923 (8); 924 (100) [M^+]; 925 (63); 926 (24)

Addukte mit Sauerstoff und Lösungsmittel (Aceton): 940 [M^+ +O]; 982 [M^+ + $(\text{CH}_3)_2\text{O}$]; 998 [M^+ + O + $(\text{CH}_3)_2\text{O}$];

μ -oxo-Dimer: 1864 [2M^+ +O]; Sauerstoffaddukt: 1880 [2M^+ +2O]

Fragmentationen: 646 [M^+ - Phytol]; 662 [M^+ - Phytol + O]; 704 [M^+ -Phytol + $(\text{CH}_3)_2\text{O}$]; 720 [M^+ - Phytol +O + $(\text{CH}_3)_2\text{O}$]

3.5.3.2 Darstellung von (Fe^{III} Bakteriopheophytin α)Chlorid unter Verwendung von FeCl_2

Zur Darstellung von (Fe^{III} Bakteriopheophytin α)Chlorid ((Fe^{III} BPhe α)Cl) wurde eine Lösung von 1,5 g (7,5 mmol, 500-facher Überschuss) FeCl_2 , 130 mg (0,75 mmol, 50-facher Überschuss) $\text{Cd}(\text{OAc})_2$, 123 mg (1,5 mmol, 100-facher Überschuss) NaOAc und einer Spatelspitze Na-Ascorbat in 15 ml AcOH hergestellt. Diese Lösung wurde mit Argon gesättigt und auf 100°C erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1000 ODml (14,8 μmol , 13,1 mg) BPhe α in 1 ml Pyridin zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Das Absorptionsspektrum des (Fe^{III} BPhe α)Cl hat wesentlich breitere Absorptionsbanden als das des BPhe α . Die beim BPhe α stark ausgeprägte B_y -Bande bei 357 nm erfährt eine hypsochrome Verschiebung um 20 nm und verliert an Intensität, gleichzeitig erfolgt eine geringe kurzwellige Verschiebung der Q_y -Bande von 749 nm nach 744 nm. Nach Beendigung der Reaktion nach ca. 1,5 h-2 h wurde der Ansatz nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

^[2] Für die Messung von monomerem (Fe^{III} Phe α)Cl und dem μ -oxo-Komplex (Fe^{III} Phe α)₂O wurde das Pigment in DE gelöst, mit 6 %-iger HCl (Monomer) bzw. 0,1M KOH (Dimer) ausgeschüttelt, und die DE-Phase absorptionsspektroskopisch vermessen.

Die Reaktion gelingt unter gleichen Bedingungen mit BPhe *a*-Derivaten, wie z.B. Me-BPheid *a* oder [3-Vinyl]-BPhe *a*.

Chromatographie: säulenchromatographisch (15 cm Länge; Ø 4 cm)

stationäre Phase: Kieselgel

mobile Phase: CHCl₃ mit 0,005 % c. HCl; polarer Anteil: Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung: 620 ODml (10,7 µmol, 10,1 mg, 71 %)

UV/Vis (DE). λ_{max} [nm] (rel. E.)^[3] :

monomer (Fe^(III)BPhe *a*)Cl = 338 (1.00); 387 (0.87); 523 (0,19); 632 (0.15);
744 (0.59); 1007.0 (0.10)

µ-oxo-Dimer (Fe^(III)BPhe *a*)₂O = 333 (1.00); 385 (0.84); 593 (0.23); 685 (sh) (0.18);
756 (sh) (0.29); 827 (0.56)

MS (ESI); Fe-BPhe *a* [C₅₅H₇₄N₄O₆Fe; 942]:

m/z (%) Isotopenverteilung des Massenpeaks: 940 (14); 941 (11); 942 (100) [M⁺]; 943 (64);
944 (24)

Addukte mit Sauerstoff und Lösungsmittel (Aceton): 958 [M⁺ + O]; 1000 [M⁺ + (CH₃)₂O];
1016 [M⁺ + O + (CH₃)₂O];

µ-oxo-Dimer: 1900 [2M⁺ + O]; 1916 [2M⁺ + 2O]

Fragmentationen: 664 [M⁺ - Phytol]; 680 [M⁺ -Phytol + O]; 722 [M⁺ -Phytol + (CH₃)₂O];
738 [M⁺ -Phytol + O + (CH₃)₂O]

3.5.3.3 Darstellung von (Fe^(III)Pheophytin *a*)Chlorid unter Verwendung von (NH₄)₂Fe(SO₄)₂

Versuche zur Optimierung der Metallierung von Pheophytin *a*

1000 ODml (18,0 µmol, 15,7 mg) Phe *a* wurden in AcOH gelöst, und die Lösung mit Argon gesättigt. Nach Zugabe von (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, NaOAc und einer Spatelspitze Na-Ascorbat wurde bei Raumtemperatur gerührt bzw. erhitzt. Die Reaktion wird absorptionsspektroskopisch wie unter Kap. B-3.5.3.1 verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Zur Optimierung wurden folgende Reaktionsparameter variiert: die Konzentration, d.h. die Menge an AcOH wurde zwischen 15 und 30 ml variiert, der molare Fe-Überschuss bezogen

^[3] Für die Messung von monomerem Fe-BPhe *a* und dem µ-oxo-Komplex wurde das Pigment wie bei der absorptionsspektroskopischen Messung von Fe-Phe *a* behandelt ^[2].

auf das Phe wurde von 50- über 10- auf 3-fach gesenkt, die Temperatur wurde getestet zwischen Raumtemperatur und 100°C.

Optimierte Reaktion zur Metallierung von Pheophytin a mit $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

In 5 ml mit Argon gesättigter AcOH wurden 21 mg (3-facher molarer Überschuss bezogen auf das Phe a) $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, 15 mg NaOAc und einer Spatelspitze Na-Ascorbat gelöst. 1000 ODml (18,0 μmol , 15,7 mg) Phe a wurden in 2 ml mit Argon gesättigtem Pyridin gelöst. Die AcOH-Lösung wurde auf 100°C erhitzt und anschließend das Me-Pheid zugetropft. Die Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Die analytischen Daten entsprechen denen des mit FeCl_2 synthetisierten $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})\text{Cl}$, die unter B-3.5.3.1 beschrieben sind.

Ausbeute nach Aufreinigung: 400 ODml (10,8 μmol , 10,0 mg, 60 %)

3.5.3.4 Darstellung von $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Bakteriopheophytin a})\text{Chlorid}$ unter Verwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

Versuche zur Optimierung der Metallierung von Bakteriopheophytin a:

In mit Argon gesättigtem AcOH wurden $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, NaOAc und Na-Ascorbat zugegeben. 500 ODml (7,5 μmol , 6,5 mg) BPhe a wurden in mit Argon gesättigtem Pyridin gelöst. Die AcOH-Lösung wurde auf 100°C erhitzt und anschließend das BPhe a zugetropft. Die Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch, wie unter B-3.5.3.2 beschrieben verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Zur Optimierung wurden folgende Reaktionsparameter variiert: die Konzentration, d.h. die Menge an AcOH wurde zwischen 3 und 17 ml variiert, die Menge an Pyridin zwischen 0,7 und 3 ml, ein 500-, 100-, 50-, 10- und 5-facher molare Fe-Überschuss bezogen auf das eingesetzte BPhe und der Einsatz von $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ wurden getestet.

Optimierte Reaktion zur Metallierung von Bakteriopheophytin a mit $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

290 mg (0,74 mmol, 50-facher Überschuss) $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, 61 mg (0,74 mmol, 50-facher Überschuss) NaOAc und 60 mg (0,3 mmol, 20-facher Überschuss) Na-Ascorbat wurden in 4 ml AcOH vorgelegt und mit Argon gesättigt. 1000 OD ml (14,8 μmol , 13,1 mg) BPhe a wurden in 1 ml Pyridin gelöst, mit Argon gesättigt und in einen Tropftrichter überführt. Nach Erwärmen der AcOH auf 100 °C, wurde das Pigment langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 2 h refluxiert. Nach Beendigung der Reaktion

(absorptionsspektroskopische Kontrolle) wurde das Reaktionsgefäß rasch im Eisbad abgekühlt und nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet.

Ausbeute nach Aufreinigung: 300 ODml (5,2 μ mol, 4,9 mg, 35 %)

Die analytischen Daten entsprechen denen des mit FeCl_2 synthetisierten (Fe^{III})BPhe a)Cl, die unter Kap. B-3.5.3.2 beschrieben sind.

3.5.3.5 Synthese von ^{57}Fe -Pheophorbid a- ^{173}C -methylester

In 5 ml mit Argon gesättigtem AcOH wurden 20 mg (50 μ mol, 3-facher Überschuss) $(\text{NH}_4)_2^{57}\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, 22 mg (166 μ mol, 10-facher Überschuss) NaOAc und 32 mg (166 μ mol, 10-facher Überschuss) Na-Ascorbat zugegeben. 1000 ODml (18,0 μ mol, 10,9 mg) Me-Pheid a wurden in 2 ml mit Argon gesättigtem Pyridin gelöst. Die AcOH-Lösung wurde auf 100°C erhitzt und anschließend das Me-Pheid a zugetropft. Die Reaktion wurde absorptionsspektroskopisch, wie unter B-3.5.3.1 beschrieben verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung nach Standardmethode (Kap. B-3.1.2) aufgearbeitet. Die wässrige Phase beim Ausschütteln wurde ebenfalls bis zur Trockene eingengt. Aus dem Rückstand kann das im Überschuss eingesetzte ^{57}Fe wieder zurückgewonnen werden.

Chromatographie: säulenchromatographisch

stationäre Phase: Kieselgel

mobile Phase: CHCl_3 mit 0,005 % c. HCl; polarer Anteil: Aceton

Ausbeute nach Aufreinigung: 400 ODml (10,9 μ mol, 7,2 mg, 60 %)

MS (ESI); ^{57}Fe -Me-Pheid a [$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5^{57}\text{Fe}$; 661]:

m/z (%) Isotopenverteilung des Massenpeaks: 660 (9); 661 (100) [M^+]; 662 (45); 663 (15)

Addukte: 677 [M^+ +O]; 693 [M^+ +2O]

4 Spektroskopische Untersuchungen von Fe-Pheophytin a und Fe-Bakteriopheophytin a

4.1 Säure-Base-Titration

(Fe^(III)(B)Phe)Cl wurde in 2 ml mit Argon gesättigtem MeOH gelöst und in eine Küvette überführt. In 1 µl-Schritten wurde 0,01 M HCl bzw. 0,01 M KOH zugegeben und die Änderungen absorptionsspektroskopisch verfolgt. Trat keine Änderung der Absorptionsbanden mehr auf, wurde die Lösung zunächst mit der entsprechenden Menge an Base bzw. Säure neutralisiert und dann entgegengesetzt bis zur Spektrenkonsistenz titriert.

4.2 Reduktion von (Fe^(III)Pheophytin a)Chlorid und (Fe^(III)Bakteriopheophytin a)Chlorid unter Bildung des Fe^(II)(Bakterio)Pheophytin a

Die Fe-Derivate wurden jeweils als Monomer (Fe^(III)(B)Phe a)Cl und als µ-oxo-Dimer (Fe^(III)(B)Phe a)₂O eingesetzt. Hierzu wurde das Pigment in DE gelöst und gegen 6 % HCl (Monomer) bzw. 0,1 M KOH (µ-oxo-Dimer) ausgeschüttelt. Anschließend wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

Methode 1 (Reduktion mit Na₂O₄S₂):

[Kadono et al., 1992]

Das (Fe^(III)(B)Phe a)Cl bzw. das (Fe^(III)(B)Phe a)₂O wurde in 2,5 ml CHCl₃/0,2 ml Pyridin / 10 mg Na₂O₄S₂ in 60 µl H₂O gelöst, 2 ½ h bei Raumtemperatur gerührt und absorptionsspektroskopisch vermessen.

Methode 2 (Pyridinreduktion):

[Kadono et al., 1992]

Das verwendete CHCl₃ wurde über Aluminiumoxid getrocknet, mehrmals entgast und mit Argon begast. Das (Fe^(III)(B)Phe a)Cl bzw. das (Fe^(III)(B)Phe a)₂O wurde in 2 ml CHCl₃/Pyridin-Mischung (25:2, v/v) in einem Dreihalskolben unter Argon gelöst. Die Lösung wurde auf 70°C am Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurden das Pigment absorptionsspektroskopisch vermessen.

4.3 Probenvorbereitung für ESR- und Mößbauer-Spektroskopie

Für die ESR-Messungen wurden 5,56 μmol ($\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Me-Pheid a}$)Cl (170 ODml) und ($\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Me-BPheid a}$)Cl (265 ODml) in drei gleiche Teile geteilt. Die erste und zweite Probe wurden in DE aufgenommen und gegen 10 %ige HCl bzw. 1 M KOH ausgeschüttelt, um das ($\text{Fe}^{(\text{II})}\text{Me-BPheid a}$)Cl in die monomere Form bzw. den μ -oxo-Komplex ($\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Me-(B)Pheid a}$)₂O zu überführen. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und in 0,4 ml angesäuertem bzw. alkalischem Toluol (1 μl c. HCl bzw. 1 μl 5M KOH / 400 μl Toluol) gelöst. Die dritte Probe wurde ohne weitere Vorbehandlung in 0,4 ml Pyridin gelöst, so dass sie das $\text{Fe}^{(\text{II})}\text{Me-(B)Pheid a}$ enthielt. Alle Proben wurden in ESR-Röhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Mößbauermessungen wurde das ($^{57}\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Me-Pheid a}$)Cl verwendet. Die Probenvorbereitung und Konzentration der Proben sind identisch mit den ESR-Proben. Auf die Messung des $^{57}\text{Fe}^{(\text{II})}\text{Me-Pheid a}$ in Pyridin wurde hier verzichtet.

5 Spektroskopische Untersuchungen von Ni-, Zn- und Fe-Bakteriopheophorbid a

5.1 Titration von Ni-Bakteriopheophorbid a und Fe-Bakteriopheophorbid a mit Imidazol

Die Titration erfolgte in einer 2 cm-Küvette. Ni-BPheid a und ($\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPheid a}$)Cl ($\approx 10 \mu\text{M}$) wurden jeweils in 2 ml Tris^[4]/DMF-Puffer-Mischung ((100 mM Tris/HCl, pH 7,5)/DMF 4:1) gelöst. Anschließend wurde 1 M wässrige Imidazolösung in 100 μl -Schritten zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen und mit der Verdünnung korrigiert.

5.2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Ni-Bakteriopheophorbid a in Tris/DMF (4:1)

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten in Tris/DMF-Puffer ((100 mM Tris/HCl, pH 7,5)/DMF 4:1) wurde wegen der schlechten Löslichkeit des Ni-BPheid a in DE und Tris/DMF-Puffer eine Stammlösung des Pigmentes in Acetonitril hergestellt. Anschließend wurden 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8 und 10 μl dieser Stammlösung zu 2 ml DE bzw. 2 ml Tris-

^[4] Tris = Tris(hydroxymethylamin)methan

Puffer/DMF 4:1 pipetiert und ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Mit dem bekannten Extinktionskoeffizienten von Ni-BPheid *a* in DE (Kap. F-4) [Hartwich et al., 1998] konnte durch lineare Regression der Extinktionskoeffizient von Ni-BPheid *a* in Tris/DMF-Puffer zu $34,5 (\pm 0,4) \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt werden.

5.3 Bestimmung der Nachweisgrenze des Oxidationsproduktes Ni-3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid *a* durch die Bildung der zweiten Ableitung des Absorptionsspektrums

Ni-BPheid *a* und Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a* wurden in Toluol bzw. MeOH (jedes $\approx 10 \mu\text{M}$) gelöst. Zu 2 ml der Ni-BPheid *a* -Lösung wurde Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a* -Lösung in 2 μl -Schritten zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen und die zweite Ableitung des Spektrums gebildet. Die Nachweisgrenze war erreicht, wenn in der zweiten Ableitung eine eindeutige negative Bande im Bereich der Soret (430 nm)- bzw. Q_y-Bande (680 nm) des Oxidationsproduktes auftrat. Eine Titration im wässrigen System war nicht möglich, da das Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a* in diesem System Aggregate bildet.

6 LH1-Rekonstitution

6.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Zur Extraktion des LH1 wurden gefriergetrocknete Zellen einer „LH1-only“-Mutante von *Rhodobacter sphaeroides* (aus dem Labor N. Hunter, [Jones et al., 1992]) verwendet. Alle Geräte und die Lösungsmittel für die Extraktion wurden im Kühlschrank oder auf Eis gekühlt, die Präparation fand soweit nicht anders angegeben auf Eis bei 4°C statt.

Extraktionslösungsmittelmischung: 50 % CHCl₃
50 % MeOH
0,1M NH₄OAc
Spatelspitze Na-Ascorbat

6.2 Isolierung der Antennenbestandteile des LH1

(Privatmitteilung L. Fiedor, 2000)

200 mg Zellen wurden zuerst trocken und dann mit zwei Pipetten Extraktionslösungsmittel im Mörser verrieben und abzentrifugiert (8 min, 4000 g). Der dunkelrote Überstand, in dem die Pigmente und Apoproteine des LH1 gelöst sind, wurde abgetrennt und im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Das Pellet wurde mit Extraktionslösungsmittel resuspendiert, im Mörser verrieben und zentrifugiert. Dies wurde so oft wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation farblos ist. Das Pellet wurde wieder mit dem Extraktionslösungsmittel resuspendiert, 15 min im Ultraschallbad inkubiert, 30 min auf Eis gerührt und anschließend zentrifugiert. Dies wurde 5-mal wiederholt und alle Überstände mit denen der Pigmentextraktion vereinigt.

Die letzte Extraktionsschritt (resuspendieren, 15 min Ultraschall, 30 min rühren, zentrifugieren) erfolgte mit dem Extraktionslösungsmittel unter Zugabe von 10 % AcOH. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet verworfen und der Überstand gesondert behandelt. Die organischen Lösungsmittel wurde im Argonstrom abgeblasen, die verbleibende AcOH mit 0,3 M Tris-Puffer verdünnt, und die Suspension 7 min bei 12000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet noch mal mit 0,3 M Tris-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren.

6.3 Rekonstitution des LH1-Komplexes

6.3.1 Puffer

Folgende Puffer wurden für die Rekonstitution verwendet:

200 mM Tris-Puffer	200 mM Tris-HCl, pH 7,6
20 % β -OG ^[5] –Puffer	20 % β -OG (w/v), 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 25 mM NaCl
20 mM Tris Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 25 mM NaCl
1 % β -OG –Puffer	1 % β -OG, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 25 mM NaCl

^[5] β -OG = n-Octyl- β -glucopyranosid

Folgende Puffer wurden für die Säulenchromatographie verwendet:

1 M Tris-Puffer	1M Tris-HCl, pH 7,6
20 mM Tris-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 25 mM NaCl
0,8 %- β -OG-Puffer	0,8 % β -OG, 25 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
140 mM NaCl-Puffer	0,8 % β -OG, 140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
190 mM NaCl-Puffer	0,8 % β -OG, 190 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
400 mM NaCl-Puffer	0,8 % β -OG, 400 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
1 M NaCl-Puffer	0,8 % β -OG, 1M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6

6.3.2 Entfernen des organischen Lösungsmittel

Die vereinigten Überstände der Extraktion wurden absorptionsspektroskopisch vermessen, um den BChl-Gehalt am langwelligen Absorptionsmaximum bei 770 nm zu ermitteln. Die Extraktionslösung wurde halbiert, und zu einer Hälfte ($\text{Fe}^{(III)}$ BPhe a)Cl gelöst in CHCl_3 zugegeben, die andere Hälfte wurde ohne Zugabe von externem Pigment rekonstituiert und diente zur Überprüfung des Rekonstitution-Ablaufs.

Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Druck nicht unter 60 mbar sinkt und die Wasserbadtemperatur 30°C nicht übersteigt, da sich sonst das enthaltene NH_4OAc zu Ammoniak und AcOH zersetzt und die Pigmente zerstört werden. Der Rückstand wurde zweimal in 200 mM Tris-Puffer resuspendiert, um Reste der organischen Lösungsmittel zu entfernen und 10 min bei 10000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

6.3.3 Rekonstitution

Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis und unter Argon durchgeführt.

Das Pellet wurde in 200 mM Tris-Puffer resuspendiert. Für einen Gehalt von 9 - 10 ODml BChl wurden 700 μl 200 mM Tris-Puffer benötigt. Die Suspension wurde unter Argon 5 min gerührt und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde schrittweise soviel 20 % β -OG-Puffer (145 μl) zugegeben, bis eine Endkonzentration von 3,4 % β -OG erreicht war. Die Suspension wurde 5 min gerührt und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 20 mM Tris-Puffer in drei Schritten auf eine Endkonzentration von 1,1 – 1,5 % β -OG verdünnt. Nach jedem Verdünnungsschritt wird die Suspension 5 min gerührt und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach der letzten Verdünnung wird bei

Raumtemperatur weitergearbeitet. Zuletzt wurde das Pellet der AcOH-Extraktion in 1 ml 1 % β -OG-Puffer suspendiert und zu dem Rekonstitutionsgemisch gegeben. Die Suspension wurde für 8 min bei geringer Geschwindigkeit (4000 g) zentrifugiert.

Da das Pellet noch Komplex enthalten kann, wurde es nochmals in wenig 1 % β -OG-Puffer suspendiert und 5 min bei 3000 g zentrifugiert.

6.3.4 Chromatographie

Die Aufreinigung des LH1-Komplexes fand auf einer DEAE-Sepharose-Säule statt. Das Säulen-Material, das in EtOH/Wasser-Gemisch suspendiert vorlag, wurde in eine als Säule verwendete Pasteur-Pipette (Betlänge 4 cm) gefüllt. Das Material wurde mit drei Säulenvolumina destilliertem Wasser, einem Säulenvolumen 1M Tris-Puffer, drei Säulenvolumina 20 mM Tris-Puffer und mit einem Säulenvolumen 0,8 % β -OG-Puffer gespült.

Die vereinigten Überstände der Rekonstitution wurden auf die DEAE-Sepharose-Säule aufgetragen.

Die freien Pigmente wurden mit 140 mM NaCl-Puffer eluiert. Bei einer etwas höheren Salzkonzentration von 190 mM NaCl wird der B820 Subkomplex (Carotinoid-frei) eluiert. Die Bande des LH1-Komplexes (B875) eluierte mit 400 mM NaCl als rosa Fraktion. Alle Fraktionen der Säule wurden absorptionsspektroskopisch untersucht.

Die Säule kann mehrmals verwendet werden. Zur Regeneration wurde sie mit einem Säulenvolumen 1 M NaCl-Puffer gespült und anschließend erneut mit 0,8 %- β -OG-Puffer äquilibriert. Zur vollständigen Reinigung wurde der Komplex nochmals unter gleichen Bedingungen auf die Säule aufgetragen, gespült und eluiert.

6.4 Pigment-Extraktion über DEAE-Sepharose-Säule

Die DEAE-Sepharose (fast flow)-Säule (Pasteurpipette) wurde in 0,8 %- β -OG –Puffer äquilibriert und der LH1-Komplex aufgetragen. Das Detergenz wurde durch Spülen mit 10-15 ml dest. Wasser entfernt und die Säule mit Argon trocken geblasen. Die Elution der Pigmente erfolgte mit Argon-gesättigten Lösungsmitteln, zuerst mit Aceton und anschließend mit MeOH (je 1,5 ml). Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Die vorhandenen Wasserreste wurden durch Zugabe von Toluol als Azeotrop am Rotationsverdampfer entfernt.

6.5 HPLC-Analyse des Pigment-Extrakts

Für die HPLC-Analyse wurde die unter Kap. B-2.3 beschriebene Anlage mit folgenden drei Laufmitteln verwendet.

Laufmittel A: Toluol

Laufmittel B: 90 % Toluol / 5 % Aceton / 4% MeOH / 1% iProp

Laufmittel C: 37,5 % Toluol / 50 % Aceton / 12,5 % konzentrierte AcOH

Gradient: 0 min – 10 % B, 0 % C / 20 min – 70 % B, 0 % C / 20,1 min – 0 % B, 70 % C / 28 min 0 % B, 70 % C / 33 min - 0 % B, 0 % C

Flussrate: 1 ml/min

Spülen: 10 min, 100 % Aceton, 2 ml/min, 10 min 10 % B, 2 ml/min

Auf 100 fehlende Prozent: Laufmittel A.

Temperatur: 4°C

Die Injektion der Pigmente erfolgte in Laufmittel A.

Um bei einer 2-Pumpen-Anlage mit drei Laufmitteln arbeiten zu können, wurde der Zufluss zu Pumpe B mit einem zusätzlichen Drei-Wege-Hahn und einem zusätzlichen Laufmittelzufluss versehen. So kann während des Laufs nach 20 min das Laufmittel B durch Laufmittel C ersetzt werden.

6.6 Pigment-Extraktion und Nachweis des (Fe^(III))Bakterio-pheophytin a)Chlorid über Absorptions-Differenzspektren

Der LH1-Komplex in 0,8 % β -OG-Puffer wurde in einen Scheidetrichter überführt und gegen DE / Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 4 ml MeOH/5 % Tris-Puffer aufgenommen, halbiert und jeder Teil in eine Küvette gegeben. Zu der einen Hälfte wurde eine Spatelspitze Imidazol zugegeben. Anschließend wurde von jeder Küvette ein Absorptionsspektrum aufgenommen, sowie von beiden Küvetten gegeneinander (Referenz-Küvette = ohne Imidazol). Um Spektren mit höherer Auflösung zu erhalten, wurde die Scangeschwindigkeit von 960 nm/min auf 430 nm/min gesenkt.

7 Synthetische Vier-Helix-Bündel-Protein-Pigment-Komplexe

7.1 Kovalente Bindung

7.1.1 Aminosäuresequenzen der verwendeten Vier-Helix-Bündelproteine

Die modularen Proteine (MOP) wurden von Harald Rau (AG Prof. W. Haehnel, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) mit den folgenden Aminosäuresequenzen modelliert und synthetisiert:

Mp-A: Ac-N-L-E-E-F-L-K-K-F-Q-E-A-L-E-K-A-Q-K-LL-K(Mp)-NH₂

Mp-A': Ac-N-L-E-E-L-L-K-K-L-Q-E-A-L-E-K-A-Q-K-LL-K(Mp)-NH₂

Mp-B: Mp-G-N-A-L-E-L-H-E-E-A-K(Aoa)-K-K-L-E-E-LL-K-K-L-NH₂

Mp-B': Mp-G-N-A-L-E-L-H-E-K-A-K(Aoa)-K-Q-L-E-EL-L-K-K-L-NH₂

Mp-C: Mp-G-N-A-R-E-L-H-E-K-A-L-K-Q-L-E-E-L-F-KK-W-NH₂

Mp-C': Mp-G-N-A-L-E-L-H-E-K-A-L-K-Q-L-E-E-L-L-KK-W-NH₂

Template: T(Trt)(Acm)(Trt)(StBu): cyclo[C(Acm)-AC(Trt)-P-G-C(SBu^t)-A-C(Trt)-P-G-]

(Mp repräsentiert den 3-Maleinimidopropionyl-Rest, der die Helix mit einem Cystein auf dem zyklischen Dekapeptid verbindet, Acm den Acetamidomethyl-Rest und SBu^t den tertiär-Butylthio-Rest)

Die modularen Proteine haben folgende Zusammensetzung:

MOP4: T[Sp-A][Sp-B][Sp-A][Sp-C] bzw.

MOP4': T[Sp-A'][Sp-B'][Sp-A'][Sp-C']

(Sp repräsentiert den 3-Succinimidopropionyl-Rest)

7.1.2 Bindung von Formyl-Chlorophyll-Derivaten

Die Bindung der Formyl-Derivate des Chl [3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a, Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a und Ni-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a wurde von H. Rau durchgeführt nach der Vorschrift [Rau et al., 2001] genauso wie die spektroskopische Untersuchung der Komplexe.

7.2 Nicht-kovalente Bindung

7.2.1 Synthese und Aminosäuresequenzen der Vier-Helix-Bündel-Proteine

Die Vier-Helix-Bündel-Proteine wurden von Bernhard Monien (AG Prof. W. Haehnel, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) modelliert und synthetisiert.

Tab. B-1 und Tab. B-2 zeigen die Sequenzen der Peptide S_i ($i=1-18$) und B_j ($j=1-12$), die durch automatisierte multiple Peptidsynthese mit einem vollautomatischen Peptidsyntheseautomat (Advanced ChemTech MPS 396) hergestellt wurden.

S1	Ac	L	E	E	A	A	K	K	A	E	E	A	A	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S2	Ac	L	E	E	V	Y	K	K	V	E	E	A	L	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S3	Ac	L	E	E	L	A	K	K	V	E	E	L	L	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S4	Ac	L	E	E	A	F	K	K	A	E	E	A	F	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S5	Ac	L	E	E	L	L	K	K	V	E	E	L	F	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S6	Ac	L	E	E	A	F	K	K	A	E	E	L	F	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S7	Ac	L	E	E	A	F	K	K	V	E	E	V	L	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S8	Ac	L	E	E	L	F	K	K	A	E	E	A	F	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S9	Ac	L	E	E	V	F	K	K	A	E	E	A	L	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S10	Ac	L	E	E	A	F	K	K	A	E	E	L	W	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S11	Ac	L	E	E	A	F	K	K	L	E	E	V	L	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S12	Ac	L	E	E	L	F	K	K	A	E	E	A	W	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S13	Ac	L	E	E	L	Y	K	K	V	E	E	L	L	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S14	Ac	L	E	Q	L	W	K	F	A	E	E	L	A	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S15	Ac	L	E	Q	L	W	K	L	A	E	E	L	F	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S16	Ac	L	E	Q	L	L	K	L	A	E	E	L	L	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S17	Ac	L	E	Q	L	F	K	L	A	E	E	L	A	K	K	K	(Mp) -NH ₂
S18	Ac	L	E	Q	L	L	K	A	A	E	E	L	F	K	K	K	(Mp) -NH ₂

Tab. B-1: Aminosäuresequenzen der Abschirmhelices S1-S18; modifizierte Aminosäurereste sind fett dargestellt, Mp = Maleinimidopropionyl-Rest, der die Helix mit einem Cystein des zyklischen Dekapeptids verbindet; Ac = Acetyl

B1	Mp	G	L	E	E	L	L	K	K	H	E	E	L	L	K	K	L	NH ₂
B2	Mp	G	L	E	L	A	L	K	L	H	E	E	F	L	K	K	L	NH ₂
B3	Mp	G	L	E	L	L	L	K	A	H	E	E	L	L	K	K	L	NH ₂
B4	Mp	G	L	E	L	A	L	K	V	H	E	E	L	L	K	K	L	NH ₂
B5	Mp	G	L	E	L	F	L	K	A	H	E	E	L	L	K	K	L	NH ₂
B6	Mp	G	L	E	L	A	L	K	F	H	E	E	L	L	K	K	L	NH ₂
B7	Mp	G	L	E	L	L	L	K	V	H	E	E	W	L	K	K	L	NH ₂
B8	Mp	G	L	E	L	A	L	K	A	H	E	E	W	L	K	K	L	NH ₂
B9	Mp	G	L	E	L	V	L	K	W	H	E	E	A	L	K	K	L	NH ₂
B10	Mp	G	L	E	L	W	L	K	F	H	E	E	A	L	K	K	L	NH ₂
B11	Mp	G	L	E	Q	I	I	K	L	H	R	E	L	F	Q	K	L	NH ₂
B12	Mp	G	L	E	Q	I	I	K	L	H	W	E	R	F	Q	K	L	NH ₂

Tab. B-2: Aminosäuresequenzen der Bindehelices B1-B11; modifizierte Aminosäurereste sind fett dargestellt, Mp = Maleinimidopropyl-Rest

Zur Synthese des zyklischen Templates wurde das Peptid H-Pro-Cys(Acm)-Ala-Cys(SBu^t)-Gly-Pro-Cys(Acm)-Cys(Trt)-Cys(SBu^t)-Gly-OH nach der Vorschrift von Rau et al. [Rau et al., 2000] manuell an einem Peptidyl-Harz (Fmoc-Gly-NovaSyn) synthetisiert. Nach der Abspaltung vom Harz wurde das Decapeptid zyklisiert [Rau, 1998]. Die Synthese der modularen Proteine auf sechs Cellulosemembranen (M1-M6) gelang nach der Vorschrift von [Schnepf et al., 2001; Rau et al., 2000].

7.2.2 Einlagerung von Ni-, Zn- und Fe-Bakteriopheophorbid a in synthetische, membrangebundene Peptide

(leicht modifiziert nach [Rau, 1998])

Sechs Zellulosemembranen (M1 bis M6), auf denen 216 verschiedene, modulare Proteine gebunden sind, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, wurden mit 80 ml einer 50 µM Lösung von M-BPheid a (M = Ni²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺) in DMF/Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,5) 1:4 3h bei Raumtemperatur geschüttelt. Hierbei lagerte sich das Pigment in unterschiedlichen Intensitäten in die verschiedenen Peptide ein, während der Hintergrund keine Absorption zeigt. Die unterschiedlich gute Bindung ist visuell anhand der Farbtiefe der violetten Spots zu erkennen. Einigen Spots färbten sich im Fall des Ni-BPheid a statt violett blaugrün. Anschließend wurden die Membranen dreimal für 15 min mit Na-Phosphat-Puffer

(100 mM, pH 7) gewaschen, um überschüssiges Pigment zu entfernen. In diesem Puffer wurden die Serien von Absorptionsspektren der zellulosegebundenen Protein-Pigment-Komplexe aufgenommen, die im Folgenden mit „0. Waschung“ gezeichnet werden. Anschließend wurden die Membranen in zwei Schritten mit steigendem DMF-Gehalt der Waschlösung (steigender Lösekraft) gewaschen, um die Stärke der Pigment-Protein-Bindung zu testen. Die Waschungen erfolgten einmal mit DMF/Tris-Puffer 1:8 (15 min) („1. Waschung“) und anschließend mit DMF/Tris-Puffer 1:4 (15 min) („2. Waschung“). Nach jeder Waschung wurden die Membranen ebenfalls absorptionsspektroskopisch vermessen. Nach den Absorptionmessungen wurden die Membranen zweimal je 60 min mit Imidazol (100 mM) in DMF behandelt, um das adsorbierte Pigment zu extrahieren. Um das Imidazol aus den Membranen zu entfernen wurden sie dreimal für je 15 min mit DMF und anschließend mit MeOH gewaschen. Die Membranen wurden getrocknet und für die Einlagerung eines weiteren M-BPheid *a* verwendet. Die Pigmente wurden in der Reihenfolge Ni-BPheid *a*, Zn-BPheid *a* und Fe-BPheid *a* eingelagert.

7.3 Analyse der Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren wurden mit einem selbstgeschriebenen Programm in VEE Pro 6.01 (Dr. Friedel Drepper, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) analysiert. Für das Filtern und die graphische Präsentation (Lage der Schultern der Q_x -Bande, Abb. C-62) wurden die entsprechenden Funktionen von MATLAB-Modulen in VEE verwendet. Die Spektren wurden mit einem low-pass-Filter (6. Ordnung Butterworth, cut-off Wert = 0,2, mit 0-Phasen-Filter) geglättet. Ein visueller Vergleich der Roh- und gefilterten Daten zeigten keinen Verlust der Feinstruktur durch das Glätten.

Alle Spektren wurden bei 900 nm auf 0 gesetzt, anschließend wurde die zweite Ableitung gebildet. Die Positionen der Maxima und Schultern ergaben sich aus den Minima der zweiten Ableitung. Die Peak-Breite der Q_y -Bande wurde bestimmt, indem nur die niederenergetische Hälfte der Bande verwendet wurde, um zu verhindern, dass Schwingungsseitenbanden das Ergebnis verfälschen. Sie wurde definiert als die Wellenlängen-Differenz zwischen dem niederenergetischen Wendepunkt und dem Maximum der Bande. Die Fläche dieser Bande wurde durch Integration über einen Bereich, der sich über die dreifache Bandbreite auf beiden Seiten des Maximums erstreckt, bestimmt.

Zur weiteren Analyse wurden die spektralen Intensitäten jedes Bandensystems in fünf Regionen unterteilt, die folgendermaßen definiert wurden.

Soret-System: Bereich von 325 – 495 nm, Unterbanden bei ~337, ~367, ~372, ~400, ~437 nm

Q_x-System: Bereich von 495 – 640 nm, Unterbanden bei ~547, ~588, ~610, ~627 nm

Q_y-System: Bereich von 640 – 870 nm, Unterbanden bei ~685, ~725, ~801 nm

Die folgenden Parameter wurden zur Analyse verwendet:

- Position, Breite und Fläche der Q_y-Bande
- Intensitätsverhältnisse zwischen den Banden: A685/A801, A588/A547, A610/A547, A627/A547

Das Verhältnis A627/A547 wurde nicht aus dem Absorptionsspektrum bestimmt, sondern aus der Fläche der entsprechenden negativen Banden in der zweiten Ableitung; diese Analyse ist sensitiver für Schultern im Q_x-Bereich und kann zum Vergleich verschiedener Spots verwendet werden.

Die graphische Darstellung der Position und Breite der Q_y-Bande erfolgte durch ein selbstgeschriebenes Programm in Visual Basic.

C. Ergebnisse und Diskussion

1 Synthese von Fe-Pheophytin *a* und Fe-Bakterio-pheophytin *a*

1.1 Einführung

Neben den Mg-Tetrapyrrolen (Chlorophyll (Chl), Bakteriochlorophyll (BChl)) gehören die Fe-Tetrapyrrole (Häme) zu den biologisch wichtigsten Vertretern dieser Verbindungsklasse (Tab. C-1, Abb. C-1) [Dickerson et al., 1961; Perutz et al., 1968; Nunn et al., 1992; Nango et al., 1998; Katz et al., 1978].

Tetrapyrrol	Proteine	Funktion
Proto-Häm	Hämoglobin	Sauerstofftransport im Blut
Proto-Häm	Myoglobin	Sauerstofftransport im Muskel
verschiedene Häme	Cytochrome	Redoxreaktionen und Elektronentransport
Proto-Häm	Cytochrom P450	Diverse Oxygenierungen
Chl <i>a</i>	LHC, PSI, PSII	Lichtabsorption, Energietransfer, Ladungstrennung
BChl <i>a</i>	LH1, LH2, bakt. RC	Lichtabsorption, Energietransfer, Ladungstrennung

Tab. C-1: Übersicht über Fe- und Mg-Tetrapyrrole, ihre Protein-Komplexe und deren Funktionen

Häme und Chlorophylle unterscheiden sich allerdings nicht nur durch das Zentralmetall, sondern auch durch die peripheren Substituenten, (teilweise) den Oxidationszustand des Makrozyklus sowie durch ihre nativen Apoproteine. Es ist deshalb von Interesse, welche Faktoren für die Bindung an das jeweilige Apoprotein, für die Interaktionen zwischen Chromophor und Protein, sowie für ihre Funktion entscheidend sind.

BChl konnte mit einer Reihe von Metallen transmetalliert werden [Hartwich, 1994], Fe fehlte aber bisher in dieser Reihe. Auch beim Chl sind die Fe-Verbindungen wenig bekannt und spektroskopisch nur unzureichend untersucht worden [Urumov, 1975; Snigula, 1997; Strell und Urumow, 1977].

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Metallierung von Pheophytin *a* (Phe *a*) und Bakteriopheophytin *a* (BPhe *a*) mit Eisen, die Charakterisierung dieser Eisenkomplexe und der Vergleich ihrer Eigenschaften mit denen von Fe-Porphyrinen.

Für Mößbauermessungen wird das ^{57}Fe -Isotop benötigt, das von der AG Prof. Parak (Technische Universität München, Garching) als Mohrsches Salz $(\text{NH}_4)_2^{57}\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ zur Verfügung gestellt wurde. Die Metallierung soll, um die Mößbauerspektroskopie zur Charakterisierung nutzen zu können, sowohl für Chl als auch für BChl auf das Mohrsche Salz übertragen werden und wegen der hohen Kosten des ^{57}Fe -Isotops so optimiert werden, dass möglichst geringe Mengen davon benötigt werden. Synthesen, Chromatographie, Massen- und Absorptionsspektren des Fe-Pheophytin *a* (Fe-Phe *a*) und Fe-Bakteriopheophytin *a* (Fe-BPhe *a*) werden in Kap. C-1.2 beschrieben. In Kap. C-1.3 werden die Eigenschaften des Fe-(B)Phe *a* bezüglich Ligandierungsverhalten und Redox-Verhalten spektroskopisch untersucht, wofür Absorptions- (Kap. C-1.3.2), Elektronenspinresonanz- (ESR-) (Kap. C-1.3.3) und Mößbauerspektroskopie (Kap. C-1.3.4) eingesetzt wurden. Zur Interpretation der Absorptions-, ESR- und Mößbauerspektren wird als Vergleich das Verhalten der gut charakterisierten Fe-Porphyrine herangezogen.

1.2 Metallierungsreaktionen mit Fe

1.2.1 Allgemeine Metallierungsreaktionen von Porphyrinen, Chlorinen und Bakteriochlorinen

Die Entwicklung der Metallierungsmethoden und die Untersuchung der Mechanismen und Kinetiken gehen auf die Metallierung von Porphyrinen zurück, die dann auf Chlorine und Bakteriochlorine übertragen wurden. Die Metallierung erfordert zum Einen die Deprotonierung des Porphyrins als kinetisch kontrollierenden Schritt und zum Anderen die Löslichkeit der Komponenten, insbesondere des Metallsalzes. Um das zu erreichen, gibt es drei wichtige Ansätze [Buchler, 1975]:

1) Direkte Metallierung in Methanol:

Diese Methode eignet sich für säurelabile Komplexe. Die Komponenten werden in Methanol (MeOH) gelöst und als Metallsalz wird das Acetat gewählt, so dass die Protonen der Pyrrol-Stickstoffe unter Bildung der schwachen Essigsäure auf das Acetat übertragen werden. Viele Metalle können mit dieser Methode insertiert werden, aber mit Fe ist diese Methode selbst bei Porphyrinen ungünstig, weshalb sie nicht weiter verfolgt wurde.

2) Direkte Metallierung mit Acetaten in Essigsäure (Acetat-Methode)

Bei der Acetat-Methode wird das Porphyrin (H_2P) oder Chlorin in konzentrierter Essigsäure mit Metallacetaten bzw. Metallsalzen (MX_2) und Zusatz von NaOAc metalliert (Gl. C-1). Hierbei werden die Protonen des Stickstoff des zu metallierenden Tetrapyrrol auf Acetat-Ionen übertragen und das Metall insertiert. Der Mechanismus dieser Reaktion konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, wahrscheinlich ist aber, dass sich ein intermediärer Komplex bildet, bei dem das Porphyrin noch ein oder zwei Protonen und das Metall seine Liganden trägt [Hambright, 1975].

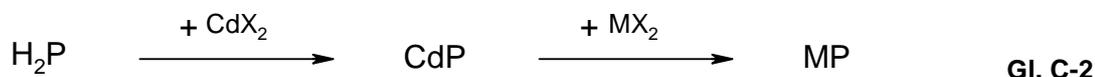


H_2P = Porphyrin; M^{2+} = Metallkation; X^- = Anion wie Chlorid oder Acetat

Für Porphyrine und Chlorine hat sich die sog. Acetat-Methode, (Gl. C-1) bewährt, mit der die meisten Übergangmetalle insertiert werden können Für Fe-Porphyrine ist dies die Methode der Wahl und sie wurde auch für Fe-Chlorine eingesetzt [Urumov, 1975]. Eine Variante dieser Methode ist die Zugabe von Pyridin, was die Löslichkeit des Porphyrins (H_2P) und des metallierten Porphyrins (MP) erhöht [Buchler, 1975]. Nur wenige Metalle (Zn^{2+} , Cu^{2+}) können mit dieser Methode in Bakteriochlorine insertiert werden [Hartwich et al., 1998].

3) Zweistufige Synthese

Zunächst wird der Cd-Komplex synthetisiert, der kinetisch günstig, aber thermodynamisch instabil ist. Aus diesem Komplex wird durch Transmetallierung das Cd^{2+} gegen ein anderes zweiwertiges Ion ausgetauscht (Gl. C-2). Hierbei ist nur im ersten Schritt eine Deprotonierung notwendig.



H_2P = Porphyrin oder (Bakterio)pheophytin; M^{2+} = Metallkation;
 X^- = Anion wie Chlorid oder Acetat

Von Urumov [Urumov, 1975] wurde diese Methode für Chlorine eingesetzt, von Hartwich [Hartwich et al., 1998] für einige bisher unzugängliche Metallo-BChl. Zur Synthese von Fe-Chlorinen und Fe-Bakteriochlorinen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Ansätze 2) und 3) verfolgt.

1.2.2 Metallierung von Porphyrinen mit Fe

Die Einlagerung von Eisen in Porphyrine ist mit der Acetat-Methode nach der literaturbekannten Vorschrift [Buchler, 1975] möglich, wobei FeSO_4 oder $\text{Fe}(\text{OAc})_2$ als zweiwertiges Metallsalz gewählt wird. Das primär gebildete $\text{Fe}^{(II)}$ Porphyrin ist allerdings nicht stabil und autoxydiert während der Aufarbeitung zum $\text{Fe}^{(III)}$ Porphyrin [Alben et al., 1968; Chin et al., 1980]. Die Metallierung von Porphyrinen mit Fe gelingt auch unter Verwendung eines dreiwertigen Metallsalzes, dem FeCl_3 , und liefert das gleiche Produkt [Buchler, 1975; Inhoffen et al., 1969]. Fischer et al. gelang mit der Acetat-Pyridin-Methode die Synthese des $\text{Fe}^{(II)}$ Porphyrins, das kurze Zeit im Trockenen stabil ist, in Lösung aber ebenfalls zum $\text{Fe}^{(III)}$ Porphyrin aufoxydiert [Fischer et al., 1931].

Hambright et al. [Hambright, 1975; Fleischer und Wang, 1960] beschreiben die Bildung eines „sitting atop“-Komplexes (SAT) als Übergangsstufe bei der Reaktion von Protoporphyrin-IX-Dimethylester (Proto-IX-DME) (Abb. C-2) mit FeCl_3 . Es ist ein 1:1-Addukt des Porphyrins mit FeCl_3 , bei dem das Porphyrin an den zentralen Stickstoffen noch nicht deprotoniert ist, und der die Stöchiometrie $[\text{FeCl}_3\text{-H}_2(\text{Proto-IX-DME})\text{-SAT}]$ (Abb. C-3) hat.

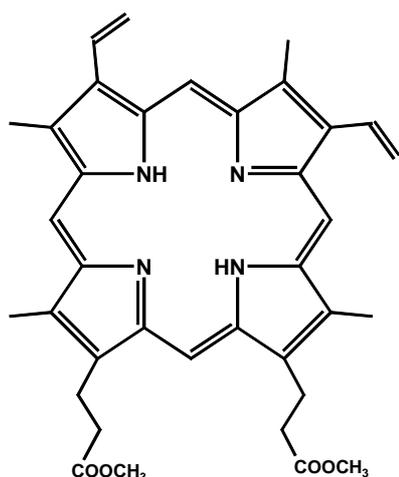


Abb. C-2: Strukturformel des Protoporphyrin-IX-Dimethylesters (Proto-IX-DME)

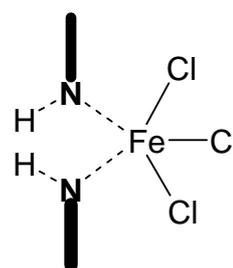


Abb. C-3: SAT-Komplex von Proto-IX-DME und FeCl_3 (nach [Hambright, 1975])

1.2.3 Metallierung von Chlorinen

Als erstes in der Literatur beschriebene Fe-Chlorin-Derivat wurde das (Fe^(III))Pheophorbid *a*-17³-methylester)Chlorid ((Fe^(III))Me-Pheid *a*)Cl) nach der Acetat-Methode unter Verwendung von FeCl₃ mit einer Ausbeute von 79 % synthetisiert [Urumov, 1975], indem das Chlorin-Derivat Pheophorbid *a*-17³-methylester (Me-Pheid *a*) mit einem 10-fachen molaren Überschuss an FeCl₃ für 3 h bei 110 °C refluxiert wurde. Er konnte außerdem zeigen, dass eine „indirekte“ Metallierung des Me-Pheid *a* über den *in situ* erzeugten Cd-Komplex im Gegensatz zu Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ mit FeCl₃ nicht möglich ist [Strell und Urumow, 1977].

Bei einer anderen, in der Literatur beschriebene Methode zur Einlagerung von Eisen in Phe *a* wird dieses in Aceton gelöst, mit einer methanolischen FeCl₂-Lösung versetzt und die Mischung für drei Stunden erhitzt [Furuya et al., 1987; Kadono et al., 1992]. Die Umsetzung liefert das Produkt (Fe^(III))Pheophytin *a*)Chlorid ((Fe^(III))Phe *a*)Cl) in 75 % Ausbeute. Mit Phe *b*, das sich von Phe *a* durch eine Formyl-Gruppe an Position C-7 unterscheidet, ist die beschriebene Reaktion aufgrund der durch diese elektronenziehenden Gruppe geänderten Basizität des Tetrapyrrolgerüsts nicht möglich. Die Metallierung gelang Furuya et al. [Furuya et al., 1987] mit wasserfreiem Fe(OAc)₂ in Essigsäure bei 60°C in 30 min. Die Reaktion verläuft innerhalb dieser Zeit nicht vollständig, so dass nach 30 min noch Phe *b* detektiert wird, bei längerer Reaktionszeit bilden sich Abbauprodukte.

Metallierung mit FeCl₂

Die eigenen Arbeiten konzentrierten sich zunächst auf die Metallierung nach der klassischen Acetat-Methode (Gl. C-1, Abb. C-4) mit FeCl₂ und NaOAc in Eisessig, mit der Pheophytin *a* (Phe *a*) wird in guter Ausbeute metalliert. Diese Methode ist auch für andere Phe *a*-Derivate einsetzbar; Phe *b*, 3-Devinyl-3-acetyl-pheophytin *a* ([3-Acetyl]-Phe *a*), Pheophorbid *a*-methylester (Me-Pheid *a*), Pheophorbid *a* (Pheid *a*), 13²-Hydroxy-pheophytin *a* (13²-OH-Phe *a*) und 13²-Demethoxycarbonylpheophytin *a* (Pyro-Phe *a*) können mit dieser Methode ebenfalls metalliert werden.

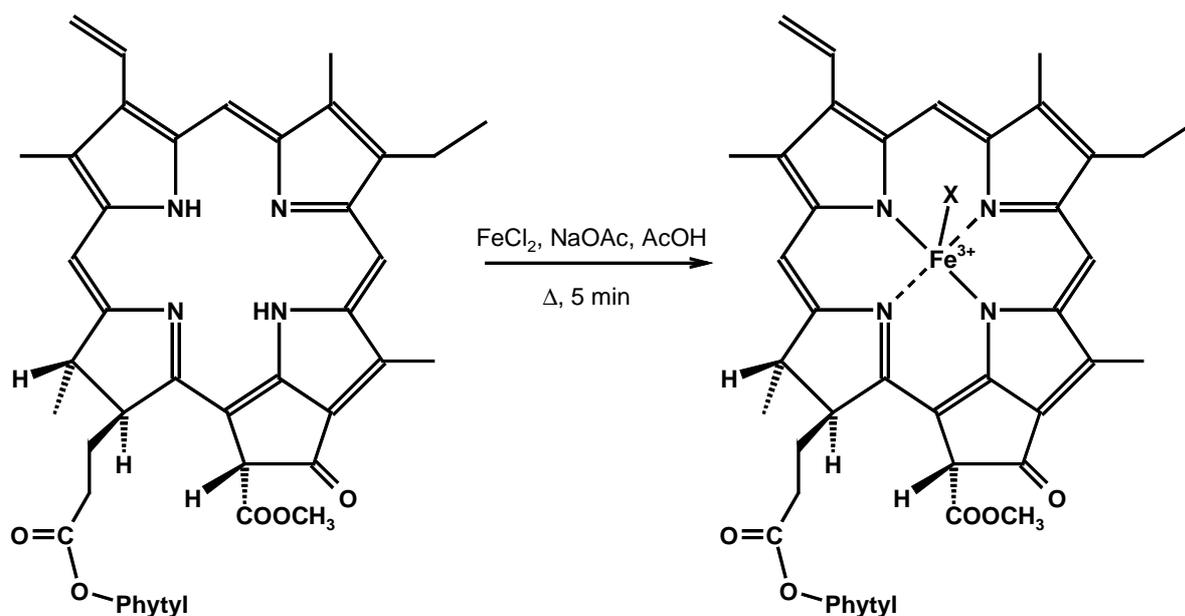


Abb. C-4: Metallierung von Pheophytin a (Phe a) mit Eisen nach der Acetat-Methode.

Bei der Metallierung von Phe a ergibt ein 50-facher Eisenüberschuss in einer Konzentration von 45 mM ein Ausbeuteoptimum von 86 %. Die Reaktionszeit ist stark abhängig von der Temperatur. Bei Raumtemperatur ist das Phe a nach 2h vollständig metalliert, bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 80 °C verkürzt sich die Reaktionszeit bei sonst identischen Bedingungen auf 5 min. Während der Reaktion oder Aufarbeitung, der Überführung in DE und dem Entfernen der Säure und Salze durch Ausschütteln gegen Wasser oxidiert das Fe^{2+} zum dreiwertigen Ion, so dass man das $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe a})\text{Cl}$ oder $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe a})\text{OAc}$ als Produkt erhält.

Optimierung für die Insertion von ^{57}Fe

Um die Möglichkeit zu haben, das $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe a})\text{Cl}$ mit Mößbauerspektroskopie zu untersuchen, muss das teure Eisenisotop ^{57}Fe in das Phe a eingelagert werden. Da dieses Eisenisotop nur in Form des Mohrschen Salzes $(\text{NH}_4)_2^{57}\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ zur Verfügung steht, musste die Metallinsertion auf das Mohrsche Salz übertragen und soweit optimiert werden, dass ein möglichst geringer Überschuss an Fe-Salz benötigt wird. Wegen der geringen Löslichkeit des Mohrschen Salzes in Aceton oder Dimethylformamid (DMF), den üblichen Lösungsmitteln für eine Transmetallierung über den Cd^{2+} -Komplex, kann diese Reaktion nicht verwendet werden. Deswegen wurde die Metallierung des Phe a mit dem Mohrschen Salz zuerst mit der Acetat-Methode versucht, die bei der Metallierung von Phe a mit FeCl_2 (siehe oben) gute Ausbeuten liefert.

Die getesteten Reaktionsbedingungen für die Optimierung der Metallierung von Phe a finden sich in Tab. C-2.

	Rkt. 1	Rkt. 2	Rkt. 3	Rkt. 4	Rkt. 5	Rkt. 6	Rkt. 7	Rkt.8
Pigmentmenge [ODml]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Pigmentkonzentration [mM]	0,9	0,9	0,6	1,2	0,8	0,8	1,8	2,6
AcOH/Pyr [ml]	20/0	20/0	30/0	15/0	23/0	23/0	5/5	5/2
Temp [°C]	RT	100°C	100°C	60 °C	45 °C	45 °C	110	110
(NH₄)₂Fe(SO₄)₂ [mg], (Überschuss)	350, (50-fach)	350, (50-fach)	70, (10-fach)	70, (10-fach)	22, (3-fach)	22; (3-fach)	22; (3-fach)	22; (3-fach)
NaOAc [mg], (Überschuss)	150, 100-fach	150, 100-fach	740, 50-fach	740, 50-fach	740, 50-fach	740, 50-fach	15; 10-fach	15; 10-fach
Reaktionszeit [min]	90	60	120	30	120	ü.N.	10	5
Ausbeute (Fe^(III)Phe a)Cl [%]	0	50	40	60	40	25	50	60

Tab. C-2: Getestete Reaktionsbedingungen für die Metallierung von Phe a mit (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, Die Spalte Rkt. 8 zeigt die Bedingungen für die optimierte Metallierung.

Variiert wurden zur Optimierung der Metallierungsreaktion der Fe-Überschuss, die Temperatur, die Reaktionszeit und die Konzentrationen. Bei der Verwendung eines 50-fachen molaren Fe-Überschusses kommt es bei Raumtemperatur zu keiner feststellbaren Reaktion, erhitzt man die Reaktionslösung auf 100°C, kommt es zwar zur Umsetzung des Phe a, aber nur bis zu einem Umsatz von 50 %, bei weiterer Reaktionsdauer setzt sich kein weiteres Phe a um, und gleichzeitig wird das entstandene (Fe^(III)Phe a)Cl zu nicht näher analysierten Abbauprodukten zersetzt. Bei einem 10-fachen Überschuss fängt das Phe a bei 60 °C an, sich zum (Fe^(III)Phe a)Cl umzusetzen, allerdings verläuft die Reaktion auch hier nur bis zu einem Umsatz von 40 - 60 %. Bei längerer Reaktionsdauer zersetzt sich auch hier das entstandene (Fe^(III)Phe a)Cl. Bei einem 3-fachen Überschuss an (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ beginnt die Reaktion bereits bei 45 °C, die Ausbeute liegt abhängig von der Reaktionsdauer nur zwischen 25 und 40 %. Die Pigmentkonzentration bei diesen Reaktionen lag zwischen 0,8 und 1,2 mM.

Um mit höher konzentrierten Lösungen arbeiten zu können, wird das Phe a wegen seiner geringen Löslichkeit in Essigsäure (AcOH) in Pyridin gelöst. Die Salze sind in Pyridin allerdings schlecht löslich, so dass diese in AcOH vorgelegt werden und die Phe a-Pyridin-Lösung nach dem Erhitzen der AcOH auf die Reaktionstemperatur zugegeben wird. Durch das Arbeiten in konzentrierter Lösung kann der Fe-Überschuss auf die 3-fache molare

Menge des Phe *a* reduziert werden und man erhält das $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$ in einer Ausbeute von 60 % (Tab. C-2).

1.2.4 Metallierung von Bakteriochlorinen

Metallierung mit FeCl_2 :

Zur Einlagerung von Eisen in BPhe *a* wurde zuerst die direkte Metallierung mit der Acetat-Methode versucht, da eine direkte Einlagerung einer zweistufigen Synthese hinsichtlich Aufwand und Ausbeute vorzuziehen ist. Allerdings gelang Hartwich et al. die Metallierung von BChl-Derivaten meist nur über den Cd-Komplex [Hartwich et al., 1998].

Die Reaktion erfolgt nach dem leicht modifizierten, oben beschriebenen Pyridin-Acetat-Verfahren (Gl. C-1, Abb. C-5), die getesteten Reaktionsbedingungen finden sich in Tab. C-3. Die entwickelte Methode lässt sich mit BPhe *a* und seinen Derivaten, wie Bakteriopheophorbid α -17³-methylester (Me-BPheid *a*), Bakteriopheophorbid *a* (BPheid *a*) oder 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophytin *a* ([3-Vinyl]-BPhe *a*) durchführen.

Die Metallsalze FeCl_2 , NaOAc , $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ und Na-Ascorbat (als Oxidationsschutz) werden in Eisessig vorgelegt; nach Erhitzen der Lösung auf die Reaktionstemperatur von 90-100°C wird das Pigment, gelöst in Pyridin zugegeben.

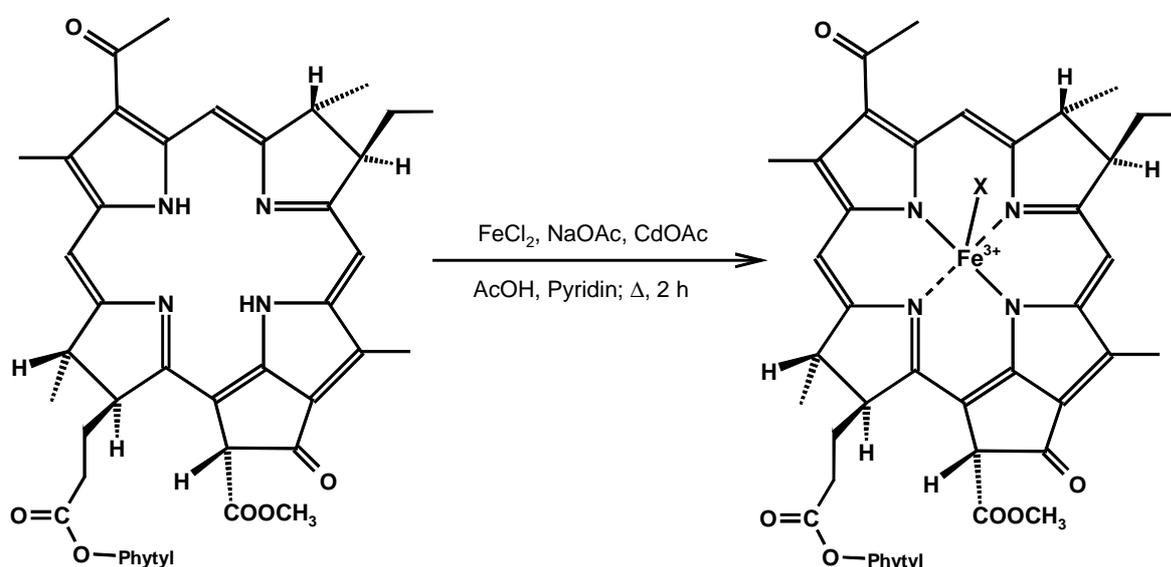


Abb. C-5: Metallierung von Bakteriopheophytin *a* (BPhe *a*) mit Eisen nach der Acetat-Methode.

	Rkt. 1	Rkt. 2	Rkt. 3	Rkt. 4	Rkt. 5	Rkt. 6	Rkt. 7
Pigmentmenge [ODml]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Pigmentkonzentration [mM]	0,5	0,6	0,4	0,75	0,4	0,9	0,9
AcOH/Pyr [ml]	27/1	24/1	37/1	20/3	38/2	15/1	15/1
Temp [°C]	100	100	100	100	100	100	100
FeCl₂ [mg], (Überschuss)	1500, (500-fach)	1000, (340-fach)	1500, (500-fach)	1780, (600-fach)	2380, (800-fach)	1500, (500-fach)	1500, (500-fach)
FeCl₂-Konzentration [mM]	270	200	200	400	300	500	500
NaOAc [mg], (Überschuss)	1200, (1000-fach)	980, (800-fach)	150, (120-fach)	120, (100-fach)	160, (130-fach)	120, (100-fach)	120; (100-fach)
NaOAc-Konzentration [mM]	530	480	50	70	50	100	100
Cd(OAc)₂ [mg], (Überschuss)	-	-	-	-	-	-	128; (50-fach)
Reaktionszeit [min]	80 min	30 min	30	30 min	30 min	50 min	30 min
Ausbeute (Fe^(III)BPhe a)Cl [%]	1	14	30	60	55	62	71

Tab. C-3: Getestete Reaktionsbedingungen für die Metallierung von BPhe a mit FeCl₂. Die Spalte Rkt. 7 zeigt die Bedingungen für die optimierte Metallierung.

Zur Metallierung wurde FeCl_2 , in einem sehr hohen Überschuss (500- bis 800-fach) bezogen auf die eingesetzte Pigmentmenge eingesetzt. Bei der eingesetzten Fe-Menge muss sowohl der Überschuss relativ zum Pigment, als auch die Konzentration betrachtet werden. Durch eine Erhöhung der Metallionenkonzentration wird die Reaktionszeit stark verkürzt und die Ausbeute erhöht, so dass mit einer Konzentration von FeCl_2 von 0,3 bis 0,5 M eine Ausbeute von bis zu 70 % bei einer Reaktionszeit von 30 min erzielt wurde. Bei einer FeCl_2 -Konzentration unterhalb von 0,2 M und einer Reaktionszeit von 30 min liegt die Ausbeute dagegen unterhalb von 30 %. Die NaOAc-Konzentration muss nicht so hoch sein, wie die des FeCl_2 . Für die Reaktion, d.h. die Deprotonierung der Stickstoffe, reicht eine Konzentration von 50 bis 100 mM aus, was unter den gegebenen Bedingungen einem Überschuss von 100 bis 130-fach relativ zur eingesetzten Pigmentmenge entspricht. Das $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ wird in einem 50-fachen Überschuss bezogen auf die Pigmentmenge eingesetzt. Die Reaktion findet auch ohne Zugabe von $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ statt, allerdings wird die Reaktionsdauer mit $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ von 50 min auf 30 min unter sonst identischen Bedingungen gesenkt.

Ungewünschte Nebenprodukte werden durch das Arbeiten unter Schutzgas und die Zugabe von Na-Ascorbat in die Reaktionslösung verhindert. Ohne Zugabe von Na-Ascorbat findet rasch eine Oxidation des BPhe a zum [3-Acetyl]-Phe a statt, obwohl unter reduktiven Bedingungen gearbeitet wird, da das eingesetzte Fe(II) während der Reaktion zu Fe(III) oxidiert und so als Reduktionsmittel wirkt. Analog zu der Metallierung von Phe a (Kap. C-1.2.3) entsteht das $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Bakteriopheopytin a})\text{Chlorid}$ ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})\text{Cl}$) bzw. $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Bakteriopheopytin a})\text{Acetat}$ ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})\text{OAc}$).

Optimierung für die Insertion von ^{57}Fe

Die Reaktionsbedingungen für die Optimierung der Metallierung von BPhe a finden sich in Tab. C-4. Für die Metallierung des BPhe a mit Mohrschem Salz wurde von den optimalen Reaktionsbedingungen für Phe a ausgegangen, d.h. mit möglichst konzentrierten Lösung und Zugabe der BPhe a-Pyridin-Lösung bei der jeweiligen Reaktionstemperatur. Variiert wurden Salzüberschuss und Konzentration. Mit einem 5-, 10- oder 25-fachen Überschuss an $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ wird das BPhe a nicht metalliert, erst ab einem 50-fachen Überschuss gelingt die Metallierung. Eine Zugabe von $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ bewirkt im Gegensatz zur Metallierung des BPhe a mit FeCl_2 (siehe oben) keine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit oder höhere Ausbeute und wurde deshalb nicht eingesetzt.

	Rkt. 1	Rkt. 2	Rkt. 3	Rkt. 4	Rkt. 5	Rkt. 6	Rkt. 7
Pigmentmenge [ODml]	500	500	500	500	500	500	1000
Pigmentkonzentration [mM]	2,5	1,2	1,2	1,1	1,5	1,5	3
AcOH/Pyr [ml]	2/1	5/1	5/1	6/1	3/2	4/1	4/1
Temp [°C]	110	110	110	110	110	110	110
(NH₄)₂Fe(SO₄)₂ [mg], (Überschuss)	15, 5-fach	30, 10-fach	70, 25-fach	145, 50-fach	145, 50-fach	190, 100-fach	290; 50-fach
(NH₄)₂Fe(SO₄)₂-Konzentration [mM]	12	12	30	50	75	150	150
NaOAc [mg], (Überschuss)	15, 25-fach	30, 50-fach	30, 50-fach	30, 50-fach	30, 50-fach	30, 50-fach	60; 50-fach
Reaktionszeit [min]	180	45	60	120	120	120	120
Ausbeute (Fe^(III)BPhe a)Cl [%]	-	-	-	3	18	70	35

Tab. C-4: Getestete Reaktionsbedingungen für die Metallierung von BPhe a mit (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, Reaktion 6 entspricht den Bedingungen für die optimierte Metallierung.

Durch eine Erhöhung der Konzentration des (NH₄)Fe(SO₄)₂ (50-facher Überschuss) in AcOH von 60 mM auf 130 mM konnte nach der Reaktion mit einer 3,7 mM BPhe a-Pyridin-Lösung die Ausbeute von 3 auf 18 % gesteigert werden, bei Zugabe einer 10 mM BPhe a-Pyridin-Lösung zu einer 130 mM-(NH₄)Fe(SO₄)₂-AcOH-Lösung erhöht sich die Ausbeute weiter auf 35 % (Tab. C-4). Bei einem 100-fachen Überschuss an (NH₄)Fe(SO₄)₂ bei gleicher Konzentration kann die Ausbeute noch verdoppelt werden.

Da überschüssig eingesetzte ⁵⁷Fe wieder zurückgewonnen werden kann, bietet es sich für die Reaktion mit dem teuren ⁵⁷Fe an, mit einem 100-fachen Überschuss zu arbeiten, der die doppelte Ausbeute liefert als ein 50-facher Überschuss.

1.2.5 Diskussion

Zum Vergleich der verschiedenen Metallierungsreaktionen von Phe a und BPhe a mit FeCl₂ bzw. Mohrschem Salz wurden die optimierten Reaktionsbedingungen in Tab. C-5 noch mal zusammengefasst. Verglichen mit der Metallierung mit FeCl₂ konnte der Fe-Überschuss der Reaktion mit Mohrschem Salz bei Phe a von 50-fach auf 3-fach reduziert werden, beim BPhe a von 500- auf 50-fach, d.h. im Fall des Phe a auf 6 % des ursprünglichen Überschusses, bei BPhe a auf 10 %.

Pigment	Fe-Phe	⁵⁷ Fe-Phe	Fe-BPhe	⁵⁷ FeBPhe
Pigmentmenge [ODml]	1000	1000	1000	1000
Pigmentkonzentration [mM]	0,9	2,6	0,9	3
AcOH/Pyr [ml]	20/-	5/2	15 /1	4/1
Temp [°C]	RT	110	100	110
FeCl₂ [mg], (Überschuss)	180; (50-fach)	-	1500; (500-fach)	-
(NH₄)₂Fe(SO₄)₂ [mg] (Überschuss)	-	22 mg; (3-fach)	-	290; (50-fach)
NaOAc [mg]; (Überschuss)	150; (100-fach)	15 mg; (10-fach)	123; (100-fach)	61; (50-fach)
Cd(OAc)₂ [mg]; (Überschuss)	-	-	128; (50-fach)	-
Zeit [min]	2h	5 min	30 min	2h
Ausbeute Fe-Komplex [%]	86	60	71	35

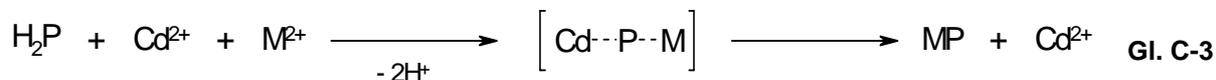
Tab. C-5: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Metallierung von Phe a und BPhe a mit Eisen unter Verwendung von FeCl₂ bzw. (NH₄)₂Fe(SO₄)₂.

Vergleicht man die hier entwickelte neue Metallierungsmethode von Phe a FeCl₂ mit den unter Kap. C-1.2.3 beschriebenen, literaturbekannten Synthesen, sieht man, dass die Reaktion mit FeCl₂ unter weniger aggressiven Bedingungen abläuft, als bei Einsatz von FeCl₃ [Urumov, 1975], da letztere Methode Temperaturen von 110 °C benötigt. Erstere läuft schon bei Raumtemperatur ab, wodurch eine Verseifung des Phetyl-Restes oder andere Nebenreaktionen verhindert werden können. Die Synthese von Furuya et al. [Furuya et al., 1987] in MeOH ist nur auf Phe a anwendbar, nicht jedoch auf Phe b, dagegen lassen sich mit der hier entwickelten Methode beide Pigmente und diverse Derivate metallieren (nicht beschrieben), wodurch diese Methode universeller einsetzbar ist.

Für die Metallierung von BPhe a mit FeCl₂ benötigt man einen höheren Eisenüberschuss, da die Bakteriochlorine weniger reaktiv sind als die Chlorine. Der gleiche Effekt tritt bei der Darstellung von Zn-BPhe a im Vergleich mit Zn-Phe a auf, die beide ebenfalls mit der Acetat-Methode synthetisiert werden können [Hartwich et al., 1998; Urumov, 1975]. Außerdem konnte die Reaktion durch Zugabe von Cd(OAc)₂ beschleunigt werden.

Cd²⁺ hat bei den Metallierungsreaktionen einen katalytischen Effekt [Hartwich et al., 1998; Urumov, 1975; Strell und Urumow, 1977]. Die Bildung des Cd²⁺-Komplexes ist kinetisch begünstigt, andererseits ist er thermodynamisch instabil. Aufgrund des größeren Ionenradius (Cd²⁺: 95 pm, Mg²⁺: 72 pm, Fe²⁺: 78 pm, Fe³⁺: 65 pm) sitzt das Cd²⁺ nicht in der Porphyrin-Ebene, sondern darüber und bildet so einen „sitting atop“-Komplex [Hartwich et al., 1998;

Hambright, 1975]. Aufgrund der Instabilität des Cd^{2+} -Komplexes gehen die Cd-Porphyrin-, Cd-Chlorin- und Cd-Bakteriochlorin-Komplexe Metallaustauschreaktionen (Gl. C-2, Gl. C-3) unter Bildung einer Zwischenstufe $[\text{Cd} - \text{P} - \text{M}]$ ein (Kap. C-1.2.1).



H_2P = Porphyrin, Phe a oder BPhe a; M^{2+} = Metallkation; X^- = Anion wie Chlorid oder Acetat

Die Cd^{2+} -Komplexe können entweder nach der Synthese isoliert werden [Hartwich, 1994], oder *in situ* weiter umgesetzt werden [Urumov, 1975; Strell und Urumow, 1977]. Die hier erfolgreich verwendete Katalyse mit $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ in AcOH durch Senken der Reaktionsdauer wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Cd^{2+} -Komplexe der (Bakterio-)Chlorophylle sind äußerst säureempfindlich, dennoch ist aufgrund der beobachteten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit die Bildung eines „sitting atop“-Komplexes nicht auszuschließen, er ist aber wohl, da die Reaktion in Säure stattfindet, nur sehr kurzlebig und kann spektroskopisch während der Reaktion nicht nachgewiesen werden.

Dagegen konnte bei der Metallierung von BPhe a mit $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ kein katalytischer Effekt des $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ festgestellt werden. Bei der Metallierung von Phe a mit $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ scheint es, dass bei einem größeren Überschuss (10- bis 50-fach) an Fe-Salz das Produkt bei längerer Reaktionszeit degradiert, was beim Einsatz von FeCl_2 nicht festgestellt werden konnte. Beim BPhe a tritt dieser Effekt bei einem 50- bis 100-fachen Überschuss nicht auf, ein höherer Fe-Überschuss wurde mangels Materials nicht getestet.

1.2.6 Chromatographie

Für die Chromatographie von (Bakterio-)Chlorophyll-Derivaten haben sich drei Systeme bewährt: i) Kieselgel als stationäre Phase mit Toluol/MeOH als Laufmittel, ii) C-18-RP als stationäre Phase mit MeOH/Puffer als Laufmittel [Hartwich, 1994; Kamhuber, 1999] und iii) Sepharose-Cl-6B als stationäre Phase mit Hexan/iso-Propanol (iProp) als mobile Phase [Struck, 1990].

Eine oft verwendete stationäre Phase für Fe-Porphyrin-Derivate ist Aluminiumoxid [Alben et al., 1968; Buchler und Schneehage, 1973], das dem Kieselgel sehr ähnlich, dessen Aktivität aber durch Zugabe von Wasser einstellbar ist.

Furuya et al. [Furuya et al., 1987] konnten Fe-Phe a und b über HPLC gut trennen, indem sie ein RP-18-Material und Aceton/Acetonitril/TMAC (Tetramethylammoniumchlorid) als

Laufmittel verwendeten. Sie stellten fest, dass das sonst beobachtete Tailing durch eine hohe Konzentration an TMAC (1-10 mM) eingeschränkt werden kann. TMAC verhindert die Dissoziation des Chlorid-Ions von $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)\text{Cl}$. Eine Dissoziation des Chlorid-Ions würde bewirken, dass das resultierende Kation $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)^+$ von den freien Silanol-Gruppen der stationären Phase durch Ionenaustauschwechselwirkungen zurückgehalten wird, was das Tailing verursacht.

Diese Systeme wurden auf ihre Trennleistung mit $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$ getestet. Die Problematik der analytischen Dünnschicht- und präparativen Säulen-Chromatographie besteht darin, dass die $\text{Fe}^{(\text{III})}$ -Komplexe in methanolischer, alkalischer und wässriger Lösung zur Dimerisierung unter Bildung von μ -oxo-Komplexen neigen (vgl. Kap. C-1.3.1.1, Kap. C-1.3.1.2), und dass sie sich durch eine hohe Affinität zu freien Sauerstoffgruppen an der stationären Phase auszeichnen, so dass für eine erfolgreiche Aufreinigung entscheidend ist, die Dimerisierung und die Bindung an die freien Sauerstoffgruppen zu verhindern.

Für die $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$ erwiesen sich die oben genannten Systeme als ungeeignet. Bei Kieselgel und Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe III) binden die Pigmente wegen der hohen Affinität des Fe-Zentralmetalls zu den Sauerstoffgruppen des Adsorbens zu stark an die stationäre Phase und können selbst mit erhöhter Polarität des Laufmittels (Aceton oder MeOH) nicht eluiert werden. Erst nach Zugabe von Säure laufen die Fe-Komplexe auf Kieselgel bzw. Aluminiumoxid. Um die Bindung des Eisens an das Kieselgel zu unterbinden, wurde Pyridin zugegeben, das durch axiale Koordination am Eisen die Koordinationssphäre absättigen sollte. Die Affinität zum Kieselgel ist aber stärker als die Bindung des Pyridin-Liganden, so dass dies nicht zum gewünschten Erfolg führte. Ähnlich verhält sich das $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$ auf Sepharose-Cl-6B, die Affinität zu den Hydroxidgruppen der stationären Phase ist hier aber nicht so ausgeprägt wie auf Kieselgel, so dass sich die Pigmente mit Hexan/iProp als mobiler Phase zwar eluieren lassen, es aber zu einem starken Tailing der Fe-Bande und, infolge des zugesetzten Alkohols im Laufmittel, teilweise zu einer Dimerisierung zum μ -oxo-Komplex kommt. Mit diesem System ist also auch keine Aufreinigung $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$ möglich.

Das RP-System für (Bakterio)Chlorophylle eignet sich für die Aufreinigung von $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$ ebenfalls nicht, da das übliche Laufmittel MeOH eine teilweise Dimerisierung des $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$ zum μ -oxo-Komplex $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)_2\text{O}$ bewirkt. Dies führt zu einem starken Tailing der Fe-Bande und Nebenprodukte können nicht abgetrennt werden.

Bei dem von Furuya et al. entwickelte RP-System mit Aceton/Acetonitril/TMAC als mobiler Phase trat unter unseren Laborbedingungen bei der HPLC und Säulenchromatographie trotz

der hohen TMAC-Konzentration starkes Tailing auf. Möglicherweise enthalten die verwendeten RP-Säulenmaterialien mehr freie Silanol-Gruppen als das in der Literatur verwendete Material. Die Umgehung dieses Effekts durch weitere Erhöhung der TMAC-Konzentration ist nicht möglich, da eine Konzentration von 10 mM bereits an der Löslichkeitsgrenze liegt. Bei der HPLC-Säule kam es infolge der hohen TMAC-Konzentration sehr schnell zu hohen Drücken, da das Salz die Poren der Fritte der Vorsäule verstopft. Außerdem lassen sich mit diesem System (stationäre Phase: C-18; mobile Phase: Aceton / Acetonitril / TMAC) auch andere Fe-(B)Chl-Derivate, wie der Methyl-Ester ((Fe^(III)Me-Pheid a)Cl) oder die freie Säure ((Fe^(III)Pheid a)Cl) nicht aufreinigen. Diese Derivate sind polarer als die mit Phytol veresterten, dadurch ist die Retentionszeit unter gleichen Bedingungen zu kurz und die Derivate laufen mit der LM-Front und können mit dieser Lösungsmittelmischung nicht getrennt werden. Eine Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit könnte nur durch eine Erhöhung der Polarität des Laufmittels erreicht werden. Da aber polare Laufmittel wie Methanol oder Wasser bzw. Puffer zur Bildung von μ -oxo-Komplexen führen, sind sie nicht praktikabel.

Aus den genannten Gründen ist auch die Auftrennung mittels analytischer Dünnschichtchromatographie (DC) nur begrenzt möglich. Zur Reaktionskontrolle, lassen sich die Fe-(B)Chl-Derivate auf RP mit Aceton/Acetonitril auf eine vollständige Umsetzung überprüfen. Die Phytol-veresterten Derivate laufen allerdings kurz hinter der LM-Front, so dass eventuell entstandene Fe-komplexierte Nebenprodukte vermutlich nicht detektiert werden können.

Die besten Ergebnisse bei der Chromatographie der Fe-(B)Chl-Derivate wurden mit Kieselgel als stationärer Phase und einer schwach sauren mobilen Phase erzielt. Als optimales Laufmittel hat sich eine Mischung aus CHCl₃ und 0,005 % konz. HCl erwiesen. Durch die Säurewirkung der HCl wird die Bildung des μ -oxo-Komplexes verhindert, und durch die Anwesenheit von freien, überschüssigen Chlorid-Ionen wird eine Bindung der Fe-(B)Chl-Derivate an das Kieselgel verhindert. Das Fe-(B)Chl läuft so in einer klar definierten Bande und kann gut vom Edukt abgetrennt werden. Die Retentionszeit wird bei der Chromatographie von Derivaten, wie (Bakterio-)Pheophorbid a oder (Bakterio-)Pheophorbid a-methylester durch Zugabe von Aceton eingestellt. Das Nebenprodukt Fe-3-Devinyl-3-acetyl-pheophytin a (Fe-[3-Acetyl]-Phe a), ein Oxidationsprodukt des Fe-BPhe a, ist in seinem Laufverhalten dem Fe-BPhe sehr ähnlich, es läuft wegen seiner geringeren Polarität ein wenig schneller, so dass es mit diesem System vom Fe-BPhe a abgetrennt werden kann. Die Methode eignet sich allerdings nur für geringe Mengen Oxidationsprodukt (Fe-[3-Acetyl]-Phe a), da sonst zu viel Fe-BPhe a verloren geht. Da der μ -oxo-Komplex die

gleiche Laufgeschwindigkeit wie das Edukt (B)Phe a hat, wird durch Lösen im sauren Laufmittel gewährleistet, dass das $(\text{Fe}^{\text{III}})(\text{B})\text{Phe a})\text{Cl}$ bereits beim Auftragen monomer vorliegt.

1.2.7 Massenspektren

$(\text{Fe}^{\text{III}})\text{Phe a})\text{Cl}$ und $(\text{Fe}^{\text{III}})\text{BPhe a})\text{Cl}$ verhalten sich im Massenspektrum bezüglich Fragmentierungsreaktionen und Adduktbildung identisch, deshalb wird hier nur das Massenspektrum von $(\text{Fe}^{\text{III}})\text{BPhe a})\text{Cl}$ näher erläutert.

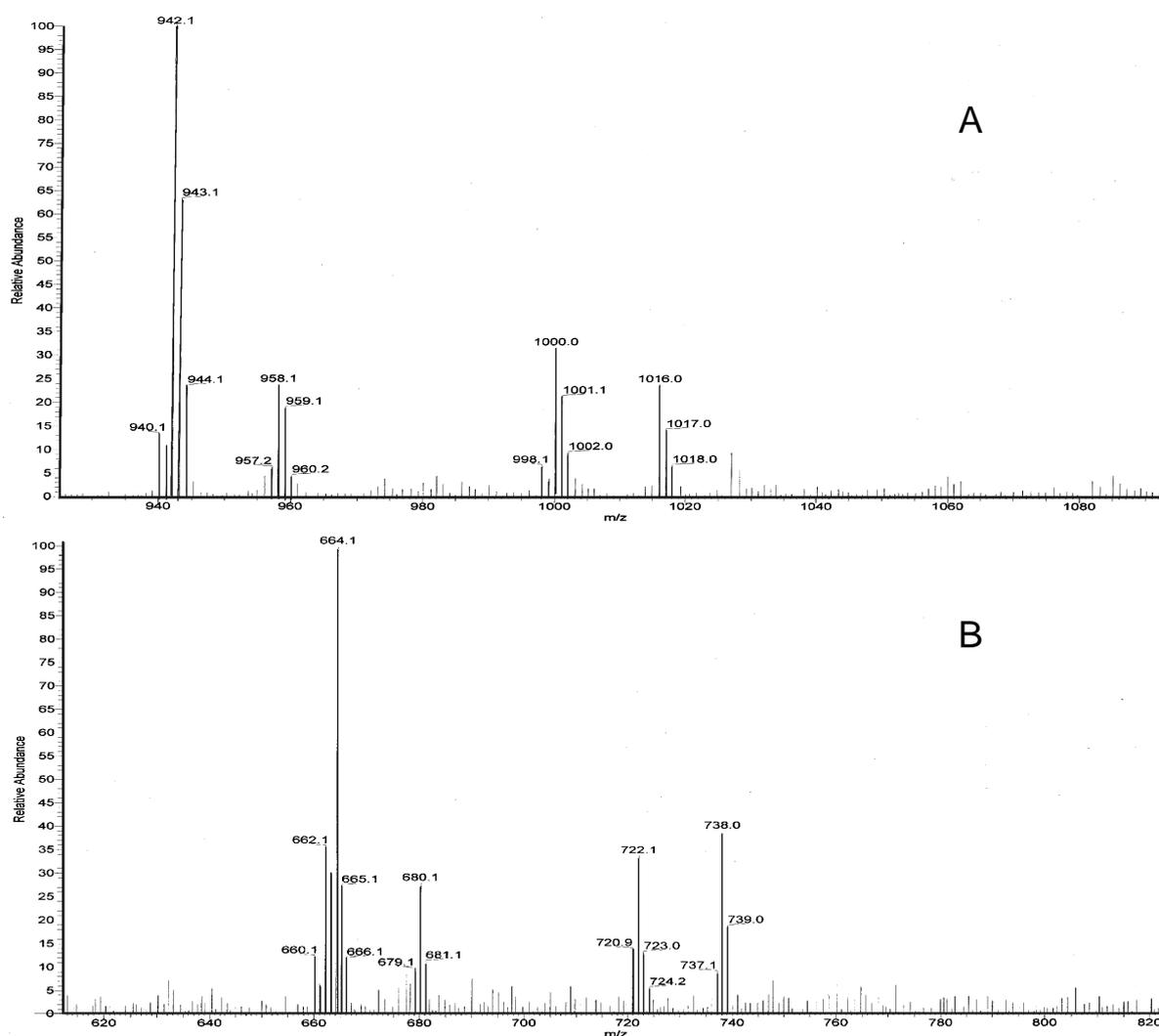


Abb. C-6: ESI-Massenspektrum des $(\text{Fe}^{\text{III}})\text{BPhe a})\text{Cl}$, $[\text{FeC}_{55}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_6]$; MW = 942] A: Ausschnitt von m/z = 920 – 1100, B: Ausschnitt von m/z = 610 - 820

Das Spektrum zeigt den erwarteten monoisotopischen (^{56}Fe) Massenpeak des $(\text{Fe}^{\text{III}})\text{BPhe a})\text{Cl}$ von m/z = 942 $[\text{FeC}_{55}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_6]$; MW = 942] (Abb. C-6 A). Der Fe-Komplex ist einfach positiv geladen, da das Fe im Komplex dreiwertig vorliegt und nur zwei Ladungen vom BPhe^{2-} ausgeglichen werden. In Lösung wird die positive Ladung von einem Gegenion

ausgeglichen, je nach Präparation ist dies Cl^- oder AcO^- , das aber im Massenspektrum nicht detektiert werden konnte. Um eine Masseneinheit höher bei $943 \text{ amu}^{[6]}$ (Abb. C-6 A) liegt das ^{13}C -Isotop des $(\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ mit einer relativen Intensität von 60 %, was der statistischen Häufigkeit des ^{13}C entspricht.

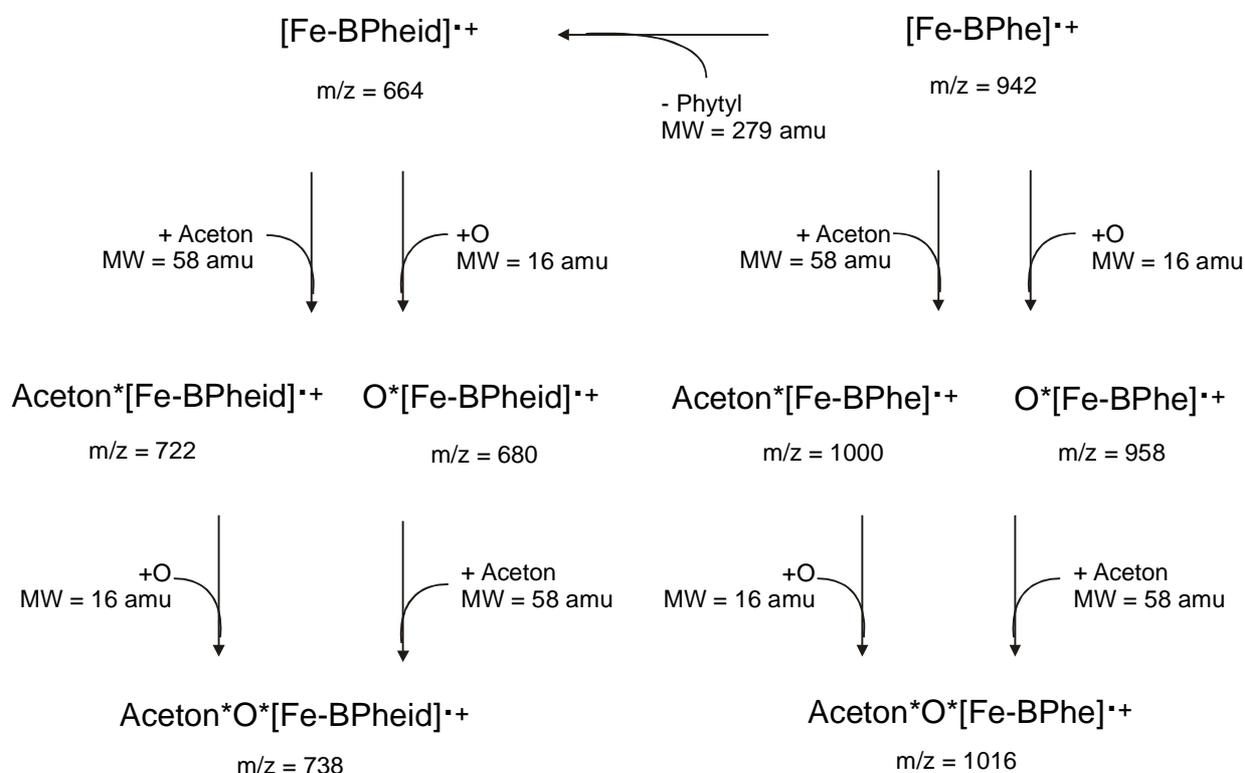


Abb. C-7: Entstehung der Hauptpeaks des ESI-Massenspektrums von $(\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a)\text{Cl}$.

Bei der Ionisation fragmentiert das $(\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a)\text{Cl}$, der Phytylrest $\text{C}_{20}\text{H}_{39}$ mit einer Molekülmasse von 279 amu wird unter Bildung des $\text{Fe}^{(III)}\text{BPheid } a$ abgespalten und liefert einen Massenpeak bei $m/z = 664$ (Abb. C-6; Abb. C-7). Auch hier erscheint der Isotopenpeak bei einer Masseneinheit höher bei $m/z = 665$ mit einer relativen Intensität von 25 %. Zusätzlich erscheinen Peaks bei höheren Massen als dem $(\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ ($m/z = 942$), die Sauerstoff-Addukten zuzuordnen sind. Solche Sauerstoff-Addukte ($\text{M}^{\bullet+} + \text{O}$) sind bereits für andere metallierte (Bakterio-)Chlorophylle $[\text{M}]\text{-BChl}$ in „Electron Spray Ionisation“-Massenspektren (ESI) beobachtet worden [Kammhuber, 1999]. Das Addukt des $\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a$ mit Sauerstoff ($\text{Fe-BPhe}^*\text{O}$ -Addukt) erscheint bei $m/z = 958$ (27 %) ($\text{M}^{\bullet+} + 16 \text{ amu}$). Außer mit Sauerstoff bilden sich Addukte mit Aceton (58 amu) ($\text{Fe-BPhe}^*\text{Aceton}$ -Addukt), das als Injektionslösungsmittel verwendet wurde, mit einem Massenpeak von $m/z = 1000$ ($\text{M}^{\bullet+} + 58$

^[6] 1 amu (engl. atomic mass unit) ist eine Atommassenkonstante und entspricht 1/12 der Masse eines ^{12}C -Atoms [Hesse et al., 1991]

amu) und einem Fe-BPhe*O*Aceton-Addukt $m/z = 1016$ ($M^{*+} + 16$ amu + 58 amu). Beim Fe-BPheid-Fragment erscheinen entsprechende Massenpeaks, die mit einer Anlagerung von Sauerstoff und/oder Aceton zu erklären sind: Fe-BPheid*O-Addukt ($m/z = 680$; $M^{*+} + 16$ amu), Fe-BPheid*Aceton-Addukt ($m/z = 722$; $M^{*+} + 58$ amu) und Fe-BPheid*Aceton*O-Addukt ($m/z = 738$; $M^{*+} + 16$ amu + 58 amu) (Abb. C-7).

In geringem Maß erscheinen im Massenspektrum das μ -oxo-Dimer bei einem Massenpeak von $m/z = 1900$ (nicht gezeigt), das der zweifachen Masse des Fe-BPhe + Sauerstoff ($[\text{Fe-BPhe}]_2\text{O}]^{*+}$) (Abb. C-8) entspricht und der Dihydroxokomplex ($[\text{Fe-BPhe}]_2(\text{OH})_2]^{*+}$) (Abb. C-9) ($m/z = 1917$) (vgl. Kap.1.3.1.1). Die Intensität dieser Peaks ist davon abhängig, auf welcher Seite das Gleichgewicht beim Lösen der Probe im Injektionslösungsmittel Aceton liegt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich der μ -oxo-Komplex nicht während der Messung bildet, sondern schon vorher als solcher vorliegt. Ein weiterer Hinweis dafür ist das Fehlen des μ -oxo-Fe-BPheid, dem μ -oxo-Komplex des Fragmentierungsprodukts von Fe-BPhe.

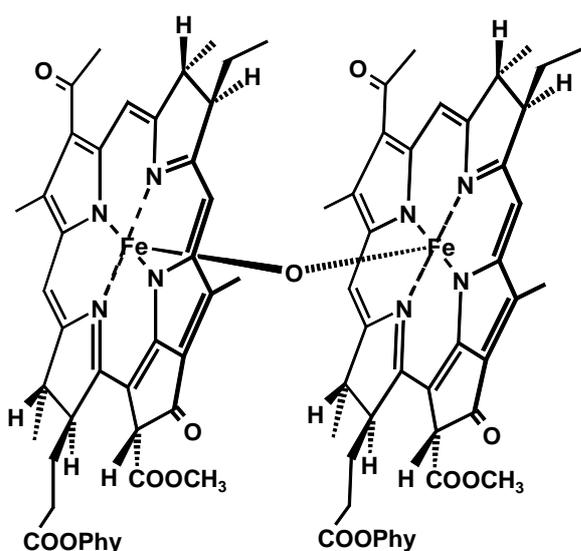


Abb. C-8: Schematische Darstellung^[7] des μ -oxo-Fe-BPhe a; $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe})_2\text{O}$

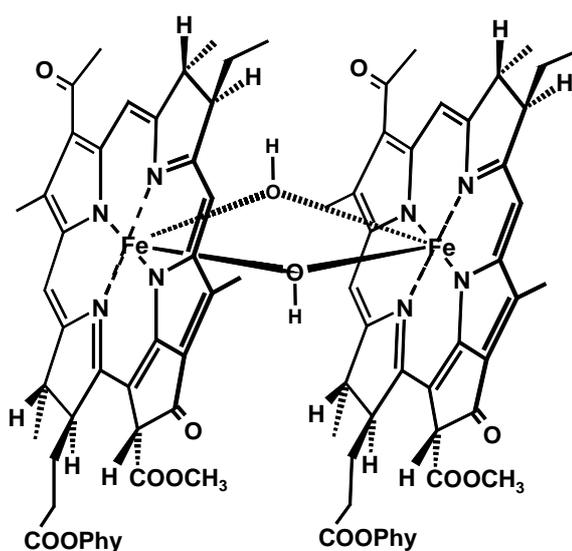


Abb. C-9: Schematische Darstellung des Dihydroxo-Komplexes von Fe-BPhe a; $\text{Fe-BPhe})_2(\text{OH})_2$

^[7] Aufgrund der Asymmetrie des BPhe a sind unterschiedliche Anordnungen der Pigmente zueinander möglich (top/top, top/bottom, bottom/bottom), außerdem eine Rotation um die Fe-O-Fe-Bindung und eine Änderung der N-Fe-O- und Fe-O-Fe-Winkel.

1.2.8 Absorptionsspektrum

Abb. C-10 zeigt die Absorptionsspektren des monomeren $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)\text{Cl}$ und des μ -oxo-Fe-Pheophytin a ($(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)_2\text{O}$) in Diethylether im Vergleich mit dem Absorptionsspektrum des Phe a . Die Soret-Bande des monomeren $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)\text{Cl}$ liegt bei 383 nm, die Q_y -Bande bei 620 nm. Relativ zum Phe a ist die Soret-Bande um 25 nm (1600 cm^{-1}) und die Q_y -Bande um 47 nm (1136 cm^{-1}) hypsochrom verschoben. Die Soret-Bande ist wie bei den meisten Chl-Derivaten nicht in die B_x - und B_y -Banden aufgespalten und die Q_x -Bande ist nicht aufgelöst. Zusätzlich tritt eine sehr langwellige Bande von geringer Intensität bei 765 nm auf (siehe unten). Die Soret-Bande des μ -oxo-Komplexes $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)_2\text{O}$ ist ausgehend vom $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)\text{Cl}$ bathochrom um 9 nm (599 cm^{-1}) verschoben, ist leicht in B_y und B_x aufgespalten und liegt bei 318 und 392 nm, die Q_y -Bande shiftet um 70 nm (1636 cm^{-1}) von 620 auf 690 nm.

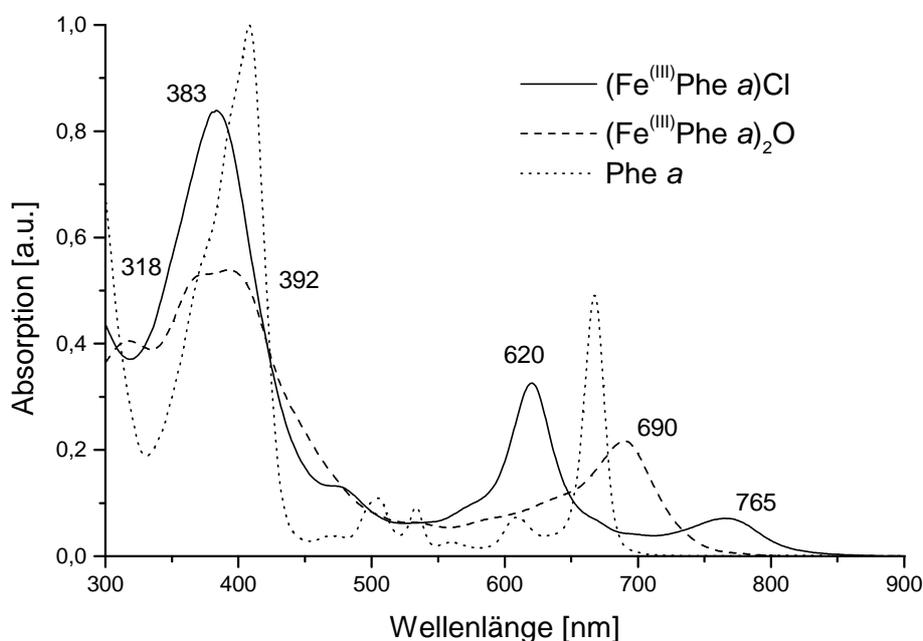


Abb. C-10: Absorptionsspektrum von Phe a (· · · ·), $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)\text{Cl}$ als Monomer (—) und als μ -oxo-Dimer $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)_2\text{O}$ (- - -) in Diethylether; Phe a wurde in der Soret-Bande auf 1 normiert; die Intensitäten des $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)\text{Cl}$ und $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)_2\text{O}$ wurden entsprechend ihrer Extinktionskoeffizienten (Kap. F-4) auf die Menge an Phe a normiert.

Abb. C-11 zeigt die Absorptionsspektren von monomerem $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ und von μ -oxo-Fe-Bakteriopheophytin a ($(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)_2\text{O}$) in Diethylether. Die elektronischen Übergänge des monomeren $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ im Soret-Bereich liegen bei 338 (B_y -Bande) und 387 nm (B_x -Bande), die Q_x -Bande bei 523 nm und die Q_y -Bande bei 744 nm und sind somit um 19 (1575 cm^{-1} , B_y), 3 nm (201 cm^{-1} , B_x) und 6 nm (107 cm^{-1} , Q_y) hypsochrom zum BPhe a verschoben. Zusätzlich tritt eine sehr langwellige Bande bei 1007 nm auf (siehe unten). Die Soret-Banden des μ -oxo-Komplexes $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)_2\text{O}$ sind geringfügig hypsochrom um 5 nm (444 cm^{-1} , B_y) und 2 nm (134 cm^{-1} , B_x) verschoben und liegen somit bei 333 nm und 385 nm,

die Q_x - und Q_y -Bande sind um 69 nm (2228 cm^{-1}) bzw. 83 nm (1349 cm^{-1}) rotverschoben (592 nm bzw. 827 nm).

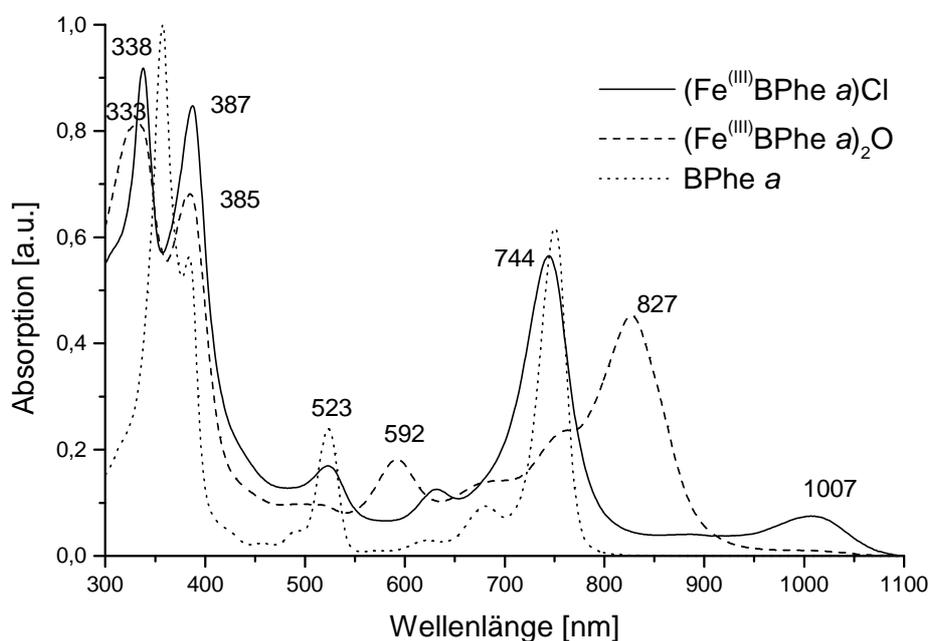


Abb. C-11: Absorptionsspektrum von BPhe a (· · · ·), $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})\text{Cl}$ als Monomer (—) und als μ -oxo-Dimer $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})_2\text{O}$ (- - -) in Diethylether; BPhe a wurde in der Soret-Bande auf 1 normiert; die Intensitäten des $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})\text{Cl}$ und $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})_2\text{O}$ wurden entsprechend ihrer Extinktionskoeffizienten (Kap. F-4) auf die Menge an BPhe a normiert.

In beiden monomeren Fe-Komplexen $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe a})\text{Cl}$ und $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})\text{Cl}$ ist die Q_y -Bande im Vergleich zum (B)Phe a kurzwellig verschoben, dieser Effekt ist beim Chlorin größer als beim Bakteriochlorin. Allgemein werden alle Banden breiter, was einen niedrigeren Extinktionskoeffizienten bewirkt, und es tritt eine zusätzliche niederenergetische Bande auf, die bei anderen M-(B)Phe bisher nicht beobachtet wurde.

Anhand der Elektronendichteverteilung der einzelnen Molekülorbitale (MO) (Kap. A) ist zu erwarten, dass der Einfluss des Metallions auf das a_{2u} -Orbital am größten ist, da dies die höchste Elektronendichte in der Nähe des Zentralions besitzt. Dieses wird energetisch abgesenkt, wodurch die damit verbundenen Übergangsenergien von Q_x und B_y des monomeren $(\text{Fe}^{\text{III}}(\text{B})\text{Phe a})\text{Cl}$ erhöht und die Blauverschiebung dieser Banden erklärt werden (Die Verschiebung der Q_x -Bande wird in Kap. C-1.3.2.3 näher diskutiert). Neben diesem Effekt können Wechselwirkungen, ähnlich der für Fe-Porphyrine beschrieben [Adar, 1978], zwischen den unbesetzten $e_g(\pi)$ -Orbitalen des Tetrapyrrolrings und den besetzten $d(\pi)$ -Orbitalen des Metalls auftreten. Dies entspricht einer Metall-Ring- π -Rückbindung, wodurch das $e_g(\pi^*)$ -Orbital des Tetrapyrrols energetisch angehoben wird, so dass der Übergang $a_{1u}, a_{2u} \rightarrow e_g(\pi^*)$ bei größeren Energien liegt, also blauverschoben ist.

Die d-Orbitale des Metalls werden unter Einfluss des Ligandenfeldes des Chlorin bzw. des Bakteriochlorins energetisch aufgespalten, so dass es zu Charge-Transfer-Übergängen ($a_{1u}(\pi), a_{2u}(\pi) \rightarrow e_g(d_\pi)$) kommen kann, womit sich die zusätzlichen langwelligen Banden bei 765 nm ($\text{Fe}^{(III)}\text{Phe } a)\text{Cl}$ und bei 1007 nm ($\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a)\text{Cl}$) erklären lassen [Goutermann, 1978; Antipas et al., 1978].

Der μ -oxo-Komplex des Fe-(B)Phe zeichnet sich durch seine langwellige Q_y - (und Q_x -)Bande und noch stärkere Bandenverbreiterung aus, ähnlich wie die μ -oxo-Komplexe der Fe-Porphyrine, für die Kurtz et al. [Kurtz, 1990; Reem et al., 1989] folgendes Modell aufstellten: Die Banden werden von den $O \rightarrow \text{Fe-CT}$ -Übergängen (einem $O(p_z) \rightarrow \text{Fe}(d_z)$ -CT- und einem $O(p_x, p_y) \rightarrow \text{Fe}(d_{xz}, d_{yz})$ -CT-Übergang) verursacht, deren Energien stark von dem Fe-O-Fe-Winkel abhängen. Beim Übergang von einer linearen Verbindung zum rechten Fe-O-Fe-Winkel wird die Energiedifferenz zwischen den Orbitalen kleiner und Entartungen werden aufgehoben, was an einer langwelligen Verschiebung und Verbreiterung durch Überlagerung mehrerer Banden führt.

Bei (B)Chl-Derivaten wird bei der Bildung von Aggregaten ebenfalls eine langwellige, excitonische Verschiebung der Q_y -Bande beobachtet, die von der Größe der Aggregate (Dimere, Trimere, Polymere) abhängt [White, 1978; Boucher und Katz, 1967; Katz et al., 1978]. Im Falle des $(\text{Fe}^{(III)}\text{Phe } a)_2\text{O}$ und $(\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a)_2\text{O}$ könnte die sehr breite, rotverschobene Q_y -Bande durch eine Überlagerung dieser beiden Effekte zustande kommen.

1.3 Spektroskopische Untersuchung des $(\text{Fe}^{(III)}\text{Pheo-phytin } a)\text{Chlorid}$ und $(\text{Fe}^{(III)}\text{Bakteriopheophytin } a)\text{Chlorid}$

1.3.1 Einführung

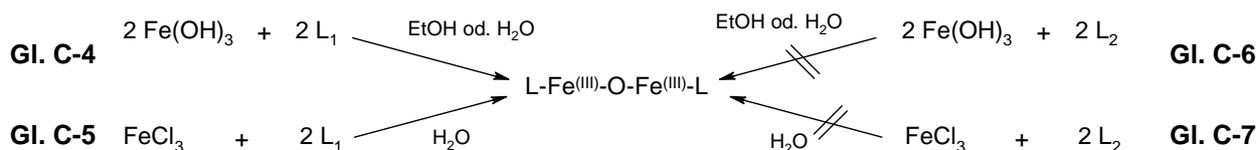
1.3.1.1 Bildung von μ -oxo-Komplexen von Fe-Porphyrinen

$(\text{Fe}^{(III)}\text{Phe } a)\text{Cl}$ und $(\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ liegen wie die Fe-Porphyrine in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor, das abhängig von den Bedingungen, die für die Fe-Porphyrine detailliert untersucht worden sind, verschoben werden kann.

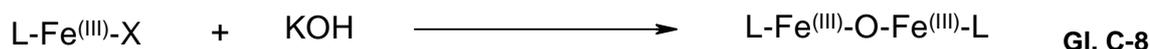
Die Bildung der μ -oxo-Komplexe kann entweder durch Hydrolyse oder durch Oxidation [Murray, 1974] erfolgen.

1) Hydrolyse:

Bei der Verwendung von Liganden L (L = salen, EDTA, HEDTA^[8]), die das Fe³⁺ in wässriger oder ethanolischer Lösung spontan komplexieren, bildet sich der μ -oxo-Komplex L-Fe^(III)-O-Fe^(III)-L durch Lösen des Liganden in wässriger oder ethanolischer Fe(OH)₃- oder FeCl₃-Lösung (Gl. C-4, Gl. C-5). Liganden wie Porphyrin, Chlorin, oder Bakteriochlorin, deren Komplexbildungstendenz nicht so groß ist, bilden auf diesem Weg keine Eisen- oder μ -oxo-Komplexe. Hier kann das μ -oxo-Dimer durch Zugabe von Base aus dem Monomer L-Fe^(III)-X synthetisiert werden (Gl. C-6, Gl. C-7, Gl. C-8).

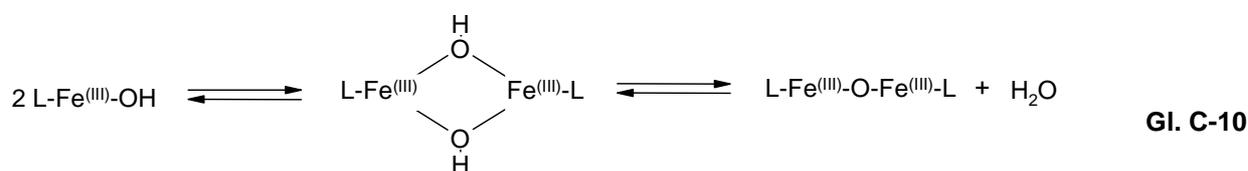


L₁ = salen, EDTA, HEDTA; L₂ = Porphyrin, Chlorin, Bakteriochlorin

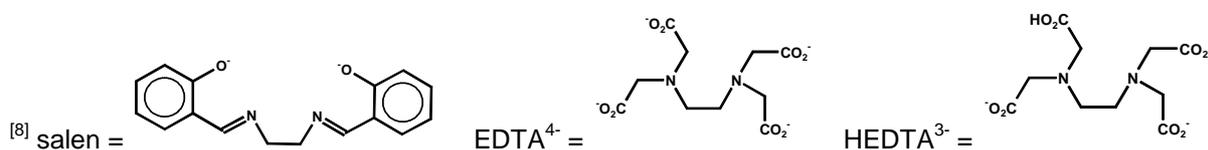


L = salen, EDTA, HEDTA, Porphyrin, Chlorin, Bakteriochlorin
 X = Halogenid, Acetat

Sadasivan et al. postulierten, dass bei der Reaktion des monomeren Fe-Komplexes L-Fe^(III)-X mit Base zuerst der Ligand X⁻ gegen OH⁻ ausgetauscht wird unter Bildung eines Hydroxokomplexes L-Fe^(III)-OH (Gl. C-9), der zum Dihydroxokomplex dimerisiert und unter Wasserabspaltung in den μ -oxo-Komplex übergeht (Gl. C-10) [Sadasivan et al., 1969].



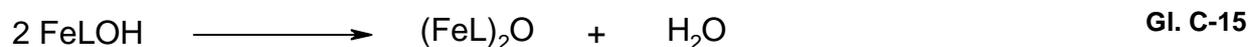
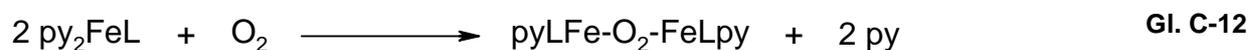
L = Porphyrin, Chlorin, Bakteriochlorin; X = Halogenid, Acetat



Diese Reaktion zeigt eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert, so dass das Monomer durch Zugabe von Base in den μ -oxo-Komplex überführt, und dieser durch Zugabe von Säure gespalten werden kann, wobei der pH-Bereich, in dem der μ -oxo-Komplex bzw. das Monomer vorliegt, von der Art des Liganden L abhängt. Da es sich um Gleichgewichtsreaktionen handelt, konnten bisher keine Di-Fe(III)-Spezies kristallisiert werden, die ausschließlich Hydroxo- oder Oxo-Liganden tragen [Kurtz, 1990].

2) Oxidation von Fe(II)-Komplexen:

Bei der Reaktion von FeCl_2 mit einem Liganden L (L = salen, Deuteroporphyrin-IX-dimethylester) bildet sich in Anwesenheit von Sauerstoff ebenfalls der μ -oxo-Komplex; genauso oxidiert ein $\text{Fe}^{(II)}\text{L}$ -Komplex mit Sauerstoff zu $\text{L-Fe}^{(III)}\text{-O-Fe}^{(III)}\text{-L}$ (L = salen, Porphyrin) (Gl. C-11) [Sadasivan et al., 1969]. Kinetische und synthetische Studien der Oxidation von $\text{Fe}^{(II)}$ -Porphyrin-Komplexen wurden in Pyridin und anderen nicht-wässrigen Lösungsmitteln von Caughey et al. durchgeführt [Alben et al., 1968; Sadasivan et al., 1969]. Die Gesamtstöchiometrie dieser Reaktion entspricht einer Oxidation von vier $\text{Fe}^{(II)}$ -Porphyrinen durch ein Sauerstoffmolekül (Gl. C-12 bis 15).



Die Reaktion der μ -oxo-Bildung ist von Bedeutung bei der Synthese von sauerstoffbindenden Häm-Modellen, da hier diese Reaktion verhindert werden muss. Dies ist durch sterische Abschirmung des Eisens mit raumerfüllenden Gruppen am Porphyrin (Lattenzaun-Modell, [Collman et al., 1978]) möglich.

Das anaerobe, durch Häm-Derivate schwarz pigmentierte Bakterium *Porphyromonas gingivalis*, das für die Entstehung Parodontalerkrankungen mit verantwortlich gemacht wird, bindet Eisen-Protoporphyrin IX (Fe-Proto IX) (Abb. C-2) als μ -oxo-Komplex, egal ob das Fe-

Proto IX bereits als μ -oxo-Komplex angeboten wird oder monomer vorliegt und unabhängig von der Oxidationsstufe des Eisens. Dies konnte über Mößbauerstudien nachgewiesen werden [Smalley et al., 1998]. Es wird vermutet, dass dies für das anaerobe Bakterium ein Schutz vor Sauerstoff ist. Vorhandener Sauerstoff wird durch die Bildung des μ -oxo-Komplexes abgefangen. Auch können mit dieser Reaktion andere aktive Sauerstoffspezies, wie O_2^- , O_2^{2-} , OH^- und Sauerstoffradikale abgefangen werden.

1.3.1.2 Reduktion des Fe^{3+} in Fe-Porphyrinen und ($Fe^{(III)}$ Pheophytin a)Chlorid

Das dreiwertige Fe in Porphyrin-Komplexen lässt sich durch gängige Reduktionsmittel wie Na-Dithionit, aber auch durch Cr(II)-Acetylacetonat oder $CaH_2/Pd/H_2O$ reduzieren [Buchler, 1975]. Die reduzierten Fe(II)-Porphyrine sind unter Sauerstoffausschluss in nicht-wässrigen Lösungsmitteln stabil, wenn das Eisen durch zwei weitere Liganden (z.B. Pyridin) stabilisiert wird. Epstein et al. zeigte am Beispiel von ($Fe^{(III)}$ Porphyrin)Cl, dass die Reduktion ebenfalls allein durch Pyridin und Piperidin erreicht werden kann, nicht jedoch mit Imidazol [Epstein et al., 1967].

Am Beispiel von monomeren ($Fe^{(III)}$ Phe a)Cl untersuchten Kadono et. al [Hori et al., 1990; Kadono et al., 1992] diese Reduktion mit verschiedenen Pyridin-Derivaten mit Hilfe der Mößbauerspektroskopie. Sie stellten fest, dass Pyridin-Derivate mit elektronenziehenden Substituenten (4-Cyano-, 4-Formyl- oder 4-Chloropyridin) eine Reduktion des Eisens bewirken, dagegen wird das Eisen durch elektronen-„schiebende“ Substituenten (4-Aminopyridin) nicht reduziert. Liganden mit hohem pK_a -Wert bewirken eine starke σ -Donor-Bindung, die die positive Ladung des Eisen(III)-Ions stabilisiert (4-Amino-Pyridin). Im Gegensatz dazu liefern Pyridin-Derivate mit elektronenziehenden Substituenten nicht die nötige Stabilisation der positiven Ladung am Eisen(III)-Ion. Um die positive Ladung zu stabilisieren, wird ein Elektron aus dem HOMO des Chl-Derivates auf das d_{π} -Orbital des Eisen übertragen. Als Folge dieses Elektronen-Transfers bildet sich eine Elektronenlücke im Makrozyklus, die augenblicklich durch einen nucleophilen Angriff eines freien Liganden aufgefüllt wird. Diese Autoreduktion wurde auch von Scherz et al. am Beispiel von Ni-BPhe und Mn-BPhe untersucht. Sie konnten zeigen, dass sie auf einer Elektronenübertragung bei der Ligandierung zurückzuführen ist, welche nach Umlagerung des Tetrapyrrolgerüsts zu einer echten Reduktion des Zentralmetalls führen kann [Noy et al., 2000; Ashur et al., im Druck].

Dagegen findet beim μ -oxo-Komplex des Eisen-Protoporphyrins IX (Fe-Proto IX) durch Pyridinzugabe keine Autoreduktion statt, erst nach Zugabe eines Reduktionsmittels (Na-Dithionit, Dithiothreitol) konnte der μ -oxo-Komplex reduziert werden [Smalley et al., 1998;

Shah et al., 1979; Al-Jaff et al., 1990]. Eine entsprechende Untersuchung für das $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$ ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

1.3.2 Absorptionsspektroskopie

1.3.2.1 Monomer - μ -oxo-Dimer-Gleichgewicht

In diesem Kapitel wird das Monomer-Dimer-Gleichgewicht von $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$ und $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ untersucht. Da sich der μ -oxo-Komplex im basischen Medium bildet und mit Säure wieder gespalten werden kann, lässt sich dieses Gleichgewicht reversibel durch Säure-Base-Titration verschieben und aufgrund der unterschiedlichen Absorption von Monomer und μ -oxo-Dimer (Kap. C-1.2.8, Abb. C-10, Abb. C-11) absorptionsspektroskopisch verfolgen:

Ausgehend vom μ -oxo-Komplex, wie das Fe-Phe bzw. Fe-BPhe in MeOH vorliegen, kann durch Zugabe von Säure (0,01 M HCl) das Dimer gespalten werden und das entstandene Monomer mit Base (0,01M KOH) wieder in den μ -oxo-Komplex überführt werden.

Ausgehend vom μ -oxo-Komplex (Abb. C-12, Abb. C-13) verschwindet die langwellige Q_y -Bande bei 692 ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$ bzw. 827 nm ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)_2\text{O}$) und in gleichen Maß bildet sich eine neue Bande bei 619 bzw. 726 nm, die Q_y -Bande des monomeren $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$ bzw. $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)\text{Cl}$. Auch bildet sich beim $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ eine deutliche Q_x -Bande bei 530 nm. Diese Reaktion ist reversibel; nach Titration mit 0,01 M HCl bis zur Spektrenkonsistenz kann durch Zugabe von 0,01 M KOH der μ -oxo-Komplex wieder gebildet werden. Es reicht hierfür aus, die Lösung zu neutralisieren, um das Gleichgewicht wieder auf die Seite des μ -oxo-Komplexes zu verschieben, da dieser sich auch mit Wasser bildet. Nach Zugabe der KOH erhält man wieder das Ausgangsspektrum.

Bei der Titration treten keine isosbestischen Punkte auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es bei der Spaltung bzw. Bildung des μ -oxo-Komplexes mindestens ein Zwischenprodukt gibt, welches eine andere Absorption hat als das Edukt bzw. Produkt. Bei mechanistischen Untersuchungen der Bildung des μ -oxo-Komplexes von Fe-Porphyrinen wurde festgestellt, dass sich zunächst Hydroxo- und Dihydroxo-Komplexe bilden (Kap. C-1.3.1.1, Gl. C-10). Hinweise auf solche Komplexe ergeben sich durch Wechsel des Lösungsmittel.

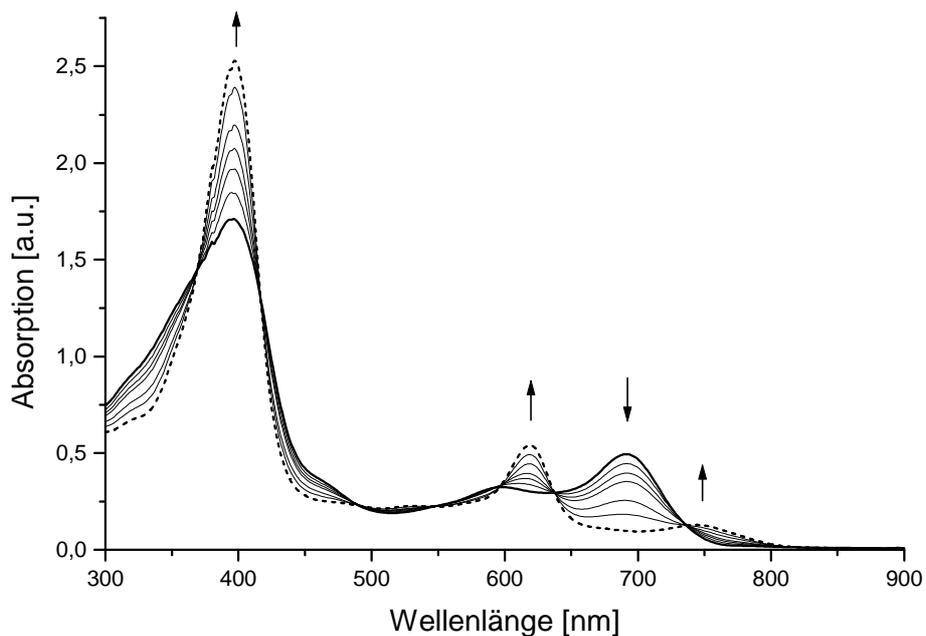


Abb. C-12: Säure-Base-Titration von Fe-Phe in MeOH: Startspektrum: μ -oxo-Komplex $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe a})_2\text{O}$ (—); Zugabe von 2, 4, 6, 11, 16, und 20 μl 0,01 M HCl (—); Endspektrum: monomeres $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe a})\text{Cl}$ (· · · ·)

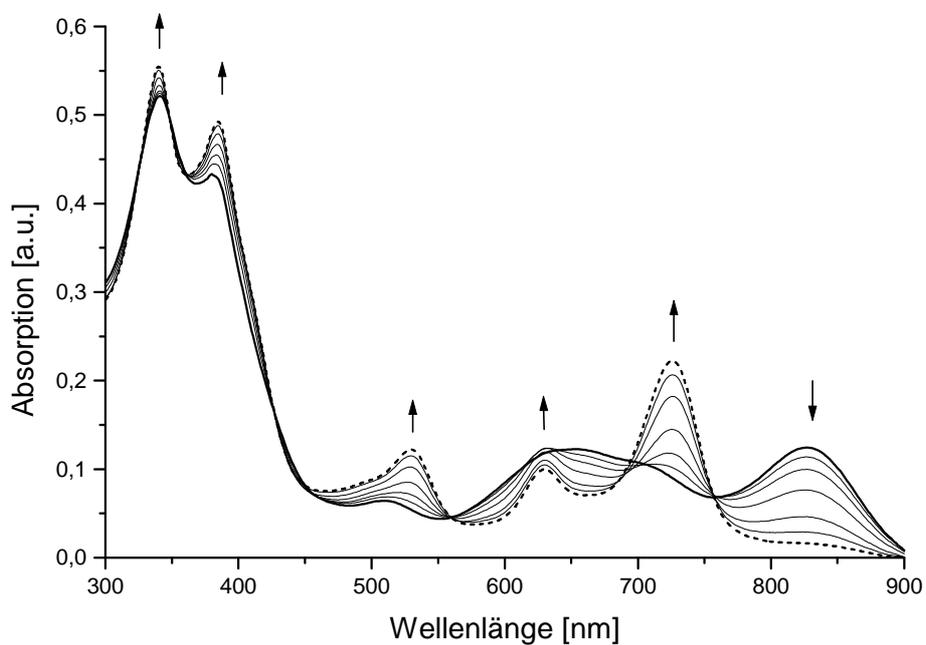


Abb. C-13: Säure-Base-Titration von Fe-BPhe in MeOH: Startspektrum: μ -oxo-Komplex $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})_2\text{O}$ (—); Zugabe von 4, 7, 10, 13, 16 und 19 μl 0,01 M HCl (—); Endspektrum: monomeres $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})\text{Cl}$ (· · · ·)

Die Absorptionsspektren der μ -oxo-Komplexe $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$ und $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)_2\text{O}$ in MeOH unterscheiden sich von denen in DE (Abb. C-14).

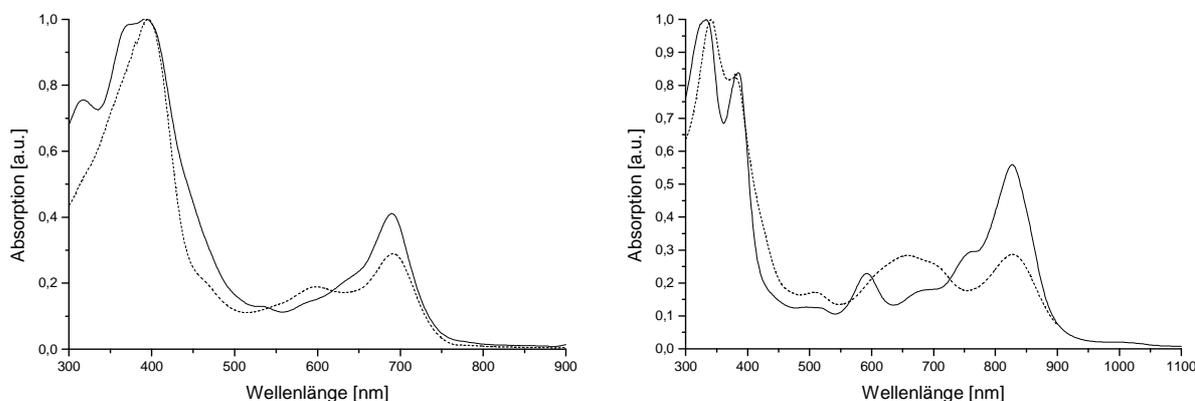


Abb. C-14: Absorptionsspektren von $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$ (links) und $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)_2\text{O}$ (rechts) in DE (—) und in MeOH(- - -); die Spektren wurden auf die Soret-Bande normiert

In MeOH bildet die Q_y -Bande eine sehr breite Doppelbande mit Maxima bei 598/691 nm ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$) bzw. bei 659/826 nm ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)_2\text{O}$), beim $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)_2\text{O}$ ist die kurzwellige Bande stärker ausgeprägt als beim $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$. In DE verschwindet der kurzwellige Anteil der Doppelbande und die Intensität der langwelligen Bande nimmt zu. Es scheint, dass in MeOH zusätzlich zu dem Produkt in DE ein zweiter Komplex entsteht, der sich nicht vollständig in den μ -oxo-Komplex umwandeln lässt, hierbei handelt es sich möglicherweise um einen Methoxo-Komplex $(\text{Fe}^{\text{III}}(\text{B})\text{Phe } a)_2\text{OMe}$.

1.3.2.2 Reduktion mit Na-Dithionit und Pyridin

Die Reduktion des $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$ (zur Reproduktion der Ergebnisse von Kadono et al.) und des $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ erfolgte nach den zwei oben beschriebenen Methoden (Kap. C-1.3.1.2): Reduktion mit Na-Dithionit und Autoreduktion mit Pyridin, die Eisenkomplexe wurden dabei jeweils einmal als Monomer eingesetzt und einmal als μ -oxo-Komplex.

Die Reduktion mit Na-Dithionit erfolgte in einer CHCl_3 /Pyridin-Lösung nach Zugabe einer konzentrierten wässrigen Na-Dithionit-Lösung innerhalb von 2,5 h bei Raumtemperatur. Zur Pyridinreduktion wurden die Pigmente in einer CHCl_3 /Pyridin-Mischung gelöst, auf 70 °C erhitzt und die Reaktion photometrisch verfolgt.

Bei der Reduktion von $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$ in CHCl_3 /Pyridin-Lösung unter erhöhten Temperaturen kommt es, ausgehend vom Monomer, zu einer bathochromen Verschiebung der Soret-Bande von 400 nm nach 409 nm und der Q_y -Bande von 629 nm nach 647 nm. Die langwellige Bande bei 765 nm verschwindet (Abb. C-15). Erhöhte Temperaturen sind nur bei

einem geringen Pyridin-Gehalt (8 %) notwendig, eine spontane Reduktion ist bei Raumtemperatur zu beobachten, wenn das $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$ in reinem Pyridin gelöst wird. Dasselbe Absorptionsspektrum erhält man nach Inkubation einer $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$ -Lösung mit Na-Dithionit (nicht gezeigt).

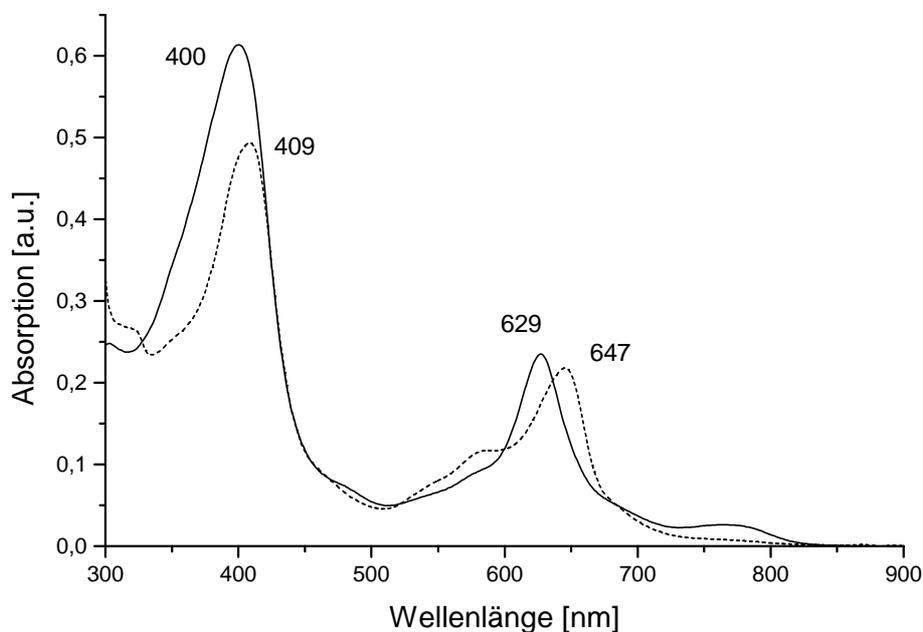


Abb. C-15: Reduktion von monomerem $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$: $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)\text{Cl}$ vor (—) und nach (· · ·) Behandlung mit Pyridin. Die Spektren wurden auf die Fläche unter der Q_y -Bande (510-900 nm) normiert.

Ausgehend vom μ -oxo-Komplex $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$ erhält man unter den gleichen Reaktionsbedingungen (erhöhte Temperatur, $\text{CHCl}_3/\text{Pyridin}$ -Lösungsmittel) ebenfalls das $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a$ -Absorptionsspektrum (Abb. C-16). Während der Reaktion spaltet sich der μ -oxo-Komplex, so dass die Q_y -Bande bei 691 nm verschwindet, während die Q_y -Bande des $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Pheophytin } a$ ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a$) bei 647 nm entsteht. Die Reaktionsdauer ist hierbei allerdings erheblich länger, erst nach 5,5 h ist kein μ -oxo-Komplex im Absorptionsspektrum mehr erkennbar. Eine Behandlung des μ -oxo-Komplexes $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$ mit Na-Dithionit führt ebenfalls zu seiner Spaltung, die nach 3 h abgeschlossen ist (nicht gezeigt).

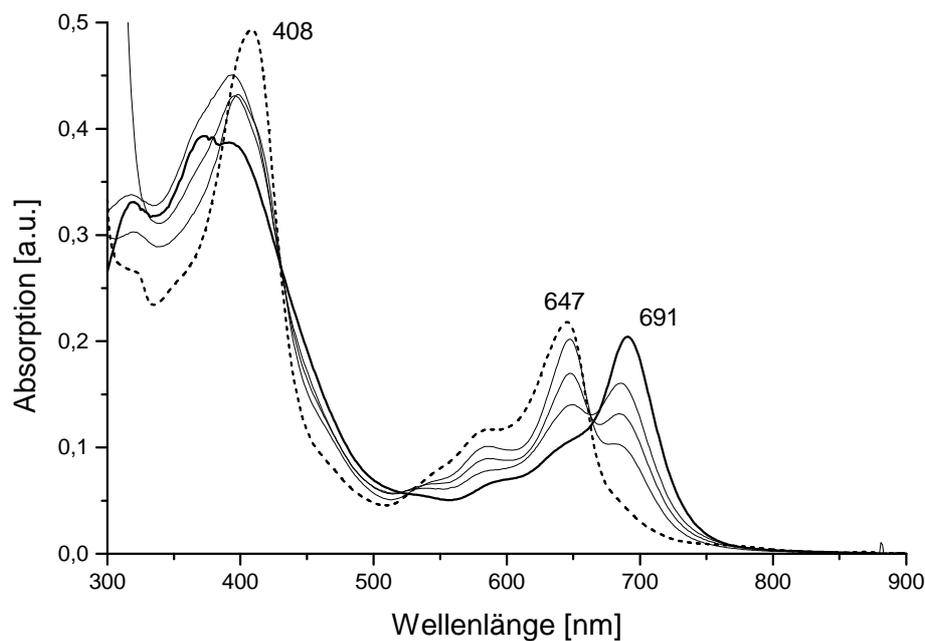


Abb. C-16: Reduktion des $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)_2\text{O}$ mit Pyridin: $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)_2\text{O}$ in CHCl_3 vor Reduktion mit Pyridin (—) als μ -oxo-Komplex; Spektren während der Reduktion (gemessen in $\text{CHCl}_3/\text{Pyridin}$ (50:1)) nach 1 h, 2,5 h, 4 h (—; Reduziertes $\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a$ nach 5,5 h Reaktionsdauer (· · ·). Alle Spektren wurden auf die Fläche der Q_y -Bande (510 – 900 nm) normiert.

Da die spektralen Daten der Reduktion des $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)\text{Cl}$ mit denen von Hori et. al [Hori et al., 1990] identisch sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Produkt um das $\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a$ handelt. Da das Absorptionsspektrum des Produkts der Reduktion des μ -oxo-Komplexes mit dem der Reduktion des Monomer übereinstimmt, ist auch hier eine Reduktion eingetreten.

Auf gleiche Weise wie das $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)\text{Cl}$ wurde das $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ behandelt. Die Reduktion erfolgte mit Pyridin und/oder Dithionit, wobei das Pigment ebenfalls als Monomer ($(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)\text{Cl}$) und μ -oxo-Komplex ($(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)_2\text{O}$) vorgelegt wurde.

Bei der Reduktion des monomeren $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ durch Pyridin kommt es zu einer Rotverschiebung der Q_y -Bande von 749 nm nach 768 nm und der Q_x -Bande von 529 nm nach 570 nm. Die langwellige Bande bei 1011 nm verschwindet (Abb. C-17). Die Soret-Bande verliert relativ zur Q_y -Bande an Intensität; die beim monomeren $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ gut separierten B_y - und B_x -Banden (338 nm und 387 nm) sind beim $\text{Fe}^{(\text{III})}$ Bakteriopheophytin a ($\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a$) nicht aufgelöst, mit einem Maximum bei 338 nm. Auf die Verschiebung der Q_x -Bande wird im nächsten Kapitel (Kap. C-1.3.2.3) näher eingegangen. Die Reaktion ist nach 2,5 h vollständig abgeschlossen. Die Reduktion mit Na-Dithionit liefert dasselbe Absorptionsspektrum (nicht gezeigt).

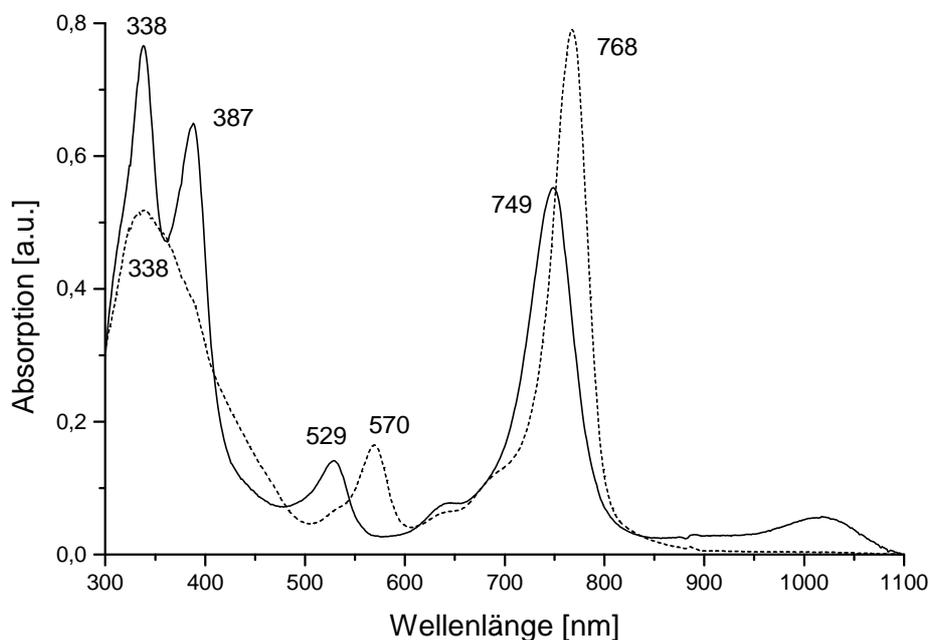


Abb. C-17: Reduktion des monomeren $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ mit Pyridin: $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)\text{Cl}$ vor (—) und nach (---) Behandlung mit Pyridin. Die Spektren wurden auf die Fläche unter der Q_y -Bande (610-1100 nm) normiert.

Bei der Reduktion des μ -oxo-Komplexes $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)_2\text{O}$ wird der μ -oxo-Komplex unter Bildung des $\text{Fe}^{\text{II}}\text{BPhe } a$ (Abb. C-18) gespalten. Die Reaktionsdauer ist erheblich länger als bei der Reduktion des Monomers. Nach 5,5 h hat sich die Hälfte des μ -oxo-Komplexes umgesetzt; nach 15 h ist die Reaktion vollständig verlaufen, so dass die Spaltung des μ -oxo-Komplexes bei den $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe } a)_2\text{O}$ erheblich länger dauert, als beim $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Phe } a)_2\text{O}$. Allerdings kam es während der Reaktion, die nur unter schwach reduzierenden Bedingungen stattfindet, teilweise zur Oxidation des Tetrapyrrolgerüsts zum Chlorin (Bildung des $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-[3-Acetyl]-Phe } a$, Struktur siehe Kap. F-3.1), dessen Absorptionsbanden in der reduzierten Form bei 419 nm und 668 nm liegen. Dies sind die bei der Reduktion des μ -oxo-Fe-BPhe zusätzlich auftretenden Banden.

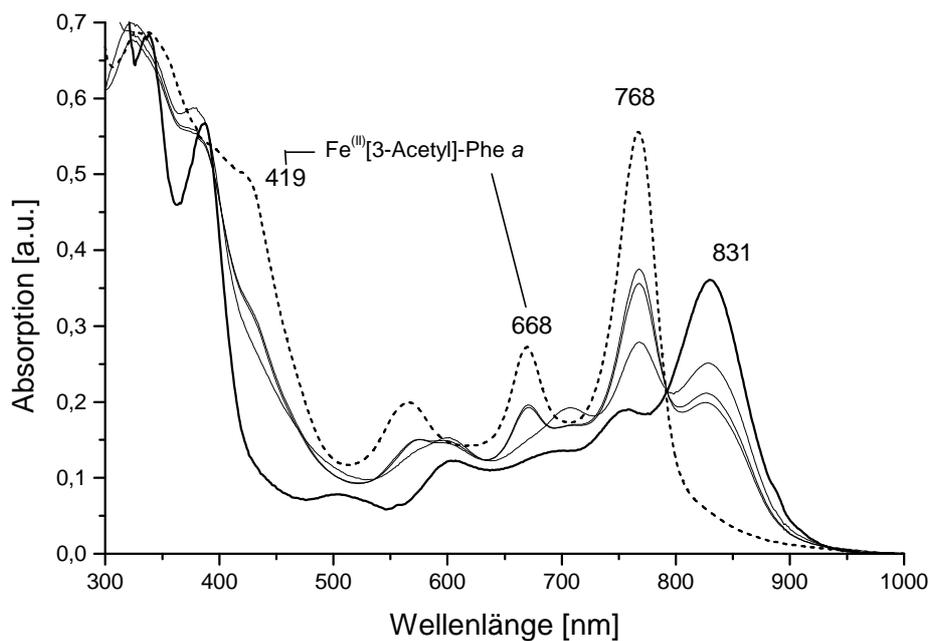


Abb. C-18: Reduktion des $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})_2\text{O}$ mit Pyridin: $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{BPhe a})_2\text{O}$ in CHCl_3 vor Reduktion mit Pyridin (—) als μ -oxo-Komplex; Spektren während der Reduktion (gemessen in $\text{CHCl}_3/\text{Pyridin}$ (50:1)) nach 1 h, 2,5 h, 5,5 h (—); Reduziertes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{BPhe a}$ nach 15 h Reaktionsdauer (- - -). Alle Spektren wurden auf die Fläche der Q_y -Bande (510 – 900 nm) normiert.

1.3.2.3 Verschiebung der Q_x -Bande

Die Lage der Q_x -Bande spielt bei der Interpretation der Absorptionsspektren von BChl und [M]-BChl eine besondere Rolle: Sie ist relativ intensiv und liegt gut separiert zwischen der B_x - und der Q_y -Bande, so dass ihr Absorptionsmaximum nicht durch andere Banden überlagert wird, und ihre Lage kann in einem weiten Bereich von 525 nm bis 615 nm variieren [Noy et al., 1999]. Die Q_x -Bande kommt durch den Elektronenübergang $a_{2u} \rightarrow e_{gx}$ zustande, dessen Energie stark von der Elektronendichte an den zentralen Stickstoffatomen beeinflusst wird, wie aus der Elektronendichteverteilung der Molekülorbitale (MO) (Kap. A) ersichtlich ist. Eine Änderung der energetischen Lage des a_{2u} -Orbitals beeinflusst auch die Energie des B_y -Übergangs, der durch den Elektronenübergang $a_{2u} \rightarrow e_{gy}$ zustande kommt. Die Elektronendichte an den zentralen Stickstoffatomen beim [M]-BChl wird durch das Metall und durch zusätzliche, axiale Liganden am Zentralion beeinflusst. Der Einfluss der Zentralions auf die Energie der Orbitale ist abhängig von seiner Elektronegativität E_N und seinem Ionenradius r_i [Hartwich et al., 1998]. Durch eine hohe Elektronegativität bzw. einen kleinen Ionenradius wird das a_{2u} -Orbital abgesenkt, wodurch sich die Übergangsenergie erhöht und die Q_x -Bande kurzweilig verschoben wird. Die Elektronegativität ist für jedes Metall spezifisch, der Ionenradius sinkt mit der Oxidationsstufe des Metalls und steigt mit seiner Koordinationszahl. Hartwich et al. [Hartwich et al., 1998] ermittelten eine lineare Beziehung

zwischen der Übergangsenergie der Q_x - und der B_y -Bande und dem Quotienten aus Elektronegativität und Ionenradius E_N/r_i für eine ganze Reihe von [M]-BChI-Derivaten mit zweiwertigen Metallionen, die in Abb. C-19 (links) graphisch dargestellt ist. Hier wurde der Quotient E_N/r_i , der für jedes Metall und jede Koordinationszahl einen spezifischen Wert hat, gegen die beobachtete Übergangsenergie $E_{M,T}$ der Q_x - und B_y -Bande aufgetragen. Dabei ergab sich eine lineare Beziehung in Abhängigkeit von der Koordinationszahl.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde versucht, die Koordinationszahl des monomeren $(Fe^{(III)}BPhe\ a)Cl$, des μ -oxo-Dimers $(Fe^{(III)}BPhe\ a)_2O$ und des reduzierten $Fe^{(II)}BPhe\ a$ zu ermitteln. Von diesen Verbindungen wurden aus den gemessenen Absorptionsspektren (siehe Kap.C-1.2.8 und C-1.3.2.2) die Übergangsenergien der Q_x - und B_y -Banden ermittelt (Tab. C-6). In Tab. C-7 sind die verwendeten Werte für Elektronegativität E_N und Ionenradius r_i in Abhängigkeit der Koordinationszahl n_c angegeben, sowie die daraus resultierenden Werte für E_N/r_i . Diese ermittelten Werte wurden zusammen mit den Übergangsenergien in das Diagramm eingetragen (Abb. C-19, rechts).

	$(Fe^{(III)}BPhe\ a)Cl$	$(Fe^{(III)}BPhe\ a)_2O$	$Fe^{(II)}BPhe\ a$
Q_x -Absorption [nm]	523	592	570
Q_x -Übergangsenergie [$10^4\ cm^{-1}$]	1,91	1,69	1,75
B_y -Absorption [nm]	338	333	nicht aufgelöst
B_y -Übergangsenergie [$10^4\ cm^{-1}$]	2,96	3,00	-

Tab. C-6: Verschiebung und Übergangsenergien der Q_x - und B_y -Bande von monomeren $(Fe^{(III)}BPhe\ a)Cl$, dem μ -oxo-Komplex $(Fe^{(III)}BPhe\ a)_2O$ und dem reduzierten $Fe^{(II)}BPhe\ a$ in DE.

	E_N	$r_i (n_c = 4)$ [pm]	$r_i (n_c = 5)$ [pm]	$r_i (n_c = 6)$ [pm]	$E_N/r_i (n_c = 4)$ [$10^2\ pm^{-1}$]	$E_N/r_i (n_c = 5)$ [$10^2\ pm^{-1}$]	$E_N/r_i (n_c = 6)$ [$10^2\ pm^{-1}$]
Fe^{2+}	1,96	63	72	78,5	3,11	2,68	2,50
Fe^{3+}	1,83	77	-	92	2,38	-	1,99

Tab. C-7: Elektronegativität E_N und Ionenradien r_i (in Abhängigkeit der Koordinationszahl n_c) von Fe^{2+} und Fe^{3+} . Die E_N -Werte entsprechen Pauling-Elektronegativitäten und sind wie die Ionenradien r_i [Huheey, 1988] entnommen.

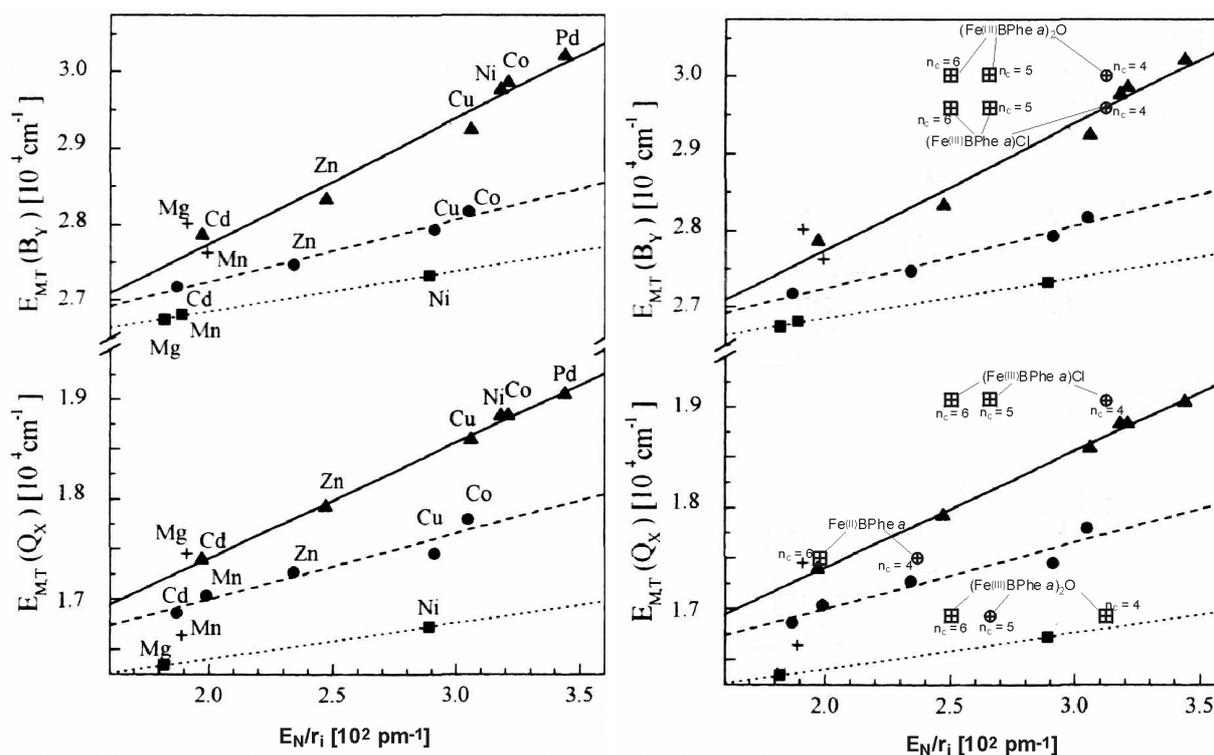


Abb. C-19: links: Korrelation der B_Y - (oben) und Q_X -Übergangsenergien (unten) mit E_N/r_i der zentralen Metallionen von $[M]$ -BChl, entnommen aus [Hartwich et al., 1998]. Koordinationszahl n_c : $n_c=4$ (\blacktriangle), (—) Linearer Fit; $n_c=5$ (\bullet), (- - -) Linearer Fit; $n_c=6$ (\blacksquare), (- · - ·) Linearer Fit rechts: In die Graphik wurden zusätzlich die gemessenen Werte für die B_Y - und Q_X -Übergangsenergien von $(Fe^{(III)}BPhe a)Cl$, $(Fe^{(III)}BPhe a)_2O$ und $Fe^{(III)}BPhe a$ in Abhängigkeit der berechneten Werte für E_N/r_i für jede mögliche Koordinationszahl eingetragen (\boxplus), um durch best mögliche Korrelation (\oplus) mit den Ausgleichsgeraden, die Koordinationszahl n_c zu ermitteln.

Sowohl die Q_X - als auch die B_Y -Bande von $(Fe^{(III)}BPhe a)Cl$ korreliert in der Graphik gut mit einer vierfachen Koordination, so dass das Eisen nur von den vier Tetrapyrrol-Stickstoffatomen umgeben ist. Das Gegenion Cl^- besetzt nach dieser Auswertung nicht wie erwartet die fünfte Koordinationsstelle. Zusätzliche, axiale Liganden beeinflussen den Ionenradius und die effektive Ladung des Metalls, die sich auf die Übergangsenergien des Komplexes auswirken. Da das $(Fe^{(III)}BPhe a)Cl$ gut mit einer vierfachen Koordination korreliert, hat das Cl^- -Gegenion keinen Einfluss auf den Ionenradius und die Ladungsverteilung am Eisen. Dies kann durch einen großen Fe-Cl-Abstand erklärt werden, bzw. durch einen stark ionischen Charakter der Fe-Cl-Bindung, der keine Änderung des Ionenradius des Eisen bewirkt, so dass dessen Koordinationssphäre einer vierfachen Koordination entspricht.

Bei dem μ -oxo-Komplex $(Fe^{(III)}BPhe a)_2O$ korrelieren die Daten nicht gut mit den von Hartwich et al. bestimmten Geraden. Die B_Y -Bande zeigt eine mäßige Korrelation zu den Ausgleichsgeraden der Koordinationszahl $n_c = 4$, die Werte der Q_X -Bande liegen zwischen einer fünf- und einer sechsfachen Koordination. Beim $(Fe^{(III)}BPhe a)_2O$ ist die fünfte

Koordinationsstelle sicher mit einem Sauerstoff besetzt, der eine kovalente Bindung zum Eisen bildet, die sechste Koordinationsstelle kann mit einem Lösungsmittelmolekül besetzt sein. Eine mögliche Erklärung ist der Unterschied zwischen dem bei Hartwich et al. verwendeten Liganden Pyridin, der sowohl zu σ -Donor, als auch zu π -Bindung fähig ist, und dem Sauerstoff-Liganden beim $(\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a)_2\text{O}$, der nur eine σ -Bindung mit dem Metall eingeht. Der Einfluss des Pyridin-Liganden auf das Metall ist damit größer, als der des Sauerstoffs, so dass ein 6-fach koordiniertes Fe (ein O-Ligand und ein Lösungsmittelmolekül) keine entsprechend große Verschiebung der Q_x -Bande zeigt.

Beim $\text{Fe}^{(III)}\text{BPhe } a$ liegt die Q_x -Bande bei 570 nm, die B_y -Bande ist nicht aufgelöst. Hier korrelieren die Daten ebenfalls nicht gut mit den Ausgleichsgeraden. Am ehesten ist hier eine Übereinstimmung mit einer vierfachen Koordination zu sehen, die ungewöhnlich ist, da die $\text{Fe}^{(III)}\text{Phe } a$ -Komplexe, die nach der gleichen Methode synthetisiert wurden, eine Bispyridin-Ligandierung haben [Hori et al., 1990].

1.3.3 ESR-Spektroskopie

1.3.3.1 Grundlagen

Bei der ESR-Spektroskopie werden Moleküle mit ungepaarten Elektronen untersucht, hierbei kann es sich um Radikale (= Dublett-Zustände) oder, insbesondere bei Übergangsmetallkomplexen, um Triplets und höhere Spinzustände handeln (Übersichten bei [Atkins, 1990; Stegmann, 1986; Galla, 1988]).

Elektronen haben einen Eigendrehimpuls, den Spin S , der mit einem magnetischen Moment verbunden ist. Durch Anlegen eines Magnetfeldes B können sich verschiedene Zustände (parallel oder antiparallel zum Magnetfeld) einstellen. Ein Molekül mit dem Gesamtspin S kann in einem Magnetfeld $(2S+1)$ verschiedene Zustände annehmen, die sich in den Spinquantenzahlen m_s unterscheiden. Bei einem Elektron mit dem Spin $S = \frac{1}{2}$ (d.h. mit den Spinquantenzahlen $m_s = \pm \frac{1}{2}$), kommt es im Magnetfeld zu einer Aufspaltung (Abb. C-20) der vorher entarteten Zustände (Zeemann-Effekt) mit einer Energie von:

$$E_{m_s} = g_e \mu_B m_s B$$

E_{m_s} = Energieniveau des Elektronenspins

g_e = Landé-Faktor

μ_B = Bohrsches Magneton

m_s = Spinquantenzahl

B = Magnetfeld

$$\mu_B = e \frac{\hbar}{2m_e}$$

$$\hbar = \frac{h}{2\pi}$$

h = Plancksches Wirkungsquantum

e = Elementarladung

m_e = Masse des Elektrons

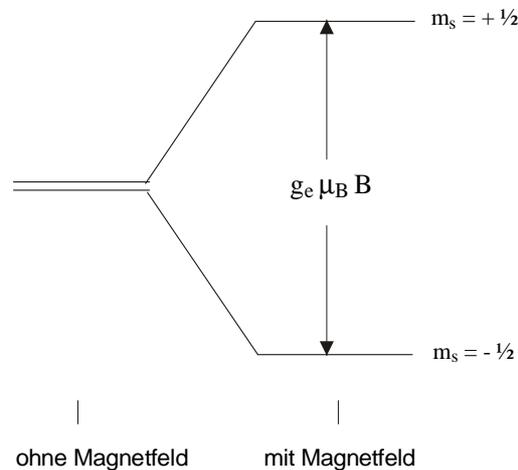


Abb. C-20: Aufspaltung der Energieniveaus der Elektronenspins S ($S = \frac{1}{2}$) in einem Magnetfeld. Die beiden Niveaus links (= feldfrei) sind entartet, und zur besseren Übersicht mit leicht unterschiedlicher Energie gezeichnet.

Bei einem Spin von $S = \frac{1}{2}$ erhält man für die Energiedifferenz der beiden Zustände:

$$\Delta E_{m_s} = g_e \mu_B B.$$

Der Landé-Faktor $g_e = 2,0023$ ist der Faktor für die Aufspaltung der Zustände für freie Elektronen. Bei ungepaarte Elektronen in Komplexen können durch das äußere Magnetfeld lokale Ströme induziert werden, wodurch der g -Wert der Elektronen im Komplex von g_e abweichen kann.

Aufgrund der Boltzmannverteilung ist der niederenergetische Zustand stärker besetzt als der energetisch höher gelegene. Durch Absorption von Strahlung können die Elektronen vom unteren in den oberen Zustand angehoben werden. Dies ist das Messprinzip der ESR-Spektroskopie. In der Praxis wird die Frequenz der eingestrahlten Strahlung (Mikrowellenstrahlung) konstant gehalten und die Feldstärke B moduliert. Bei einer bestimmten Feldstärke tritt der Resonanzfall ein und die Strahlung wird absorbiert. Bestimmt wird bei den Messungen dann der g -Faktor für diesen Übergang und gegebenenfalls weitere Parameter.

Fe^{2+} hat eine $3d^6$ -Elektronenkonfiguration, Fe^{3+} eine $3d^5$ -Elektronenkonfiguration. Die fünf d -Orbitale eines unkomplexierten, also ligandenfeldfreien Eisenions sind entartet, d.h. sie haben gleiche Energie. Im Ligandenfeld kommt es zur Aufhebung der Entartung und somit zur energetischen Aufspaltung der Orbitale (Abb. C-21). Diese Aufspaltung ist abhängig von

der Anordnung der Liganden, d.h. ob sie einen oktaedrischen, tetraedrischen oder quadratisch planaren Komplex bilden.

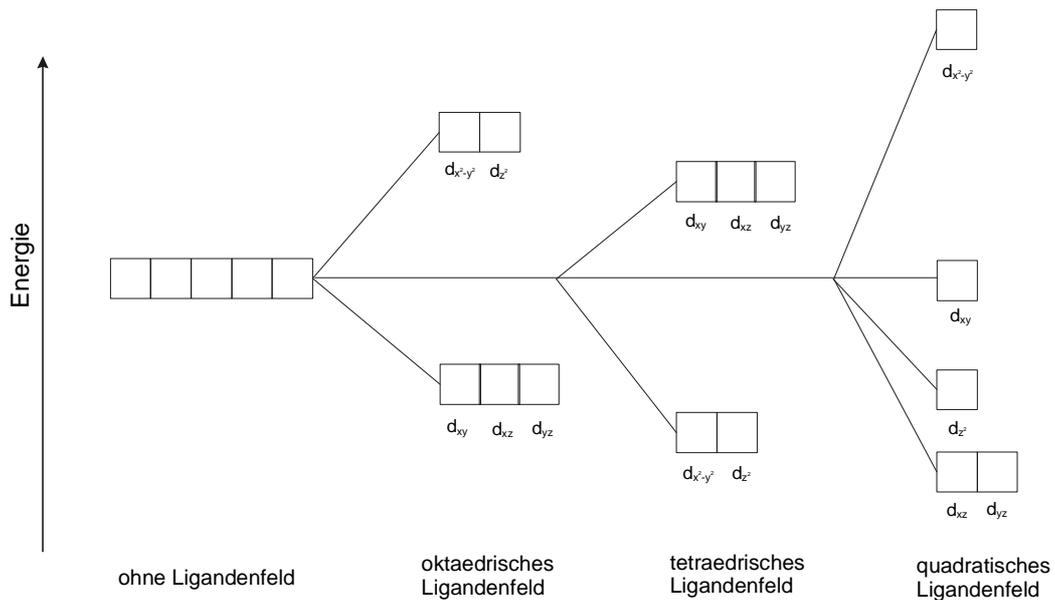


Abb. C-21: Aufspaltung der d-Orbitale in einem oktaedrischen, tetraedrischen und quadratischem Ligandenfeld

Die Größe der Aufspaltung ist, bei gleichem Metallion, abhängig von der Art des Liganden. Ist die Aufspaltungsenergie größer als die Spinpaarungsenergie (*low-spin*-Aufspaltung), werden zuerst die energieärmeren Orbitale besetzt. Dadurch kommt es zu Unterschieden in der Anzahl der ungepaarten Elektronen bei Übergangsmetallen mit d^4 -, d^5 -, d^6 - und d^7 -Konfiguration. Fe^{3+} - *high-spin*-Komplexe weisen einen Spin von $S=5/2$ und *low-spin*-Komplexe von $S=1/2$ auf (Abb. C-22).

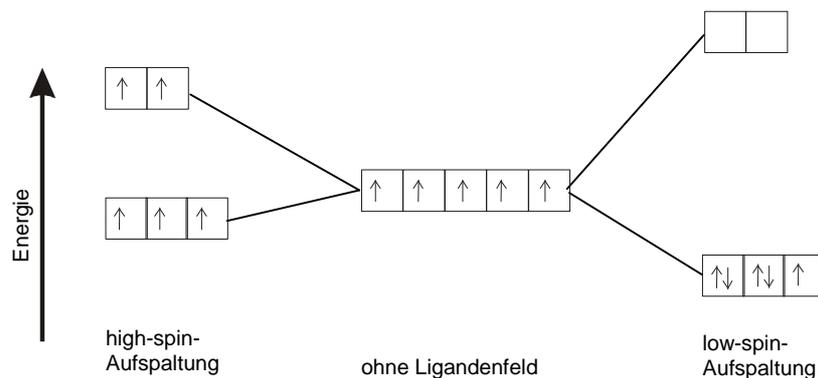


Abb. C-22: Aufspaltung der d-Orbitale im oktaedrischen Ligandenfeld unter Bildung von *high*- und *low-spin*-Komplexen mit d^5 -Elektronenkonfiguration

1.3.3.2 ESR-Spektroskopie an (Fe^(III)Pheophorbid *a*-17³-methylester)Chlorid, μ -oxo-Fe^(III) Pheophorbid *a*-17³-methylester, Fe^(II)Pheophorbid *a*-17³-methylester, (Fe^(III)Bakteriopheophorbid *a*-17³-methylester)Chlorid, μ -oxo-Fe^(III)Bakteriopheophorbid *a*-17³-methylester) und Fe^(II)Bakteriopheophorbid *a*-17³-methylester *a*

Bei der Interpretation der ESR-Spektren von Fe-Me-Pheid und Fe-Me-BPheid kann an die Ergebnisse der Untersuchungen an Fe-Porphyrinen angeknüpft werden.

Typisch für *high-spin* Fe³⁺-Komplexe sind *g*-Werte von $g \approx 6$ und $g \approx 2$ [Policar et al., 1996; Murray, 1974]. Für unterschiedliche substituierte Fe(III)-Porphyrin-Komplexe geben Chen et al. [Chen et al., 1982] Werte von $g = 5,57 - 5,76$ und $g = 2,01 - 2,05$ an. Diese *g*-Werte sind unabhängig von dem fünften Liganden (bzw. Gegenion), der die positive Ladung des Komplexes ausgleicht. Durch ESR-Messungen an Fe(III)-Porphyrinen, die nicht in der Lage sind, μ -oxo-Komplexe zu bilden, fanden sie heraus, dass die monomeren Hydroxo-Komplexe der Form Fe(P)OH dieselben Resonanzen zeigen, wie die Fe(P)Cl-Komplexe. Bei μ -oxo-Komplexen erhielten sie Resonanzen bei $g \approx 4$. Murray et al. beschreiben einen *g*-Wert für μ -oxo-Fe-Porphyrine von $g = 4,3$ [Murray, 1974] und eine zusätzliche Resonanz bei $g = 2$.

Von je drei Proben des Fe-Me-Pheid *a* und Fe-Me-BPheid *a* wurden ESR-Spektren bei 77 K in Toluol aufgenommen. Die Proben wurden so vorbereitet, dass eine Probe monomeres (Fe^(III)Me-(B)Pheid *a*)Cl, eine zweite (Fe^(III)Me-(B)Pheid *a*)₂O und eine dritte Fe^(II)Me-(B)Pheid *a* enthält. Durch Ausschütteln gegen Säure bzw. Base wurde dabei das Monomer-Dimer-Gleichgewicht auf eine Seite verschoben und durch Ansäuern bzw. Zugabe von Base in Toluol stabilisiert. Das Fe^(II)Me-(B)Pheid *a* wurde durch Lösen in Pyridin hergestellt (Kap. C-1.3.2.2). Abb. C-23 zeigt die ESR-Spektren der sechs Proben.

Das monomeren (Fe^(III)Me-Pheid *a*)Cl zeigt sehr intensive Spektren mit *g*-Werten von $g = 5,7$, $g = 3,0$ und $g = 2,05$, das (Fe^(III)Me-BPheid *a*)Cl von $g = 5,04$ und $g = 2,01$. Die Bande bei $g = 5,04$ des (Fe^(III)Me-BPheid *a*)Cl hat im Gegensatz zum (Fe^(III)Me-Pheid *a*)Cl eine Schulter bei $g = 5,8$. Diese Werte stimmen gut mit den Literaturdaten für *high-spin*-Fe³⁺-Komplexe überein.

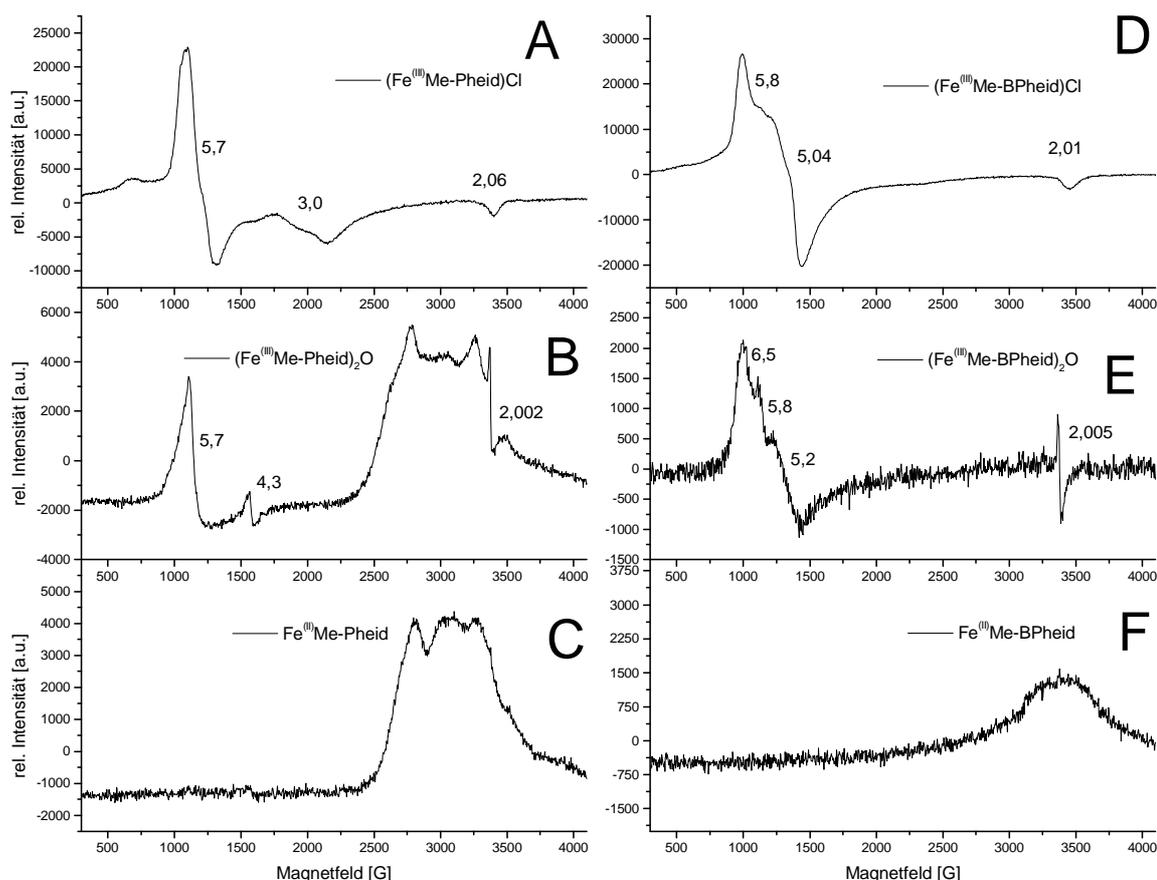


Abb. C-23: ESR-Spektren von (A) $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-Pheid } a)\text{Cl}$, (B) $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-Pheid } a)_2\text{O}$, (C) $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-Pheid } a$, (D) $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-BPheid } a)\text{Cl}$, (E) $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-BPheid } a)_2\text{O}$ und (F) $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-BPheid } a$ in Toluol in ähnlichen Konzentrationen bei 77 K.

Die sehr viel schwächeren ESR-Spektren der μ -oxo-Komplexe von $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-Pheid } a)_2\text{O}$ und $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-BPheid } a)_2\text{O}$ zeigen ebenfalls die (Rest)-Resonanzen der monomeren Komplexe ($g = 5,7$ ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-Pheid } a)_2\text{O}$) $g = 5,8$ ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-BPheid } a)_2\text{O}$), allerdings in sehr viel geringerer Intensität. Zusätzlich zu diesen Banden sind schwache Resonanzen bei $g = 4,3$ und $g = 2,002$ bei $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-Pheid } a)_2\text{O}$ und bei $g = 6,5$, $5,2$ und $2,002$ bei $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-BPheid } a)_2\text{O}$ zu beobachten. Die Signale bei $g = 5,7$ ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-Pheid } a)_2\text{O}$) und $g = 5,8$ ($(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-BPheid } a)_2\text{O}$) lassen vermuten, dass diese Proben mit monomerem $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-(B)Pheid } a)\text{X}$ verunreinigt sind. Infolge der Präparation ist es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um $(\text{Fe}^{\text{III}}\text{Me-(B)Pheid } a)\text{Cl}$ handelt. Wahrscheinlicher ist es, dass die μ -oxo-Bildung nicht vollständig war und noch Hydroxo-Komplex vorhanden ist (siehe Kap. C-1.3.2.1).

Die reduzierten Komplexe zeigen keine spezifischen Peaks. Die große Bande bei $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Me-Pheid } a$ taucht ebenfalls im μ -oxo-Spektrum auf. Hier handelt es sich wohl um Verunreinigungen, die nicht näher klassifiziert werden konnten. Da $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Me-BPheid } a$ kein

ESR-Signal zeigt, handelt es sich bei den reduzierten Verbindungen um *low-spin*-Komplexe mit d^6 -Elektronenkonfiguration, die keine ungepaarten Elektronen enthalten.

Die gemessenen g -Werte für monomeres $(\text{Fe}^{(III)}(\text{B})\text{Me-Pheid } a)\text{Cl}$ stimmen gut mit den Literaturdaten für Fe^{3+} -*high spin*-Komplexe mit fünffacher Koordination überein. Der Gesamtspin des Fe beträgt $S = 5/2$. Bei den μ -oxo-Komplexen kommt es zu einer starken antiferromagnetischen Kopplung zwischen den beiden Eisenionen, was zu einer Verringerung der magnetischen Suszeptibilität führt [Murray, 1974]. Die ESR-Spektren zeigen Verunreinigungen mit monomerem $(\text{Fe}^{(III)}\text{Me}-(\text{B})\text{Pheid})\text{X}$. Der fünfte Ligand lässt sich anhand der Verschiebung nicht bestimmen, da die Chlorid- und Hydroxy-Komplexe ähnliche Verschiebungen zeigen [Chen et al., 1982]. Typisch für μ -oxo-Komplexe sind g -Werte von $g \sim 4$, wie für das $(\text{Fe}^{(III)}\text{Me-Pheid } a)_2\text{O}$ gezeigt werden konnte. Das $(\text{Fe}^{(III)}\text{Me-BPheid } a)_2\text{O}$ hingegen zeigt keine Resonanzen bei $g \sim 4$, sondern bei $g \sim 6,5$ und $g \sim 5,2$, die für μ -oxo-Komplexe ungewöhnlich sind und sind für Fe-Porphyrine bisher nicht beschrieben worden. Dies könnte seine Ursache in einer anderen Geometrie des Komplexes haben, die durch sperrige Reste, die aus der Tetrapyrrol-Ebene ragen, hervorgerufen wird.

1.3.4 Mößbauerspektroskopie

1.3.4.1 Grundlagen

Der Mößbauereffekt beruht auf der Resonanzabsorption eines γ -Photons durch einen Kern (Grundlagen bei [Atkins, 1990; Wagner, 1986; Galla, 1988]). Von Resonanzabsorption spricht man, wenn ein Isotop ein γ -Quant einer definierten Energie beim Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand emittiert und diese Strahlung durch das gleiche Isotop in der Probe absorbiert wird, d.h. vom Grundzustand in den angeregten Zustand übergeht. In Abb. C-24 ist dieses Energieschema am Beispiel des ^{57}Fe als Mößbauer-Isotops dargestellt. Quelle für die γ -Strahlung ist bei der ^{57}Fe -Spektroskopie das ^{57}Co -Isotop, das mit einer Halbwertszeit von 270 Tagen in einen angeregten Zustand des ^{57}Fe zerfällt. Dieser Zustand geht in einem mehrstufigen Prozess unter Emission eines γ -Photons in den Grundzustand über. Ein anderer ^{57}Fe -Kern kann die von der Quelle emittierte Strahlung absorbieren und geht in den angeregten Zustand über. Nach der mittleren Lebensdauer des Kernzustandes E_a (Halbwertszeit $\tau = 98$ ns) geht der Zustand wieder in den Grundzustand E_g über, wiederum unter Emission eines γ -Quants.

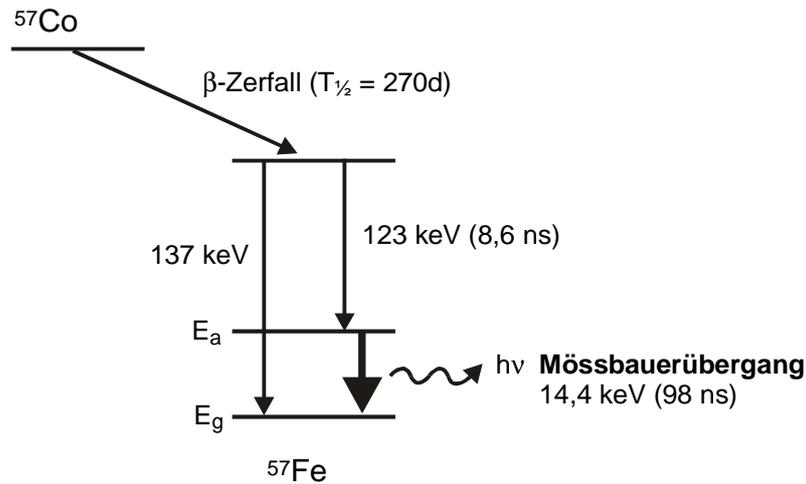


Abb. C-24: Termschema für ^{57}Fe ; angegeben sind die Übergangsenergien und in Klammern die Halbwertszeiten des Übergangs. Der Mössbauerübergang ist fett eingezeichnet.

Aufgrund des Impulserhaltungssatzes erhält ein angeregter Kern, der ein Quant emittiert einen Rückstoß. Die Energie des Quants ist um die Rückstoßenergie des Kerns erniedrigt. Dieses emittierte, energiereichere Quant kann aufgrund der Bandenverschiebung nicht mehr vom gleichen Übergang absorbiert werden. Beim Einbau in einen Festkörper ist es aber insbesondere bei tiefen Temperaturen möglich, dass Kerne rückstoßfrei emittieren und absorbieren, da der Rückstoßimpuls auf den gesamten Festkörper übertragen wird, der im Vergleich zum einzelnen Kern eine praktisch unendliche Masse besitzt. Unter diesen Bedingungen ergeben sich extrem geringe Linienbreite und entsprechend hoch aufgelöste Spektren.

Die emittierenden Kerne (Quelle) und absorbierenden Kerne (Probe, Absorber) sind in der Praxis in verschiedenartige Festkörper eingebaut. Durch die verschiedenen Umgebungen kommt es zu geringfügigen Verschiebungen der Energieniveaus, so dass infolge der geringen Linienbreite keine Resonanzabsorption zu beobachten ist. In der Praxis ermöglicht man die Resonanzabsorption, indem die Quelle auf einem elektromagnetischen Antrieb, dem sog. Drive befestigt wird, auf dem die Quelle mit variabler Geschwindigkeit hin und her bewegt werden kann. Aufgrund des Dopplereffekts erfahren die emittierten Quanta eine Energieverschiebung, so dass wieder eine Resonanz-Absorption stattfinden kann. Gemessen wird die Anzahl der emittierten Quanta in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Drives.

Durch elektromagnetische Wechselwirkung zwischen dem absorbierenden Atomkern und der ihn umgebenden Elektronenstruktur kann es zur Aufspaltung und Verschiebung der Resonanzlinie kommen. Diese Wechselwirkungen können in drei Gruppen eingeteilt werden: 1) elektrische Monopolwechselwirkungen führen zur Isomerieverschiebung, 2) elektrische

Quadrupolwechselwirkungen führen zur Quadrupolaufspaltung der Resonanzlinien und 3) magnetische Dipolwechselwirkungen führen zur magnetischen Hyperfeinaufspaltung. Die Isomerieverschiebung (elektrische Monopol-Wechselwirkung) wird durch elektrische Wechselwirkung der ausgedehnten elektrischen Ladung des Kerns mit den Elektronen hervorgerufen. Es tritt eine Verschiebung der Absorptionslinie bzgl. $\nu = 0$ auf. Der Kernradius ist in den verschiedenen Kernzuständen (Grund- (GZ-) und angeregter Zustand) leicht verschieden ($^{57}\text{Fe}^*$ ist um 0,2 % kleiner als ^{57}Fe). Dadurch wird aber bei der Kern-Anregung die elektrostatische Wechselwirkung mit den Elektronen der Atomhülle beeinflusst. Beim Eisen beispielsweise nimmt die Isomerieverschiebung mit steigender Oxidationszahl ab, da die Abschirmeffekte der 3d-Elektronen abnehmen.

Die Quadrupol-Aufspaltung (elektrische Quadrupol-Wechselwirkung) entsteht durch die Wechselwirkung zwischen dem Kernquadrupolmoment und dem Gradienten des von den Elektronen erzeugten elektrischen Feldes am Kernort. In einigen Fällen sind die Kernspins S des GZ und des angeregten Zustandes verschieden. So ist $S(^{57}\text{Fe})=1/2$ und $S(^{57}\text{Fe}^*)=3/2$. Dieser Wechsel des Spins ist mit einer Änderung der Ladungsverteilung im Kern verbunden: Im ^{57}Fe ist die Kernladung kugelsymmetrisch (kein Quadrupolmoment) verteilt, im $^{57}\text{Fe}^*$ mehr an den Polen konzentriert (er besitzt ein elektrisches Quadrupolmoment; Kernspin ≥ 1) und ist somit nicht mehr kugelsymmetrisch.

Von allen biologisch relevanten Elementen ist Fe das einzige, welches der Mößbauerspektroskopie zugänglich ist. Für Häm und ihre Protein-Komplexe wie Myoglobin und Hämoglobin wurden bisher zahlreiche Mößbauermessungen durchgeführt, hingegen war eine Untersuchung von (B)Chl und seinen Protein-Komplexen bisher mit dieser Methode nicht möglich. Erst die Synthese von (B)Chl-Derivaten mit Fe als Zentralmetall erlaubt eine Untersuchung durch Mößbauerspektroskopie.

1.3.4.2 Mößbauer-Spektroskopie an ^{57}Fe -Pheophorbid a-17³-methylester

Die Mößbauerspektren des monomeren ^{57}Fe -Me-Pheid a und des μ -oxo-Komplexes wurden in Toluol bei zwei verschiedenen Temperaturen (80 bzw. 5 K) aufgenommen. Während der Messungen bei 5 K wurde zusätzlich ein externes Magnetfeld von 20 mT senkrecht zur Einstrahlrichtung angelegt.

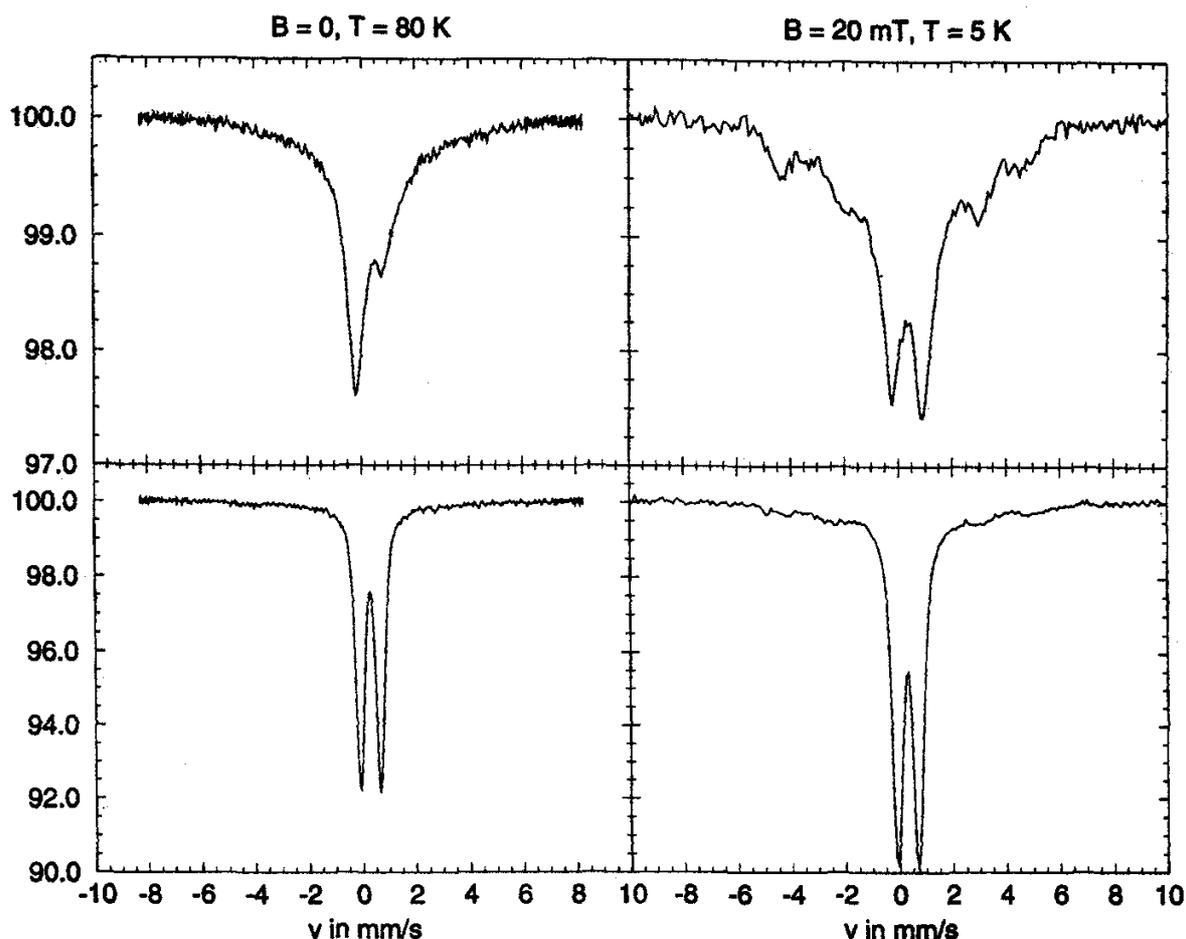


Abb. C-25: Mößbauerspektren von $^{57}\text{FeMe-Pheid a}$ als Monomer (oben) und als $\mu\text{-oxo-Dimer}$ (unten) gemessen in Toluol ohne Magnetfeld und bei 80 K (links) und bei 5K mit einem Magnetfeld von 20mT senkrecht zur Einstrahlrichtung (rechts).

Beim monomeren $^{57}\text{Fe-Me-Pheid}$ kommt es bei 80 K zu einer asymmetrischen Dublettaufspaltung mit geringerer Intensität auf der Flanke mit höherer Geschwindigkeit mit einer Isomerieverschiebung von $0,43 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ und einer Quadrupolaufspaltung von $1,1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Bei tieferen Temperaturen (5K, 0 mT) wird dieses Dublett symmetrisch (Spektrum nicht gezeigt) mit einer Isomerieverschiebung von $0,33 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ und einer Quadrupolaufspaltung von $1,1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Mit einem zusätzlichen Magnetfeld senkrecht zur Einstrahlrichtung kommt es durch Hyperfeinaufspaltung bei gleicher Isomerieverschiebung und Quadrupolaufspaltung zu einem Sechslinienspektrum. Der $\mu\text{-oxo-Komplex}$ zeigt bei beiden Temperaturen ein gut aufgelöstes symmetrisches Quadrupoldublett, dessen Isomerieverschiebung bei tieferen Temperaturen gleich bleibt ($0,43 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$) und dessen Quadrupolaufspaltung steigt ($0,76 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (80K), $0,79 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (5K)). Hier kommt es bei Anlegen eines externen Magnetfeldes zu keiner Hyperfeinaufspaltung (Abb. C-25, Tab. C-8).

	I.S. [mm*s ⁻¹] (80 K)	Q.S. [mm*s ⁻¹] (80 K)	I.S. [mm*s ⁻¹] (5K, 20mT)	Q.S. [mm*s ⁻¹] (5 K, 20 mT)
(⁵⁷ FeMe-Pheid)Cl	0,43	1,1	0,33	1,1
(⁵⁷ FeMe-Pheid) ₂ O	0,43	0,76	0,43	0,79
Fe(Porph)Cl ^[a]	0,41	- ^[b]	0,41 ^[d]	0,46 ^[d]
(FePorph) ₂ O ^[c]	0,40	0,66	0,41 ^[d]	0,67 ^[d]

Tab. C-8: Isomerieverschiebung (I.S.) (relativ zu Eisen) und Quadrupolaufspaltung (Q.S.) des monomeren und dimeren ⁵⁷FeMe-Pheid.

^[a] Daten für Tetraphenylporphyrin entnommen aus [Maricondi et al., 1972]

^[b] Bei 80 K ist hier nur eine Verbreiterung der Linie zu sehen und keine Aufspaltung

^[c] Daten für Tetraphenylporphyrin entnommen aus [Torrens et al., 1972];

^[d] Ohne externes Magnetfeld aufgenommen.

Die Mößbauerspektren von monomeren und dimeren Fe-Porphyrin-Komplexen sind gut charakterisiert [Sams und Tsin, 1979].

Die μ -oxo-Komplexe von verschiedenen substituierten Fe-Porphyrinen zeigen sowohl bei 273 K, 80 K und 5 K zwei gut aufgelöste Peaks, das Quadrupoldublett. Lediglich die Intensität der Peaks ändert sich geringfügig mit der Temperatur. Die Isomerieverschiebung und Quadrupolaufspaltung variiert in einem sehr kleinen Bereich ($0,7 \pm 0,02$ mm/s) bei 80 und 5 K, die aber im Bereich des Meßfehlers liegen. Von peripheren Substituenten ist die Quadrupolaufspaltung ($0,61 - 0,73$ mm/s) nur sehr geringfügig abhängig, während die Isomerieverschiebung davon unabhängig ist. Die kleine Quadrupolaufspaltung weist auf Fe³⁺ *high spin* hin. Das Fehlen einer magnetischen Peakverbreiterung resultiert von einer starken Spin-Spin-Kopplung über die Sauerstoffbrücke zwischen den beiden S=5/2 Fe(III)-Ionen, was zu einer schnellen Relaxation führt [Torrens et al., 1972]. Magnetische Messungen weisen auf eine antiferromagnetische Kopplung hin [Cohen, 1969; Maricondi et al., 1969].

Mößbauerspektren des μ -oxo-Komplexes von Fe(III)PPIX sind symmetrisch [Smalley et al., 1998]. Ist das Spektrum asymmetrisch spricht dies für die Anwesenheit von monomeren *high-spin* Fe(III)PPIX.

Das ⁵⁷Fe-Me-Pheid *a* zeigt eine geringfügig höhere Quadrupolaufspaltung als die Fe-Porphyrine, insbesondere ist dies bei dem monomeren Komplex zu beobachten (Tab. C-8) Die Isomerieverschiebung des monomeren ⁵⁷Fe-Me-Pheid ist bei tiefen Temperaturen niedriger als beim Fe-Porphyrin, wobei dieser Effekt bei Temperaturerhöhung abnimmt. Durch die Hydrierung des Makrozyklus an Ring D verringert sich die Elektronendichte des gesamten Rings und damit auch am Eisen, was zu einer Veränderung der Resonanzlinien und der Aufspaltung führt. Eine genauere Auswertung erfordert allerdings einen Fit der Spektren, der bisher nicht möglich war. Vermutlich enthalten die Mößbauer-Proben, wie die

ESR-Proben Gemische aus monomeren Komplexen bzw. Hydroxo-Komplexen und dimeren μ -oxo- bzw. Dihydroxo-Komplexen, was einen Fit erschwert. Da noch nicht geklärt werden konnte, ob für einen theoretischen Fit zu viele Komponenten in der Probe enthalten sind, oder ob die Probenvorbereitung verbessert werden muss, um weniger Komponenten in den Proben zu haben, wurde auf die Messung von ^{57}Fe -Me-BPheid bisher verzichtet. Durch den Einbau der Fe-(B)Phe in photosynthetische Komplexe sollte es möglich sein, definiertere Strukturen und damit eindeutiger Mößbauerspektren zu erhalten.

2 Rekonstitution des Lichtsammelkomplex 1 mit Fe-Bakteriopheophytin a

2.1 Einführung

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, Antennen-Komplexe des Lichtsammelkomplexes 1 (LH1) zu rekonstituieren, in denen ein oder mehrere BChl gegen Fe-BPhe a^[9] ausgetauscht sind. Diese Versuche wurden nach der von L. Fiedor entwickelten Methode zu der Rekonstitution von LH1 mit Ni-BPhe a [Fiedor et al., 2001] durchgeführt.

Fe-BPhe a hat, wie Ni-BPhe a [Museum et al., 1999b; Fiedor et al., 2000], eine sehr kurze Lebensdauer im angeregten Zustand [Allison und Becker, 1960]. Nach der Absorption von Licht findet durch ultraschnelle (< 100 fs) innere Konversion eine Relaxation des angeregten Zustands statt [Adar et al., 1976]. Eingelagert im LH1 (in dem die absorbierte Lichtenergie über alle BChl verteilt ist), sollte das Fe-BPhe a als effiziente Energiefalle fungieren und die Fluoreszenz löschen, wobei die Abklingzeiten Informationen über den Mechanismus des Energietransfers und excitonische Zustände liefern können. Fe-BPhe a, eingelagert in photosynthetische Komplexe eignet sich zusätzlich gut als spezifische Sonde. Durch den Einbau von ⁵⁷Fe-BPhe a in LH1 kann die Bindungstasche durch ESR und Mößbauermessungen näher untersucht werden, was mit Bakteriochlorophyll a (BChl a) nicht möglich ist.

Das BChl a in Antennen-Komplexen von Purpurbakterien kann gegen modifizierte Pigmente durch drei verschiedene Methoden ausgetauscht werden. Bei der ersten Methode wird der Komplex aus den Membranen isoliert und anschließend unter Zusatz von externem Pigment unter leicht denaturierenden Bedingungen inkubiert, wodurch ein Austausch von BChl a gegen das im Überschuss vorhandene, modifizierte Pigment stattfindet [Lapouge et al., 2000]. Bei der zweiten Methode werden die α - und β -Polypeptide getrennt isoliert, aufgereinigt und nach Zusatz von BChl a oder BChl a-Derivaten wird der Komplex rekonstituiert [Davis et al., 1995; Loach und Parkes-Loach, 1995]. Bei der dritten Methode werden erst die Antennen-Bestandteile BChl a, Carotinoide und die α - und β -Polypeptide gemeinsam isoliert, auf eine Aufreinigung der Einzelkomponenten wird hier im Gegensatz zur zweiten Methode verzichtet. Das modifizierte Pigment wird in einem definierten

^[9] Da in diesem Kapitel die Konformation des Fe-BPhe a (Monomer oder μ -oxo-Dimer) in der Regel nicht entscheidend ist, wurde auf die genaue Strukturbezeichnung (Fe^(III)BPhe a)Cl bzw. (Fe^(III)BPhe a)₂O verzichtet.

Verhältnis zum vorhandenen BChl *a* zugegeben und anschließend wird der LH1-Komplex rekonstituiert [Fiedor et al., 2001]. Die Einlagerung des BChl *a*-Derivates ist eine Konkurrenzreaktion mit dem BChl *a*, so dass sich das modifizierte BChl *a* entsprechend seiner relativen Bindungsstärke in einem statistischen Verhältnis zum BChl *a* einlagert. Mit dieser Methode gelang Fiedor et al. die Rekonstitution von LH1 mit Ni-BPhe *a* [Fiedor et al., 2001]. Durch die Änderung der eingesetzten Menge an Ni-BPhe *a* erhielt er das rekonstituierte LH1 mit variierendem Gehalt an Ni-BPhe *a*. Durch die ultraschnelle innere Konversion (IC) von Ni-BPhe *a* wird die Anregungsenergie strahlungslos abgegeben und die Fluoreszenz gelöscht. Diese Löschung diente neben der HPLC-Analyse der Pigmente als Nachweis für den Einbau von Ni-BPhe *a* ins LH1. Es konnte gezeigt werden, dass bereits die Anwesenheit von einem Ni-BPhe *a* im LH1 ausreicht, um die Fluoreszenz des gesamten Systems (≤ 31 BChl, > 16 Carotinoide) durch IC zu löschen.

Für erste Versuche, ob Fe-BPhe *a* ins LH1 eingebaut werden kann, wurde die dritte Methode gewählt. Diese ist am wenigsten aufwendig, da die Chromatographie der Polypeptide wegfällt, und sie lieferte schon beim Austausch mit Ni-BPhe *a* gute Erfolge. Außerdem erhält man durch die Konkurrenz von Fe-BPhe *a* und BChl *a* bei der LH1-Bildung einen Hinweis auf die Bindungsstärke des Fe-BPhe *a* im Vergleich zu BChl *a*.

In den folgenden zwei Kapiteln (Kap. C-2.2 und Kap. C-2.3) werden die Methode der Extraktion und Rekonstitution und anschließend die Ergebnisse der ersten Rekonstitutionsversuche von Carola Reindl (im Rahmen ihrer Diplomarbeit) beschrieben. Im Kap. C-2.4 werden meine Ergebnisse zu Rekonstitution, Absorption und Fluoreszenz erläutert und mit denen von Carola Reindl sowie Literaturdaten verglichen und diskutiert, das letzte Kapitel (Kap. C-2.5) geht auf die Quantifizierung des Fe-BPhe *a*-Gehalts im LH1 ein.

2.2 Extraktion und Rekonstitution des LH1

Zur Extraktion der Antennenbestandteile des LH1-Komplexes wurden Bakterienzellen einer Mutante (DD13, RC⁻, LH2⁻, aus dem Labor N. Hunter [Jones et al., 1992]) von *Rhodobacter sphaeroides* verwendet, die weder Reaktionszentren noch LH2-Antennen enthalten. Die Extraktion erfolgte wiederholt mit einem Gemisch aus Methanol und Chloroform [Theiler et al., 1984]. Im ersten Extraktionsschritt werden durch Mörsern hauptsächlich die Pigmente, BChl und Carotinoide extrahiert. Durch rasches Arbeiten auf Eis wird eine Degradierung der Pigmente verhindert. Im zweiten Schritt werden durch Aufschluss im Ultraschallbad die im Extraktionslösungsmittelgemisch löslichen α - und β -Untereinheiten isoliert. Im letzten Schritt

wird die β -Untereinheit vollständig isoliert, indem das Lösungsmittelgemisch mit Essigsäure versetzt und damit die Löslichkeit der β -Untereinheit erhöht wird.

Für die Rekonstitution wird der dunkelrote Extrakt, in dem sich die Pigmente und Apoproteine der LH1-Antenne befinden halbiert. Der eine Teil wird mit so viel Fe-BPhe *a* versetzt, dass man ein Verhältnis von 1:1 von BChl *a* zu Fe-BPhe *a* erhält. Bei der Zugabe von Fe-BPhe *a* muss nicht darauf geachtet werden, in welcher Konformation (Monomer oder μ -oxo-Dimer) es vorliegt, denn nach Entfernen des organischen Lösungsmittel und Resuspension in *n*-Octyl- β -glucopyranosid-Puffer (β -OG-Puffer) liegt das Fe-BPhe *a* in jedem Fall als μ -oxo-Komplex vor. Parallel wird aus dem zweiten Teil eine Rekonstitution ohne Zusatz von Fe-BPhe *a* durchgeführt; dieser Rekonstitutionsansatz dient als Kontrolle.

Die LH1-Komponenten werden aus dem organischen Lösungsmittel in Tris(hydroxymethylamin)methan-Puffer (Tris-Puffer) überführt. Die Rekonstitution des LH1-Komplexes gelang nach einer Vorschrift von Fiedor et al. [Fiedor et al., 2001] durch Zugabe von β -OG-haltigem (3,4 %) Tris-Puffer und anschließender schrittweisen Verdünnung mit Tris-Puffer auf eine Endkonzentration von 1,1 % β -OG. Diese Verdünnungsmethode ist in der Literatur mehrfach für die Rekonstitution des LH1 sowohl aus *Rhodobacter sphaeroides* als auch aus *Rhodospirillum rubrum* beschrieben [Loach und Parkes-Loach, 1995; Davis et al., 1996; Davis et al., 1995]. Bei hoher β -OG-Konzentration bildet sich zunächst der carotinoidfreie Subkomplex B820 [Meadows et al., 1998; Loach und Parkes-Loach, 1995] mit der wahrscheinlichen Zusammensetzung $\alpha\beta$ 2BChl, durch Senken der β -OG-Konzentration bildet sich der höher ($n = 16$) aggregierte LH1-Komplex. Nach Entfernung der nichtlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurde der Rekonstitutionsansatz über eine Ionenaustauscher-Säule (DEAE^[10]-Sephacel) gereinigt. Bei niedrigen Salzkonzentrationen bindet der gesamte Rekonstitutionsansatz auf der Säule, durch schrittweise Erhöhung der NaCl-Konzentration im Spülpuffer werden folgende Fraktionen eluiert: bei 140 mM NaCl eluieren freie Pigmente, bei 190 mM NaCl der carotinoidfreie Subkomplex B820 ($\lambda_{\max} = 820$ nm) und bei 400 mM NaCl der rekonstituierte LH1-Komplex ($\lambda_{\max} = 875$ nm).

Alle Fraktionen wurden absorptionsspektroskopisch vermessen, wobei die ersten beiden Fraktionen nur auf die Anwesenheit des rekonstituierten LH1-Komplexes überprüft wurden, die leicht an der stark rotverschobenen Q_y -Bande ($\lambda_{\max} = 875$ nm) erkennbar ist, im Gegensatz zu der der freien Pigmente BChl ($\lambda_{\max} = 777$ nm), μ -oxo-Fe-BPhe ($\lambda_{\max} = 820$ nm) und dem carotinoidfreien Subkomplex ($\lambda_{\max} = 820$ nm). Um sicherzustellen, dass kein

^[10] DEAE = Diethylaminoethyl

Pigment unspezifisch am LH1 gebunden ist, wurde der Komplex ein zweites Mal auf einer DEAE-Sepharose-Säule unter den gleichen Bedingungen wie oben gereinigt. Die Ausbeute lag nach der zweiten Säule durchschnittlich bei 7-10 % bezogen auf die isolierte Menge BChl *a*. Im Anschluss an die Chromatographien wurden jeweils, ohne die Proben zwischendurch einzufrieren, Fluoreszenz-Emissionsspektren aufgenommen.

Die Rekonstitutionsversuche von Carola Reindl im Rahmen ihrer Diplomarbeit [Reindl, 2000] wurden nach obiger Vorschrift mit zwei Abweichungen durchgeführt: 1) Der zugesetzte Fe-BPhe *a* -Anteil wurde im Bereich von 11-110 % Fe-BPhe *a* bezogen auf BChl *a* variiert. 2) Das rekonstituierte LH1 wurden nur einmal auf einer DEAE-Sepharose-Säule aufgereinigt, alle Proben eingefroren und anschließend, als alle Proben zu Verfügung standen, mittels Absorption und Fluoreszenz vermessen. Im folgenden Kapitel werden diese Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

2.3 Erste LH1-Rekonstitutionsversuche

[Reindl, 2000]

Die Rekonstitution wurde sechsmal mit variierendem Fe-BPhe *a* -Anteil (11, 17, 34, 37, 100 und 111 % bezogen auf BChl *a* im Zellextrakt) durchgeführt, der Ansatz über eine DEAE-Sepharose-Säule aufgereinigt und mittels Absorption und Fluoreszenz vermessen. Die Absorptionsbanden aller Präparation liegen bei dem nicht modifizierten LH1 (reko-LH1) und bei dem mit Fe-BPhe *a* rekonstituierten LH1 (Fe-LH1) bei 374, 502 und 877 nm. Die Intensität der Carotinoid-Bande bei 500 nm schwankt in einem sehr kleinen Bereich von 69-73 % bezogen auf die Intensität der Q_y-Bande (100 %). Unterschiede ergaben sich auch im Pigment-Protein-Verhältnis, wobei dieses Verhältnis bei den mit Fe-BPhe rekonstituierten Komplexen geringfügig größer war als bei den nicht modifizierten LH1-Komplexen. Jede Präparation wurde nach der Elution von der DEAE-Sepharose-Säule unter Argon bei -20 °C eingefroren. Nachdem alle Präparationen zur Verfügung standen, erfolgte die erste Fluoreszenzmessung mit Anregung bei 500 nm. Die Proben wurden danach wieder eingefroren und später eine zweite Messung erneut mit Anregung bei 500 nm und zusätzlich mit Anregung bei 850 nm durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. C-9 zusammengefasst.

Präp	zugewetztes FeBPhe- Anteil [%]	1. Messung		2. Messung	
		F_{\max} [nm]	F_{rel} [%] 500 nm-Anregung	F_{\max} [nm]	F_{rel} [%] 500 nm-Anregung
1 reko-LH1	-	894	100	892	100
1 Fe-LH1	11	892	39	901	260
2 reko-LH1	-	899	100	899	100
2 Fe-LH1	17	901	83	902	92
3 reko-LH1	-	903	100	906	100
3 Fe-LH1	34	903	80	907	77
4 reko-LH1	-	904	100	907	100
4 Fe-LH1	38	902	122	903	204
5 reko-LH1	-	901	100	905	100
5 Fe-LH1	101	902	96	903	108
6 reko-LH1	-	900	100	901	100
6 Fe-LH1	111	901	50	903	56

Tab. C-9: Vergleich der Fluoreszenzmaxima und -intensitäten der nativen und der mit Fe-BPhe versetzten Rekonstitutionsansätze:

Angegeben sind die Maxima der Emissionsspektren (F_{\max}) sowie die Änderung der Emissionsintensität des Fe-LH1 (F_{rel} [%]) im Vergleich zum reko-LH1 (bezogen auf die gleiche Absorption bei der Anregungswellenlänge) bei beiden Messungen.

Die Messungen zeigen folgende Ergebnisse:

1. Alle 500 nm Anregungsspektren des Fe-LH1 und reko-LH1 zeigen eine einzige Emissionsbande. Dabei liegen die Maxima der verschiedenen Präparationen nach der ersten Säulenchromatographie zwischen 892 und 907 nm.
2. Bei der zweiten Messung (Anregung bei 500 nm) zeigen die Produkte aller Präparationen Fluoreszenzintensitäten die mindestens um die Hälfte geringer als bei der ersten Messung sind, obwohl sich die Absorption nicht ändert (nicht dargestellt).
3. Bei gleicher Verdünnung verschiedener einheitlich rekonstituierter Proben, d.h. bei gleicher Absorption sollte die Fluoreszenzintensität gleich sein; dies entspricht dem Quotienten Fluoreszenzintensität / Absorption. Dieser schwankt aber selbst für reko-LH1 ohne Fe-BPhe *a* in einem großen Bereich. Die Werte liegen bei der 1. Messung zwischen 35,5 und 97,1 für reko-LH1, bei der 2. Messung zwischen 12,2 und 31,6.

4. Die Fluoreszenzintensitäten von Fe-LH1 relativ zu reko-LH1 (Fluoreszenzintensität entspricht 100 %) sind in Tab. C-9 angegeben. Bei der ersten Messung zeigen fünf von sechs Präparationen eine Abnahme der Intensität. Bei der zweiten Messung ist bei drei von sechs Modifikationsversuchen die Fluoreszenz teilweise gelöscht, bei anderen ist die Fluoreszenzintensität deutlich erhöht. Bei der Anregung bei 850 nm haben zwei Fe-Präparationen eine niedrigere Emission als die nativ rekonstituierten Komplexe (nicht gezeigt).
5. Weder die Verschiebungen noch die Fluoreszenzintensitäten des Fe-LH1 relativ zu den reko-LH1 lassen eine Korrelation mit der eingesetzten Fe-BPhe α -Menge zu.

Die Werte der Absorption des rekonstituierten LH1 sind mit den literaturbekannten Daten identisch und entsprechen denen des nativen, aus Membranen isolierten Komplexes von *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* [Fiedor et al., 2001; Davis et al., 1995].

Aufgrund der unterschiedlichen Werte für das Verhältnis von Fluoreszenzintensität zu Absorption schon innerhalb der reko-LH1-Reihe, kann nicht davon ausgegangen werden, dass einheitliche Präparationen vorlagen. Die großen Änderungen der Fluoreszenzintensitäten zwischen den ersten und den zweiten Messungen zeigt, dass die Proben instabil sind. Eventuell erfolgte durch das Einfrieren und Auftauen eine teilweise Denaturierung des Komplexes, was die niedrigeren Fluoreszenzintensitäten der zweiten Messungen erklären würde. Das LH1 von *Rb. sphaeroides* ist im Vergleich zu dem anderer Purpurbakterien, z.B. *Rhodospirillum rubrum*, sehr labil [Fiedor et al., 2001]. Geringe Mengen von freiem BChl α in der Lösung sind im Absorptionsspektrum nicht zu erkennen, da der Extinktionskoeffizient des freien Pigmentes niedriger als der des LH1 ist ($\epsilon_{\text{BChl}} = 90 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{\text{LH1}} = 126 - 118 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; [Bandilla, 1995]). Allerdings wurde keine Fluoreszenzbande für freies BChl α bei 800 nm beobachtet. Das freie BChl α kann aber auch in Aggregaten vorliegen, die keine Fluoreszenz zeigen und in der Absorption ähnliche Maxima ($\lambda_{\text{max}} \sim 850 \text{ nm}$) wie die Antennen haben und somit schlecht erkannt werden können.

Die starke Streuung der Werte der Fluoreszenzintensitäten und der Verschiebungen können nicht mit den zugesetzten Fe-BPhe α -Mengen in Einklang gebracht werden und machten es erforderlich, die Rekonstitution zu optimieren.

2.4 Rekonstitution mit zwei Chromatographieschritten

Beim folgenden Verfahren wurde das rekonstituierte LH1 sofort nach der ersten Säulenchromatographie absorptions- und fluoreszenzspektroskopisch vermessen, nach dem anschließenden Einfrieren nochmals säulenchromatographisch aufgereinigt und wieder unmittelbar anschließend vermessen. Für die Rekonstitution mit Fe-BPhe a wurde beiden Ansätzen 100 % Fe-BPhe a (bezogen auf den BChl-Gehalt der Extraktionslösung) zugesetzt.

2.4.1 Absorptionsspektren

Die Absorptionsbanden des rekonstituierten LH1 ohne Zusatz von Fe-BPhe a (reko-LH1) liegen nach der ersten Säulenchromatographie bei 376 nm, 500 / 504 nm und 877 / 879 nm (siehe Tab. 2, Abb. C-26). Nach der zweiten Säulenchromatographie absorbieren beide Präparationen bei 376 nm, 501 nm und 876 nm. Der Carotinoid-Gehalt variiert in einem kleinen Bereich. Als Maß für den Carotinoid-Gehalt ist das Verhältnis des Carotinoid-Peaks bei 501 nm zur Q_y -Bande angegeben ($Car / Q_y = E_{500 \text{ nm}} / E_{Q_y}$, Tab. C-10). Dies Verhältnis liegt beim reko-LH1 nach der ersten Säulenchromatographie bei 0,74 und 0,72, nach der zweiten Säulenchromatographie bei beiden Präparationen bei 0,75.

Versuch	Präp	1. Säulenchromatographie			2. Säulenchromatographie		
		Car [nm]	Q_y [nm]	Car / Q_y	Car [nm]	Q_y [nm]	Car / Q_y
A	reko-LH1	504	879	0,74	501	876	0,75
A	Fe-LH1	501	876	0,73	501	876	0,84
B	reko-LH1	500	877	0,72	501	876	0,75
B	Fe-LH1	501	876	0,81	501	876	0,81

Tab. C-10: Absorptionsmaximum der langwelligen Bande und Carotinoid-Gehalt ($E_{500 \text{ nm}}/E_{Q_y}$) des reko-LH1 und Fe-LH1 nach der ersten und zweiten DEAE-Sepharose-Säulenchromatographie

Die Absorptionsspektren des mit Fe-BPhe a rekonstituierten LH1 (Fe-LH1) sind denen des reko-LH1 nach der zweiten Säulenchromatographie sehr ähnlich. Es treten keine Verschiebungen der Soret-, Carotinoid- oder Q_y -Bande auf. Lediglich in den Intensitäten der Carotinoid- und Soret-Bande lassen sich geringe Unterschiede erkennen. Das Verhältnis Car / Q_y liegt nach der ersten Säulenchromatographie bei 0,73 bzw. 0,81 und nach der

zweiten Säulenchromatographie bei 0,84 bzw. 0,81. Der Carotinoid-Gehalt ist bei den Fe-LH1-Präparationen um ca. 10 % gegenüber dem der reko-LH1-Komplexe erhöht.

Die Absorptionsspektren des rekonstituierten LH1 und des Produkts der Rekonstitution mit Fe-BPhe *a* der Präparation B nach der zweiten Säulenchromatographie sind in Abb. C-26 dargestellt.

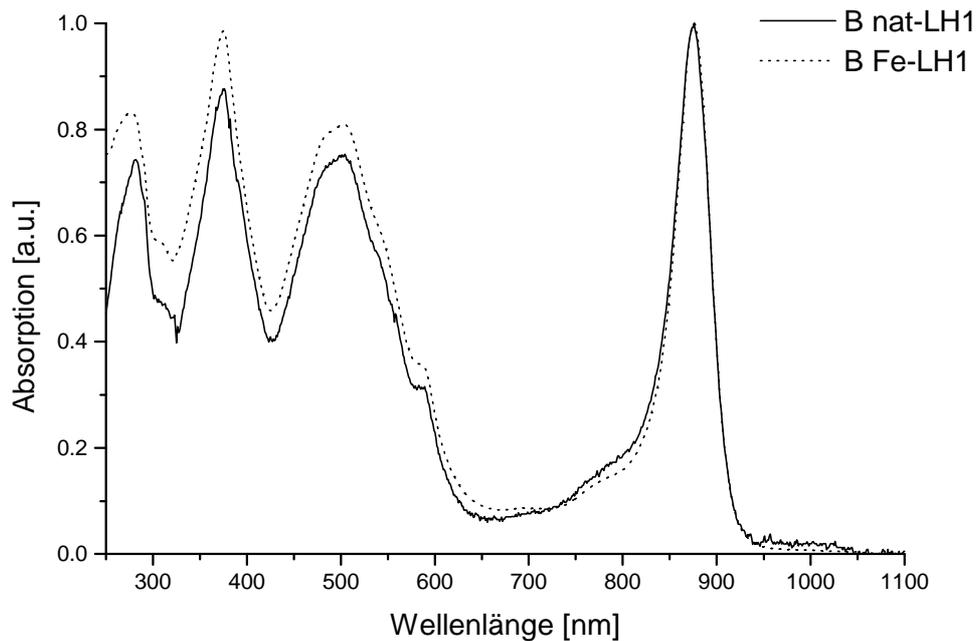


Abb. C-26: Absorptionsspektrum des rekonstituierten LH1 (—) und des mit Fe-BPhe *a* rekonstituierten LH1 (· · ·) in 0,8 % β -OG-Puffer (20 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 7,6) nach der zweiten DEAE-Sephrose-Säulenchromatographie.

2.4.2 Fluoreszenz

Die Fluoreszenzemissionen wurde nach Anregung bei 500 nm im Q_y -Bereich von 650 nm – 1000 nm gemessen. Die 500 nm-Anregungsspektren des reko-LH1- und Fe-LH1 zeigen alle eine einzige Emissionsbande im Bereich von 891 nm bis 895 nm (siehe Tab. C-11). Bezogen auf das langwelligste Absorptionsmaximum ($\lambda_{\max} = 876$ nm) ist die Emission durch den Stokes-shift [Gauglitz, 1986] um 15 - 19 nm langwellig verschoben.

Das Verhältnis von Fluoreszenz-Intensität / Absorption (F/A) liegt in einem Bereich von 1,14 – 2,19, wobei das Verhältnis bei Fe-LH1-Komplexen kleiner als bei reko-LH1 ist. Somit schwankt das Verhältnis in einem sehr viel kleineren Bereich als bei den ersten Rekonstitutionsversuchen mit unterschiedlichem Fe-BPhe-Gehalt. Die absoluten

Fluoreszenzintensitäten sind geringer als bei den ersten Versuchen, da die Messungen in einer Halbmikroküvette durchgeführt wurden (bei den ersten Versuchen in einer 1 cm-Küvette). Die relativen Fluoreszenzintensitäten des Fe-LH1 bezogen auf 100 % Fluoreszenz der zugehörigen reko-LH1-Kontrolle bestätigen nach der ersten Säulenchromatographie die Ergebnisse der ersten Rekonstitutionsversuche. Bei einer Fe-LH1-Probe ist die Fluoreszenzintensität höher, als die der Kontrolle, bei der anderen Probe wird die Fluoreszenz gelöscht. Nach der zweiten Säulenchromatographie erhält man für beide Fe-LH1-Proben eine Löschung der Fluoreszenz. Eine Probe liegt bei 66 %, die andere bei 70 % Fluoreszenzintensität bezogen auf 100 % Intensität der reko-LH1.

Präp	1. Säulenchromatographie			2. Säulenchromatographie		
	F [nm]	F _{rel} [%]	F / A	F [nm]	F _{rel} [%]	F / A
A reko-LH1	891	100	1,35	892	100	1,74
A Fe-LH1	891	118	1,58	891	66	1,14
B reko-LH1	893	100	1,81	893	100	2,19
B Fe-LH1	895	79	1,44	891	70	1,55

Tab. C-11: Fluoreszenzdaten der LH1-Rekonstitutionen nach 1. und 2. Säulenchromatographie. F_{rel} ist bezogen auf 100% Fluoreszenz von reko-LH1 und korrigiert mit dem Faktor des Verdünnungsunterschieds bei der Anregungswellenlänge ($\lambda = 500$ nm).

2.4.3 Diskussion

Die Absorptionsbanden und der Carotinoid-Gehalt des aufgereinigten LH1 entsprechen den Literaturdaten des nativen LH1 in β -OG-Puffer [Fiedor et al., 2001]. Der Carotinoid-Gehalt ist nach der ersten Säulenchromatographie im Vergleich der Präparation A und B unterschiedlich, nach der zweiten Säulenchromatographie, haben die beiden reko-LH1 bzw. Fe-LH1-Präparationen einen gleich hohen Carotinoid-Gehalt. Es scheint, dass das rekonstituierte LH1 erst nach der zweiten Säulenchromatographie eine optimale Konformation erreicht, was eventuell auf Konzentrationsunterschiede des LH1 im Verhältnis zur β -OG-Konzentration zurückzuführen ist. Die Bildungs- und Denaturierungsgeschwindigkeiten des LH1 sind stark abhängig vom Verhältnis β -OG zu LH1 in der Lösung [Loach und Parkes-Loach, 1995]. Auch der Einbau von Ni-BPhe a in den rekonstituierten LH1 nach der gleichen Methode ergab nur geringfügige Änderungen in den Absorptionsbanden [Fiedor et al., 2001]. Es erfolgte eine Blauverschiebung der Q_y-Bande um 2 - 3 nm nach Einbau von 3 - 20 % Ni-BPhe a, sowie eine Intensitätsabnahme der Carotinoid-Bande um 26 % bei einem Gehalt von 57 % Ni-BPhe a. Es kommt also auch bei einem Austausch von über 50 % des BChl a mit Ni-BPhe a nur zu sehr geringen Änderungen

in den Absorptionsspektren, die abhängig sind von Ni-BPhe a -Gehalt. Aus den Absorptionsspektren lässt sich damit die erfolgreiche Rekonstitution erkennen, sie lassen aber keinen Rückschluss auf einen erfolgreichen Einbau von Fe-BPhe a zu.

Im Gegensatz dazu kam es bei der LH1-Rekonstitution mit den isolierten α - und β -Peptiden des LH1 aus *Rb. sphaeroides* in Gegenwart von anderen BChl a -Derivaten zu größeren Absorptionsänderungen [Davis et al., 1996]. Die Q_y -Bande ist deutlich blauverschoben bei [3-Vinyl]-BChl a (858 nm) und Cd-BPhe a (852 nm) im Vergleich zur Rekonstitution mit BChl a (874 nm), wenn nur modifiziertes Pigment bei der Rekonstitution angeboten wird.

Durch die Anregung im Carotinoid-Bereich der Komplexe findet nur bei intakten Komplexen ein Energietransfer auf das BChl a statt, das die Energie in Form von Fluoreszenz abgibt. Sind in den LH1-Komplexen ein oder mehrere BChl a gegen Fe-BChl a ausgetauscht, wird durch die rasche innere Konversion des Fe-BPhe a ein Quenchen der Fluoreszenz erwartet. Erst nach der zweiten Säulenchromatographie tritt eine einheitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität um 30 % bzw. 34 % bezogen auf 100 % Intensität des reko-LH1 ein.

Die Beeinflussung der Emissionseigenschaften des LH1 durch den Einbau eines externen Pigments sind am Beispiel des Ni-BPhe a bereits untersucht worden [Fiedor et al., 2001]. Es konnte gezeigt werden, dass eine teilweise Inkorporation von Ni-BPhe a in den Komplex zu einer drastischen Abnahme der Emission führt. Bei Vergleich des prozentualen Anteils an Ni-BPhe a im Rekonstitutionsgemisch und anschließender Pigmentanalyse mittels HPLC wurde sogar ein bevorzugter Einbau des Ni-BPhe a festgestellt. Dabei führte die Erhöhung der Menge an modifiziertem Pigment zu einer Erniedrigung der Emissionsintensität. Ein Anteil von 27 % Ni-BPhe a im LH1 löscht die Fluoreszenz bereits vollständig. Das Ni-BPhe a wirkt demnach in der Antenne als äußerst effizienter Deaktivierungskanal, der durch die Anwesenheit einer Kaskade von sowohl Metall- als auch p -zugehöriger Energieniveaus, die ihre Energie schrittweise über „internal conversion“ abgeben, verursacht wird [Hartwich et al., 1995]. Bereits aus einem Gehalt von 3,2 % Ni-BPhe a resultiert eine Löschung der Fluoreszenz um 50 %.

Übertragen auf die gemessene Fe-LH1-Emission (Löschung um ca. 30 %) würde dies bei gleicher Energieübertragung eine Inkorporation von ca. 2 % Fe-BPhe a bedeuten. Dies würde auf eine äußerst schwache Bindungsaffinität des Fe-BPhe a hinweisen, da das Fe-BPhe a im Verhältnis 1:1 zu BChl a eingesetzt wurde. Eine andere, allerdings weniger wahrscheinliche Erklärung für die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen ist, dass das Fe-BPhe a eine ähnliche Bindungsaffinität wie BChl a oder auch Ni-BPhe a hat, aber im

eingebauten Zustand nicht in der Lage ist, die Fluoreszenz genauso effektiv zu quenchen wie Ni-BPhe *a*. Deshalb sollte der FeBPhe-Gehalt in den Antennenkomplexen quantitativ bestimmt werden.

2.5 Quantifizierung des Fe-Bakteriopheophytin *a*-Gehalts

2.5.1 Einführung

Im Allgemeinen erfolgt die Bestimmung des Pigmentgehalts von Pigment-Protein-Komplexen (RC [Meyer, 1997; Hartwich, 1994], LH2 [Bandilla, 1995] und LH1 [Fiedor et al., 2001]) in zwei Schritten. Im ersten Schritt werden die Pigmente aus dem Protein extrahiert und in organisches Lösungsmittel überführt. Der LH1-Komplex wurde dazu auf eine DEAE-Sepharose-Säule aufgetragen und mit Puffer gespült, um das Detergenz zu entfernen. Anschließend wird die Säule mit Argon trocken geblasen und die Pigmente mit MeOH/Aceton eluiert. Im zweiten Schritt werden die Pigmente über HPLC-chromatographische Analyse getrennt und quantifiziert. Mit dieser Methode können die Pigmente rasch extrahiert werden und durch Arbeiten unter Schutzgas kann das Entstehen von Abbauprodukten (z.B. 13²-Hydroxy-bakteriochlorophyll *a* (13²-OH-BChl *a*), 3-Devinyl-3-acetyl-chlorophyll *a* ([3-Acetyl]-Chl *a*), Strukturformeln siehe Kap. F-3.1 und Kap. F-3.2) vermieden werden.

2.5.2 HPLC-Analyse

Das Monomer-Dimer-Gleichgewicht, sowie die Bindung von Fe-BPhe *a* in neutraler Lösung an das Kieselgel macht die Chromatographie der Fe-BPhe *a* -Derivate auf HPLC schwierig. Versuche auf Dünnschicht und LC zeigten (Siehe Kap. C-1.2.6), dass das Fe-BPhe *a* auf Kieselgel in neutraler Lösung am Start bleibt und erst nach Ansäuern als Monomer läuft. Das Laufmittel wurde nicht von Beginn an angesäuert, da sonst das BChl *a* pheophytinisiert und dann im sauren Laufmittel stark tailt. Trotz dieser Nachteile der Kieselgelmatrix als stationäre Phase wurde diese für die Trennung von Fe-BPhe *a* und BChl *a* gewählt. Nur auf Kieselgel war es möglich, das Fe-BPhe *a* in einer Bande zu isolieren. Auf RP mit Aceton / Acetonitril [Furuya et al., 1987] läuft das Fe-BPhe *a* (und auch das Fe-Phe *a*, d.h. das mit Phytol veresterte Chl *a*) zu schnell. Eine Reduzierung der Retentionszeit ist nur durch Zugabe von polareren Lösungsmitteln (MeOH, H₂O) möglich. Dadurch verschiebt sich das Monomer-Dimer-Gleichgewicht auf die Seite des Dimers, was zu einem starken Tailing der Bande führt.

Es wurde ein HPLC-System entwickelt [Reindl, 2000], in dem sowohl die Carotinoide, das BChl *a* und das Fe-BPhe *a* gut voneinander getrennt laufen. Für die Trennung der Carotinoide und des BChl *a* bestand bereits ein guter HPLC-Gradient für Kieselgel als stationäre Phase (private Aufzeichnungen, Ingrid Simonin), der nur geringfügig modifiziert wurde. Die Trennung erfolgte mit einem linearen Gradienten (Tab. C-12).

Deshalb wurde nach der Eluierung des BChl *a* das polare Laufmittel B gegen das polare, angesäuerte Laufmittel C gewechselt, mit dem das Fe-BPhe *a* eluiert werden kann.

Laufmittel\Zeit	0 min	20 min	20,01 min	28 min	33 min
A	90 %	30 %	30 %	30 %	100 %
B	10 %	70 %	0 %	0 %	0 %
C	0 %	0 %	70 %	70 %	0 %

Tab. C-12: HPLC-Gradient für die Trennung von BChl *a* und Fe-BPhe *a* (LM A = Toluol; LM B = Toluol, 5 % Aceton, 4 % MeOH, 1 % iProp; LM C = 37,5 % Toluol, 50 % Aceton, 12,5 % konz. AcOH); die Übergänge von 0 – 20 min und von 20,01 – 33 min erfolgten jeweils linear, von 20 – 20,01 min als Stufe.

Mit dem beschriebenen Gradienten ist es möglich, BChl *a*, Carotinoide und Fe-BPhe *a* voneinander zu trennen. Abbauprodukte des Fe-BPhe *a*, wie z.B. Fe-[3-Acetyl]-Phe *a* oder Fe-13²-OH-BPhe *a* (Strukturformeln siehe Kap. F-3.1 und F-3.2), können mit diesem Gradienten nicht vom Fe-BPhe *a* abgetrennt werden, da die Fe-BPhe *a* -Derivate alle unmittelbar nach dem Zusatz von Säure zum Laufmittel mit der Laufmittel-Front eluieren. Ein geringerer Säureanteil führt zwar zu einer verringerten Laufgeschwindigkeit, aber auch zum Schmierens des Fe-BPhe *a* auf der Säule, so dass damit keine Trennung der Fe-BPhe *a* -Derivate erfolgt.

Das Chromatogramm (Abb. C-27) zeigt die Trennung des BChl *a* und des Fe-BPhe *a* mit dem oben beschriebenen Gradienten. Die Zuordnung der Banden erfolgte über ihre Absorptionsspektren. Die erste Fraktion bei 8,7 min wurde als das 13²(S)-BChl (BChl *a'*) identifiziert, die nachfolgende Fraktion bei 9,0 min als das 13²(R)-BChl (BChl *a*). Bei 23,8 min eluiert das Fe-BPhe *a* in einer Bande.

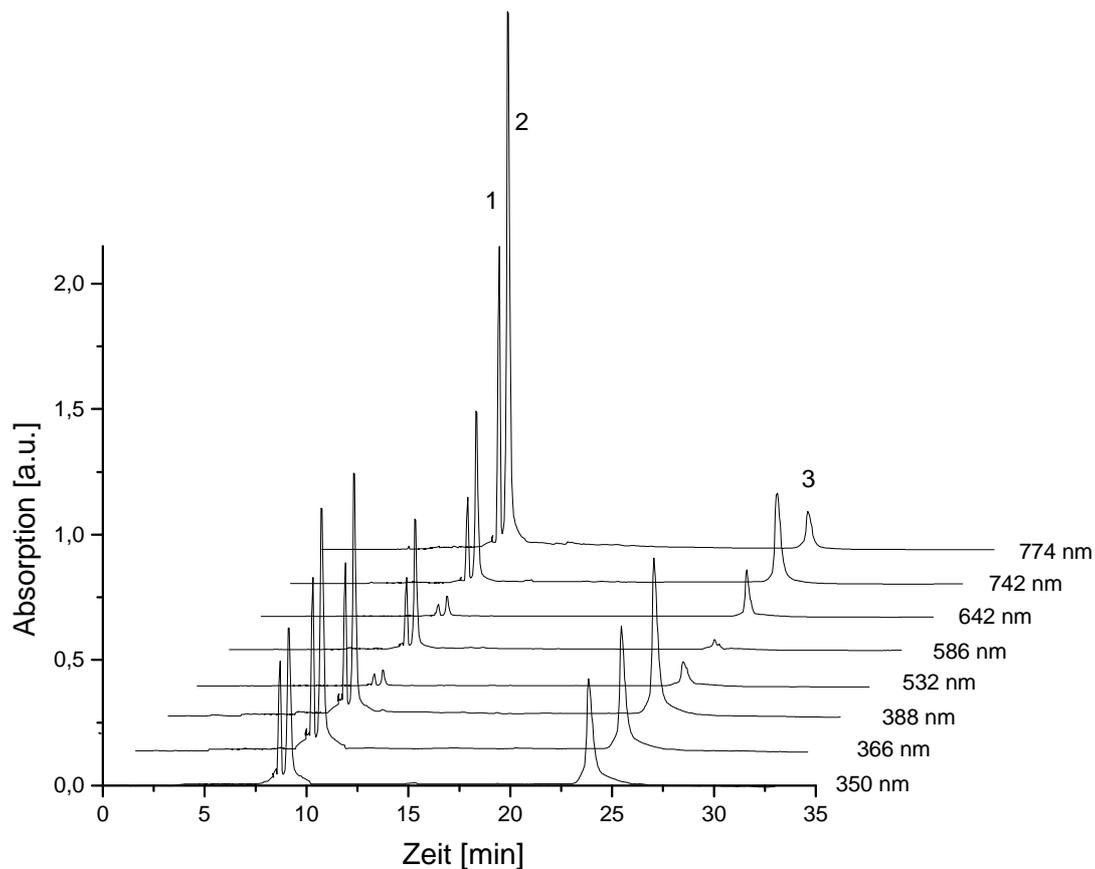


Abb. C-27: HPLC-Chromatogramme bei verschiedenen Detektionswellenlängen für die Trennung von BChl a und Fe-BPhe a (1 = BChl a'; 2 = BChl a; 3 = Fe-BPhe)

2.5.3 Problematik der Pigment-Extraktion nach Standard-Methode

Aus den Vorversuchen von Carola Reindl wurde ersichtlich, dass die Extraktion des Fe-BPhe a der schwierigere Schritt ist: Bei den Vorversuchen wurde jeweils eine Pigmentmischung (BChl a, Fe-BPhe a) mit dem LH1 auf die Vollständigkeit der Extraktionsmethode untersucht.

Bei der Standardextraktion über eine DEAE-Sepharose-Säule kann das Fe-BPhe a nicht quantitativ von der Säule eluiert werden. Auch durch Modifikation des Laufmittels, durch Zugabe von Pyridin, um eine Ligation des Fe an das Säulenmaterial zu verhindern, konnte bei der Extraktion aus LH1 kein Fe-BPhe a auf der HPLC detektiert werden, bei Verwendung von Pigmentmischungen wurden lediglich 23 % des zugesetzten Fe-BPhe wieder gefunden. Aus diesem Grund wurden weitere Versuche zur Extraktion der Pigmente unternommen. Um eine HPLC-Analyse vornehmen zu können, muss das Detergenz aus dem Extraktionsgemisch vollständig entfernt werden, da es ansonsten das Laufverhalten auf der HPLC stark beeinflusst.

Es wurde versucht, den Komplex bzw. eine Pigmentmischung gefrierzutrocknen, in Aceton aufzunehmen und nach Zentrifugation der unlöslichen Bestandteile zu vermessen. In der Pigmentmischung konnten nur 3,5 % des eingesetzten Fe-BPhe *a* auf der HPLC detektiert werden, bei dem LH1-Komplex kein Fe-BPhe *a*. Auch scheint bei dieser Methode das Detergenz nicht vollständig entfernt zu werden, was bei der HPLC verändertes Laufverhalten und hohe Drücke verursacht.

Des Weiteren wurde versucht, das Detergenz durch Zusatz von Biobeads zu entfernen. Im Kontrollversuch mit Pigmentmischungen wurden 21 % des zugesetzten Fe-BPhe *a* detektiert, beim LH1 hingegen wieder keines.

Wegen dieser Schwierigkeiten bei der vollständigen Extraktion der Pigmente und der vollständigen Entfernung des Detergenz wurde nach alternativen Möglichkeiten gesucht, die einen Nachweis des Fe-BPhe *a* in den Komplexen durch schnelle Extraktion und ohne Entfernen des Detergenz ermöglichen.

2.5.4 Nachweis über Differenz-Absorptions-Spektroskopie

Für den Fe-BPhe *a*-Nachweis kann man die Tatsache ausnützen, dass Fe-BPhe *a* unter geeigneten Bedingungen als μ -oxo-Komplex bzw. monomer vorliegt, da sich beide Systeme durch ihre unterschiedlichen Absorptionsspektren unterscheiden lassen. Als geeignetes Lösungsmittel, in dem das Fe-BPhe *a* als μ -oxo-Komplex vorliegt hat sich MeOH / 5 % 20 mM Tris pH 7,5 herausgestellt. Bei Zugabe von festem Imidazol wird der μ -oxo-Komplex durch die Komplexierung mit dem Liganden Imidazol gespalten, so dass das Fe-BPhe *a* monomer vorliegt. Abb. C-28 zeigt die Verschiebung zwischen Monomer und μ -oxo-Komplex sowie das Differenzspektrum.

In der Lösung in Methanol liegen die Absorptionsbanden des μ -oxo-Komplexes im Soret-Bereich bei 342 nm und 380 nm, die Q_x -Bande bei 506 nm, und im Q_y -Bereich befinden sich zwei breite Banden bei 663 nm und 834 nm. Nach Zugabe von Imidazol verliert die Soret-Bande an Intensität und die Maxima liegen bei 348 nm und 387 nm. Die Q_x -Bande ist durch die Ligandierung mit Imidazol langwellig nach 562 nm verschoben (fünffach koordiniertes Fe). Die Q_y -Bande wird durch die Monomerisierung sehr viel schärfer und liegt bei 784 nm. Im Differenzspektrum erscheinen im Soret-Bereich durch die geringere Intensität des Imidazol-komplexierten Fe-BPhe *a* zwei negative Banden bei 334 nm und 380 nm. Im Q_x -Bereich liegt ein positiver Peak bei 560 nm, im Q_y -Bereich erscheint eine positive Bande bei 780 nm und eine ausgeprägte negative Bande bei 845 nm. Die Intensität der positiven Bande im Q_y -Bereich liegt bei fast 60 % der Intensität der Q_y -Bande im Imidazol-Spektrum und die negative Bande bei 70 % der Q_y -Bande im μ -oxo-Spektrum.

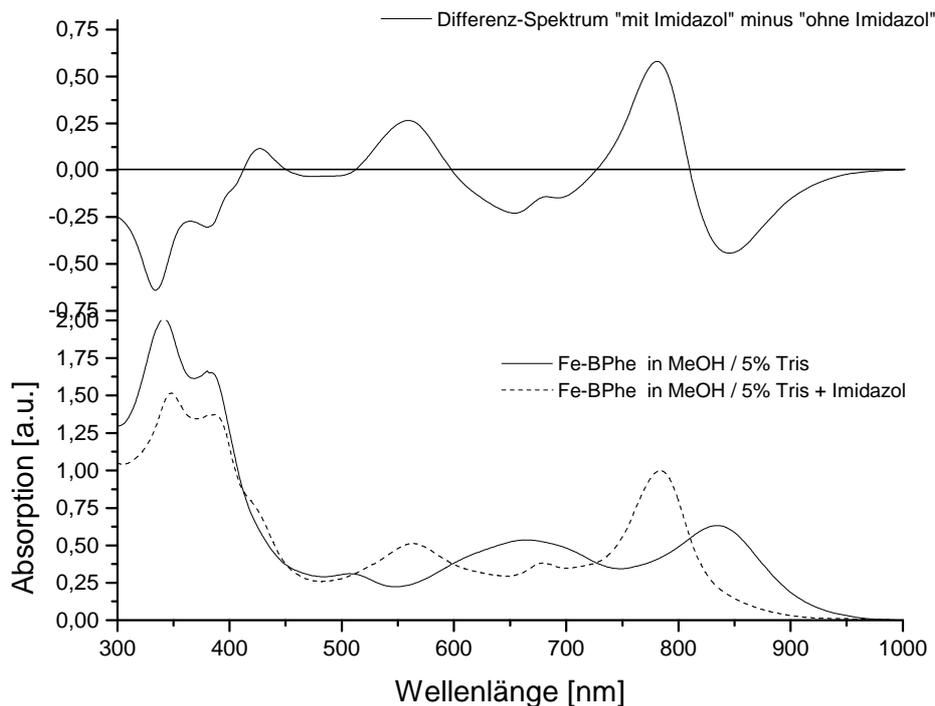


Abb. C-28: Absorptionsspektren von FeBPhe a in MeOH / 5% 20mM Tris pH 7,5 ohne und mit Imidazol (unten), Differenzspektrum („mit Imidazol“ minus „ohne Imidazol“) (oben)

Das BChl a hingegen lässt in den Absorptionsspektren mit und ohne Imidazol kaum einen Unterschied erkennen (Abb. C-29). Im Differenzspektrum sieht man kleine Änderungen von sehr geringer Intensität im Vergleich zu dem Fe-BPhe a -Differenz-Spektrum.

Im Differenzspektrum liegen die negativen Absorptionsbanden im Soret-Bereich bei 338 nm und 361 nm. Dies bedeutet, dass die Intensität der Soret-Banden nach Imidazol-Zugabe abnimmt. Im Q_x-Bereich erscheint eine negative Bande bei 603 nm und eine positive bei 636 nm. Sie stammen von einer Abnahme von fünffach-kordiniertem BChl und einer Zunahme von sechsfach-kordiniertem BChl bei der Imidazol-Zugabe.

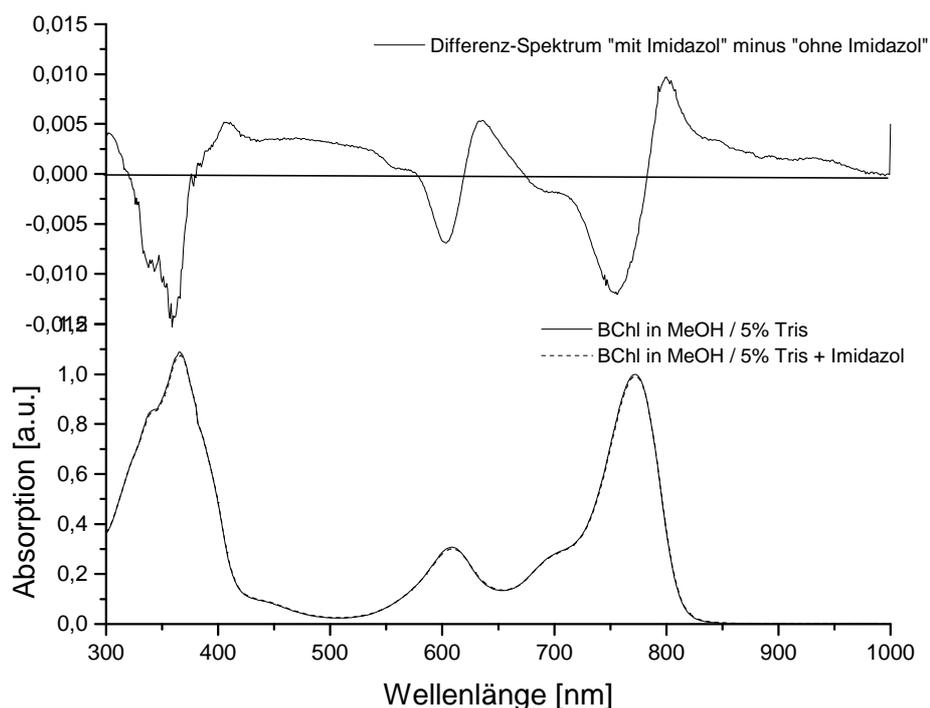


Abb. C-29: Absorptionsspektren von BChl a in MeOH/5 % 20 mM Tris pH 7,5 ohne und mit Imidazol (unten), Differenzspektrum („mit Imidazol“ minus „ohne Imidazol“) (oben)

Die Q_y -Bande verschiebt sich langwellig bei der Imidazol-Zugabe, wodurch im Differenzspektrum eine negative Bande bei 756 nm und eine positive bei 800 nm entsteht. Die Intensitäten des Differenzspektrums des BChl a sind allerdings sehr viel geringer als beim Fe-BPhe a. Sie entsprechen nur ca. 1 % der Intensität der Absorption.

Deshalb sollten mit dieser Methode auch geringe Mengen Fe-BPhe a, die im Absorptionsspektrum von der Absorption des BChl a überlagert sind, detektiert werden können.

Um diese Methode auf ihre Sensitivität zu untersuchen, wurden Mischungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von BChl a zu Fe-BPhe a hergestellt und unter den oben beschriebenen Bedingungen vermessen. Die Mischungen enthielten BChl a : Fe-BPhe a in den Verhältnissen 2:1, 3:1, 18:1 und 50:1. In diesen Mischungen liegt die BChl-Konzentration bei 27,5 – 10 μM und die Fe-BPhe a -Konzentration bei 0,5 – 5,8 μM (Tab. C-13). Mit diesen Mischungen kann getestet werden, ob in jedem Fall das Fe-BPhe a die erwarteten Banden zeigt und ob es quantitativ bestimmt werden kann. Zusätzlich wurde eine 14:1-Mischung von geringerer Gesamtkonzentration hergestellt. Hiermit soll getestet werden, ob das Fe-BPhe a auch in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden kann.

BChl <i>a</i> (MeOH) [μM]	Fe-BPhe <i>a</i> (MeOH) [μM]	BChl/Fe-BPhe (eingesetzt)	Differenz- OD ₈₄₅	BChl/Fe-BPhe (gemessen)
12,3	5,8	2:1	- 0,01375	2:1
10	3,3	3:1	- 0,0696	3:1
11	0,63	18:1	- 0,0112	20:1
27,5	0,5	50:1	- 0,0169	35:1
4,5	0,16	14:1	(-0,0002)	(450:1)

Tab. C-13: Bestimmung von Fe-BPhe *a* mit Differenzabsorptionsspektroskopie in verschiedenen BChl-Fe-BPhe-Mischungen

In allen getesteten Mischungen (außer 14:1, verdünnt) ist eine deutliche negative Q_y-Bande im Differenzspektrum zu sehen. Die Anwesenheit von Fe-BPhe *a* kann in allen diesen Testmischungen nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung wurde in erster Näherung angenommen, dass entsprechend den Ergebnissen des Differenzspektrums von Fe-BPhe *a* ohne BChl *a* (Abb. C-28), die Intensität der negativen Q_y-Bande im Differenzspektrum 70 % der Intensität der Q_y-Bande des μ -oxo-Komplexes in MeOH hat. Bei dieser Wellenlänge hat das BChl *a* im Differenzspektrum nur geringe Intensität (0,0025 OD), so dass sie in erster Näherung vernachlässigt wurde (Abb. C-29). Das Fe-BPhe *a* kann sogar noch in einem Verhältnis von 50:1 nachgewiesen werden, hier ist der Fehler allerdings größer.

Die 14:1-Mischung zeigt, dass die Gesamtmenge an Fe-BPhe *a* kritischer für die Bestimmung ist, als das BChl *a*-Fe-BPhe *a*-Verhältnis. Bei geringen Intensitäten liegen die Banden im Differenzspektrum im Grundrauschen. Bei der 14:1-Mischung wäre eine negative Bande von 0,003 zu erwarten gewesen, die allerdings nicht sicher aufgelöst werden kann. Auch ist keine eindeutige BChl-Differenz-Absorption zu erkennen. 0,16 μM Fe-BPhe *a*- bzw. 4,5 μM BChl *a*-Lösungen können mit dieser Methode nicht mehr nachgewiesen werden. Die 18:1-Mischung hat eine Fe-BPhe-Konzentration von 0,63 μM ; das Fe-BPhe *a* konnte hier noch eindeutig nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt also zwischen 0,5 und 0,6 μM Fe-BPhe.

Die Bestimmung des Fe-BPhe *a* -Gehaltes des rekonstituierten LH1 erfolgte auf dieselbe Weise. Nach der Extraktion der Pigmente mit organischem Lösungsmittel, wurden sie in MeOH aufgenommen, die Hälfte der Lösung mit Imidazol versetzt, die Spektren vermessen und die Differenz gebildet.

Die Intensität der beiden Proben lag an der langwelligen Absorptionsbande bei 0,003 bzw. 0,01 OD. In den Differenzspektren waren keine Banden bei den erwarteten Wellenlängen zu beobachten. Die Intensität der Proben liegt noch unterhalb der 14:1-Mischung, so dass auch hier die Intensitäten im Differenzspektrum unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Methode der Differenzabsorption für die Bestimmung des Fe-BPhe-Gehalts in LH1-Komplexen prinzipiell eignet, hierfür aber höhere Konzentrationen benötigt werden. Dies bedeutet, dass größere Mengen des LH1-Komplexes rekonstituiert werden müssen. Aus den Fluoreszenzspektren ist ersichtlich, dass das Fe-BPhe nur zu einem geringen Prozentsatz ins LH1 (2 %) eingebaut wird (Kap. 2.4.2). Bei einer Nachweisgrenze des Fe-BPhe von 0,5 μM würden 25 μM LH1 benötigt werden, was (bei einer Lösung von 1 ml) 3 ODml entspräche.

Eine alternative Methode wäre der Nachweis des Fe-BPhe über HPLC. Hier liegt die Problematik in der quantitativen Isolierung der Pigmente aus dem LH1-Komplex und der Entfernung des Detergenz. Durch die Verwendung von anderen Säulenmaterialien wäre eine quantitative Isolierung vielleicht möglich.

3 Formyl-Derivate der (Bakterio)Chlorophylle

3.1 Einführung

Mit Hilfe von Tetrapyrrol-modifizierten (B)Chl können (B)Chl-Bindungstaschen auf Raumerfüllung (Umesterung an Position C-17³, [Struck, 1990], Ligandierung und Wasserstoffbrückenbindungen ([3-Vinyl]-BChl, Modifikation an C-13², [Struck et al., 1990; Meyer, 1997]) detailliert untersucht werden. Durch das Einführen von reaktiven, funktionellen Gruppen eröffnen sich neue Möglichkeiten der Modifikation, wobei die Einführung der Formylgruppe ein besonders attraktives Syntheseziel ist, da Aldehydreste leicht mit Aminen, Hydroxylaminen u. ä. reagieren und so weiter modifiziert werden können [Klement et al., 1999].

Eine weitere wichtige Anwendung für (Bakterio)Chlorophyll-Derivate mit Formyl-Gruppen ist ihre kovalente Bindung an synthetische Peptide, die von Rau et al entwickelt wurde (siehe auch Kap. C-4.2). So konnte Chl *b*, ein natürliches Chlorophyll-Derivat mit einer Formyl-Gruppe an Ring B, bereits erfolgreich auf diesem Weg an das Peptid gebunden werden [Rau et al., 2001]. Durch die kovalente Bindung wird eine definierte Position und eine definierte Orientierung des Chlorophylls im Protein erreicht. Durch Synthese von Formyl-Chlorophyll-Derivaten, welche die Formylgruppen an verschiedenen Positionen tragen, sollte es möglich sein, gezielt die Orientierung des Chlorophylls im Protein zu steuern.

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, Chlorophyll- und Bakteriochlorophyll-Derivate zu synthetisieren, die Formyl-Gruppen an verschiedenen Positionen tragen. Das folgende Kapitel (Kap. C-3.2) beschreibt die Syntheseplanung und die Zielmoleküle, anschließend wird die Synthese der einzelnen Verbindungen beschrieben (Kap. 3.3).

3.2 Syntheseplanung

Wie bereits erwähnt, besitzt das Chlorophyll *b* (Chl *b*) eine Formyl-Gruppe an Position 7 (Abb. C-30). Dieses Pigment kann in ausreichenden Mengen aus Spinat isoliert werden und steht somit direkt oder nach weiteren Modifikationen, wie z.B. Umesterung oder Verseifung an Position C-17⁴ oder Austausch des Zentralatoms gegen Zn²⁺ oder Ni²⁺, zur Bindung an synthetische Peptide zur Verfügung. Ein weiteres natürliches Chlorophyll mit einer Formyl-Gruppe ist das Chl *d*, das zuerst von Manning et al. 1943 beschrieben [Manning und H. H.

Strain, 1943] und in verschiedenen Rotalgen in kleinen Mengen gefunden wurde. Vor wenigen Jahren wurde der photosynthetische Prokaryont *Acaryochloris marina* entdeckt, dessen Hauptpigment das Chl *d* ist [Miyashita et al., 1996; Akiyama et al., 2001]. Da die Gewinnung von ausreichenden Mengen von Chl *d* aus dieser Quelle aber sehr aufwendig ist, wurde eine Synthese aus Chlorophyll *a* (Chl *a*) vorgezogen.

Chl *a* bzw. Phe *a* besitzen im Gegensatz zu Chl *d* eine Vinyl-Gruppe an Position 3 (Abb. C-30). Durch oxidative Spaltung durch Ozon, KMnO_4 oder $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$ [March, 1992] mit anschließender reduktiver Aufarbeitung lassen sich Doppelbindungen in Formyl-Gruppen umwandeln. Fischer-Drsek [Fischer-Drsek, 1995] hat eine Methode entwickelt, die 3-Vinyl-Gruppe des Pheophorbid *a* -17³-methylesters (Me-Pheid *a*) mit Ozon zu spalten, und erhielt nach reduktiver Aufarbeitung den 3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid *a* -17³-methylester ([3-Formyl]-Me-Pheid *a*, Strukturformel siehe Kap. F-3.1). Das gleiche Produkt erhielt M. Katterle [Katterle, 2001] durch Spaltung der 3-Vinyl-Doppelbindung mit $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$.

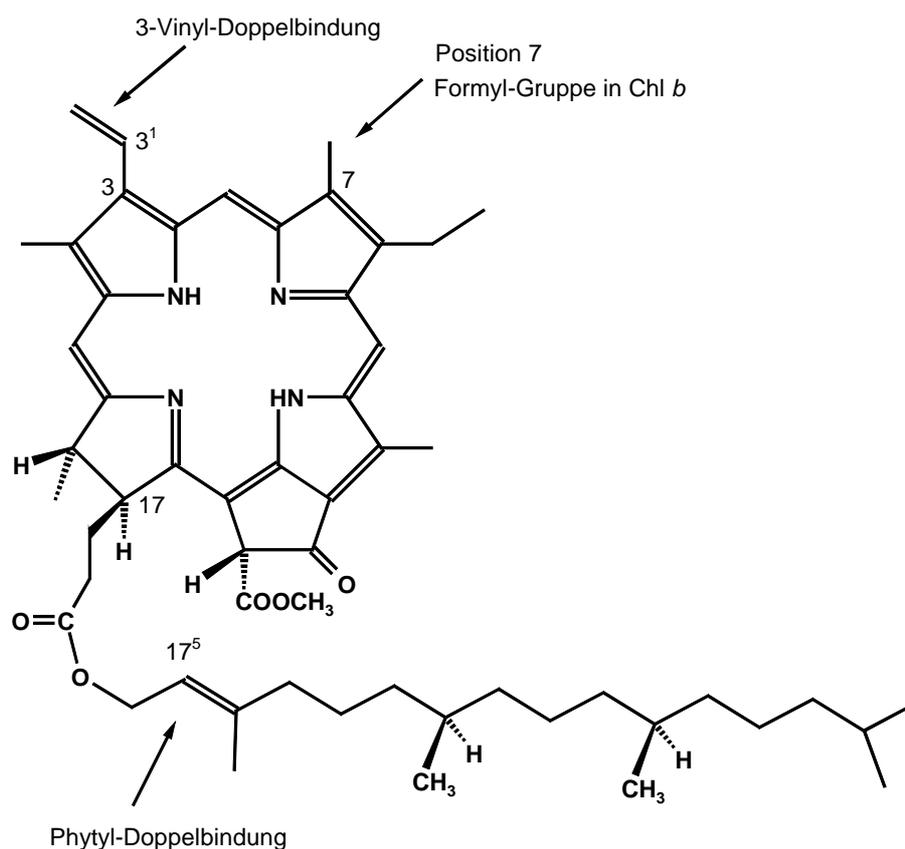


Abb. C-30: Zur Verfügung stehende Positionen zur Einführung von Formyl-Gruppen im Pheophytin *a* (Phe *a*).

Wegen der hohen Giftigkeit und Flüchtigkeit des OsO_4 wurde im Rahmen dieser Arbeit die Spaltung mit Ozon untersucht. Als erstes sollte diese Reaktion mit unseren Labormaßstäben reproduziert werden und das [3-Formyl]-Me-Pheid *a* in größeren Mengen synthetisiert werden, um es nach anschließender Metallierung mit Zn^{2+} oder Ni^{2+} für die kovalente Bindung in synthetische Vier-Helix-Bündel-Proteine zur Verfügung zu stellen.

Phe *a* enthält eine weitere Doppelbindung, die Phytyl-Doppelbindung an Position C17⁵-C17⁶ (Abb. C-30), welche ebenfalls mit Ozon spaltbar sein sollte. Um das System am Anfang zu vereinfachen und um geeignete Reaktionsbedingungen für die Spaltung der Phytyl-Doppelbindung zu ermitteln, wurde diese Reaktion zuerst mit dem 3-Devinyl-3-acetyl-pheophytin *a* ([3-Acetyl]-Phe *a*, Strukturformel siehe Kap. F-3.1) optimiert, da dieses Molekül nur die gewünschte spaltbare Gruppe enthält. Im Anschluss wurden die optimierten Reaktionsbedingungen auf die Ozonolyse des Phe *a* übertragen.

Zusätzlich sollte versucht werden, ein Bakteriochlorophyll-Derivat mit einer Formyl-Gruppe zu synthetisieren. BChl *a* bzw. BPhe *a* besitzt an Position 3 anstelle einer Vinyl-Gruppe, eine Acetyl-Gruppe. Diese lässt sich mit NaBH_4 in eine 3¹-OH-Gruppe reduzieren, die durch thermische Dehydratation in die Vinyl-Gruppe überführt werden kann (Abb. C-31) [Struck, 1990], so dass ein Bakteriochlorophyll-Derivat mit einer 3-Vinyl-Gruppe für die Ozonolyse zur Verfügung steht. Die Oxidative Spaltung der 3-Vinyl-Doppelbindung des 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriopheophorbid-17³-methylester *a* ([3-Vinyl]-Me-BPheid *a*) mit Osmiumtetroxid und Natriumperodat [Katterle, 2001] lieferte nur ein Gemisch aus mindestens sechs verschiedenen Produkten, mit einer für Chlorine typischen Absorption.

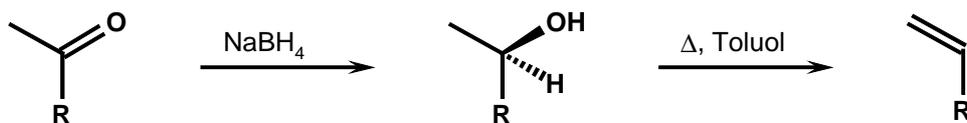


Abb. C-31: Umwandlung der 3-Acetyl-Gruppe von BChl *a* in eine 3-Vinyl-Gruppe, R = 3-Deacetyl-Bakteriochlorophyll *a*.

Da die Dehydratisierung nur mit dem sehr oxidationsempfindlichen Mg-BChl-Derivaten möglich ist, wurde ein alternativer Syntheseweg zur Umsetzung des 3-Deacetyl-3¹-hydroxyethyl-bakteriopheophytin *a* (3¹-OH-BPhe *a*) zum [3-Vinyl]-BPhe *a* gesucht.

3.3 Ozonolyse-Reaktionen

3.3.1 Mechanismus der Ozonolyse

[March, 1992; Laue und Plagens, 1994; Belew, 1969]

Nach dem von Criegee [Criegee, 1975] postulierten Mechanismus ist der erste Schritt der Ozonolyse eine 1,3-dipolare Cycloaddition des Ozons an die C-C-Doppelbindung (Abb. C-32 A), das so gebildete Primärozonid (Abb. C-32 B) ist instabil und zerfällt über eine Cycloreversion in das Carbonyloxid und die Carbonylverbindung (Abb. C-32 C). Das Carbonyloxid ist wieder eine dipolare Verbindung, die sehr schnell an die C=O-Doppelbindung der Carbonylverbindung unter Bildung des Ozonids addiert (Abb. C-32 D). In Anwesenheit von Methanol geht das Carbonyloxid direkt in ein Alkoxyhydroperoxid über (Abb. C-32 E), das mit Dimethylsulfid zum Acetal, bzw. in methanolischer Lösung zum Acetal reduzieren wird [Pappas und Keaveney, 1966] (Abb. C-32 F). Das Acetal wird zum Schluss mit verdünnter Säure unter Bildung des Aldehyds spalten (Abb. C-32 G).

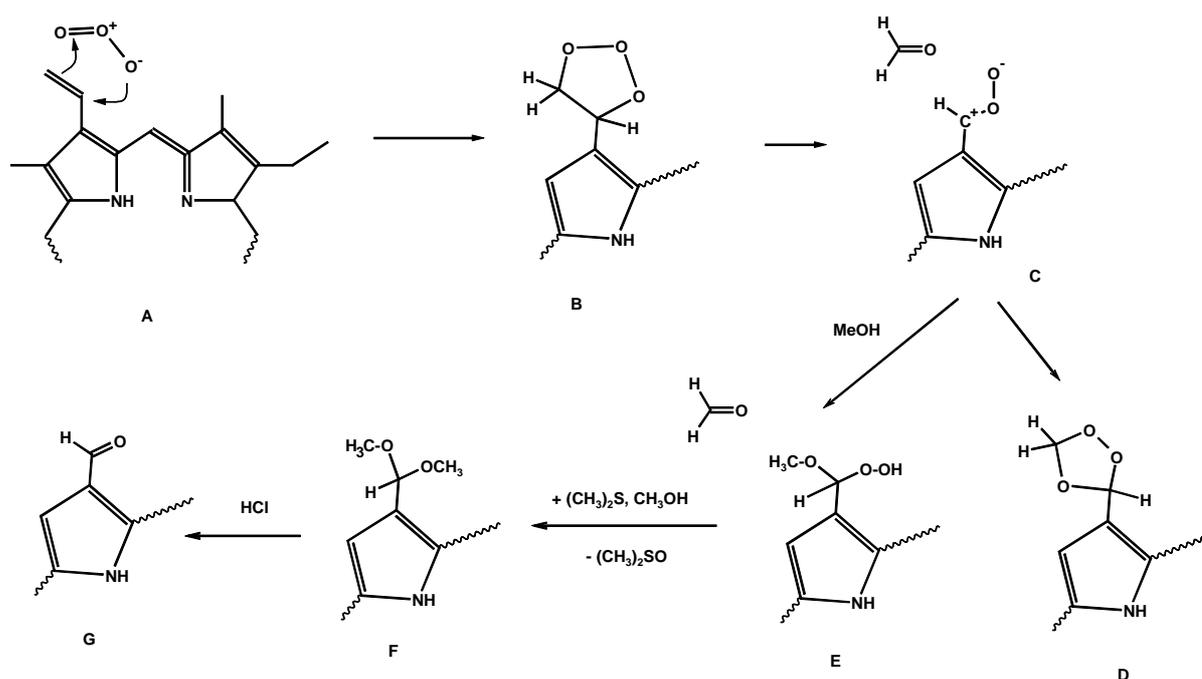


Abb. C-32: Mechanismus der Ozonolyse der 3-Vinyl-Doppelbindung des Me-Pheid a.

A: 1,3-Dipolare Cycloaddition des Ozons an die Doppelbindung

B: Primärozonid

C: Zerfall des Primärozonids in Formaldehyd und einem Carbonyloxid

D: Cycloreversion zum Ozonid

E: In methanolischer Lösung Bildung des Carbalkoxyperoxid

F: Reduktion des Carbalkoxyperoxids mit Dimethylsulfid ((CH₃)₂S) zum Acetal

G: Spaltung des Acetals mit verdünnter Säure zum Aldehyd

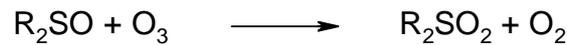


Abb. C-33: Reduktion von Ozon mit Dimethylsulfid unter Bildung von Sauerstoff und Dimethylsulfoxid.

Durch die Zugabe von Dimethylsulfid wird nicht nur das Alkoxyhydroperoxid (Abb. C-32 F) reduziert, sondern auch das überschüssige Ozon in der Reaktionslösung abgefangen, wodurch die Reaktion rasch abgebrochen werden kann. Das Dimethylsulfid wird dabei zum Dimethylsulfoxid und/oder Dimethylsulfon oxidiert (Abb. C-33).

3.3.2 Ozonolyse der 3-Vinyl-Doppelbindung des Pheophorbid a –17³-methylesters und 13²-Demethoxycarbonylpheophorbid a –17³-methylesters

3.3.2.1 Darstellung der Ausgangsverbindungen und Ozonolyse-Reaktion

Durch methanolische Extraktion im Ultraschallbad wurde aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* Chl a im Milligrammmaßstab isoliert, ohne weitere Aufreinigung mit Essigsäure zum Pheophytin a (Phe a) entmetalliert und anschließend in schwefelsaurem Methanol zum Pheophorbid a-17³-methylester (Me-Pheid a) umgeestert. Dieser wurde durch Pyrolyse in den 13²-Demethoxycarbonylpheophorbid a-17³-methylester (Pyro-Me-Pheid a) überführt (Abb. C-34). Me-Pheid a und Pyro-Me-Pheid a dienen als Ausgangsverbindungen für die Ozonolyse der 3-Vinyl-Doppelbindung.

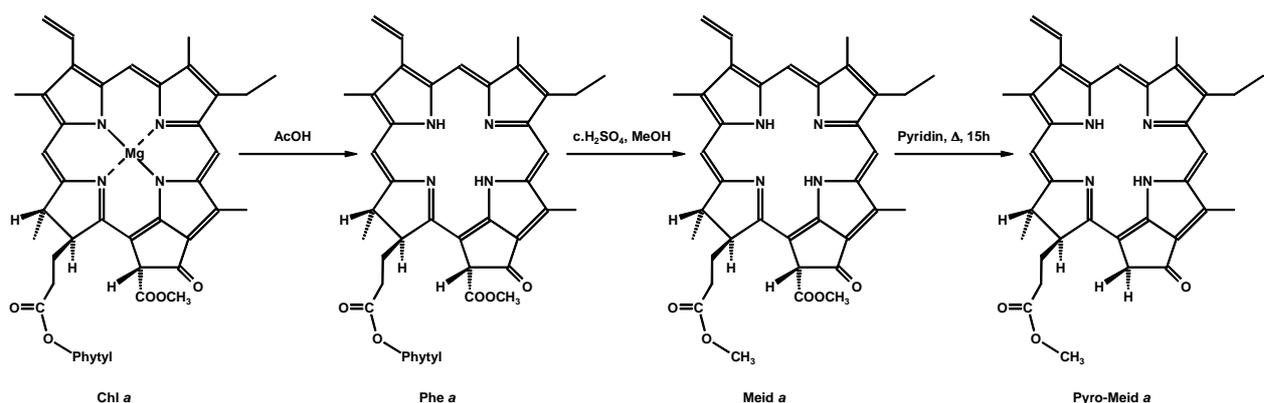


Abb. C-34: Darstellung des Pheophorbid a-17³-Methylesters (Me-Pheid a) und 13²-Demethoxycarbonylpheophorbid a-17³-Methylesters (Pyro-Me-Pheid a) aus Chlorophyll a (Chl a)

Die Spaltung der 3-Vinyl-Doppelbindung erfolgte mit Ozon, leicht modifiziert nach der Vorschrift von Fischer-Drsek [Fischer-Drsek, 1995] und Fuhrhop [Fuhrhop und Lehmann,

1984] und einer reduktiven Aufarbeitung mit Dimethylsulfid nach dem unter 3.3.1 beschriebenen Mechanismus (Abb. C-35). Im Gegensatz zur Original-Vorschrift wurde der Reaktionsansatz nach dem Einleiten von Ozon bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ und dem Abbruch der Reaktion mit Dimethylsulfid nicht über Nacht unter Rühren aufgetaut, sondern innerhalb von 2 h auf Raumtemperatur gebracht, da eine längere Inkubation nach der Dimethylsulfidzugabe keine Änderung der Produktzusammensetzung bewirkt. Nach der Chromatographie erhält man das [3-Formyl]-Me-Pheid *a* in einer Ausbeute von 90 %.

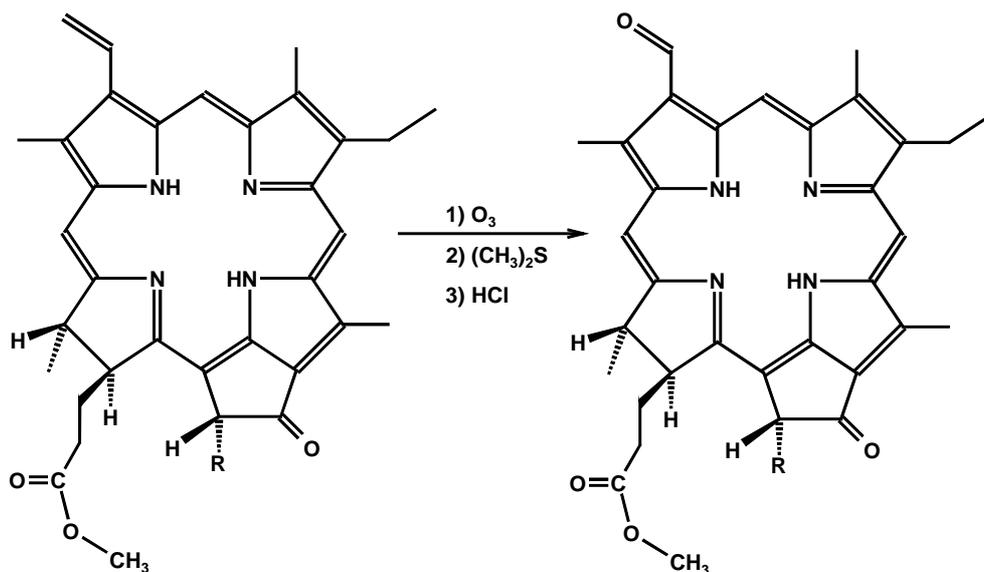


Abb. C-35: Darstellung des [3-Formyl]-Me-Pheid *a* ($\text{R} = \text{COOCH}_3$) aus Me-Pheid *a* und des [3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a* ($\text{R} = \text{H}$) aus Pyro-Me-Pheid *a*

Die Ozonolyse findet bei tiefen Temperaturen unter stark sauren Bedingungen statt (3 % konzentrierte H_2SO_4), so dass das Tetrapyrrolgerüst protoniert vorliegt, was an der tiefblauen Farbe der Reaktionslösung zu erkennen ist. Dieses Reaktionsmedium bewirkt einerseits die Stabilisierung des Tetrapyrrolgerüsts und verhindert so einen Angriff des Ozons auf die konjugierten Doppelbindungen des Tetrapyrrols, andererseits wird eine Allomerisierung des isozyklischen Rings verhindert.

Ozon wird nur kurz und in einem geringen Überschuss (ca. 3-facher molarer Überschuss, bezogen auf die eingesetzte Pigmentmenge) eingeleitet. Nach dem Einleiten reagiert das überschüssige, gelöste Ozon weiter, bis die Reaktion mit Dimethylsulfid abgebrochen wird. Der Angriff des Ozons auf die 3-Vinyl-Doppelbindung erfolgt sehr rasch, so dass die Reaktion innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist. Eine absorptionsspektroskopische Verfolgung der Reaktion war aus diesem Grund nur begrenzt möglich.

Die Ozonolyse des Pyro-Me-Pheid *a* findet unter denselben Bedingungen wie bei der Ozonolyse des Me-Pheid *a* statt und liefert in ebenfalls 90 % Ausbeute den 3-Devinyl-3-formyl-13²demethoxycarbonylpheophorbid-17³-methylester *a* ([3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a*). Ein Einfluss des Substituenten am isozyklischen Ring an Position C-13² auf die Reaktivität der C-3-Vinyl-Gruppe konnte bei der Ozonolyse nicht festgestellt werden, da das Pyro-Me-Pheid *a* unter denselben Bedingungen wie das Me-Pheid *a* reagiert und dabei eine vergleichbare Ausbeute liefert. Struck et al. konnten allerdings zeigen, dass Substituenten am isozyklischen Ring an Position C-13² einen Einfluss auf die Dehydratation des 3¹-Hydroxyethyl-BChl *a* (3¹-OH-BChl *a*) zum 3-Deacetyl-3-vinyl-bakteriochlorophyll *a* ([3-Vinyl]-BChl *a*) haben. So konnten z.B. die Pyro- und die 13²-OH-Derivate kein Wasser eliminieren (Abb. C-31) [Struck et al., 1992].

3.3.2.2 Absorptionsspektren

Das Absorptionsspektrum von [3-Formyl]-Me-Pheid *a* in DE ist Abb. C-36 im Vergleich mit dem Edukt Me-Pheid *a* dargestellt, die Wellenlängen der Absorptionsmaxima sind in Tab. C-14 angegeben.

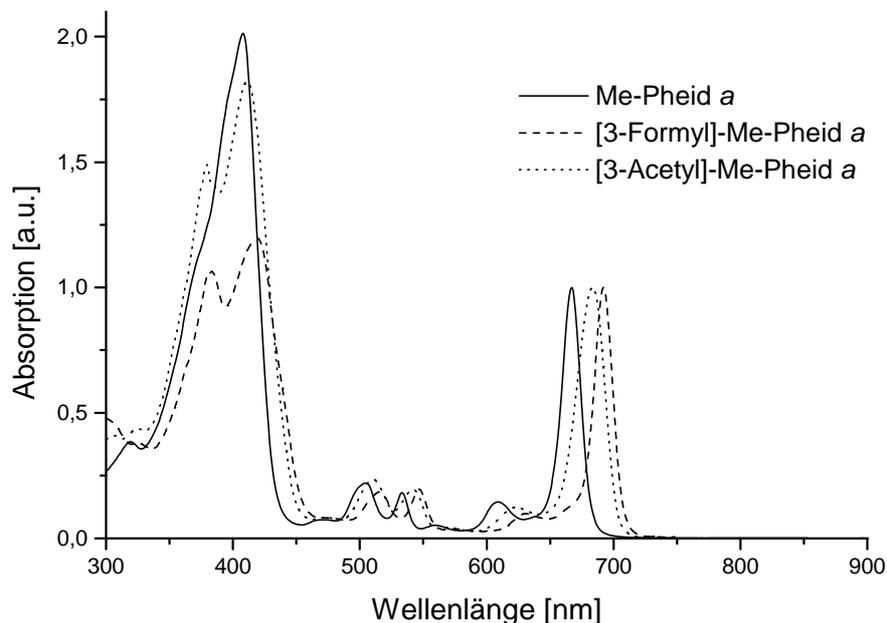


Abb. C-36: Absorptionsspektren von Me-Pheid *a* (—), [3-Formyl]-Me-Pheid *a* (- - -) und [3-Acetyl]-Me-Pheid *a* (· · · ·), jeweils in Diethylether gemessen; die Spektren wurden auf die Q_y-Bande normiert.

	B_y	B_x	$Q_x(0,1)$	$Q_x(0,0)$	Q_y
Me-Pheid a	n.a.	408 (1,00)	505 (0,11)	533 (0,09)	667 (0,49)
Pyro-Me-Pheid a	n.a.	409 (1,00)	505 (0,11)	534 (0,08)	667 (0,52)
[3-Acetyl]-Me-Pheid a	380 (0,82)	411 (1,00)	511 (0,13)	542 (0,10)	683 (0,55)
[3-Formyl]-Me-Pheid a	383 (0,89)	419 (1,00)	516 (0,15)	547 (0,16)	692 (0,83)
[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a	384 (0,86)	419 (1,00)	517 (0,15)	548 (0,15)	690 (0,78)

Tab. C-14: Absorptionsmaxima von Me-Pheid a, [3-Acetyl]-Me-Pheid a und [3-Formyl]-Me-Pheid a in DE; die Absorptionsbanden wurden auf das Absorptionsmaximum normiert.

Die Q_y -Bande des Me-Pheid a verschiebt sich nach der Einführung der 3-Formyl-Gruppe um 25 nm (542 cm^{-1}) bathochrom von 667 nm nach 692 nm. Die Soret-Bande des Me-Pheid a ist nicht in die B_x - und B_y -Banden aufgespalten und liegt, mit einer ca. doppelten Intensität im Vergleich zur Q_y -Bande, bei 408 nm. Beim [3-Formyl]-Me-Pheid a hingegen spaltet sich die Soret-Bande in zwei deutlich getrennte Banden auf, die bei 383 (B_y) und 419 nm (B_x ; um 11 nm (643 cm^{-1}) relativ zum Me-Pheid a rotverschoben) liegen, deren Intensitäten ähnlich hoch sind wie die der Q_y -Bande. Die Q_x -Banden sind ebenfalls bathochrom um 11 (422 cm^{-1} ; $Q_x(0,1)$) bzw. 15 nm (480 cm^{-1} ; $Q_x(0,0)$) verschoben. Die Decarboxylierung an C-13² hat nur geringen Einfluss auf das Absorptionsspektrum des [3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a; lediglich die Q_x -Bande erfährt eine geringfügige langwellige Verschiebung um 1 nm (33 cm^{-1}).

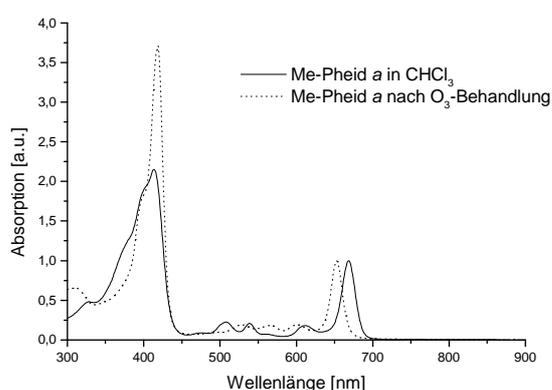


Abb. C-37: Ozonolyse-Zwischenprodukt: Me-Pheid a in CHCl_3 (—), Ozonolyse-Zwischenprodukt nach Reduktion mit Dimethylsulfid (· · · ·).

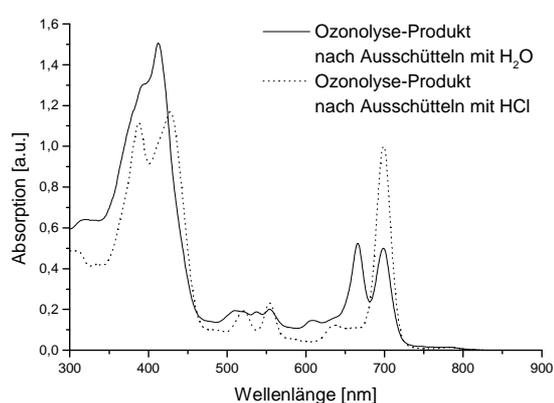


Abb. C-38: Ozonolyse-Zwischenprodukte: Ozonolyse nach Ausschütteln mit H_2O (—), Ozonolyse-Produkt nach Ausschütteln mit HCl (· · · ·)

Bei der Reaktion entstehen Zwischenprodukte (vgl. Kap. 3.3.1, Abb. 32), die sich durch ihre Absorptionsspektren vom Edukt Me-Pheid a und Produkt [3-Formyl]-Me-Pheid a unterscheiden. Zu ihrer photometrischen Charakterisierung wurde aus der Reaktionslösung nach Einleiten von O_3 eine Probe entnommen, mit Dimethylsulfid versetzt und ein

Absorptionsspektrum in CHCl_3 aufgenommen. Anschließend wurde die Probe mit Wasser ausgeschüttelt, vermessen, mit verdünnter HCl ausgeschüttelt und noch mal ein Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. C-37, Abb. C-38).

Das Absorptionsspektrum der Probe nach Reduktion mit Dimethylsulfid in CHCl_3 zeigt eine kurzwellige Verschiebung der Q_y -Bande (653 nm) im Vergleich zu Me-Pheid *a* in CHCl_3 (669 nm) (Abb. C-37). Die Intensität der Soret-Bande ist ca. 4-mal so groß wie die der Q_y -Bande. Diese Änderungen des Absorptionsspektrums sind unabhängig von der Dauer der O_3 -Behandlung und deshalb wohl eher dem Säuregehalt der Lösung zuzuschreiben. Nach dem Ausschütteln der Ozonolyse-Probe mit Wasser spaltet sich die Q_y -Bande in zwei Banden auf, eine bei 666 nm und eine bei 699 nm (Abb. C-38). Der langwellig Teil entspricht der Q_y -Bande des [3-Formyl]-Me-Pheid *a* in CHCl_3 . Die Bande bei 666 nm liegt etwas kurzwelliger als die Q_y -Bande des Me-Pheid *a* in CHCl_3 ($Q_y = 669$ nm). Diese Bande entspricht wohl dem Acetal, da dieses ein ähnliches Konjugationssystem wie das Me-Pheid *a* bzw. wie das [3-Ethyl]-Me-Pheid *a* besitzt. Durch die vorhandene Säure in der Reaktionslösung werden die Acetale bereits beim Ausschütteln mit Wasser zum Teil gespalten. Nach dem Ausschütteln mit verdünnter HCl verschwindet die Bande bei 666 nm vollständig unter Bildung der Bande bei 699 nm, der Q_y -Bande der [3-Formyl]-Me-Pheid *a*.

Die Verschiebungen der Absorptionsmaxima lassen sich mit dem 4-Orbital-Modell von Goutermann (Kap. A) erklären. Der elektronenziehende Einfluss der 3-Carbonyl-Gruppen auf die Elektronenverteilung des π -Systems ist hauptsächlich induktiv, wodurch sich die Elektronenverteilung am C-3-Atom und die energetische Lage der Molekülorbitale, deren Elektronendichte am C-3-Atom ungleich Null ist (a_{1u} und e_{gx} , vgl. Abb. A-6), ändert. Das e_{gx} -Orbital wird energetisch stärker abgesenkt als das a_{1u} -Orbital, so dass die Übergänge Q_y , Q_x und B_x bathochrom verschoben werden. Diese Tendenzen sind bereits vom 3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid *a*-17³-methylester ([3-Acetyl]-Me-Pheid *a*) bekannt [Smith und Calvin, 1966], das sich vom Me-Pheid *a* durch eine Acetyl-Gruppe an Position C-3 unterscheidet und somit strukturell und elektronisch dem [3-Formyl]-Me-Pheid *a* ähnlich ist. Auch hier treten langwellige Verschiebungen der Absorptionsbanden auf, die aber nicht so groß sind wie beim [3-Formyl]-Me-Pheid *a* (Abb. C-36, Tab. C-14). Die Soret-Banden sind beim [3-Acetyl]-Me-Pheid *a* wie beim [3-Formyl]-Me-Pheid *a* in B_y - und B_x -Banden aufgespalten und zeigen eine geringere Intensität als die Soret-Bande des Me-Pheid *a*, aber auch hier fällt der Effekt geringer aus als beim [3-Formyl]-Me-Pheid *a*. Der Grund hierfür ist der +I-Effekt des Methyls der Acetylgruppe, der den -I-Effekt der Carbonylgruppe zum Teil kompensiert, so dass die Acetylgruppe eine schwächere elektronenziehende Wirkung hat als die

Formylgruppe. Dadurch sind die Auswirkungen der 3-Acetyl-Gruppe auf das Absorptionsspektrum nicht so ausgeprägt, wie die der 3-Formyl-Gruppe.

Die langwellige Verschiebung der Q_x -Bande des [3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a* im Vergleich zum [3-Formyl]-Me-Pheid *a* wurde bereits für andere Pyro-Verbindungen der Chlorophyll- und Bakteriochlorophyll-Serie (Mg-Komplexe und freie Basen) in der Literatur beschrieben [Struck et al., 1992].

3.3.2.3 Metallierung des [3-Formyl]-Me-Pheid *a* mit Zn^{2+} und Ni^{2+}

Die Metallierung des [3-Formyl]-Me-Pheid *a* gelingt nach Standardmethode zur Metallierung von Phe *a* und Me-Pheid *a*, der Acetat-Methode in konzentrierter Essigsäure mit $Zn(OAc)_2$ bzw. $Ni(OAc)_2$ [Urumov, 1975], mit einer Ausbeute von ca. 80 %. Das [3-Formyl]-Me-Pheid *a* zeigt im Vergleich zum Me-Pheid *a* keinen Unterschied in der Reaktivität. Abb. C-39 zeigt die Absorptionsspektren dieser beiden metallierten Verbindungen, die in ihren Charakteristika den Spektren der Ni- und Zn-Chl-Derivate entsprechen. Die Hauptabsorptionsbanden liegen bei 437 nm und 678 nm (Zn-[3-Formyl]-Me-Pheid *a*) und bei 431 nm und 669 nm (Ni-[3-Formyl]-Me-Pheid *a*). Im Vergleich zu Zn- und Ni-Phe *a* sind auch hier alle Banden langwellig verschoben.

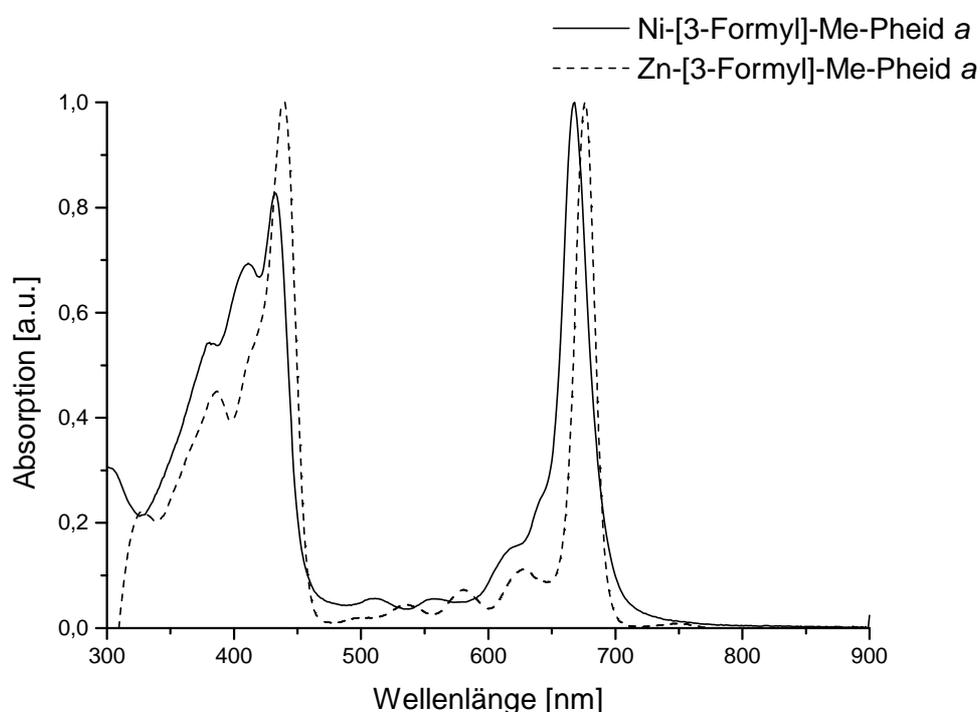


Abb. C-39: Absorptionsspektren des Ni-[3-Formyl]-Me-Pheid *a* (—) und Zn-[3-Formyl]-Me-Pheid *a* (- - -) in DE, normiert auf die Q_y -Bande.

3.3.3 Ozonolyse der Doppelbindung des Phytyl-Restes von 3-Devinyl-3-acetylpheophytin a und Pheophytin a

Die Spaltung der Doppelbindung des Phytyl-Restes mit Ozon wurden an zwei Chlorophyll-Derivate durchgeführt, am [3-Acetyl]-Phe a und am Phe a. Das [3-Acetyl]-Phe a besitzt im Gegensatz zu Phe a nur eine nicht-aromatische Doppelbindung, die Phytyl-Doppelbindung, die mit Ozon gespalten wird, wodurch das System vereinfacht wird und zur Untersuchung der Reaktionsbedingungen diente (Abb. C-40).

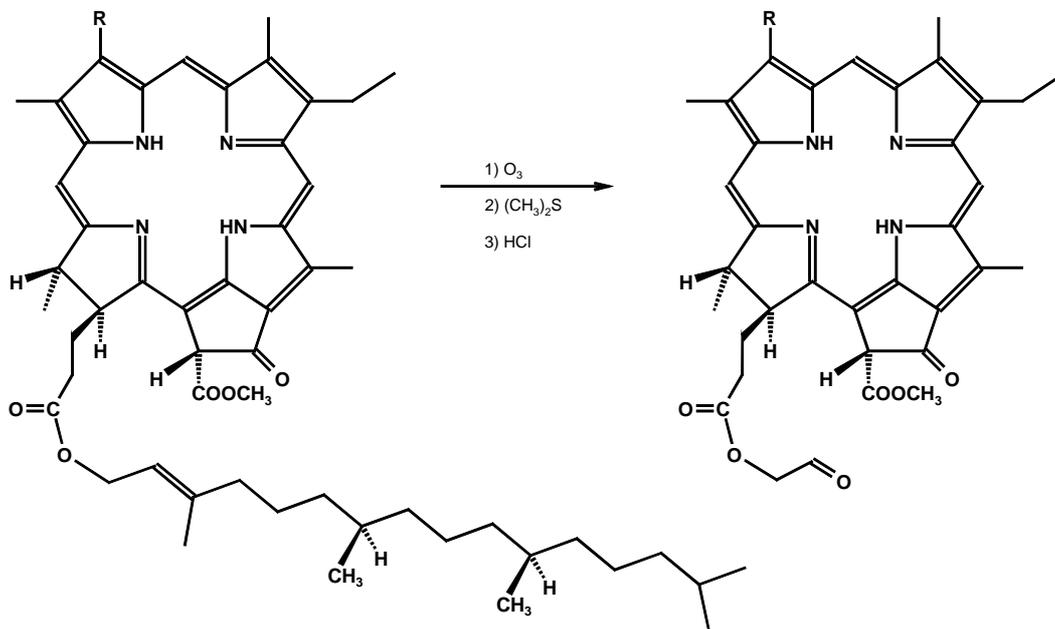


Abb. C-40: Darstellung von 3-Acetyl-3-devinylpheophorbid *a*-17³-(ethanal-2-yl)-ester ([3-Acetyl]-Ethanal-Pheid *a*) (R = COCH₃) und Pheophorbid *a*-17³-(ethanal-2-yl)-ester (Ethanal-Pheid *a*) (R = CHCH₂) aus [3-Acetyl]-Phe *a* (R = COCH₃) bzw. Phe *a* (R = CHCH₂) mit Ozon.

Die Phytyl-Doppelbindung des [3-Acetyl]-Phe *a* reagiert unter den gleichen Bedingungen wie die 3-Vinyl-Gruppe des Me-Pheid *a* und liefert in einer Ausbeute von 56 % das 3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid *a*-17³-(ethanal-2-yl)ester ([3-Acetyl]-Ethanal-Pheid *a*). 33 % nicht umgesetztes Edukt konnten zurückgewonnen werden. Durch die tiefen Temperaturen wird eine Spaltung des empfindlichen Phytyl-Esters verhindert, der bei Raumtemperatur hingegen in dem gleichen Lösungsmittelgemisch (CHCl₃/MeOH/H₂SO₄) verseift wird. Auch beim Ausschütteln mit verdünnter Säure zur Spaltung der Acetale tritt keine Verseifung des Phytyl-Esters ein.

Das Absorptionsspektrum des [3-Acetyl]-Ethanal-Pheid *a* unterscheidet sich nicht vom Spektrum des Edukts [3-Acetyl]-Phe *a*, da der 17³-Ester vom Chlorin-Grundgerüst durch die Propionsäure-Seitenkette getrennt ist, und somit die Elektronendichte im Ringsystem nicht

beeinflusst. Kleine, aber definierte Unterschiede zwischen den Absorptionsspektren von Phe *a* und seiner freien Säure bzw. Chl *a* und seiner freien Säuren, wie sie von Fiedor (Fiedor, unveröffentlicht) beobachtet wurden, konnten hier nicht nachgewiesen werden.

Bei der Ozonolyse des Phe *a* kann nicht nur die Phytyl-Doppelbindung gespalten werden, sondern auch, wie beim Me-Pheid *a*, die 3-Vinyl-Doppelbindung. Da beide Reaktionen unter denselben Reaktionsbedingungen ablaufen, werden neben dem Zielprodukt Ethanal-Pheid *a* (Abb. C-41, A) noch zwei weitere Produkte, das 3-Devinyl-3-formyl-pheophytin *a* ([3-Formyl]-Phe *a*) (Abb. C-41, B) und das [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a* (Abb. C-41, C) erwartet.

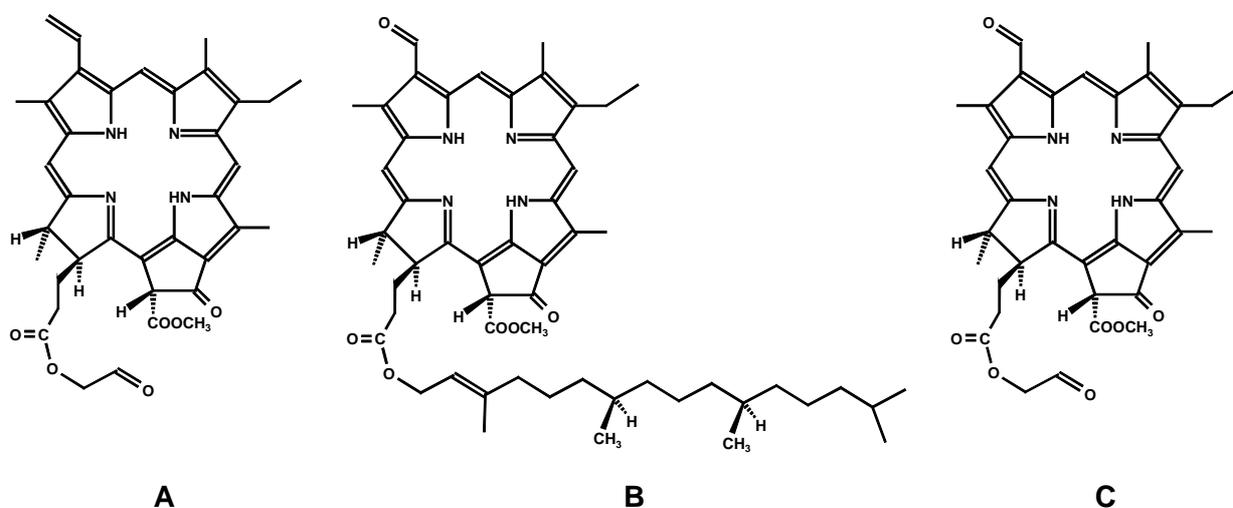


Abb. C-41: Strukturformeln der möglichen Produkte bei der Ozonolyse von Phe:
A: Pheophorbid a -17³-(ethanal-2-yl)ester (Ethanal-Pheid *a*)
B: 3-Devinyl-3-formyl-pheophytin *a* ([3-Formyl]-Phe *a*)
C: 3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid a -17³-(ethanal-2-yl)ester ([3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a*)

Bei der Ozonolyse des Phe *a* konnten alle drei erwarteten Produkte nachgewiesen werden. Unter gleichen Reaktionsbedingungen wie für die Ozonolyse der 3-Vinyl-Doppelbindung des Me-Pheid *a* konnte festgestellt werden, dass die Phytyl-Doppelbindung etwas schneller reagiert als die 3-Vinyl-Gruppe, so dass abhängig von der Reaktionsdauer hauptsächlich das Ethanal-Pheid *a* (Abb. C-41 A) und das 3-Devinyl-3-formyl-pheophorbid-17³-(ethanal-2-yl)ester *a* ([3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a*) (Abb. C-41 C) entstehen und nur in sehr geringen Mengen das [3-Formyl]-Phe *a* (Abb. C-41 B). Absorptionsspektroskopisch unterscheiden sich nur die 3-Vinyl-Derivate von den 3-Formyl-Derivaten, so dass hierbei nur das relative Verhältnis dieser Verbindungen bestimmt werden kann. Die Unterscheidung der beiden möglichen 3-Vinyl-Produkte und der beiden 3-Formyl-Produkte erfolgt über Dünnschichtchromatographie.

Um das gewünschte Zielprodukt, das Ethanal-Pheid *a*, als Hauptprodukt zu erhalten mussten die Reaktionsbedingungen geringfügig modifiziert werden. Hierzu wurden der Ozongehalt, die Inkubationszeit bis zum Reaktionsabbruch mit Dimethylsulfid und die Temperatur variiert.

Die Stoffmenge des eingeleiteten Ozons ist von der Einleitdauer und von der Durchflussgeschwindigkeit abhängig. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde in allen Versuchen gleich eingestellt. Nach 1 min Einleiten von Ozon ist ca. die Hälfte der eingesetzten 1000 ODml (18,0 μ mol) Phe *a* umgesetzt, nach 2 min wurden das Phe *a* vollständig zum [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a* umgesetzt. Um zu verhindern, dass das Ethanal-Pheid *a* weiter zum [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a* reagiert, wurde nur 40 bis 60 s O₃ eingeleitet und somit eine unvollständige Umsetzung des Phe *a* in Kauf genommen.

Zur Untersuchung, welche Auswirkungen die Inkubationszeit der Pigmente in der ozonhaltigen Lösung bis zum Abbruch mit Dimethylsulfid auf die Produktzusammensetzung hat, wurde 20 s O₃ eingeleitet, nach 10, 20, 30, 40 und 100 s eine Probe entnommen, und die Reaktion sofort durch Zugabe von Dimethylsulfid abgebrochen. Anschließend wurden die einzelnen Proben separat nach Vorschrift aufgearbeitet. Die Produktanalyse fand mit Hilfe der HPLC statt (Abb. C-42). Als Maß für die relative Produktzusammensetzung dienten die Flächen der einzelnen Elutionspeaks im Chromatogramm, gemessen beim jeweiligen langwelligen Maximum. Zur Normierung der einzelnen Proben wurde die Summe der Flächen aller Produkte auf 100 % gesetzt und so das prozentuale Verhältnis der einzelnen Verbindungen bestimmt (Tab. C-15).

Das HPLC-Chromatogramm der ersten Probe (Abb. C-42, Probe nach 10 s) zeigt vier getrennte Peaks. Das unpolarste Pigment, das Edukt Phe *a* eluiert als Doppelpeak mit einer Retentionszeit von 7,7/8,1 min. Der Peak bei 7,7 min entspricht dem Diastereomeren 13²(S)-Phe (Phe *a'*) und der Peak bei 8,1 min dem 13²(R)-Phe (Phe *a*). Bei 9,2 min eluiert das [3-Formyl]-Phe *a*, ohne Trennung der Diastereomere. Bei einer Retentionszeit von 17,3/18,0 min läuft das Ethanal-Pheid *a'/a* und von 19,7 /20,6 min das [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a'/a*.

Die Analyse der Produkt-Verhältnisse durch Integration (Tab. C-15) zeigt, dass nach 20 s Einleiten von Ozon und 10 s Inkubation in der ozonhaltigen Lösung und anschließendem Abbruch der Reaktion durch Zugabe von Dimethylsulfid 27 % des Phe *a* umgesetzt sind, davon entsprechen 14 % dem Pheophorbid *a*-17³-(ethanal-2-yl)ester (Ethanal-Pheid *a*), 10 % dem [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a* und nur 3 % dem [3-Formyl]-Phe *a*. Bei längerer Inkubationszeit setzt sich weiteres Phe *a* um, wobei nur wenig [3-Formyl]-Phe *a* gebildet

wird, sich aber das Verhältnis von Ethanal-Pheid *a* zu [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a* verschlechtert, bis nach einer Inkubationszeit von 100 s diese beiden Produkte in annähernd gleichen Teilen vorliegen. Um als Hauptprodukt das Ethanal-Pheid *a* zu erhalten, muss die Reaktion sofort nach dem Einleiten durch Zugabe von Dimethylsulfid abgebrochen werden.

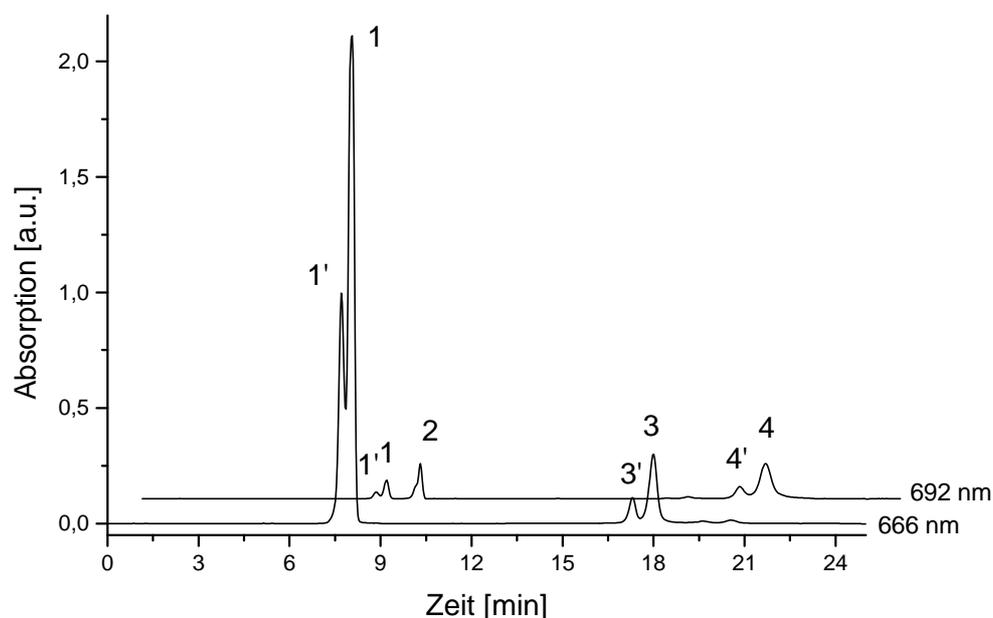


Abb. C-42: HPLC-Analyse der Produkte der Ozonolyse von Phe:

Laufmittel A: Hexan/Toluol (1:1, v/v); Laufmittel B: 60% Hexan/Toluol (1:1, v/v), 40% (Aceton/MeOH/iProp, 5:4:1, v/v/v)

Gradient: 0 min - 1 % / 5 min - 1 % / 15 min - 2,5 % / 16 min - 8 % / 26 min - 9,5 % (%-Angaben entsprechen Laufmittel B; auf 100 fehlende % entsprechen Laufmitte A)

1' / 1: Phe *a'*/*a*

2: [3-Formyl]-Phe *a*

3' / 3: Ethanal-Pheid *a'*/*a*

4' / 4: [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a'*/*a*

Darüber hinaus wurde der Einfluss der Temperatur auf die Produktzusammensetzung untersucht. Die Produktzusammensetzung wurde hier nicht durch HPLC-Analyse, sondern absorptionsspektroskopisch und dünnschichtchromatographisch untersucht. Im Absorptionsspektrum lässt sich durch die starke langwellige Verschiebung (Kap. C-3.3.2.2) der 3-Formyl-Produkte das Verhältnis von 3-Vinyl- zu 3-Formyl-Derivaten leicht bestimmen. Das relative Verhältnis von nicht umgesetztem Phe *a* zu Ethanal-Pheid *a* lässt sich gut über DC bestimmen, da sie sich in ihren R_f -Werten stark unterscheiden. Das 3-Formyl-Phe-Derivat entsteht immer nur in sehr geringen Mengen, so dass es bei der Bestimmung der Produktzusammensetzung vernachlässigt werden kann. Wie in der oben beschriebenen Versuchsreihe, wurden Lösungen von 1000 ODml (18,0 μ mol) Phe *a* jeweils 1 min mit Ozon behandelt und die Reaktionen anschließend sofort durch Zugabe von Dimethylsulfid

abgebrochen. Die Reaktionen wurden bei Temperaturen von -70°C , -60°C und -50°C durchgeführt. Die Menge an umgesetzten Phe änderte sich durch die Temperatur nicht, so dass für die Produktzusammensetzung das Verhältnis von 3-Vinyl- zu 3-Formyl entscheidend ist. Bei -70°C liegt dieses Verhältnis bei 1:3, d.h. es entstand mehr 3-Formyl-Produkt. Bei -60°C liegt es bei 2:1, bei -50°C bei 3:1.

	Phe <i>a'</i> / <i>a</i>	[3-Formyl]- Phe <i>a</i>	Ethanal- Pheid <i>a'</i> / <i>a</i>	[3-Formyl]- Ethanal-Pheid <i>a'</i> / <i>a</i>
Probe nach 10 s	73	3	14	10
Probe nach 20 s	69	5	15	11
Probe nach 30 s	69	4	16	11
Probe nach 40 s	63	6	17	13
Probe nach 100 s	45	5	25	24

Tab. C-15: Produktzusammensetzung in % der Ozonolyse von Phe *a*. Nach 20 s Ozoneinleiten wurden die Proben nach weiteren 10, 20, 30, 40, 100 s durch Zugabe von Dimethylsulfid abgebrochen.

Durch höhere Temperaturen wird die Ozonolyse der Phetyl-Doppelbindung stärker begünstigt als die der 3-Vinyl-Doppelbindung. Generell gilt, dass bei der Spaltung mit Ozon konjugierte Doppelbindungen schlechter reagieren als isolierte [Laue und Plagens, 1994]. Die 3-Vinyl-Doppelbindung hat im Gegensatz zur Phetyl-Doppelbindung die Möglichkeit zur Konjugation mit dem π -System des Tetrapyrrols, weshalb sie mit Ozon schlechter reagiert als die Phetyl-Doppelbindung. Durch höhere Temperaturen sinkt die Löslichkeit des Ozons im Lösungsmittel und damit die Ozonkonzentration in der Lösung. Eine geringere Ozonkonzentration scheint sich ungünstig auf die Spaltung der 3-Vinyl-Doppelbindung auszuwirken, wodurch sich das Produktverhältnis von Ethanal-Pheid *a* zu [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a* verbessert.

Aus den oben aufgeführten Vorversuchen ergaben sich folgende optimierte Reaktionsbedingungen: das Ozon wurde bei einer Reaktionstemperatur von -50°C für 40 s eingeleitet und die Reaktion sofort durch Zugabe von Dimethylsulfid abgebrochen. Unter diesen Bedingungen konnte das Ethanal-Pheid *a* in einer Ausbeute von 44 % gewonnen werden. Dabei bildeten sich 4 % [3-Formyl]-Phe *a* und 18 % [3-Formyl]-Ethanal-Pheid *a*. 22 % nicht umgesetztes Phe *a* konnten zurückgewonnen werden.

Die Massenspektren der beiden Ozonolyseprodukte Ethanal-Pheid *a* und [3-Acetyl]-Ethanal-Pheid *a* zeigen die erwarteten Massenpeaks von $m/z = 635$ bzw. 651 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

3.3.4 Ozonolyse von 3-Deacetyl-3-vinyl-bacteriopheophorbid a –17³-methylester

3.3.4.1 **Synthese der Ausgangsverbindung 3-Deacetyl-3-vinyl-bacteriopheophorbid a –17³-methylester**

Als Ausgangsverbindung diente das BChl a, das aus dem Purpurbakterium *Rb. sphaeroides* R26.1, einer carotinoidfreien Mutante, extrahiert wurde. BChl a besitzt an der Position C-3 eine Acetyl-Gruppe, im Gegensatz zu den Chlorophyllen a und b, die dort eine Vinyl-Gruppe tragen.

Nach der von Struck et al. [Struck et al., 1992] entwickelten Synthese, ist es möglich, die 3-Acetyl-Gruppe des BChl a mit NaBH₄ zum 3¹-Hydroxyethyl-Derivat zu reduzieren, und anschließend durch thermische Wasserabspaltung in die Vinyl-Gruppe zu überführen (Abb. C-43).

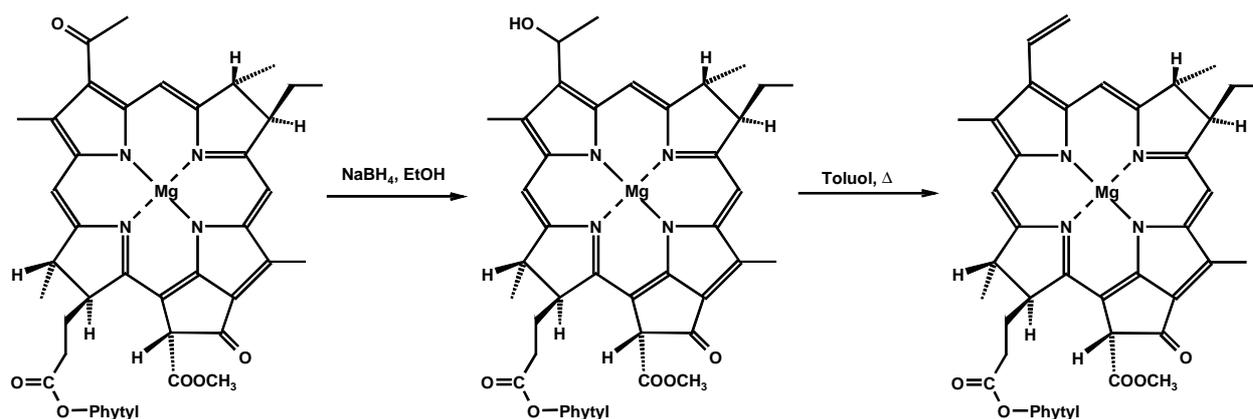


Abb. C-43: Darstellung des [3-Vinyl]-BChl a aus BChl a

Das [3-Vinyl]-BChl a lässt sich durch Behandlung mit Essigsäure pheophytinisieren und das entstandene [3-Vinyl]-BPhe a durch saure Umesterung in Methanol in das [3-Vinyl]-Me-BPheid a überführen, das als Ausgangsverbindung für die Ozonolyse der 3-Vinyl-Doppelbindung verwendet wurde.

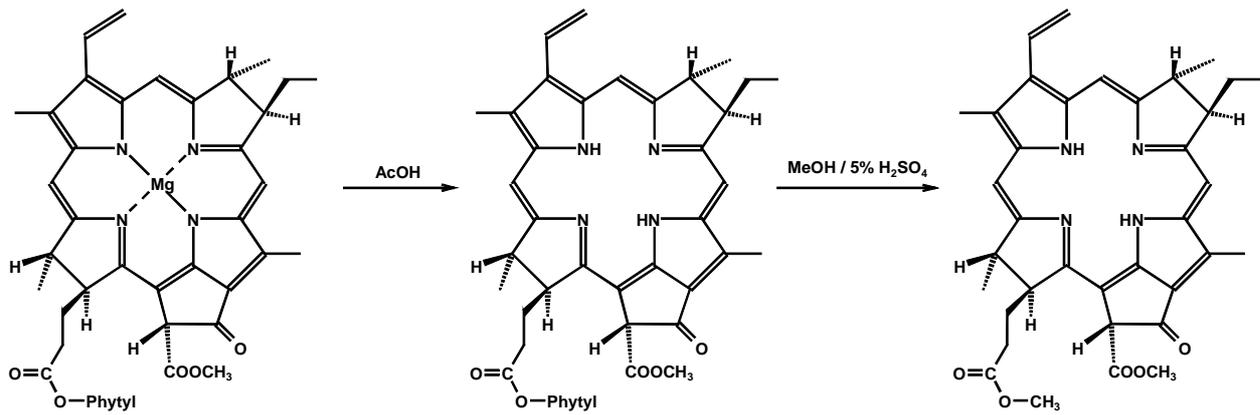


Abb. C-44: Darstellung des [3-Vinyl]-Me-BPheid a aus [3-Vinyl]-BChl a

Problematisch bei dieser Reaktionsfolge zur Synthese des [3-Vinyl]-Me-BPheid a ist die außerordentlich hohe Sauerstoff- und Lichtempfindlichkeit der magnesiumhaltigen Bakteriochlorophyll-Derivate, wodurch Arbeiten unter striktem Sauerstoff- und Lichtausschluss notwendig ist. Alle magnesiumhaltigen Zwischenprodukte müssen säulenchromatographisch über DEAE-Sepharose aufgereinigt werden, wobei sich allerdings Degradierungsprodukte bilden können. Die nicht-metallierten Bakteriopheophytin-Derivate sind hingegen weniger empfindlich gegenüber Oxidation und lassen sich über die besser trennenden präparativen Kieselgelplatten aufzureinigen.

Aus diesem Grunde wurde nach einem alternativen Syntheseweg für die Darstellung des [3-Vinyl]-Me-BPheid a gesucht. Hierzu bot es sich an, die Reaktionen mit dem BPhe a bzw. Me-BPheid a durchzuführen. Die Reduktion der 3-Acetyl-Gruppe des BPhe a gelingt unter den gleichen Bedingungen wie beim BChl a in EtOH mit NaBH_4 , die anschließende Dehydratisierung in Toluol ist allerdings beim BPhe a unter den für BChl a eingesetzten Bedingungen nicht möglich. Die Abgangsneigung der Hydroxygruppe scheint durch das fehlende Magnesiumzentralatom erniedrigt zu sein.

Struck et al. [Struck et al., 1992] stellten eine Abhängigkeit der Dehydratisierung der 3^1 -Hydroxy-Gruppe von $C-13^2$ -Substituenten am isozyklischen Ring des BChl a fest, so dass weder das $3^1\text{-OH-}13^2\text{-OH-BChl a}$ noch das $3\text{-Deacetyl-}3^2\text{-hydroxyethyl-}13^2\text{-demethoxycarbonyl bakteriochlorophyll a}$ ($3^1\text{-OH-Pyro-BChl a}$) eine thermische Eliminierung der 3^1 -Hydroxy-Gruppe eingingen. Es wird postuliert, dass für die Dehydratisierung ein intaktes β -Ketoester-System benötigt wird, welches durch Bildung eines Enolats über das π -System des Tetrapyrrols die 3^1-OH-Gruppe aktiviert. Das BPhe a hat ein intaktes β -Ketoester-System, dessen Epimerisierung aber möglicherweise nicht so schnell wie beim BChl a verläuft.

Um eine Aktivierung der 3¹-OH-Gruppe zu erreichen und somit die Dehydratisierung der 3¹-OH-Gruppe des BPhe *a* zu ermöglichen, wurde Mg(ClO₄)₂ zur Stabilisierung des Enols zugegeben (Abb. C-45) [Scheer und Katz, 1978]. Die erfolgreiche Reaktion lässt sich photometrisch durch Verschiebung der Q_y-Bande von 718 nm (Q_y-Bande des 3¹-Hydroxy-BPhe *a*) nach 725 nm (Q_y-Bande des [3-Vinyl]-BPhe *a*) erkennen. Das Mg(ClO₄)₂ wurde in einem Stoffmengenverhältnis von 1 : 2,4 zum eingesetzten BPhe *a* zugegeben, da ab einem äquimolaren Verhältnis Nebenreaktionen, wie die Verseifung des Phtylrestes eintreten. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 80 % isoliert werden und stimmt in Masse, Absorptionsspektrum, DC und Retentionszeit in der HPLC mit dem nach herkömmlicher Methode hergestellten [3-Vinyl]-BPhe *a* überein.

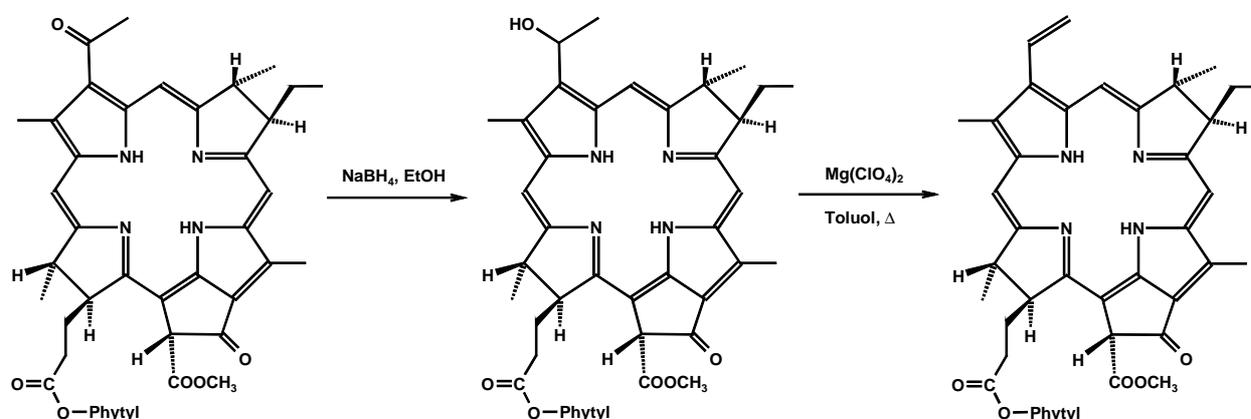


Abb. C-45: Darstellung des [3-Vinyl]-BPhe *a* aus BPhe *a*

OH⁻ ist ein sehr schlechte Abgangsgruppe, die in der Regel nur durch Säurekatalyse abgespalten werden kann [March, 1992]. Eine Aktivierung kann auch durch die Stabilisierung des Übergangszustandes, dem Carbeniumion durch das π -System eines Aromaten stattfinden. Dies scheint hier der entscheidende Effekt zu sein, da das BChl *a* durch das Magnesiumzentralmetall eine höhere Elektronendichte besitzt, als das BPhe *a*. Zusätzlich kann das π -System durch die Bildung des Enols um eine Doppelbindung erweitert werden. Anscheinend ist die Elektronendichte des BPhe *a* nicht groß genug, um das Carbeniumion zu stabilisieren, erst nach Zugabe von Mg(ClO₄)₂ und der damit erfolgten Erweiterung des π -Systems tritt eine Eliminierungsreaktion ein.

Es ist bekannt, dass Mg(ClO₄)₂ im β -Ketoester-System durch Bildung eines peripheren Mg-Komplexes die Enolform stabilisiert (Abb. C-46) [Scheer und Katz, 1978]. Zur spektroskopischen Bestimmung dieses peripheren Mg-Komplexes sind gesättigte Mg-Lösungen notwendig, bei dieser Synthese wurde das Mg(ClO₄)₂ nur in geringen Mengen eingesetzt, so dass der intermediär gebildete periphere Mg-Komplex während der Reaktion spektroskopisch nicht nachweisbar war.

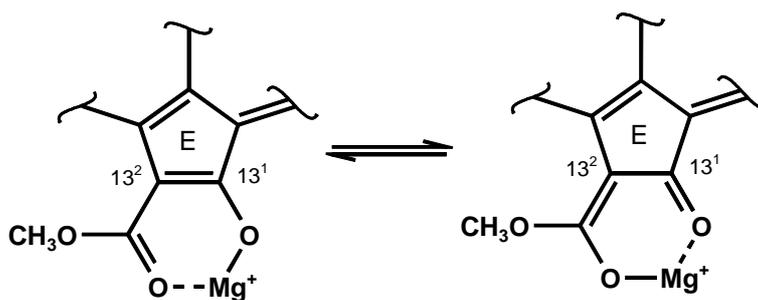


Abb. C-46: Resonanzformen des peripheren Mg-Komplexes am isozyklischen Ring E von (B)Chl *a* und (B)Phe *a* unter Bildung eines Enolats

Eine weitere Methode, um eine Eliminierung der 3¹-OH-Gruppe zu erreichen, die kurz vor Beendigung dieser Arbeit veröffentlicht wurde, ist die direkte Aktivierung. Katterle erreichte durch Einsatz von Methansulfonylchlorid und Triethylamin, dass die Abgangsneigung der 3¹-OH-Gruppe des 3¹-OH-Pyro-BMeid *a* begünstigt wird und erhielt auf diesem Wege mit 83 % Ausbeute das [3-Vinyl]-Pyro-BMeid *a* [Katterle, 2001].

3.3.4.2 Ozonolyse des 3-Deacetyl-3-vinylbakteriopheophorbid *a*-17³-methylesters

Die Spaltung der 3-Vinyl-Doppelbindung des [3-Vinyl]-Me-BPheid *a* mit Ozon wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie beim Me-Pheid *a* (siehe Kap. C-3.3.2.1). Da es unter diesen Bedingungen nicht zu der gewünschten Umsetzung kam, sondern zu Chlorinbildung und weiteren nicht näher analysierten Abbauprodukten des [3-Vinyl]-Me-BPheid *a*, wurden die Reaktionsparameter Temperatur, O₃-Konzentration, Pigmentkonzentration, Säurekonzentration, Lösungsmittel und Reaktionszeit variiert. Diese Versuche blieben aber ohne Erfolg. Zwei Degradierungsprodukte konnten über ihr Absorptionsspektrum und ihre Retentionszeit durch HPLC-Analyse identifiziert werden, das Me-Pheid *a* und das [3-Formyl]-Me-Pheid *a*, die durch Bildung einer Doppelbindung an Position C7-C8 durch Oxidation entstehen. Es wurde versucht, diese Oxidation am Ring B durch Zugabe von Na-Ascorbat zu verhindern. Bei einem hohen Na-Ascorbat-Überschuss (50-500-fach, bezogen auf die Pigmentmenge) wirkt das Na-Ascorbat als spezifischer Schutz vor einem O₃-Angriff, dies bedeutet allerdings auch, dass die 3-Vinyl-Gruppe nicht angegriffen wird. Bei einem niedrigeren Na-Ascorbat-Überschuss (äquimolar bis 10-fach) wird durch das Ozon erst das Na-Ascorbat oxidiert und anschließend die 3-Vinyl-Doppelbindung angegriffen, so dass der Ring B nicht mehr vor Oxidation geschützt ist.

Bei der Reaktion ist ein langwelliger Shift der Q_y-Bande, analog zu der Verschiebung bei der Ozonolyse des Me-Pheid *a* zu erwarten. In ca. 1 % der Produkte konnte ein solcher Shift

absorptionsspektroskopisch beobachtet werden. Dieses Produkt wurde mittels präp. DC von polareren Produkten abgetrennt und über HPLC-Analyse nochmals aufgereinigt. Es konnte allerdings nicht genügend Material für eine massenspektroskopische Analyse gewonnen werden. Abb. C-47 zeigt das Absorptionsspektrum dieses Produktes im Vergleich mit dem des Edukts [3-Vinyl]-Me-BPheid *a* und dem des Me-BPheid *a*.

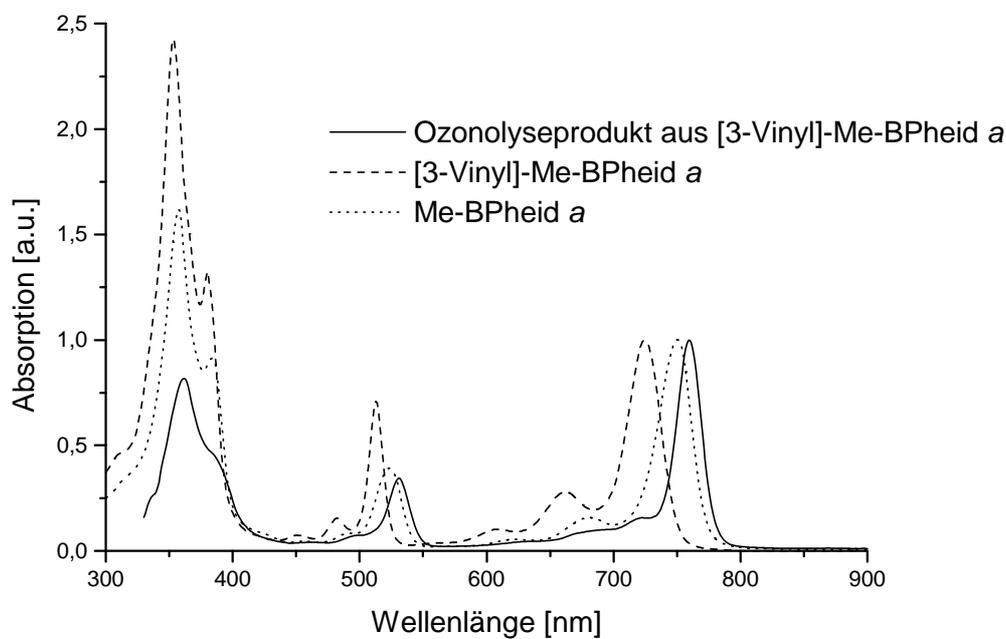


Abb. C-47: Absorptionsspektren des [3-Vinyl]-Me-BPheid *a* (- - -) in DE und des Ozonolyseproduktes aus [3-Vinyl]-Me-BPheid *a* (—) in Toluol/Hexan 1:1 und des Me-BPheid *a* (· · · ·), alle Spektren wurden auf die Q_y -Bande normiert.

Die Q_y -Bande des [3-Vinyl]-Me-BPheid *a* verschiebt sich langwellig um 35 nm (635 cm^{-1}) langwellig von 725 nm nach 760 nm. Die Q_y -Bande des Me-BPheid *a* liegt bei 750 nm, so dass sich eine Reihe aufstellen lässt, mit zunehmender langwelliger Verschiebung der Q_y -Bande von [3-Vinyl]-Me-BPheid *a* über das Me-BPheid *a* zum 3-Devinyl-3-formylbakteriopheophid *a* ([3-Formyl]-Me-BPheid *a*). Diese Reihenfolge, die die unterschiedliche Substitution an Position C-3 auf die Q_y -Bande bewirkt, konnte auch bei der analogen Reihe Me-Pheid *a*, [3-Acetyl]-Me-Pheid *a* und [3-Formyl]-Me-Pheid *a* festgestellt werden (Kap. C-3.3.2.2). Die Retentionszeit in der HPLC ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dem hier dargestellten Produkt um das [3-Formyl]-Me-BPheid *a* handelt. Im Vergleich mit den Retentionszeiten von Me-Pheid *a* (12,8 min), [3-Formyl]-Me-Pheid *a* (16,3 min), [3-Vinyl]-Me-BPheid *a* (15,4 min) und dem [3-Formyl]-Me-BPheid *a* (17,1 min) sieht man, dass im Vergleich zum jeweiligen Edukt das [3-Formyl]-Me-BPheid *a* etwa im gleichen Maße langsamer läuft wie das [3-Formyl]-Me-Pheid *a*. Die Verschiebung im Absorptionsspektrum

und die Retentionszeit sind gute Hinweise, dass es sich bei dem isolierten Produkt um das [3-Formyl]-Me-BPheid *a* handelt.

Katterle [Katterle, 2001] versuchte ebenfalls die 3-Vinyl-Doppelbindung des [3-Vinyl]-BMeid *a* oxidativ zu spalten, aber nicht mit Ozon, sondern mit Osmiumtetroxid und Natriumperiodat. Auch mit dieser Methode, die bei den Chlorderivaten gute Ergebnisse lieferte, erhielt er ein Gemisch aus mindestens sechs verschiedenen Produkten, welche alle für Chlorine typische Absorption zeigten.

4 Bindung von (Bakterio-)Chlorophyll-Derivaten an synthetische modulare Proteine

4.1 Einführung

In der Natur sind die Wechselwirkungen zwischen Pigment und Protein von entscheidender Bedeutung für Lichtaufnahme, Energietransfer und Ladungstrennung, weshalb bei der Synthese künstlicher Systeme die Untersuchung der Pigment-Protein-Wechselwirkungen ein wesentlicher Aspekt ist. Die natürlichen Photosysteme sind so komplex, dass sie zur Synthese *in vitro* stark vereinfacht werden müssen. Hierfür werden verschiedene Methoden auf der Pigment- und/oder der Proteinseite verwendet (vgl. Kap. A). In den meisten Fällen werden natürliche Proteine als Grundlage für Pigmentaustausch und Mutationen verwendet, so dass in den modifizierten Komplexen, wie auch in den natürlichen, (B)Chl-Protein- und (B)Chl-(B)Chl-Wechselwirkungen nebeneinander vorliegen, die nur schwer voneinander zu unterscheiden sind.

Um allein (B)Chl-Protein-Wechselwirkungen untersuchen zu können, ist es notwendig, die (B)Chl in neue, synthetische Proteine einzulagern. Das *de novo* Design scheint zur Untersuchung der (B)Chl-Protein-Wechselwirkungen besonders gut geeignet zu sein, da hier die Möglichkeit besteht, durch ein geeignetes Design der Proteine nur ein (B)Chl zu binden und somit allein (B)Chl-Protein-Wechselwirkungen ohne gleichzeitig auftretende (B)Chl-(B)Chl-Wechselwirkungen zu untersuchen. Zahlreiche Modelle zur Bindung von nur einem Chromophor in einer synthetischen Bindungstasche sind für Häm entwickelt worden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse über Design, Struktur und Synthese können zum Entwurf von neuen (B)Chl-Proteinen herangezogen werden.

Trotz der strukturellen Unterschiede von (B)Chl und Häm (vgl. Kap. A und Kap. C-1.1) sollte es möglich sein, die auf dem *de novo* Design aufbauenden Hämproteine direkt für die (B)Chl-Bindung zu verwenden, da (B)Chl nach geeigneten Modifikationen auch von Häm-Bindungstaschen (z.B. Myoglobin und Hämoglobin) akzeptiert werden (vg. Kap. C-1.1). Ähnlich wie Häm werden auch die (B)Chl über His oder andere ligandierende Aminosäuren am Protein gebunden werden.

Die von der AG Haehnel (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zunächst für Hämbindung entwickelten modularen, Vier-Helix-Bündel-Proteine basieren auf den Prinzipien der orthogonalen Synthese von Vier-Helix-Bündel-Proteinen mit hydrophoben Kern [Mutter et al., 1988; Mutter und Vuilleumier, 1989]. Die verwendeten membrangebundenen Vier-Helix-Bündel-Proteine bestehen aus vier antiparallelen, amphiphilen α -Helices, die kovalent an ein zyklisches Dekapeptid („Template“) gebunden wurden (Abb. C-48). Für die Helixaußenseiten werden hydrophile Aminosäuren gewählt, unter Berücksichtigung α -Helix-stabilisierender Faktoren [Bryson et al., 1995; Popot und Engelman, 2000; DeGrado, 1997], wodurch das gesamte Protein wasserlöslich wird. Die Aminosäurereste der Innenseite sind hydrophob, so dass sich eine hydrophobe Tasche bildet, die den Kofaktor aufnehmen kann. Zur Bindung des Häms, aber auch der (Bakterio-)Chlorophylle, befindet sich an der Innenseite zweier gegenüberliegender Helices (Bindehelices) jeweils ein Histidin, das über das Zentralmetall den Chromophor koordinativ binden kann (Abb. C-48, links). Die beiden anderen Helices (Abschirmhelices) dienen zur Abschirmung der hydrophoben Bindungstasche gegen das wässrige Außenmilieu. Auf der gegenüberliegenden „Unter“-Seite des „Templates“ kann das Protein zusätzlich kovalent auf einer Zellulosemembran nach der sog. Spotsynthese gebunden werden [Frank, 1992] (Abb. C-48, rechts). Dies ermöglicht das gleichzeitige Screenen einiger hundert verschiedener Peptide.

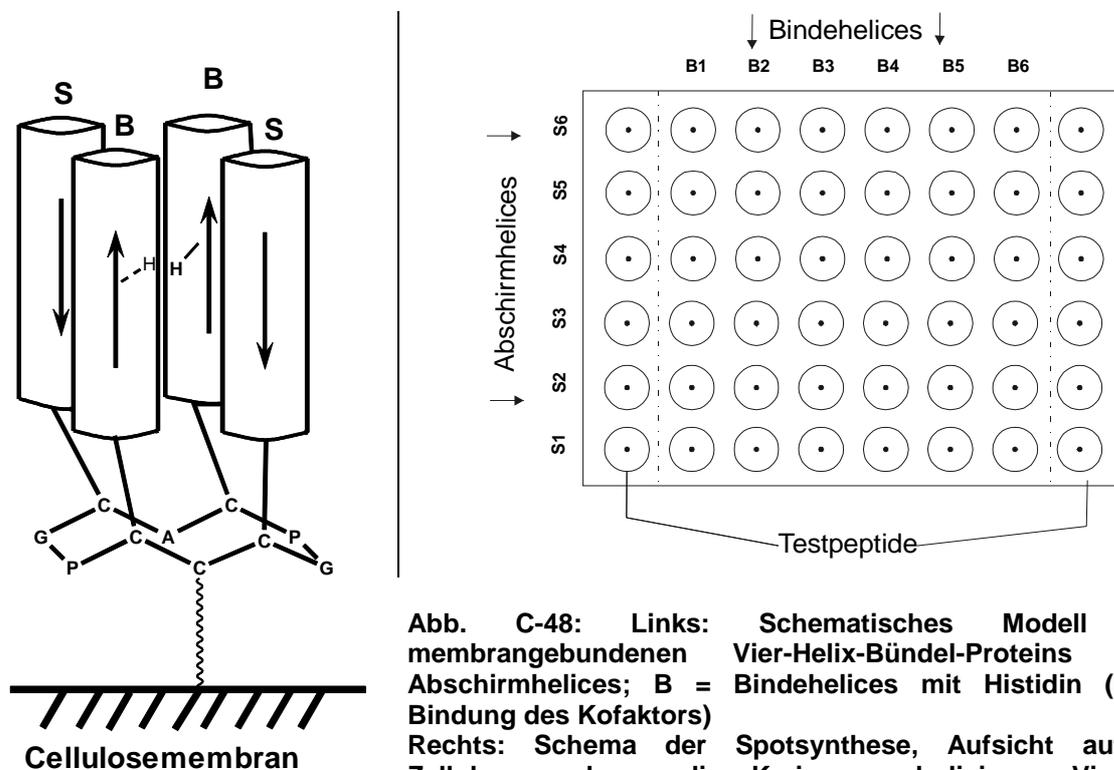


Abb. C-48: Links: Schematisches Modell eines membrangebundenen Vier-Helix-Bündel-Proteins (S = Abschirmhelices; B = Bindehelices mit Histidin (H) zur Bindung des Kofaktors) Rechts: Schema der Spotsynthese, Aufsicht auf eine Zellulosemembran; die Kreise symbolisieren Vier-Helix-Bündel-Proteine mit unterschiedlichen Kombinationen von Abschirm- und Bindehelices.

Die hydrophoben Aminosäurereste im Inneren werden, mit Ausnahme des Histidins, gezielt variiert, so dass man Bibliotheken von Peptiden mit unterschiedlichem hydrophoben Kern erhält, mit denen sich die Wirkung geringer Peptidänderungen auf die spektralen oder redoxreaktiven Eigenschaften des Chromophors untersuchen lassen. Nach diesem System konnten Rau et al. eine Bibliothek von 299 auf einer Zellulosemembran gebundenen Peptiden synthetisieren und auf die Bindung von Häm screenen: das Tetrapyrrol konnte reversibel und wiederholt gebunden werden, und das Redoxpotential von -90 bis -150 mV variiert werden [Rau und Haehnel, 1998]. „Erfolgreiche“ (auch nur ansatzweise) Konstruktionen können dann in einer zweiten Syntheserunde modifiziert und verfeinert werden.

Dieses für Häm-Proteine entwickelte System sollte auf (Bakterio-)Chlorophylle übertragen werden. Um eine Bindung der Chlorophylle zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Beim ersten Ansatz wurden die Chlorophylle kovalent an das Protein gebunden (Kap. C-4.2), wodurch eine Bindung im Protein erzwungen wird, während beim zweiten Ansatz die Bindung nicht-kovalent, vor allem über Koordination der Zentralmetalle mit Histidin-Resten im Protein erfolgte. Im Kap. C-4.3 wird das Design der Proteinsequenzen zur nicht-kovalenten Bindung erläutert, in Kap. C-4.4 die Wahl und Synthese der BChl-Derivate und in Kap. C-4.5 die Einlagerung der BChl-Derivate in die modularen Proteine (MOP). Das letzte Kapitel (Kap. C-4.6) beschreibt die Analyse der BChl-Bindung an die modularen Proteine und die Ergebnisse parallel durchgeführter Untersuchungen in Lösung.

4.2 Kovalente Bindung von Chlorophyll-Derivaten an modulare Proteine

Die kovalente Bindung von Chlorophyllen an MOP wurde mit der von Rau et al. entwickelten Methode erreicht [Rau et al., 2001]. Dabei werden Chlorophyll-Derivate, die eine Formyl-Gruppe tragen, über eine modifizierte Peptidseitenkette, ein mit einer Aminoxyacetyl-Gruppe modifiziertes Lysin, über eine Oximbindung kovalent an ein modulares Vier-Helix-Bündel-Protein gebunden (Abb. C-49). Die Ergebnisse der von Rau et al. durchgeführten Versuche mit den in Kap. C-3 synthetisierten Verbindungen werden im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

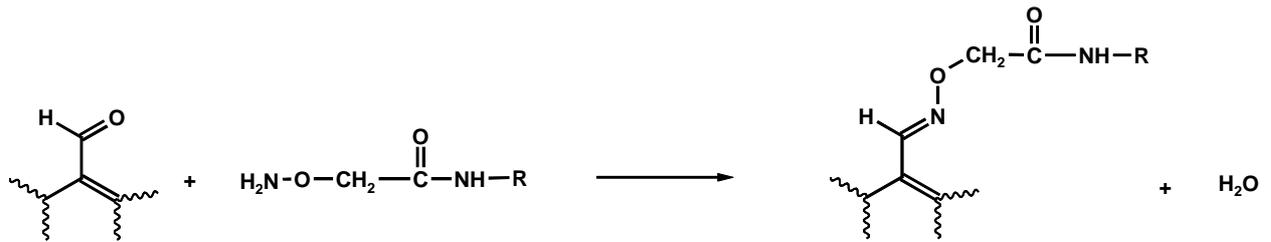


Abb. C-49: Kupplung einer Formyl-Gruppe an ein mit einer Aminoxyacetyl-Gruppe modifiziertes Lysin (R = Peptid) unter Bildung eines Oxims

Ein natürliches Chlorophyll-Derivat mit einer Aldehyd-Gruppe an Ring B ist das Chl *b* (Abb. C-50). Durch kovalente Bindung wird eine definierte Position und eine bestimmte Orientierung des Chlorophylls im Protein erreicht, eine gezielte Änderung der Chlorophyll-Orientierung im Protein sollte prinzipiell durch Bindung von Formyl-Chlorophyll-Derivaten möglich sein, die die Formyl-Gruppen an verschiedenen Positionen tragen. Wie Chl *b* besitzt das in Kap. C-3 synthetisierte [3-Formyl]-Me-Pheid *a* (Chl *d*-Derivat) eine Formyl-Gruppe, jedoch an einer anderen Position (Abb. C-50).

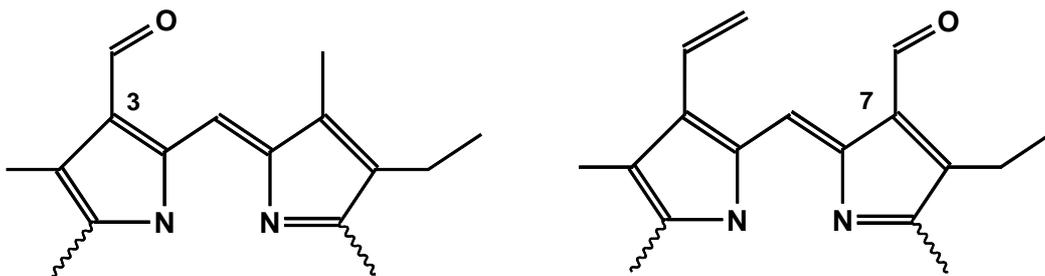


Abb. C-50: Ausschnitt von Chl *d* (links) - und Chl *b*-Derivaten (rechts) mit den Formyl-Gruppen an Position C-3- bzw. C-7.

Als Protein wurde ein modulares Vier-Helix-Bündel-Protein verwendet, mit einer asymmetrischen Helixanordnung von ABAC. Die Helices B und C tragen beide Histidine (Bindehelices) zur zusätzlichen Koordinierung des Zentralmetalls der Chlorophylle, an Helix B sitzt zusätzlich der modifizierte Lysin-Rest, an dem die Chlorophyll-Derivate kovalent gebunden werden (Abb. C-51 I). Die kovalente Bindung der Chlorophylle an eine α -Helix des Vier-Helix-Bündel-Proteins ist in Abb. C-51 II dargestellt [Rau et al., 2001]. Als Chlorophyll-Derivate wurden Zn-Me-Pheid *b*, mit der Formyl-Gruppe an Position C-7 und das Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a* (Synthese siehe Kap. C-3.3.2) verwendet.

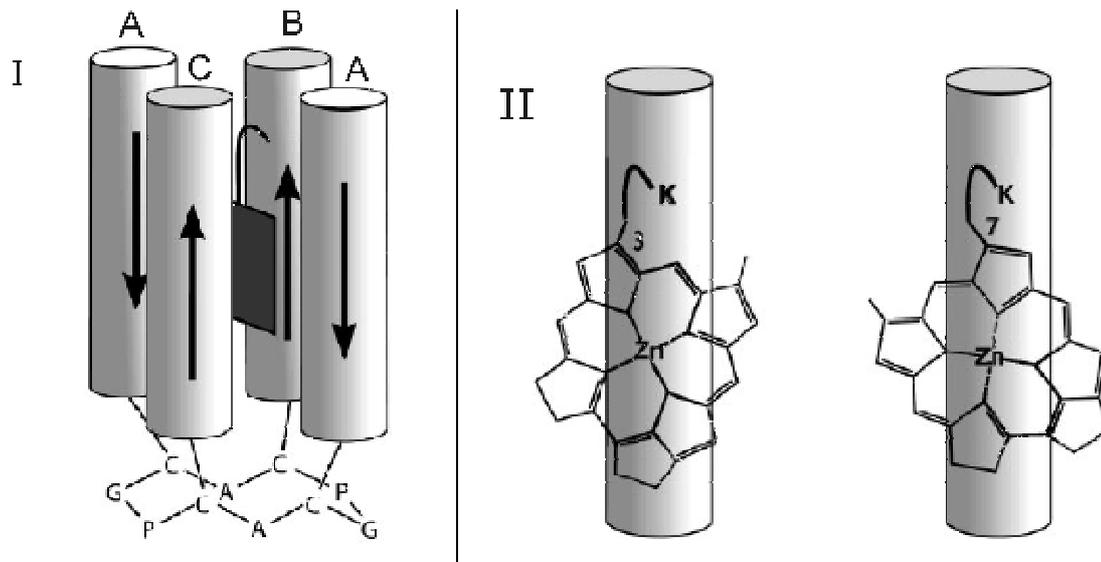


Abb. C-51: Schematische Darstellung eines modularen Vier-Helix-Bündel-Proteins (I) mit einem gebundenen Kofaktor (dargestellt als Parallelogramm) und der verschiedenen Orientierungen der Chlorophyll-Derivate Zn-Me-Pheid *b* und Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a* (II) (entnommen aus [Rau et al., 2001]).

Die chemoselektive Kopplung erfolgte nach der oben gezeigten Methode (Abb. C-49) in schwach saurer Lösung. Die 3-Formyl-Verbindung reagiert um ein vielfaches rascher, als die 7-Formyl-Verbindung, und es wurde ein geringerer Überschuss an Pigment benötigt. Dies ist möglicherweise durch die unterschiedliche Position der Formyl-Gruppe zu erklären, aber ein Einfluss der 13^2 -COOCH₃-Gruppe (beim 3-Formyl-Derivat abgespalten) kann nicht ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe von Massen- und CD-Spektroskopie konnte die erfolgreiche Bindung nachgewiesen werden. Die Absorptionsspektren des gebundenen Zn-Me-Pheid *b* zeigen einen langwelligen Shift der Q_y-Bande im Vergleich mit dem ungebundenen Pigment, der durch den elektronenziehenden Effekt der Oximbindung verursacht wird. Das proteingebundene Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a* zeigt hingegen eine Blauverschiebung der Q_y-Bande um 9 nm gegenüber dem Pigment in Lösung (Abb. C-52).

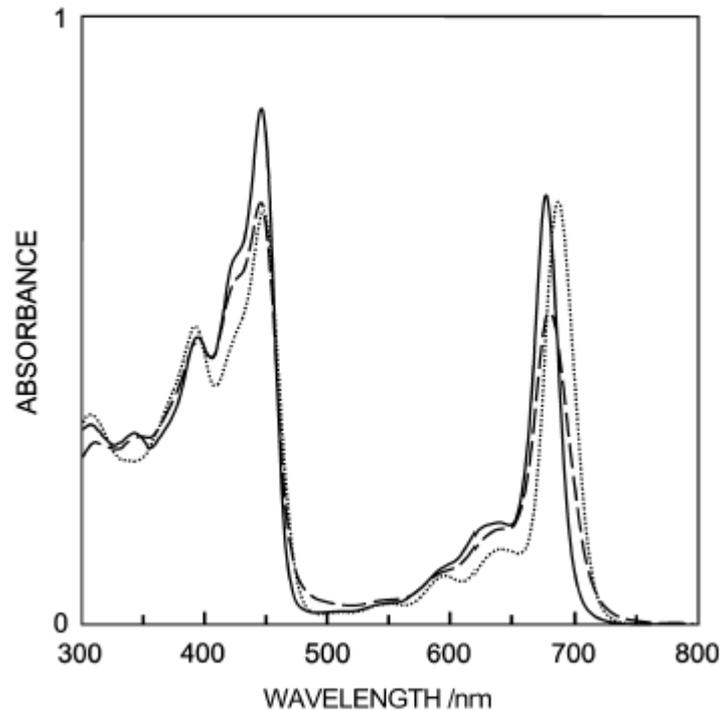


Abb. C-52: Absorptionsspektrum von Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a* in MeOH (· · · ·), gebunden als Oxim an das MOP (—) und an eine einzelne Helix (- - -). Die Spektren wurden auf die gleiche Fläche unter der Q_y -Bande zwischen 550 und 750 nm normiert (entnommen aus [Rau et al., 2001]).

Eine ähnliche Verschiebung kommt durch die Bindung des Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid *a* an eine einzelne α -Helix zustande, sie ist also auf die Oximbildung zurückzuführen. Ein bemerkenswerter Effekt ist die Änderung der Halbwertsbreite (Breite auf halber Höhe) der Q_y -Bande: In MeOH beträgt sie 35 nm, gebunden an eine einzelne Helix 28 nm, und gebunden im MOP 24 nm. Diese Bandenverschmälerung ist ein Hinweis auf die zunehmend unpolare und definiertere Umgebung des Pigments, da die Pigmente in unpolaren Lösungsmitteln eine Bandenverschmälerung im Vergleich zu polaren Lösungsmitteln zeigen. Nicht geklärt werden konnte, ob das Zentralmetall von den Histidinen komplexiert wird, da die Absorptionsspektren der Chlorophylle darüber keine Aussage zulassen.

4.3 Peptid-Design und Modellierung der modularen Proteine für die nicht-kovalente Bindung von [M]-Bakteriochlorophyllen (M = Ni, Zn und Fe)

Die verwendeten Peptide wurden von Bernhard Monien (AG Prof. Haehnel, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) entworfen und synthetisiert.

Jeweils zwei gleiche Abschirmhelices S_i ($i = 1-18$) und Bindehelices B_j ($j = 1-12$) wurden alternierend und mit wechselnder Orientierung auf einem „Template“ positioniert, was zu einer Bibliothek von 216 Vier-Helix-Bündel-Proteinen auf Zellulosemembran führte. Die meisten dieser Peptide basieren auf einem symmetrischen Modell, in dem die vier Helices annähernd parallel angeordnet sind und so ein Rechteck mit Seitenlängen von 1,00 nm und 1,07 nm und einer Diagonalen von 1,47 nm bilden (Abb. C-53). Die Geometrie entspricht der natürlicher Häm-koordinierender Vier-Helix-Bündel im Cytochrom bc_1 und b_{562} [Zhang et al., 1998].

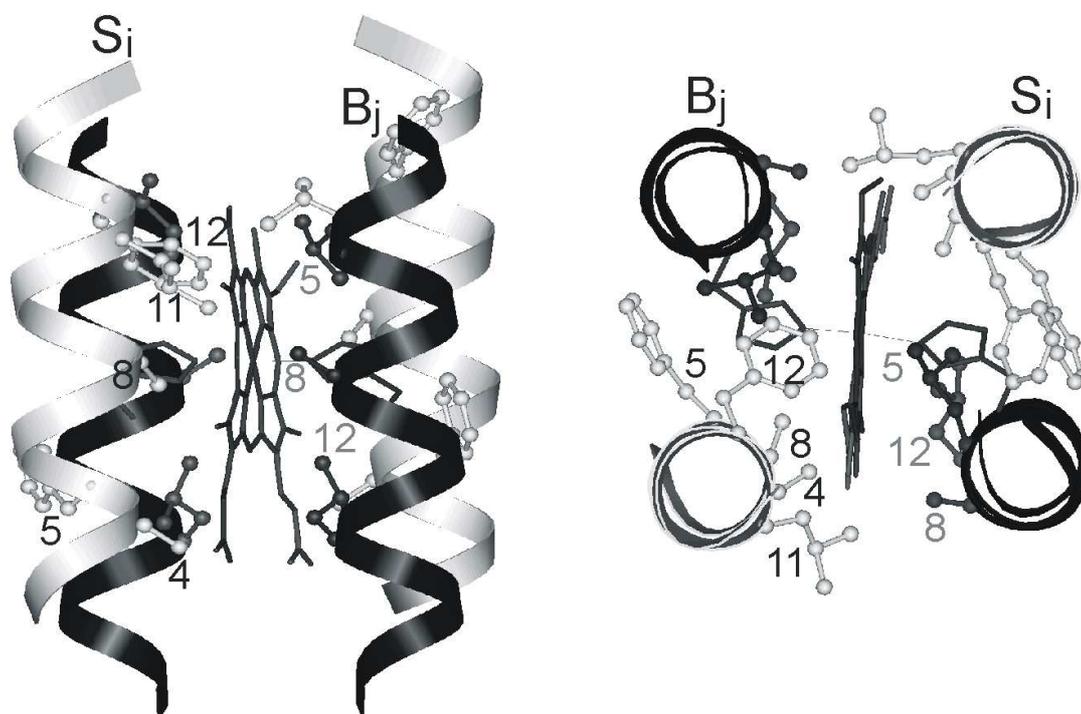


Abb. C-53: Symmetrisches Modell eines Kofaktor-bindenden Vier-Helix-Bündel-Proteins, Bindehelices B_j (schwarz), Abschirmhelices S_i (weiß) (erhalten von Bernhard Monien; Universität Freiburg). Basierend auf diesem Modell wurden die Bindehelices B_1-B_{10} und die Abschirmhelices S_1-S_{13} entworfen. Detailliert dargestellt wurden nur die Histidine, die Zentralmetall binden, und die Aminosäurereste, die während des Designs variiert wurden.

Der Kofaktor befindet sich im hydrophoben Kern der Vier-Helix-Bündel, mit dem Metallzentrum auf dem Schnittpunkt der Diagonalen des Rechtecks. Die Bindehelices B_j wurden so angeordnet, dass eine axiale Koordination des Häm durch die beiden Histidine möglich ist. Die Fe-N_{HIS}-Bindungslänge liegt zwischen 0,208 und 0,203 nm. Die Histidinebenen stehen senkrecht auf der Häm-Ebene und sind um 90° gegeneinander gedreht [Zhang et al., 1998; Arnesano et al., 1999; Carrell et al., 1999]. Diese geometrischen Einschränkungen bewirken eine Verdrillung der Helices um 24° bezüglich der Helixposition mit dem kleinst möglichen Fe-C_α-(His)-Abstand. Um eine enge „knob-into-hole“-Packung der Aminosäurereste zwischen den Helices zu ermöglichen [Harbury et al., 1993], wurden die Abschirmhelices (S_i) um 0,27 nm relativ zur Bindehelix vertikal verschoben. Die Propionat-Seitenketten des Häm sind entlang der Proteinachse orientiert. Dieses Modell dient dem Design der Abschirmhelices S_1 - S_{13} und der Bindehelices B_1 – B_{10} . Die veränderten Aminosäurereste X_4 , X_5 , X_8 , X_{11} and X_{12} in der Sequenz der Abschirmhelix S_i genauso wie Z_5 , Z_8 and Z_{12} in der Sequenz der Bindehelix B_j (Tab. C-16) bilden den größten Teil der hydrophoben Packung des Häm.

Position X_n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Abschirmhelices S_1 - S_{13} , (symmetrisches Modell)	L	E	E	X	X	K	K	X	E	E	X	X	K	K	K (Mp)
Teil der 1bcc-Helix 41	I	S	A	W	W	N	F	G	S	L	L	A	V	C	L
Teil der 1bcc-Helix 45	Y	K	E	T	W	N	T	G	V	I	L	L	L	T	L
Abschirmhelices S_{14} - S_{18} (asymmetrisches Modell)	L	E	E	L	X	K	X	A	E	E	L	X	K	K	K (Mp)

Position Z_m	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Bindehelices B_1 - B_{10} (symmetrisches Modell)	Mp	G	L	E	L	Z	L	K	Z	H	E	E	Z	L	K	K	L
Teil der 1bcc-Helix 41	I	A	G	I	T	I	I	H	L	T	F	L	H	E	S		
Teil der 1bcc-Helix 45	F	F	F	I	C	I	F	L	H	I	G	R	G	L	Y	Y	
Bindehelices B_{11} - B_{13} (asymmetrisches Modell)	Mp	G	L	E	Q	I	I	K	L	H	Z	E	Z	Z	Q	K	L

Tab. C-16: Aminosäuresequenzen der Abschirmhelices S_i (oben) mit den variierten Positionen X_n , und der Bindehelices B_j (unten) mit den variierten Positionen Z_m (siehe auch Abb. C-54). Das nicht-nummerierte Mp bezeichnet den Maleinimidopropionyl-Rest, der die Helix mit einem Cystein auf dem zyklischen Dekapeptid verbindet.

Um eine möglichst dichte Packung der Aminosäurereste zu erhalten, wurde das System mit der Software (InsightII, Accelrys) wiederholt durch den Einbau von Wassermolekülen in Lücken im Umkreis von 1 nm um das Hämeisen getestet. Eine schrittweise Substitution der hydrophoben Reste während dieser Modellierung führte zu einer Verringerung der Anzahl der Wassermoleküle. Für diese Variationen wurde Alanin als kleiner, Leucin und Valin als mittlerer und Phenylalanin als großer Aminosäurerest verwendet. Sequenzen mit fünf oder weniger Wassermolekülen in der 1 nm-Sphäre um das Hämeisen wurden für die Synthese akzeptiert. Die resultierenden Helixsequenzen B₁-B₁₀ und S₁-S₁₃ sind in Abb. C-51 angegeben.

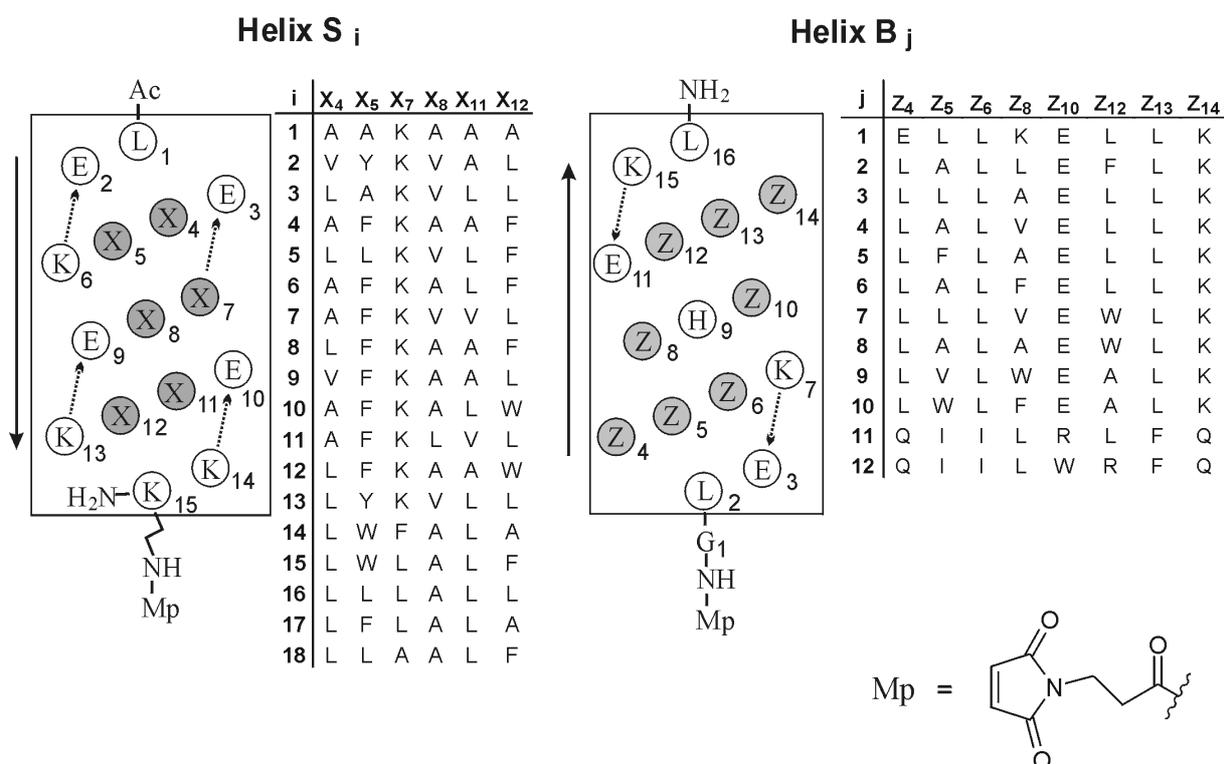


Abb. C-54: Schematische Darstellung der Abschirmhelices S_i und Bindehelices B_j (erhalten von Bernhard Monien; AG Prof. Haehnel, Universität Freiburg). Die Aminosäuren, die variiert wurden (X_n in S_i und Z_m in B_j) sind grau dargestellt. Die Tabellen enthalten die Aminosäuren an diesen Positionen in den verschiedenen Helices.

Ein alternatives Modell basiert auf der Struktur von Cytochrom *b* (Cyt *b*) in der Ubiquinon-Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Kette C des PDB-Eintrags 1bcc.pdb [Zhang et al., 1998]). Die Helices 41, 43, 45 und 48 von dieser Untereinheit bilden ein Vier-Helix-Bündel, das zwei Hämgruppen über eine *bis*-Histidin-Ligandierung zwischen zwei gegenüberliegenden Helices bindet. Die Sequenzen von S₁₄-S₁₈ und B₁₁-B₁₂ (Abb. C-54) basieren auf diesem Design.

Hierzu mussten folgende Modifikationen der ursprünglichen Proteineinheit durchgeführt werden:

- 1) Nur die Hälfte des natürlichen Vier-Helix-Bündels, welches die Region um das Häm mit dem höheren Potential einschließt, wurde für das Protein mit einem einzelnen Tetrapyrrol verwendet, da nur ein einzelnes BChl gebunden werden sollte.
- 2) Da die natürliche Einheit in einer hydrophoben Umgebung sitzt, wurden alle Aminosäuren der Außenseite des Bündels gegen hydrophile Aminosäuren ausgetauscht.
- 3) Die natürliche Einheit enthält vier verschiedene Helices, aber nur jeweils zwei paarweise gleiche (S_i , B_j) wurden für die Modellierung (und Synthese) verwendet, die (wie oben) nach der besten Raumerfüllung ausgewählt wurden.

Aus diesen Anpassungen resultierte ein Vier-Helix-Bündel-Protein mit neuen Sätzen von jeweils zwei identischen Abschirm- und Bindehelices (Abb. C-55). Wie bei der obigen Prozedur wurden die Aminosäurereste an den Positionen der Abschirmhelix ($X_5 = W$, $X_7 = F$, $X_{12} = A$) und der Bindehelix ($Z_{10} = I$, $Z_{12} = R$, $Z_{13} = G$) variiert, und die Variationen hinsichtlich der optimalen Packung selektiert. In der Startkonfiguration hatten neun Wassermoleküle in dem 1 nm-Umkreis um das Hämeisen Platz. Durch den vorher beschriebenen Austausch der genannten Aminosäuren, konnte diese Zahl auf zwei reduziert werden. Dieses MOP ($B_{12}S_{15}$) enthielt $Z_{10} = W$ and $Z_{13} = F$ in der Bindehelix und $X_7 = L$ and $X_{12} = F$ in der Abschirmhelix.

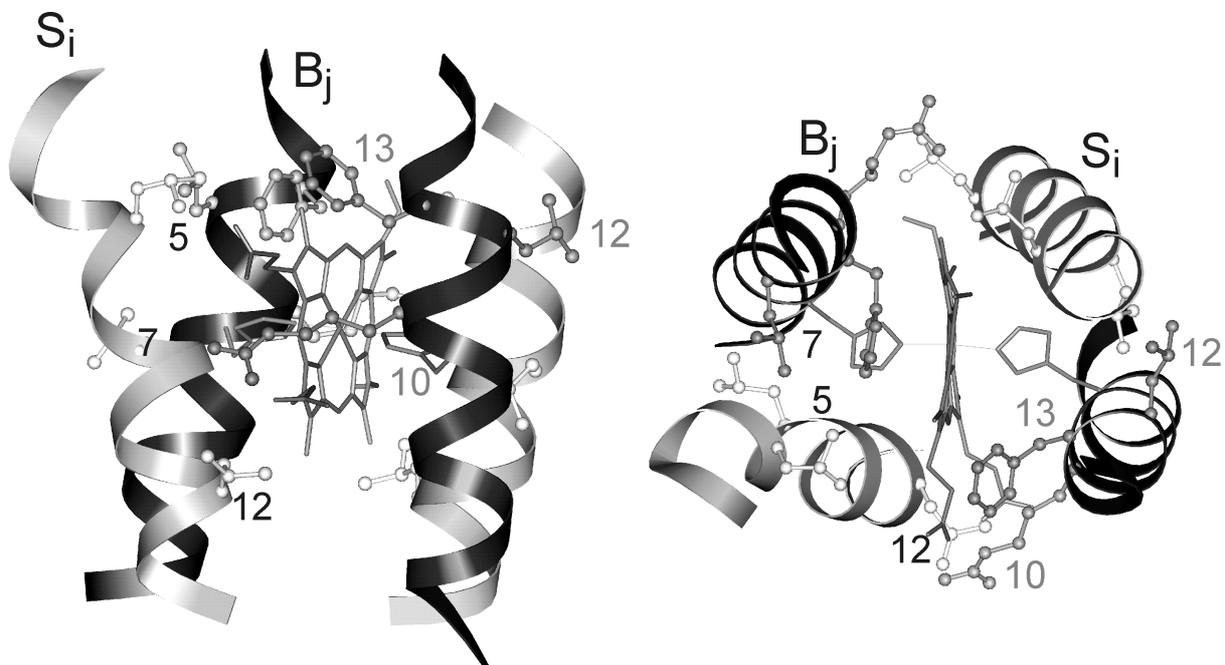


Abb. C-55: Asymmetrisches Modell eines Kofaktor-bindenden Vier-Helix-Bündel-Proteins, basierend auf der Struktur von Cytochrom *b*, Bindehelices B_j (schwarz), Abschirmhelices S_i (weiß) (erhalten von Bernhard Monien, Universität Freiburg). Basierend auf diesem Modell wurden die Bindehelices B_{11} und B_{12} und die Abschirmhelices S_{14} - S_{18} designt. Detailliert dargestellt wurden nur die Histidine, die das Zentralmetall binden, und die Aminosäurereste, die während des Designs variiert wurden.

Um die Packung weiter zu optimieren, wurde das Tetrapyrrol um 50° gedreht, so dass die geladenen Propionsäure-Gruppen an der Außenseite der hydrophoben Tasche des Bündels in direktem Kontakt mit Wasser war. Für diese Änderung wurde ein Arginin an der Außenseite des hydrophoben Kerns (Austausch der Bindehelix $Z_{12} = L$ und $Z_{10} = R$) positioniert. Die Struktur wurde energieminiert, um alle Seitenketten so weit wie möglich zu relaxieren. In der endgültigen Struktur wurden die Abschirmhelices wieder für eine optimale Packung berechnet, was zu den Abschirmhelices S_{16} ($X_5 = L$, $X_7 = L$, $X_{12} = L$), S_{17} ($X_5 = F$, $X_7 = L$, $X_{12} = A$) und S_{18} ($X_5 = L$, $X_7 = A$, $X_{12} = F$) führte (Abb. C-54).

4.4 Wahl und Darstellung der Bakteriochlorophyll-Derivate zur nicht-kovalenten Bindung in modularen Proteinen

Die Wahl der für die Einlagerung zu verwendenden Pigmente fiel auf Bakteriochlorophyll-Derivate, da bei diesen, im Gegensatz zu den Chlorophyllen, alle vier Absorptionsbanden klar voneinander getrennt liegen und die Verschiebungen jeder einzelnen Bande gut beobachtet und als Sonden für Koordination und Bindung benutzt werden können. Es wurden zwei grundlegende Modifikationen am BChl durchgeführt: i) Verseifung des Phytylesters und ii) Austausch des zentralen Mg^{2+} gegen Ni^{2+} , Zn^{2+} bzw. Fe^{3+} .

Durch Behandlung des BChl *a* mit Trifluoressigsäure (TFA) tritt gleichzeitig die Demetallierung und die Verseifung des Phytylesters ein [Rosenbach-Belkin, 1988]. Die Remetallierung erfolgte im Falle des Ni^{2+} über den intermediären Cd-Komplex [Hartwich et al., 1998], im Falle des Zn^{2+} [Hartwich, 1994] und Fe^{2+} (Kap. C-1.2.3) direkt nach der Acetat-Methode (Abb. C-56; Kap. C-1.2.1).

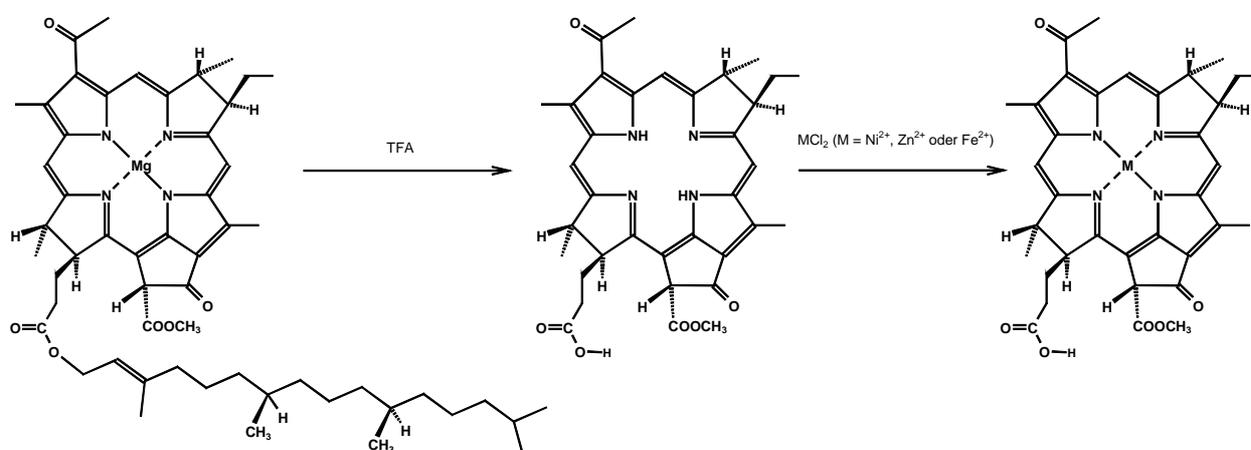


Abb. C-56: Darstellung von [M]-BPhoid *a* (M = Ni^{2+} , Zn^{2+} bzw. Fe^{3+}) aus BChl *a*

Es ist unwahrscheinlich, dass der große, hydrophobe Phytylrest an Position C-17³ in die hydrophobe Tasche des Vier-Helix-Bündels passt. Außerdem macht er BChl *a* sehr hydrophob. Eine Abspaltung der Phytyl-Seitenkette bewirkt eine erhöhte Wasserlöslichkeit der Bakteriochlorophyllide (BChlid) und eine Verringerung der Aggregation in wässriger Lösung, die für die Einlagerung in die wasserlöslichen Peptide notwendig ist.

Ni wurde als Zentralmetall gewählt, weil es Mg in vielen (B)Chl-Bindungstaschen ersetzen kann [Chen et al., 1995; Scheer und Hartwich, 1995; Fiedor et al., 2000; Fiedor et al., 2001; Näveke, 1998], anders als Mg ein vielseitiges und gut untersuchtes Ligationsverhalten zeigt (inklusive $n_c = 4$) [Noy et al., 2000] und eine extrem kurze Lebensdauer im angeregten Zustand hat, die sich von den sehr langen Lebensdauern der Mg- und Zn-Komplexe unterscheidet [Musewald et al., 1999b; Noy et al., 1998; Noy et al., 2000; Musewald et al., 1999a], aber im Gegensatz zu Fe keine Redoxchemie eingeht.

Zn wurde gewählt, weil es gegen das zentrale Mg in nahezu allen enzymatischen Reaktionen von (B)Chl (mit Ausnahme der Mg-Chelatase [Masuda et al., 1999]) und in allen verfügbaren (B)Chl-Bindungstaschen ohne signifikante Änderung an Reaktivität und Eigenschaften ausgetauscht werden kann [Lapouge et al., 2000; Scheer und Hartwich, 1995; Bandilla et al., 1998; Parkes-Loach et al., 1995; Scheumann et al., 1996; Helfrich et al., 1994].

Fe schließlich wurde als Zentralmetall gewählt, um Informationen über den Einfluss des makrozyklischen Systems auf die Pigmentbindung zu erhalten. Die Bindung von Häm (Fe-Protoporphyrin IX, Struktur siehe Abb. A-4) an synthetische Proteine ist detailliert untersucht [Rabanal et al., 1995; Rau et al., 2000]. Im Vergleich zum symmetrischen und ungesättigten Porphyrin-Makrozyklus des Häms ist der BChl-Makrozyklus unsymmetrisch, was von der Reduktion an den Ringen B und D und von seinen Substituenten herrührt. Fe-BChl besitzt eine Acetyl-Gruppe an Position C-3, und einen zusätzlichen isozyklischen Ring E, der sich von der C-13-Propionsäureseitenkette des Protoporphyrins ableitet. Andererseits ist Fe-BChl in Folge der Anwesenheit des isozyklischen Rings E starrer als Häm, und wegen des β -Ketoestersystems am Ring E reaktiver.

4.5 Nicht-kovalente Pigment-Bindung

Sechs Zellulosemembranen mit insgesamt 216 verschiedenen modularen Proteinen (MOP) wurden bei Raumtemperatur nacheinander mit den Metallo-Bakteriopheophorbiden ([M]-BPheid *a*; M = Ni, Zn, Fe) in einer Mischung aus DMF und Tris-Puffer inkubiert. Nach

dem Entfernen von überschüssigem ungebundenem Pigment durch kurzes Waschen mit Na-Phosphat-Puffer war die Absorption der Pigmente in fast allen Proteinspots klar zu sehen, während der unmodifizierte Zelluloseuntergrund praktisch farblos blieb. Ein Beispiel mit Ni-Bakteriopheophorbid *a* (Ni-BPheid *a*) ist in Abb. C-57 dargestellt. Die Spots unterscheiden sich durch ihrer Farbe aber auch durch die Intensität der Färbung, während die meisten Spots purpurfarben sind, erscheinen einige blau-grün. Dies weist auf Änderungen in der Q_x -Absorption hin, die in den Bakteriochlorinen stark zu der Farbe beiträgt, und dadurch auf eine unterschiedliche Bindungssituation des Zentralmetalls hinweist.

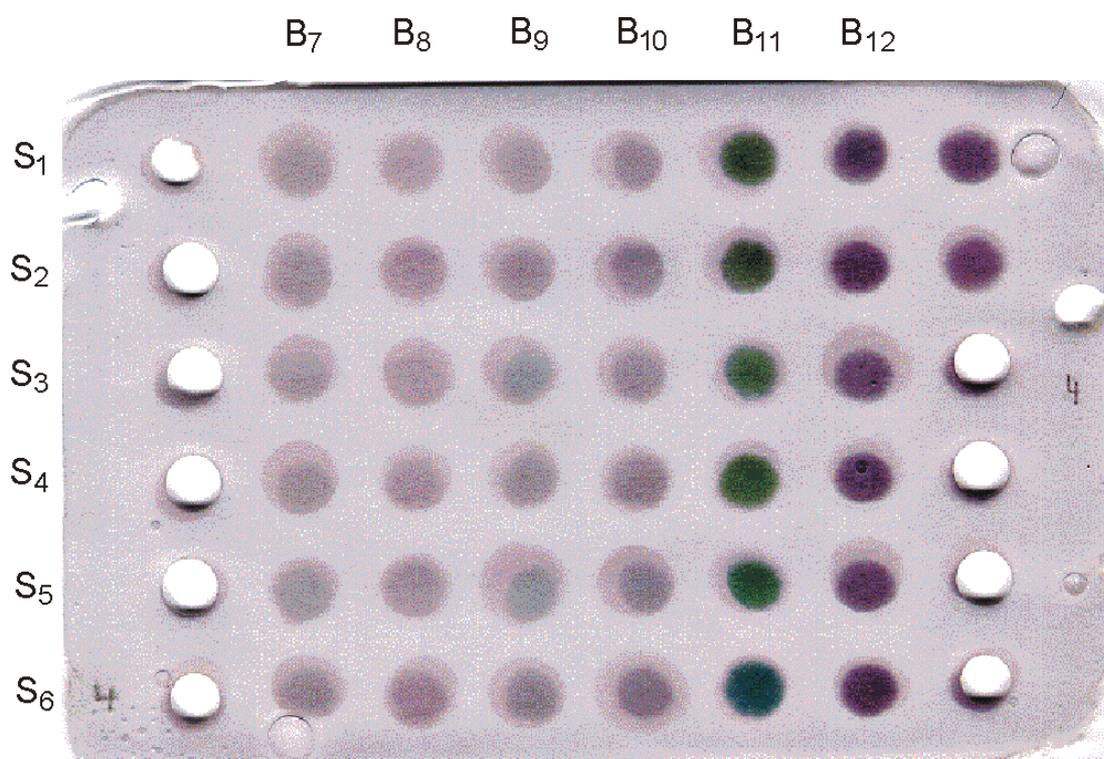


Abb. C-57: Zellulosemembran mit 38 modularen Proteinen (B₇S₁ – B₁₂S₆) nach Inkubation mit Ni-BPheid *a* in Tris/DMF und Waschen mit Na-Phosphat-Puffer. Die leeren Spots enthielten ebenfalls modulare Proteine, die zur Syntheseüberprüfung ausgestanzt wurden, um sie massenspektroskopisch zu analysieren.

Um die Bindungsstärke der Pigmente zu den verschiedenen MOPs zu testen, wurden die Membranen anschließend zweimal mit Tris-Puffer mit einem steigenden Anteil an DMF (11 % und 20 %) gewaschen, jedes Mal gefolgt von einer Waschung mit Na-Phosphat-Puffer, um überschüssiges DMF zu entfernen. Nach jedem Waschzyklus wurden Absorptionsspektren von allen Spots aufgenommen und basierend auf der Spektroskopie der Pigmente in dem entsprechenden Puffersystem systematisch analysiert (siehe Kap. C-4.6.2.1).

4.6 Absorptionsspektroskopische Analyse der nicht-kovalent gebundenen [M]-Bakteriochlorophyll-Protein-Komplexe (M = Ni, Zn und Fe)

4.6.1 Überblick über die charakteristischen Parameter der absorptions-spektroskopischen Analyse

Die unterschiedlichen Kombinationen von Binde- und Abschirmhelix lassen aufgrund der Modifikationen im hydrophoben Bereich der Peptide ein unterschiedliches Bindeverhalten der [M]-BPheid *a* erwarten. Ein unterschiedliches Bindeverhalten kann absorptions-spektroskopisch anhand der Intensität, der Bandbreite und der Lage der Absorptionsbanden analysiert werden, welche als Kriterien für die Art und Stärke der Pigment-Protein-Bindung verwendet wurden. Parallel zu der Analyse der Absorptionsspektren der proteingebundenen Pigmente wurden entsprechende Untersuchungen der Pigmente in Lösung durchgeführt, um das Ausmaß der Proteineffekte abschätzen und interpretieren zu können.

Q_y-Bereich:

Die Intensität der Q_y-Bande ist ein Maß für die gebundene Pigmentmenge, die aber nur bei bekanntem Extinktionskoeffizienten bestimmt werden kann. Um die Pigmentmenge abschätzen zu können, wurde der Extinktionskoeffizient der Pigmente in dem Inkubationspuffer (Tris-Puffer / DMF (4:1)) bestimmt. Da der Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit der Polarität der Umgebung stark schwanken kann, erfolgte die Quantifizierung durch die Fläche unter der Q_y-Bande, welche eine geringe Abhängigkeit vom Lösungsmittel zeigt. Eine Abnahme des Extinktionskoeffizienten in polarerer Lösungsmitteln wird durch eine Bandenverbreiterung kompensiert, wobei die Oszillatorstärke unabhängig vom Lösungsmittel und dem Koordinationszustand des Zentralmetalls konstant bleibt [Noy et al., 2000; Noy et al., 1998]. Die Halbwertsbreite der Q_y-Bande ist somit ein Maß für die Polarität der Proteinumgebung. Dies wurde in Lösung durch Messung des Pigments in einer Reihe von organischen Lösungsmitteln untersucht, um die Größe des Effektes der Umgebung auf die Absorptionsspektren zu ermitteln. Ein weiterer Faktor für die Änderung der Halbwertsbreite der Q_y-Bande ist die Heterogenität. In polarer Lösung sollten sich Unordnungen in der näheren Umgebung spektral stärker auswirken als in unpolaren Lösungsmitteln (π - π^* -Übergänge). Die Stabilität der Komplexe wurde durch die Abnahme der Q_y-Intensitäten während der Waschschrte mit steigender DMF-Konzentration ermittelt. Die Lage der Q_y-Bande wird von mehreren Faktoren beeinflusst, so dass ihre Position nur wenig Rückschlüsse auf die Art der Wechselwirkungen zulässt. Zu diesen Faktoren gehören

neben der Koordination des Zentralmetalls, die eine kurzwellige Verschiebung der Q_y -Bande bewirkt, Pigment-Protein- und Pigment-Pigment-Wechselwirkungen, die eine langwellige Verschiebung der Q_y -Bande bewirken.

Q_x -Bereich:

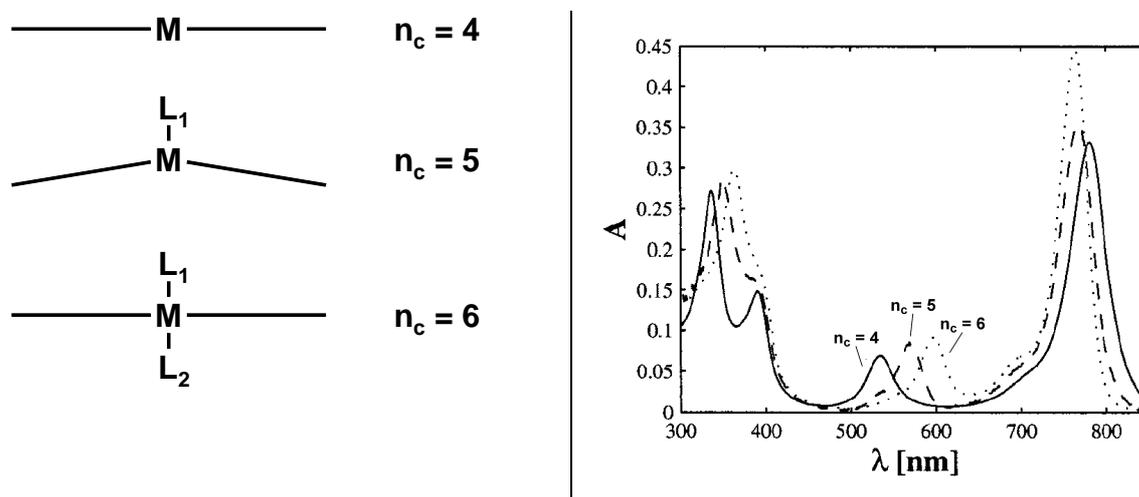


Abb. C-58: Links: Schematische Darstellung der möglichen Koordinationszustände (n_c) des Zentralmetalls. Die dicke Linie stellt die Seitenansicht des Tetrapyrrol-Makrozyklus dar, L_1 und L_2 die zusätzlichen axialen Liganden.

Rechts: Verschiebung der Q_x -Bande bei höheren Koordinierungen für Ni-BPhe a in Acetonitril mit Pyridin (entnommen aus [Noy et al., 2000])

Die Lage der Q_x -Bande zeigt eine starke Abhängigkeit von der Koordination des Zentralmetalls [Hartwich et al., 1998; Noy et al., 2000; Noy, 2000]. Je höher koordiniert das Zentralmetall vorliegt, desto langwelliger ist die Lage der Q_x -Bande. Noy et al. [Noy et al., 2000] konnten zeigen, dass Ni-BPhe a durch die Zugabe von Imidazol oder Pyridin als N-Donor-Liganden die Koordinationszahl von 4 nach 6 ändert. Im Absorptionsspektrum ist dies durch eine bathochrome Verschiebung der Q_x -Bande von 535 nm (vierfache Koordination) nach 573 nm (fünffache Koordination) und weiter nach 608 nm (sechsfache Koordination) erkennbar (Werte für Ni-BPhe a in Acetonitril, titriert mit Imidazol) (Abb. C-58). Der fünfbindige Übergangszustand wurde mit Hilfe chemometrischer Methoden als Intermediat bestimmt, da er nur in geringer Konzentration in Acetonitril vorkommt. Diese Messungen lassen sich auf andere [M]-BChl a übertragen. Die Q_x -Übergänge können in einem Bereich von 525 - 545 nm (vierfache Koordination, ohne axiale Liganden), 550 - 580 nm (fünffache Koordination, ein axialer Ligand) und 585 - 615 nm (sechsfache Koordination, zwei axiale Liganden) in Abhängigkeit vom Metall, von Liganden und vom Lösungsmittel schwanken [Noy et al., 1998; Noy et al., 1999]

Um die Verschiebung der Q_x -Bande im verwendeten Lösungsmittelsystem (Tris/DMF (4:1)) einer Koordinationszahl zuordnen zu können, wurden die Pigmente in dieser Lösung mit Imidazol als Ligand titriert.

4.6.2 Ni-Bakteriopheophorbid a

4.6.2.1 Untersuchungen in Lösung

4.6.2.1.1 Titration mit Imidazol

Als möglicher Ligand im Protein wird das zentrale Histidin der Bindehelices angeboten. Bei der Bindung von Ni-BPheid *a* an die Vier-Helix-Bündel-Proteine erwartet man, dass das Zentralmetall Ni an den Histidin(en) der Bindehelix koordiniert und dadurch einen oder zwei axiale Liganden erhält (Abb. C-58, links). Dies soll mittels der Verschiebung der Q_x -Bande nachgewiesen werden. Deshalb wurde in einem Parallelversuch das Koordinationsverhalten des Ni-BPheid *a* in der Inkubationslösung (DMF/Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,5) 1:4) durch schrittweise Zugabe von Imidazol absorptionsspektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung des Ligationsverhaltens von Ni-BPheid *a* in organischen Lösungsmitteln von Noy et al. [Noy et al., 2000] dienen als Vergleich und zur Interpretation der Verschiebungen.

Die Absorptionsmaxima des Ni-BPheid *a* in Tris-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,5)/DMF 4:1 liegen bei 783 nm (Q_y), 542 nm (Q_x) und 336 nm (B_y) mit einer Schulter bei 385 nm (B_x) (Abb. C-59). Die Absorptionsbanden des Ni-BPheid *a* sind in wässriger Lösung sehr breit, so dass bei der teilweisen Änderung des Koordinationszustandes die überlagerten Q_x -Banden nur schwer aufzulösen sind. Deshalb wird deren genaue Lage anhand der Minima der zweiten Ableitung der Absorptionsspektren bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode können aus Spektren überlagerte Absorptionsbanden, die nur als Schultern erscheinen, aufgelöst werden und die genaue Position der Banden bestimmt werden. Die drei aufgelösten Banden (B_y , Q_x und Q_y) erscheinen in der zweiten Ableitung bei den gleichen Wellenlängen als Minima. Die B_x -Bande ist im Originalspektrum nur als Schulter bzw. als Terrassenpunkt bei ca. 385 nm erkennbar, in der zweiten Ableitung hingegen liegt ein klar erkennbares Minimum bei 394 nm vor.

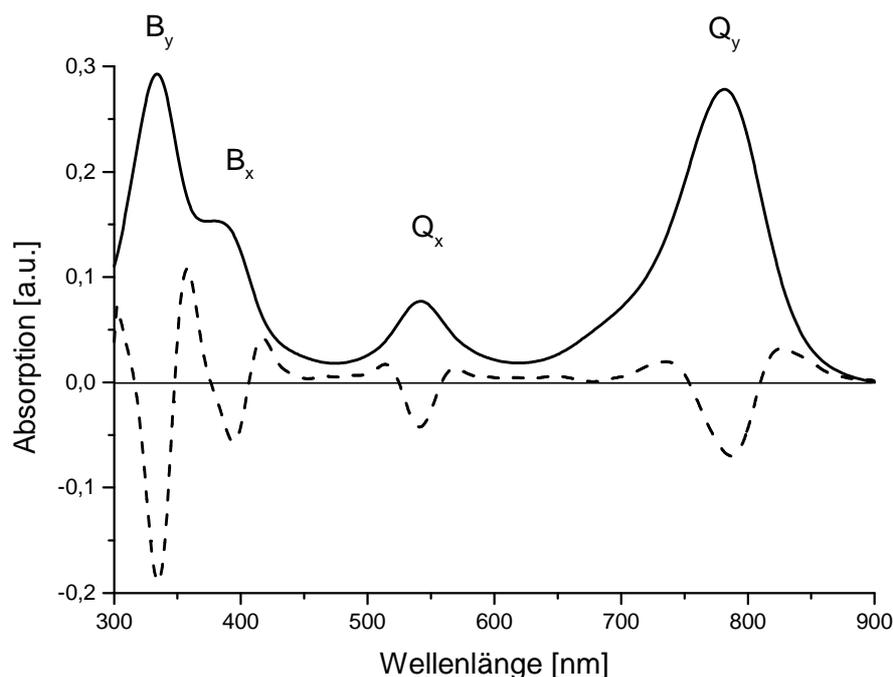


Abb. C-59: Absorptionsspektrum von Ni-BPheid a in Tris/DMF (4:1) (—) und seine zweite Ableitung (- - -)

Die Zugabe von Imidazol führt zu einer sichtbaren Farbänderung der Lösung von purpurfarben nach grün. Die Q_x -Bande bei 543 nm nimmt ab, während sich eine neue Bande bei 585 nm bildet (Abb. C-60). Bei einer Erhöhung der Imidazol-Konzentration auf 0,26 mM wird die Q_x -Bande sehr breit, mit einem Maximum bei 610 nm. Bei genauer Analyse des Q_x -Bereichs mit der zweiten Ableitung sieht man, dass sich bei geringen Imidazolkonzentrationen zuerst ein Minimum bei 585 nm bildet. Die relative Intensität der beiden Minima im Q_x -Bereich bei 542 nm und 585 nm ändert sich bei steigender Imidazolkonzentration zu Gunsten des längerwelligeren Minimums. Erst bei einer Imidazol-Konzentration von 0,23 mM erscheint eine Q_x -Absorption bei 609 nm. Die Q_y -Bande erfährt durch die Zugabe von Imidazol eine hypsochrome Verschiebung von 783 nm nach 769 nm (0,26 mM Imidazol) und eine leichte Intensitätszunahme. Die B_x -Bande reagiert nur geringfügig auf eine zusätzliche Ligandierung des Zentralmetalls, sie verschiebt sich langwellig von 394 nm nach 396 nm. Die B_y -Bande erfährt am Anfang der Titration keinen Shift, d.h. solange die Q_x -Bande bei 542 nm bzw. 585 nm liegt, aber gleichzeitig mit der Bildung der Q_x -Bande bei 609 nm (ab 0,23 mM Imidazol) erscheint eine neue B_y -Bande bei 370 nm.

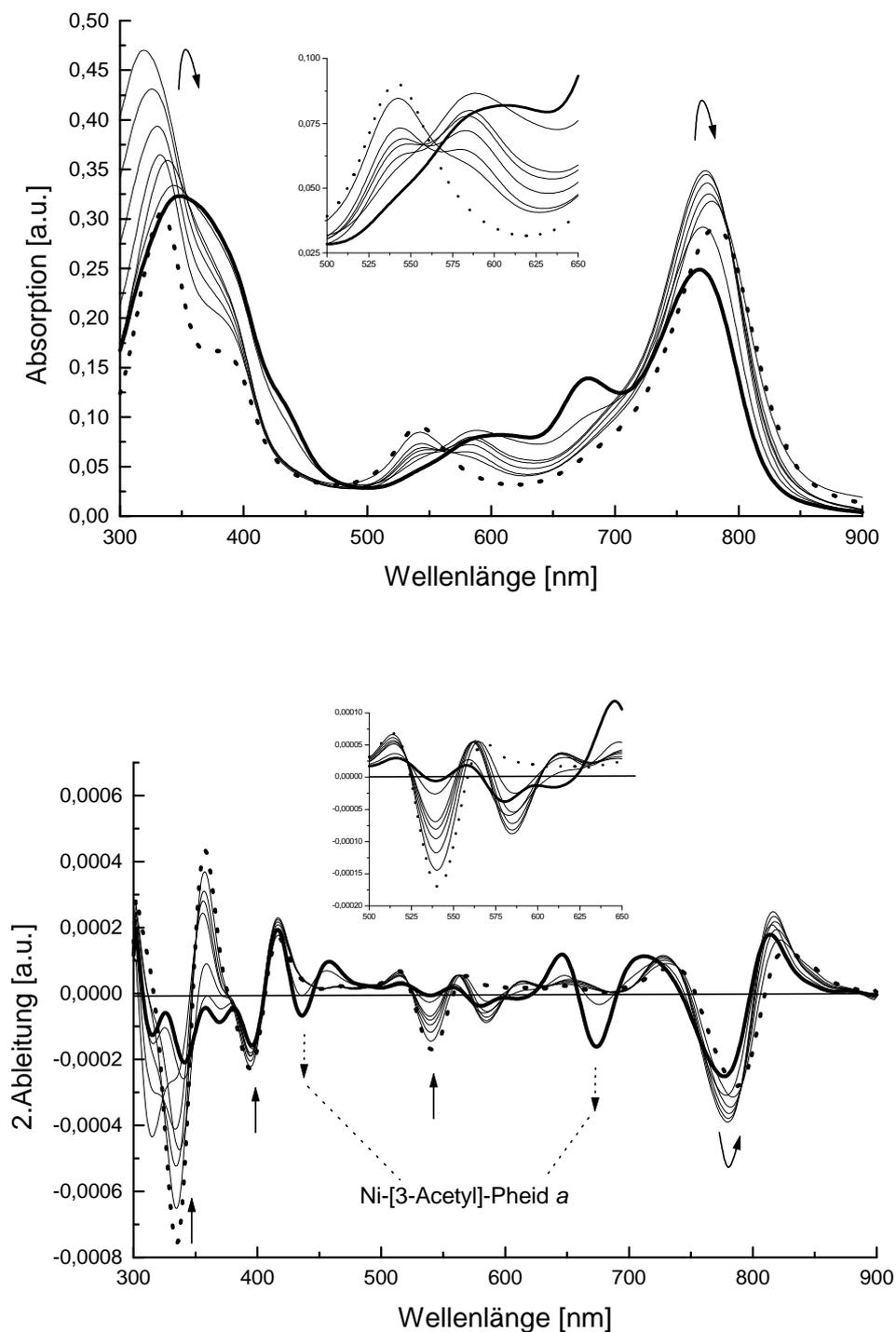


Abb. C-60: Absorptionsspektrum (oben) und zweite Ableitung (unten) von Ni-BPheid a in Tris/DMF titriert mit Imidazol; Startspektrum 0 mM Imidazol (· · · ·), schrittweise Erhöhung der Imidazol-Konzentration von 0,048 mM über 0,09, 0,13, 0,17, 0,20, 0,23 (—) bis 0,26 mM Imidazol (—).

Da bei der Titration keine isobestischen Punkte (Abb. C-60, inset) auftreten, ist anzunehmen, dass während der Titration mehr als nur zwei Komponenten vorliegen, was ein Hinweis auf das Auftreten drei verschiedener Koordinationszustände des Ni-BPheid a ist, die

gleichzeitig in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Dies wird durch die 2. Ableitung bestätigt.

Als Nebenreaktion findet während der Titration eine Dehydrogenierung des Bakteriochlorins (Ni-BPheid *a*) zum Chlorin (Ni-3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid *a*-17³-methylester (Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a*) Strukturformel siehe Kap. F-3.1) statt. Dies bildet sich ab einer Imidazolkonzentration von 0,23 mM mit einer Q_y-Absorption bei 676 nm und einer Soret-Bande bei 436 nm. Bei weiter steigender Imidazolkonzentration (0,26 mM) gewinnen diese Banden an Intensität, korreliert mit dem Auftreten der für 6-fach koordinierte BChl (d.h. zwei zusätzliche Liganden) typischen 609 nm Q_x-Bande.

Koordinationszahl n_c	Ni-BPheid <i>a</i> bzw. Ni-BPhe <i>a</i> in	B _y [nm]	B _x [nm]	Q _x [nm]	Q _y [nm]
$n_c = 4$	Tris/DMF	336	394	542	783
	Acetonitril	337	391	535	780
$n_c = 5$	Tris/DMF/ Imidazol	337	394	585	780
	Acetonitril / Imidazol	350	391	573	767
$n_c = 6$	Tris/DMF / Imidazol	370	396	609	769
	Acetonitril / Imidazol	362	391	608	764

Tab. C-17: Absorptionsmaxima von Ni-BPheid *a* in Tris/DMF bzw. Ni-BPhe *a* Acetonitril titriert mit Imidazol mit $n_c = 4$, $n_c = 5$ und $n_c = 6$; die Acetonitrildaten stammen aus [Noy et al., 2000].

Die Lage der Absorptionsbanden des Ni-BPheid *a* bei Titration mit Imidazol sind, abgesehen von einer schwachen Rotverschiebung der ersten zwei Maxima (~ 10 nm), in wässriger Lösung identisch mit den von Noy et al. beschriebenen Absorptionsspektren von Ni-BPhe *a* in Acetonitril [Noy et al., 2000], wo die bathochromen Verschiebungen der Q_x-Bande einem schrittweisen Anstieg der Koordinationszahl von $n_c = 4$ nach $n_c = 6$ zugeschrieben werden (Tab. C-17). Deshalb wurde die 542 nm-Spezies einem Ni-BPheid *a* ohne zusätzlichen Liganden ($n_c = 4$), die 585 nm bzw. 609 nm-Spezies einem Ni-BPheid *a* mit einem ($n_c = 5$) bzw. zwei ($n_c = 6$) zusätzlichen Imidazolmolekülen, die das Zentralmetall ligandieren, zugeordnet. Die Rotverschiebungen für $n_c = 4$ und $n_c = 5$ wie auch die allgemeine Bandenverbreiterung rührt von der wässrigen Umgebung her. Im Komplex mit $n_c = 6$ schirmt das zweite Imidazol das Zentralmetall vom Lösungsmittel ab und folglich ist das Absorptionsmaximum in Wasser dem in Acetonitril ähnlich. Ein deutlicher Unterschied ergab sich für Komplexe mit $n_c = 5$. In Acetonitrillösung taucht der fünffach koordinierte Komplex während der Titration nur in sehr geringen Mengen auf, in Tris/DMF ist er dagegen sehr dominant. In wässriger Lösung scheint im Gegensatz zu dem weniger polaren Lösungsmittel Acetonitril der fünffach koordinierte Komplex bevorzugt gebildet zu werden. Welchen Einfluss der Phtyl-Rest, der für die Untersuchung in Tris/DMF abgespalten wurde, bei der

Koordination hat, konnte wegen der schlechten Löslichkeit des Ni-BPhe *a* in wässriger Lösung nicht bestimmt werden.

Die Oxidation des Bakteriochlorins zum Chlorin erfolgt erst ab einer 0,23 mM Imidazolkonzentration, d.h. erst wenn eine 6-fach koordinierte Komponente in der Lösung vorliegt. Eine Abhängigkeit der Oxidation des BChl zum [3-Acetyl]-Chl von der Koordinationszahl des Zentralmetalls stellten Brereton et al. bereits 1983 fest [Brereton et al., 1994; Brereton und Sanders, 1983a; Brereton und Sanders, 1983b]. Sie zeigten, dass bei Belichtung das fünffach koordinierte BChl *a* in Gegenwart von Sauerstoff rasch zum Chlorin oxidiert, wohingegen bei sechsfach koordiniertem BChl *a* keine Umwandlung zum Chlorin beobachtet wurde. Dieses Verhalten widerspricht den hier beobachteten Effekten. Es handelt sich bei der hier beschriebenen Titration mit Imidazol um eine Dunkelreaktion, die somit einem anderen Mechanismus folgen kann, was offensichtlich die Abhängigkeit der Oxidation von der Koordinationszahl umkehrt.

4.6.2.1.2 Bestimmung der Nachweisgrenze des Oxidationsproduktes Ni-3-Devinyl-3-acetyl-pheophorbid *a*

Da sowohl bei der Titration mit Imidazol als auch bei vielen der Ni-BPheid *a*-MOP-Spektren das Oxidationsprodukt des Ni-BPheid *a*, das Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a*, erscheint, wurde untersucht, ab welchem Gehalt es in einer Ni-BPheid *a*-Lösung eindeutig nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde zu einer Lösung des Ni-BPheid *a* in MeOH schrittweise Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a*, ebenfalls gelöst in MeOH, zugegeben. Eine Bestimmung in der Tris/DMF-Mischung war infolge der Aggregation des Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a* in dieser Mischung nicht möglich. Der Nachweis erfolgte durch Detektion eindeutiger Minima in der zweiten Ableitung der Absorptionsspektren an den für Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a* charakteristischen Wellenlängen (430 nm, 675 nm). Mengen von nur 1 % Oxidationsprodukt in dieser Mischung können klar durch das gleichzeitige Erscheinen dieser zwei Banden identifiziert werden. Die Bande bei 675 nm erscheint schon ab einem Gehalt von 0,3 % Oxidationsprodukt in der Mischung, wohingegen die Bande bei 430 nm erst ab 1 % erkennbar wird.

4.6.2.1.3 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Ni-Bakteriopheophorbid *a* in Tris/DMF

Der Extinktionskoeffizient von Ni-BPhe *a* (Ni-Bakteriopheophytin *a*) in Diethylether (DE) beträgt $63,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 779 nm (Maximum der Q_y -Bande). Bei den Einlagerungsversuchen wurde wegen der schlechten Löslichkeit und wegen einer möglichen sterischen Hinderung des Phytol-Restes nicht Ni-BPhe *a* verwendet, sondern das Ni-BPheid *a*. Eine Verseifung des Phytol-Esters beeinflusst den Extinktionskoeffizienten kaum, in erster Näherung kann deshalb der Extinktionskoeffizient des Ni-BPhe *a* in DE auch für Ni-BPheid *a* verwendet werden.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten in Tris-Puffer/DMF (4:1) wurden jeweils gleiche Mengen an Ni-BPheid *a* in verschiedenen Konzentrationen in DE und Tris-Puffer/DMF gelöst und absorptionsspektroskopisch vermessen. Mit dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{779} = 63,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kann jede Absorption der Q_y -Bande des Ni-BPheid *a* in DE nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz einer Konzentration an Pigment gleichgesetzt werden.

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

E = Extinktion

ε = Extinktionskoeffizient [$63,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

d = Schichtdicke [1 cm]

c = Konzentration [mM]

Trägt man nun die Pigment-Konzentrationen der einzelnen Messungen gegen die Extinktion in Tris/DMF auf, erhält man eine Gerade, deren Steigung dem Extinktionskoeffizienten von Ni-BPheid *a* in Tris/DMF entspricht (Abb. C-61). Demnach beträgt der Extinktionskoeffizient von Ni-BPheid *a* in Tris/DMF $34,5 (\pm 0,4) \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dieser Wert ist deutlich geringer als in Ether, aber gleichzeitig ist die Q_y -Bande verbreitert. Diese Änderungen setzen einen Trend fort, der bereits für andere Bakteriochlorine in protischen, nicht-wässrigen Lösungsmitteln wie MeOH beobachtet wurde [Oelze, 1985; Noy et al., 1998; Noy et al., 1998].

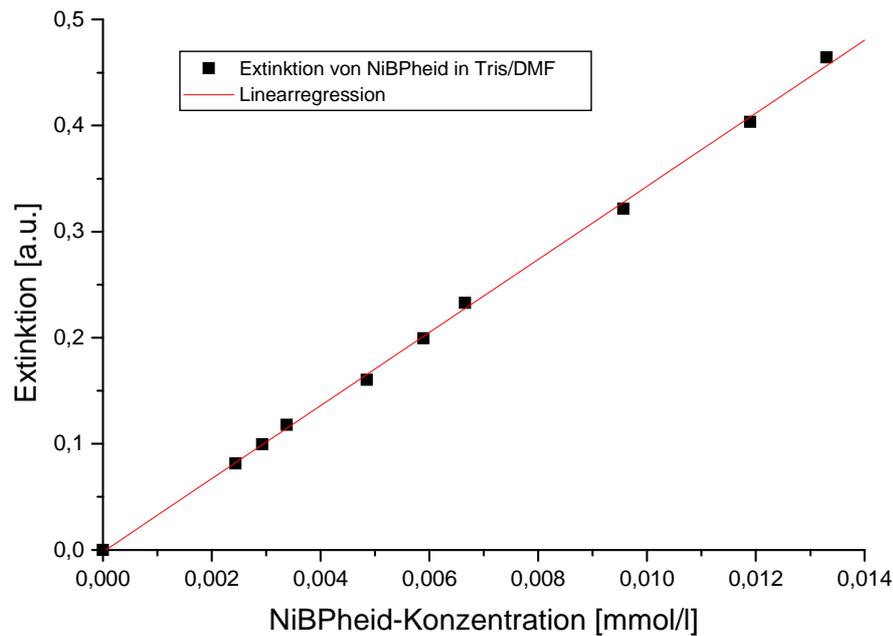


Abb. C-61: Linearregression zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Ni-BPheid a in Tris/DMF 4:1

Diese Änderung von ϵ mit der Polarität des Lösungsmittels, und somit auch innerhalb der Proteine, erschwert eine genaue Bestimmung der gebundenen Pigmentmenge auf den Membranen. Andererseits kann die Änderung des Extinktionskoeffizienten Informationen über die Polarität der Umgebung liefern, sofern das Pigment auf anderem Weg quantifiziert werden kann. Es ist bekannt, dass eine Abnahme von ϵ durch eine Bandenverbreiterung kompensiert wird und die Oszillatorstärke unabhängig vom Lösungsmittel und dem Koordinationszustand des Metalls konstant bleibt [Noy et al., 1998; Noy et al., 2000]. Deshalb erfolgte die Quantifizierung durch Berechnung der Fläche unter der Q_y -Bande. Integriert man über den Q_y -Bereich von 620-900 nm, kann man diese zu den ermittelten Pigmentkonzentrationen in Beziehung setzen:

$$\frac{\text{Fläche}_{620-900\text{nm}}}{\text{Konzentration [mmol/l]}} = 1295 (\pm 31) \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{nm} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Mit Hilfe dieses Faktors kann die Pigmentkonzentration weitgehend unabhängig vom Lösungsmittel und der Peptidumgebung bestimmt werden.

4.6.2.1.4 Vergleich der Absorption von Ni-Bakteriopheophorbid a in verschiedenen Lösungsmitteln

Da die Polarität der Umgebung innerhalb der Vier-Helix-Bündel-Proteine stark variieren kann, wurde, um die Größe dieses Effektes auf die Absorptionsspektren zu ermitteln, Ni-BPheid a in einer Reihe von organischen Lösungsmitteln vermessen. Zusätzlich kann es im Protein auch zu einer O-Ligandierung des Zentralmetalls durch polare Aminosäurereste oder Wasser kommen. Durch die Verwendung von Lösungsmitteln, die in der Lage sind eine Ni-O-Ligandierung einzugehen, wie Tetrahydrofuran (THF), Dioxan und Dimethylsulfoxid (DMSO), wurden diese Auswirkungen auf die Absorptionsspektren untersucht. Die verwendeten Lösungsmittel lassen sich aufgrund ihres Verhaltens gegenüber Ni-BPheid a in vier Gruppen einteilen:

- unpolare Lösungsmittel (Hexan, DE, Toluol)
- polare, aprotische Lösungsmittel (Aceton, Acetonitril, Benzonitril)
- polare, protische Lösungsmittel (MeOH, H₂O, Essigsäure)
- koordinierende, aprotische Lösungsmittel (THF, Dioxan, DMSO, Methylamin)

Die Verschiebungen der Absorptionsbanden sowie die Breite der Q_y-Bande sind in Tab. C-18 zusammengefasst.

In allen Lösungsmitteln außer Methylamin liegt das Maximum der Q_x-Absorption in einem für eine Vierfachkoordination charakteristischem Bereich (530 – 548 nm). Das Zentralmetall ist also hauptsächlich von den vier Stickstoffen des Tetrapyrrols koordiniert, nur in Methylamin trägt es zwei zusätzliche Liganden ($n_c = 6$; Q_x = 594 nm). In einigen Lösungsmitteln erscheinen im Absorptionsspektrum in der Q_x-Region langwellige Schultern, die in der zweiten Ableitung Hinweise auf Komponenten mit einer höheren Koordinationszahl liefern. Diese Lösungsmittel sind THF, Dioxan und DMSO, die deshalb zusammen mit Methylamin als „koordinierende Lösungsmittel“ klassifiziert wurden. In THF wurde eine zusätzliche Komponente bei $\lambda_{max} = 578$ nm ($n_c = 5$), in DMSO eine zusätzliche Komponente bei $\lambda_{max} = 594$ nm ($n_c = 6$) detektiert. In Dioxan gibt es neben einer entsprechenden fünffachkoordinierten Komponente ($\lambda_{max} = 572$ nm) zusätzlich eine sechsfachkoordinierte ($\lambda_{max} = 611$ nm). Bei der Analyse der Verschiebung der Q_y-Bande sind zwei bemerkenswerte Effekte zu beobachten. Der erste betrifft einen charakteristischen Rotshift von allen Banden in den zwei verwendeten aromatischen Lösungsmitteln, Toluol und Benzonitril, was auf van der Waals-Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel-Aromaten und dem aromatischen π -System des Ni-BPheid a zurückzuführen ist. In AcOH und H₂O ist die Q_y-Bande ebenfalls

langwellig verschoben, wofür die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Ni-BPheid *a* und dem Lösungsmittel verantwortlich ist.

		B _y [nm]	B _x [nm]	Q _x [nm]	Q _y [nm]	Q _y -Breite [nm]	½ Q _y -Breite [nm]
unpolare LM	Hexan	337	391	531	783	37	11
	DE	336	391	530	780	43	14
	Toluol	340	395	536	791	44	14
aprotische LM	Aceton	336	391	532	779	55	19
	Acetonitril	336	389	531	776	61	21
	Benzonitril	340	397	537	788	55	19
protische LM	MeOH	337	390	536	778	65	21
	AcOH	338	392	538	786	65	23
	H ₂ O	342	398	548	794	89	29
koord. LM	THF	337	392	534 / 578*	782	52	17
	Dioxan	338	393	535 / 572* / 611*	786	50	15
	DMSO	339	392	535 / 594*	782	65	23
	Methylamin	364	399	594	763	68	32

Tab. C-18: Absorptionsmaxima von Ni-BPheid *a* in verschiedenen Lösungsmitteln. Die mit * gekennzeichneten Q_x-Banden bilden Schultern im Absorptionsspektrum, ihre genaue Lage wurde in der zweiten Ableitung bestimmt. (Q_y-Breite = Breite auf halber Höhe; ½ Q_y-Breite = Differenz zwischen Wendepunkt an der langwelligen Flanke der Q_y-Bande und Maximum)

Die Bandbreite der Q_y-Bande steigt, unabhängig von der Bestimmungsmethode, vom unpolaren Lösungsmittel über polare zu protischen Lösungsmitteln an und ist in Wasser am größten. Dies entspricht den Untersuchungen von Limantara et al. am Bakteriochlorophyll [Limantara et al., 1997]. Die Bandbreite der Q_y-Bande kann somit innerhalb der Vier-Helix-Bündel-Proteine als Maß für die Polarität der Umgebung dienen.

4.6.2.2 Absorption der Ni-BPheid *a*-Protein-Komplexe

4.6.2.2.1 Lage der Absorptionsbanden

Nach der Einlagerung von Ni-BPheid *a* in die Vier-Helix-Bündel-Proteine kommt es zu Verschiebungen der Absorptionsbanden im Vergleich zu Ni-BPheid *a* in Lösung (Kap. C-4.6.2.1). In Tab. C-19 sind die Wellenlängenbereiche der Hauptabsorptionsbanden des

Pigmentes in den Proteinen angegeben, innerhalb derer sie aufgrund unterschiedlicher Koordination oder Proteinumgebung variieren können.

Ni-BPheid a	B_y [nm]	B_x [nm]	Q_x [nm]	Q_y [nm]
in Tris/DMF	336	394	542	783
in Tris/DMF/Imidazol	341	396	585/609	761
in Vier-Helix-Bündel-Proteinen	320-341	397-402	544-551	771-802

Tab. C-19: Hauptabsorptionsbanden von Ni-BPheid a eingelagert in die Vier-Helix-Bündel-Proteine im Vergleich zu Ni-BPheid a in Lösung

Die Spektren der MOP-Pigment-Komplexe zeigen ähnlich große Änderungen wie die Spektren der verschiedenen koordinierten Pigmente in wässriger Lösung. Die Verschiebungen innerhalb dieser Wellenlängenbereiche können durch unterschiedliche Koordination des Zentralmetalls erklärt werden. Verschiebungen außerhalb dieses Wellenlängenbereichs werden durch die Protein-Umgebung verursacht, sie decken aber im Wesentlichen die Bereiche ab, in denen das Ni-BPheid a in organischen Lösungsmitteln absorbiert (Tab. C-18). Neben der Verschiebung variiert die Q_y -Bande auch stark in Intensität und Bandbreite, was in Kap. C-4.6.2.2.3 näher diskutiert wird. Die Hauptabsorption der Q_x -Bande liegt in einem Bereich, der für eine vierfache Koordination ($n_c = 4$) des Zentralmetalls charakteristisch ist, in einigen Spektren weist eine langwellige Schulter in diesem Bereich aber auf höher koordinierte Spezies hin. Eine genaue Analyse dieser Schultern erfolgte mit Hilfe der zweiten Ableitung der Absorptionsspektren (Kap. C-4.6.2.2.2).

4.6.2.2.2 Analyse der Koordination des Ni in den Ni-BPheid a-Protein-Komplexen

Der Koordinationszustand des Zentralmetalls des Ni-BPheid a innerhalb der Vier-Helix-Bündel-Proteine lässt sich in gleicher Weise wie in Lösung aus der Verschiebung der Q_x -Bande erkennen, eine Überlagerung mehrerer nebeneinander auftretender Banden kann durch Bildung der zweiten Ableitung aufgelöst werden. Die möglichen Positionen im Q_x -Bereich werden in Abb. C-62 exemplarisch für die vier verschiedenen Typen erklärt. Bei einigen Spots erscheinen in der zweiten Ableitung die 4 Hauptabsorptionsbanden ohne zusätzliche Minima (vgl. Absorption von Ni-BPheid a in Lösung ohne Imidazol Kap. C-4.6.2.1.1; Abb. C-59), wobei die Lage der Q_x -Bande auf eine Koordinationszahl $n_c = 4$ deutet (Abb. C-62 A). Bei anderen Spots mit langwelligen Schultern im Q_x -Bereich erscheinen zusätzliche Minima in der zweiten Ableitung, die Komponenten mit höherer Koordination entsprechen. Beispiel B repräsentiert einen Spot mit einem signifikanten Beitrag mit $n_c = 5$, Beispiel C einen Spot mit $n_c = 6$ (Typ I). In allen Fällen treten deutliche Minima in der zweiten Ableitung auf, so dass der Koordinationstyp eindeutig bestimmbar ist. Die Streuung in diesen

Bereichen ist größer als in Lösung, für vierfache Koordination liegt die Bande in einem Wellenlängenbereich von 544 nm bis 551 nm, bei fünffacher Koordination von 583 nm bis 590 nm, bei sechsfacher Koordination von 608 nm bis 613 nm (Typ I). Außer diesen drei erwarteten Komponenten tritt noch eine weitere, längerwellige Komponente der Q_x -Bande auf, die kein Gegenstück in Lösung hat (Abb. C-62 Beispiel D). Sie absorbiert in einem Bereich von 619 nm bis 628 nm. Die langwellige Lage der Absorption lässt auf eine sechsfache Koordination dieses Komplexes schließen, er wird zur Unterscheidung von Komplexen mit einer Q_x -Absorption von ungefähr 610 nm Typ II genannt.

Denkbar ist, dass hier ein Lösungsmittelmolekül mit in die Bindungstasche eingebracht wurde. Möglicherweise handelt es sich bei der sechsfachen Koordination des Typs I um eine gemischte Koordination von einem Histidin und einem O-Liganden, bei Typ II hingegen um zwei Histidin-Liganden. Allerdings gibt es in Lösung keinen Hinweis darauf, dass ein O-Ligand eine weniger starke Auswirkung auf den Q_x -Übergang hat, als ein N-Ligand, allerdings wurden keine gemischten Koordinationen, d.h. eine gleichzeitige Koordination eines N- und O-Liganden in Lösung getestet.

Um die Bindungssituation des Ni-BPheid *a* in allen 216 Vier-Helix-Bündel-Proteinen vergleichen zu können, wurden eine Reihe von Parametern automatisch mit einem selbstgeschriebenen Programm (F. Drepper; AG Haehnel, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) extrahiert. Hierzu wurde die Q_x -Region in drei Bereiche von 580 – 586 nm (585 nm-Bereich), 596 – 614 nm (609 nm-Bereich) und 614 – 640 nm (627 nm-Bereich) unterteilt, um Minima in der zweiten Ableitung einer bestimmten Koordinationszahl zuordnen zu können. Zusätzlich wurden die Absorptionen um 430 nm und 670 nm durch die zweite Ableitung ausgewertet, um das Maß der Oxidation des Ni-BPheid *a* zum entsprechenden Chlorin (Ni-[3-Acetyl]-Pheid *a*) zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden in einer Matrix dargestellt (Abb. C-63). Die charakteristischen Absorptionen werden durch Balken dargestellt, mit einer Farbkodierung für die fünf vorher genannten Banden und einer Längenkodierung entsprechend ihrer relativen Intensitäten im Bezug auf die Maximalintensität dieser Bande jeweils über die drei Waschschrte. Das vierfach koordinierte Ni-BPheid *a* wurde übersichtlichkeitshalber nicht mit in die Matrix aufgenommen, da alle Spots diese Komponente enthalten, oft in hoher Intensität. Die Betrachtung zeigt eine auffällige vertikale Musterung, die auch schon bei der visuellen Inspektion der Membranen deutlich war (Abb. C-57). Sie verstärkt sich im Laufe der Waschungen. Dies zeigt, dass die Bindehelix B_j in erster Linie für die Art der Koordination verantwortlich ist, die Abschirmhelix S_i hingegen nur geringen Einfluss hat. Die Bindehelix B_5 und in geringerem Ausmaß B_3 und B_{10} fördern den für Ni ungewöhnlichen Zustand mit $n_c = 5$, während $n_c = 6$ durch B_{11} (Typ I) und B_{12} (Typ II)

gebildet wird. Auch ist eine klare Korrelation zwischen dem Koordinationszustand $n_c = 6$ (Typ I) und der Oxidation des Makrozyklus zu beobachten (B_{11}), was den Ergebnissen der Titration von Ni-BPheid a mit Imidazol in Lösung entspricht (Kap. C-4.6.2.1.1).

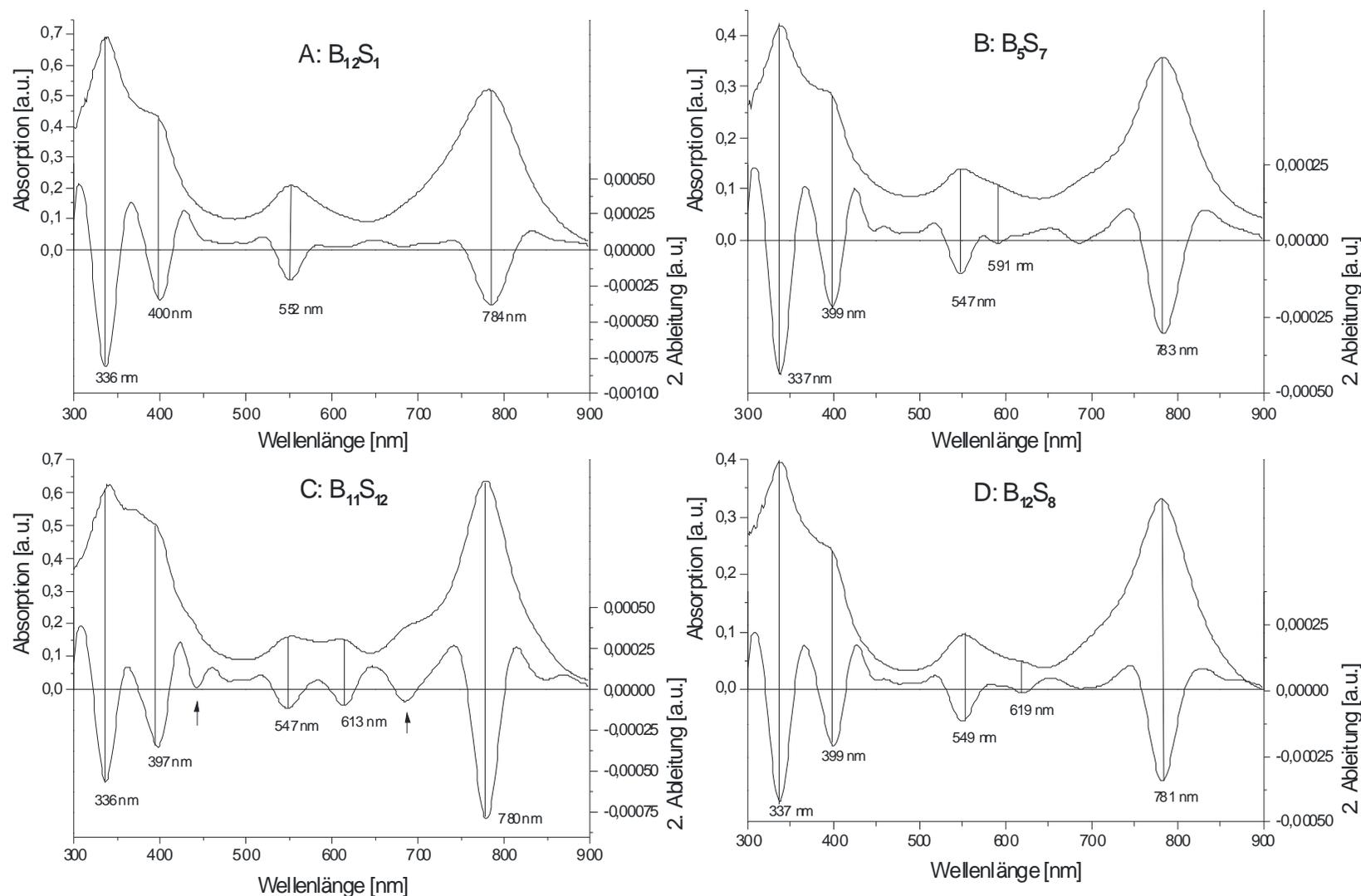


Abb. C-62: Absorptionsspektren und 2. Ableitung von vier repräsentativen Spots der Membranen nach Inkubation mit Ni-BPheid *a* und zweifachem Waschen mit Tris/DMF (siehe Kap. B-7.2.2 und C-4.5) in vier verschiedenen Koordinationszuständen: (A) Spot mit ausschließlich $n_c = 4$, (B) Spot mit zusätzlich $n_c = 5$, (C) Spot mit zusätzlich $n_c = 6$ (Typ I), (D) Spot mit zusätzlich $n_c = 6$ (Typ II)

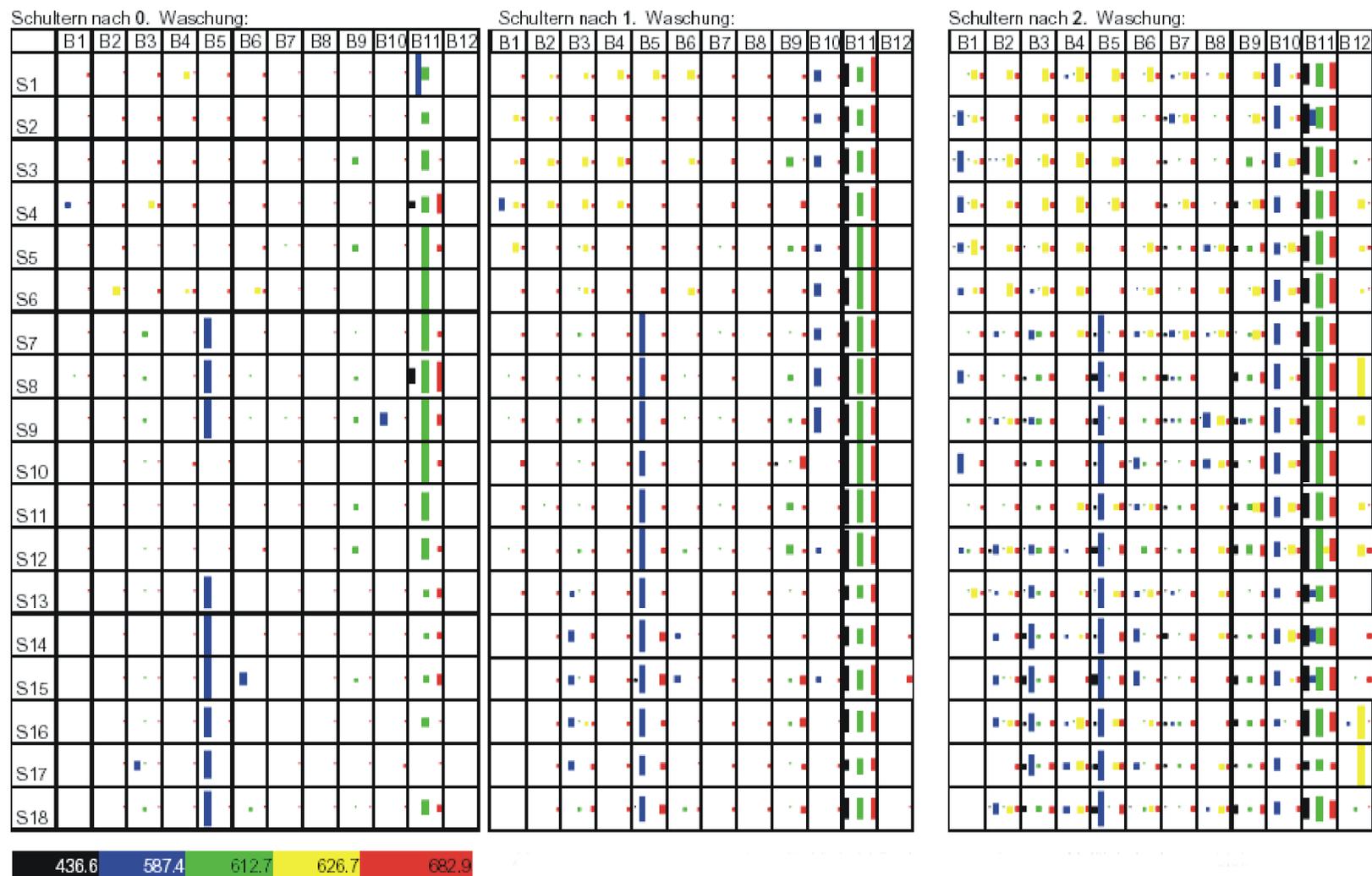


Abb. C-63: Relative Intensitäten der höher koordinierten Ni-BPheid α Komponenten ($n_c > 4$) in der Q_x -Region und des Oxidationsproduktes Ni-[3-Acetyl]-Pheid α im Verlauf der Waschschritte. Die Werte wurden auf den Maximalwert der entsprechenden Bande für jede Waschung normiert. (erhalten von F. Drepper; AG Haehnel, Freiburg).

4.6.2.2.3 Analyse der Q_y-Absorptionsbande

Die Q_y-Bande deckt den Wellenlängenbereich von 771 nm bis 802 nm ab. Bei einer Koordination des Zentralmetalls an Histidin verschiebt sich die Q_y-Bande kurzwellig (Kap. C-4.6.2.1.1, [Noy et al., 2000]), bei einer Bindung an Proteine hingegen meist langwellig, aufgrund des umgebungsinduzierten Rotshifts (environment-induced red-shift = EIRS) [Scheer und Struck, 1993].

In Abb. C-64 wurde die Verschiebung der Q_y-Bande der einzelnen Spots nach den drei Waschschrritten in Graustufen kodiert aufgetragen, um Tendenzen der Bindung, bezogen auf die Binde- und Abschirmhelices, zu erkennen. Die Größe der Kreise entspricht der relativen Menge an Pigment (Fläche unter der Q_y-Bande), normiert auf den Maximalwert der drei Waschungen. Die Spots der Membran M1 (B₁S₁ – B₆S₆) absorbieren nach jeder Waschung sehr langwellig und ihre Intensitäten sind im Vergleich zu anderen Spots sehr niedrig. In diese Proteine wurde vor der Ni-BPheid *a*-Bindung bereits Häm eingelagert. Wie es scheint, wurden dadurch die Bindeeigenschaften der Vier-Helix-Bündel-Proteine irreversibel beeinflusst, ohne dass verbliebenes Pigment auf der Membran registriert werden konnte. Bei den restlichen Spots erkennt man wieder eine vertikale Musterung, so dass auch hier der Einfluss der Bindehelix größer ist, als der Einfluss der Abschirmhelix. Die Spots mit den Bindehelices B₃, B₁₀ und B₁₂ absorbieren kurzwellig, die mit den Bindehelices B₄ und B₉ sind meist rotverschoben im Vergleich zu Ni-BPheid *a* in Lösung. Diese Tendenzen verstärken sich mit den Waschungen. Auffallend ist die vergleichsweise große gebundene Pigmentmenge bei den Spots mit den Bindehelices B₁₁ und B₁₂. Die relative Blauverschiebung der Q_y-Bande in Vier-Helix-Bündel-Proteinen mit den Bindehelices B₃, B₁₀ und B₁₂ stimmt mit einem relativ großen Anteil an langwelligen Komponenten in der Q_x-Region, d.h. höher koordinierten Komponenten überein, hingegen wurden bei Spots mit den Bindehelices B₄ und B₉ nur geringe Anteile an höher koordiniertem Ni-BPheid *a* gefunden.

Durch den in Lösung bestimmten Faktor (Kap. C-4.6.2.1.3) zur Bestimmung der Pigmentmenge aus der Fläche unter der Q_y-Bande (1,4 – 34,8, Abb. C-64) ergibt sich ein Gehalt von 0,8 – 22 nmol/cm². Der Proteingehalt auf den Spots beträgt ungefähr 9,35 nmol/cm², so dass sich ein Protein-Pigment-Verhältnis von 1 : 0,08 – 2,3 ergibt. Diese sehr grobe Abschätzung deutet auf eine Bindung von mindestens einem BChl pro Protein bei den starkbindenden MOP hin.

Die halbe Breite der Q_y-Bande liegt zwischen 13,8 nm und 42,4 nm, wobei nur wenige Spots Halbwertsbreiten unter 20 nm (Bindehelix B₁₁, nach 2. Waschung) und über 30 nm besitzen (vorwiegend Spots mit Bindehelix B₃). Die meisten Spots haben Halbwertsbreiten zwischen 20 und 30 nm, die denen in polaren Lösungsmitteln ähnlich sind (Tab. C-18).

Um die Stabilität der Komplexe zu testen, wurden die Membranen wiederholten Waschungen unterworfen, bei denen die DMF-Konzentration von 0 % über 12,5 % auf 25 % erhöht wurde. In Abb. C-64 und Tab. C-20 ist zu sehen, dass es zwischen den einzelnen Spots große Unterschiede in der Stabilität der Komplexe gibt. Dies wird anhand zweier Beispiele näher erläutert (Abb. C-65): Bei MOP B_1S_1 ist die Beladung nach der 0. Waschung niedrig ($\sim 0,3$ OD) und die Menge an gebundenem Pigment verringert sich während der Waschungen noch erheblich. Die Beladung bei MOP $B_{11}S_{12}$ hingegen ist nach der 0. Waschung annähernd doppelt so hoch wie bei B_1S_1 , und diese Menge bleibt während der Waschungen mehr oder weniger konstant.

Durch die Änderungen an total gebundenem Pigmenten können die Spots in drei Kategorien eingeteilt werden:

- 1) einige Spots behalten nach der zweiten Waschung die Intensität der Q_y -Bande innerhalb der Fehlergrenze von $\pm 10\%$. Zu diesen Spots gehören hauptsächlich diejenigen mit Bindehelix B_{11} und B_{12} .
- 2) Die meisten Spots verlieren 10-30 % der Absorption während der Waschungen.
- 3) Bei der letzten Gruppe wurde ein höherer Absorptionsverlust beobachtet. Diese Gruppe befindet sich ausschließlich auf der Membran, die vorher bereits für Bindungsstudien mit Häm verwendet wurde.

Starke Änderungen wurden generell nach der zweiten Waschung beobachtet, hier nehmen die Intensitäten um etwa 50 % ab. Nur wenige MOP-Komplexe behalten die Intensitäten von annähernd 100 %. Insbesondere gehören die Vier-Helix-Bündel-Proteine mit der Bindehelix B_{11} zu dieser Kategorie, die sich durch sehr hohe Stabilität auszeichnet. Ein weiterer Effekt, der während der wiederholten Waschungen zu beobachten ist, ist die Korrelation zwischen der Stabilität der Komplexe und der Verschiebung in der Q_x -Region. Langwellig absorbierende Komplexe mit $n_c = 4$ verlieren Pigment, während die Q_y -Intensität von Komponenten mit $n_c > 4$ annähernd konstant bleibt. Auch ist zu beobachten, dass sich das Verhältnis zwischen den nebeneinander vorliegenden Komponenten mit vierfacher und sechsfacher Koordination beim Waschen (Abb. C-65 unten) zu Gunsten der höher koordinierten Verbindung verbessert.

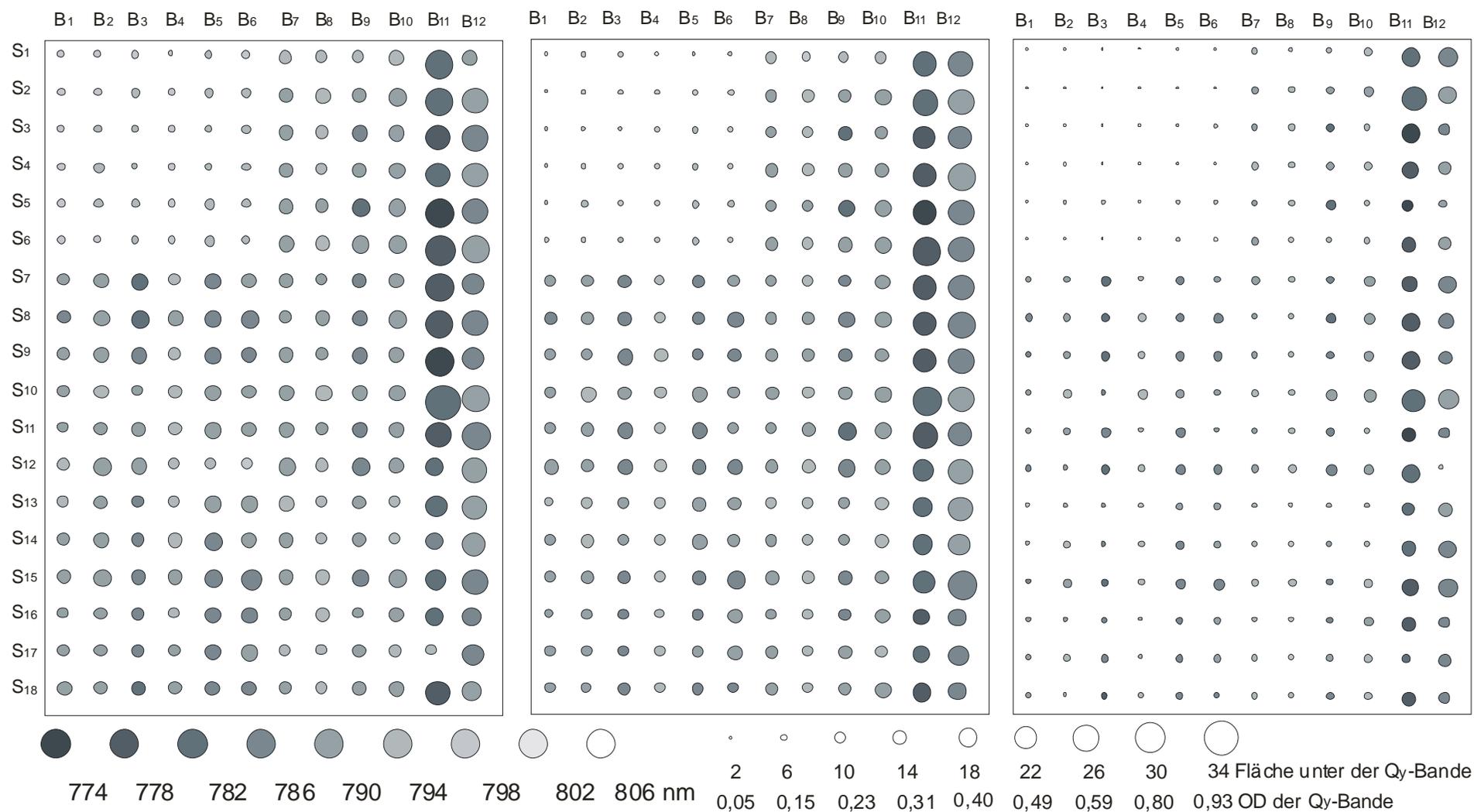


Abb. C-64: Schematische Darstellung der Verschiebung der Q_y -Bande (Graustufen) und der gebundenen Pigmentmenge (Kreisgröße) für alle Spots für die drei Waschungen (links: 0. Waschung, Mitte: 1. Waschung, rechts: 2. Waschung).

	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12	MW	+/-	σ
S01	37	26	27	33	40	45	18	17	17	14	7	-58	19	+/-	26
S02	34	33	34	28	21	28	9	17	15	12	-2	-1	19	+/-	12
S03	31	40	37	30	19	33	19	14	9	21	8	15	23	+/-	10
S04	38	40	24	30	15	31	8	2	10	14	-4	-12	16	+/-	16
S05	42	21	34	32	25	28	16	15	15	7	7	2	20	+/-	12
S06	26	8	27	21	24	24	13	27	8	8	2	10	17	+/-	9
S07	19	11	18	24	8	11	16	9	11	1	9	-12	10	+/-	9
S08	0	14	22	23	14	10	7	13	-2	8	9	-6	9	+/-	8
S09	12	24	1	-12	25	5	9	7	13	1	14	-14	7	+/-	12
S10	-1	-3	-14	9	3	14	7	22	10	-4	14	11	5	+/-	9
S11	8	1	-3	18	6	23	27	1	-10	-1	-6	21	7	+/-	12
S12	-12	24	-1	-6	-25	-47	18	03	8	0	-46	-3	-8	+/-	21
S13	22	22	20	11	15	17	25	17	11	-18	-5	2	12	+/-	12
S14	23	8	20	19	17	17	18	16	12	-14	-36	4	9	+/-	16
S15	23	17	17	20	14	11	-2	16	10	21	-28	-15	9	+/-	15
S16	20	16	19	24	19	15	19	25	-15	3	-14	8	12	+/-	13
S17	19	9	19	13	22	15	-12	6	-2	6	-68	5	3	+/-	23
S18	23	29	18	21	11	20	-1	17	14	2	2	12	14	+/-	9
MW	20	19	18	19	15	17	12	13	7	5	-8	-2	11	+/-	8
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	Gesamt-MW Spalten (↑) and Reihen (↓)		
σ	14	12	13	12	13	18	10	9	9	10	22	17	11	+/-	9

Tab. C-20: Pigmentverlust von Ni-BPheid a nach der ersten Waschung in %, für jede Spalte (Bindehelix) bzw. Reihe (Abschirmhelix) ist der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung σ unten bzw. rechts angegeben, die Werte insgesamt rechts unten.

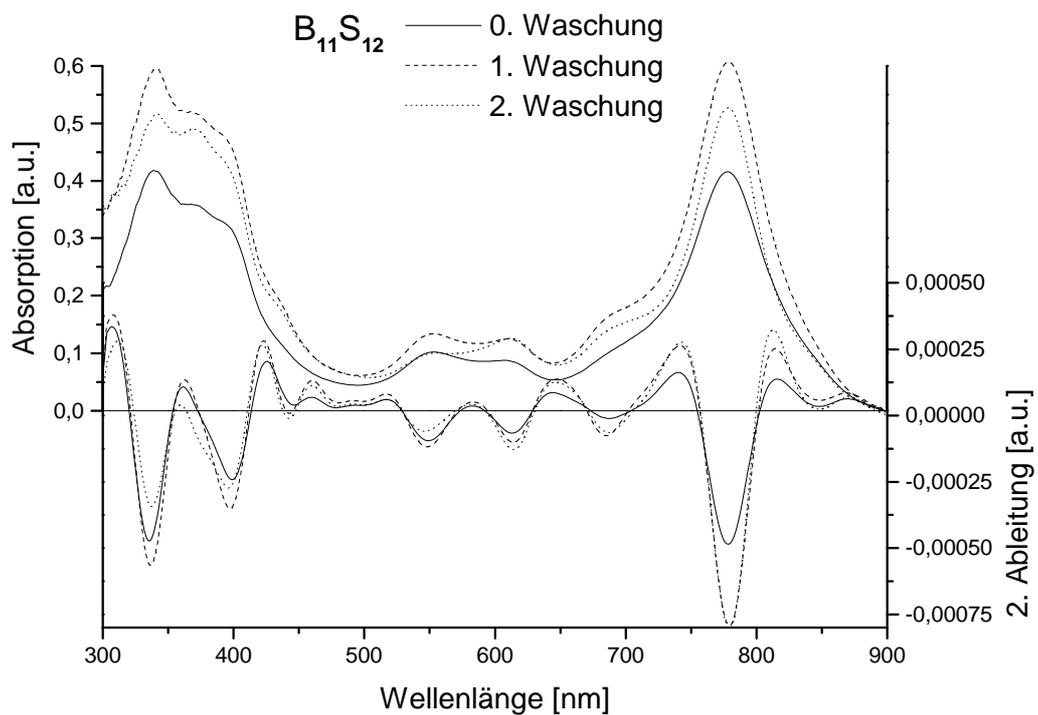
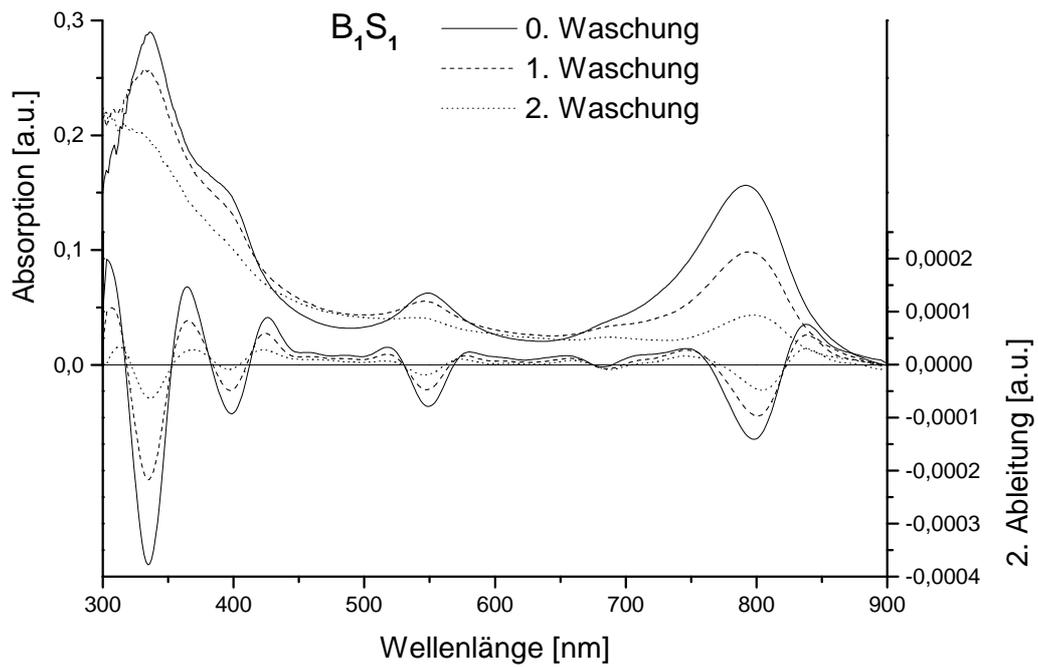


Abb. C-65: Pigmentverluste beim Waschen: Absorptionsspektren der Ni-BPheid α -Komplexe mit den Vier-Helix-Proteinen B_1S_1 (oben) und $B_{11}S_{12}$ (unten) im Laufe der drei Waschschrirte, dargestellt als Absorption und zweite Ableitung.

4.6.2.2.4 Diskussion

Das Ni-BPheid *a* wird in unterschiedlicher Menge und mit Koordinationszahlen von 4 - 6 von den verschiedenen Vier-Helix-Bündel-Proteinen gebunden, zudem zeigen die Komplexe auch unterschiedliche Stabilitäten. Bei allen untersuchten Parametern (Intensität, Verlust während der Waschungen und Koordination des Zentralmetalls) ist der Einfluss der Bindehelices B_j stärker als der der Abschirmhelices S_j . Eine Sonderrolle spielen hierbei die Bindehelices B_{11} und B_{12} , die sich durch besondere Stabilität der Komplexe und hohe Ni-BPheid *a*-Bindung auszeichnen. Diese beiden Bindehelices wurden nach einem neuen Design, das auf der Struktur des Cyt b aus dem Cytochrom bc_1 -Komplex basiert, modelliert.

Das Zentralmetall liegt zum größten Teil vierfach koordiniert vor. Eine Ausnahme bildet hier die Bindehelix B_{11} , da hier in annähernd gleichen Verhältnissen vierfach- und sechsfach-koordinierte Komponenten vorliegen. Bei den anderen Komplexen sind die höher koordinierten Komponenten nur in geringerem Ausmaß (unter 10 %) vertreten. Bei der vierfach koordinieren Spezies kann es sich einerseits um unspezifisch im hydrophoben Inneren der MOP gebundenes Pigment handeln, oder andererseits um spezifisch gebundene Komplexe, bei denen durch die Aminosäurereste eine Koordination an den Histidinen verhindert wird (z. B. Volumeneffekte). Wahrscheinlich ist, dass letzterer Fall in Spots eintritt, in denen keine höher koordinierten Komponenten vorliegen (B_4 , B_8 und B_{12}), und beim Waschen nur geringe Verluste auftreten.

Nach der Beendigung meiner praktischen Arbeiten wurden neue Versuche, in der AG von Prof. Haehnel (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zur Untersuchung der Bindungssituation von Ni-BPheid *a* an MOP in Lösung durchgeführt, wofür drei Komplexe mit möglichst spezifischer Bindung aus diesen Ergebnissen ausgewählt wurden, die eine Tendenz zur vierfachen, fünffachen bzw. sechsfachen Koordination zeigten. Diejenigen Proteine, die auf der Membran die Tendenz zur Bildung von Komplexen mit $n_c = 5$ bzw. $n_c = 6$ hatten, aber immer noch einen großen Anteil an einer vierfachkoordinierten Komponente zeigten, zeigten in Lösung wesentlich höhere Anteile von Komplexen mit $n_c > 4$. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass in Lösung weniger oder sogar kein Pigment unspezifisch gebunden ist.

Das Ni-BPheid *a* kann in drei Koordinationsstufen vorliegen ($n_c = 4, 5, 6$), die auch alle in verschiedenen Spots der Vier-Helix-Bündel-Proteinen gefunden wurden. Speziell bei Spots mit symmetrisch designten Vier-Helix-Bündel-Proteinen, in denen zwei Histidine einander

gegenüber positioniert sind (B_{11}), wird die Koordinationszahl $n_c = 6$ bevorzugt. Diese Spots zeichnen sich auch durch eine hohe Bindungsintensität des Pigments an das Protein aus. Im Laufe der Waschungen mit steigendem DMF-Gehalt verstärkt sich bei diesen Spots diese Tendenz, so dass der Anteil von Ni-BPheid *a* mit $n_c = 4$ zugunsten höher koordinierter Spezies sinkt. Trotz des symmetrischen Designs tritt auch die für Ni-Komplexe ungewöhnliche Koordinationszahl $n_c = 5$ auf (B_3 , B_5 und B_{10}), die in Lösung nur mit Imidazol (Kap. C-4.6.2.1.1; [Noy et al., 2000]) und in mit Ni-BChl substituierten bakteriellen Reaktionszentren beobachtet wurde [Chen et al., 1995]. Im bakteriellen Reaktionszentrum wird durch die asymmetrische Proteinumgebung der nativen Bindungstaschen von BChl dem Ni-BPhe *a* die fünffache Koordination „aufgeprägt“. Im Gegensatz dazu sind native Mg-Komplexe praktisch ausschließlich fünffach koordiniert gebunden, eine vierfache Koordination tritt so gut wie nie auf [Katz et al., 1976].

In der zweiten Ableitung der Absorptionsspektren taucht in einigen Fällen eine Komponente mit einer sehr langwellig verschobenen Q_x -Bande (625 nm, $n_c = 6$ (Typ II)) auf, die kein Gegenstück in Lösung hat. Eine ähnlich langwellig verschobene Q_x -Bande (632 nm) fanden Morris et al. bei einer Lysin-Substitution im Reaktionszentrum (RC) [Morris et al., 2003]. Dadurch erhielten sie eine ungewöhnliche sechsfache Koordination des BChl, das von der einen Seite mit His und von der anderen Seite mit dem eingeführten Lys-Rest komplexiert wird.

Das Ni-BPheid *a* oxidiert innerhalb der MOP, wie auch in Lösung rascher bei einer sechsfachen Koordination des Zentralmetalls. In den photosynthetischen Komplexen liegt das BChl ausschließlich fünffach koordiniert vor. Genauso hat auch Ni-BChl, eingetauscht ins RC und LH1, die für Ni-BChl ungewöhnliche 5-fache Koordination. Diese bietet in den photosynthetischen Apparaten möglicherweise einen Schutz vor Oxidation.

Die Spots der Bindehelices B_{11} und B_{12} zeichnen sich durch hohe Intensitäten der Absorption und auch immer durch hohe Stabilität während der Waschungen aus. Bei B_{11} ist zusätzlich der hohe Anteil an sechsfach koordiniertem Ni-BPheid *a* und die geringe Halbwertsbreite der Q_y -Bande bemerkenswert. Diese beiden Helices wurden nach dem asymmetrischen Cyt *b*-Modell entworfen. Ein Vergleich der Sequenzen der beiden Modelle ergab, dass die Unterschiede wahrscheinlich auf einen Arg-Rest in B_{11} und B_{12} (Position Z_{10} bzw. Z_{12}) zurückzuführen sind. Vier-Helix-Bündel-Proteine mit Arginin-Resten zeichnen sich auch durch eine stabilere Häm-Bindung aus (B. Monien, mündliche Mitteilung 2002), was auf die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Propionatresten und der Arg-

Seitenkette zurückzuführen ist. Gleichzeitig bewirkt das Arg eine Umorientierung des Ni-BPheid *a* im MOP, wofür es eingeführt wurde (siehe Kap. C-4.3, Abb. C-55)

Arg bildet neben Trp und Tyr im LH2 von *Rhodospseudomonas acidophila* [McDermott et al., 1995] und *Rb. sphaeroides* [Fowler et al., 1997] Wasserstoffbrückenbindungen zum Sauerstoff der C-3-Acetylgruppe des BChl *a* aus. Kashiwada et al. konnten in synthetischen Vier-Helix-Bündel-Proteinen ebenfalls eine erhöhte Stabilität der Bindung zwischen Pigment und Protein feststellen, wenn die Proteine eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen polaren Aminosäureresten und der C-3-Acetyl-Gruppe von BChl *a* [Kashiwada et al., 1999] bzw. der Carboxyl-Gruppe von Ni/Zn-Porphyrinen [Kashiwada et al., 2000] ausbilden können.

Im Falle des Ni-BPheid *a* besteht die Möglichkeit, eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Arginin und einerseits der C-3-Acetyl-Gruppe oder andererseits wie bei Häm mit der C17³-COOH-Gruppe auszubilden. Dadurch sind wahrscheinlich die hohe Intensität und die hohe Stabilität der Spots mit den Bindehelices B₁₁ und B₁₂ zu erklären. Allerdings unterscheiden sie sich stark in der Koordination des Zentralmetalls; Spots mit B₁₁ sind hauptsächlich sechsfach koordiniert und Spots mit B₁₂ vierfach. Dieser Unterschied ist auf die relative Position der Arg in der Helix zurückzuführen. In B₁₁ sitzt das Arg an Position Z₁₀ direkt benachbart zum His an Position Z₉, in B₁₂ befindet es sich an Position Z₁₂ einen Helixturn über dem His (Abb. C-54). Es scheint, dass die Position Z₁₀ einen idealen Abstand besitzt, um gleichzeitig eine Ni-Koordination und eine Wasserstoffbrückenbindung zum Ni-BPheid *a* auszubilden. Dagegen scheint die Position des Arg an Z₁₂ (B₁₂) nur eine Wasserstoffbrückenbindung zuzulassen und somit eine Koordination mit dem His zu verhindern, was vermuten lässt, dass erstere stärker ist als die His-Ni-His-Bindung.

4.6.3 Zn-Bakteriopheophorbid *a*

Für die Zn-Komplexe wurden analog zum Vorgehen bei den Ni-Komplexen als Grundlage zur Auswertung der Absorptionsspektren von proteingebundenen Komplexen äquivalente Untersuchungen in Lösung durchgeführt: Messung in der Inkubationslösung Tris / DMF und Bestimmung des Extinktionskoeffizienten und der Halbwertsbreite der Q_y-Bande in dieser Lösung.

Es ist bekannt, dass die Zn-Komplexe nur eine maximal fünffache Koordination des Zentralmetalls eingehen, weshalb auf eine Titration mit Imidazol verzichtet wurde.

Tab. C-21 zeigt die Absorptionsmaxima von Zn-Bakteriopheophorbid *a* (Zn-BPheid *a*) in DE, Tris/DMF und eingelagert in die Vier-Helix-Bündel-Proteine, in Abb. C-66 sind diese drei Absorptionsspektren dargestellt.

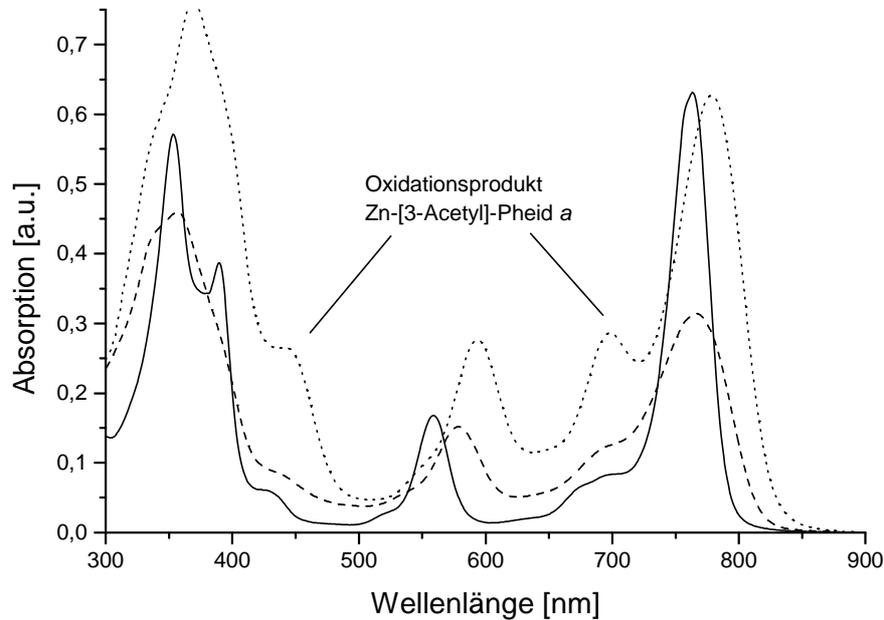


Abb. C-66: Absorptionsspektren von Zn-BPheid *a* in DE (—), Tris/DMF (- - -) und eingelagert in das Vier-Helix-Bündel-Protein B₉S₆ (· · · ·).

Zn-BPheid <i>a</i>	B _y [nm]	B _x [nm]	Q _x [nm]	Q _y [nm]	Q _y -Breite
In DE	353	389	558	763	36
In Tris/DMF	356	n.a.	579	766	75
In der 2. Ableitung	360	392	579	766	-
In Vier-Helix-Bündel-Proteinen	351 - 380	383 - 401	579 - 594	775 - 787	40 - 58

Tab. C-21: Absorptionsmaxima und Halbwertsbreite der Q_y-Bande von Zn-BPheid *a* in DE, Tris/DMF und eingelagert in Vier-Helix-Bündel-Proteine.

Der Extinktionskoeffizient von Zn-BPheid *a* wurde, wie schon beim Ni-BPheid *a* ausgehend von dem bekannten Extinktionskoeffizienten in DE ($67,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bestimmt und beträgt in Tris / DMF $33,7 \pm 0,014 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Durch Berechnung der Fläche erhält man zur Bestimmung der Pigmentmenge bei unbekanntem Extinktionskoeffizienten einen Faktor von

$$\frac{\text{Fläche}_{620-900\text{nm}}}{\text{Konzentration} [\text{mmol/l}]} = 3222 (\pm 744) \text{ l} \cdot \text{nm} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}.$$

Die Wellenlängenbereiche, in denen die Absorptionen der Zn-BPheid-MOP variieren (Q_y -Bande $\Delta = 12$ nm) sind in Tab. C-22 und Abb. C-67 dargestellt. Die Absorptionen sind im Vergleich zu denen in Lösung, ähnlich wie bei Ni-BPheid-MOP, rotverschoben. Der Wellenlängenbereich in dem die Q_y -Bande variiert ist, bedingt durch die geringere Komplexität der Koordination, nicht so groß wie bei den Ni-Komplexen. Die Intensitäten der Q_y -Banden schwanken in einem großen Bereich von 0,01 OD bis 1,25 OD (Abb. C-67). Durch Berechnung der Fläche unter der Q_y -Bande kann mit Hilfe des oben bestimmten Faktors die Pigmentmenge berechnet werden, die zwischen 0,3 und 12 nmol/cm² liegt, dieser Wert ist halb so hoch wie der Wert des Ni-BPheid *a*. Infolge der ähnlich starken Zn-BPheid *a*-Bindung an die Vier-Helix-Bündel-Proteine wie bei Ni-BPheid, ist ein Memory-Effekt in diesem Falle wohl auszuschließen. Wie bei der Einlagerung von Ni-BPheid *a* sind die MOP der Membran M1 ($B_1S_1 - B_6S_6$) auch bei der Einlagerung von Zn-BPheid *a* diejenigen mit der geringsten Bindung, die MOP mit der Bindehelix B_{11} diejenigen mit der stärksten Bindung.

Die Breite der Q_y -Bande liegt in allen MOP-Komplexen niedriger als im Inkubationslösungsmittel Tris/DMF (Tab. C-21). Dies ist ein Hinweis, dass sich das Pigment in einer unpolaren Umgebung befindet, d.h. eingebaut in den hydrophoben Kern der Vier-Helix-Bündel-Proteine vorliegt. Für die Verschmälerung der Breite der Q_y -Bande können allerdings zwei Effekte verantwortlich sein. Einerseits kann eine Verringerung der Bandbreite durch eine unpolare Umgebung zustande kommen, wie es auch in Lösung festgestellt werden kann [Limantara et al., 1997], andererseits kann auch eine geringere Heterogenität die Ursache sein (vgl. Kap. C-4.6.1).

Der Pigmentverlust während der ersten Waschung lässt auch hier eine Einteilung in drei Gruppen zu: es gibt Spots, die zwischen 50 % und 60 % Pigment verlieren ($B_1S_1 - B_6S_6$; B_7S_{13} , B_8S_{13}), Spots die ca. 30 % an Intensität verlieren und Spots die annähernd konstante Intensitäten zeigen (Verlust unter 10 %; $B_{11}S_i$). Nach der zweiten Waschung beträgt aber der Verlust auch bei den starkbindenden MOP zwischen 30 % und 60 % (Tab. C-22).

Die Q_x -Bande des Zn-BPheid *a* liegt in Tris / DMF-Lösung als auch bei allen MOP-Komplexen in einem Bereich, der für eine 5-fache Koordination typisch ist. In Tris / DMF-Lösung liegt sie bei 579 nm; in den MOP-Komplexen ist sie rotverschoben und liegt in einem Bereich von 579 – 594 nm. In der zweiten Ableitung der Absorptionsspektren des Zn-BPheid *a* in Lösung und MOP-gebunden lassen sich keine Banden im Q_x -Bereich erkennen, die oberhalb von 600 nm liegen, d.h. das Zn-BPheid *a* liegt in keinem der MOP-Komplexe 6-fach koordiniert vor.

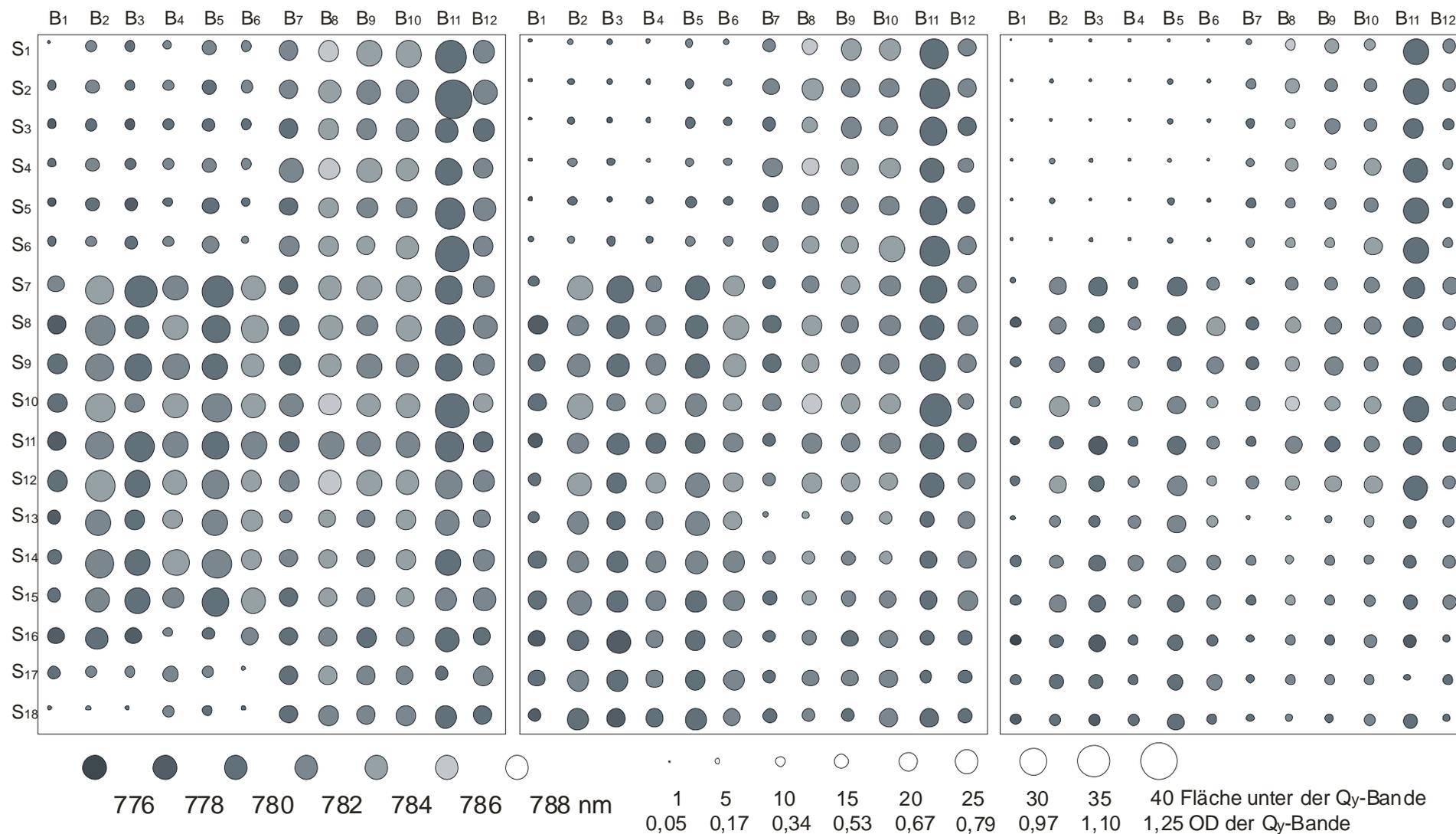


Abb. C-67: Schematische Darstellung der Verschiebung der Q_y-Bande von Zn-BPheid a (Graustufen) und der gebundenen Pigmentmenge (Kreisgröße) für alle Spots für die drei Waschungen, normiert auf den Maximalwert aller Messungen (links: 0. Waschung, Mitte: 1. Waschung, rechts: 2. Waschung).

	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12	MW	+/-	σ
S01	46	48	46	53	46	47	33	26	22	18	10	19	35	+/-	14
S02	53	43	42	45	40	39	8	3	19	19	19	19	29	+/-	16
S03	62	39	44	49	27	31	38	30	-5	18	-16	20	28	+/-	21
S04	52	35	35	44	38	24	20	20	26	11	8	25	28	+/-	13
S05	52	37	55	28	31	1	12	13	25	14	8	30	26	+/-	16
S06	46	35	28	34	33	-11	28	10	-1	-9	13	9	18	+/-	18
S07	32	15	13	34	18	18	33	27	24	22	1	17	21	+/-	9
S08	1	28	2	20	19	9	17	21	19	20	21	16	16	+/-	8
S09	20	15	19	19	11	6	18	20	22	15	6	20	16	+/-	5
S10	18	16	18	16	25	30	26	6	18	22	7	23	19	+/-	7
S11	21	22	22	21	26	28	36	23	20	16	15	15	22	+/-	6
S12	34	21	18	15	10	10	39	14	26	25	8	26	20	+/-	9
S13	25	14	10	4	0	17	57	64	34	31	37	9	25	+/-	19
S14	-11	26	15	19	22	1	28	30	22	36	36	18	20	+/-	13
S15	-18	-2	14	-1	24	15	17	25	21	14	17	10	11	+/-	12
S16	-4	11	-43	-102	-65	-4	32	24	20	11	34	18	-6	+/-	41
S17	-29	-123	-131	-17	-83	-531	25	14	15	5	15	27	-68	+/-	150
S18	-255	-316	-383	-68	-143	-283	14	32	26	10	16	23	-111	+/-	151
MW	8	-2	-10	12	4	-31	27	21	20	17	14	19	8	+/-	36
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	Gesamt-MW Spalten (↑) and Reihen (↓)		
σ	69	84	99	39	49	140	12	18	9	10	13	6	8	+/-	15

Tab. C-22: Pigmentverlust von Zn-BPheid *a* nach der ersten Waschung in %, für jede Spalte (Bindehelix) bzw. Reihe (Abschirmhelix) ist der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung σ unten bzw. rechts angegeben, die Werte insgesamt rechts unten.

Im Absorptionsbereich, der für eine 4-fache Koordination charakteristisch ist, zeigt sich bei den meisten MOP-Komplexen in der zweiten Ableitung eine kleine Bande (539 - 547 nm), die allerdings nur 1 % der Intensität Q_x -Bande der 5-fach koordinierten Spezies besitzt. Diese Bande ist auch in der zweiten Ableitung der Absorptionsspektren von Zn-BPheid *a* in Tris / DMF-Lösung (538 nm) mit einer höheren Intensität (10% der $n_c = 5$ -Bande) erkennbar. Sie kann man wohl bei den Zn-BPheid *a*-MOP-Komplexen auf eine Verunreinigung aus der Lösung zurückführen.

Diskussion:

Die Komplexe von Zn-BPheid *a* mit den verschiedenen MOP zeigen ein ähnliches Muster bezüglich ihrer Affinität und Stabilität wie die Ni-BPheid *a*-MOP-Komplexe. Auch bei Zn-BPheid *a* sind die stabilsten Komplexe diejenigen mit der Bindehelix B₁₁. Die Quantifizierung der gebundenen Pigmentmenge ergab, dass nur ca. halb so viel Zn-BPheid *a* gebunden wurde, wie Ni-BPheid *a* im ersten Versuch, d.h. maximal ein Zn-BPheid pro MOP. Die Absorptionsspektren der Zn-Komplexe zeigen wie die der Ni-Komplexe eine Rotverschiebung aller Banden, die auf die Bindung am Protein zurückzuführen ist.

Das Zn-BPheid *a* liegt in den MOP-Komplexen hauptsächlich 5-fach koordiniert vor, nur ein sehr geringer Prozentsatz zeigt $n_c = 4$, was auf eine Verunreinigung aus der Inkubationslösung zurückzuführen ist. Zn-BPheid *a* kann BChl in nahezu allen BChl-Bindungstaschen ohne signifikante Änderung an Reaktivität und/oder Eigenschaften ersetzen und zeigt in den natürlichen Komplexen dasselbe Koordinationsverhalten wie BChl mit $n_c = 5$. Das Bakterium *Acidiphilium rubrum* enthält in den photosynthetischen Apparaten Zn-BChl *a* anstelle des BChl *a* [Kobayashi et al., 1998; Shimada et al., 1998]. Zn-BPheid *a* ist folglich ein geeignetes Pigment für das Screenen der MOP nach BChl-Bindungstaschen. Aufgrund der Koordination, Bindungsstärke und Bandbreite konnte bestätigt werden, dass es sich bei den MOP um BChl-Bindungstaschen handelt. Da sich bei der Bindung des Zn-BPheid *a* das gleiche Muster in Affinität und Stabilität wie bei der Bindung von Ni-BPheid *a* zeigt, reicht zum frühen Screening der Komplexe ein Pigment aus.

4.6.4 Fe-Bakteriopheophorbid *a*

Fe-Bakteriopheophorbid *a* (Fe-BPheid *a*) konnte infolge der starken Abnutzung der Membranen durch häufiges Waschen mit wässrigen und organischen Lösungsmitteln nur in vier der sechs Membranen eingelagert werden (B₁S₁₃ - B₆S₁₈; B₇S₁ - B₁₂S₁₈). Nach der Inkubation der Membranen wurde die Pigment-Inkubationslösung photometrisch vermessen, da eine starke Farbänderung von blaugrün (μ -oxo-Fe-BPheid *a*, siehe Kap. C-1.3.2.1) nach

rotbraun zu beobachten war. Das Absorptionsspektrum dieses „Überstands“ zeigte nur eine unspezifische, breite Absorptionsbande bei ca. 430 nm, und keine für Porphyrin, Chlorin oder Bakteriochlorin typischen langwelligen Absorptionsbanden, so dass zu vermuten ist, dass der Makrozyklus unter Ringöffnung oxidiert ist. Um die Wirkung von Imidazol alleine auf die Oxidation des Makrozyklus zu untersuchen, wurde eine Langzeitmessung von Fe-BPheid *a* in Tris/DMF/Imidazol durchgeführt. Die Bedingungen wurden wie für die Inkubationslösung gewählt. Es zeigte sich, dass das Fe-BPheid *a* als μ -oxo-Komplex sehr stabil ist und sich während der Reaktionsdauer von 15 h nur sehr geringe Mengen Oxidationsprodukt (Fe-[3-Acetyl]-Pheid *a*) bildeten. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass für die Oxidation während der Inkubation mit den MOP die Bindung des Fe-BPheid *a* an die Vier-Helix-Bündel-Proteine verantwortlich ist, welche somit eine der Häm-Oxygenase ähnliche enzymatische Aktivität zeigen.

Die Fe-BPheid *a*-Komplexe zeichnen sich, ähnlich wie die Ni-BPheid *a*-Komplexe durch unterschiedliches Koordinationsverhalten aus, können aber zusätzlich zwei verschiedene Oxidationsstufen eingehen und μ -oxo-Komplexe bilden. Zur Untersuchung in Lösung wurde Fe-BPheid *a* in Tris/DMF mit Imidazol titriert und mit Na-Dithionit reduziert.

In Tris/DMF liegt das Fe-BPheid *a* als μ -oxo-Komplex vor, mit Absorptionsmaxima bei 342 nm, 391 nm, 596 nm und 763/831 nm. Die Q_y -Bande bildet, wie in MeOH (Kap. C-1.3.2.1), eine breite Doppelbande. Nach der ersten Zugabe von Imidazol (0,048 mM) verändert sich das Absorptionsspektrum in ähnlicher Weise, wie beim Übergang von MeOH in DE, d.h. die breite Doppelbande verschwindet zu Gunsten einer einzelnen breiten Bande bei 803 nm. Durch weitere Imidazolzugabe kam es zu keiner Änderung des Absorptionsspektrums, so dass auch durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 125 mM der μ -oxo-Komplex nicht gespalten werden konnte.

In Kap. C-1.3.2.2 konnte gezeigt werden, dass in CHCl_3 durch Zugabe von Na-Dithionit gleichzeitig eine Spaltung des μ -oxo-Komplexes und eine Reduktion des Fe stattfindet. In Tris/DMF ist allerdings weder eine Spaltung des μ -oxo-Komplexes, noch eine Reduktion mit Na-Dithionit möglich. Der μ -oxo-Komplex ist in diesem Medium sehr stabil.

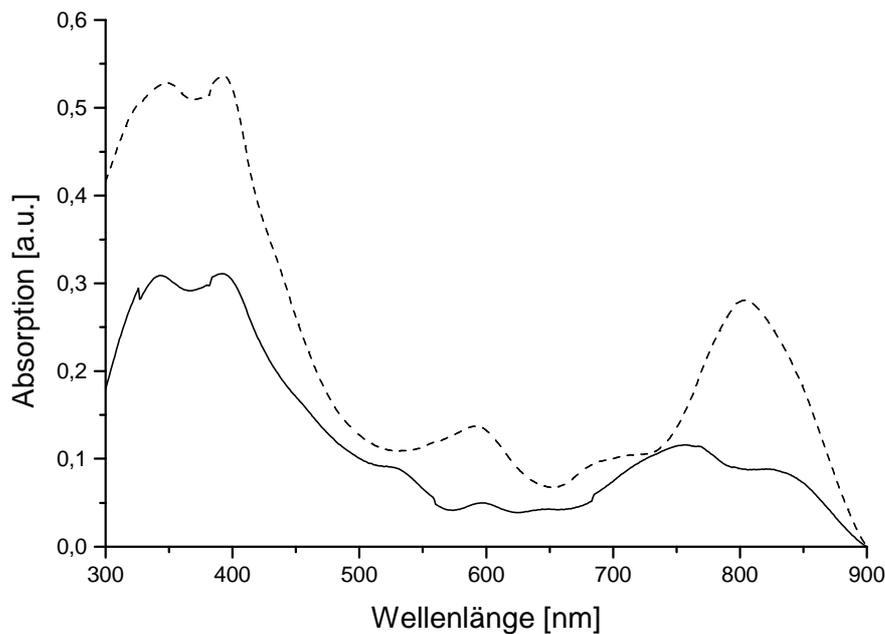


Abb. C-69: Absorptionsspektrum von Fe-BPheid *a* in Tris/DMF (—) und mit 125 mM Imidazol (- - -)

Fe-BPheid <i>a</i>	B _y [nm]	B _x [nm]	Q _x [nm]	Q _y [nm]
In DE (μ-oxo)	333	385	593	827
In DE (monomer)	338	387	523	744
In CHCl ₃ (reduziert)	338	n.a.	570	768
In Tris/DMF (μ-oxo)	342	391	596	763/831 nm
In Tris/DMF/Imidazol (μ-oxo)	348	393	591	803
In Vier-Helix-Bündel-Proteinen	326 - 330	380 - 378	568 - 598	766 - 785

Tab. C-23: Absorptionsbanden der verschiedenen Konformationen von Fe-BPheid *a* in verschiedenen Lösungsmitteln.

Die Absorptionsspektren der Fe-BPheid *a*-MOP-Komplexe zeigen in erster Linie monomeres Fe-BPheid *a* (Abb. C-70). Nur ein geringer Anteil liegt als μ-oxo-Komplex vor (Bande bei ca. 850 nm), ein erheblicher Anteil an Pigment ist zum Fe-[3-Acetyl]-Pheid *a* oxidiert (Bande bei ca. 685 nm). Die Analyse der Lage der Q_y-Bande ergab im Vergleich mit den Reduktionsreaktionen in Lösung (Abb. C-51, Kap.1.3.2.2), dass das Fe-BPheid *a* innerhalb der Proteine reduziert vorliegt. Die gebundene Pigmentmenge ist sehr viel niedriger als bei den Ni- und Zn-Komplexen. Eine Quantifizierung wie für Ni- bzw. Zn-Pheid *a* war mit Fe-BPheid *a* nicht möglich, da es in Tris/DMF als μ-oxo-Komplex vorliegt, der einen anderen

Extinktionskoeffizienten besitzt als das Monomer. Die gebundene Pigmentmenge wurde deshalb nur mittels des Extinktionskoeffizienten von Fe-BPheid in DE geschätzt, und ist aufgrund des unpolareren Lösungsmittels zu hoch. Nach dieser Abschätzung ergab sich ein Fe-BPheid a - MOP-Verhältnis von (0,03 – 0,6) : 1. Die Bindungsstärken, die durch das Waschen mit steigendem DMF-Gehalt getestet wurde, sind aber denen von Ni- und Zn-Komplexen ähnlich, so dass auch hier einige Komplexe ihre Intensität annähernd behalten, viele 30 % Pigment und einige Komplexe über 50 % Pigment verlieren (Tab. C-24).

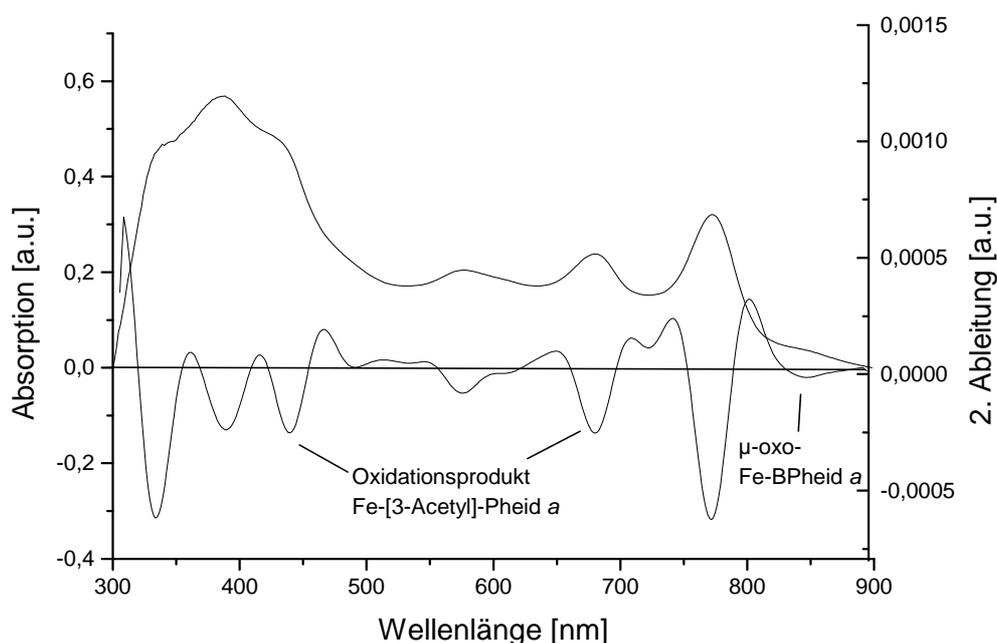


Abb. C-70: Absorptionsspektrum von Fe-BPheid a in dem MOP B₁₁S₁₀ (oben) und seine zweite Ableitung (unten)

Die Lage der Q_x-Bande entspricht nach den Daten aus Kap. C-1.3.2.3 einem Fe^(II)BPheid a mit einer vierfachen Koordination. In der Vier-Helix-Bündel-Proteinen taucht in der zweiten Ableitung eine langwellige Q_x-Bande auf, die im Bereich von 609 – 630 nm liegt und einer sechsfachen Koordination des Zentralmetalls entspricht.

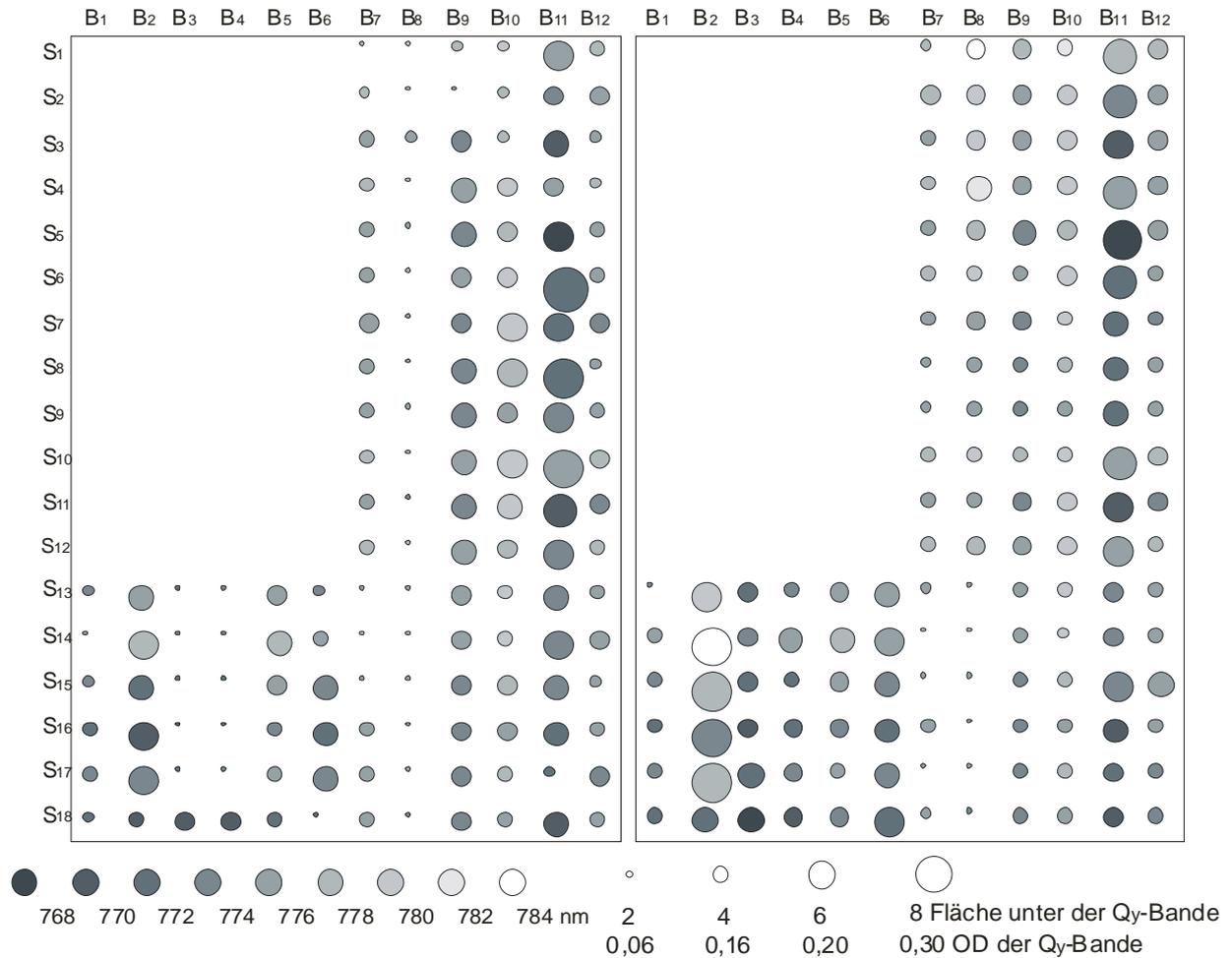


Abb. C-71: Schematische Darstellung der Verschiebung der Q_y -Bande von Fe-BPheid *a* (Graustufen) und der gebundenen Pigmentmenge (Kreisgröße) für alle Spots für die 0. (links) und 1. Waschung (rechts), normiert auf den Maximalwert aller Messungen. Eine 2. Waschung entfiel, da die Membranen zunehmend zerfielen.

	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12	MW	+/-	σ
S01	---	---	---	---	---	---	-30	-19	-50	-254	-14	-7	-62	+/-	87
S02	---	---	---	---	---	---	-77	-10	-227	-46	-43	-387	-132	+/-	134
S03	---	---	---	---	---	---	-17	-96	-6	-102	-20	-216	-76	+/-	73
S04	---	---	---	---	---	---	25	2	26	5	-67	-99	-18	+/-	48
S05	---	---	---	---	---	---	8	11	3	3	-44	-26	-7	+/-	20
S06	---	---	---	---	---	---	-2	15	21	26	21	20	17	+/-	9
S07	---	---	---	---	---	---	36	21	-8	59	13	8	22	+/-	21
S08	---	---	---	---	---	---	28	34	41	58	35	-146	39	+/-	10
S09	---	---	---	---	---	---	38	41	41	39	27	-5	30	+/-	17
S10	---	---	---	---	---	---	10	26	48	52	24	22	30	+/-	15
S11	---	---	---	---	---	---	8	43	30	30	19	-11	20	+/-	17
S12	---	---	---	---	---	---	1	9	32	14	-4	27	13	+/-	13
S13	50	10	18	-21	9	-259	54	28	39	25	9	15	-2	+/-	80
S14	-145	-9	22	7	22	-41	20	35	37	31	37	17	3	+/-	50
S15	-22	-18	21	22	34	24	40	36	36	19	-1	-129	5	+/-	45
S16	4	6	-38	-27	-23	5	14	34	34	23	-1	15	4	+/-	22
S17	9	8	-6	13	19	14	28	15	30	21	-98	16	6	+/-	33
S18	-5	-11	1	19	3	-114	12	35	28	17	15	15	1	+/-	37
MW	-18	-2	3	2	11	-62	11	15	9	1	-5	-43	-8	+/-	41
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	Gesamt-MW Spalten (†) und Reihen (.)		
σ	61	11	21	19	18	100	29	32	62	72	36	107	-7	+/-	32

Tab. C-24: Pigmentverlust von Fe-BPheid a nach der ersten Waschung in %, für jede Spalte (Bindehelix) bzw. Reihe (Abschirmhelix) ist der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung σ unten bzw. rechts angegeben, die Werte insgesamt rechts unten.

4.6.5 Diskussion

Durch die Einlagerung von Fe-BPheid *a* in die Vier-Helix-Bündel-Proteine wurde der in der Inkubationslösung ansonsten sehr stabile μ -oxo-Komplex gespalten und das Zentralmetall Fe reduziert. Im Gegensatz dazu liegt das Fe im Häm in diesen Vier-Helix-Bündel-Proteinen dreiwertig vor (mündl. Mitteilung, Bernhard Monien 2000) und lässt sich erst nach Zugabe von Na-Dithionit reduzieren. Der elektronenärmere Makrozyklus des BChl senkt das Redoxpotential des Fe also erheblich. Ein ähnlicher Effekt wurde von de Groot et al. in Lösung beobachtet, wo bei der Ligation von BChl mit Histidin eine Reduktion beobachtet werden konnte [Soede-Huijbregts et al., 2000].

Da Imidazol bzw. Na-Dithionit in dem Inkubationslösungsmittelgemisch keine Spaltung des μ -oxo-Komplexes oder eine Reduktion bewirken, ist dies auf den Einfluß des Proteins und wahrscheinlich auf eine Koordination mit His zurückzuführen. Außerdem scheint die Reduktion des Fe-BPheid in den Vier-Helix-Bündel-Proteinen eine Oxidation des Fe-BPheid in Lösung stark zu begünstigen.

Bemerkenswert ist, dass sich alle drei untersuchten Pigmente (Ni-, Zn- und Fe-BPheid *a*) trotz ihrer unterschiedlichen Koordination in Intensität und Stabilität der Bindung an die MOP ähneln. Bei allen drei Pigmenten zeichneten sich die MOP mit den Bindehelices B₁₁ und B₁₂ durch geringen Pigmentverlust während der Waschungen und geringe Halbwertsbreite der Q_y-Bande aus.

Auch wenn infolge der Zerstörung der Membranen keine BChl *a*-Bindungsstudien möglich waren, zeigen die Ergebnisse mit den wesentlich stabileren Metall-Komplexen, insbesondere Ni-BPheid *a*, dass eine Selektion auf BChl-Bindungstaschen möglich ist.

D. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war zum Einen die Synthese von neuartigen (Bakterio-)Chlorophyll-Derivaten zur Einlagerung in Proteine und ihre Charakterisierung in Lösung, zum Anderen Bindungsstudien an Komplexen dieser Derivate mit modularen Proteinen und dem Lichtsampler-Komplex 1 aus *Rhodobacter sphaeroides*.

Darstellung von Fe-(Bakterio-)Pheophytinen

Es wurde ein Verfahren etabliert, das die Metallierung von Pheophytin *a*, Bakteriopheophytin *a* und deren Derivate mit Eisen ermöglicht. Die bisher noch nicht beschriebene Darstellung von Fe-Bakteriopheophytin erfolgte nach der Acetat-Methode unter Verwendung von FeCl_2 und lieferte die Produkte in einer Ausbeute von 86 % (für Fe-Phe) bzw. 71 % (für Fe-BPhe). Zusätzlich wurde diese Methode so weit modifiziert und optimiert, dass ausgehend vom Mohrschen Salz auch die Einlagerung von ^{57}Fe möglich ist, wodurch eine Erweiterung der spektroskopischen Methoden (Mößbauer-Spektroskopie) erreicht wird. Da ^{57}Fe ein sehr teures Isotop ist, wurde die Reaktion hinsichtlich des benötigten Fe-Überschusses so weit optimiert, dass er im Fall des Fe-Phe auf 6 %, im Fall des Fe-BPhe auf 10 % der ursprünglichen Menge reduziert werden konnte. Da die Fe-Komplexe nicht mit den für (Bakterio-)Chlorophyll-Derivate etablierten Methoden gereinigt werden können, wurde für diese Komplexe ein neues Chromatographiesystem entwickelt.

Spektroskopische Untersuchung der Fe-(Bakterio-)Pheophytine

Es ist bekannt, dass Fe-Porphyrine leicht zu μ -oxo-Komplexen dimerisieren und das Zentralion in zwei Oxidationsstufen (+2 und +3) vorliegen kann. Die Dimerisierung des Fe-Phe und Fe-BPhe wurde durch Säure-Base-Titration absorptionsspektroskopisch untersucht. Sie ist reversibel und vom Lösungsmittel abhängig. In wässriger, methanolischer oder basischer Lösung liegt das Gleichgewicht auf der Seite des μ -oxo-Komplexes ($(\text{Fe}^{(III)}(\text{B})\text{Phe } a)_2\text{O}$), durch Zugabe von Säure oder starken Liganden, wie Imidazol oder Pyridin kann der μ -oxo-Komplex gespalten werden.

In aerober Lösung liegt das Zentralmetall des Fe-(B)Phe dreiwertig vor ($(\text{Fe}^{(III)}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$). Dieses lässt sich „klassisch“ mit Na-Dithionit zum zweiwertigen $\text{Fe}^{(II)}(\text{B})\text{Phe } a$ reduzieren, aber im Gegensatz zu Fe-Porphyrinen auch allein durch Ligandierung mit Pyridin. Die drei Zustände der Fe-Komplexe ($(\text{Fe}^{(III)}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$, $(\text{Fe}^{(III)}(\text{B})\text{Phe } a)_2\text{O}$ und $\text{Fe}^{(II)}(\text{B})\text{Phe } a$) wurden durch ESR- und Absorptionsspektroskopie charakterisiert.

Die Oxidationsstufen der drei Zustände wurden für ^{57}Fe -Me-Pheid *a* durch Mößbauerspektroskopie bestätigt. $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)\text{Cl}$ und $(\text{Fe}^{(\text{III})}(\text{B})\text{Phe } a)_2\text{O}$ bilden Fe^{3+} -*high spin*-Komplexe, das $\text{Fe}^{(\text{II})}(\text{B})\text{Phe } a$ einen Fe^{2+} -*low spin*-Komplex. Die Mößbauerspektren ähneln denen von Fe-Porphyrinen, allerdings enthalten sie aufgrund der sehr intensiven Spektren des Monomer-Dimer-Gleichgewichts immer dessen Beiträge.

Einlagerung von Fe-Bakteriopheophytin *a* in LH1 von *Rhodobacter sphaeroides*

Zur Untersuchung, ob Fe-BPhe von BChl-Bindungstaschen akzeptiert wird, wurde versucht Fe-BPhe ins LH1 von *Rb. sphaeroides* einzulagern. Die Rekonstitution erfolgte nach der von Fiedor et al. für Ni-BPhe etablierten Methode, die Charakterisierung der Komplexe mit Hilfe von Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten zwar auf einen Einbau von Fe-BPhe hin, allerdings nur in sehr geringem Maß. Zur Quantifizierung des Fe-BPhe-Gehalts wurden verschiedene Methoden getestet. Der einfachste und vielversprechendste Weg war die Differenzabsorptionsspektroskopie, bei der die unterschiedliche Absorption von μ -oxo-Dimer und Monomer des Fe-BPhe ausgenützt wird.

Darstellung von Formyl-(Bakterio-)Chlorophyll-Derivaten

Eine kovalente Bindung von Chlorophyll-Derivaten an synthetische Peptide ist durch die Kopplung von Formyl-Gruppen mit einem modifizierten Lysin-Rest unter Bildung eines Oxims möglich. Ein natürliches Pigment mit einer Formyl-Gruppe an Position C-7 ist das Chl *b*. Ausgehend von der von Fischer-Drsek [Fischer-Drsek, 1995] entwickelten Reaktion zur Bildung einer 3-Formyl-Gruppe durch oxidative Spaltung des C-3-Vinyl des Chl *a* mit Ozon wurde diese Methode zur Synthese von größeren Mengen [3-Formyl]-Me-Pheid *a* verwendet. Ebenfalls mit Ozon konnte die Phetyl-Doppelbindung von Phe *a* unter Bildung des Ethanal-Pheid *a* erreicht werden. Somit stehen insgesamt drei Chlorophyll-Derivate für die kovalente Bindung an synthetische Peptide zur Verfügung, welche die Formyl-Gruppen an verschiedenen Positionen tragen, wodurch eine unterschiedliche Orientierung der Pigmente im Protein erreicht werden kann.

Durch Reduktion und anschließende Dehydratisierung lässt sich die 3-Acetyl-Gruppe des BChl *a* in eine 3-Vinyl-Gruppe umwandeln. Es wurde versucht, diese in Analogie zum Phe *a* mit Ozon zu spalten. In Folge der leichten Oxidation des Makrozyklus lieferte diese Reaktion das Zielprodukt [3-Formyl]-Me-BPheid *a* nur in äußerst geringen Mengen, so dass diese Methode für die präparative Synthese dieser Verbindung nicht geeignet ist.

Nicht-kovalente Bindung von [M]-BPheid (M = Ni, Zn, Fe) in synthetische modulare Proteine (MOP)

Ni-, Zn-, und Fe-BPhe wurden auf ihre Komplexbildung mit 216 verschiedenen, synthetischen Vier-Helix-Bündel-Proteinen untersucht, welche abwechselnd und in antiparalleler Anordnung modelliert und synthetisiert wurden (Synthese und Modellierung durch B. Monien, AG Prof. W. Haehnel, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg). Die [M]-BPheid-MOP-Komplexe wurden absorptionspektroskopisch auf die Stärke der Bindung, die Koordination des Zentralmetalls und auf die Hydrophobizität der Umgebung untersucht. Zur Abschätzung der Größe dieser Parameter wurden sie auch für [M]-BPheid in Lösung untersucht. Alle MOP binden [M]-BPheid in sehr unterschiedlichem Maße. Stärke und Art der Bindung werden in erster Linie durch die Bindehelix bestimmt. Eine quantitative Modulation findet allerdings auch durch die Abschirmhelix statt.

Ni-BPheid zeigt in den Komplexen drei mögliche Koordinationszustände ($n_c = 4, 5, 6$). Eine hohe Koordinationszahl geht immer mit einer stabilen Bindung und einer schmalen Q_y -Bande (d.h. unpolare Umgebung oder geringe Heterogenität) einher. Zn-BPheid ist in allen Komplexen fünffach koordiniert, das Fe-BPheid vierfach. Qualitativ zeigen alle drei Pigmente ein gleiches Muster in Bezug auf das Bindungsverhalten, so dass ausgehend von Häm-Bindungstaschen die Bildung von BChl-Bindungstaschen bestätigt werden konnte. Quantitativ konnte eine Selektivität gegenüber dem Zentralmetall festgestellt werden, insbesondere wurden Ni- und Zn-BPheid besser als Fe-BPheid gebunden. Fe-BPheid wurde durch die Bindung im MOP reduziert, das Dimere dissoziiert. Die Pigmente wurden durch die Bindung im Protein stabilisiert und im Falle des Fe-BPheid gegen Oxidation zum Chlorin geschützt. Dagegen oxidiert sechsfach-koordiniertes Ni-BPheid sehr leicht.

E. Literaturverzeichnis

- Aagaard, J. und Sistrom, W. R. (1972) Control of Synthesis of Reaction Center Bacteriochlorophyll in Photosynthetic Bacteria. *Photochem. Photobiol.*, **15**, 209-225.
- Adar, F. (1978) Electronic Absorption Spectra of Hemes and Hemoproteins. In *The Porphyrins* Vol. 3, Dolphin, D. (Hrsg.) Academic Press, New York, S. 167-209.
- Adar, F., Gouterman, M., Aronowitz, S. (1976) Fluorescence, Resonance Raman and Radiationless Decay in Several Hemoproteins. *J. Phys. Chem.*, **80**, 2184-2191.
- Akiyama, M., Miyashita, H., Kise, H., Watanabe, T., Miyachi, S., Kobayashi, M. (2001) Detection of Chlorophyll *d* and Pheophytin *a* in a Chlorophyll *d*-Domination Oxygenic Photosynthetic Prokaryote *Acaryochloris marina*. *Anal. Sci.*, **17**, 205-208.
- Al-Jaff, G., Silver, J., Wilson, M. T. (1990) Studies on the Binding of Nitrogenous Bases to Protoporphyrin IX Iron(II) in Aqueous Solution at High pH Values. Part I. Pyridine and Imidazole Ligands. *Inorg. Chim. Acta*, **176**, 307-316.
- Alben, J. O., Fuchsman, W. H., Beaudreau, C. A., Caughey, W. S. (1968) Substituted Deuteroporphyrins. III. Iron(II) Derivatives. Reaction with Oxygen and Preparation from Chloro- and Methoxohemins. *Biochemistry*, **7**, 624.
- Alden, R. G., Johnson, E., Nagarajan, V., Parson, W. W., Law, C. J., Cogdell, R. G. (1997) Calculations of Spectroscopic Properties of the LH2 Bacteriochlorophyll: Protein Antenna Complex from *Rhodospseudomonas acidophila*. *J. Phys. Chem.*, **101**, 4667-4680.
- Allison, J. B. und Becker, R. S. (1960) Effect of Metal Atom Perturbations on the Luminescent Spectra of Porphyrins. *J. Chem. Phys.*, **32**, 1410-1417.
- Antipas, A., Buchler, J. W., Gouterman, M., Smith, P. D. (1978) Porphyrins 36. Synthesis and Optical and Electronic Properties of Some Ruthenium and Osmium Octaethylporphyrins. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3015-3024.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Faraone-Mennella, J., Rosato, A., Barker, P. D., Fersht, A. R. (1999) The Solution Structure of Oxidized *Escherichia coli* Cytochrome b562. *Biochemistry*, **38**, 8657-8670.
- Ashur, I., Brandis, A., Greenwald, M., Scheer, H., Vakrat-Haglili, Y., Meirovitz, I., Scherz, A. (im Druck) Control of Redox Transitions and Oxygen Species Binding in Mn Centers by Biologically Significant Ligands: Model Studies with [Mn]-Bacteriochlorophyll *a*. *J. Am. Chem. Soc.*

- Atkins, P. W. (1990) *Physikalische Chemie*. 2. Aufl. VCH Verlag, Weinheim, Basel, Cambridge, New York, S. 475-488.
- Bandilla, M. (1995) Rekonstitution der Antennen B875 und B800-850 aus *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. mit Eintausch chemisch modifizierter (Bakterio-)Chlorophylle. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bandilla, M., Ücker, B., Ram, M., Simonin, I., Gelhaye, E., McDermott, G., Cogdell, R., Scheer, H. (1998) Reconstitution of the B800 Bacteriochlorophylls in the Peripheral Light Harvesting Complex B800-850 of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. with BChl a and Modified (Bakterio-)chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 390-402.
- Belew, J. S. (1969) Ozonization. In *Oxidation 1, Techniques and Applications in Organic Synthesis*. Augustine, L. R. (Hrsg.) Marcel Dekker, New York, S. 259-335.
- Boonstra, A. F., Germeroth, L., Boekema, E. J. (1994) Structure of the Light Harvesting Antenna from *Rhodospirillum rubrum* Studied by Electron Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **1184**, 227-234.
- Boonstra, A. F., Visschers, R. W., Calkoen, F., van Grondelle, R., van Bruggen, E. F. J., Boekema, E. J. (1993) Structural Characterization of the B800-850 and B875 Light-Harvesting Antenna Complexes from *Rhodobacter sphaeroides* by Electron Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1142**, 181-188.
- Boucher, L. J. und Katz, J. J. (1967) Aggregation of Metallochlorophylls. *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 4703-4708.
- Boxer, S. G., Kuki, A., Wright, K. A., Katz, B. A., Xuong, N. H. (1982) Oriented Properties of the Chlorophylls: Electronic Absorption Spectroscopy of Orthorhombic Pyrochlorophyllide *a*-Apomyoglobin Single Crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1121-1125.
- Braun, P., Olsen, J. D., Strohmann, B., Hunter, C. N., Scheer, H. (2002) Assembly of Light-Harvesting Bacteriochlorophyll in a Model Transmembrane Helix in its Natural Environment. *J. Mol. Biol.*, **318**, 1085-1095.
- Braun, P. und Scherz, A. (1991) Polypeptides and Bacteriochlorophyll Organization in the Light Harvesting Complex B850 of *Rhodobacter sphaeroides* R-26.1. *Biochemistry*, **30**, 5177-5184.
- Brereton, R. G., Rahmani, A., Liang, Y., Kvalheim, O. M. (1994) Investigation of the Allomerization Reaction of Chlorophyll *a*: Use of Diode Array HPLC, Mass Spectrometry and Chemometric Factor Analysis for the Detection of Early Products. *Photochem. Photobiol.*; **59**, 99-110.
- Brereton, R. G. und Sanders, J. K. M. (1983a) Bacteriochlorophyll *a*: Influence of Axial Coordination on Reactivity and Stability. Design of an Improved Extraction Procedure. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2**, 431-434.
- Brereton, R. G. und Sanders, J. K. M. (1983b) Coordination and Aggregation of Bacteriochlorophyll *a*: an NMR and Electronic Absorption Study. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2**, 423-430.

- Bryson, J. W., Betz, S. F., Lu, H. S., Suich, D. J., Zhou, H. X., O'Neil, K. T., DeGrado, W. F. (1995) Protein Design: a Hierarchic Approach. *Science*, **270**, 935-941.
- Bryson, J. W., Desjarlais, J. R., Handel, T. M., DeGrado, W. F. (1998) From Coiled Coils to Small Globular Proteins: Design of a Native-like Three-Helix Bundle. *Protein Sci.*, **7**, 1404-1414.
- Buchler, J. W. (1975) Static Coordination Chemistry of Metalloporphyrins. In *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Smith, K. M (Hrsg.) Elsevier, Amsterdam, S. 157-232.
- Buchler, J. W. und Schneehage, H. H. (1973) Zweikernige Eisen- und Scandium-Porphyrine des Typs μ -Oxo-bis[octaäthylporphinatometall(III)]. *Z. Naturforsch.*, **28b**, 433-439.
- Carrell, C. J., Schlarb, B. G., Bendall, D. S., Howe, C. J., Cramer, W. A., Smith, J. L. (1999) Structure of the Soluble Domain of Cytochrome *f* from the Cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochemistry*, **38**, 9590-9599.
- Chen, L. X., Wang, Z., Hartwich, G., Katheder, I., Scheer, H., Scherz, A., Montano, P. A., Norris, J. R. (1995) An X-ray Absorption Study of Chemically Modified Bacterial Photosynthetic Reaction Centers. *Chem. Phys. Lett.*, **234**, 437-444.
- Chen, R.-J., Latos-Grazynski, L., Balch, A. L. (1982) Preparation and Characterization of Some Hydroxy Complexes of Iron(III) Porphyrins. *Inorg. Chem.*, **21**, 2412-2418.
- Chin, D.-H., La Mar, G. N., Balch, A. L. (1980) On the Mechanism of Autoxidation of Iron(II) Porphyrins. Detection of a Peroxo-Bridged Iron(III) Porphyrin Dimer and the Mechanism of Its Thermal Decomposition to the Oxo-Bridged Iron(III) Porphyrin Dimer. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4344-4350.
- Cohen, I. A. (1969) The Dimeric Nature of Hemin Hydroxides. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1980-1983.
- Collman, J. P., Brauman, J. I., Rose, E., Suslick, K. S. (1978) Cooperativity in Oxygen Binding to Iron Porphyrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1053-1055.
- Criegee, R. (1975) Mechanism of ozonolysis. *Angew. Chem.*, **87**, 765-771.
- Davis, C. M., Bustamante, P. L., Loach, P. A. (1995) Reconstitution of the Bacterial Core Light-Harvesting Complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* with Isolated α - and β -Polypeptides, Bacteriochlorophyll *a*, and Carotenoid. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5793-5804.
- Davis, C. M., Parkes-Loach, P. S., Cook, C. K., Meadows, K. A., Bandilla, M., Scheer, H., Loach, P. A. (1996) Comparison of the Structural Requirements for Bacteriochlorophyll Binding in the Core Light-Harvesting Complexes of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter sphaeroides* Using Reconstitution Methodology with Bacteriochlorophyll Analogs. *Biochemistry*, **35**, 3072-3084.
- DeGrado, W. F. (1997) Protein Design: Proteins from Scratch. *Science*, **278**, 80-81.

- Dickerson, R. E., Kendrew, J. C., Strandberg, B. E. (1961) The Crystal Structure of Myoglobin: Phase Determination to a Resolution of 2 Å. by the Method of Isomorphous Replacement. *Acta Cryst. A*, **14**, 1188-1195.
- Ditson, S. L., Davis, R. C., Pearlstein, R. M. (1984) Relative Enrichment of P-870 in Photosynthetic Reaction Centers Treated with Sodium-Borohydride. *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 623-629.
- Dudkowiak, A., Nakamura, C., Arai, T., Miyake, J. (1998) Interactions of Chlorophyll a with Synthesized Peptide in Aqueous Solution. *J. Photochem. Photobiol., B*, **45**, 43-50.
- Epstein, L. M., Straub, D. K., Maricondi, C. (1967) Mößbauer Spectra of Some Porphyrin Complexes with Pyridine, Piperidine and Imidazole. *Inorg. Chem.*, **6**, 1720-1724.
- Fiedor, L., Scheer, H., Hunter, N. C., Tschirschwitz, F., Voigt, B., Ehlert, J., Nibbering, E., Leupold, D., Elsässer, T. (2000) Introduction of a 60 fs Deactivation Channel in the Photosynthetic Antenna LH1 by Ni-Bacteriopheophytin a. *Chem. Phys. Lett.*, **319**, 145-152.
- Fiedor, L., Leupold, D., Teuchner, K., Voigt, B., Hunter, C. N., Scherz, A., Scheer, H. (2001) Excitation Trap Approach to Analyze Size and Pigment-Pigment Coupling: Reconstitution of LH1 Antenna of *Rhodobacter sphaeroides* with Ni-Substituted Bacteriochlorophyll. *Biochemistry*, **40**, 3737-3747.
- Fischer-Drsek, R. (1995) Chlorophyllabbau in Seidenraupen (*Bombyx mori* L.): Beiträge zur Strukturaufklärung der prosthetischen Gruppe eines rot fluoreszierenden Chromoproteins. Dissertation, Université de Fribourg (Schweiz).
- Fischer, H., Treibs, A., Zeile, K. (1931) The Porphyrins. XXVII. The Mechanism of Iron Introduction into Porphyrins and Isolation of Crystalline Hemes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **20**, 195-199.
- Fleischer, E. B. und Wang, J. H. (1960) Detection of a Type of Reaction Intermediate in the Combination of Metal Ions with Porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3498-3502.
- Fowler, G. J. S., Hess, S., Pullerits, T., Sundström, V., Hunter, C. N. (1997) The Role of β Arg₁₀ in the B800 Bacteriochlorophyll and Carotenoid Pigment Environment within the Light-Harvesting LH2 Complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, **36**, 11282-11291.
- Francia, F., Wang, J., Venturoli, G., Melandri, B. A., Barz, W. P., Oesterhelt, D. (1999) The Reaction Center-LH1 Antenna Complex of *Rhodobacter sphaeroides* Contains one PufX Molecule which is Involved in Dimerization of this Complex. *Biochemistry*, **38**, 6834-6845.
- Frank, R. (1992) Spot-Synthesis: An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support. *Tetrahedron*, **48**, 9217-9232.
- Frese, R. N., Olsen, J. D., Branvall, R., Westerhuis, W. H. J., Hunter, C. N., van Grondelle, R. (2000) The Long-Range Supraorganization of the Bacterial Photosynthetic Unit: A Key Role for PufX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5199-5202.

- Fuhrhop, J. H. und Lehmann, T. (1984) Metalloporphyrins in Polymeric Matrices, Micelles, and Vesicles. VI. Hydrophobic and Hydrophilic Derivatives of 3,8-Diformyldeuteroporphyrin Dimethyl Ester and their Interaction with Vesicles. *Liebigs Ann. Chem.*, **6**, 1057-1067.
- Furuya, K., Inoue, H., Shirai, T. (1987) Determination of Pheophytinatoiron(III) Chlorides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Sci.*, **3**, 353-357.
- Gall, B. (1997) Untersuchungen zur Modifikation der Chlorin-Kofaktoren in isolierten Reaktionszentren von Photosystem II. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Galla, H.-J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 46-97.
- Gauglitz, G. (1986) Elektronenspektroskopie. In *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. Naumer, H. and Heller, W. (Hrsg.) 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 192-209.
- Ghosh, R., Rosatzin, T., Bachofen, R. (1988) Subunit Structure and Reassembly of the Light-Harvesting Complex form *Rhodospirillum rubrum* G9+. In *Photosynthetic Light-harvesting Systems, Organization and Function*. Scheer, H. and Schneider, S. (Hrsg.) Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 93-102.
- Gibney, B. R., Rabanal, F., Dutton, P. L. (1997) Synthesis of Novel Proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 537-542.
- Goutermann, M. (1978) Optical Spectra and Electronic Structure of Porphyrins and Related Rings. In *The Porphyrins* Vol. 3, Dolphin, D (Hrsg.) Academic Press, New York, S. 1-165.
- Hambright, P. (1975) Dynamic Coordination Chemistry of Metalloporphyrins. In *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Smith, K. M. (Hrsg.) Elsevier, Amsterdam, S. 233-277.
- Hanson, L. K. (1991) Molecular Orbital Theory of Monomer Pigments. In *Chlorophylls*. Scheer, H. (Hrsg.) CRC Press, Boca Raton, S. 993-1014.
- Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S., Alber, T. (1993) A Switch Between Two-, Three-, and Four-Stranded Coiled Coils in GCN4 Leucine Zipper Mutants. *Science*, **262**, 1401-1407.
- Hartwich, G. (1994) Dynamik des Elektrontransfers in Reaktionszentren photosynthetischer Bakterien: Beeinflussung durch gezielten Pigment austausch. Dissertation, Technische Universität München.
- Hartwich, G., Friese, M., Scheer, H., Ogrodnik, A., Michel-Beyerle, M. E. (1995) Ultrafast internal conversion in 13(2)-OH-Ni-bacteriochlorophyll in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26. *Chem. Phys.*, **197**, 423-434.
- Hartwich, G., Fiedor, L., Simonin, I., Cmiel, E., Schaefer, W., Noy, D., Scherz, A., Scheer, H. (1998) Metal-Substituted Bacteriochlorophylls. 1. Preparation and Influence of Metal and Coordination on Spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3675-3683.

- Hasegawa, J., Ozeki, Y., Ohkawa, K., Hada, M., Nakatsuji, H. (1998) Theoretical Study of the Excited States of Chlorin, Bacteriochlorin, Pheophytin a, and Chlorophyll a by the SAC/SAC-CI Method. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 1320-1326.
- Hauksson, J. B., La Mar, G. N., Pandey, R. K., Rezzano, I. N., Smith, K. M. (1990) NMR Study of Heme Pocket Polarity/Hydrophobicity of Myoglobin Using Polypropionate-Substituted Hemins. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 8315-8323.
- Helfrich, M. (1995) Chemische Modifikation von Chlorophyll-Vorstufen und deren Verwendung zur Charakterisierung von Enzymen der Chlorophyll-Biosynthese. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Helfrich, M., Schoch, S., Lempert, U., Cmiel, E., Rudiger, W. (1994) Chlorophyll Synthetase Cannot Synthesize Chlorophyll a'. *Eur. J. Biochem.*, **219**, 267-275.
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (1991) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 4. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 201-208.
- Hori, H., Kadono, K., Fukuda, K., Inoue, H., Shirai, T., Fluck, E. (1990) Mössbauer Spectroscopic Studies of (Peophytin)iron Complexes with Pyridine and Substituted Pyridines. *Radiochim. Acta*, **49**, 77-82.
- Hu, X., Damijanovic, A., Ritz, T., Schulten, K. (1998) Architecture and Mechanism of the Light-Harvesting Apparatus of Purple Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5935-5941.
- Hu, X. und Schulten, K. (1998) Model for the Light-Harvesting Complex I (B875) of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.*, **75**, 683-694.
- Huheey, J. E. (1988) *Anorganische Chemie, Prinzipien von Struktur und Reaktivität*. 1. Aufl. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, S. 78-79, 158.
- Iakovleva, O., Reiner, M., Rau, H., Haehnel, W., Parak, F. (2002) Moessbauer and EPR Study of a Cytochrome b Model. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 655-660.
- Inhoffen, H. H., Buchler, J. W., Thomas, R. (1969) Chlorophyll and Hemin. XXV. 3,4,7,8-Tetrahydrooctaethylporphine (Bacteriooctaethylchlorine). *Tetrahedron Lett.*, **14**, 1141-1144.
- Ivancich, A., Artz, K., Williams, J. C., Allen, J. P., Mattioli, T. A. (1998) Effects of Hydrogen Bonds on the Redox Potential and Electronic Structure of the Bacterial Primary Electron Donor. *Biochemistry*, **37**, 11812-11820.
- Jimenez, R., Dikshit, S. N., Bradforth, S. E., Fleming, G. R. (1996) Electronic Excitation Transfer in the LH2 Complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Phys. Chem.*, **100**, 6825-6834.
- Jones, M. R., Fowler, G. J. S., Gibson, L. C. D., Grief, G. G., Olsen, J., Crielaard, W., Hunter, C. N. (1992) Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* Lacking One or More Pigment-Protein Complexes and Complementation with Reaction-Center, LH1, and LH2 Genes. *Mol. Microbiol.*, **6**, 1173-1184.

- Jungas, C., Ranck, J.-L., Rigaud, J.-L., Joliot, P., Vermeiglio, A. (1999) Supramolecular Organization of the Photosynthetic Apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *EMBO J.* **18**, 534-542.
- Kadono, K., Hori, H., Fukuda, K., Inoue, H., Shirai, T., Fluck, E. (1992) Spectroscopic Characterization of Iron Complexes of Methyl Pheophorbide with Pyridine and Its Derivatives. *Inorg. Chim. Acta*, **201**, 213-218.
- Kammhuber, N. (1999) Bakteriochlorophyll-Derivate als neuartige Sensibilisatoren für die Photodynamische Therapie von Tumoren: Darstellung und Screening. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Karrasch, S., Bullough, P. A., Ghosh, R. (1995) The 8.5 Å Projection Map of the Light-Harvesting Complex I from *Rhodospirillum rubrum* Reveals a Ring Composed of 16 Subunits. *EMBO J.*, **14**, 631-638.
- Kashiwada, A., Nishino, N., Wang, Z.-Y., Nozawa, T., Kobayashi, M., Nango, M. (1999) Molecular Assembly of Bacteriochlorophyll *a* and Its Analogues by Synthetic 4- α -Helix Polypeptides. *Chem. Lett.*, **12**, 1301-1302.
- Kashiwada, A., Takeuchi, Y., Watanabe, H., Mizuno, T., Yasue, H., Kitagawa, K., Iida, K., Wang, Z.-Y., Nozawa, T., Kawai, H., Nagamura, T., Kurono, Y., Nango, M. (2000) Molecular Assembly of Covalently-Linked Mesoporphyrin Dimers with Light-Harvesting Polypeptides. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 2115-2119.
- Katterle, M. (2001) Entwicklung von artifiziellen selbstorganisierenden Antennen-/Elektronentransfer-Einheiten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Katz, J. J., Norris, J. R., Shipman, L. L., Thurnauer, M. C., Wasielewski, M. R. (1978) Chlorophyll Function in the Photosynthetic Reaction Center. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**, 393-434.
- Katz, J. J., Oettmeier, W., Norris, J. R. (1976) Organization of Antenna and Photo-Reaction Centre Chlorophylls on the Molecular Level. *Phil. Trans. Roy Soc.*, **273**, 227-253.
- Katz, J. J., Shipman, L. L., Cotton, T. M., Janson, T. R. (1978) Chlorophyll Aggregation: Coordination Interactions in Chlorophyll Monomers, Dimers and Oligomers. In *The Porphyrins* Vol. 5, Dolphin, D. (Hrsg.) Academic Press, New York, S. 402-458.
- Ketelaars, M., van Oijen, A. M., Matsushita, M., Kohler, J., Schmidt, J., Aartsma, T. J. (2001) Spectroscopy on the B850 Band of Individual Light-Harvesting 2 Complexes of *Rhodopseudomonas acidophila*. I. Experiments and Monte Carlo Simulations. *Biophys. J.*, **80**, 1591-1603.
- Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S., Rudiger, W. (1999) Pigment-free NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductase from *Avena sativa* L: Purification and Substrate Specificity. *Eur. J. Biochem.*, **265**, 862-874.
- Kobayashi, M., Akiyama, M., Yamamura, M., Kise, H., Takaichi, S., Watanabe, T., Shimada, K., Iwaki, M., Itoh, S., Ishida, N., Koizumi, M., Kano, H., Wakao, N., Hiraishi, A. (1998) Structural Determination of the Novel Zn-Containing Bacteriochlorophyll in *Acidiphilium rubrum*. *Photochem. Photobiol.*, **20**, 75-80.
- Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K., Michel, H. (1996) The Crystal Structure of the Light-Harvesting Complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*. *Structure*, **4**, 581.

- Kuki, A. und Boxer, S. G. (1983) Chlorophyllide-Substituted Hemoglobin Tetramers and Hybrids: Preparation, Characterization, and Energy Transfer. *Biochemistry*, **22**, 2923-2933.
- Kurtz, D. M. jr. (1990) Oxo- and Hydroxo-Bridged Diiron Complexes: A Chemical Perspective on a Biological Unit. *Chem. Rev.*, **90**, 585-606.
- Lapouge, K., Naeveke, A., Robert, B., Scheer, H., Sturgis, J. N. (2000) Exchanging Cofactors in the Core Antennae from Purple Bacteria: Structure and Properties of Zn-Bacteriopheophytin-Containing LH1. *Biochemistry*, **39**, 1091-1099.
- Laue, T. und Plagens, A. (1994) *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*. Teubner Studienbücher Chemie. Elschenbroich, C., Hensel, F., and Hopf, H. (Hrsg.) 1. Aufl. B. G. Teubner, Stuttgart, S. 243-245.
- Levi, P. (1987) *Das periodische System*. 1. Aufl. Carl Hanser Verlag, München, S. 244-245.
- Limantara, L., Sakamoto, S., Koyama, Y., Nagae, H. (1997) Effects of Nonpolar and Polar Solvents on the Q_x and Q_y Energies of Bacteriochlorophyll *a* and Bacteriopheophytin *a*. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 330-337.
- Loach, P. A. und Parkes-Loach, P. S. (1995) Structure-Function Relationships in Core Light-Harvesting Complexes (LHI) as Determined by Characterization of the Structural Subunit and by Reconstitution Experiments. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Blankenship, R., Madigan, M. T., and Bauer, C. E. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 437-471.
- Ma, J. G., Zhang, J., Franco, R., Jia, S. L., Moura, I., Moura, J. J. G., Kroneck, P. M. H., Shelnut, J. A. (1998) The Structural Origin of Nonplanar Heme Distortions in Tetraheme Ferricytochromes *c*(3). *Biochemistry*, **37**, 12431-12442.
- Manning, W. M. und H. H. Strain (1943) Chlorophyll *d*, a Green Pigment of Red Algae. *J. Biol. Chem.*, **151**, 1-19.
- March, J. (1992) *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure*. 4. Aufl. John Wiley & Sons, New York, S. 822-823, 1174.
- Maricondi, C., Straub, D. K., Epstein, L. M. (1972) Moessbauer studies on Hemin Derivatives of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4157-4159.
- Maricondi, C., Swift, W., Straub, D. K. (1969) Thermomagnetic Analysis of Hemin and Related Compounds. *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 5205-5210.
- Masuda, T., Inoue, K., Masuda, M., Nagayama, M., Tamaki, A., Ohta, H., Shimada, H., Takamiya, K. (1999) Magnesium Insertion by Magnesium Chelatase in the Biosynthesis of Zinc Bacteriochlorophyll *a* in an Aerobic Acidophilic Bacterium *Acidiphilium Rubrum*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33594-33600.
- Matsushita, M., Ketelaars, M., van Oijen, A. M., Kohler, J., Aartsma, T. J., Schmidt, J. (2001) Spectroscopy on the B850 Band of Individual Light-Harvesting 2 Complexes of *Rhodospseudomonas acidophila*. II. Exciton States of an Elliptically Deformed Ring Aggregate. *Biophys. J.*, **80**, 1604-1614.

- McDermott, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite-Lawless, A. M., Papiz, M. Z., Cogdell, R. J., Isaacs, N. W. (1995) Crystal Structure of an Integral Membrane Light-Harvesting Complex from Photosynthetic Bacteria. *Nature*, **374**, 517-521.
- Mcglynn, P., Hunter, C. N., Jones, M. R. (1994) The *Rhodobacter sphaeroides* PufX Protein is not Required for Photosynthetic Competence in the Absence of a Light Harvesting System. *FEBS Lett*, **349**, 349-353.
- McLuskey Karen, Prince Stephen M, Cogdell Richard J, Isaacs Neil W {a} (1999) Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of the B800-820 Light-Harvesting Complex from *Rhodospseudomonas acidophila* Strain 7050. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography.*, **55**, 885-887.
- Meadows, K. A., Iida, K., Tsuda, K., Recchia, P. A., Heller, B. A., Antonio, B., Nango, M., Loach, P. A. (1995) Enzymatic and Chemical Cleavage of the Core Light-Harvesting Polypeptides of Photosynthetic Bacteria: Determination of the Minimal Polypeptide Size and Structure Required for Subunit and Light-Harvesting Complex Formation. *Biochemistry*, **35**, 1559-1574.
- Meadows, K. A., Parkes-Loach, P. S., Kehoe, J. W., Loach, P. A. (1998) Reconstitution of Core Light-Harvesting Complexes of Photosynthetic Bacteria Using Chemically Synthesized Polypeptides. 1. Minimal Requirements for Subunit Formation. *Biochemistry*, **37**, 3411-3417.
- Melchers, B., Knapp, E. W., Parak, F., Cordone, L., Cupane, A., Leone, M. (1996) Structural Fluctuations of Myoglobin from Normal-Modes Mössbauer-, Raman-, and Absorption Spectroscopy. *Biophys. J.*, **70**, 2092-2099.
- Meyer, M. (1997) Pigment-modifizierte Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides* R26.1. Einfluß von Tetrapyrrol-Derivaten in den Bindungstaschen H_{A,B} auf die Absorptionseigenschaften, den Ladungstransfer und die Struktur. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Miyake, J., Kusumi, T., Dudkowiak, A., Goc, J., Frackowiak, D. (1998) The Interactions Between Bacteriochlorophyll *c* and Amphiphilic Peptides. *J. Photochem. Photobiol., A*, **116**, 147-151.
- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M., Miyachi, S. (1996) Chlorophyll *d* as a Major Pigment. *Nature*, **383**, 402-407.
- Moog, R. S., Kuki, A., Fayer, M. D., Boxer, S. G. (1984) Excitation Transport and Trapping in a Synthetic Chlorophyllide Substituted Hemoglobin: Orientation of the Chlorophyll S₁ Transition Dipole. *Biochemistry*, **23**, 1564-1571.
- Morris, Z. S., Laible, P. D., Pokkuluri, P. R., Mets, D. G., Hata, A. N., Poluektov, O. G., Thurnauer, M. C., Schiffer, M., Hanson, D. K. (2003) Lysine Substitutions Near Photoactive Cofactors in the Bacterial Photosynthetic Reaction Center Have Opposite Effects on the Rate of Triplet Energy Transfer. (*eingereicht*).
- Murray, K. S. (1974) Binuclear Oxo-bridged Iron(III) Complexes. *Coord. Chem. Rev.*, **12**, 1-35.
- Musewald, C., Gilch, P., Hartwich, G., Poellinger-Dammer, F., Scheer, H., Michel-Beyerle, M. (1999a) Magnetic Field Dependence of Ultrafast Intersystem-Crossing: A Triplet Mechanism on the Picosecond Time Scale? *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8876-8881.

- Musewald, C., Hartwich, G., Lossau, H., Gilch, P., Poellinger-Dammer, F., Scheer, H., Michel-Beyerle, M. E. (1999b) Ultrafast Photophysics and Photochemistry of [Ni]-Bacteriochlorophyll *a*. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 7055-7060.
- Mutter, M., Altmann, E., Altmann, K.-H., Hersperger, R., Koziej, P., Nebel, K., Tuchscherer, G., Vuilleumier, S., Gremlich, H.-U., Müller, K. (1988) The Construction of New Proteins. Artificial Folding Units by Assembly of Amphiphilic Secondary Structures on a Template. *Helv. Chim. Acta*, **71**, 835-847.
- Mutter, M. und Vuilleumier, S. (1989) A Chemical Approach to Protein Design - Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 535-554.
- Nango, M., Kashiwada, A., Watanabe, H., Yamada, S., Tanaka, T. (1998) Molecular Assembly of Bacteriochlorophylls by Light-Harvesting Model Polypeptides. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 11th. Garab, G. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 93-96.
- Noy, D., Brumfeld, V., Ashur, I., Scheer, H., Scherz, A. (1999) Ground and Excited State Spectroscopy of Nickel-Substituted Bacteriochlorophyll at Three Coordination States. (*eingereicht*).
- Noy, D., Brumfeld, V., Ashur, I., Yerushalmi, R., Scheer, H. (1998) Axial Ligand Coordination and Photodissociation of Nickel Substituted Bacteriochlorophyll *a*. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 11th. Garab, G. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 4225-4228.
- Noy, D., Yerushalmi, R., Brumfeld, V., Ashur, I., Scheer, H., Baldrige, K. K., Scherz, A. (2000) Optical Absorption and Computational Studies of [Ni]-Bacteriochlorophyll-*a*. New Insight Into Charge Distribution Between Metal and Ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3937-3944.
- Noy, D. (2000) Modified Bacteriochlorophylls: A New Tool for Modeling Metal-Ligand Interactions in Metalloenzymes. Dissertation, Weizman Institute of Science Rehovot.
- Noy, D., Fiedor, L., Hartwich, G., Scheer, H., Scherz, A. (1998) Metal-Substituted Bacteriochlorophylls. 2. Changes in Redox Potentials and Electronic Transition Energies Are Dominated by Intramolecular Electrostatic Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3684-3693.
- Nunn, R. S., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Rice, D. W., Hunter, C. N. (1992) Purification and Crystallization of the Light Harvesting LH1 Complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Mol. Biol.*, **228**, 1259-1262.
- Näveke, A. (1998) Pigmenttausch im Lichtsammlerkomplex des Purpurbakteriums *Rhodospirillum rubrum* und Fourier-Transform-Raman-Spektroskopie an Metallo-Bakteriophäophytinen *a*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Oelze, J. (1985) Analysis of Bacteriochlorophylls. *Methods Microbiol.*, **18**, 257-284.
- Olsen, J. D., Sturgis, J. N., Westerhuis, W. H. J., Fowler, G. J. S., Hunter, C. N., Robert, B. (1997) Site-Directed Modification of the Ligands to the Bacteriochlorophylls of the Light-Harvesting LH1 and LH2 Complexes of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, **36**, 12625-12632.

- Omata, T. und Murata, N. (1983) Preparation of Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b* and Bacteriochlorophyll *a* by Column Chromatography with DEAE-Sepharose CL-6B and Sepharose CL-6B. *Plant Physiol.*, **24** (6), 1093-1100.
- Pappas, J. J. und Keaveney, W. P. (1966) A New and Convenient Method for Converting Olefins to Aldehydes. *Tetrahedron Letters*, **36**, 4273-4278.
- Parkes-Loach, P. S., Davis, C. M., Cook, C., Meadows, K. A., Bandilla, M., Scheer, H., Loach, P. A. (1995) Comparison of Bacteriochlorophyll Binding Requirements in the Core Light-Harvesting Complexes of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter sphaeroides*. In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. Mathis, P. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 155-158.
- Paulsen, H. und Kuttkat, A. (1993) Pigment Complexes of Light-Harvesting Chlorophyll-*a/b* Binding Protein Are Stabilized by a Segment in the Carboxyterminal Hydrophilic Domain of the Protein. *Photochem. Photobiol.*, **57**, 139-142.
- Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. (1990) Reconstitution of Pigment-Containing Complexes from Light-Harvesting Chlorophyll *a/b*-Binding Protein Overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta*, **181**, 204-211.
- Pearlstein, R. M., Davis, R. C., Ditson, S. L. (1982) Giant Circular Dichroism of High Molecular-Weight Chlorophyllide-Apomyoglobin Complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 400-402.
- Pennington, F. C., Strain, H. H., Svec, W. A., Katz, J. J. (1964) Preparation and Properties of Pyrochlorophyll *a*, Methyl Pyrochlorophyllide *a*, Pyropheophytin *a*, and Methyl Pyropheophorbide *a* Derived from Chlorophyll by Decarbomethoxylation. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1418-1426.
- Perutz, M. F., Muirhead, H., Cox, J. M., Goaman, L. C. G. (1968) Three-Dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxyhemoglobin at 2.8 Å Resolution: The Atomic Model. *Nature*, **219**, 131-139.
- Plumley, F. G. und Schmidt, G. W. (1987) Reconstitution of Chlorophyll *a/b* Light-Harvesting Complexes - Xanthophyll-Dependent Assembly and Energy-Transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 146-150.
- Polcar, C., Artaud, I., Mansuy, D. (1996) First Synthesis of a Binuclear [Mn^{II}(bipy)-Fe^{III}(porphyrin)] Complex: Spectroscopic Characterization and First Evidence of Reversible Formation of Manganese(III) as Manganese Peroxidase. *Inorg. Chem.*, **35**, 210-216.
- Popot, J.-L. und Engelman, D. M. (2000) Helical Membrane Protein Folding, Stability, and Evolution. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 881-922.
- Pullerits, T. und Sundström, V. (1996) Photosynthetic Light-Harvesting Pigment-Protein Complexes: Toward Understanding How and Why. *Acc. Chem. Res.*, **29**, 381-389.
- Rabanal, F., DeGrado, W. F., Dutton, P. L. (1995) Assembled Between Two Subunits of a Synthetic Four-Helix Bundle Multiheme Protein. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7103-7104.

- Rau, H. K. (1998) Design, chemische Synthese und Charakterisierung von modularen Chlorophyll- und Hämproteinen Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
- Rau, H. K., DeJonge, N., Haehnel, W. (1999) Parallel Solid Phase Synthesis and Screening of 399 Four-Helix Bundle Hemoproteins. In *Peptides*. Bajusz, S. and Hudecz, F. (Hrsg.) Adadémiai Kiadó, Budapest, S. 312-313.
- Rau, H. K., DeJonge, N., Haehnel, W. (1998) Modular Synthesis of *de novo*-Designed Metalloproteins for Light-Induced Electron Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11526-11531.
- Rau, H. K., DeJonge, N., Haehnel, W. (2000) Combinatorial Synthesis of Four-Helix Bundle Hemoproteins for Tuning of Cofactor Properties. *Angew. Chem., Int. Ed.* **39**, 250-253.
- Rau, H. K. und Haehnel, W. (1998) Design, Synthesis, and Properties of a Novel Cytochrome *b* Model. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 468-476.
- Rau, H. K., Snigula, H., Struck, A., Robert, B., Scheer, H., Haehnel, W. (2001) Design, Synthesis and Properties of Synthetic Chlorophyll Proteins. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3284-3295.
- Reem, R. C., McCormick, J. M., Richardson, D. E., Muselman, R. L. (1989) Spectroscopic Studies of the Coupled Binuclear Ferric Active Site in Methemerythrins and Oxyhemerythrin: the Electronic Structure of Each Iron Center and the Iron-oxo and Iron-peroxide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4688-4704.
- Reindl, C. (2000) Fe-substituiertes Bakteriochlorophyll: Charakterisierung, Analytik und Einbauversuche in den Lichtsammelkomplex 1 von *Rhodobacter sphaeroides*. Diplomarbeit, Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- Robertson, D. E., Farid, R. S., Moser, C. C., Urbauer, J. L., Mulholland, S. E., Pidikiti, R., Lear, J. D., Wand, A. J., Degrado, W. F., Dutton, P. L. (1994) Design and Synthesis of Multi-Haem Proteins. *Nature*, **368**, 425-431.
- Rosenbach-Belkin, V. (1988) The Primary Reactants in Bacterial Photosynthesis Modeling by *in vitro* Preparation. Dissertation, Weizmann Institute of Science Rehovot.
- Sadasivan, N., Eberspaecher, H. I., Fuchsman, W. H., Caughey, W. S. (1969) Substituted Deuteroporphyrins. VI. Ligand-Exchange and Dimerization Reactions of Deuterohemins. *Biochemistry*, **8**, 534-541.
- Sams, J. R. und Tsin, T. B. (1979) Moessbauer Spectroscopy of Iron Porphyrins. In *The Porphyrins*: Vol. 4, Dolphin, D. (Hrsg.) Academic Press, New York, S. 425-478.
- Sauer, K., Cogdell, R. J., Prince, S. M., Freer, A. A., Isaacs, N. W., Scheer, H. (1996) Structure-Based Calculations of the Optical Spectra of the LH II Bakteriochlorophyll-Protein Complex from *Rhodospseudomonas acidophila*. *Photochem. Photobiol.*, **64**, 564-576.
- Scheer, H. (1988) Chlorophylls. In *Handbook of Chromatography, Plant Pigments Vol 1*, Köst, H.-P. (Hrsg.) CRC Press, Boca Raton, S. 235-307.

- Scheer, H. (1991) Structure and Occurrence of Chlorophylls. In *Chlorophylls*. Scheer, H. (Hrsg.) CRC Press, Boca Raton, S. 3-30.
- Scheer, H. und Hartwich, G. (1995) Bacterial Reaction Centers with Modified Tetrapyrrol Chromophores. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Blankenship, R., Madigan, M. T., and Bauer, C. E. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 649-663.
- Scheer, H. und Inhoffen, H. H. (1978) Hydroporphyrins: Reactivity, Spectroscopy and Hydroporphyrin Analogues. In *The Porphyrins* Vol. 2, Dolphin, D. (Hrsg.) Academic Press, New York, S. 45-90.
- Scheer, H. und Struck, A. (1993) Bacterial Reaction Centers with Modified Tetrapyrrole Chromophores. In *The photosynthetic reaction center* Vol. 1, Deisenhofer, J. and Norris, J. R. (Hrsg.) Academic Press, New York, S. 157-193.
- Scheer, H. und Katz, J. J. (1978) Peripheral Metal Complexes: Chlorophyll "Isomers" with Magnesium Bound to the Ring E β -Keto Ester System. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 561-571.
- Scheumann, V., Ito, H., Tanaka, A., Schoch, S., Rüdiger, W. (1996) Substrate Specificity of Chlorophyll(ide) *b* Reductase in Etioplasts of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Eur. J. Biochem.*, **242**, 163-170.
- Schnepf, R., Hörth, P., Wieghardt, K., Hildebrandt, P., Haehnel, W. (2001) *De novo* Design and Characterization of Copper Centers in Synthetic Four-Helix-Bundle Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2186-2195.
- Schulten, K. (1999) From Simplicity to Complexity and Back: Function, Architecture and Mechanism of Light-Harvesting Systems in Photosynthetic Bacteria. In *Simplicity and Complexity in Proteins and Nucleic Acids*. Frauenfelder H., Deisenhofer, J., and Wolynes, P. G. (Hrsg.) Dahlem University Press, Berlin, S. 227-253.
- Shah, H. N., Bonnett, R., Mateen, B., Williams, R. A. D. (1979) The Porphyrin Pigmentation of Subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochem. J.*, **180**, 45-50.
- Sharp, R. E., Diers, J. R., Bocian, D. F., Dutton, P. L. (1998) Differential Binding of Iron(III) and Zinc(II) Protoporphyrin IX to Synthetic Four-Helix Bundle. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 7103-7104.
- Shifman, J. M., Gibney, B. R., Sharp, R. E., Dutton, P. L. (2000) Heme Redox Potential Control in *de novo* Designed Four-R-Helix Bundle Proteins. *Biochemistry*, **39**, 14813-14821.
- Shimada, K., Itoh, S., Iwaki, M., Nagashima, K. V. P., Matsuura, K., Kobayashi, M., Wakao, N. (1998) Reaction Center Complex Based on Zn-Bacteriochlorophyll from *Acidiphilium rubrum*. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 11th Garab, G. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 909-912.
- Smalley, J. F., Silver, J., Marsh, P. J., Birss, A. J. (1998) The Periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* Binds Iron Protoporphyrin IX in the μ -oxo Dimeric Form: An Oxidative Buffer and Possible Pathogenic Mechanism. *Biochem. J.*, **331**, 681-685.
- Smith, J. H. C. und Benitez, A. (1955) Chlorophylls: Analysis in Plant Material. In *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* Vol. 4, Paech, K. and Tracey, M. (Hrsg.) Springer Verlag, Berlin, S. 142-196.

- Smith, J. R. L. und Calvin, M. (1966) Studies on the Chemical and Photochemical Oxidation of Bacteriochlorophyll. *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 4500-4506.
- Snigula, H. (1997) Einlagerung von Eisen in Chlorophylle und Bakteriochlorophylle. Diplomarbeit, Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- Soede-Huijbregts, C., Touw, S., van Hemert, M., Raap, J., Lugtenburg, J., de Groot, H. J. M. (2000) Contrasting correlations between ^{15}N -shifts and nitrogen charge reveal a charge buffering capacity in the molecular electronics of aromatic nitrogen heterocycles. *Chem. Phys. Lett. (eingereicht)*.
- Stegmann, H. B. (1986) Elektronenspinresonanz. In *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. Naumer, H. and Heller, W. (Hrsg.) 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 249-262.
- Steiner, R. (1981) Bacteriochlorophyll *b* aus *Ectothiorhodospira halochloris*. Zulassungsarbeit, Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- Storch, K. F. (1993) Stereospezifität des Austausches 13/2 hydroxylierter Pigmente in photosynthetische Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides* R 26.1. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Strell, M. und Urumow, T. (1977) New Methods for Introduction of Metals Into Derivatives of Chlorophyll. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 970-974.
- Struck, A. (1990) Chemisch modifizierte Bakteriochlorophylle und -phäophytine in den Bindungsstellen B *A,B* und H *A,B* von photosynthetischen Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides* R26: Pigmentsynthese, Pigment austausch und Spektroskopie. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Struck, A., Cmiel, E., Katheder, I., Schaefer, W., Scheer, H. (1992) Bacteriochlorophylls Modified at Position C-3: Long-Range Intramolecular Interaction with Position C-13². *Biochim. Biophys. Acta*, **1101**, 321-328.
- Struck, A., Cmiel, E., Katheder, I., Scheer, H. (1990) Modified Reaction Centers from *Rhodobacter sphaeroides* R26. 2. Bacteriochlorophylls with Modified C-3 Substituents at Sites B_A and B_B. *FEBS Lett.*, **268**, 180-184.
- Struck, A., Snigula, H., Rau, H.-K., Hörth, P., Winkler, D., Scheer, H., Haehnel, W. (1999) Synthetic Four-Helix Bundle Proteins with Chlorophyll Derivatives. In *Peptides*. Bajusz, S. and Hudecz, F. (Hrsg.) Adadémiai Kiadó, Budapest, S. 456-457.
- Svec, W. A. (1991) The Distribution and Extraction of the Chlorophylls. In *Chlorophylls*. Scheer, H. (Hrsg.) CRC Press, Boca Raton, S. 89-102.
- Theiler, R., Suter, F., Wiemken, V., Zuber, H. (1984) The Light-Harvesting Polypeptides of *Rhodospseudomonas sphaeroides* R-26.1. I. Isolation, Purification and Sequence Analysis. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **365**, 703-719.
- Torrens, M. A., Straub, D. K., Epstein, L. M. (1972) Moessbauer Studies on oxo-Bridged Iron(III) Porphines. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4160-4162.

- Ücker, B., Fraser, N., Cogdell, R., Scheer, H. (1998) Spectral and Photochemical Properties of Light-Harvesting-Complex II of Purple Bacteria Treated with Sodium Borohydride. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Proc. Int. Congr. Photosynth., 11th*. Garab, G. (Hrsg.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 61-64.
- Urumov, T. (1975) Metallkomplexe von Chlorophyllderivaten. Dissertation, Technische Universität München.
- van Grondelle, R. und Novoderezhkin, V. (2001) Dynamics of Excitation Energy Transfer in the LH1 and LH2 Light-Harvesting Complexes of Photosynthetic Bacteria. *Biochemistry*, **40**, 15057-15068.
- Wagner, F. E. (1986) Mößbauerspektroskopie. In *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. Naumer, H. and Heller, W. (Hrsg.) 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 236-243.
- Weiss, C. jr. (1972) The π -Electron Structure and Absorption Spectra of Chlorophylls in Solution. *J. Mol. Spec.*, **44**, 37-80.
- White, W. I. (1978) Aggregation of Porphyrins and Metalloporphyrins. In *The Porphyrins* Vol. 5, Dolphin, D (Hrsg.) Academic Press, New York, S. 303-339.
- Williams, P. A., Fülöp, V., Garman, E. F., Saunders, N. F. W., Ferguson, S. J., Hajdu, J. (1997) Heme-Ligand Switching During Catalysis in Crystals of a Nitrogen-Cycle Enzyme. *Nature*, **389**, 406-412.
- Yeh, S.-R., Takahashi, S., Fan, B., Rousseau, D. L. (1997) Ligand Exchange During Cytochrome *c* Folding. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 51-56.
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y.-I., Kim, K. K., Hung, L.-W., Crofts, A. R., Berry, E. A., Kim, S.-H. (1998) Electron Transfer by Domain Movement in Cytochrome *bc*₁. *Nature*, **392**, 677-684.
- Zuber, H. (1985) Structure and Function of Light-Harvesting Complexes and their Polypeptides. *Photochem. Photobiol.*, **42**, 821-825.
- Zuber, H. und Brunisholz, R. A. (1991) Structure and function of antenna polypeptides and Chlorophyll-protein complexes: Principles and variability. In *Chlorophylls*. Scheer, H. (Hrsg.) CRC Press, Boca Raton, S. 627-704.

F. Anhang

1 Verwendung der Einheit OD und ODml

Die Einheiten OD und ODml gehören nicht zu den SI-Einheiten, bzw. zu den abgeleiteten SI-Einheiten und werden hier näher erklärt. Die Einheit OD („optische Dichte“) entspricht einer Konzentration, die Einheit ODml einer Stoffmenge. Diese Einheiten lassen sich bei bekanntem Extinktionskoeffizienten über das Lambert-Beer'sche-Gesetz in die Standardgrößen für Konzentration c und Stoffmenge n umrechnen.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion [OD λ]
 ε = Extinktionskoeffizient [$l \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
 c = Konzentration [mmol/l]
 d = Schichtdicke der Küvette [cm]

$$E \cdot V = \varepsilon \cdot n \cdot d$$

$E \cdot V$ = Extinktion mal Volumen [ODml]
 ε = Extinktionskoeffizient [$l \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
 n = Stoffmenge [mmol]
 d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten lassen sich die Einheiten OD und ODml direkt in Konzentration bzw. Stoffmenge umrechnen. Ist der Extinktionskoeffizient nicht bekannt oder nur genähert, ist durch die Verwendung von OD bzw. ODml eine genaue relative Mengenangabe möglich.

Der Extinktionskoeffizient ist abhängig von der Wellenlänge, so dass bei der Verwendung der Einheit OD die Wellenlänge mit anzugeben ist. Da sich die verwendeten Extinktionskoeffizienten der Chl und BChl in der Regel auf die langwelligste Absorptionsbande (Q_y) beziehen, wurde auf die Angabe der Wellenlänge verzichtet, wenn sie sich auf das langwelligsten Absorptionsmaximum bezieht.

Ein direkter Stoffmengen-Vergleich ist mit diesen Einheiten nicht möglich, da die Extinktionskoeffizienten je nach Verbindung stark variieren können. Die Ausbeuten der Reaktionen wurden in ODml gemessen und mit den unter Kap. 4 angegebenen Extinktionskoeffizienten umgerechnet.

2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Fe-Phe und Fe-BPhe

Der Extinktionskoeffizient von Fe-Me-Pheid *a*, der dem des Fe-Phe *a* sehr ähnlich sein sollte, da der Ester an Position C-17³ an den Absorptionsübergängen nicht beteiligt ist, wurde von Urumov zu $\epsilon_{625} = 16,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{396} = 44,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt (in CHCl_3) [Urumov, 1975]. In dieser Arbeit ist nicht angegeben, nach welcher Methode der Extinktionskoeffizient bestimmt wurde.

Ein eigener Versuch zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ergab $\epsilon_{384} = 58 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{620} = 21,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in Diethylether [Snigula, 1997]. Zur Bestimmung wurde eine definierte Menge Phe *a* in einer Küvette direkt zum Fe-Phe *a* umgesetzt und die Reaktion absorptionsspektroskopisch verfolgt. Aus der Abnahme der Phe *a*-Bande bei 668 nm und der Zunahme der Fe-Phe *a*-Bande bei 625 nm wurde aus der umgesetzten Stoffmenge der Extinktionskoeffizient berechnet. Diese Methode ist nicht sehr genau, da bei den entsprechenden Wellenlängen beide Pigmente absorbieren, was nur schwer korrigiert werden kann.

Der Extinktionskoeffizient von transmetalliertem Chl *a* und BChl *a* lässt sich, ausgehend von der Tatsache, dass die Oszillatorstärken der Q_y-Bande von transmetallierten BChl *a* von der Natur des Metalls weitgehend unabhängig sind [Noy et al., 1998] berechnen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

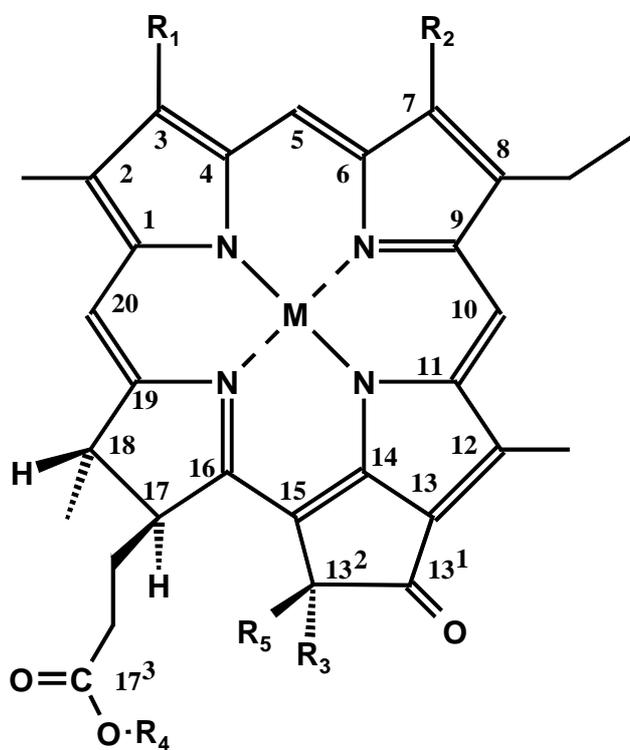
Fe-Phe *a* und Chl *a* bzw. Fe-BPhe *a* und BChl *a* wurden in Diethylether gelöst und Absorptionsspektren aufgenommen. Die Flächen unter den Absorptionsspektren wurden im Wellenlängenbereich von 550 nm - 750 nm im Fall der Chlorine und von 605 nm - 850 nm im Fall der Bakteriochlorine bestimmt. Bei gleich grossen Flächen ist die Pigmentmenge gleich groß. Da die Extinktionskoeffizienten von Chl *a* ($\epsilon_{660} = 109,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und BChl *a* ($\epsilon_{771} = 91,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bekannt sind, können über das Lambert-Beer'sche-Gesetz (Kap. F-1) die Extinktionskoeffizienten des Fe-Phe *a* und des Fe-BPhe *a* berechnet werden.

Die so ermittelten Extinktionskoeffizienten in Diethylether betragen $\epsilon_{620} = 36,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Fe-Phe und $\epsilon_{744} = 58,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Fe-BPhe. Diese Extinktionskoeffizienten wurden zur Berechnung der Stoffmengen in dieser Arbeit verwendet.

Ausgehend von diesen Werten für monomeres Fe-(B)Phe *a* kann durch Säure-Base-Titration der Extinktionskoeffizient der μ -oxo-Komplexe abgeschätzt werden. Für das $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{Phe } a)_2\text{O}$ ergab sich ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{620} = 18,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und für das $(\text{Fe}^{(\text{III})}\text{BPhe } a)_2\text{O}$ von $\epsilon_{744} = 29,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

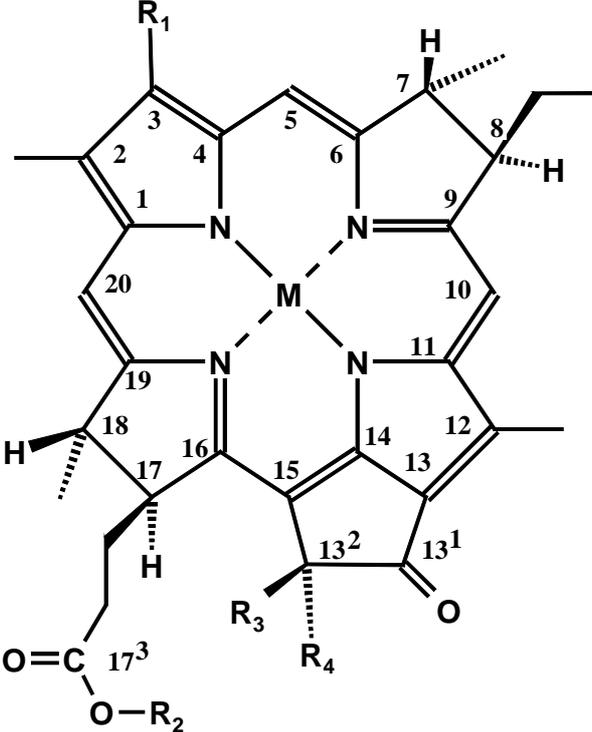
3 Pigmentübersicht

3.1 Chlorin-Derivate



Pigment	M	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Chl a	Mg ²⁺	CH=CH ₂	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	H
Chl b	Mg ²⁺	CH=CH ₂	CHO	CO ₂ CH ₃	phytyl	H
Phe a	2H	CH=CH ₂	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	H
Pheid a	2H	CH=CH ₂	CH ₃	CO ₂ CH ₃	H	H
Me-Pheid a	2H	CH=CH ₂	CH ₃	CO ₂ CH ₃	CH ₃	H
Pyro-Phe a	2H	CH=CH ₂	CH ₃	H	phytyl	H
13²-OH-Phe a	2H	CH=CH ₂	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	OH
[3-Acetyl]-Chl a	Mg ²⁺	COCH ₃	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	H
[3-Acetyl]-Me-Pheid a	2H	COCH ₃	CH ₃	CO ₂ CH ₃	CH ₃	H
[3-Acetyl]-Phe a	2H	COCH ₃	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	H
[3-Formyl]-Phe a	2H	CHO	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	H
[3-Formyl]-Me-Pheid a	2H	CHO	CH ₃	CO ₂ CH ₃	CH ₃	H
Ethanal-Pheid a	2H	CH=CH ₂	CH ₃	CO ₂ CH ₃	CH ₂ CHO	H
[3-Formyl]-Ethanal-Pheid a	2H	CHO	CH ₃	CO ₂ CH ₃	CH ₂ CHO	H
Zn-[3-Formyl]-Me-Pheid a	Zn ²⁺	CHO	CH ₃	CO ₂ CH ₃	CH ₃	H
Zn-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a	Zn ²⁺	CHO	CH ₃	H	CH ₃	H
Ni-[3-Acetyl]-Pheid a	Ni ²⁺	COCH ₃	CH ₃	CO ₂ CH ₃	H	H
Ni-[3-Formyl]-Me-Pheid a	Ni ²⁺	CHO	CH ₃	CO ₂ CH ₃	CH ₃	H
Ni-[3-Formyl]-Pyro-Me-Pheid a	Ni ²⁺	CHO	CH ₃	H	CH ₃	H
(Fe^(III)Phe a)Cl	Fe ³⁺	CH=CH ₂	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	H
Fe^(II)Phe a	Fe ²⁺	CH=CH ₂	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	H
Fe^{(II)/(III)}-[3-Acetyl]-Phe a	Fe ^{2+/3+}	COCH ₃	CH ₃	CO ₂ CH ₃	phytyl	H

3.2 Bakteriochlorin-Derivate



Pigment	M	R₁	R₂	R₃	R₄
BChl <i>a</i>	Mg ²⁺	COCH ₃	phytyl	H	CO ₂ CH ₃
BPhe <i>a</i>	2H	COCH ₃	phytyl	H	CO ₂ CH ₃
[3-Vinyl]-BChl <i>a</i>	Mg ²⁺	CH=CH ₂	phytyl	H	CO ₂ CH ₃
[3-Vinyl]-Me-BPheid <i>a</i>	2H	CH=CH ₂	CH ₃	H	CO ₂ CH ₃
13²-OH-BChl <i>a</i>	Mg ²⁺	COCH ₃	phytyl	OH	CO ₂ CH ₃
3¹-OH-BChl <i>a</i>	Mg ²⁺	CH(OH)CH ₃	phytyl	H	CO ₂ CH ₃
3¹-OH-Me-BPheid <i>a</i>	Mg ²⁺	CH(OH)CH ₃	CH ₃	H	H
3¹-OH-Pyro-BChl <i>a</i>	Mg ²⁺	CH(OH)CH ₃	phytyl	H	H
3¹-OH-BPhe <i>a</i>	2H	CH(OH)CH ₃	phytyl	H	CO ₂ CH ₃
[3-Formyl]-Me-BPheid <i>a</i>	Mg ²⁺	CHO	CH ₃	H	CO ₂ CH ₃
Me-BPheid <i>a</i>	2H	COCH ₃	CH ₃	H	CO ₂ CH ₃
Zn-BPheid <i>a</i>	Zn ²⁺	COCH ₃	H	H	CO ₂ CH ₃
Ni-BPheid <i>a</i>	Ni ²⁺	COCH ₃	H	H	CO ₂ CH ₃
Fe^(III)BPhe <i>a</i>	Fe ²⁺	COCH ₃	phytyl	H	CO ₂ CH ₃
(Fe^(III)BPheid <i>a</i>)Cl	Fe ³⁺	COCH ₃	H	H	CO ₂ CH ₃

4 Verwendete Extinktionskoeffizienten

Pigment	Lösungs- mittel	Extinktionskoeffizient ϵ [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$] (λ_{max})	Literatur
BChl a	DE	91,0 (771 nm)	[Hartwich, 1994]
Chl a	DE	86,5 (660 nm)	[Meyer, 1997]
BPhe a	DE	67,5 (750 nm)	[Hartwich, 1994]
Phe a	DE	55,5 (667 nm)	[Scheer, 1991]
Pyro-Phe a	DE	49,0 (667 nm)	[Pennington et al., 1964]
[3-Acetyl]-Phe a	DE	44,4 (683 nm)	[Meyer, 1997]
[3-Formyl]-Phe a	DE	72,1 (692 nm)	[Smith und Benitez, 1955]
Pyro-Me-Pheid a	DE	52,0 (667 nm)	[Pennington et al., 1964]
3¹-OH-BChl a	DE	66,0 (728 nm)	[Struck et al., 1992]
[3-Vinyl]-BChl a	DE	83,0 (745 nm)	[Struck et al., 1992]
[3-Vinyl]-BPhe a	DE	35,9 (724 nm)	[Meyer, 1997]
Cd-BPhe a	DE	88,3 (761 nm)	[Hartwich, 1994]
Ni-BPhe a	DE	63,0 (779 nm)	[Hartwich, 1994]
Zn-BPhe a	DE	67,7 (762 nm)	[Hartwich, 1994]
Fe-BPhe a	DE	Monomer: 58,0 (740 nm) μ -oxo-Dimer: 29,0 (819 nm)	[Reindl, 2000] ^[11]
Fe-Phe a	DE	Monomer: 36,8 (620 nm) μ -oxo-Dimer: 18,3 (690 nm)	[Snigula, 1997]

^[11] Bestimmt über Intergration über die Q_y-Bande von 605-850 nm (Kap.2); μ -oxo-Dimer-Extinktionskoeffizient ist der Wert pro Tetrapyrrol-Hälfte

Lebenslauf

Name	Heike Snigula
Geburtstag	09.07.1970
Geburtsort	München
1977 – 1981	Besuch der Grundschule Rotenbuchstraße, München
1981 – 1990	Albert-Einstein-Gymnasium, München Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1990 – 02/1997	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
05/1996	Diplom-Hauptprüfung, <i>Wahlpflichtfach: Biochemie</i>
07/1996 – 02/1997	Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Hugo Scheer am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der LMU München
02/1997	Beginn der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Hugo Scheer am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der LMU München