

---

**Fluoreszenzspektroskopie an einem  
neuartigen Wirkstoff der  
Diphenylpyrazol-Klasse zur Therapie  
neurodegenerativer Erkrankungen**

**Anne Reiner**

---



München 2017



---

**Fluoreszenzspektroskopie an einem  
neuartigen Wirkstoff der  
Diphenylpyrazol-Klasse zur Therapie  
neurodegenerativer Erkrankungen**

**Anne Reiner**

---

Dissertation

an der Fakultät für Physik  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Anne Mareen Reiner  
aus Filderstadt.

München, den 14. Juni 2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Armin Giese

Tag der mündlichen Prüfung: 8. August 2017

## Kurzfassung

Die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen zu Amyloiden ist Teil der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen. Diese Amyloide haben, anders als das jeweilige natürliche Protein, eine charakteristische  $\beta$ -Faltblattstruktur. Die Aggregate sind vermehrt im Gehirn der Patienten zu finden. Ihre Anreicherung und die damit verbundene Aggregation wird als Ursache für ihre Neurotoxizität vermutet. Ein therapeutisches Ziel ist demzufolge die Hemmung der Aggregation der Proteine. Zu diesem Zweck wurden tausende Moleküle in einem großen Screening auf ihre anti-aggregative Wirkung getestet [128]. Hier zeigte sich das Diphenylpyrazol (DPP) anle138b vielversprechend, das auch in Tierversuchen eine Wirkung erzielte. Die Verabreichung der Substanz anle138b führte dabei zu einer Modulation der Aggregation und gleichzeitig zu einer längeren Überlebenszeit erkrankter Mäuse (Prion infizierte Mäuse, transgene Parkinson- und Taumäuse).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Fluoreszenz des biologisch relevanten Moleküls anle138b und einigen anderen DPP-Derivaten. Es wird dabei das Fluoreszenzverhalten im Detail untersucht und wichtige Informationen über die Interaktion der DPP-Moleküle mit den Aggregaten erhalten. Das charakteristische Fluoreszenzverhalten der Substanz anle138b erlaubt es, die Bindungsstöchiometrie mit  $\alpha$ -Synuclein und hTau46 Fibrillen zu bestimmen. Dabei kann eine starke Bindung ( $K_d \sim 200$  nM) zu beiden Aggregaten festgestellt werden. Über eine direkte kompetitive Messung mit dem bekannten Marker der Proteinaggregation Thioflavin T ist es möglich die Bindungsstelle in der Fibrille genauer einzugrenzen. Mittels stationärer und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie wird die Fluoreszenz der DPP-Derivate in verschiedenen Lösungsmitteln und Proteinfibrillen aufgeklärt. In polaren protischen Lösungsmitteln kann eine duale Fluoreszenz beobachtet werden, wobei hier eine starke Beschleunigung des Zerfalls des angeregten Zustands auftritt. Das Auftreten der rotverschobenen Fluoreszenz deutet hierbei auf einen ladungstrennten Zustand hin. Dieser wird durch eine Protonierung oder Wasserstoffbrückenbindung am Pyrazol induziert und in polaren Lösungsmitteln stabilisiert. In unpolaren Lösungsmitteln oder Proteinfibrillen wird dieser Zustand nur schwach oder gar nicht besetzt. Die Fluoreszenz der DPP-Derivate in den Fibrillen gibt wichtige Informationen über die Bindungsstelle, die demnach unipolar und von der wässrigen Umgebung abgeschirmt ist.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Struktur der  $\alpha$ -Synuclein Fibrille [121] schlägt mehrere mögliche Bindungsstellen für kleine aggregationsmodulierende Moleküle vor. Aus dem Vergleich mit den hier gewonnenen Ergebnissen der Fluoreszenzspektroskopie, kann eine potentielle Bindungsstelle für anle138b in dieser Struktur angegeben werden.



## Abstract

The misfolding and aggregation of proteins into amyloids is part of the pathogenesis of several neurodegenerative diseases. In contrast to the native protein the amyloids have a  $\beta$ -sheet structure. The aggregates can be found in the patients brains and their accumulation and aggregation is thought to be associated with their neurotoxicity.

One therapeutic approach could be the inhibition of the aggregation of those proteins. To this purpose thousands of molecules were screened for anti-aggregative properties [128]. Here, the diphenyl-pyrazole (DPP) anle138b could achieve promising results *in vitro* as well as in mouse models. The application of the substance lead to a modulation of the aggregation. Simultaneously, a prolongation of the survival time of diseased mice could be observed (prion infected mice, transgenic Parkinson mice and Tau-mice).

In this thesis the fluorescence of the biologically relevant molecule anle138b and derivates is investigated. The fluorescence is investigated in detail and important informations about the interaction of the DPP molecules with the aggregates can be achieved. The characteristic fluorescence properties of anle138b can be used to determine the binding stoichiometry of anle138b to  $\alpha$ -synuclein and hTau46 fibrillar structures. Here a strong binding ( $K_d \sim 200$  nM) could be observed. The binding site for anle138b in the fibril could be localized by a direct competition measurement with the popular marker of protein aggregation Thioflavin T.

Using stationary and time-resolved fluorescence measurements the fluorescence properties of the compounds can be explained. In polar protic solvents a dual fluorescence is observed. Here a strong acceleration of the decay of the excited state occurs. The red-shifted fluorescence points to a charge-transfer state. This state is stabilized by polar solvents. In nonpolar solvents or protein fibrils the state is at most only weakly populated. The fluorescence of the DPP molecules in the fibrils gives important information on the binding site. From this it follows that the binding site should be nonpolar and shielded from the surrounding water molecules.

In a recently published structure of an  $\alpha$ -synuclein fibril [121] several binding sites for aggregation modulating molecules are suggested. By comparison with the results from the fluorescence investigations one possible binding site for anle138b in this structure can be indicated.



---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. DPP-Derivate als „Wirkstoff“ gegen neurodegenerative Erkrankungen</b>	<b>5</b>
2.1. Die Prionenkrankheit . . . . .	5
2.2. Tauopathien/Alzheimer . . . . .	7
2.3. $\alpha$ -Synucleinopathien/Parkinson . . . . .	8
2.4. Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Proteinaggregation . . . . .	9
2.4.1. Das Tau-Protein . . . . .	12
2.4.2. $\alpha$ -Synuclein . . . . .	13
2.5. Das Molekül anle138b . . . . .	15
<b>3. Die Fluoreszenzspektroskopie</b>	<b>21</b>
3.1. Einführung in die stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	22
3.1.1. Einfluss der Lösungsmittelpolarität . . . . .	26
3.1.2. ICT- und TICT- Zustände . . . . .	27
3.1.3. Probe-Probe Wechselwirkung und FRET . . . . .	28
3.1.4. Stationäre Fluoreszenz: Das Fluoreszenzspektrometer . . . . .	30
3.1.5. Zeitaufgelöste Fluoreszenz: Die Streak-Kamera . . . . .	32
3.2. Fluoreszenzmarker der Proteinaggregation . . . . .	35
3.2.1. ANS . . . . .	35
3.2.2. Thioflavin T . . . . .	36
<b>4. Bindung und Bindungsstöchiometrie von anle138b</b>	<b>43</b>
4.1. Charakterisierung der DPP-Derivate und Amyloid-Fibrillen . . . . .	44
4.1.1. Löslichkeit der DPP-Derivate . . . . .	44
4.1.2. Photoreaktion von anle138b . . . . .	45
4.1.3. Fluoreszenz von anle138b und Derivaten . . . . .	45
4.1.4. Charakterisierung der $\alpha$ -Synuclein Fibrillen mit FTIR und ThT	47
4.2. Untersuchung der Fluoreszenz mit $\alpha$ -Synuclein und hTau46 . . . . .	49
4.2.1. Anisotropien . . . . .	50
4.2.2. Umgebung von anle138b in der $\alpha$ -Synuclein Fibrille . . . . .	52

4.3. Bindungsstöchiometrie . . . . .	55
4.3.1. Bindungsstöchiometrie von Thioflavin T . . . . .	60
4.4. Vergleich mit ThT . . . . .	62
4.5. Die Bindung von anle138b in der Fibrille . . . . .	65
<b>5. Eigenschaften und Modell zur Fluoreszenz der DPP-Derivate</b>	<b>69</b>
5.1. Lösungsmittelpolarität und Umgebung in der Fibrille . . . . .	69
5.2. Die untersuchten DPP-Derivate . . . . .	70
5.3. Stationäre Fluoreszenz der DPP-Derivate . . . . .	71
5.3.1. Photoreaktion in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	75
5.3.2. Die DPP-Derivate in Lösungsmittelmischungen . . . . .	79
5.3.3. Die DPP-Derivate in Säuren verschiedener Polarität . . . . .	81
5.4. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen . . . . .	82
5.4.1. Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen . . . . .	86
5.5. Modell zur Fluoreszenz der DPP-Derivate . . . . .	88
5.5.1. Modell zur Bindungsstelle von anle138b in der Fibrille . . . . .	91
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>99</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>Literatur</b>	<b>115</b>
<b>Publikationen</b>	<b>127</b>

# KAPITEL 1

---

## Einleitung

---

Neurodegenerative Erkrankungen betreffen die alternde Bevölkerung. Vergesslichkeit und „senile Demenz“ sind Teil des Alterungsprozesses und wurden erst mit steigender Lebenserwartung zu einer sogenannten Volkskrankheit [112, Kapitel 4],[43]. Alzheimer und Parkinson sind die häufigsten Erkrankungen, die durch Verlust- oder Fehlfunktion bestimmter Neuronen zu einem Rückgang kognitiver oder motorischer Fähigkeiten führen. Die heutige Forschung kennt eine Vielzahl weiterer Erkrankungen mit ebenso vielen Ursachen, deren Krankheitsbild der Verlust der Gedächtnisleistung im Alter ist [112, 36]. Die Krankheiten sind damit hauptsächlich ein Problem der westlichen Industriestaaten und ihrer „greisen“ Bevölkerungsschicht, aber auch den damit verbundenen Kosten für jüngere Generationen, um den Alten ein würdiges Leben zu gewährleisten. Dadurch ist es zur Aufgabe geworden, diese Krankheiten zu erforschen, um sie nicht nur besser zu verstehen, sondern auch mögliche Wirkstoffe, die nicht nur der Symptombekämpfung dienen, zu finden [112, Kapitel 4].

Nicht zuletzt seit dem BSE (Bovine spongiforme Enzephalopathie)-Skandal in den 90er Jahren, der in kurzer Zeit bis zu 150 Todesopfer in Großbritannien forderte, ist bekannt, dass unter gewissen Umständen auch jüngere Menschen von neurodegenerativen Erkrankungen betroffen sein können [2, 17]. Hier führte der Verzehr von infiziertem Rindfleisch zu einer Variante der Creutzfeldt-Jakob Krankheit [131]. Diese Erkrankung ist zwar außergewöhnlich [131] und mittlerweile selten geworden, jedoch verläuft sie schnell und immer tödlich [40].

Der „Krankheitserreger“ konnte zunächst nicht zugeordnet werden, da durch die epidemieartige Fortpflanzung von einer Virusinfektion ausgegangen wurde [100]. Ein Virus konnte im Zusammenhang mit der Krankheit nicht gefunden werden [56]. Jedoch wurde die fehlgefaltete Form des Prionproteins als ursächlich für die Übertragung der Krankheit bestätigt [99, 100]. Das Prion ( $\text{PrP}^C$ ) ist ein zelluläres, im menschlichen oder tierischen Organismus vorkommendes Protein [76]. Aufgrund sporadischer Veränderung oder eines Gendefekts kann es auch in einer fehlgefalteten Form ( $\text{PrP}^{SC}$ ) vorliegen. Diese pathogene Form hat die Eigenschaft, als Keim für die Umwandlung des natürlichen  $\text{PrP}^C$  nach  $\text{PrP}^{SC}$  zu wirken. Dies erklärt auch sein in-

fektiöses Verhalten [36]. Die fehlgefalteten Proteine PrP<sup>SC</sup> haben die Eigenschaft sich zu größeren Aggregatkomplexen zusammenzulagern. Weiterhin werden die krankhaft veränderten Prionen als Ursache für die Neurodegeneration gehandelt [5, 127]. Basierend auf dieser Hypothese wäre die Inhibition der Akkumulation und Aggregation von PrP<sup>SC</sup> ein möglicher Ansatz zur Therapie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit [84].

Im Zuge dessen wurde am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung in München in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen intensiv nach einem möglichen Medikament gesucht, das genau an dieser Stelle ansetzt.

Mit anle138b konnte ein wirkungsvolles Molekül gefunden werden, das wie sich in folgenden Untersuchungen zeigte, auch gegen weitere neurodegenerative Erkrankungen eingesetzt werden kann [128, 129]. Dem liegt zugrunde, dass die Ursache für das Absterben der Neuronen hier einem ähnlichen Mechanismus folgt, nämlich der Aggregation krankhaft veränderter Proteine im Gehirn der Patienten [36]. Das Medikament befindet sich kurz vor der ersten klinischen Phase und ist damit ein hoffnungsvoller Kandidat für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen.

Was kann eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchung eines „Medikaments“ über dessen Wirkungsweise aussagen? Mit dieser Fragestellung beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Aus Tiermodellen transgener Synuclein- (A30P) und transgener Tau (PS19) Mäuse sowie mit Prionen infizierter Mäuse konnte eine Reduktion der Akkumulation oligomerer Strukturen der Proteine festgestellt werden [128, 129]. Daraus ergibt sich direkt die Fragestellung, ob das Medikament mit den krankheitsspezifischen Aggregaten auf molekularer Ebene interagiert und diese dadurch modifiziert.

Eine nicht kovalente Bindung eines Farbstoffs an eine makromolekulare Struktur geht mit einer Änderung der Umgebung einher. Sind die Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Substanzen abhängig vom Lösungsmittel, kann mittels der Fluoreszenz eine Änderung der direkten Umgebung festgestellt werden [77]. Dieses charakteristische Verhalten ist z.B. von der Interaktion des Farbstoffs Thioflavin T mit Proteinaggregaten, die eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweisen, bekannt [91]. Durch ein ähnliches Vorgehen konnte in Wagner et al. [128, 129] und Deeg et al. [30] die direkte Wechselwirkung von anle138b mit  $\alpha$ -Synuclein und hTau46 Fibrillen gezeigt werden. Für  $\alpha$ -Synuclein konnte außerdem eine relativ hohe Bindungsaffinität der Substanz für die Aggregate gefunden werden. Das fluoreszenzspektroskopische Verhalten der Substanz ist in diesem Zusammenhang hochinteressant.

In dieser Arbeit wird nicht nur die Bindung von anle138b an pathologische Aggregate genauer untersucht, sondern auch der Mechanismus, der zu der starken Umgebungsabhängigkeit der Fluoreszenz führt, aufgeklärt. Daraus kann eine potentielle Bindungsstelle für anle138b in der Fibrille postuliert und eine mögliche Wirkungsweise abgeleitet werden.

---

## Gliederung der Arbeit

In **Kapitel 2** wird in das Thema „neurodegenerative Erkrankungen“ eingeführt. Der in der Einleitung schon angedeutete gemeinsame Mechanismus der Proteinaggregation ist in diesem Kapitel Hauptthema. Zunächst werden die für diese Arbeit relevanten Krankheiten beschrieben und Gemeinsamkeiten hervorgehoben. Dabei wird genau auf die Aggregationsmechanismen der einzelnen involvierten Proteine eingegangen. Ein Abschnitt des Kapitels befasst sich detailliert mit den verschiedenen Modellen der Fibrillenbildung von  $\alpha$ -Synuclein, dem Tau-Protein und  $A\beta_{42}$ . Abschließend wird das Vorgehen zur Suche eines Aggregationsinhibitors, sowie die Substanz anle138b vorgestellt.

In **Kapitel 3** werden die Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie erklärt. Hier geht es vor Allem um die Mechanismen, die zu einer Änderung des Fluoreszenzspektrums führen können. Der Fokus wird auf den Einfluss der Lösungsumgebung der Moleküle gelegt. Wichtigster Faktor ist hier die Polarität des Lösungsmittels. Sekundäre Faktoren können die Protonierung- bzw. Deprotonierung des Fluorophors durch das Lösungsmittel sein oder Wasserstoffbrückenbindungen. Dem angeschlossen wird das Vorgehen zur stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung beschrieben.

In einem weiteren Abschnitt werden Fluoreszenzmarker der Proteinaggregation vorgestellt unter anderem der bekannteste Marker Thioflavin T. Thioflavin T zeigt eine sehr interessante Fluoreszenz in verschiedenen Lösungsmitteln und mit Proteinaggregaten. Diese wird hier beschrieben und in einem bekannten Reaktionsmodell zusammengefasst.

In **Kapitel 4** wird die Fluoreszenz von anle138b und anderen DPP-Derivaten zunächst charakterisiert und anschließend die Bindung an Proteinaggregate untersucht. Es konnte eine charakteristische Fluoreszenzänderung aller untersuchten Derivate gefunden werden, die es ermöglicht die Bindungsstöchiometrie von anle138b an  $\alpha$ -Synuclein und hTau46 Fibrillen zu bestimmen.

Im zweiten Abschnitt des Kapitels werden die Ergebnisse mit denen für Thioflavin T verglichen. Aus einer direkten Konkurrenz von anle138b mit Thioflavin T um die Bindung an  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen können Rückschlüsse auf die Bindungsstelle von anle138b in den Fibrillen gezogen werden.

Abschließend wird in **Kapitel 5** die Fluoreszenz von anle138b und Derivaten in verschiedenen Lösungsmitteln genauer untersucht. Daraus kann ein Reaktionsmodell für die Fluoreszenz in den unterschiedlichen Umgebungen und in den Fibrillen abgeleitet werden. Dies macht es möglich eine Aussage über die direkte Umgebung von anle138b in der Fibrille zu geben. Zusammen mit den Resultaten aus Kapitel 4 kann dadurch die Bindungsstelle eingegrenzt- und innerhalb eines Modells für  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen postuliert werden.



# KAPITEL 2

---

## DPP-Derivate als „Wirkstoff“ gegen neurodegenerative Erkrankungen

---

Der Begriff der „Neurodegeneration“ beschreibt die Gemeinsamkeit verschiedener Krankheiten, die zum funktionellen und strukturellen Verlust von Neuronen führt und damit zu einem ähnlichen Krankheitsbild: Der Rückgang der Gedächtnisleistung (Demenz), sowie kognitive Einschränkungen (Dystonien) [43]. Zu ihnen gehören beispielsweise die Alzheimerkrankheit, Morbus Parkinson oder Chorea Huntington. Andere Krankheiten sind unter anderem BSE oder die Creutzfeldt-Jakob Krankheit (CJD) [111].

Die Zahl der unterschiedlichen Formen und Ausprägungen neurodegenerativer Erkrankungen ist hoch und sie alle zu nennen wäre im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es gibt aber eine Reihe von Untergruppen, die Krankheiten mit ähnlicher Symptomatik zusammenfassen: So gehört BSE oder vCJD zu den Prionenkrankheiten, Parkinson wird zu den  $\alpha$ -Synucleinopathien gezählt und Alzheimer zu den Tauopathien [72]. Auf welcher Grundlage diese Zusammenfassungen erfolgen und der sich daraus ergebende Therapieansatz wird im Folgenden erläutert.

### 2.1. Die Prionenkrankheit

Prionenkrankheiten werden auch Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) genannt. Diese Krankheiten können sowohl Tiere als auch Menschen betreffen [127]. So gehört zu ihnen die Bovine spongiforme Enzephalopathie beim Rind [83] und die Creutzfeldt-Jakob Krankheit beim Menschen [27]. Während des Krankheitsverlaufs kommt es zu einer schwammartigen Aushöhlung des zentralen Nervensystems (ZNS) aufgrund eines massiven Nervenverlusts und der pathologischen Ablagerung des Prion-Proteins [127]. Dies führt zu Symptomen wie Schreckhaftigkeit, motorische Störung und Rückgang der Gedächtnisleistung bis hin zur Demenz [90]. Die mittlere Erkrankungsdauer von Creutzfeldt-Jakob Patienten ist mit 4-6 Monaten extrem kurz und endet immer tödlich [70]. Eine weitere Besonderheit der Prionenkrankheiten,

welche sie von den anderen neurodegenerativen Erkrankungen unterscheidet, ist ihre infektiöse Übertragbarkeit. So führte der Verzehr von BSE „infiziertem“ Rindfleisch zu einer varianten Form der Creutzfeldt-Jakob Krankheit beim Menschen [131]. Diese Tatsache machte es zunächst äußerst schwierig, die Ursache der Krankheit zu finden. Zunächst ging man von sich langsam vermehrenden Viren aus, welche die Krankheit übertragen [100]. Dies wurde aber relativ schnell widerlegt da keine viralen Nukleinsäuren nachgewiesen werden konnten [56]. 1982 wagte Stanley Prusiner die Hypothese, es handle sich bei den „Erregern“ um Proteine [99]. Die Prion-Hypothese legt der Krankheit die Fehlfaltung des sogenannten Prion („proteinaceous infectious particle“)-Proteins PrP<sup>C</sup> nach PrP<sup>SC</sup> zugrunde. Diese Form des Proteins kann über autokatalytische Reaktion die Fehlfaltung weiterer Prion-Proteine bewirken. Die pathogene Form des Prion-Proteins PrP<sup>SC</sup> lagert sich zu hoch infektiösen fibrillaren Aggregaten zusammen [100, 127]. Weiterhin kann die Umwandlung von PrP<sup>C</sup> nach PrP<sup>SC</sup> auch spontan oder aufgrund eines Gendefekts entstehen [36].

Das Prnp-Gen wird in erwachsenen Organismen in fast allen Geweben exprimiert. Die Menge an exprimiertem Protein ist jedoch unterschiedlich und im ZNS am stärksten ausgeprägt [76, 5]. Es gibt extrazelluläres und intrazelluläres Prion-Protein, wobei letzterem eine höhere Pathogenität zugesprochen wird [73]. Die Rolle des Prion-Proteins in der Zelle ist bisher ungeklärt. Da das Protein aber in vielen Organismen auftritt, scheint es eine wichtige Funktion zu besitzen [106]. Mäuse, bei denen das Prnp-Gen unterdrückt ist zeigen nur kleine Einschränkungen in ihrem Verhalten. Dennoch konnte festgestellt werden, dass die Prion-Proteine die Fähigkeit zur Kupferbindung haben [39] und kultivierte Neuronen von Prnpunterdrückten Mäusen einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt sind [110].

Die Umwandlung von PrP<sup>C</sup> nach PrP<sup>SC</sup> trägt eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der Prionenkrankheiten. PrP<sup>SC</sup> lagert sich ausschließlich im Gehirn der Patienten an, während das normale Protein weiterhin in vielen anderen Gewebestrukturen zu finden ist [5]. Die beiden Proteine unterscheiden sich erst in ihrer Sekundärstruktur. PrP<sup>C</sup> liegt in einer  $\alpha$ -Helix vor während PrP<sup>SC</sup> eine ausgeprägte  $\beta$ -Faltblattstruktur besitzt und sich zu Aggregaten anlagert [95]. Die Auflösung der PrP<sup>SC</sup>-Aggregate und der  $\beta$ -Faltblattstruktur bewirkt eine Reduktion der Infektiosität [127].

Auf noch ungeklärte Weise wirken fibrillare und präfibrillare  $\beta$ -Faltblattstrukturen der Prion-Proteine zelltoxisch. Es wird angenommen, dass diese Toxizität nicht direkt wirkt. Studien an Mäusen haben ergeben, dass für die weitere Ausbreitung von PrP<sup>SC</sup> auch PrP<sup>C</sup> vorhanden sein muss [15]. Die Umwandlung der Proteine scheint damit ein entscheidender Schritt in der Toxizität zu sein. Ungeklärt bleibt auch, ob PrP<sup>SC</sup> direkt oder indirekt die Apoptose der Neuronen induziert [73]. Trotzdem kann die medikamentöse Unterbindung des Übergangs von PrP<sup>C</sup> nach PrP<sup>SC</sup> das Fortschreiten der Krankheit verhindern. Die Verringerung von PrP<sup>SC</sup> in den Neuronen ist somit ein möglicher Ansatz für eine Therapieform [84].

## 2.2. Tauopathien/Alzheimer

Schon Alois Alzheimer beschrieb 1906 die Ablagerung von extrazellulären Plaque ähnlichen Aggregaten, die er durch eine Autopsie des Gehirns seiner ersten an schwerer Demenz verstorbenen Patientin entdeckte [1]. Es hat sich gezeigt, dass diese Ablagerungen bei allen Alzheimerpatienten gefunden werden können. Dies führte zu der Ansicht, dass die Aggregate Hauptursache für die neuronale Abnahme sind [112, Kapitel 4]. Bis heute konnte aber noch kein direkter Zusammenhang gefunden werden [43].

Etwa fünf Prozent der 65-Jährigen und 20-40 % der über 85-Jährigen leiden an Demenz. Somit steigt mit höherer Lebenserwartung das Risiko an Alzheimer zu erkranken [112, Kapitel 4]. Demenz hat viele Ursachen und Alzheimer ist nur eine davon. Jedoch gehört die Erkrankung zu den Hauptursachen, weshalb sie oft synonym für Demenz verwendet wird. Typischerweise geht aufgrund der Krankheit die Gedächtnisleistung der Patienten zurück. Dies führt zunächst zu einem Verlust des Kurzzeitgedächtnisses, was zu Vergesslichkeit und Desorientierung führt. Mit dem Fortschritt der Erkrankung kommt es neben starken kognitiven Einschränkungen auch zum Verlust motorischer Fähigkeiten [112, Kapitel 4].

Seit Anfang der 80er Jahre konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die fibrillaren Aggregatstrukturen, die den pathologischen Phänotyp der Alzheimererkrankung ausmachen, aus den Tau- und  $A\beta$  Proteinen gebildet werden [112, Kapitel 4, 36, 111]. Die Aggregation dieser beiden Proteine wurde seitdem als Hauptursache für die Degradation der Neuronen gehandelt und intensiv erforscht [112, Kapitel 4].

Tau ist in den Axonen der Neuronen zu finden [109] und ist ein Mikrotubuli assoziiertes Protein, das an diese bindet und sie stabilisiert [36]. Dabei unterstützt es den Transport im Axon [13]. Der C-Terminus des Proteins ist die mikrotubulibindende Domäne und reguliert die Rate der Mikrotubulipolymerisation. Der N-Terminus, die sogenannte Projektionsdomäne wechselwirkt mit den Cytoskelettelementen und bestimmt damit die Abstände der Mikrotubuli im Axon. Dadurch erlaubt Tau den Mikrotubuli mit Elementen des Cytoskeletts zu interagieren und schränkt damit ihre Flexibilität ein [19].

Tau kann an etwa 30 Stellen phosphoryliert werden. Alle Positionen der Phosphorylierung sind außerhalb der mikrotubulibindenden Domäne lokalisiert. Der Phosphorylierungszustand verändert die Eigenschaften von Tau. Phosphoryliertes Tau-Protein ist weniger effizient in der Mikrotubulipolymerisation als nicht phosphoryliertes [8]. Damit kann die Phosphorylierung außerhalb der Mikrotubuli bindenden Domäne die Anreicherung von Tubulin stark beeinflussen [19]. Eine abnormale Phosphorylierung des Tau-Proteins wird als Ursache für die Aggregation gehandelt [109]. Die Phosphorylierung könnte aber auch erst dann einsetzen, wenn sich die Aggregate schon gebildet haben [19]. Unabhängig davon, was ursächlich für die Aggregatbildung ist, häufen sich vor allem hyperphosphorylierte Tau-Monomere in den Aggregaten an.

Daraus folgend ist weniger Tau an die Mikrotubuli gebunden. Die Mikrotubuli depolymerisieren. Dadurch kommt es zu einer Beeinträchtigung des axonalen Transports, zu Dysfunktion an den Synapsen und zur Degradation der Reizweiterleitung [111].

$A\beta$  ist ein Spaltprodukt des in der Zellmembran verankerten „Amyloid Precursor Proteins“ (APP). Die Rolle von  $A\beta$  und APP im Organismus ist bisher ungeklärt. Eine sequentielle Abspaltung generiert  $A\beta$  Fragmente mit unterschiedlicher Anzahl von Aminosäuren. Unter anderem das amyloidogene  $A\beta_{42}$  [47].  $A\beta_{42}$  ist stark hydrophob und aggregiert leicht (auch *in vitro*) ohne äußere Einflüsse in sogenannte „senile Plaques“ [36]. Die Aggregation und Anreicherung von  $A\beta_{42}$  kann aufgrund genetischer Faktoren, aber auch sporadisch erfolgen [112, Kapitel 4]. In beiden Fällen zeigen die Patienten die Symptome der Alzheimererkrankung. Dies führte zu der Hypothese, dass die gesteigerte Produktion und Aggregation von  $A\beta_{42}$  direkt oder indirekt zur Neurotoxizität führt [50].

### 2.3. $\alpha$ -Synucleinopathien/Parkinson

Parkinson ist eine Erkrankung, die in fortgeschrittenem Stadium vor allem zu motorischen Beeinträchtigungen führt. Als erstes wurde die Erkrankung 1817 vom britischen Arzt James Parkinson beschrieben [97]. Die Krankheitsursache wurde einige Jahre später durch Tretiakoff (1919) und Brissaud (1925) entdeckt, die durch Autopsien Veränderungen in der Substantia Nigra der Patienten fanden [79]. Erst 1960 konnte gezeigt werden, dass diese Tatsache zu einem Rückgang des Dopaminhaushalts und somit unmittelbar zu einer Einschränkung der Reizweiterleitung führt [112, Kapitel 5]. Unabhängig davon wurden schon 1912 von Friedrich Lewy größere Aggregatstrukturen (Lewy-Körperchen) in den Neuronen entdeckt [82]. Erst achtzig Jahre später konnte gezeigt werden, dass diese aus fehlgefaltetem  $\alpha$ -Synuclein bestehen. Ein Protein, das in allen Typen von Neuronen vorkommt. Auch hier ist der Zusammenhang zwischen den Ablagerungen und dem Verlust der Neuronen bisher nicht geklärt [112, Kapitel 5].

Der größte Risikofaktor an Parkinson zu erkranken ist das Alter. So sind nur etwa ein Prozent der 65-Jährigen von der Krankheit betroffen, bei den über 85-Jährigen sind es schon fünf Prozent [36]. Die Krankheit bricht meist sporadisch aus. Es gibt aber auch Umweltfaktoren, die Parkinson auslösen können, wie z.B. das Pestizid Rotenone oder das Herbizid Paraquat [117]. Genetische Mutationen führen zu einer frühen Erkrankung der Betroffenen, häufig sogar schon Mitte zwanzig oder Anfang dreißig [112, Kapitel 5].

Mit fortschreitender Krankheit kommt es zu einem Rückgang dopaminerzeugender Neuronen in der Substantia Nigra. Die Basalganglien integrieren und filtern Bewegungsinformationen bevor sie an die primär- und supplementär-motorische Rinde weitergegeben werden. Sie wirken dabei permanent hemmend auf die Reizweiterleitung. Erst die Ausschüttung von großen Mengen Dopamin verursachen eine

Weiterleitung der motorischen Information. Der Rückgang der Dopamin produzierenden Neuronen führt zu einer verringerten Dopaminausschüttung in den Neuronen, die an der motorischen Reizweiterleitung beteiligt sind. Dies führt zu einer permanenten Hemmung der Bewegung und erklärt deren Fehlsteuerung [112, Kapitel 5]. Die Symptome sind der für die Krankheit typische Tremor und ein insgesamt langsamer (Bradykinese) und steifer (Rigor) Bewegungsapparat sowie die posturale Instabilität. Neben den motorischen Einschränkungen, kommt es im Endstadium der Erkrankung auch zum Verlust kognitiver Fähigkeiten. Zur Symptombekämpfung wird den Patienten u.a. Dopamin (L-DOPA) verabreicht, um den Dopaminhaushalt zu erhöhen. Dies lässt die Patienten einige Jahre nahezu symptomfrei leben. Ein Medikament, das die Krankheitsursache bekämpft, ist bisher nicht erhältlich, da diese noch weitestgehend unbekannt ist [112, Kapitel 5].

Die Pathogenese der Parkinsonerkrankung ist die erhöhte Expression, Aggregation und Ablagerung von  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen in den Neuronen, sogenannte Lewy-Körperchen. Transgene Mäuse, die mutantes  $\alpha$ -Synuclein überexprimieren, zeigen sowohl pathologische Aggregate, als auch Neurodegeneration [87].  $\alpha$ -Synuclein ist ein kleines präsynaptisches Protein, dessen genaue Funktion ungeklärt ist. Wie das Tau-Protein geht es eine konformelle Änderung von einem nahezu strukturlosen Protein hin zu einer  $\beta$ -Faltblattstruktur ein. Diese Konformation fördert die Aggregation [36]. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Verlust dopaminerger Neuronen und der Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein besteht bisher nicht. Vieles deutet aber darauf hin, dass Intermediate bei der Bildung von Fibrillen zelltoxisch wirken können [94].

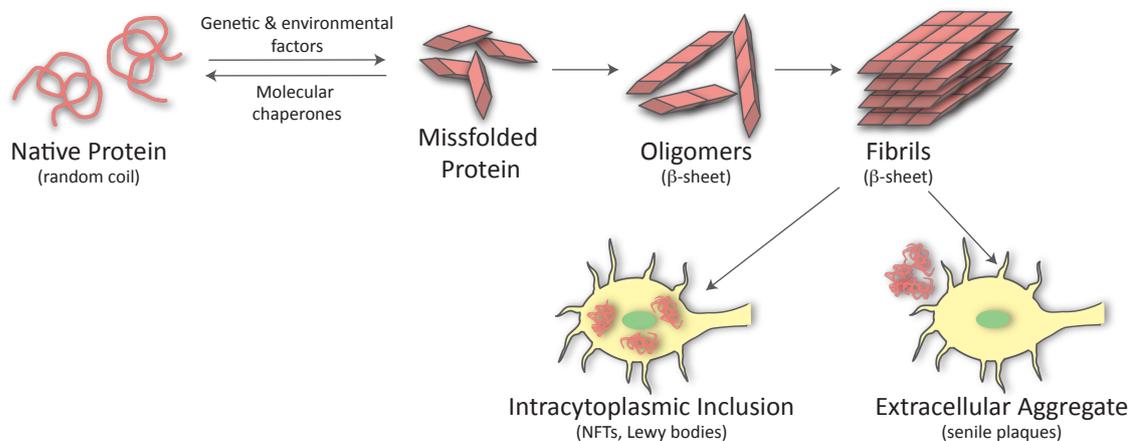
## 2.4. Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Proteinaggregation

Die Proteinaggregation ist eine Gemeinsamkeit der neurodegenerativen Erkrankungen [36]. Obwohl der direkte Zusammenhang zwischen dem Rückgang der Gedächtnisleistung und der Anhäufung sogenannter Amyloide bisher ungeklärt ist [43], wird die Aggregation der einzelnen Proteine intensiv erforscht [111]. Die meiste Literatur existiert zu  $A\beta_{42}$ . Aggregatstrukturen (senile Plaques) dieses Proteins werden bei der Alzheimerkrankheit extrazellulär gefunden [36]. Die Aggregation von  $A\beta_{42}$  erfolgt über mehrere Stufen [49, 36]. Die Amyloide sind dann das Endstadium des Aggregationsprozesses. Die Proteinmonomere bilden dabei Fibrillen mit Cross- $\beta$ -Struktur, wobei die Proteine senkrecht zur Fibrillenachse stehen. Diese für Amyloidstrukturen typische Anordnung kann auch für andere Proteine gefunden werden. Der Begriff der Amyloidbildung ist hier ebenfalls gebräuchlich [49]. Die Aggregation der Proteine in fibrillare Strukturen (Amyloide) wird zunächst anhand von  $A\beta_{42}$  erklärt, bevor auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu Tau und  $\alpha$ -Synuclein eingegangen wird.

In Abbildung 2.1 sind die einzelnen Schritte des Aggregationsprozesses schematisch dargestellt [36]. Genetische oder Umgebungsfaktoren führen zu einer Fehlfaltung

## 2. DPP-Derivate als „Wirkstoff“ gegen neurodegenerative Erkrankungen

des Ausgangsproteins [50]. Dies wird natürlicherweise durch molekulare Chaperone verhindert. Chaperone sind Hilfsproteine, die an bestimmten Stellen eines Proteins nach der Translation binden und es damit vor schädlichen Kontakten bewahren. Sie „helfen“ so dem Protein sich korrekt zu falten [36, 51]. Die Fehlfaltung eines Proteins kann jedoch nicht immer verhindert werden. Die fehlgefalteten Proteine haben die Eigenschaft sich miteinander zu vereinen zu größeren oligomeren Strukturen [49]. Diese und die fehlgefalteten Proteine werden mit Ubiquitin markiert und vom Proteasom abgebaut [33], oder sie werden durch Autophagocytose zerstört [43]. Eine Überexprimierung fehlgefalteter Proteine, z.B. aufgrund eines Gendefekts, führt dazu, dass dieser natürliche Abbaumechanismus nicht mehr alle fehlerhaften Proteinstrukturen erfasst [43]. Dadurch bilden sich zunächst Multimere und daraus

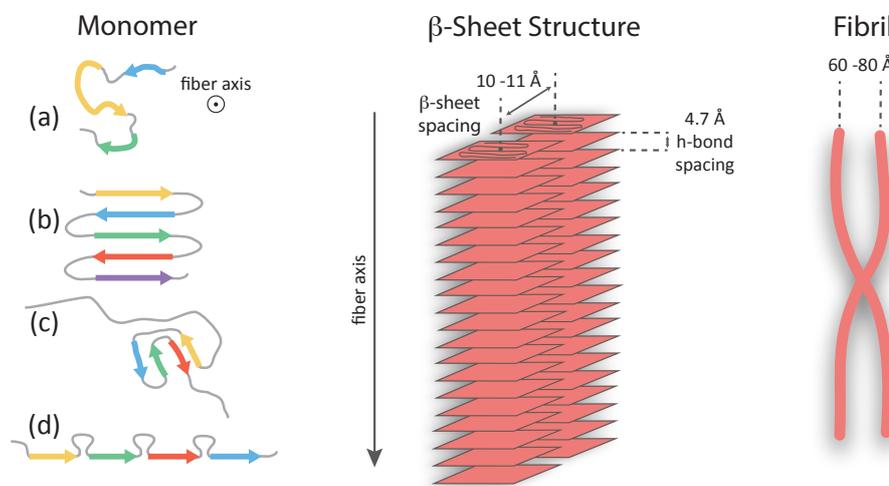


**Abbildung 2.1.:** Aggregationszyklus vom Monomer über dessen fehlgefaltete Form hin zum großen Aggregatkomplex. Dieser Prozess ist für das pathogene Prion-Protein sowie für Tau,  $A\beta_{42}$  und  $\alpha$ -Synuclein zu finden. Die Fibrillen bilden abhängig vom Protein entweder intrazytoplasmische- oder extrazelluläre Aggregatkomplexe. Grafik modifiziert übernommen aus [36].

Fibrillen mit  $\beta$ -Faltblattstruktur [49]. Die Fibrillen lagern sich zu großen Aggregatkomplexen zusammen, wie im Fall von  $A\beta_{42}$  zu extrazellulären senilen Plaques [36]. Die Fibrillenbildung ist damit ein mehrstufiger Prozess, wobei schon gebildete Strukturen wieder zerfallen [21] können. Üblicherweise setzt die Fibrillenbildung verzögert ein, was darauf schließen lässt, dass es sich um einen Keimbildungsprozess handelt [33].

Anhand verschiedener Modellpeptide wurde die Bildung von Amyloiden genauer untersucht und in [49] zusammengefasst: *In vitro* eingesetzte Aggregationskeime, wie z.B. schon bestehende Fibrillen, beschleunigen die  $\beta$ -Faltblattstrukturbildung. Außerdem begünstigt die partielle Denaturierung der Proteine den Prozess. Die Zugabe von Ionen oder der Einsatz von Scherströmungen beeinflusst die Morphologie der Fibrillen positiv. Untersuchungen an  $A\beta_{40}$  haben gezeigt, dass die Geschwindigkeit

der Fibrillenbildung von der Konzentration der Monomere in der Lösung abhängig ist. Aus Untersuchungen an Proteinfragmenten des  $A\beta_{40}$  konnte gezeigt werden, dass eine Region im hydrophoben Kern der Proteinsequenz ausschlaggebend für die Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen ist. In allen stark bindenden Sequenzen war  $A\beta_{16-20}$  (KLVFF) enthalten. Dabei ist  $A\beta_{14-23}$  das kürzeste Fragment, das noch eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbildet [53]. Auch in  $A\beta_{42}$  neigt diese Region zur Aggregation. Diese Sequenz nimmt damit bevorzugt eine  $\beta$ -Strangkongformation ein [62]. In Abbildung 2.2 (a) ist die Topologie der  $A\beta_{42}$ -Monomere innerhalb der Fibrille gezeigt. Xiao et al. [134] schlagen als Modell eine Struktur mit drei  $\beta$ -Faltblattsegmenten vor, die sich S-förmig anordnen. Die  $\beta$ -Faltblätter liegen auch hier senkrecht zur Wachstumsrichtung der Fibrille.



**Abbildung 2.2.:** Aufbau einer Fibrille: Die  $\beta$ -Faltblätter lagern sich rechtwinklig zur Wachstumsrichtung der Fibrille an. Der Abstand zwischen zwei  $\beta$ -Strängen beträgt 10-11 Å, der Abstand zwischen zwei Monomeren 4.7 Å [108]. (a)-(d) Anordnung der Monomere in der Fibrille (a)  $A\beta_{42}$ , (b) und (c)  $\alpha$ -Synuclein, (d) Tau. Modelle aus [134, 123, 121, 125].

Im Zusammenhang mit der neuronalen Dysfunktion wurde auch eine potentielle Toxizität der Aggregate untersucht [111]. Dabei wurde im Besonderen die intermediäre Spezies der Oligomere als toxisch eingestuft. Oligomere können strukturell verschieden sein. Fibrillare Oligomere haben eine  $\beta$ -Faltblattstruktur wie Fibrillen. Prefibrillare Oligomere haben intermediären Charakter. Sie sind Vorläufer für Oligomere, die eine ringförmige Struktur mit einer Pore in der Mitte bilden [42]. Fibrillen sind nicht obligatorisch für die Krankheiten [130]. Es gibt auch Hinweise darauf, dass Fibrillen protektiv für die Neuronen wirken [4, 9].

Eine Ursache für die Toxizität der Oligomere könnte die Porenbildung sein [3]. Die Protofilamente haben hydrophobe Oberflächen, die sonst im  $\beta$ -Faltblatt der kompletten Fibrille versteckt sind [96]. Die hydrophoben, positiv geladenen Regionen der Oligomere wechselwirken mit den negativ geladenen Lipidmembranen. Es existieren

auch Zelloberflächenproteine, die  $A\beta$  Oligomere binden wie z.B. das APP. Dadurch könnten sie Poren in der Membran bilden [42, 49]. Dies könnte zu einer Deformation der Zellmembran führen und eine Kaskade an Reaktionen nach sich ziehen, wie z.B. ein Anstieg des Kalziumgehalts in der Zelle, Änderung der Ionenkanalfunktion, Produktion von Sauerstoffradikalen, Modulation der Reizweiterleitung und Dysfunktion der Mitochondrien um nur einige wenige zu nennen. Welche hierbei direkt von der  $A\beta$  Aggregation beeinflusst werden bleibt weiterhin unklar [42].

### 2.4.1. Das Tau-Protein

Neben den Ablagerungen extrazellulärer seniler Plaques treten bei der Alzheimerkrankheit auch intrazelluläre Aggregate auf. Die sogenannten Neurofibrillenbündel<sup>1</sup> bestehen zum größten Teil aus Tau-Protein [19]. Da jede Neurofibrille aus zwei Filamenten besteht, die sich helikal umeinander anordnen, wurden sie von Kidd et al. als „paired helical filaments“ (PHF) bezeichnet. Viele dieser PHFs bilden größere Aggregatkomplexe und schließlich die charakteristischen Neurofilamente [67].

Das native Tau-Protein hat keine Sekundärstruktur<sup>2</sup> [107]. In Gegenwart von Mikrotubuli reichert sich Tau an der Oberfläche an und nimmt eine ähnliche Konformation wie in den PHFs ein. Allerdings bildet es hier keine Filamente aus. Es bleibt fast ausschließlich in einer „random coil“ Struktur und bedeckt einen Großteil der Oberfläche [124].

Schweers et al. konnten zeigen, dass nur ein kleiner Anteil der pathogenen PHFs in einer  $\alpha$ -Helix oder einem  $\beta$ -Faltblatt vorliegt [107]. In [124] wurde die  $\alpha$ -Helix als Hauptkomponente der PHFs bestätigt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass eine kurze Sequenz des Tau-Proteins die Tendenz hat eine  $\beta$ -Struktur zu bilden. Diese Motive liegen in der „repeat domain“ des Proteins zwischen N- und C-Terminus [20] und bestehen aus relativ hydrophoben Residuen. N- und C-Terminus behalten dabei ihre „random coil“ Struktur. Die  $\beta$ -Faltblattstrukturen dieser Domänen lagern sich rechtwinklig zur Wachstumsrichtung der PHFs an, während N- und C-Terminus sich undefiniert in einer sogenannten „fuzzy coat“-Struktur darum anordnen (siehe Abbildung 2.2 (d)) [125]. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur bestimmt dadurch den Kern der PHFs [20, 85]. Lagern sich die PHFs zu den größeren NFT-Strukturen an, gewinnt sie an Signifikanz. Damit wird Tau ebenfalls zu den amyloiden Strukturen gezählt [124]. Wie bei  $A\beta_{42}$  gibt es auch im Fall der Tau-Aggregation wenig Hinweise darauf, dass die Fibrillen toxisch auf die Zellen wirken. Vielmehr wurde hier die Theorie verfolgt, dass schon die kleineren oligomeren Strukturen die eigentlich toxische Spezies sind [109].

Das pathogene Tau kann eine verkürzte Aminosäuresequenz innerhalb der Kernstruktur („repeat domain“) der PHFs besitzen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass dieses verkürzte Protein normales, lösliches Tau in eine oligomere Struktur kataly-

---

<sup>1</sup>engl. Neuro Fibrillary Tangles (NFT)

<sup>2</sup>engl. random coil

sieren kann. Das normale Tau-Protein ist in Gegenwart dieses verkürzten „Primers“ nicht in der Lage an die Mikrotubuli zu binden. Stattdessen aggregiert es bevorzugt in pathogene PHFs. Oligomere Strukturen dieser Spezies sind resistent gegen cytosolische Protease. Sie können bis zu den Synapsen gelangen und es wird angenommen, dass sie transsynaptisch weitergegeben werden. Damit könnte Tau direkt an der Verbreitung pathogener Proteine in noch gesunde Neuronen beteiligt sein [109].

Warum bei der Alzheimerkrankheit die Aggregation der beiden Proteine  $A\beta_{42}$  und Tau parallel auftritt ist bisher nicht geklärt [85]. Auch ist unklar, ob die Aggregation von Tau durch die Aggregation von  $A\beta_{42}$  induziert wird. Aus transgenen Mausmodellen ist aber bekannt, dass die Aggregation von Tau nicht eine einfache Folge der  $A\beta_{42}$  Aggregation ist. Die Tau-Aggregation wird damit als von  $A\beta_{42}$  unabhängige Ursache für die Neurodegeneration gehandelt. [85].

### 2.4.2. $\alpha$ -Synuclein

Das Protein  $\alpha$ -Synuclein bildet in der Pathogenese der Parkinsonerkrankung intrazelluläre Ablagerungen, sogenannte Lewy-Körperchen aus. Das sind größere Aggregatstrukturen, die sich aus fibrillaren Strukturen zusammensetzen [111]. Unter physiologischen Zellkonditionen nimmt  $\alpha$ -Synuclein wie Tau eine „random coil“ Struktur ein [16]. Gebunden an negativ geladene Membranen (Zellmembran) hat  $\alpha$ -Synuclein eine  $\alpha$ -helikale Struktur [68]. Die Aggregation in Fibrillen mit großem Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen erfolgt über einen mehrstufigen Prozess, wie er in Abbildung 2.1 dargestellt ist. Dabei bilden sich auch hier oligomere Intermediate aus, die zu größeren Fibrillen aggregieren [36].

$\alpha$ -Synuclein ist ein relativ großes Protein mit 140 Aminosäuren und elf repetitiven Domänen (NAC-Region) [94]. Die repetitive Domäne wird von 89 Residuen des gesamten Proteins gebildet. Mutationen, die zu einer abnormen Faltung des Proteins führen, sind auch an dieser Stelle zu finden [94]. Diese Domänen sind verantwortlich für die Aggregation des Proteins in  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Aus EPR<sup>3</sup>- und Festkörper-NMR<sup>4</sup>-Messungen ist bekannt, dass Residuen zwischen 31-109 bevorzugt ein  $\beta$ -Faltblatt bilden. Der N-Terminus (30 Residuen) hat eine heterogene Struktur, während der C-Terminus (30 Residuen) flexibel ist.

Nach einem Modell von M. Vilar et al. [123] lagern sich die  $\beta$ -Faltblätter senkrecht zur Wachstumsrichtung der Fibrille (siehe Abbildung 2.2 (b)) aneinander an. Dabei stapeln sich fünf  $\beta$ -Faltblätter in einer Kette übereinander.  $\beta_1$  und  $\beta_5$  sind dabei dem Lösungsmittel ausgesetzt. Die fünf einzelnen Segmente werden immer aus den gleichen Residuen gebildet, die innerhalb von 30-110 liegen. Die meisten Amide in der repetitiven Domäne, welche die  $\beta$ -Faltblattstruktur bilden, sind vor der Umgebung, z.B. dem Lösungsmittel, geschützt. Fast alle Residuen des C- und N-Terminus sind dem Lösungsmittel ausgesetzt. Es existiert folglich in jeder größeren Aggregat-

---

<sup>3</sup>engl. Electron Paramagnetic Resonance

<sup>4</sup>engl. Nuclear Magnetic Resonance

struktur, die  $\beta$ -Faltblattstrukturen beinhaltet, ein vom Lösungsmittel abgeschirmter hydrophober Kern [123]. Tuttle et al. [121] schlagen ein etwas anderes Modell für die Fibrillenbildung vor. Zwar ist die Lage der  $\beta$ -Faltblätter hier auch senkrecht zur Wachstumsrichtung, die Monomere in der Fibrille nehmen aber eine „Greek-Key“ Topologie ein (siehe Abbildung 2.2 (c)), anstelle einer einfachen Meander-Struktur, wie in Vilar et al. gezeigt [123]. Auch hier liegt die hydrophobe NAC-Domäne innerhalb des Kerns der Fibrille [98].

Genetische oder Umgebungsfaktoren führen zur Fehlfaltung und Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein, wie in Abbildung 2.1 gezeigt. Dabei bildet die Ablagerung der Fibrillen in den Lewy-Körperchen das Endstadium des Prozesses [36]. Vieles deutet darauf hin, dass die oligomeren Intermediate die eigentlich zelltoxischen Spezies sind [54]. Deshalb sind die Oligomere Gegenstand intensiver Forschung und ihr Entstehungsprozess wird kontrovers diskutiert. Oligomere sind Intermediate der Aggregation und aus diesem Grund extrem schwer zu isolieren. Sobald die Konzentration an Protein ein bestimmtes Level erreicht hat, konvertieren sie sofort in Fibrillen. Diese sogenannten „on-pathway“ Oligomere setzen sich wie die Fibrillen aus einer  $\beta$ -Faltblattstruktur zusammen [68].

Die Zugabe von Metallionen oder Lipiden kann stabile Intermediate hervorrufen [71, 68]. Oligomere, die durch solche Additive erzeugt werden, wirken aber nicht als Keime für die Aggregation des Wild-Typs. Sie werden deshalb als „off-pathway“ Oligomere bezeichnet [68].

Die „on-pathway“ Oligomere werden als die toxische Spezies gehandelt. Sie können auch als Keime für die Aggregation in Fibrillen *in vitro* eingesetzt werden. Im Unterschied zu den Fibrillen haben sie eine antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur [68]. Analog zu einigen amyloiden Oligomeren besitzen die  $\alpha$ -Synuclein Oligomere eine zylindrische Form mit einem Loch in der Mitte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Oberfläche der Oligomere stark hydrophob ist, wie es auch schon für  $A\beta_{42}$  gefunden wurde [23].

Ein möglicher Weg der Toxizität ist die Fähigkeit der  $\alpha$ -Synuclein Oligomere Poren in der Zellmembran zu bilden. *In vitro* Messungen haben gezeigt, dass die Oligomere stark negative Membranen durchbrechen können [23]. Es gibt zwei Modelle der Porenformation: (i) Die Bindung von  $\alpha$ -Synuclein Monomeren an der Membran führt zur Porenbildung. Dabei bleibt die  $\alpha$ -Helixstruktur erhalten. Die Bildung von Pentameren und Hexameren führt dann zu einer Ringstruktur. (ii) Das „Barrel-Modell“ sieht die Bildung von Poren durch schon fertige Oligomere vor. Diese binden mit einer antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur an die Membran. Die Änderung in der Membranstruktur kann z.B. zu einem Anstieg des  $Ca^{2+}$  Levels in der Zelle führen [94].

Verschiedene Dysfunktionen der Neuronen stehen in Verbindung mit dem intrazellulären, pathogen aggregierten  $\alpha$ -Synuclein, wie die Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems, Änderungen in der Freisetzung synaptischer Vesikel, Schädigung der Mitochondrien und die Bildung von Poren. Es wurde aber auch extrazelluläres

$\alpha$ -Synuclein gefunden, das via Exocytose ins extrazelluläre Cytoplasma gegeben wird. Dies könnte eine Weitergabe der pathogenen Strukturen in weitere noch gesunde Neuronen bedingen [94]. Die zu Oligomeren aggregierten  $\alpha$ -Synuclein Proteine sind dadurch befähigt die Ausbreitung der Aggregate zu beschleunigen.

Die Aggregation der Proteine, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert werden, folgt nach einem ähnlichen Schema. Es bilden sich zunächst Intermediate aus, die in folgenden Schritten zu großen Aggregatstrukturen akkumulieren und den Phänotyp der Krankheiten ausmachen. Die Oligomere wurden dabei als toxische Spezies gehandelt, welche die Degeneration der Neuronen auf noch nicht geklärte Weise bedingen. Ob die pathologische Veränderung der Proteine ursächlich für die Krankheiten ist, ist nicht geklärt. Da die Aggregation der Proteine aber charakteristisch für die Krankheiten ist, stellt sie Angriffspunkt für eine mögliche Therapie dar. Im folgenden Abschnitt wird das neue potentielle Therapeutikum „anle138b“ vorgestellt, das genau dies zum Ziel hat: Die Hemmung der Aggregation der Proteine zu Oligomeren (und Fibrillen). Ist dieses Molekül in seinem Therapieansatz erfolgreich, wäre dies auch ein starkes Argument für die Gültigkeit der Oligomertheorie.

## 2.5. Das Molekül anle138b

Die Inhibition der Aggregatbildung als mögliche Therapieform gegen neurodegenerative Erkrankungen wird in der Literatur viel diskutiert [16 50, 109]. Gerade die Oligomertheorie, die kleinere Aggregatstrukturen als die eigentliche toxische Spezies identifiziert, legt eine Behandlung mit anti-aggregativen Substanzen nahe [16, 12]. Allerdings ist es eine Herausforderung die richtige Struktur zu finden, die alle Kriterien erfüllt: eine anti-aggregative Funktion, keine toxischen Wirkungen, eine gute Bioverfügbarkeit sowie die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [127].

Die Identifizierung einer Substanz, die all diese Kriterien erfüllt, setzt eine systematische Suche voraus. Zu diesem Zweck wurde am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung in München in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen eine Screening-Methode (SIFT<sup>5</sup>) angewandt [41], die im Schnellverfahren die anti-aggregative Wirkung hunderter Substanzen testen kann. Als Protein, dessen Aggregation verhindert werden soll, wurde das Prion-Protein verwendet. Trotz seiner Toxizität fiel die Wahl auf dieses Protein, da seine Aggregation leicht mithilfe von Fluoreszenzmarkern nachzuvollziehen ist. Das pathogene PrP<sup>SC</sup> bindet direkt an das native PrP<sup>C</sup>, wodurch es zu einer Akkumulation der beiden Proteine kommt. Außerdem ist eine weitere Untersuchung des potentiellen Medikaments, die auch seine Wirksamkeit *in vivo* beinhaltet, an Prion erkrankten Mäusen am schnellsten durchzuführen. Der Krankheitsverlauf ist sehr kurz und weicht wenig von dem des Menschen ab [128].

---

<sup>5</sup>engl. Scanning for Intensely Fluorescent Targets

Das Verfahren beruht auf der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS<sup>6</sup>) [6]. Menschliches PrP<sup>SC</sup> wird über einen Antikörper mit rotem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Eine Bindung des Antikörpers an die Aggregate aus humanem PrP<sup>SC</sup> führt daher zu roter Fluoreszenz des Aggregatkomplexes. Prion-Protein einer Maus rPrP wird mit grünem Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnet. Bindet rPrP an PrP<sup>SC</sup> wird gleichzeitig rote und grüne Fluoreszenz detektiert. Wird die Bindung von PrP<sup>SC</sup> und rPrP durch die Zugabe eines Inhibitors verhindert, ist verstärkt nur rote Fluoreszenz zu sehen. Das Molekül DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetat), das die Aggregation von rPrP und PrP<sup>SC</sup> inhibiert, wurde als Standard verwendet. Eine Substanz wurde als wirkungsvoll eingestuft, wenn sie etwa 50% des Effekts von DOSPA erreichte [6]. Dieses Verfahren ist sehr sensitiv und kann aufgrund dessen in kleinsten Volumen ( $\mu\text{L}$ ) mehrere Substanzen in kürzester Zeit testen. Dadurch konnten über zehntausend Substanzen untersucht werden. Davon zeigten Derivate der Diphenylpyrazole das gewünschte Resultat.

Etwa 150 Substanzen dieser Klasse mit verschiedenen Eigenschaften wurden in Zellkulturen und Mausmodellen weiter auf Wirksamkeit als Inhibitor untersucht [128]. Die Hauptstruktur der DPPs, bestehend aus einem Pyrazol- und zwei Phenylringen (siehe Abbildung 2.3 (a), Mitte) weist auf eine gute metabolische Stabilität und Bioverfügbarkeit hin. Tatsächlich konnte sich eine der Substanzen, anle138b, in allen Kriterien durchsetzen, wobei die hohe *in vivo* Aktivität ausschlaggebend für das gute Abschneiden der Substanz in den ersten Tests war [128].

Ausgehend von anle138b (Abbildung 2.3 (a), Mitte) kann durch Variation der einzelnen Gruppen, bezeichnet mit R1, R2 und R3 in Abbildung 2.3 (a) die Abhängigkeit der Aktivität von der Struktur gezeigt werden. Das Brom in R3 an der *meta*-Position führt zur höchsten Aktivität der Struktur als Inhibitor. Eine Verschiebung des Broms an die *para*- oder *ortho*-Position reduziert den Effekt oder lässt ihn sogar ganz verschwinden. Die Substitution an der *meta*-position mit anderen Halogenen führt zu keiner Verbesserung der Aktivität gegenüber anle138b. An der Position R2 zeigt das Pyrazol die beste Wirkung. Die Substitution am 3'-Phenylring ist vergleichsweise komplex, da eine Änderung an dieser Position die Bioverfügbarkeit im Gehirn beeinflusst. Das 1,3-Benzodioxol zeigt hier die höchste Aktivität und bestätigt damit die Struktur von anle138b als besten Inhibitor [128].

Abbildung 2.3 (b) fasst die Resultate zu dieser Untersuchung noch einmal zusammen. Die prozentuale Inhibition der Akkumulation von PrP<sup>SC</sup> im Gehirn der erkrankten Mäuse wurde aus dem Verhältnis zu einer unbehandelten Referenz gebildet. Dazu wurde der Gehalt zu verschiedenen Zeiten nach Infektion und Krankheitsbeginn in Milz oder Gehirn bestimmt (<sup>a</sup>Gehalt im Gehirn 120 Tage nach Infektion nach 40 Tagen Behandlung, <sup>b</sup>Gehalt im Gehirn nach 106 Tagen Infektion nach 24 Tagen Behandlung und <sup>c</sup>Gehalt in der Milz 35 Tage nach Infektion und 34 Tage nach Behand-

---

<sup>6</sup>engl. Fluorescence Correlation Spectroscopy

lung). Hierbei zeigt sich, dass beispielsweise die Derivate *anle197b* (I), *sery335b* (Cl), *anle186b* (F) und *sery313b* (OH), bei denen das Brom in der *meta*-Position durch ein anderes Halogen oder eine OH-Gruppe substituiert ist, unterschiedliche inhibitorische Wirkung erzielten. Dabei setzt sich *anle138b* klar gegenüber den anderen Substanzen durch [127]. Alle fünf Substanzen werden in dieser Arbeit genauer untersucht, wobei aufgrund ihres interessanten fluoreszenzspektroskopischen Verhaltens der Fokus auf *anle138b*, *anle186b* und *sery313b* gelegt wird.

Die Tiermodelle zeigen nicht nur einen Rückgang der Akkumulation von PrP<sup>SC</sup> durch die Therapie mit *anle138b*, sondern auch eine Verlängerung der Überlebenszeit der Tiere (siehe Abbildung 2.3 (c) und (d)) [128]. Die mittlere Verlängerung Überlebenszeit der Mäuse betrug bis zu 73 Tage bei einer Behandlung ab dem 80. Tag nach der Infektion (51 Tage bei einer Behandlung ab dem 120. Tag nach Infektion, siehe Tabelle 2.1) [127]. Darüber hinaus zeigten gesunde Mäuse keine toxischen Nebenwirkungen [127].

Analog zum oben beschriebenen Vorgehen, wurden die anti-aggregative Wirkung einiger ausgewählter DPP-Substanzen für  $\alpha$ -Synuclein und Tau Aggregate mithilfe der SIFT-Methode getestet. In einem Zellkultur Essay und einem Tiermodell konnte sich auch hier *anle138b* als geeignete Struktur durchsetzen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Akkumulation von Proteinaggregaten im Gehirn der Mäuse durch die Verabreichung von *anle138b* reduziert [128, 129].

**Tabelle 2.1.:** <sup>a</sup>Verlängerung der Überlebenszeit bzw. <sup>b</sup>symptomfreie Lebenszeit der mit *anle138b* therapierten Mäuse.

Prion <sup>a</sup>	$\alpha$ -Synuclein <sup>b</sup>	Tau <sup>a</sup>
73d (80dpi)	70d (56dpi)	41d (0dpi)
51d (120dpi)	66d (350dpi)	

Transgene Parkinsonmäuse (A30P-hum- $\alpha$ -syn. Mäuse) zeigen die ersten Symptome erst nach etwa 350 Tagen. Die Therapie mit *anle138b* ab dem 56. Tag nach Geburt der Tiere führte zu einer Verlängerung der symptomfreien Überlebenszeit von 70 Tagen [128]. Bei einer Therapie ab Krankheitsbeginn (350 Tage) kann eine symptomfreie Überlebenszeit von 66 Tagen erzielt werden (siehe Tabelle 2.1). Der Beginn der Behandlung scheint somit nicht ausschlaggebend für den Erfolg der Therapie zu sein [80]. Tau transgene Mäuse (PS19 Mäuse) wurden nach dem Absetzen von der Mutter mit *anle138b* behandelt. Dies führte zu einer Verlängerung der Überlebenszeit von 41 Tagen [129].

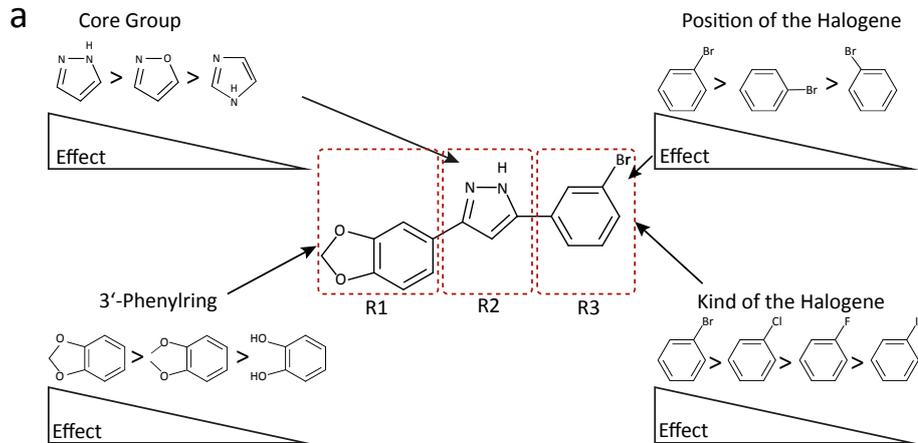
In allen drei Fällen konnte gezeigt werden, dass sich der prozentuale Anteil an oligomeren Strukturen im Gehirn der erkrankten Mäuse durch die Therapie reduziert. Gleichzeitig kam es zu einer Regeneration der betroffenen Hirnareale und zu einem Rückgang der Symptome [128, 129].

## *2. DPP-Derivate als „Wirkstoff“ gegen neurodegenerative Erkrankungen*

---

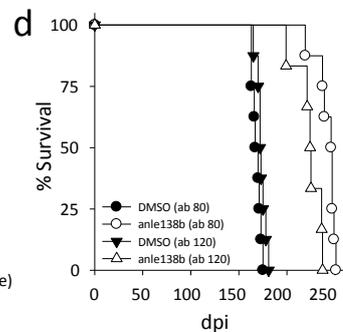
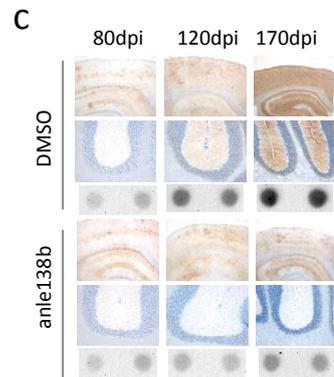
Das Ergebnis dieser erfolgreichen Therapie unterstützt die Oligomertheorie, nach der präfibrillare Strukturen die toxische Ursache sind, die das Absterben der Neuronen bedingt. Damit ist anle138b nicht nur ein vielversprechendes Medikament, sondern unterstützt auch die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen und trägt zu neuen Erkenntnissen bei.

Inwiefern anle138b tatsächlich auf molekularer Ebene mit den pathogenen Aggregaten wechselwirkt, geht aus den klinischen Untersuchungen nicht hervor. Hier setzt die Fluoreszenzspektroskopie an, um eine direkte Interaktion nachzuweisen.



**b**

Compound	R1	R2	R3	Inhibition of PrP <sup>Sc</sup> (%)
anle138b				65 <sup>a</sup> , 107 <sup>b</sup> , 49 <sup>c</sup>
sery335b				61 <sup>a</sup> , 41 <sup>c</sup>
sery313b				33 <sup>c</sup>
anle186b				21 <sup>b</sup>
anle197b				<5 <sup>c</sup>



<sup>a</sup>PrP<sup>Sc</sup> level in brain 120 dpi and treatment for 40d, oral, peanut butter

<sup>b</sup>PrP<sup>Sc</sup> level in brain 106 dpi and treatment for 24d (14d i.p.; 2x5d oral by gavage)

<sup>c</sup>PrP<sup>Sc</sup> level in spleen 35 dpi and treatment for 34d, oral, peanut butter

**Abbildung 2.3.:** (a) Darstellung der strukturabhängigen Aktivität von anle138b und Derivaten. Die Struktur kann am 3'-Phenylring R1, an der Kerngruppe R2 oder am zweiten Benzolring R3 verändert werden. Veränderungen an R3 sind entweder Art des Halogens oder seine Position. (b) Inhibition von PrP<sup>Sc</sup> bzgl. einer nicht behandelten Referenz für verschiedene DPP-Derivate. Die Derivate unterscheiden sich nur an R3 durch die Art der Substitution an der *meta*-Position. (c) Schnitt durch neuronales Gewebe einer mit Prionen infizierten Maus. Oben: nach der Behandlung mit DMSO. Unten: nach der Behandlung mit anle138b, 80, 120 und 170 Tage nach der Infektion. Je dunkler die Färbung, desto mehr Aggregate sind in dem Schnitt vorhanden. (d) Überlebenszeit Prion infizierter Mäuse, die mit DMSO (schwarze Kreise und Dreiecke) oder mit anle138b (durchsichtige Kreise und Dreiecke) behandelt wurden. Modelle und Grafiken modifiziert übernommen aus [127].



# KAPITEL 3

---

## Die Fluoreszenzspektroskopie

---

Die Fluoreszenz ist ein wichtiges Instrument zur Untersuchung biologischer Proben, wie Proteine, Membrane oder sogar ganze Zellen. Der größte Teil der fluoreszenzbasierten Untersuchungen ist in der Mikroskopie zu finden [77]. Hier werden typischerweise stark fluoreszierende Farbstoffe oder Proteine wie das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) direkt in Zellen oder Zellkomponenten eingebracht und dadurch Strukturen aufgeklärt [119, 29]. Zur Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen in *in vitro* Messungen werden oft intrinsische Fluoreszenzen einzelner Aminosäuren, wie Tryptophane oder Tyrosine, herangezogen [91].

Die Fluoreszenz intrinsischer (Aminosäuren) oder extrinsischer Farbstoffe wird auch zur Untersuchung der Proteinaggregation eingesetzt. Bekannteste Marker der Proteinaggregation sind Thioflavin T (ThT) und 1-Anilidonaphthalen-8-Sulfonsäure (1,8-ANS, im Folgenden ANS) und deren Derivate [91, 52]. Die Fluoreszenz der Moleküle wird nicht nur für den Nachweis von fibrillaren oder oligomeren Aggregatstrukturen verwendet, sondern es können auch ganze Aggregationszyklen beobachtet werden [57]. Grundlage der Detektionsmöglichkeit veränderter Proteinstrukturen sind die speziellen Fluoreszenzeigenschaften der Fluorophore. Die Änderung der direkten Umgebung der Moleküle ist dabei wichtigster Faktor.

In diesem Kapitel werden die Grundlagen, die zu einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von Molekülen führen, zunächst allgemein genannt. Die stationäre und zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz liefert die dafür grundlegenden Daten. Beide Messmethoden werden im folgenden Abschnitt genauer beschrieben. Abschließend wird auf die beiden, speziell für die Proteinaggregation wichtigen, Substanzen ThT und ANS genauer eingegangen.

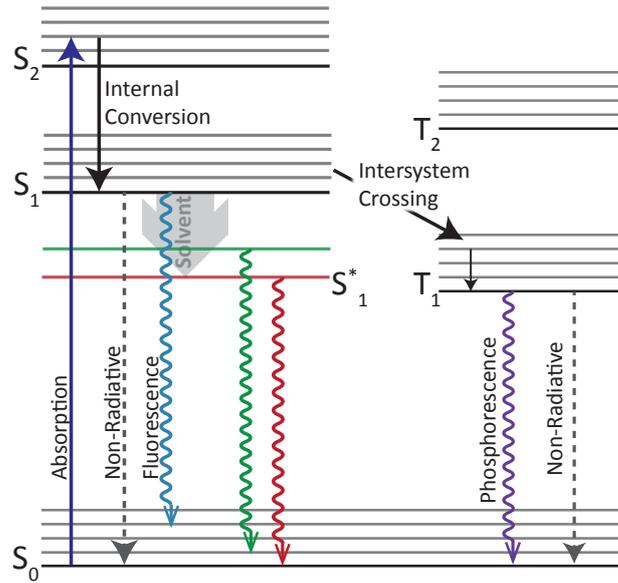
### 3.1. Einführung in die stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die Emission eines Moleküls nach Anregung durch ein Lichtquant wird im Allgemeinen als Lumineszenz bezeichnet. Sie vereint die Begriffe der Fluoreszenz und der Phosphoreszenz. Die Fluoreszenz findet aus einem angeregten Singulettzustand statt. Das Elektron in diesem Zustand ist zu einem Grundzustandselektron spinpaar und der Übergang ist erlaubt. Die Übergangsraten sind moderat und die strahlende Lebensdauer des angeregten Zustands liegt im Nanosekunden Zeitbereich. Phosphoreszenz ist die Emission aus einem angeregten Triplettzustand. Das Elektron in diesem Zustand hat einen zum Grundzustandselektron ungepaarten Spin und der Übergang ist spinverboten. Die Übergangsraten sind aus diesem Grund sehr klein und die Lebensdauer liegt bei Millisekunden bis Sekunden. Die Phosphoreszenz ist im Allgemeinen sehr schwach und wird für Moleküle, die sich in Lösung befinden, kaum beobachtet [77, Kapitel 1].

Die Emission eines einfachen Fluorophors stammt typischerweise aus dessen niedrigstem elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  (Kasha-Regel) [63]. Dies lässt sich anhand eines Jablonski-Diagramms [60] folgendermaßen erklären (siehe Abbildung 3.1): Die Absorption erfolgt aus dem Grundzustand  $S_0$  in eines der vibronischen Niveaus der angeregten elektronischen Zustände, repräsentativ dargestellt durch  $S_1$  oder  $S_2$ . Aus diesem Zustand relaxiert das Elektron schnell in den niedrigsten vibronischen Zustand des  $S_1$ . Diese sogenannte interne Konversion geschieht innerhalb weniger Pikosekunden, sodass die Fluoreszenz aus dem thermischen Gleichgewicht des  $S_1$  stattfindet [77, Kapitel 1]. Dadurch tritt die Fluoreszenz im Allgemeinen unabhängig von der Anregungswellenlänge immer bei der gleichen Energie auf. Die Fluoreszenz erfolgt in einen der Schwingungszustände des elektronischen Grundzustands. Damit ist die Emission relativ zur Anregungsenergie etwas niedriger, was sich durch eine Rotverschiebung ausdrückt. Der Abstand zwischen Absorptions- und Fluoreszenzmaximum wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet [113, 77]. Durch eine Spinumkehr kann das Molekül den Triplettzustand  $T_1$  erreichen (Intersystem Crossing). Dieser Übergang wird durch die Substitution schwerer Atome, wie Brom oder Jod, begünstigt [64]. Der Übergang aus dem Triplett- in den Grundzustand ist, bis auf die schwache Phosphoreszenz, überwiegend strahlungslos. Deshalb ist die Lumineszenz für Moleküle, die eine ausgeprägte Triplettbevölkerung besitzen, stark unterdrückt [120].

Strahlungslose Zerfälle können auch bei einem Übergang des  $S_1$  in den Grundzustand auftreten. Das Verhältnis von strahlungslosen zu strahlenden Zerfällen wird über die Fluoreszenzquantenausbeute  $Q$  ausgedrückt. Sie ist gegeben durch:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad . \quad (3.1)$$



**Abbildung 3.1.:** Jablonski-Diagramm zur Fluoreszenz, Phosphoreszenz und Absorption eines Moleküls.

$\Gamma$  ist die Rate der strahlenden Übergänge und  $k_{nr}$  die der nichtstrahlenden. In der Konstante  $k_{nr}$  sind alle nichtstrahlenden Prozesse zusammengefasst und enthalten somit auch mögliche Übergänge in den Triplettzustand ( $k_{isc}$ ). Die Übergangsrate in den Grundzustand bestimmt die Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustands. Da sowohl nichtstrahlende als auch strahlende Zerfälle zur Gesamtrate beitragen, ist die Lebensdauer des angeregten Singulettzustands gegeben durch

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (3.2)$$

Die Rate der nichtstrahlenden Zerfälle bleibt aufgrund der vielen möglichen Faktoren zunächst unbekannt [77, Kapitel 1]. Die strahlende Zerfallsrate kann aber aus dem Verhältnis des Absorptions- und Emissionsspektrums des Fluorophors bestimmt werden:

$$\Gamma \approx 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \frac{\int F(\nu) d\nu}{\int F(\nu) d\nu / \nu^3} \int \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (3.3)$$

Sie ist eine Formel, die von S. J. Strickler und R. A. Berg aus der Ratengleichung zur Absorption und Fluoreszenz von A. Einstein, aufgestellt wurde [114]. Sie berücksichtigt die spektrale Verbreiterung der Fluoreszenz und Absorption aufgrund des Lösungsmittels. Das Spektrum wird in dieser Formel abhängig von der Wellenzahl  $\nu(\text{cm}^{-1})$  dargestellt. Die Absorption ist über den Absorptionskoeffizienten  $\epsilon(\nu)$  gegeben und das Fluoreszenzspektrum wird auf das Maximum normiert [114]. Die Formel 3.3 gibt nur die radiative Lebensdauer  $\Gamma = 1/\tau_{\text{rad}}$  des Übergangs  $S_1 \rightarrow S_0$  für nicht

### 3. Die Fluoreszenzspektroskopie

---

reaktive Moleküle an. Übergänge in fluoreszierende Zwischenzustände werden dabei nicht berücksichtigt.

Die tatsächliche Lebensdauer des angeregten Zustands kann mithilfe der Quantenausbeute und der berechneten radiativen Lebensdauer bestimmt werden:

$$\tau = Q \cdot \tau_{\text{rad}} \quad .$$

Es ist aber auch möglich die Lebensdauer des  $S_1$  mit einer Streak-Kamera in einem zeitaufgelösten Experiment zu messen. Die Lebensdauer  $\tau$  ist die mittlere Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verbleibt. Die Intensität der Fluoreszenz klingt exponentiell mit der Zeit  $t$  ab mit einer Rate  $1/\tau$ :

$$I = I_0 \exp(-t/\tau) \quad .$$

In der stationären Messung wird über einen langen Zeitbereich integriert. Ist nur ein Zustand an der Fluoreszenz beteiligt, ist die Amplitude des stationären Spektrums dieser Zeit zuzuordnen.

Dadurch, dass es im angeregten Zustand eines Moleküls zu verschiedenen Prozessen kommen kann, setzt sich die Fluoreszenz oft aus mehreren Komponenten zusammen. Sind die Zerfälle nicht spektral voneinander getrennt, so ist im stationären Spektrum nicht jeder Zerfallskanal eindeutig zuzuordnen. Hier können zeitaufgelöste Messungen Aufschluss geben. Für die zeitaufgelöste Messung mit mehreren Lebensdauern wird ein multiexponentieller Zerfall der Fluoreszenzintensität angenommen:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i \exp(-t/\tau_i) \quad . \quad (3.4)$$

Damit kann bei korrekter Anpassung der Lebensdauer  $\tau_i$  die zugehörige Amplitude  $A_i$  für die verschiedenen Komponenten bestimmt werden. Jeder Zeit ist damit eindeutig ein spektraler Verlauf zugehörig [77, Kapitel 4].

Die Umgebung eines Farbstoffs kann einen direkten Einfluss auf dessen Fluoreszenz besitzen. Die unmittelbare Umgebung der meisten Moleküle ist zunächst das Lösungsmittel, in dem sie gelöst werden, oder in biologischen Systemen die den Farbstoff bindende Struktur [77, Kapitel 6]. Für Farbstoffe, die zur Strukturaufklärung dienen ist entscheidend, dass eine Änderung in der nächsten Umgebung des Moleküls zu einer Änderung der Fluoreszenz führt [14].

Den wichtigsten Einfluss auf die Fluoreszenz eines Moleküls hat oft die Polarität des Lösungsmittels. Die Lösungsmittelpolarität führt im Allgemeinen zu einer Vergrößerung der Stokes-Verschiebung. Ist das Lösungsmittel sehr polar, wird die Energie des Grund- und angeregten Zustands abgesenkt (siehe Abbildung 3.1). Da aber die relative Verschiebung wichtig ist, wird in Abbildung 3.1 nur die Absenkung des angeregten Zustands  $S_1$  gezeigt. Wie stark dieser Einfluss ist, hängt auch von der Polarität, d.h. vom Dipolmoment, des Zustands ab. Mit der Absenkung gehen

meist Änderungen der strahlenden und nichtstrahlenden Zerfallsraten einher. Diese Interaktion der Lösung mit dem Molekül wird im Folgenden noch genauer erläutert, da sie direkt die Polarität der Umgebung anzeigt [77, Kapitel 1].

Zweite wichtige Eigenschaft eines Lösungsmittels, die zur Änderung der Fluoreszenz führen kann, ist seine Viskosität oder, wenn es sich um eine biologische Umgebung handelt, seine Rigidität [14].

Des Weiteren kann der Farbstoff durch die Absorption von Licht eine Reaktion durchführen. Das Molekül kann seine Struktur oder Zusammensetzung verändern. Gruppen können abgespalten werden und mit der Umgebung reagieren. Das Molekül wird dadurch im Allgemeinen so verändert, dass sich dies auf seine Fluoreszenzeigenschaften auswirkt [35]. Dabei treten unter anderem die folgenden Prozesse auf:

Ein Ladungstransfer innerhalb des Moleküls oder ein Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel führt zu einer Ladungsverschiebung im angeregten Zustand. Dies kann zu einer speziellen Wechselwirkung des Moleküls mit der Umgebung führen. Die Stabilisierung einer Ladungsverschiebung ist stark von der Umgebung abhängig und wird z.B. von einem polaren Lösungsmittel stabilisiert [44].

Die Moleküle können auch, durch die lokale Umgebung begünstigt, miteinander interagieren. So kann z.B. die Emission eines Moleküls von einem anderen absorbiert werden und dieses zur Fluoreszenz anregen. Die Anregungsenergie kann auch strahlungslos über Dipol-Dipol Wechselwirkungen weitergegeben werden. Dazu müssen sich die Moleküle auf bis zu 1-10 nm begegnen. Bekanntestes Beispiel ist hier der FRET von einem Donor- auf ein Akzeptormolekül. Die Effizienz dieses Übertrags kann aus der Abnahme der Fluoreszenz des Donors bzw. aus der Zunahme der Fluoreszenz des Akzeptors bestimmt werden. Fluoreszenz und Absorption der beteiligten Moleküle müssen für die Wechselwirkungen spektral überlappen [77, Kapitel 6], [103].

Bei genügend hoher Dichte oder räumlicher Nähe können Moleküle gleicher Art im angeregten Zustand Dimere formen (Excimerbildung), die beim Rückgang in den Grundzustand wieder in Monomere zerfallen. Werden Dimere von unterschiedlichen Molekülen gebildet, nennen sie sich Exciplexe. Für die Excimer- oder Exciplexbildung muss die Konzentration in einer Lösung sehr hoch sein, damit die Moleküle zusammenfinden [77, Kapitel 6], [10].

Alle beschriebenen Ursachen sind entweder direkt oder indirekt von der Umgebung abhängig, führen aber zum gleichen Ergebnis: zur energetischen Absenkung des besetzten Zustands nach Anregung, was zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenz bezüglich der Absorption führt. Eine Quantifizierung der Einflüsse auf die Emission eines Fluorophors liefert damit die Möglichkeit die lokale Umgebung zu charakterisieren. Sind mehrere Effekte überlagert, dann ist es oft schwer den dominierenden zu isolieren [77, Kapitel 6].

### 3.1.1. Einfluss der Lösungsmittelpolarität

Die Rotverschiebung der Fluoreszenz eines Farbstoffs gegenüber der Absorption wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Sie ist von der Polarität des Lösungsmittels abhängig. Je polarer das Lösungsmittel, desto stärker ist diese ausgeprägt. Polare Lösungsmittel senken sowohl den Grundzustand als auch den angeregten Zustand energetisch ab. Durch die Anregung in den  $S_1$  ändert sich in der Regel das Dipolmoment der Farbstoffe. Oft ist das Dipolmoment des angeregten Zustands größer als das des Grundzustands. In diesem Fall ist der Einfluss der Polarität auf den Grundzustand viel schwächer als auf den angeregten Zustand. In Abbildung 3.1 ist der Einfluss von Lösungsmitteln mittlerer (grün) bis starker Polarität (rot) für den Zustand  $S_1$  gezeigt.

Auch die Lösungsmittel besitzen ein Dipolmoment, das umso größer ist, je polarer die Lösung. Vor der Photoanregung ordnen sich die Lösungsmittelmoleküle in einer Solvatationshülle um den Fluorophor an, sodass ihre Dipolmomente relativ zum Dipolmoment  $\mu_G$  des Grundzustands ausgerichtet sind. Im angeregten Zustand ändert sich das Dipolmoment ( $\mu_G \neq \mu_E$ ) des Fluorophors und die Lösungsmittelmoleküle müssen sich neu ausrichten. Das geschieht in wenigen Pikosekunden viel schneller als die Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustands der meisten Fluorophore. Die Umordnung in der Solvatationshülle um die Farbstoffe führt zu einer energetischen Absenkung des  $S_1$  und damit zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenz [77, Kapitel 6], [14]. Die Viskosität hat keinen Einfluss auf den Betrag der Verschiebung, aber auf die Geschwindigkeit der Umordnung der Solvatationshülle [77, Kapitel 6] und kann so die Fluoreszenz beeinflussen.

Der bathochrome Shift der Fluoreszenz kann allgemein mit der sogenannten Lippert-Gleichung beschrieben werden:

$$\nu_A - \nu_{Fl} = \frac{2}{hc} \cdot \Delta f \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} \quad (3.5)$$

$$\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad .$$

In dieser gibt  $\Delta f$  eine Näherung der Lösungsmittelpolarität anhand der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  und des Brechungsindex  $n$  an. Direkt proportional zur Verschiebung ist die Differenz der Dipolmomente des Grund- und angeregten Zustands ( $\mu_E - \mu_G$ ).  $a$  ist die Größe der Solvatationshülle, in der sich das Fluorophor befindet [77, Kapitel 6]. Oft wird die Stokes-Verschiebung aber nur als direkt proportional zur Permittivität der Lösungsmittel angegeben wie beispielsweise in [48].

Dieses Modell berücksichtigt keine chemischen Wechselwirkungen, die konformelle Änderungen eines Moleküls hervorrufen und damit zur Änderung der Emission beitragen. Zu solchen Änderungen gehören z.B. ladungsgetrennte Zustände, die vom Lösungsmittel begünstigt werden, der Protonentransfer oder die Wasserstoffbrückenbindung.

### 3.1.2. ICT- und TICT- Zustände

Ladungstrennte Zustände innerhalb eines Moleküls, sogenannte ICT-Zustände<sup>1</sup>, ergeben sich aus der Verschiebung von Ladungen im angeregten Zustand. Häufig diskutierte Moleküle, die diesen Zustand einnehmen, haben einen Elektronen gebenden und einen Elektronen ziehenden Teil, der beispielsweise über eine Einfachbindung verbrückt sein kann. Dies führt zu hohen Dipolmomenten im angeregten Zustand der sonst eher unpolaren Moleküle [44]. Systeme, die diese Zustände einnehmen besitzen im Grundzustand und im optisch angeregten Zustand ein delokalisiertes Elektronensystem. Dieser Zustand wird in der Literatur auch als lokal angeregter (LE<sup>2</sup>) Zustand bezeichnet. Aus diesem Zustand erfolgt eine Ladungsverschiebung, die zu einem ICT-Zustand führt. Die Übergangsrate aus einem LE- in einen ICT-Zustand kann je nach Umgebung sehr hoch sein [102]. In polaren Lösungsmitteln werden solche ladungstrennten angeregten Zustände stabilisiert und können die energetisch niedrigsten Zustände sein. In unpolaren Lösungsmitteln ist die Ladungstrennung nicht stabilisiert und die LE-Zustände bilden die Zustände niedrigster Energie [77, Kapitel 6], [44].

Oft ist in stark polaren Lösungsmitteln die Fluoreszenz des LE- durch den ICT-Zustand stark reduziert und eine zusätzliche, aber schwächere, rotverschobene Fluoreszenz aus dem ICT-Zustand ist zu beobachten. Es zeigt sich eine sogenannte duale Fluoreszenz aus zwei Zuständen. Die gesamte Fluoreszenzquantenausbeute geht hierbei zurück. Ursächlich für den Rückgang der Fluoreszenz durch den zusätzlichen Zustand ist dessen starke vibronische Kopplung zum Grundzustand und die damit verbundene nichtstrahlende interne Konversion [44]. Gleichzeitig hat fast jeder ICT-Zustand einen energetisch ähnlichen Triplettzustand, der leicht erreicht werden kann [102, 136].

Die Bildung eines ICT-Zustands kann auch durch einen Protonentransfer innerhalb des Moleküls oder extern durch das Lösungsmittel hervorgerufen werden. Beides kann zu einer Deformation der Struktur und zur Öffnung eines Zerfallskanals mit hoher Rate in den Grundzustand führen, was mit einem starken Rückgang der Fluoreszenzquantenausbeute einhergeht. Dies konnte am Beispiel von 4,4'-Dihydroxythioindigo [32] gezeigt werden.

In besonderen Fällen kann auch die Drehung der Gruppen gegeneinander eine Ladungstrennung bedingen oder umgekehrt. Die Moleküle haben zunächst einen planaren Grundzustand und einen delokalisierten angeregten Zustand. Im angeregten Zustand können sie dann den ladungstrennten verdrehten Zustand einnehmen, der umso interessanter ist für weitere Reaktionen, je energetisch tiefer er liegt. Dieser Zustand wird als „Twisted Internal Charge Transfer“-Zustand (TICT) bezeichnet [102]. Wie die ICT-Zustände wird auch der TICT-Zustand durch eine polare Umgebung stabilisiert. Anders als beim ICT spielt aber auch die Viskosität der Umgebung eine

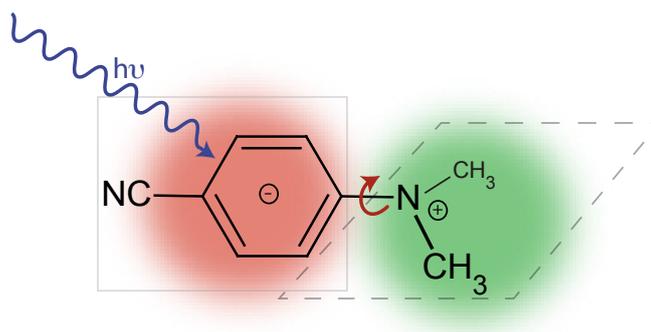
---

<sup>1</sup>engl. Internal Charge Transfer States

<sup>2</sup>engl. Locally Excited

entscheidende Rolle. Durch die hohe Viskosität der Lösungsmittelmoleküle rund um das Fluorophor wird auch seine Beweglichkeit eingeschränkt und eine Rotation um eine Einfachbindung wird verhindert. Die Übergangswahrscheinlichkeit in den TICT-Zustand ist dadurch in viskosen Lösungsmitteln oft verringert [48]. Eine direkte Trennung der Einflüsse von Viskosität und Polarität ist jedoch meist nicht vollständig möglich [77, Kapitel 6].

Prominentes Beispiel für einen ausgeprägten TICT- und damit ladungstrennten Zustand ist 4,4-Dimethylaminobenzonitril (DMABN). In einem polaren Lösungsmittel



**Abbildung 3.2.:** Das Molekül DMABN. Die Drehung des Moleküls um die Einfachbindung in den TICT-Zustand ist durch den roten Pfeil gekennzeichnet. Die Ladungstrennung durch die rote und grüne Hinterlegung.

zeigt DMABN die typische duale Fluoreszenz und kleine Quantenausbeuten, die auf einen TICT Zustand hinweisen. In unpolarer Umgebung wie Benzol ist nur die starke Fluoreszenz aus dem LE zu beobachten [48]. Das Modell für DMABN sagt eine Drehung im TICT von bis zu  $90^\circ$  um die Einfachbindung zwischen Benzolring und dem Stickstoffatom voraus. Zwischen diesen beiden Gruppen findet die Ladungstrennung in zwei Radikationen statt, wobei die negative Ladung auf dem Benzolring liegt [44].

#### 3.1.3. Probe-Probe Wechselwirkung und FRET

Wie oben bereits erwähnt, können Fluorophore auch untereinander wechselwirken. Beispiel hierfür ist der strahlungslose und strahlende Energietransfer. Bei einem strahlenden Energietransfer werden die emittierten Photonen eines Fluorophors (Donors) von einem anderen Molekül (Akzeptor) absorbiert. Wichtige Voraussetzung für diesen Transfer ist der Überlapp des Emissionsspektrums des Donors mit der Absorption des Akzeptors. Weiter ist die optische Dichte und damit die Konzentration des Akzeptors wichtig, um die Wahrscheinlichkeit einer Absorption zu erhöhen [77, Kapitel 13].

Diese sogenannte Reabsorption überdeckt häufig die Beobachtung des strahlungslosen Energietransfers. Hier handelt es sich um einen Übertrag der Energie aufgrund einer Dipol-Dipol Wechselwirkung. Er findet auch bei niedrigen Dichten statt, wenn

die Moleküle in einem definierten Abstand (1-10 nm) zueinander liegen. Beispielsweise wenn Donor und Akzeptor auf der DNA oder einem Protein gebunden sind. Dies wird als „Förster Resonant Energy Transfer“ (FRET) bezeichnet; benannt nach Theodor Förster, der diese Wechselwirkung das erste Mal theoretisch beschrieb [37]. Die Rate des Energietransfers hängt von mehreren Faktoren ab. Zunächst muss ein Überlapp von Donorfluoreszenz und Akzeptorabsorption existieren, wie beim strahlenden Energietransfer. Natürlich ist die Rate abhängig von der Quantenausbeute des Donors. Außerdem spielt die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente von Absorption und Emission eine Rolle. Wichtigster Faktor ist der Abstand zwischen den beiden Molekülen [115], [77, Kapitel 13]. Zusammengenommen führt dies zu einer Rate des Energietransfers gegeben durch:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 . \quad (3.6)$$

Dabei ist  $\tau_D$  die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors.  $R_0$  ist der Försterradius und  $r$  der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Der Försterradius beschreibt den Abstand bei dem FRET zu 50 % effizient ist, d.h. die Hälfte der Energie wird durch den Akzeptor absorbiert. Wenn der Abstand zwischen Donor und Akzeptor dem Försterradius entspricht, dann ist die Transferrate gleich der Zerfallsrate des Donors ( $1/\tau_D$ ). Der Försterradius liegt typischerweise zwischen 20 Å und 60 Å [77, Kapitel 13].

Der Försterradius kann aus den spektralen Eigenschaften des Donors und Akzeptors bestimmt werden:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N_A n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda . \quad (3.7)$$

Der Radius ist direkt proportional zum Überlappintegral der Donoremission und der Akzeptorabsorption.  $F_D$  ist das korrigierte Emissionsspektrum, dessen Fläche normiert ist.  $\epsilon_D$  ist der molare Absorptionskoeffizient des Akzeptors in den Einheiten  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .  $N_A$  ist die Avogadrokonstante und  $n$  der Brechungsindex des Lösungsmittels. Der Försterradius ist direkt proportional zur Quantenausbeute  $Q_D$  des Donors [37, 115].

Der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  beschreibt die relative Orientierung der beiden Moleküle, zwischen denen FRET stattfindet. Er ist bei fehlender Information der tatsächlichen Lage der Moleküle relativ schwer zu bestimmen. Allerdings gibt es drei Extremwerte für  $\kappa^2$ : wenn die Moleküle parallel hintereinander liegen, ist  $\kappa^2 = 4$ ; wenn sie parallel nebeneinander liegen, ist  $\kappa^2 = 1$  und wenn sie in einem  $90^\circ$ -Winkel zueinander stehen ist  $\kappa^2 = 0$  [77, Kapitel 13]. Für eine zufällige Anordnung der Moleküle aufgrund von Rotationsdiffusion ergibt sich der Wert  $\kappa^2 = 2/3$  [28].

Da der Abstand  $r$  zwischen den Molekülen wichtigster Faktor der FRET-Effizienz ist, wird die FRET-Messung oft für die Abstandsbestimmung herangezogen. Darüber

können z.B. Abstände zwischen DNA-Basen oder Abstände auf Proteinsträngen bestimmt werden. Dabei sind Donor- und Akzeptormolekül auf der DNA oder dem Protein kovalent verlinkt und haben einen definierten Abstand zueinander [31, 65]. Zur Bestimmung des Abstands muss die FRET-Effizienz bekannt sein. Sie ergibt sich z.B. aus dem Anteil der vom Donor absorbierten Photonen, die auf den Akzeptor transferiert werden. Das ist das Verhältnis der Transferrate  $k_T(r)$  zur Zerfallsrate des Donors in Gegenwart des Akzeptors ( $\tau_D^{-1} + k_T(r)$ ):

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} \quad . \quad (3.8)$$

Zusammen mit Gleichung 3.6 ergibt sich daraus:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad . \quad (3.9)$$

Gleichzeitig ist die FRET-Effizienz direkt aus der Abnahme der Fluoreszenz des Donors und der Zunahme der Fluoreszenz des Akzeptors ersichtlich:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad . \quad (3.10)$$

Dabei ist  $F_D$  die Fluoreszenz des Donors bei Abwesenheit und  $F_{DA}$  die Fluoreszenz des Donors in Gegenwart des Akzeptors.

Aus den Gleichungen 3.7, 3.9 und 3.10 kann so der Abstand  $r$  bestimmt werden. Da die Effizienz extrem vom Abstand abhängig ist, sind Messungen des Abstands nur dann sinnvoll, wenn dieser in der Nähe von  $R_0$  liegt (zwischen  $0.5 R_0$  und  $2 R_0$ ) [77, Kapitel 13].

Diese Bestimmung von  $r$ , setzt einen fixen Abstand zwischen Donor und Akzeptor voraus. In einem Donor-Akzeptor-Mix in Lösung oder in Membranen kann eine Verteilung der Abstände vorliegen und die Formel kann nicht mehr angewandt werden [77, Kapitel 13]. Eine komplexere Beschreibung wird aus der Mittelung der Transferrate über eine angenommene Verteilung der Abstände von Donor zu Akzeptor abgeleitet [135].

#### 3.1.4. Stationäre Fluoreszenz: Das Fluoreszenzspektrometer

Für die Messung stationärer Fluoreszenzspektren wird ein kommerzielles Fluoreszenzspektrometer, Fluorolog<sup>®</sup> 3 der Firma Horiba (Model FL3-22), verwendet. Die Funktionsweise des Geräts wird sehr detailliert in [101], [77, Kapitel 2] und [55] beschrieben.

Zur Beleuchtung dient eine Xenon-Lampe, die ein relativ breites Spektrum zwischen 250 nm und 700 nm besitzt. Das Anregungslicht wird durch einen Doppelmonochromator auf die gewünschte Wellenlänge selektiert. Mithilfe der Spalteinstellung kann

die Wellenlängenauflösung der Anregung sowie die Belichtungsintensität gewählt werden.

Die Fluoreszenz kann rechtwinklig zur Anregung aufgenommen werden (Right-Angle Geometry) oder unter einem Winkel von  $22.5^\circ$  zum einfallenden Strahl (Front-Face Geometry). Die Aufnahme der Fluoreszenz in der Front-Face Geometry kann bei sehr schwach fluoreszierenden oder dichten Proben sinnvoll sein, da der optische Weg durch die Probe kürzer ist als bei der Right-Angle Geometry.

Durch einen zweiten Doppelmonochromator auf der Emissionsseite wird die Fluoreszenz spektral aufgetrennt. Mittels eines Schrittmotors an den Gittern werden die Wellenlängen abgestimmt und auf den Detektor abgebildet. So wird das Emissionsspektrum erhalten. Streulicht aus der Probenkammer, Intensität der Emission und räumliche Auflösung auf dem Detektor können über die verschiedenen Spalte des Emissionsmonochromators eingestellt werden.

Einige Faktoren müssen bei der Aufnahme des Emissionsspektrums beachtet- und korrigiert werden: Die Emission der Xenon-Lampe ist nicht über das gesamte Spektrum konstant. Außerdem nimmt die Leistung der Lampe mit der Zeit ab. Aus diesem Grund wird die Intensität der Lampe über eine Photodiode gleichzeitig mit dem Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Werden die Emissionsspektren auf die Leistung der Lampe referenziert, können sie auch bei unterschiedlicher Alterung der Lampe miteinander verglichen werden.

Die Effizienz der Gittermonochromatoren sowohl auf der Anregungs- als auch auf der Emissionsseite ist wellenlängenabhängig. Auf der Anregungsseite wird dies über die Photodiode referenziert und damit korrigiert. Auf der Emissionsseite benutzt das Auswertungsprogramm, das die Spektren graphisch darstellt, eine Korrekturfunktion, die diese Abhängigkeit korrigiert.

Eintritts- und Austrittsspalt der Probenkammer bestimmen zum einen, wieviel Licht auf die Probe fällt (Eintrittsspalt) zum anderen die Intensität, die auf den Detektor fällt (Austrittsspalt). Ein größerer Eintrittsspalt bewirkt ein höheres Signal bzw. eine bessere Ausleuchtung der Probe und damit ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Gleichzeitig führt dies aber auch zu einer höheren optischen Belastung der Probe. Ein größerer Austrittsspalt kann ebenfalls das Signal verbessern, aber zu einer schlechteren spektralen Auflösung führen. Hier ist es wichtig die optimalen Bedingungen für die jeweilige Probe zu finden.

Mit dem Fluorolog<sup>®</sup> 3 können sowohl Anregungs- als auch Emissionsspektren aufgenommen werden. Ein Anregungsspektrum zeigt die Emission bei einer konstanten Wellenlänge in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge. Das Emissionsspektrum zeigt die Fluoreszenz über einen Wellenlängenbereich nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Emissionsspektren aufgenommen.

### 3.1.5. Zeitaufgelöste Fluoreszenz: Die Streak-Kamera

Die in dieser Arbeit verwendete Streak-Kamera (Typ C5680-24) ist ein kommerzielles Gerät der Firma Hamamatsu, das mit einer selbst gebauten Beleuchtungs- und Triggereinheit betrieben wird. Der Aufbau wurde von Franziska Graupner während ihrer Doktorarbeit konzipiert und seine Funktionsweise ist in ihrer Dissertation [45] sehr genau beschrieben. Hier soll deshalb nur eine kurze Übersicht gegeben werden, die sich im Wesentlichen auf [45] bezieht.

Die Anlage wird mit einem Titan:Saphir-Laserverstärkersystem (Clark CPA 2001, Clark-MRX Inc.) betrieben. Der Laser liefert  $\sim 180$  fs Laserpulse bei 778 nm mit einer Repetitionsrate von 1 kHz. Die Wellenlänge kann über verschiedene optisch-parametrische Verstärkungsmethoden und Harmonischenerzeugung verändert werden. Die SHG<sup>3</sup> liefert eine Wellenlänge von 389 nm. Aus der THG<sup>4</sup> können 259 nm gewonnen werden. Ein non-kollinearer optisch-parametrischer Verstärker (NOPA<sup>5</sup>) deckt einen Spektralbereich von etwa 450-700 nm ab. Eine zusätzliche SHG kann Licht aus dem NOPA frequenzverdoppeln und liefert damit Wellenlängen im ultravioletten Spektralbereich von 230 nm bis 350 nm. Damit steht fast der komplette sichtbare und nahe UV Spektralbereich für die Anregung zur Verfügung.

Das Anregungslicht wird über eine längere Verzögerungsstrecke geleitet und anschließend auf die Probe fokussiert. Die Verzögerung ist notwendig, damit der Trigger für das Streak-Kamera System und die Fluoreszenz synchronisiert sind. Die Emission wird in einem Winkel von  $15^\circ$  zur Anregung mittels eines Achromaten (Bernhard Halle Nachfl. GmbH, Brennweite 80 mm) kollimiert und mit einem zweiten Achromaten (Edmund Optics, Brennweite 75 mm) auf ein Spektrometer vor der Streak-Kamera abgebildet. Die Fluoreszenz kann nicht parallel zur Anregung aufgenommen werden, da sonst das Anregungslicht direkt auf die Streak-Kamera fokussiert würde. Durch die Anregung in einem Winkel von  $15^\circ$  kann dies verhindert werden. Dennoch vorhandenes Streulicht aus der Anregung wird mit einem Filter geblockt. Da die Anregungspolarisation bei der Sammlung des Fluoreszenzlichts erhalten bleibt, werden Anisotropieeffekte durch einen Polarisator (Wire-Grid-Polarisator, Moxtek, ProFlux NanoWire™ Technology PPL04C) unterdrückt.

Der Streak-Kamera ist ein Spektrometer (Princeton Instruments, Acton Series SP2356) vorgeschaltet, das das Fluoreszenzlicht räumlich spektral aufgespaltet direkt auf den Eingangsspalt des Streak-Kamera Systems abbildet.

Die prinzipielle Funktionsweise der Streak-Kamera ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Das auf den Eintrittsspalt fokussierte Licht wird durch eine Eingangsoptik auf die Photokathode abgebildet. Hier werden die Photonen in Elektronen umgesetzt. Die Elektronen werden anschließend durch eine Gitterelektrode beschleunigt. Mit jedem Laserpuls werden somit zweidimensionale Elektronenwolken generiert, die der Vertei-

---

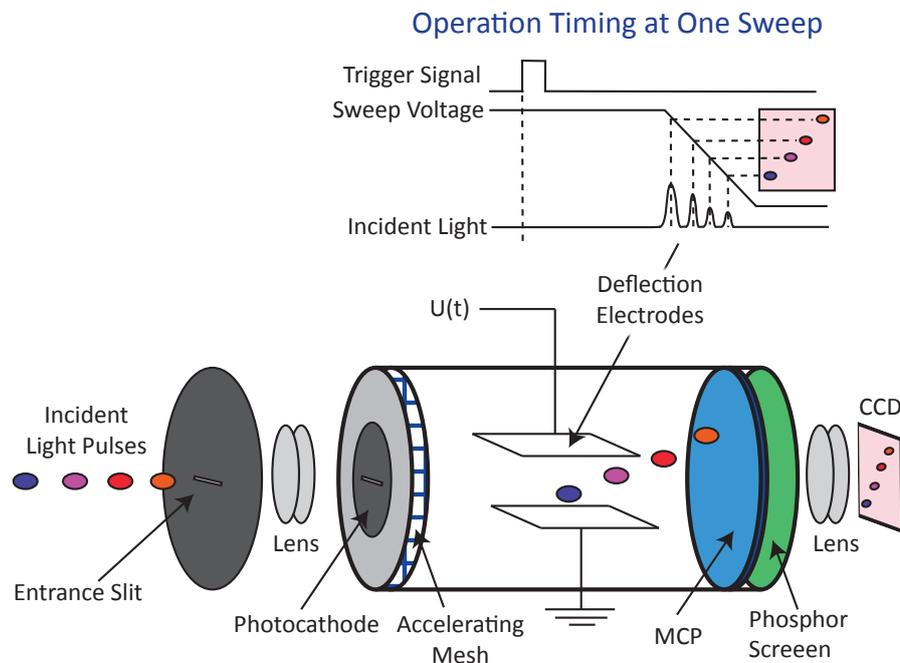
<sup>3</sup>engl. Second Harmonic Generation

<sup>4</sup>engl. Third Harmonic Generation

<sup>5</sup>engl. Noncollinear Optical Parametric Amplifier

### 3.1. Einführung in die stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

lung der Fluoreszenz entsprechen: die transversale Ausdehnung der Elektronen ist die spektrale Verteilung, die longitudinale Ausdehnung die zeitliche Entwicklung der Emission. Die Elektronendichte entspricht der Intensität. Die Elektronenwolke läuft zwischen zwei Elektroden, an denen eine zeitlich variable Spannungsrampe angelegt wird. Durch das entsprechende elektrische Feld werden die Elektronen räumlich abgelenkt. Elektronen zu frühen Zeiten stark, Elektronen zu späteren Zeiten schwach, angedeutet durch die vier Punkte in Abbildung 3.3. Dadurch wird die zeitliche Verteilung der Elektronen in eine räumliche umgesetzt. Die Elektronen werden auf einer Multi-Channel-Plate (MCP) vervielfacht und erreichen einen Phosphorschirm. Hier werden sie wieder in Photonen umgewandelt. Eine Austrittsoptik bildet die Photonen auf eine CCD-Kamera ab. Durch die Variation der Ablenkspannung kann der Zeitbereich auf dem Phosphorschirm verändert werden. Der Zeitbereich ist allerdings nur stufenweise abstimmbaar.



**Abbildung 3.3.:** Das Funktionsprinzip der Streak-Kamera. Grafik modifiziert übernommen aus [45].

In Abbildung 3.3 (oben), ist die Funktionsweise der Triggereinheit dargestellt. Der Trigger der Streak-Kamera erfolgt entweder optisch über den Laser (für kurze Zeitbereiche) oder elektronisch für lange Zeitbereiche. Beim optischen Trigger werden über eine Photodiode die Laserpulse an die Triggereinheit der Streak-Kamera weitergegeben. Das Triggerlevel wird in die Anstiegsflanke des Pulses gelegt. Der optische Trigger hat den Vorteil sehr geringer zeitlicher Schwankungen (Jitter).

Der elektronische Trigger wird über das Kilohertzsignal des Lasersystems getrieben. Der Trigger kann dabei manuell über die Zuschaltung verzögernder Elektronik (Kabelschleifen) zeitlich angepasst werden. Der elektronische Trigger hat einen höheren Jitter und ist deshalb nur für große Zeitfenster geeignet. Nach dem Eingang des Triggers fährt die Kamera die Spannungsrampe und streakt das nächste Fluoreszenzsignal.

Die Streak-Kamera besitzt zwei Betriebsmodi, den kontinuierlichen und den Einzelschussmodus. Beim kontinuierlichen Aufnahmemodus löst jedes Triggersignal eine Spannungsrampe aus (Wiederholrate 1 kHz). Damit wird jedes Elektronenbündel gestreakt und auf den Phosphorschirm abgebildet. Während einer festgelegten Integrationszeit werden Bilder des Phosphorschirms von einer CCD-Kamera aufgenommen. Anschließend wird die CCD-Kamera durch eine Blende geschlossen und das Bild ausgelesen. Dies dauert etwa 7 ms. Danach wird die Blende wieder geöffnet und ein neues Bild wird aufgenommen. Da der Phosphorschirm etwa 3 ms nachleuchtet, werden in diesem Aufnahmemodus immer mehrere (ca. 3) überlagerte Streak-Bilder von der CCD-Kamera detektiert.

Der Einzelschussmodus<sup>6</sup> bietet die Möglichkeit einzelne Streak-Bilder aufzunehmen. Dies geschieht über eine interne Synchronisation von CCD-Kamera und der Streak-Einheit. Nachdem die CCD-Kamera das letzte Bild ausgelesen hat, gibt sie einen Befehl an die Streak-Einheit beim nächsten Trigger einmal zu streaken. Nur dieses eine Bild wird anschließend vom Phosphorschirm ausgelesen. Damit werden weniger Daten in der gleichen Zeit produziert als im kontinuierlichen Betrieb. Da aber nicht mehrere Streak-Bilder übereinander liegen, kann eine bessere Zeitauflösung erreicht werden.

Das Bild des Phosphorschirms wird im normalen Aufnahmemodus der CCD-Kamera direkt aufgenommen und als Matrix von  $640 \times 480$  Pixel abgespeichert. Das Bild kann aber auch durch sogenanntes Photonenzählen (engl.: Photon-Counting Mode) aufintegriert werden. Dabei wird ein Schwellenwert gesetzt, ab dem ein Signal als Photon gezählt wird und damit das thermische Elektronenrauschen oder das Rauschen der CCD unterdrückt. Erst wenn an einem Messpunkt der Schwellenwert überschritten ist, wird ein Fluoreszenzpunkt aufgezeichnet. Dabei ist es notwendig, dass die Fluoreszenz so gering ist, dass pro Pixel nur ein Photon detektiert wird, da es sonst zu einer „Sättigung“ des Signals kommen kann. Durch das Photonenzählen kann ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden als im Analogmodus. Außerdem ist die aufgenommene Datenmenge kompakter, da nur binäre Messpunkte abgespeichert werden müssen. Jedes einzelne CCD-Bild wird in eine Datei geschrieben. Dadurch kann jedes dieser Bilder später noch einmal aufgerufen werden. Das hat den Vorteil, dass fehlerhafte Daten nachträglich entweder gelöscht oder korrigiert werden können. Näheres zu den Korrekturmöglichkeiten, wie z.B. auch der „Jitterkorrektur“, finden sich in [45].

---

<sup>6</sup>engl. Single-Streak Mode

Für die Messungen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, wurde der kontinuierliche Aufnahmemodus und das Photon-Counting gewählt, da alle Aufnahmezeiten im mittleren bis langen Zeitbereich liegen. Auch eine „Jitterkorrektur“ der Daten war aus diesem Grund nicht notwendig.

## 3.2. Fluoreszenzmarker der Proteinaggregation

Die Fluoreszenz verschiedener Farbstoffe wird auch zur Untersuchung der Proteinfaltung, Aggregation oder Wechselwirkung mit der Umgebung verwendet. Die hohe Sensibilität der Fluoreszenz auf eine Umgebungsänderung macht sie zu einem wichtigen Instrument zur Untersuchung der statischen und dynamischen Änderung der Proteine durch Faltung oder Aggregation. Tryptophan und Tyrosin sind Aminosäuren und gleichzeitig Fluorophore, die natürlich in Proteinen auftreten und als intrinsische Marker verwendet werden können [24, 91].

Ist die intrinsische Fluoreszenz der Aminosäuren nicht ausreichend für die Untersuchung der Proteinstruktur, können externe Fluorophore zur Markierung verwendet werden. Diese können durch Mutagenese oder chemische Reaktionen direkt an eine spezifische Stelle substituiert werden oder sie wechselwirken an unspezifischen Stellen mit den Aggregatstrukturen und gehen eine nichtkovalente Bindung ein [91, 61].

Für die Untersuchung von Proteinaggregaten mittels kleiner organischer Moleküle, die nur durch nichtkovalente Bindung ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern, werden häufig die beiden Farbstoffe Thioflavin oder 1-Anilinonaphthalin-8-Sulfonsäure (ANS) herangezogen [91]. Ihre Fluoreszenzeigenschaften sind stark umgebungsabhängig und deshalb ideal für den Nachweis von amyloiden Aggregatstrukturen [52]. Die Literatur beschäftigt sich ausführlich mit der Wechselwirkung der beiden Marker mit den Proteinstrukturen. Gleichzeitig ist aber auch der Fluoreszenzmechanismus, der ihrer Eigenschaft als Marker zu Grunde liegt, Gegenstand intensiver Forschung [7]. Im nächsten Abschnitt wird auf den Mechanismus der beiden Moleküle, der zur Änderung der Fluoreszenz führt, genauer eingegangen.

### 3.2.1. 1-Anilinonaphthalin-8-Sulfonsäure (ANS)

Die pathologische Aggregation einiger Proteine ist ein dynamischer Prozess mit teilweise gefalteten Intermediaten und oligomeren Strukturen bis hin zu amyloiden Fibrillen mit geordneter  $\beta$ -Faltblattstruktur [49]. Die charakteristische Fluoreszenz des hydrophoben Moleküls ANS ist ein direkter Nachweis für die Existenz präfibrillarer Strukturen.

ANS gehört zu den Sulfonsäuren. In Abbildung 3.4 (a) ist die 1-Anilinonaphthalen-8-Sulfonsäure abgebildet, die bekannteste Struktur dieser Gruppe. Die Fluoreszenz des Moleküls ist stark von der Polarität der Umgebung abhängig. In polaren Lösungsmitteln ist sie im Wesentlichen unterdrückt. Mit dem Rückgang der Polarität der Umgebung steigt jedoch die Quantenausbeute an. Gleichzeitig führt eine hohe

Polarität zu einem bathochromen Shift des Emissionsmaximums. Der Effekt der Polarität auf die Quantenausbeute ist jedoch stärker als auf die Verschiebung der Fluoreszenz. Eine Änderung der Viskosität hat hingegen keinen Einfluss [14].

Während die Fluoreszenz stark auf die Polarität der Umgebung reagiert, bleibt die Absorption davon weitgehend unbeeinflusst. Daraus folgend ist das Dipolmoment des angeregten Zustands im Gegensatz zum Grundzustand hoch und der angeregte Zustand wird durch ein polares Lösungsmittel stabilisiert. Das hohe Dipolmoment wird durch die Drehung zwischen der Aminoaryl-Gruppe und dem Naphtalin erklärt, welche eine Ladungstrennung zur Folge hat [14]. Das Dipolmoment des zugehörigen Triplett,  $T_1$  ist kleiner als das des verdrehten Zustands  $S_{1(TICT)}$ . Die Stabilisierung des ladungstrennten  $S_{1(TICT)}$  und die Absenkung der Energie durch die Relaxation der polaren Lösungsmittelmoleküle reduziert die Energieaufspaltung zwischen Singulett- und Triplettzustand und favorisiert dadurch eine höhere ISC-Rate in den Triplett. Dies führt zu einer kleinen Quantenausbeute von ANS in polaren Lösungsmitteln. In unpolaren Lösungsmitteln wird der  $S_{1(TICT)}$  nicht stabilisiert und ein Übergang in  $T_1$  nicht favorisiert. Dies führt zu einer ausgeprägten Fluoreszenz. Dementsprechend zeigt ANS einen charakteristischen Anstieg der Fluoreszenz unter Zugabe präfibrillarer und fibrillarer Strukturen, die hydrophobe Regionen besitzen. Natives Protein (Monomere), das diese Strukturen nicht aufweist, führt zu keiner Änderung der Fluoreszenz [52, 14].

#### 3.2.2. Thioflavin T

Thioflavin T (ThT) ist der in der Literatur am meisten verwendete Marker für amyloide Strukturen. ThT wird als Standardverfahren *in vitro* eingesetzt, das als Nachweismethode einer vollständigen Aggregation in  $\beta$ -Faltblattstrukturen dient. Man spricht auch davon, dass eine Probe „ThT positiv“ ist, wenn sie das für eine Bindung mit ThT typische Verhalten zeigt. Das ist der starke Anstieg der Fluoreszenz von ThT durch die Wechselwirkung mit den fibrillaren Strukturen, während das Molekül mit nativem Protein oder in reinem Wasser nur geringe Fluoreszenz zeigt [58, 81]. Dieses Verhalten ist Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen. Sie beschäftigen sich nicht nur mit der Bindung von ThT an die Aggregate, sondern auch mit seinem interessanten Fluoreszenzverhalten in verschiedenen Lösungsumgebungen [38, 7].

Die molekulare Struktur von ThT ist in Abbildung 3.4 (a) gezeigt. ThT zeigt eine Absorption über einen weiten Spektralbereich von 250 nm bis fast 490 nm. Das Absorptionsmaximum liegt bei 412 nm (siehe Abbildung 3.4 (c), schwarz). Das Molekül wird typischerweise im Maximum angeregt und fluoresziert in unpolaren Lösungsmitteln um einige Nanometer verschoben bei etwa 480 nm [126] (siehe Abbildung 3.4 (c), rot). Die Fluoreszenz ist in Wasser oder mit nativem Protein stark unterdrückt und bathochrom auf ca. 490 nm verschoben. Sie ist aber vergleichsweise stark in unpolaren Lösungsmitteln oder mit Proteinfibrillen. Der Anstieg der Fluoreszenz

nach einer Anregung im Maximum der Absorption wird zur Untersuchung von Proteinaggregaten eingesetzt und ist direkt proportional zur Bindung der ThT-Moleküle an amyloide Strukturen [81].

Diese charakteristische Fluoreszenz wird in der Literatur zunächst durch einen ladungstrennten Zustand zwischen Benzothiazol und dem Phenylring erklärt [116]. Der nicht zu vernachlässigende Einfluss der Viskosität führt zu einer Erweiterung des Modells durch einen ladungstrennten Zustand (TICT-State) mit einer Verdrillung der beiden Gruppen gegeneinander. Der Grundzustand von ThT wird als annähernd planar angenommen, während im angeregten Zustand eine 90°-Geometrie erreicht wird. Diese wird von kleinen polaren Lösungsmittelmolekülen, wie Wasser, DMSO oder sogar Ethanol stabilisiert. Viskose oder starre Medien behindern diese Drehung, da keine schnelle Umordnung der Lösungsmittelmoleküle möglich ist [116].

Das Modell ist gültig für die Fluoreszenz nach Anregung in den niedrigsten angeregten Zustand. Was es jedoch nicht berücksichtigt, ist das Auftreten einer blauen Fluoreszenzbande bei 440 nm nach Anregung im kurzwelligen Bereich zwischen 340 nm und 350 nm. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Fluoreszenz bei etwa 480 nm, ist die Quantenausbeute nach Anregung zwischen 340 nm und 350 nm für polare und gering viskose Lösungsmittel wie Wasser, DMSO und Ethanol größer als für unpolare oder stark viskose Lösungsmittel wie Chloroform oder Glycerol [86]. Maskevich et al. [86] führen dafür folgende Erklärung an: Die Vergrößerung eines  $\pi$ -Elektronensystems durch den Beitrag vieler Gruppen führt zu einer Verschiebung der Absorption und Emission in Richtung längerer Wellenlängen. Jedes ThT-Fragment, das nicht konjugiert ist sollte deshalb eine Absorption und Fluoreszenz im kürzeren Wellenlängenbereich besitzen. Die Fragmente könnten voneinander getrennte Benzol- oder Benzothiazolringe sein. Oder die Ladungen der beiden Gruppen des intakten ThT-Moleküls sind schon im Grundzustand getrennt und die Moleküle nehmen noch vor der Anregung einen Zustand mit  $\phi = 90^\circ$  ein. Daraus folgend verhalten sich die beiden zueinander verdrehten Teile wie zwei unabhängige Chromophore [86]. Dieser Zustand darf jedoch nicht mit dem TICT verwechselt werden, der nach der Anregung des planaren ThT im langwelligen Wellenlängenbereich eingenommen werden kann [86, 38].

Diese Idee zur Fluoreszenz von ThT wird von Freire et al. [38] in einem Modell zusammengefasst (siehe Abbildung 3.4 (b)). Hier teilen sich die ThT-Moleküle vor der Anregung in zwei Typen auf: Typ I ist ein schon im Grundzustand verdrehtes Molekül mit  $\phi = 90^\circ$ . Er hat eine verschwindende Absorption bei großen Wellenlängen ( $> 350$  nm) und eine hohe Quantenausbeute in polaren Lösungsmitteln. Seine Fluoreszenz ist in unpolaren und viskosen Lösungsmitteln weniger stark ausgeprägt.

Die Geometrie von Typ II ist planar. Er hat eine hohe Absorption bei langen Wellenlängen und eine kleine Quantenausbeute in polaren und nicht viskosen Lösungsmitteln. Je unpolarer und rigider die Umgebung, desto höher ist die Quantenausbeute der Fluoreszenz bei etwa 480 nm. Insgesamt hat Typ II jedoch eine höhere Quanten-

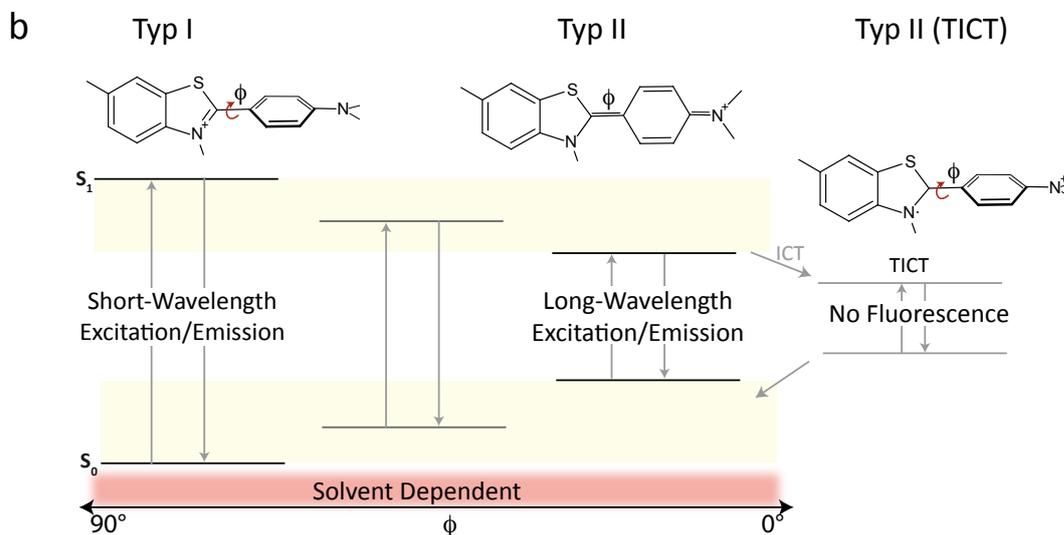
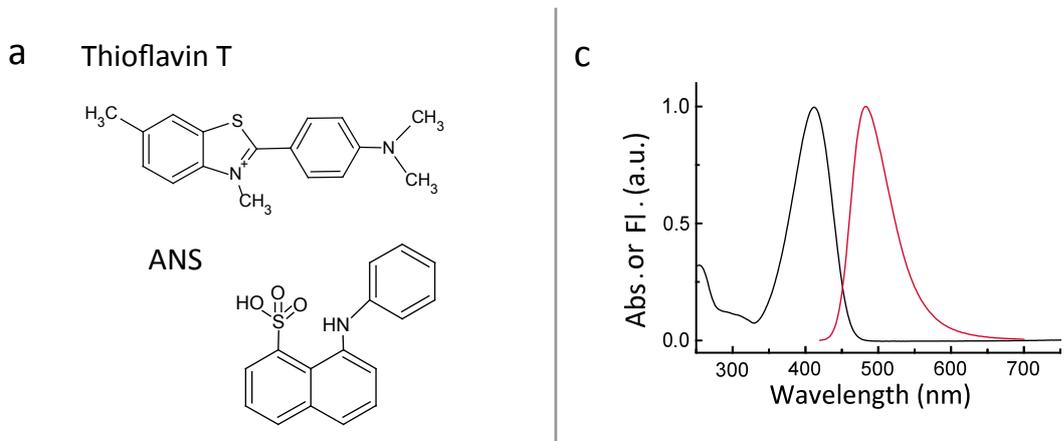
### 3. Die Fluoreszenzspektroskopie

---

ausbeute als Typ I. Die Reaktion der Fluoreszenz von Typ II auf die Umgebung kann auf den TICT-Zustand zurückgeführt werden, wie er oben schon beschrieben wurde.

$\phi$  unterliegt einer statistischen Verteilungsfunktion. Die Verteilung der Typen im Grundzustand hängt von der Lösungsmittelpolarität ab. Die 90°-Geometrie von Typ I wird durch ein polares Lösungsmittel wie Wasser oder DMSO stabilisiert. Umgekehrt ist die planare Konformation des Moleküls in unpolaren und viskosen Lösungsmitteln bevorzugt. Gleichzeitig wird der Übergang der Moleküle in den TICT-Zustand von Typ II in unpolaren oder viskosen Lösungsmitteln unterdrückt.

Die rigide Umgebung in Proteinfibrillen begünstigt eine Konformation der Moleküle im Typ II. Zusätzlich wird der TICT im angeregten Zustand verhindert. Daraus erklärt sich die hohe Quantenausbeute von ThT in den Fibrillen und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 480 nm [38]. Da aber auch die Polarität eine nicht unwesentliche Rolle spielt, wäre zu erwarten, dass ThT in unpolaren Regionen der Fibrillen bindet [7]. In der Literatur ist vielfach versucht worden aus diesen beiden Informationen die Bindungsstelle für ThT genauer einzugrenzen.



**Abbildung 3.4.:** (a) Die molekularen Strukturen von Thioflavin T und ANS. (b) Schema zur Erklärung der Fluoreszenz von ThT in polaren und unpolaren Lösungsmitteln nach [38]. In polaren Lösungsmitteln ist der überwiegende Anteil der Moleküle im Grundzustand nicht planar (Typ I). Sie absorbieren und emittieren im kurzwelligen Bereich. Der kleine Anteil der Moleküle, die im Grundzustand planar sind (Typ II) absorbiert im langwelligen Spektralbereich. Sie haben im angeregten Zustand eine hohe Rate in einen TICT. In unpolaren Lösungsmitteln liegen die Moleküle überwiegend in einem planaren Grundzustand vor. Absorption und Fluoreszenz liegen im langwelligen Spektralbereich. Der Übergang in den TICT ist unterdrückt. Das Bild wurde nach dem Modell in [38] erstellt. (c) Absorption von ThT in Puffer (schwarz) und Fluoreszenz von ThT mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot) bei Anregung im Maximum der Absorption.

#### Fluoreszenzeigenschaften von ThT in der Fibrille

Seit der Entdeckung von ThT als Marker für Proteinaggregate durch P.S. Vassar und C.F. Culling 1959 [122] beschäftigen sich zahlreiche Arbeiten mit der Bindung von ThT an die Proteinaggregate von  $\alpha$ -Synuclein und amyloiden Strukturen. Dabei ist es durch theoretische und experimentelle Methoden gelungen die Bindungsstelle(n) der Moleküle in den  $\beta$ -Faltblattstrukturen genauer einzugrenzen.

H. Naiki et al. [93] und LeVine [81] haben die Fluoreszenz von ThT unter Zugabe verschiedener amyloider Fibrillen und anderer  $\beta$ -Faltblattstrukturen systematisch untersucht. Die Bindung von ThT mit den Strukturen führt nicht immer zu dem oben beschriebenen Fluoreszenzanstieg. Es zeigt sich, dass, anders als für ANS, nur die Bindung an fibrillare Strukturen der  $\beta$ -Faltblattpolymere, nicht aber an  $\beta$ -Faltblattoligomere oder Monomere, zu einem Fluoreszenzanstieg führt. Jedoch ist die Fluoreszenzzunahme bei 482 nm qualitativ immer identisch, unabhängig von der Primärsequenz der Strukturen. Vielmehr scheint die  $\beta$ -Faltblatt- und die fibrillare Anordnung der Aggregate ausschlaggebend für den Anstieg der Fluoreszenz zu sein. Quantitativ ist die Affinität der ThT-Moleküle für die Proteinaggregate durchaus unterschiedlich. Die Dissoziationskonstante  $K_d$  von ThT für die in [81] untersuchten Proteine (unter anderem  $A\beta_{40}$ , Transthyretin, ApoA II und Insulin) variiert zwischen  $0.033 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$ .

In den Arbeiten der vergangenen Jahrzehnte wurden verschiedene Modelle zur Beschreibung des Fluoreszenzanstiegs von ThT durch die Bindung an Proteinaggregate vorgestellt. Ein Vorschlag ist die Bindung von ThT in Form von Mizellen von R. Khurana et al. [66]. Die ThT-Moleküle sollen bei Konzentrationen von  $10\text{-}20 \mu\text{M}$  in Mizellen vorliegen. Die Kombination der hydrophoben und polaren Bereiche in der Struktur von ThT begünstigt die Bildung von Mizellen in einer wässrigen Umgebung. Die hydrophobe Dimethylaminogruppe am Phenylring ordnet sich dabei vom Wasser abgewandt an, die hydrophile Benzothiazolgruppe mit dem polaren Stickstoff und Schwefel zeigt nach außen. Der schwache Anstieg der Fluoreszenz von ThT mit der Konzentration in Wasser, wird auf die Bildung der Mizellen zurückgeführt. Ein noch stärkeres Indiz ist der Anstieg der Anisotropie bei steigender ThT-Konzentration. Die Mizellen konnten in [66] durch AFM-Bilder<sup>7</sup> visualisiert werden. Sogar ihre Bindung in „Höhlen“ der gedrehten fibrillaren Strukturen wurde so gezeigt.

Spätere Berechnungen zeigten Mizellenstrukturen erst ab einer Konzentration von  $30 \mu\text{M}$ , was viel höher ist als die Konzentrationen, die in standardisierten Fluoreszenzprotokollen verwendet werden [104]. Damit wurde die Mizellentheorie in der neueren Literatur ausgeschlossen.

Neben der Mizellentheorie existiert auch das oben beschriebene Modell aus Abbildung 3.4 (b) zur Fluoreszenzänderung in der Fibrille [38]. Demnach bindet ein einzelnes ThT-Molekül in einer „Cavity“ ( $6\text{-}8 \text{ \AA}$ ) mit seiner Langachse parallel zur Wachstumsrichtung der Fibrillen. Die Bindung der Moleküle in den Kavitäten der

---

<sup>7</sup>engl. Atomic Force Microscope

Fibrillen führt zu einer sterischen Hinderung und zwingt das Molekül in eine planare Geometrie. Dies verhindert einen Übergang in den TICT aus dem angeregten Zustand und einen Rückgang der Quantenausbeute [38, 52]. In diesem Fall wäre abgesehen von der Größe der „Cavity“ auch die Dielektrizität entscheidend. Die „Cavity“ muss außerdem lang genug sein, damit das gesamte Molekül darin Platz findet [118]. Diese Theorie deckt sich mit den meisten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen, die an ThT durchgeführt wurden.

In [46] wurde die Bindungsstelle von ThT an die amyloiden Strukturen sowohl theoretisch als auch experimentell genauer eingegrenzt. Generell wurde auch hier gefunden, dass die Fluoreszenzzunahme von ThT nur bei der Bindung an Peptidfibrillen auftritt, jedoch nicht an nativem, monomeren Protein. Die untersuchten Amyloidfibrillen (hier Acetylcholinesterase und  $\gamma$ -Cyclodextrin), haben alle  $\beta$ -Faltblattstruktur, die rechtwinklig zur Achse der Fibrillen angeordnet ist. Für beide Proteinfibrillen wurde ein Tubus oder „Cavity“ in der Mitte der Fibrillen vorgeschlagen, parallel zur Fibrillenachse [26]. Die Größen dieser Höhlen liegen bei etwa 8-9 Å und bieten Platz für bis zu zwei ThT-Moleküle. Kavitäten mit größerem Durchmesser von bis zu 20-25 Å wurden auch für  $\alpha$ -Synuclein Poren und  $\beta$ -Amyloid-Fibrillen (15-20 Å) gefunden [78]. Es wurde vorgeschlagen, dass ein oder mehrere ThT-Moleküle in diesen Kavitäten entlang der Wachstumsrichtung der Fibrille binden.

#### Mögliche Bindungsstellen von ThT in der Fibrille

Aus NMR-Daten wurde ein Modell für die Faltung des monomeren  $\alpha$ -Synuclein in Fibrillen postuliert. In diesem Modell ordnen sich mehrere  $\beta$ -Faltblätter übereinander an (siehe Abbildung 2.2 (b)). Die  $\beta$ -Faltblätter liegen dabei rechtwinklig angeordnet zur Wachstumsrichtung der Fibrille (Näheres dazu siehe Abschnitt 2.4) [123]. Der Abstand zwischen den einzelnen übereinander liegenden  $\beta$ -Strängen beträgt etwa 5 Å. Zwischen den  $\beta$ -Faltblättern, die sich zur Fibrille anordnen, liegen etwa 10-11 Å [121]. Die benachbarten Reihen von Cross- $\beta$ -Strängen bilden an der Oberfläche der Stränge und zwischen den  $\beta$ -Faltblättern kanalartige Strukturen. Diese Strukturen formen mögliche Bindungsstellen für ThT [75, 7].

Die Bindung von ThT wurde von M. Biancalana et al. [7] anhand eines Modellpeptids beschrieben. Das Modellpeptid PSAM (engl. Peptide Self Assembling Mimic) kann gezielt ein  $\beta$ -Faltblatt erzeugen, das einen Kanal aus hydrophoben aromatischen Aminosäuren auf der Oberfläche bildet. Kristallstrukturen des Peptids zeigen eine „Cavity“ an der Oberfläche des  $\beta$ -Faltblatts, die aus aromatischen Ringen des Tyrosins gebildet wird. Diese werden durch benachbarte Leucin Residuen stabilisiert. Die Simulationen zeigten, dass ThT die Bindung in Kanälen an der Oberfläche präferiert. Dabei ordnen sich die Farbstoffe mit ihrer Langachse entlang der Fibrillenachse und rechtwinklig zu den  $\beta$ -Faltblättern an (siehe Abbildung 2.2). ThT bindet dabei nicht gleichmäßig auf der Oberfläche, sondern bevorzugt in von Aromaten gebildeten Kanälen. Die Kanäle werden von mindestens vier  $\beta$ -Strängen gebildet. Die Dissozia-

tionskonstante mit  $K_d \sim 2 \mu\text{M}$  bestätigt eine hohe Affinität des Moleküls für diese Bindungsstelle. Aus den Simulationen geht hervor, dass nur ein Molekül in den von den Aminosäuren gebildeten „Cavities“ Platz findet.

In [92] wurden sechs Bindungsstellen in einer  $\beta$ -Faltblattstruktur eines Modellsystems simuliert; drei auf der Oberfläche und drei innerhalb der  $\beta$ -Struktur. In zwei Fällen bindet ThT rechtwinklig zur Wachstumsrichtung der Fibrillen. Die Solvationshülle der ThT-Moleküle ist substantiell von der Umgebung in der Fibrille modifiziert. Dies beeinflusst stark das Fluoreszenzspektrum der Moleküle. Das experimentell gemessene Spektrum konnte nur reproduziert werden, wenn ThT in die Kanäle an der Oberfläche der Faltblätter bindet.

Beide Arbeiten [7, 92] beschreiben Bindungsstellen, die von jeweils einem ThT besetzt werden können. Dies rückt das Modell aus Abbildung 3.4 (b) von ThT in den Fokus. Die Rigidität in der Bindungsstelle ist ausreichend für die Änderung in der Fluoreszenz, jedoch nicht notwendig, um das Molekül zu planarisieren und einen Übergang in den TICT zu unterdrücken. Die elektronische Stabilisierung durch die Umgebung ist gleichermaßen wichtig wie die sterische Hinderung der Drehung [132]. Dabei haben Messung und Simulation gezeigt, dass die Bindungsstelle, welche die charakteristische Fluoreszenz von ThT bedingt, an der Oberfläche der  $\beta$ -Faltblattstruktur liegt und durch aromatische Residuen gebildet wird. Etwa vier bis fünf  $\beta$ -Faltblätter sind dabei notwendig, um ein ThT-Molekül vollständig zu binden [92].

## KAPITEL 4

---

### Bindung und Bindungsstöchiometrie von anle138b

---

Die intrinsische Fluoreszenz verschiedener organischer Moleküle wurde in der Literatur oft als Marker für die Bildung pathologischer Aggregate herangezogen. Die Fluoreszenzänderung wird meist auf eine nicht kovalente Interaktion der Marker mit dem Proteinaggregat zurückgeführt, die keinen Einfluss auf die Aggregatbildung hat. Die Fluoreszenzspektroskopie ist damit eine direkte Nachweismethode für die Fibrillenbildung, sowie die Wechselwirkung der Marker mit den Aggregaten [52].

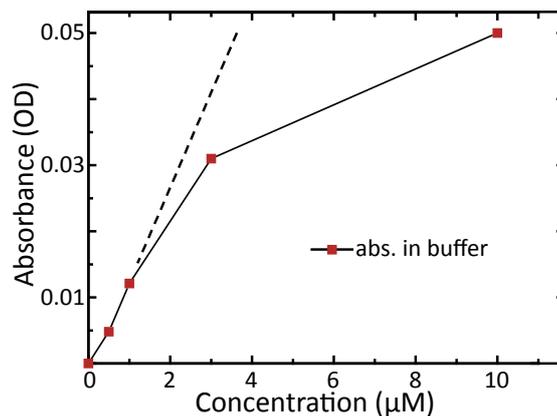
Aus pathologischen Untersuchungen erkrankter Mäuse (siehe Abschnitt 2.5) konnte festgestellt werden, dass die Bildung toxischer Oligomere durch die Therapie mit anle138b zurückgeht. Eine direkte Wechselwirkung der Substanz mit den Aggregaten konnte aber auf diesem Wege nicht nachgewiesen werden. Spektroskopische Untersuchungen zeigen jedoch einen Anstieg der intrinsischen Fluoreszenz von anle138b durch die Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein Aggregaten, welche auf eine nicht kovalente Wechselwirkung der Substanz mit den Fibrillen hinweist [30]. Die Fluoreszenzerhöhung ist sehr spezifisch abhängig von der Umgebung. Diese Abhängigkeit wird im nachfolgenden Kapitel genauer erläutert.

In diesem Kapitel wird die Bindung und die Bindungsstöchiometrie von anle138b mit zwei verschiedenen Proteinen untersucht: zum einen mit dem Parkinson assoziierten  $\alpha$ -Synuclein und zum anderen mit dem bei verschiedenen Krankheiten vorkommenden hTau46 (näheres zu den Proteinen siehe Abschnitt 2.4). Die Bindungskonstanten werden sowohl für  $\alpha$ -Synuclein als auch für hTau46 Fibrillen bestimmt und mit einer zu [30] überarbeiteten Auswertungsmethode berechnet. Die Ergebnisse werden mit denen für Thioflavin T verglichen. Aus einem kompetitiven Vergleich von anle138b mit Thioflavin T kann eine Aussage über die Bindungsstelle von anle138b an die Fibrille gemacht werden.

## 4.1. Charakterisierung der DPP-Derivate und Amyloid-Fibrillen

Zunächst werden die grundlegenden Eigenschaften der Substanz anle138b (Br) sowie der Proteinaggregate charakterisiert, bevor auf ihre Interaktion eingegangen wird. Diese vor allem fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden überwiegend in [74, 101] und [30] beschrieben. Dabei hat sich unter anderem gezeigt, dass anle138b eine Photoreaktion bei Belichtung im UV-Bereich eingeht. Aus diesem Grund werden parallel zu anle138b die photostabilen Derivate anle186b (F) und sery313b (OH) untersucht. Beide Substanzen wurden positiv als Aggregationsinhibitoren im SIFT-Essay getestet (siehe Abschnitt 2.5). Hier wird die Fluoreszenz der drei Derivate vorgestellt und die Ergebnisse zur Photoreaktion noch einmal zusammengefasst.

### 4.1.1. Löslichkeit der DPP-Derivate



**Abbildung 4.1.:** Anstieg der Absorbanz mit der Konzentration. Ab  $1 \mu\text{M}$  ist eine deutliche Abweichung von der eigentlich linearen Abhängigkeit zu sehen. Modifiziert übernommen aus [74].

Zur Bestimmung der Löslichkeit eignet sich die Messung der Absorption in Abhängigkeit von der Konzentration. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz steigt die Absorption linear mit der Konzentration an [137]. In Abbildung 4.1 ist die Absorption von anle138b in wasserbasiertem Puffer in Abhängigkeit der Konzentration dargestellt. Offensichtlich ist schon ab einer Konzentration von etwa  $1 \mu\text{M}$  die Linearität nicht mehr gegeben. Die Löslichkeitsgrenze liegt dementsprechend unterhalb von  $1 \mu\text{M}$ . Auch die beiden anderen Substanzen anle186b und sery313b zeigen ein ähnliches Verhalten. Die Löslichkeit der Substanzen in wasserbasiertem Puffer ist damit extrem gering und es werden nur Konzentrationen bis  $0.5 \mu\text{M}$  verwendet.

Höhere Konzentration können in den Lösungsmitteln DMSO und Ethanol erzielt werden. Die Substanzen werden aus diesem Grund immer erst in DMSO (für Messun-

gen in Puffer oder in Puffer mit Proteinaggregaten) oder in Ethanol (für Messungen in Cyclohexan) gelöst, bevor sie in Puffer/Cyclohexan verdünnt werden. Dies führt dazu, dass im Endprodukt etwa 1 % (v/v) des jeweils anderen Lösungsmittels vorhanden ist<sup>1</sup>.

#### 4.1.2. Photoreaktion von anle138b

Die Substanz anle138b geht unter UV-Belichtung eine Photoreaktion ein. Dabei wird das Brom an der *meta*-Position abgespalten und durch eine Komponente aus dem Lösungsmittel ersetzt. Aus einer LC-MS<sup>2</sup> können die Photoprodukte der belichteten Substanz in Puffer und DMSO bestimmt werden. In Wasser wird das Brom durch eine OH-Gruppe ersetzt. Es bildet sich folglich das stabile Derivat sery313b (OH). In DMSO stehen deutlich mehr Gruppen zur Verfügung, die an die *meta*-Position binden können. Zu einem sehr kleinen Anteil entsteht sery313b (4 %). Der Rest teilt sich auf in Produkte mit einer Methylsulfoxidgruppe (25 %), mit einer Schwefel-Methylgruppe (29 %) und einem Wasserstoff (41 %) [101]. Etwa 1 % der entstandenen Photoprodukte kann nicht zugewiesen werden.

Da alle Photoprodukte andere Fluoreszenzeigenschaften besitzen als anle138b, ist es notwendig, die Messeinstellungen so zu wählen, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz der Moleküle photoreagiert. Mit einer absorbierten Dosis von nur etwa 228 nJ/ml pro Spektrum können bis zu zehn Spektren in Folge aufgenommen werden, ohne dass ein signifikanter Anteil der Moleküle photoreagiert. Dazu wird folgende Messeinstellung am Fluoreszenzspektrometer gewählt: Anregungsmonochromator 0.4 nm, Emissionsmonochromator 8 nm, Integrationszeit 0.4 s, 5 nm spektrale Auflösung [30].

Obwohl diese Eigenschaft von anle138b die weitere Untersuchung nicht beeinflusst, werden parallel die zwei weiteren Derivate anle186b und sery313b untersucht, die beide in Wasser photostabil sind. Es handelt sich hierbei zum einen um das Photoprodukt von anle138b (sery313b), bei dem das Brom durch eine OH-Gruppe ersetzt ist, zum anderen um die DPP-Substanz anle186b, bei der das Brom durch ein Fluoratom substituiert ist.

#### 4.1.3. Fluoreszenz von anle138b und Derivaten

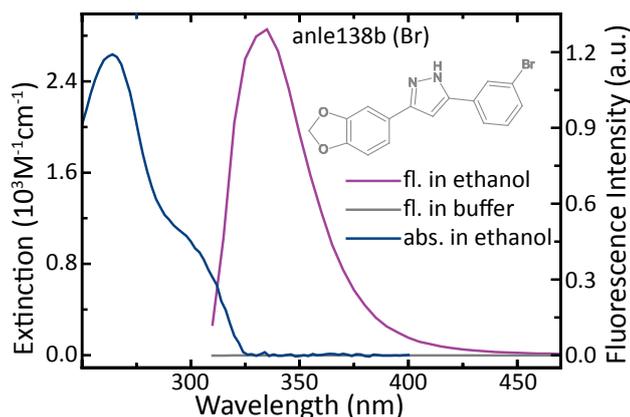
Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 4.2 die Fluoreszenz und Absorption von anle138b in Ethanol (blau) gezeigt. Da sich die Substanz in Ethanol sehr gut löst, ist dieses Lösungsmittel ideal, um die grundlegenden Eigenschaften in Absorption und Fluoreszenz zu untersuchen, bevor auf die Proteinaggregate eingegangen wird. Anle138b zeigt eine ausgeprägte Absorption im UV-Bereich von 250 nm bis ca. 325 nm, wobei sich bei etwa 300 nm eine Schulter abzeichnet, die durch die starke Absorptionsbande um 260 nm teilweise überlagert ist. Die Bande bei 260 nm kann

---

<sup>1</sup>Alle verwendeten Lösungsmittel stammen von der Firma Merck Millipore

<sup>2</sup>engl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

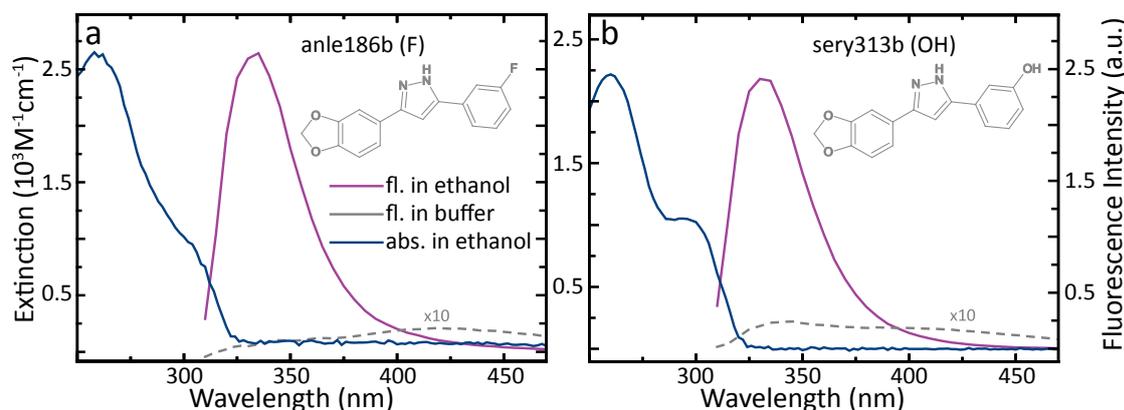
der Anregung in einen elektronisch höheren angeregten Zustand (S2) zugesprochen werden. Die Schulter bei 300 nm ist die Absorption in den elektronisch niedrigsten Zustand S1. Dazu symmetrisch, aber um fast 40 nm verschoben, zeichnet sich die Fluoreszenz (lila) bei einer Anregung von 300 nm ab (Absorptionskoeffizient bei 300 nm:  $\epsilon = 10000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Das ausgeprägte Maximum der Fluoreszenz in Ethanol liegt bei 335 nm.



**Abbildung 4.2.:** Absorption (dunkelblau) und Fluoreszenz (lila) von anle138b in Ethanol. Die graue Linie zeigt die nicht detektierbare Fluoreszenz in wasserbasiertem Puffer.

Die Fluoreszenz von anle138b zusammen mit Proteinen und Proteinaggregaten wird allerdings in wasserbasiertem Puffer aufgenommen, nicht nur um eine möglichst biologische Umgebung zu schaffen sondern vor allem, da die pathologischen Aggregate ausschließlich in Puffer bei einem pH-Wert von 7 stabil sind. Untersuchungen der Fluoreszenz von anle138b in Puffer oder reinem Wasser zeigen unter den verwendeten Bedingungen kein Signal. Grund hierfür ist zum einen die geringe Konzentration von nur  $0.5 \mu\text{M}$ , zum anderen die Messeinstellungen, die so gewählt sind, dass anle138b während eines Messzyklus nicht photoreagiert. Das führt aber dazu, dass keine Fluoreszenz für anle138b sichtbar ist. Dennoch kann eine potentielle Fluoreszenzerhöhung unter Zugabe von Proteinen und Proteinaggregaten gemessen werden.

Die Absorption der beiden Substanzen anle186b (F) und sery313b (OH) in Ethanol ist sehr ähnlich zu anle138b (siehe Abbildung 4.3 (a) und (b) in blau). Bei einer Anregung mit 300 nm (Absorptionskoeffizient bei 300 nm:  $\epsilon = 10000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) zeigen beide Substanzen in Ethanol eine ausgeprägte Fluoreszenz (lila) mit einem Maximum bei etwa 335 nm. Die Fluoreszenz in wasserbasiertem Puffer ist auch für diese beiden Substanzen sehr schwach, kann aber unter den gewählten Bedingungen gemessen werden. Zur besseren Veranschaulichung ist die Fluoreszenz in Puffer in Abbildung 4.3 (a) und (b) um einen Faktor zehn vergrößert (grau gestrichelt). Die Fluoreszenz ist stark rotverschoben und zeigt ein deutliches zweites Maximum bei etwa 420 nm.



**Abbildung 4.3.:** (a) Absorption (dunkelblau) und Fluoreszenz (lila) von anle186b in Ethanol. Die Fluoreszenz in wasserbasiertem Puffer ist sehr schwach und aus diesem Grund um das zehnfache erhöht dargestellt (grau gestrichelt). (b) Absorption (dunkelblau) und Fluoreszenz (lila) von sery313b in Ethanol. Auch hier ist die Fluoreszenz in wasserbasiertem Puffer um das zehnfache erhöht dargestellt (grau gestrichelt).

Aufgrund der höheren Quantenausbeute der beiden Substanzen in Wasser und ihrer Photostabilität sind sie für spezielle Messungen besser zu handhaben. Aus Vergleichen über Fluoreszenz, Absorption und Struktur können wiederum Rückschlüsse auf das Verhalten von anle138b gezogen werden. Daher werden anle186b und sery313b gleichermaßen charakterisiert. Im darauffolgenden Kapitel 5 werden die Gemeinsamkeiten von Fluoreszenz und Absorption in einem Schema begründet und damit die Vergleichbarkeit der Substanzen gerechtfertigt. Alle Resultate der folgenden Untersuchungen beziehen sich aber zuletzt immer auf das pharmakologisch relevante Molekül anle138b.

Die Fluoreszenz von anle138b ist damit für die Untersuchung mit pathologischen Aggregaten charakterisiert. Die Eigenschaften, die zu der deutlichen Änderung der Fluoreszenz aufgrund des Lösungsmittels führen, werden in Kapitel 5 ausführlich diskutiert.

#### 4.1.4. Charakterisierung der $\alpha$ -Synuclein Fibrillen mit FTIR und ThT

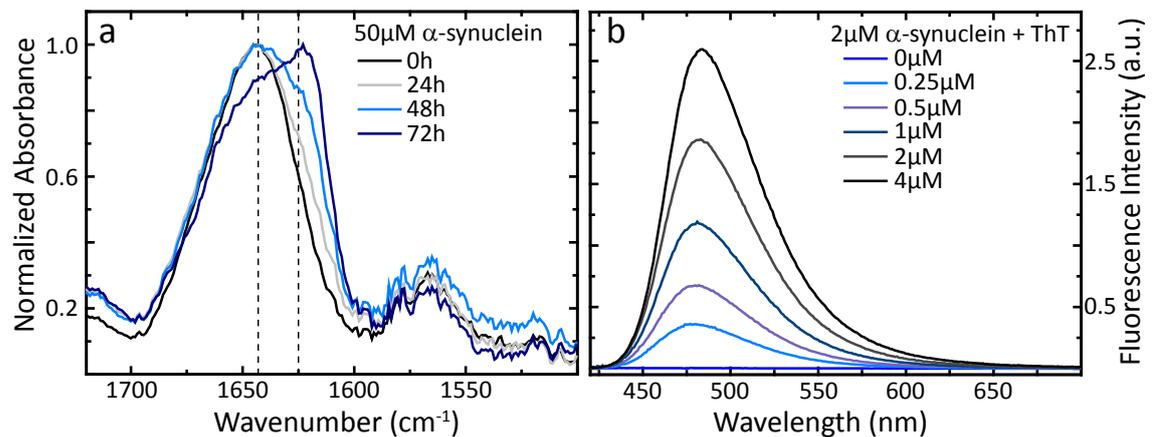
Die Aggregation der Proteine in  $\beta$ -Faltblattstrukturen kann mittels FTIR-Messungen<sup>3</sup> verfolgt werden. Ein gelungener Aggregationsprozess ist am Ende Thioflavin T (ThT) positiv d.h. die Zugabe von ThT zu den fertigen Fibrillen führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz des Farbstoffs. Beide Essays zum Nachweis der Proteinaggregation werden im Folgenden anhand von  $\alpha$ -Synuclein erklärt.

Die  $\alpha$ -Synuclein (bzw. hTau42) Proteine und Aggregate wurden vom Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung in München bereitgestellt.

<sup>3</sup>engl. Fourier-Transformation-Infrared-Spectroscopy

#### 4. Bindung und Bindungsstöchiometrie von anle138b

Das Protein wird aus E-Coli Bakterien extrahiert. Es liegt zunächst monomerisch vor. 1,4 ml Tris-Puffer mit etwa  $100 \mu\text{M}$  Protein ( $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $0.02\% \text{ NaN}_3$ ) werden für insgesamt 72 h in einem Rührschüttler (Eppendorf) bei  $37^\circ\text{C}$  und 1400 rpm geschüttelt. Alle 24 h wird der Aggregationsprozess im FTIR-Spektrometer aufgenommen. Durch die Aggregation verschiebt sich die Amid I Bande von etwa  $1643 \text{ cm}^{-1}$  nach  $1625 \text{ cm}^{-1}$ . Dies ist deutlich in Abbildung 4.4 (a) zu sehen. Während sich nach 24 h und 48 h nur eine leichte Schulter bei  $1625 \text{ cm}^{-1}$  abzeichnet (hellgrau und hellblau), ist die Verschiebung durch die Aggregation nach 72 h (dunkelblau) deutlich zu sehen. Dies zeigt, dass die Aggregation erst nach 72 h abgeschlossen ist. Eine Verlängerung der Aggregationszeit führt zu keiner weiteren Veränderung (Daten nicht gezeigt). In der Lösung befindet sich jedoch noch ein hoher Prozentsatz an Monomeren. Dieser Anteil nicht aggregierten Proteins kann durch Zentrifugieren mit einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) aus der Lösung extrahiert werden.

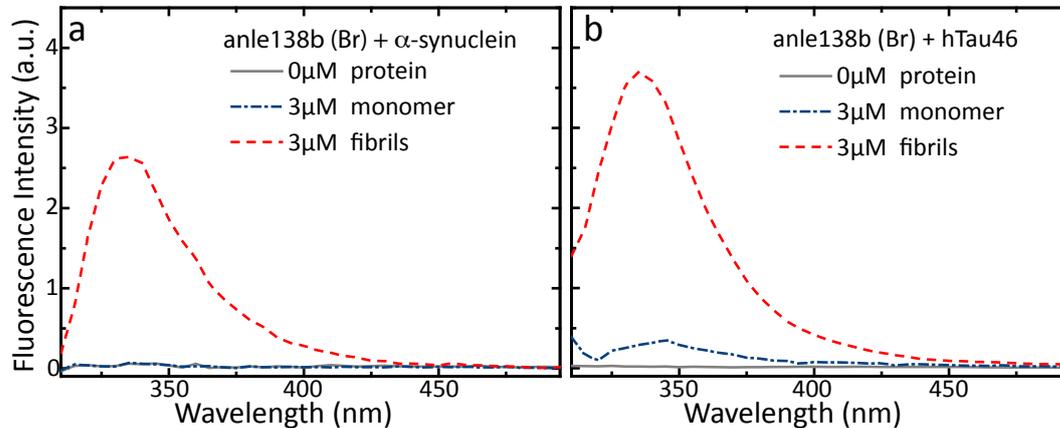


**Abbildung 4.4.:** (a) Verfolgung der Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein über 72 h. Die Amid I Bande verschiebt sich während des Aggregationsprozesses von  $1643 \text{ cm}^{-1}$  nach  $1625 \text{ cm}^{-1}$ . (b) Die Aggregate sind ThT positiv, d.h. die Zugabe des Fluorophors führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz abhängig von der Konzentration.

Die Aggregation in  $\beta$ -Faltblattstrukturen kann anschließend über die Zugabe von ThT verifiziert werden. Hier sollte die Erhöhung der Konzentration von ThT zu einem Anstieg der Fluoreszenz führen. In Abbildung 4.4 (b) ist dies für eine Lösung mit  $2 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein gezeigt. Durch die Zugabe von  $0.25\text{--}4 \mu\text{M}$  ThT steigt die Fluoreszenz kontinuierlich an.

Die Aggregation von hTau46 erfolgt in ähnlichen Schritten. Etwa  $22 \mu\text{M}$  Protein wird in  $50 \text{ mM}$  Tris-Puffer ( $0.03 \text{ mg/ml}$  Heparin,  $0.02\% \text{ NaN}_3$ ) verdünnt und für 72 h bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Rührschüttler geschüttelt ( $1000 \text{ rpm}$ ). Die Aggregation in Fibrillen kann auch hier über die ThT Fluoreszenz nachgewiesen werden [88].

## 4.2. Untersuchung der Fluoreszenz mit $\alpha$ -Synuclein und hTau46



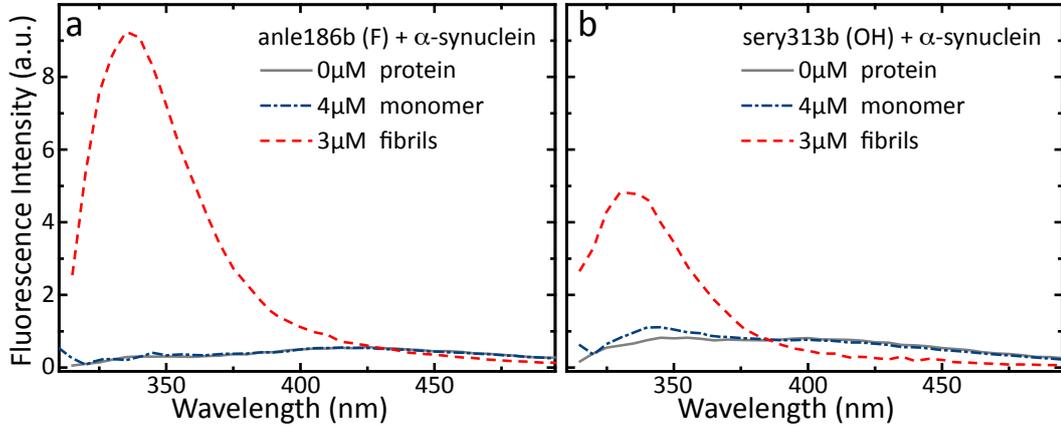
**Abbildung 4.5.:** (a) anle138b in Puffer (grau) mit  $\alpha$ -Synuclein Monomeren (blau, strichpunktirt) und mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot gestrichelt). (b) anle138b in Puffer (grau) mit hTau46 Monomeren (blau, strichpunktirt) und mit hTau46 Fibrillen (rot gestrichelt).

Zur Untersuchung der Interaktion von anle138b mit Proteinaggregaten, wird die Substanz in Tris-Puffer (pH 7) gelöst ( $0.25 \mu\text{M}$ ). Wie oben gezeigt, ist auch hier für anle138b in Puffer keine Fluoreszenz zu sehen (siehe Abbildung 4.5 (a) und (b) in grau). Die Zugabe von nativem Protein ( $3 \mu\text{M}$  Monomer) führt zu keiner ( $\alpha$ -Synuclein) oder nur geringer (hTau46) Fluoreszenz (strichpunktirt in blau). Erst die Zugabe von Proteinfibrillen ( $3 \mu\text{M}$  Proteinkonzentration) führt in beiden Fällen zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz (rot gestrichelt). Das Emissionsmaximum liegt bei etwa 335 nm und ist in Form und Lage ähnlich dem in Ethanol.

Gleichzeitig werden anle186b und sery313b in Puffer und mit  $\alpha$ -Synuclein Monomeren sowie Fibrillen untersucht (siehe Abbildung 4.6). Beide Substanzen zeigen ähnliche Eigenschaften wie anle138b. Die Fluoreszenz in Puffer (grau) und mit nativem Protein (strichpunktirt in blau) ist sehr gering und zeigt ein rotverschobenes Maximum bei etwa 420 nm. Unter Zugabe von Fibrillen steigt die Fluoreszenz an (rot gestrichelt). Das Maximum liegt wie in Ethanol bei etwa 335 nm. Die beiden Derivate werden jedoch nicht mit hTau46 untersucht. Hier geht es ausschließlich darum, eine Wechselwirkung der *in vivo* aktiven Substanz anle138b mit anderen Proteinaggregaten zu bestätigen.

Der Anstieg der Fluoreszenz von anle138b und den beiden Derivaten unter Zugabe der Proteinaggregate könnte aus der direkten Wechselwirkung der Moleküle mit der Proteinstruktur resultieren. Tatsächlich ist die Fluoreszenz der DPP-Substanzen abhängig von der direkten Umgebung, wie die unterschiedlichen Spektren in Puffer und in Ethanol in den Abbildungen 4.2 und 4.3 zeigen. Somit könnte die Bindung

zu einer Umgebungsänderung der Moleküle führen und dementsprechend zu einem Anstieg der Fluoreszenz.



**Abbildung 4.6.:** (a) anle186b in Puffer (grau) mit  $\alpha$ -Synuclein Monomeren (blau, strichpunktiert) und mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot gestrichelt). (b) sery313b in Puffer (grau) mit  $\alpha$ -Synuclein Monomeren (blau, strichpunktiert) und mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot gestrichelt).

#### 4.2.1. Anisotropien

Der Anstieg der Fluoreszenz der DPP-Derivate durch die Zugabe von Proteinfibrillen ist ein Hinweis aber kein Beweis für die direkte Wechselwirkung der Substanzen mit den Aggregaten. Die Messung der Anisotropie kann hier Aufschluss geben. Die Anisotropie ist ein Maß für den Polarisationserhalt der Fluoreszenz bezüglich der Anregungspolarisation. In der stationären Messung wird die Anisotropie direkt aus der Differenz der beiden Polarisationszustände der Intensität  $I_{\perp}$  und  $I_{\parallel}$  bestimmt:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (4.1)$$

Die Anisotropie ist eine dimensionslose Größe, die unabhängig von der Gesamtfluoreszenz sein sollte. Deshalb wird die Differenz der beiden Fluoreszenzen  $I_{\parallel} - I_{\perp}$  auf die Gesamtfluoreszenz  $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$  normiert. Nach Anregung eines Moleküls mit polarisiertem Licht (hier  $I_{\parallel}$ ) ist die Anisotropie der Fluoreszenz direkt abhängig vom Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  zur Rotationskorrelationszeit  $\theta$ .

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\theta} \quad (4.2)$$

$r_0$  ist hierbei die maximal mögliche Anisotropie mit  $r_0 = 0.4$ .

Ist die Rotationskorrelationszeit länger als die Fluoreszenzlebensdauer, dann steigt die Anisotropie. Bei sehr kleinen Molekülen wie den DPP-Derivaten liegt die Rotationskorrelationszeit bei etwa 150 ps und ist damit deutlich kürzer als deren Fluoreszenzlebensdauer im Nanosekundenbereich [77, Kapitel 10]. Die Anisotropie ist folglich nahezu null. Für die Proteine und Proteinaggregate ist, aufgrund von Größe und Form, die Rotationskorrelationszeit groß. Für  $\alpha$ -Synuclein Monomere beträgt sie etwa 1-2 ns und für die Fibrillen ist  $\theta \gg 10$  ns [118]. Monomere und Aggregate sollten deshalb eine Anisotropie ungleich null besitzen. Koppeln die DPP-Moleküle an die Monomere oder Fibrillen, dann muss die Anisotropie und daraus resultierend auch die Rotationskorrelationszeit steigen.

**Tabelle 4.1.:** Anisotropien und Rotationskorrelationszeiten von anle138b, anle186b und sery313b mit  $\alpha$ -Synuclein. Die Fehler ergeben sich aus der Mittelung über mehrere Messungen.

	anle138b (Br)		anle186b (F)		sery313b (OH)	
	r	$\theta$ (ns)	r	$\theta$ (ns)	r	$\theta$ (ns)
Puffer	-	0.15*	< 0.02	< 0.26	< 0.006	< 0.06
Monomere	-	-	< 0.003	< 0.05	< -0.002	< 0.02
Fibrillen	0.3±0.06	-	0.3±0.1	15±1.5	0.2±0.008	4±1.25

\*Literaturwert

Für die Substanzen anle186b und sery313b kann aus einer zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung die Fluoreszenzlebensdauer in Puffer bestimmt werden (Details siehe Kapitel 5). Sie beträgt für anle186b 5 ns und für sery313b 4 ns. Da anle138b in Puffer keine Fluoreszenz zeigt, kann auch keine Lebensdauer bestimmt werden. Aus stationären Messungen können für die Substanzen anle186b und sery313b in Puffer sehr kleine Anisotropien und folglich kurze Rotationskorrelationszeiten von 20-200 ps bestimmt werden, was gut mit den Vorhersagen zu Molekülen dieser Größe übereinstimmt [77, Kapitel 10]. Für anle138b kann aufgrund fehlender Fluoreszenz keine Anisotropie oder Rotationskorrelationszeit gemessen werden.

Die Zugabe der Monomere ( $3 \mu\text{M}$  Proteinkonzentration) ändert die Anisotropie der Moleküle anle186b und sery313b nicht. Jedoch mit Fibrillen ( $3 \mu\text{M}$  Proteinkonzentration) steigt die Anisotropie der beiden Moleküle auf  $\sim 0.3$ . Auch für anle138b kann eine Anisotropie gemessen werden, da die Fluoreszenz mit Fibrillen ausreichend hoch ist. Daraus ergeben sich deutlich höhere Rotationskorrelationszeiten.

Der Anstieg der Rotationskorrelationszeit und Anisotropie der Moleküle kann nur von einer direkten Kopplung der Derivate an die großen Aggregate stammen. In Kombination mit  $\alpha$ -Synuclein Monomeren ändert sich die Rotationskorrelationszeit nicht. Folglich findet auch keine Kopplung zwischen den Molekülen und dem nativen Protein statt. Dies deckt sich sehr gut mit den Resultaten aus dem vorangegangenen

Abschnitt. Obwohl für anle138b keine direkte Messung der Anisotropie in Puffer und mit Monomeren existiert, kann über den Vergleich mit den stärker fluoreszierenden Derivaten anle186b und sery313b auch hier darauf geschlossen werden, dass es zu keiner Wechselwirkung zwischen anle138b und den  $\alpha$ -Synuclein Monomeren kommt.

Die Anisotropien von anle138b mit hTau46 Fibrillen ergeben ähnliche Werte von 0.2-0.3. Damit kann von einer Kopplung mit den Fibrillen ausgegangen werden. Eine direkte Messung der Anisotropie von anle138b und den Monomeren ist aber auch hier nicht möglich.

Die Kombination aus Fluoreszenzdaten und Anisotropie erlaubt eine Aussage über die direkte Bindung von anle138b und Derivaten an Proteinaggregate mit fibrillarer Struktur. Dabei scheint für anle138b die  $\beta$ -Faltblattstruktur der Aggregate ausschlaggebend für die effiziente Kopplung zu sein.

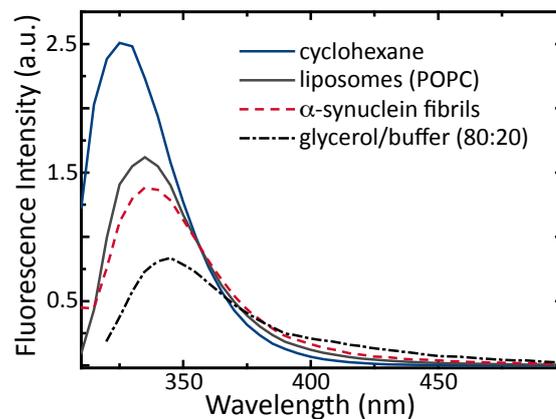
#### 4.2.2. Umgebung von anle138b in der $\alpha$ -Synuclein Fibrille

Die Messungen der Fluoreszenz und Anisotropie haben gezeigt, dass anle138b an die Proteinfibrillen bindet (nicht kovalente Bindung). Ursache für diese Annahme sind die Fluoreszenzeigenschaften in der Fibrille, die sich deutlich von denen in Puffer unterscheiden. Es gibt zwei Hauptfaktoren in der Fibrille, die zu der Fluoreszenzänderung führen können. Zum einen ist die Umgebung in der Fibrille viel rigider als in Wasser. Zum anderen kann anle138b auch an Stellen binden, die stark hydrophob sind. Aus Vergleichsmessungen mit anderen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität und Rigidität kann die Umgebung in der Fibrille näher eingegrenzt werden.

In Abbildung 4.7 ist die Fluoreszenz von anle138b in Cyclohexan (blau), POPC-Liposomen (grau), Glycerol (schwarz, strichpunktiert) und  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot, gestrichelt) gezeigt. Die Amplituden der einzelnen Spektren stehen in dieser Grafik in einem absoluten Verhältnis zueinander. Die Fluoreszenz von anle138b ( $1 \mu\text{M}$ ) in einem extrem unpolaren Lösungsmittel wie Cyclohexan ( $\epsilon = 2.02$ ) ist in dieser Vergleichsgrafik am stärksten ausgeprägt und am stärksten blauverschoben. Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei etwa 330 nm (blau). Genauso zeigt anle138b ( $0.5 \mu\text{M}$ ) inkubiert in 1 mM POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) Liposomen eine hohe Fluoreszenz (grau). Liposome bestehen aus einer doppelseitigen Membran aus Lipiden mit einer hydrophilen Kopf- und hydrophoben Schwanzgruppe. Die hydrophile Kopfgruppe ist der wässrigen Umgebung zugewandt, die Schwanzgruppe ist ihr abgewandt. Das Maximum der Emission liegt relativ zu Cyclohexan ins Rote verschoben und zeigt einen schwachen Ausläufer bei etwa 420 nm, der Hinweis auf eine zweite Bande gibt. Ebenso ist die Fluoreszenz von anle138b ( $0.5 \mu\text{M}$ ) in Glycerol (80% Glycerol 20% Wasser) sehr ausgeprägt. Glycerol ist extrem viskos ( $\eta = 60.8 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ) und aus diesem Grund ideal, um eine rigide Umgebung zu schaffen. Gleichzeitig ist Glycerol aber auch stark polar ( $\epsilon = 50.03$ ). Das Maximum der Fluoreszenz in Glycerol ist gegenüber Cyclohexan rotverschoben und liegt bei etwa 345 nm. Die rotverschobene Emission, die sich in den Liposomen schon ansatzweise

abzeichnet, ist in Glycerol deutlich sichtbar. Die Viskosität in Glycerol scheint zu bewirken, dass die Fluoreszenz gegenüber reinem Wasser ansteigt. Da aber Glycerol gleichzeitig etwas unpolarer als Wasser ( $\epsilon = 80.16$ ) ist, können die beiden Einflüsse nur schwer getrennt werden.

Ebenso zeigt die Fluoreszenz von anle138b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen ( $3\mu\text{M}$ ) einen geringen Rotanteil und eine Verschiebung ins Rote relativ zu Cyclohexan (Maximum der Fluoreszenz bei 335 nm). Damit liegt das Fluoreszenzspektrum von anle138b in den Fibrillen durch Position des Maximums und Verlauf zwischen dem in Cyclohexan und dem in Glycerol und damit zwischen stark unpolare und stark viskos.



**Abbildung 4.7.:** Fluoreszenz von anle138b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot gestrichelt), inkubiert in POPC-Liposomen (dunkelgrau), in Glycerol/Puffer (80:20) (schwarz, strichpunktiert) und in Cyclohexan (blau).

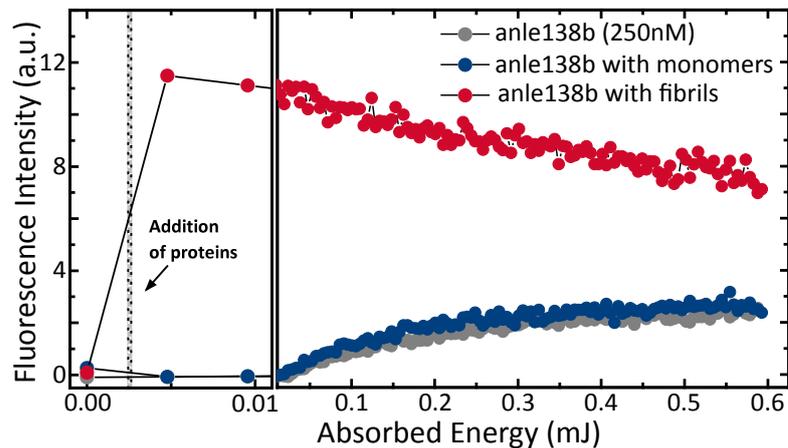
Aus dem Vergleich mit Cyclohexan, das dem Molekül eine vollständig unpolare Umgebung bietet, ist es wahrscheinlich, dass der ausgeprägte blaue Anteil der Fluoreszenz von anle138b-Molekülen stammt, die in hydrophoben Umgebungen in der Fibrille oder dem Lipid sitzen. Der kleine rote Anteil im Spektrum könnte von Molekülen stammen, die hydrophilen oder wässrigen Bereichen zugewandt sind. Die Rigidität ist in Fibrille und Lipid gleichermaßen vorhanden. Ihr Einfluss ist sicherlich nicht vollständig vernachlässigbar. Dennoch ist ersichtlich, dass eine rigide Umgebung nicht alleinige Ursache für die Änderung der Fluoreszenz sein kann.

In den Liposomen ist die Stelle, an der anle138b gebunden sein kann mit der hydrophoben Schwanzgruppe der Lipide genau definiert. Die Rotverschiebung und der geringe rotverschobene Anteil kann von Molekülen stammen, die entweder in einem hydrophilen Bereich- oder gar nicht an das Lipid gebunden sind. Es könnte aber auch sein, dass insgesamt, durch die etwas weiter entfernt liegenden polaren Gruppen/Wassermoleküle an der Bindungsstelle, die mittlere Polarität erhöht ist.

In den Fibrillen ist anle138b offenbar innerhalb einer unpolaren Umgebung gebunden. Eine genaue Lokalisierung ist an dieser Stelle nicht möglich. Ein identisches

Verhalten kann auch für hTau46 Fibrillen gefunden werden (siehe Anhang, Abbildung A.1).

#### Photoreaktion in der Fibrille



**Abbildung 4.8.:** Belichtung von anle138b in Puffer (grau), mit Monomeren (blau) und mit Fibrillen (rot). Die linke Seite des Bildes zeigt den Anstieg der Fluoreszenz von anle138b durch die Zugabe von Fibrillen. Dieser Anstieg ist bei Zugabe von Monomeren nicht zu sehen.

Eine Methode die Bindungsstelle noch genauer zu charakterisieren ist die Belichtung von anle138b innerhalb der Fibrille.

Die Belichtung von anle138b in wasserbasiertem Puffer führt zu einer Substitution des Broms an der *meta*-Position des Phenylrings durch eine OH-Gruppe. Das dadurch entstandene Photoprodukt ist sery313b, das oben schon vorgestellt wurde. Sery313b fluoresziert in Wasser stärker als anle138b. Dies führt zu einem charakteristischen Anstieg der Fluoreszenz mit der Belichtungszeit durch jedes umgesetzte Molekül (siehe Abbildung 4.8, grau). Ein ebensolches Verhalten ist für anle138b unter Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein Monomeren ( $6.8 \mu\text{M}$  Proteinkonzentration) zu finden. Durch einen spektralen Vergleich der Fluoreszenz nach Belichtung von anle138b in reinem Wasser und in Wasser mit  $\alpha$ -Synuclein Monomeren (blau) kann gezeigt werden, dass das Photoprodukt aus der Belichtung mit Monomeren identisch zu sery313b aus der Belichtung in Wasser ist.

Die Belichtung mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen ( $3.2 \mu\text{M}$  Proteinkonzentration) zeigt einen dazu unterschiedlichen Verlauf (rot). Zunächst führt die Zugabe der Fibrillen zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz. Mit Erhöhung der Belichtungszeit nimmt die Fluoreszenz jedoch langsam ab. Die Rate, mit der die Fluoreszenz hierbei zurück geht, ist kleiner als für anle138b in Puffer oder mit Monomeren. Daraus folgend ist die Effizienz für eine Photoreaktion in Fibrillen geringer. Eine detaillierte Beschreibung

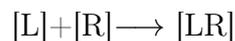
der Photoreaktion ist im nächsten Kapitel über die Fluoreszenzeigenschaften von anle138b zu finden. Hier dient die Analyse der Photoreaktion allein dem Zweck, die Bindung zu charakterisieren.

Aus dem Vergleich der Photoreaktion von anle138b innerhalb der drei unterschiedlichen Umgebungen Puffer, Monomer und Fibrille zeigt sich, dass anle138b innerhalb der Fibrille in einer Umgebung zu finden ist, die nur gering den Wassermolekülen ausgesetzt ist. Dies ist für Monomere nicht der Fall. Innerhalb der Fibrille könnte demzufolge die Umgebung sowohl hydrophob als auch relativ abgeschlossen vom Lösungsmittel sein.

Ein identisches Verhalten zeigt sich bei der Belichtung von anle138b mit hTau46 Fibrillen. Details dazu sind im Anhang in Abbildung A.2 zu finden.

### 4.3. Bindungsstöchiometrie

Mit der Kenntnis über die direkte Bindung von anle138b an die Proteinfibrillen ist auch die Bindungsstöchiometrie des Moleküls von Interesse. Die Bindungsaffinität einer Substanz an ihre Umgebung ist in der Pharmakologie eine wichtige Größe, mit der unter anderem die beste Wirksamkeit abgeschätzt werden kann [18]. In der Literatur wird typischerweise von der Bindung eines Medikaments oder auch eines körpereigenen Enzyms an einen Rezeptor gesprochen. Der Rezeptor steht hier für jedes biologische Makromolekül, das spezifisch von dem zu untersuchenden Liganden besetzt wird. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor kann als eine Reaktion betrachtet werden, bei der das freie Molekül [L] und der freie Rezeptor [R] zu einem Liganden-Rezeptor Komplex assoziieren:



Die Affinität, mit der Ligand und Rezeptor zusammenfinden wird über die Dissoziationskonstante  $K_d$  beschrieben. Sie ist ein Maß dafür, wie stark ein Molekül unter Gleichgewichtsbedingungen (stationärer Zustand) von den Rezeptoren dissoziiert wird. Dabei setzt sich die Konstante  $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  aus der Hin- ( $k_{\text{on}}$ ) und Rückrate ( $k_{\text{off}}$ ) zusammen [11, Kapitel 1].

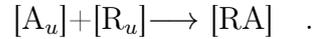
Im Allgemeinen wird die Dissoziationskonstante (im Gleichgewicht auch Bindungskonstante genannt) über die sogenannte isotherme Titrationskalorimetrie bestimmt, ein Verfahren, bei dem die Temperaturänderung durch die Bindung von Ligand an Rezeptor gemessen wird.

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass anle138b selektiv an  $\alpha$ -Synuclein und hTau46 Fibrillen und nicht an die Monomere bindet. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Bindung von anle138b an die Fibrillen strukturabhängig aber nicht proteinabhängig ist. Über die Bestimmung der Dissoziationskonstante und der Anzahl an Bindungsstellen in der Fibrille, können Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Bindung noch genauer bestimmt werden.

#### 4. Bindung und Bindungsstöchiometrie von anle138b

---

Die Bindung von freiem anle138b (Ligand) an die Fibrille (Rezeptor) führt zu einem Ligand-Rezeptor Komplex wie oben beschrieben:



Dabei ist  $[A_u]$  freies anle138b,  $[R_u]$  freier Rezeptor (Fibrillen) und  $[RA]$  der Komplex aus beidem. Die Dissoziationskonstante berechnet sich daraus zu

$$K_d = \frac{[A_u][R_u]}{[RA]} \quad . \quad (4.3)$$

Die Gesamtkonzentrationen an Liganden  $[A_0]$  und Rezeptoren  $[R_0]$  setzen sich aus gebundenen und ungebundenen Komponenten zusammen:

$$[R_0] = [R_u] + [RA] \quad (4.4)$$

$$[A_0] = [A_u] + [RA] \quad (4.5)$$

$$[RA] = [A_b] \quad . \quad (4.6)$$

Dabei ist  $[A_b]$  die Konzentration an gebundenem anle138b. Mit Gleichung 4.4 - 4.6 wird  $K_d$  zu

$$K_d = \frac{A_u(R_0 - A_b)}{A_b} \quad . \quad (4.7)$$

Die Zeichen für die Konzentration  $[ ]$  werden ab hier zugunsten der Übersicht weggelassen.

Die Dissoziationskonstante kann über den Anstieg der Fluoreszenz von anle138b bestimmt werden. Da anle138b in Puffer keine Fluoreszenz zeigt, ist die Anzahl gebundener Moleküle  $A_b$  immer proportional zur Fluoreszenz

$$F = y \cdot A_b \quad .$$

$y$  ist eine Proportionalitätskonstante.

Es existieren zwei Varianten, mit denen ein Anstieg der Fluoreszenz aufgrund der Bindung von anle138b an die Proteinaggregate gemessen werden kann. Die erste Variante misst den Anstieg der Fluoreszenz von anle138b in einer Peptidlösung konstanter Konzentration durch die Zugabe von anle138b. Die zweite Variante misst den Anstieg der Fluoreszenz von anle138b durch die Zugabe von Proteinfibrillen.

##### Variante I

In Abbildung 4.9 und 4.10 (links) ist der Anstieg der Fluoreszenz von anle138b durch die Zugabe zu einer  $6 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein (Abbildung 4.9) oder  $3.6 \mu\text{M}$  hTau46 (Abbildung 4.10) Lösung gezeigt. Die Konzentration an anle138b in der Lösung wird schrittweise erhöht und mit jedem Titrationsschritt die Fluoreszenz im Maximum

bei  $\lambda_{\max} = 345$  nm aufgenommen. Daraus ergibt sich ein Anstieg der Fluoreszenz, der mit steigender Konzentration in Sättigung geht.

Bei diesem Vorgehen ist die Gesamtkonzentration der Rezeptoren  $R_0$  konstant. Da aber mehrere Proteine in der Fibrille benötigt werden können, um eine Bindungsstelle (d.h. einen Rezeptor  $R_0$ ) für anle138b zu bilden, ist  $P = R_0 \cdot B$  die nötige Proteinkonzentration, welche die richtige Anzahl an Bindungsstellen  $B$  zur Verfügung stellt. Damit kann Gleichung 4.7 umgeschrieben werden zu:

$$F = y \cdot A_b = y \cdot P/B \cdot \frac{1/K_d \cdot A_u}{1 + 1/K_d \cdot A_u} \quad . \quad (4.8)$$

Für  $A_u \rightarrow \infty$  wird aus Gleichung 4.8

$$F_{\max} = y \cdot A_b = y \cdot P/B \quad . \quad (4.9)$$

Das entspricht gleichzeitig der Situation, dass alle Bindungsstellen in der Fibrille besetzt sind und die maximale Fluoreszenz erreicht ist. Hier gilt  $F_{\max} \propto A_b$ . Dies wird über eine Horizontale im Maximum der Fluoreszenz in Abbildung 4.9 und 4.10 (links) gekennzeichnet. Über den Schnittpunkt der Horizontalen, mit der linearen Anpassung

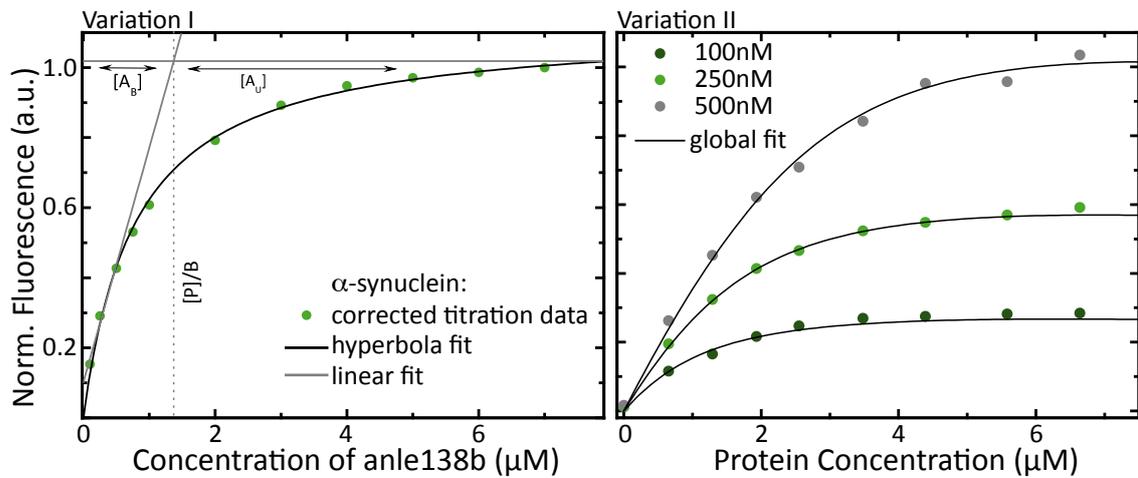
$$F = y \cdot A_b \approx y \cdot A_0 \quad ,$$

wie in Abbildung 4.9 und 4.10 (links) gezeigt, kann damit zunächst  $A_b$  bestimmt werden. Über Gleichung 4.9 ergibt sich die Anzahl der Proteine in der Fibrille, die eine Bindungsstelle für anle138b bilden.

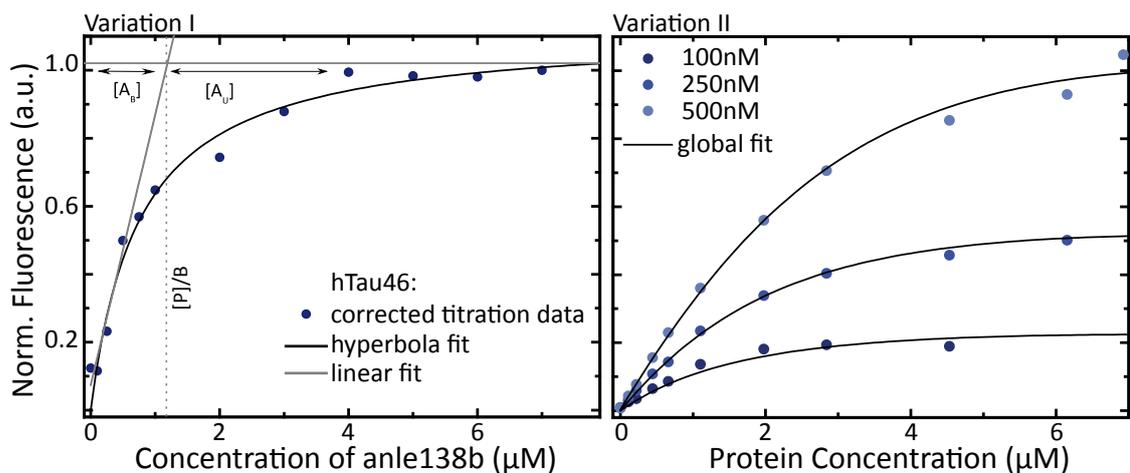
In der Praxis ist zu beachten, dass anle138b nur bis zu einer bestimmten Konzentration ( $1 \mu\text{M}$ ) löslich ist. Die verwendeten Konzentrationen sind jedoch deutlich höher. Das heißt, die eingewogenen anle138b-Moleküle in der Lösung  $A_0$  liegen ab einer Konzentration von ( $1 \mu\text{M}$ ) in drei Zuständen vor

$$A_0 = A_b + A_{sc} + A_s \quad .$$

$A_s$  ist anle138b ungelöst im Feststoff und steht für die Bindung nicht zur Verfügung, während  $A_{sc} = A_u$  die kritische lösliche Menge darstellt, die ungebunden ist. Im linearen Bereich von Abbildung 4.9 und 4.10 (links) ist anle138b jedoch gelöst, weshalb hier  $A_b$  durch eine lineare Anpassung von  $F \propto A_b \propto A_0$  bestimmt werden kann. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von anle138b ist die Menge an  $A_u$  unbekannt.  $K_d$  kann deshalb aus dieser Messung nicht bestimmt werden. Da die Steigung bei geringer anle138b Konzentration sehr steil ist, kann jedoch  $B$  relativ genau bestimmt werden. Der Fehler wird dabei während der Berechnung berücksichtigt.



**Abbildung 4.9.:** Variante I: anle138b wird zu  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen dazutitriert. Aus Variante I kann die Anzahl B der Monomere in der Fibrille, die eine Bindungsstelle für anle138b bilden, bestimmt werden. Variante II:  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen werden zu anle138b dazutitriert. Aus Variante II kann mit B aus Variante I die Dissoziationskonstante  $K_d$  bestimmt werden.



**Abbildung 4.10.:** Variante I: anle138b wird zu hTau46 Fibrillen dazutitriert. Aus Variante I kann die Anzahl B der Monomere in der Fibrille, die eine Bindungsstelle für anle138b bilden, bestimmt werden. Variante II: hTau46 Fibrillen werden zu anle138b dazutitriert. Aus Variante II kann mit B aus Variante I die Dissoziationskonstante  $K_d$  bestimmt werden.

In Variante I wird aus einem Fit der Gleichung 4.8 an die Titrationskurve in Abbildung 4.9 und 4.10 (links) das Maximum der Fluoreszenz  $F_{\max}$  bestimmt und als Horizontale an die Daten angelegt. Dabei wird ein Fehler für  $F_{\max}$  von 20% angenommen. Aus dem Schnittpunkt der Horizontalen mit der linearen Anpassung wird die zugehörige Konzentration für  $A_b$  bestimmt. Der Fehler aus dem linearen Fit

wird ebenfalls berücksichtigt. Aus Gleichung 4.9 kann damit die Anzahl der Monomere B, die eine Bindungsstelle für anle138b bilden bestimmt werden. Sowohl für  $\alpha$ -Synuclein als auch für hTau46 liegt diese bei ca. 6 Monomeren für eine Bindungsstelle (Details siehe Tabelle 4.2).

### Variante II

Eine zweite Möglichkeit ist, die Proteinkonzentration in der Lösung zu variieren und dabei die Konzentration an anle138b konstant zu halten. Durch die Zugabe von neuen Fibrillen steigt die Fluoreszenz von anle138b an, bis alle Moleküle gebunden sind und eine maximale Fluoreszenz erreicht wird.

Hier werden die Titrationskurven für drei verschiedene Konzentrationen von anle138b aufgenommen, wie in Abbildung 4.9 und 4.10 (rechts, gekennzeichnet durch Variante II) gezeigt ist. Die drei Konzentrationen sind  $0.1 \mu\text{M}$ ,  $0.25 \mu\text{M}$  und  $0.5 \mu\text{M}$ . In den Lösungen wird durch die Zugabe von Fibrillen die Proteinkonzentration schrittweise erhöht. Die Fluoreszenz wird nach jedem Titrationsschritt bei  $\lambda_{\text{max}} = 345 \text{ nm}$  aufgenommen. Daraus ergeben sich drei verschiedene Anstiegskurven der Fluoreszenz, die ab bestimmten Proteinkonzentrationen absättigen.

Die Konzentration der Proteine P ist somit variabel und die anle138b Konzentration ist fix. In Gleichung 4.7 wird mithilfe von Gleichung 4.5 und 4.6  $A_u$  durch  $A_0$  und  $A_b$  ersetzt

$$K_d = \frac{(A_0 - A_b)(P/B - A_b)}{A_b} .$$

Unter Berücksichtigung von  $F = y \cdot A_b$  wird die Fluoreszenz  $F$  von anle138b anstelle von  $A_b$  als unabhängige Variable eingeführt:

$$K_d = \frac{((1 - P/P_s)a_s - F/y)(P/B - F/y)}{F/y} . \quad (4.10)$$

Zusätzlich wird berücksichtigt, dass die Konzentration  $A_0$  von anle138b durch die Zugabe der Proteine zurückgeht. Dies wird durch den Faktor  $A_0 = (1 - P/P_s)a_s$  ausgeglichen, bei dem die eingewogene Menge  $a_s$  an anle138b um die Menge P an zugegebenem Protein normiert auf die Stammkonzentration  $P_s$  des Proteins korrigiert wird.

Die Anzahl an Bindungsstellen im Aggregat B wird aus der Messung von Variante I übernommen. Aus einem globalen Fit der Gleichung 4.10 an die Daten in Abbildung 4.9 und 4.10 (rechts) kann dann die Dissoziationskonstante bestimmt werden.

Für Variante II werden die Titrationskurven in Abbildung 4.9 und 4.10 (rechts) gezeigt und mit Gleichung 4.10 und bekanntem B global gefittet. Daraus ergeben sich für beide Proteine  $K_d$ -Werte im nanomolaren Bereich. Die Dissoziationskonstante für die hTau46 Fibrillen ist mit  $303 \pm 86 \text{ nM}$  etwas größer als für  $\alpha$ -Synuclein mit  $160 \pm 38 \text{ nM}$  (siehe Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2.:**  $K_d$  und B-Werte für anle138b mit  $\alpha$ -Synuclein und hTau46 ermittelt aus den Varianten I und II. Die Fehler ergeben sich aus der Varianz der Fits.

	$\alpha$ -Synuclein		hTau46	
	$K_d$	B	$K_d$	B
anle138b	$160 \pm 38$ nM	$6 \pm 2$	$303 \pm 86$ nM	$5 \pm 2$
ThT	$1.25 \pm 0.4$ $\mu$ M	$1.1 \pm 0.4$	-	-

Die Werte für  $\alpha$ -Synuclein decken sich gut mit denen aus einem globalen Fit, bei dem B als Variable offen gelassen wurde [101, 30]. Hier liegt  $K_d$  bei  $190 \pm 120$  nM. Der Fehler aus dem globalen Fit ist bei dieser Berechnung allerdings größer.

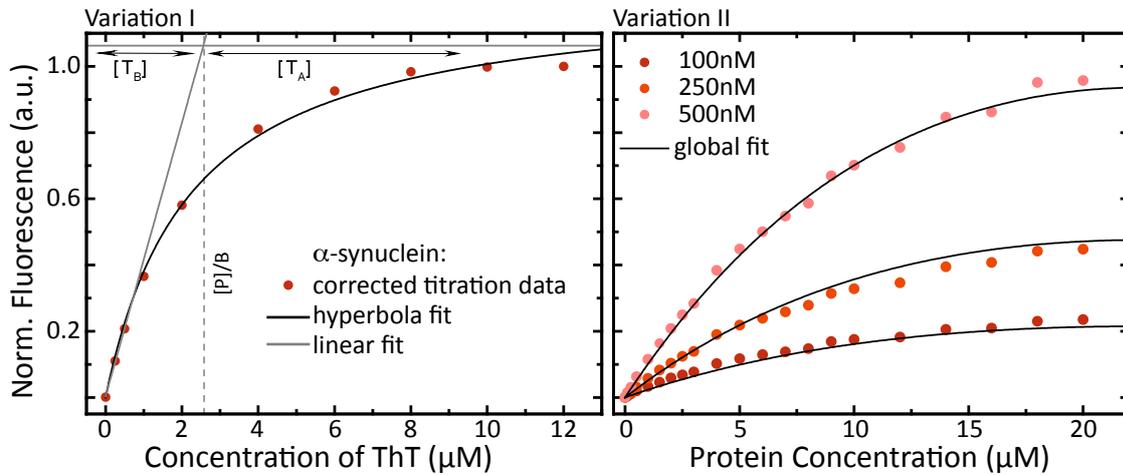
#### 4.3.1. Bindungsstöchiometrie von Thioflavin T

Die Dissoziationskonstante für die Bindung von Thioflavin T (ThT) an die  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen wurde ebenfalls auf diese zwei Arten bestimmt (siehe Abbildung 4.11). Schon am Verlauf der Titrationskurven ist ersichtlich, dass die Bindungsaffinität von ThT für die Fibrillen geringer ist als für anle138b, da der Anstieg der Fluoreszenz deutlich flacher ist.

Zunächst werden B und  $K_d$  aus Variante I bestimmt. Im Unterschied zu anle138b, ist ThT in Pufferumgebung besser löslich. Es gibt zwar Studien, die Mizellenbildung von ThT bei Konzentrationen zwischen 10-20  $\mu$ M zeigen [105, 66]. Diese werden aber zum einen kontrovers diskutiert, zum anderen wird die kritische Konzentration zur Aggregatbildung von ThT hier erst in den letzten Titrationsschritten erreicht. Aus diesem Grund kann  $K_d$  aus Variante I direkt berechnet werden.

Zu etwa 2.1  $\mu$ M  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen wird bis zu 12  $\mu$ M ThT dazugegeben. Mit jedem Titrationsschritt wird die Fluoreszenz im Maximum bei  $\lambda_{\max} = 478$  nm (Anregung bei 412 nm) aufgenommen. Die Bestimmung von B erfolgt wie in Variante I oben beschrieben. Zur Bestimmung von  $K_d$  wird über den linearen Fit an die Daten zunächst für jeden Punkt in Abbildung 4.11 (links) das Verhältnis von gebundenen  $T_b$  zu ungebundenen  $T_u$  ThT Molekülen gebildet. Daraus kann mit Formel 4.8  $K_d$  bestimmt werden. Aus der Messung ergibt sich eine Dissoziationskonstante  $K_d$  für ThT von  $1.25 \pm 0.4$   $\mu$ M. Etwa jedes Monomer in der Fibrille bildet eine Bindungsstelle für ThT ( $B \approx 1$ ).

Variante I ist die Standardmethode zur Bestimmung von  $K_d$  und B für ThT und Aggregatstrukturen. Für ThT und  $A\beta_{42}$  existieren Werte für  $K_d$  zwischen 1 und 2  $\mu$ M [81, 69, 93]. Aus theoretischen Berechnungen mit einer  $A\beta_{42}$ -Sequenz ergab sich für B ein Wert von 4.5 und  $K_d$  lag bei etwa 6  $\mu$ M [133]. Fluoreszenzspektroskopische Messungen mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen ergaben sogar Werte für  $K_d$  zwischen 1-15  $\mu$ M [22]. Die in dieser Auswertung bestimmten Werte stimmen dementsprechend gut mit der



**Abbildung 4.11.:** Variante I: ThT wird zu  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen dazutitriert. Aus Variante I kann die Anzahl B der Monomere in der Fibrille, die eine Bindungsstelle für ThT bilden, sowie  $K_d$  bestimmt werden. Variante II:  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen werden zu ThT dazutitriert. Aus Variante II kann mit B aus Variante I die Dissoziationskonstante  $K_d$  bestimmt werden.

Literatur überein.

Zur Bestimmung von  $K_d$  und B aus Variante II werden drei Ansätze für ThT verwendet, mit  $0.1 \mu\text{M}$ ,  $0.25 \mu\text{M}$  und  $0.5 \mu\text{M}$ . Zu den drei Lösungen werden nach und nach  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen dazugegeben. Mit jedem Titrationsschritt wird die Fluoreszenz bei  $478 \text{ nm}$  (Anregung bei  $412 \text{ nm}$ ) aufgenommen. Die drei Titrationskurven werden mit Gleichung 4.10 und aus Variante I bekanntem  $B \approx 1$  global angepasst. Daraus ergibt sich ein  $K_d$ -Wert von  $40 \mu\text{M}$ .

Variante II ist für die Bestimmung der Bindungsstöchiometrie von ThT nicht geeignet. Es muss sehr viel Protein hinzutitriert werden, damit sogar bei den sehr kleinen Konzentrationen von ThT eine Sättigung der Fluoreszenz erreicht werden kann. Dadurch kommt es zu einer Verdünnung der Lösung, um welche die Fluoreszenz korrigiert werden muss. Daraus ergeben sich fehlerhafte Werte für die Fluoreszenz in der Absättigung  $F_{\text{max}}$ . Dies führt wiederum dazu, dass der globale Fit für die drei Konzentrationen von  $0.1 \mu\text{M}$  und  $0.25 \mu\text{M}$  nicht korrekt ist. Ein globaler Fit mit offenem B führt zum gleichen Ergebnis für  $K_d$  und B, allerdings liegt hier der Fehler bei über 100%.

Ein ähnliches Vorgehen wie in Variante II gibt es in der Literatur bisher nicht. Es existiert folglich keine Vergleichsmöglichkeit, die den sehr hohen Wert für  $K_d$  von  $40 \mu\text{M}$  bestätigt. In Celej et al. [22] wurde gezeigt, dass je nach Präparation die Werte für  $K_d$  zwischen  $1 \mu\text{M}$  und  $15 \mu\text{M}$  variieren können. Aufgrund der Schwierigkeit die Daten mit Gleichung 4.10 korrekt anzupassen und der Tatsache, dass der hier berechnete  $K_d$ -Wert aus Variante II weit außerhalb des in der Literatur angegebenen Bereichs liegt, kann er jedoch nicht als sinnvoll erachtet werden.

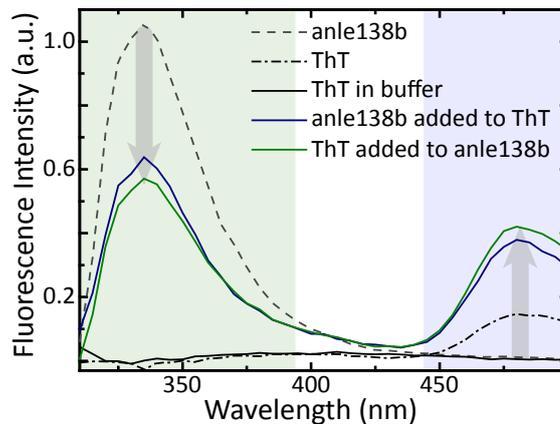
Die Bindungsaffinität von anle138b für  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen ist damit deutlich stärker als die von ThT. Dieser Sachverhalt wird bei der direkten Kompetitionsmessung zwischen anle138b und ThT im nächsten Abschnitt genauer aufgegriffen.

### 4.4. Vergleich mit ThT

Sowohl  $\alpha$ -Synuclein- als auch hTau46 Fibrillen sind große Komplexe, die sich aus sehr vielen Monomeren zusammensetzen. Eine genaue Charakterisierung der Struktur ist aus diesem Grund fast unmöglich. Es gibt in der Literatur aber sehr viele Studien über die Interaktion von ThT mit den Fibrillen (siehe Abschnitt 3.2.2). Aus einem Vergleich mit ThT könnte deshalb eine genauere Lokalisierung der Bindungsstelle von anle138b in der Fibrille möglich sein. Daraus folgend stellt sich die Frage, was geschieht, wenn ThT und anle138b um die Bindung an die Fibrillen konkurrieren. Binden sie beide gleichermaßen oder wird das eine Molekül durch das andere verdrängt und kann dies über die Fluoreszenz herausgefunden werden?

Die Fluoreszenz von ThT ist stark von der Anregungswellenlänge abhängig. Da ThT ein breites Absorptionsspektrum von  $< 300$  nm bis  $> 450$  nm besitzt, ist die Anregung über einen weiten Spektralbereich möglich. Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, wird im Allgemeinen das Absorptionsmaximum von 412 nm als Anregungswellenlänge für Untersuchungen mit Proteinaggregaten verwendet. Entsprechend liegt das Fluoreszenzmaximum bei 478 nm. Anregung bei Wellenlängen  $< 350$  nm führen zu kleineren Fluoreszenzquantenausbeuten von ThT mit den Aggregaten als bei Anregung mit 412 nm. Anle138b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen hat zwischen 310-400 nm eine sehr ausgeprägte Fluoreszenz. Diese überlappt vollständig mit der Absorption von ThT.

Zur Untersuchung der Kompetition von ThT und anle138b um die Bindung an  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen, wird sowohl anle138b zu ThT als auch ThT zu anle138b dazutitriert. In Abbildung 4.12 ist das Ergebnis dieser Messung gezeigt. Zu etwa  $4 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein werden  $0.5 \mu\text{M}$  anle138b dazugegeben. Bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm zeigt anle138b durch die Bindung an die Aggregate seine typische Fluoreszenz mit Maximum bei etwa 340 nm (grau gestrichelt). In einer anderen Lösung werden etwa  $4 \mu\text{M}$  ThT zu ebenfalls  $4 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein dazugegeben. Die Anregung bei 300 nm führt zu einer niedrigen Bande bei etwa 478 nm (schwarz, strichpunktiert). In reinem Puffer ist bei Anregung (300 nm) von  $4 \mu\text{M}$  ThT hier keine Bande zu sehen (schwarz). In der Literatur konnte gezeigt werden, dass es bei einer Bindung von ThT an  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen und Anregung bei 275 nm zu einem FRET von Tyrosin auf ThT mit einer Emission bei 478 nm kommen kann. Diese ist jedoch sehr gering, da Tyrosin für Wellenlängen  $> 350$  nm nur schwach fluoresziert [91]. Auch bei einer Anregung mit 300 nm zeigt Tyrosin Fluoreszenz. Das Maximum bei 478 nm in Abbildung 4.12 stammt demzufolge von einer FRET-Anregung durch Tyrosin.



**Abbildung 4.12.:** Fluoreszenz von ThT und anle138b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen nach Anregung bei 300 nm. Fluoreszenz von anle138b mit Fibrillen (grau gestrichelt), ThT mit Fibrille (schwarz, strichpunktiert), ThT in Puffer (schwarz), ThT mit anle138b (blau) und anle138b mit ThT (grün). Die grauen Pfeile zeigen den Rückgang der Fluoreszenz von anle138b bei 340 nm und den gleichzeitigen Anstieg der Fluoreszenz von ThT bei 478 nm.

Zu den beiden Lösungen wird das jeweils andere Molekül dazugegeben. Zu  $0.5 \mu\text{M}$  anle138b etwa  $4 \mu\text{M}$  ThT (grün) und zu  $4 \mu\text{M}$  ThT  $0.5 \mu\text{M}$  anle138b (blau). Die Fluoreszenz von anle138b nach Anregung bei 300 nm ist in beiden Fällen gegenüber der Fluoreszenz ohne ThT (schwarz gestrichelt) reduziert. Gleichzeitig steigt die Fluoreszenz von ThT bei 478 nm an.

Bei der Zugabe von ThT zu anle138b (grün) könnte auf den ersten Blick dieses Verhalten der Fluoreszenz aufgrund einer Verdrängung von anle138b durch ThT auftreten. ThT bindet nahezu an jedes Monomer in der Fibrille, weshalb es sehr wahrscheinlich ist, dass es auch eine Bindungsstelle von anle138b einnimmt. Dann wäre mehr ThT gebunden, die Fluoreszenz bei 478 nm steigt an. Gleichzeitig fällt die Fluoreszenz von anle138b bei 340 nm ab, da durch die Verdrängung weniger anle138b gebunden ist. Im umgekehrten Fall, bei der Zugabe von anle138b zu ThT, sollte sich aber an der Fluoreszenz von ThT nichts ändern. Einzig sollte, falls ThT zu einem geringen Anteil von anle138b aus der Bindungsstelle verdrängt wird, die Fluoreszenz fallen. Sie steigt jedoch auch in diesem Fall an.

Bei genauerer Betrachtung scheint deshalb ein anderes Szenario viel wahrscheinlicher. Die Fluoreszenz von ThT in der Fibrille ohne anle138b bei einer Anregung von 300 nm geschieht durch einen FRET von Tyrosin auf das Molekül [91]. Bei  $4 \mu\text{M}$  ThT ist die zu erwartende Fluoreszenz durch die schwarze strichpunktierter Kurve gegeben. Unter der Annahme, dass alle fluoreszierenden Moleküle auch gebunden sind, es also keine weiteren Moleküle gibt, die noch eine Bindungsstelle finden können, ist dies die maximale Fluoreszenz, die bei  $4 \mu\text{M}$  ThT erreicht werden kann. Durch die Zugabe von anle138b sollte sich an dieser Situation nichts ändern. Es können nicht mehr Moleküle binden als im Fall ohne anle138b. Einzig anle138b könnte

ThT verdrängen. Dann würde aber die Fluoreszenz von anle138b ansteigen und die von ThT sinken. Die Fluoreszenz von anle138b sinkt aber und die von ThT steigt. Bleibende mögliche Erklärung, die daraus resultiert, ist ein FRET von anle138b auf ThT. Dafür spricht der Überlapp in Fluoreszenz und Absorption der beiden Moleküle, die hohe Quantenausbeute von anle138b in der Fibrille und die Möglichkeit, dass sich ThT und anle138b durch die Bindung in der Fibrille annähern können.

Zu einem kleinen Teil wird ThT durch anle138b auch aus seiner Bindungsstelle verdrängt, zu sehen an der Abnahme der Fluoreszenz von ThT bei 478 nm nach einer Anregung mit 412 nm (siehe Anhang). Das ist auch sehr wahrscheinlich, da anle138b eine niedrigere Dissoziationskonstante als ThT besitzt.

Unter der Annahme, dass es sich tatsächlich um einen FRET der Anregung von anle138b auf ThT handelt, kann aus der Abnahme der anle138b Fluoreszenz bei Zugabe von ThT der Abstand zwischen den beiden Molekülen in der Fibrille abgeschätzt werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass anle138b nicht durch ThT verdrängt wird. In Abschnitt 3.1.3 wird das Vorgehen zur Bestimmung der FRET-Effizienz beschrieben. Aus der Effizienz kann der Abstand der Moleküle zueinander bestimmt werden. Dieser ergibt sich zu

$$r^6 = R_0^6 \cdot \left( \frac{F_D}{F_D - F_{DA}} - 1 \right) \quad . \quad (4.11)$$

Dabei ist  $r$  der Abstand zwischen den beiden Molekülen,  $R_0$  der Försterradius (siehe Abschnitt 3.1),  $F_D$  ist die Fluoreszenz des Donors (anle138b) ohne den Akzeptor (ThT) und  $F_{DA}$  ist die Fluoreszenz des Donors mit Akzeptor.  $R_0$  wird aus Gleichung 3.7 in Abschnitt 3.1.3 bestimmt. Für verschiedene Orientierungsfaktoren  $\kappa$  der beiden Moleküle zueinander ergeben sich die Werte in Tabelle 4.3.

**Tabelle 4.3.:** Förster-Radien und Abstände zwischen ThT und anle138b für verschiedene Orientierungsfaktoren  $\kappa^2$ . ThT fix bedeutet anle138b wurde zu ThT dazugegeben. Anle138b fix bedeutet, ThT wurde zu anle138b dazugegeben.

$\kappa^2$	$R_0$ (Å)	ThT fix r (Å)	anle138b fix r(Å)
0.67	58	64	62
1	62	68	66
4	79	87	84

Für eine statistische Verteilung der Orientierung von Donor und Akzeptor zueinander ergibt sich ein  $\kappa^2$  von 0.67 und der Abstand der Moleküle liegt bei etwa 60 Å. Liegen die Moleküle parallel nebeneinander ist  $\kappa^2$  eins und die Radien liegen bei 66-68 Å. Liegen die Moleküle parallel hintereinander ist  $\kappa^2$  vier und der FRET ist am effizientesten. Hier ist der FRET-Abstand über 80 Å.

Alle drei Radien liegen nahe am Försterradius mit maximal  $1.1R_0$ . Damit ist der FRET-Übertag von anle138b auf ThT relativ effizient und die Abstandsmessung kann als sinnvoll erachtet werden. Trotz der Bindung der Moleküle an eine strukturierte Umgebung wie die Fibrille, ist eine statistische Orientierung am wahrscheinlichsten. Eine Bindung exakt parallel oder hintereinander ist, wenn die Moleküle nicht kovalent auf der Fibrille verlinkt sind, sehr unwahrscheinlich. Der Abstand zwischen den beiden Molekülen liegt damit bei etwa 60 Å.

## 4.5. Die Bindung von anle138b in der Fibrille

Die grundlegenden spektroskopischen Untersuchungen von anle138b und den beiden DPP-Derivaten anle186b (F) und sery313b (OH) zeigen eine starke Umgebungsabhängigkeit der Fluoreszenz. Während in Ethanol ein ausgeprägtes Maximum zu finden ist, das symmetrisch zur Absorption liegt, ist die Fluoreszenz in Wasser davon grundlegend verschieden. Hier zeigt sich eine nur schwache (anle186b und sery313b) oder überhaupt keine Fluoreszenz (anle138b). Ein Umgebungswechsel ist folglich direkt durch die Änderung der Fluoreszenz zu beobachten.

Diese Eigenschaft der Derivate ist bei der Untersuchung mit Peptiden und Peptidfibrillen äußerst hilfreich. Messungen mit  $\alpha$ -Synuclein oder hTau46 Monomeren haben keine Änderung der Fluoreszenz gegenüber der in wasserbasiertem Puffer gezeigt. Die direkte Umgebung der Derivate wird folglich nicht geändert. Die Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein oder hTau46 Fibrillen löst einen Anstieg der Fluoreszenz aus. Gleichzeitig ändert sie sich auch spektral: Das Fluoreszenzspektrum der Derivate mit Peptidfibrillen ist ähnlich dem in Ethanol, mit einem ausgeprägten Maximum im blauen Spektralbereich. Folglich findet unter Zugabe von Fibrillen eine Änderung der direkten Umgebung der Derivate statt. Die Beweglichkeit der Derivate ist gegenüber der wässrigen Umgebung stark reduziert. Es kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer nicht kovalenten Bindung der Moleküle an die Fibrille kommt. Die Fibrille bietet viel Platz auf ihrer Oberfläche oder auch zwischen den einzelnen Protofilamenten, die so eine andere Umgebung schaffen kann.

Diese Annahme wird unterstrichen von den Ergebnissen der Anisotropiemessungen. Die Anisotropie der kleinen Moleküle steigt unter Zugabe der Fibrillen stark an. Dies ist ein direkter Nachweis für die Bindung der Derivate an die Fibrille.

Die Bindung an die Fibrillen ist zunächst unabhängig von deren Primärstruktur, da die Fluoreszenzänderung gleichermaßen für  $\alpha$ -Synuclein und hTau46 zu finden ist. Die Sekundärstruktur der beiden Proteine ist insofern ähnlich als dass sie  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweist, die jeweils in einer repetitiven Domäne liegen. Bei der Bildung von Protofilamenten und Fibrillen lagern sich diese  $\beta$ -Faltblätter bevorzugt aneinander und bilden eine amyloide Struktur. Diese Gemeinsamkeiten in der Sekundärstruktur kann Hintergrund für das fluoreszenzspektroskopische Verhalten der Moleküle sein. Für eine vollkommen andere Struktur wie beispielsweise die

von Aktinfilamenten, die kein Amyloid bilden, konnte eine direkte Wechselwirkung fluoreszenzspektroskopisch nicht nachgewiesen werden. *In vitro* Experimente haben auch keine Störung der Aktinpolymerisation gezeigt [128, SI]. Eine direkte Bindung des Moleküls mit der nicht-amyloiden Struktur der Aktinfilamente ist folglich sehr unwahrscheinlich.

Zusammengefasst kommt es offenbar zu einer sichtbaren Wechselwirkung der Derivate mit amyloiden Strukturen, während andere Strukturen und die monomerische Form der Peptide nicht Ziel der Bindung sind.

Aus der fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung der Bindungskonstanten geht eine hohe Affinität des Moleküls anle138b für die Proteinaggregate hervor. Für die Bindung an die Fibrillen des Proteins hTau46 konnte eine Dissoziationskonstante von 303 nM gefunden werden. Für  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen liegt diese sogar nur bei 160 nM. Gleichzeitig braucht es in beiden Fällen etwa 5-6 Monomere, die eine Bindungsstelle für anle138b zusammensetzen.

Dass anle138b mit den Fibrillen wechselwirkt, ist damit hinreichend bewiesen. Die Frage nach der Struktur der Bindungsstelle ist nicht ohne weiteres zu beantworten. Aus den ersten Beobachtungen der Fluoreszenz geht hervor, dass die Fluoreszenz von anle138b in Fibrillen spektral zwischen der in Glycerol, Lipiden und Cyclohexan liegt. Die Rigidität der Bindungsstelle ist ein nicht zu vernachlässigender Faktor, der zu einem Fluoreszenzanstieg führen kann. Sie ist aber nicht der einzige Einfluss. Vielmehr scheint auch die Polarität eine große Rolle zu spielen. Demnach müsste der ausgeprägte Blauanteil aus rigiden und unpolaren Regionen der Fibrille stammen. Der Rotanteil von rigiden und polaren Regionen z.B. an der Oberfläche der Fibrillen oder von ungebundenen Molekülen. Aus den Belichtungsexperimenten geht hervor, dass ein Großteil der Bindungsstellen in der Fibrille der wässrigen Umgebung abgewandt sein muss. Grund für diese Annahme ist die wesentlich kleinere Reaktivität des Moleküls bei Belichtung in den  $\alpha$ -Synuclein oder hTau46 Fibrillen als bei Belichtung in Wasser.

Wie genau es zu diesem beobachteten Fluoreszenzverhalten kommt, wird im nächsten Kapitel diskutiert. Fazit aus der bisherigen Diskussion ist: Anle138b bindet bevorzugt in hydrophoben Regionen der Fibrille. Diese Bindung ist für die Fluoreszenzänderung verantwortlich. Die Bindungsstellen der DPP-Derivate sind der wässrigen Umgebung abgewandt.

Eine engere Eingrenzung der Bindungsstelle von anle138b soll der direkte kompetitive Vergleich mit Thioflavin T liefern. Die Bindungsstelle von ThT ist in der Literatur sehr genau untersucht worden (näheres dazu siehe Abschnitt 3.2.2).

Der Vergleich wurde an  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen durchgeführt. ThT besitzt für die Fibrillen eine deutlich geringere Affinität als anle138b. Der gemessene  $K_d$ -Wert liegt bei 1.25  $\mu$ M. In der Literatur wurden Werte zwischen 1-15  $\mu$ M beschrieben [22]. Dabei bietet jedes Monomer in der Fibrille Platz für eine Bindungsstelle (in der Literatur werden bis zu 4-5 Monomere genannt [133, 7]). ThT bindet längs der Fibrillenachse senkrecht zur Wachstumsrichtung [7]. Für die Bindungsstelle

gibt es mehrere Vorschläge. ThT könnte z.B. in den Poren binden, die in der Mitte der Fibrillen gebildet werden. Diese bestehen großteils aus hydrophoben Regionen [78]. In den Poren hätten auch mehrere ThT Moleküle Platz. Simulationen schlagen aber auch andere Bindungsstellen vor, beispielsweise an der Oberfläche der Fibrillen. Anhand eines Modellpeptids wurden hier hydrophobe Kanäle gefunden, die von Aromaten gebildet und von Leucin stabilisiert werden [7]. Die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von ThT wurden auf die Bindung in diesen hydrophoben Kanälen zurückgeführt [92].

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine charakteristische Änderung der Fluoreszenz, die auf eine direkte Wechselwirkung von anle138b und ThT miteinander zurückgeführt werden kann. Dabei wurde das Modell eines FRET der Anregung von anle138b auf ThT favorisiert. Handelt es sich tatsächlich um einen FRET, dann liegen die Abstände der Moleküle zueinander bei 60 Å.

Die Pore in der Mitte der  $\alpha$ -Synuclein Fibrille hat einen Durchmesser von 20 Å [78]. Für eine Anordnung der beiden Moleküle innerhalb der Pore nebeneinander ist der FRET-Abstand zu groß. Die Fluoreszenz von anle138b wäre in diesem Fall vollständig gequenched. Auch der Abstand nebeneinander auf zwei unterschiedlichen Protofilamenten der Fibrille ist mit 11 Å zu klein [108]. Hier wäre ausschließlich eine diagonale Anordnung sinnvoll, d.h. die Moleküle befinden sich nicht auf einer Höhe. Da die Fibrille mehrere  $\mu\text{m}$  lang ist wäre eine solche Position denkbar [49]. In diesem Fall ist aber die Verdrängung von ThT durch anle138b nicht vorstellbar. Die Moleküle können aber auch hintereinander auf der Fibrille sitzen. Liegen die ThT-Moleküle längs der Fibrillenachse in den hydrophoben Kanälen, dann wird die Bindungsstelle maximal durch vier bis fünf Monomere gebildet. Für die Bindung von anle138b werden bis zu sechs Monomere benötigt. Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, liegen die Monomere in einem Abstand von etwa 5 Å zueinander [123]. Das ergibt bis zu 55 Å zwischen den beiden Molekülen. Aus dieser Abschätzung bleibt unbekannt, wieviele Monomere unbesetzt zwischen den beiden Molekülen liegen können. Trotzdem stimmt der Wert sehr gut mit dem errechneten Abstand von 60 Å aus dem FRET überein.

Aus den Fluoreszenzeigenschaften von anle138b ging hervor, dass sich das Molekül bevorzugt in hydrophoben Umgebungen anlagert, die von der wässrigen Umgebung abgegrenzt sind. Einen bevorzugten Platz bietet hier die Pore mit den hydrophoben Regionen. Diese wurde aber durch die FRET-Messung ausgeschlossen. Andere mögliche Bereiche sind, basierend auf den Simulationen der ThT Bindungsstelle, die hydrophoben Kanäle auf der Fibrilloberfläche. Diese werden auch aus der Bestimmung des FRET-Abstands favorisiert. Zusammengenommen ist es somit möglich, dass anle138b ebenfalls in den Kanälen bindet und es so zu einem FRET zwischen den beiden Molekülen und zur Verdrängung von ThT kommen kann.



# KAPITEL 5

---

## Eigenschaften und Modell zur Fluoreszenz der DPP-Derivate

---

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, dass die Fluoreszenzeigenschaften von anle138b und Derivaten dazu genutzt werden können, ihre direkte Wechselwirkung mit Prote-inaggregaten nachzuweisen. In diesem Kapitel soll die Fluoreszenzänderung, die zu dieser Beobachtung führt, genauer untersucht werden. Dazu werden Lösungsmittel verschiedener Polarität und Viskosität herangezogen, welche die Umgebung der Derivate in der Fibrille simulieren sollen. Zusätzliche Informationen werden aus zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen gewonnen. Aus den Messungen kann ein Modell abgeleitet werden, das die Fluoreszenz von anle138b in Lösungsmitteln verschiedener Polarität und in Fibrillen beschreibt.

Aus diesem Modell kann eine mögliche Bindungsstelle für anle138b in einer kürzlich veröffentlichten Struktur der  $\alpha$ -Synuclein Fibrille von Tuttle et al. [121] abgeleitet werden. Dieser Vorschlag der Bindungsstelle bezieht auch die Ergebnisse aus dem letzten Kapitel mit ein.

### 5.1. Lösungsmittelpolarität und Umgebung in der Fibrille

Lösungsmittel haben spezielle Eigenschaften, die Einfluss auf die Fluoreszenz haben können. Eine Auswahl verschiedener Lösungsmittel und Mischungen können demzufolge unterschiedliche Bedingungen schaffen, wie z.B. hohe Viskosität und Polarität oder die Mischung aus beidem.

In Tabelle 5.1 sind die in diesem Abschnitt verwendeten Lösungsmittel aufgelistet. Die wichtigste Eigenschaft zur Charakterisierung der Lösungsmittel ist hierbei die Polarität. Zweit wichtigster Faktor ist die Viskosität. Zusätzlich müssen auch Eigenschaften wie die Protonierung oder Deprotonierung der Moleküle durch das Lösungsmittel berücksichtigt werden, sowie ihre Fähigkeit Wasserstoffbrücken zu bilden.

So ist Wasser beispielsweise stark polar und kann Wasserstoffbrücken ausbilden. Bei Glycerol fällt sofort die hohe Viskosität auf, das Lösungsmittel ist aber auch relativ polar und ebenfalls protisch. DMSO hat eine mittlere Polarität, ist aber aprotisch und wirkt damit Protonen ziehend. Mischungen der Lösungsmittel können die eine oder andere Eigenschaft noch verstärken. Ethanol ist vergleichsweise unpolar in der Liste der Lösungsmittel, hat aber die Eigenschaft Wasserstoffbrücken zu bilden. Die beiden Säuren Essigsäure und Ameisensäure sind starke Protonendonoren. Essigsäure ist dabei unpolar, während die Ameisensäure hoch polar ist. Einzig Cyclohexan ist ein ausschließlich unpolares Lösungsmittel mit keinen weiteren Eigenschaften [89].

**Tabelle 5.1.:** Liste der in diesem Abschnitt verwendeten Lösungsmittel. Die Daten sind aus [89] und [34] entnommen.

	Dielektrizität $\epsilon$	Viskosität $\eta$ (mPa s)
Cyclohexan	2.02	0.975
Essigsäure	6.15	1.13
Ethanol	24.55	1.2
DMSO	46.45	1.996
DMSO/Puffer (40:60)	66.68	1.3
Ameisensäure	58	3.76
wasserbasierter Puffer	80.16	1
Glycerol/Puffer (80:20)	50.03	60.8
$\alpha$ -Syn. Fibrillen	??	??

In der Fibrille gibt es rigide hydrophobe und rigide hydrophile Regionen. Diese können an der Oberfläche oder im Innern der Fibrille liegen. An der Oberfläche der Fibrille gibt es große hydrophile Bereiche mit der Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung. Die Oberfläche ist dem Lösungsmittel exponiert. Kleine Moleküle können aber auch in Kanälen auf der Oberfläche binden, die nicht direkt dem Lösungsmittel ausgesetzt sind [7, 92]. Es gibt dementsprechend viele Möglichkeiten, wie die nicht kovalente Bindung der DPP-Derivate an die Fibrille zu einer Änderung der Fluoreszenz führen kann. Gleichzeitig kann möglicherweise die Kenntnis über den spektralen Verlauf, die Quantenausbeute und die Lebensdauer der fluoreszierenden Zustände zu einer Aussage über den Ort der Bindung führen. Aus stationären und zeitaufgelösten Messungen der Fluoreszenz in verschiedenen Lösungsmitteln und in der Fibrille kann daraus die Bindungsstelle der DPP-Derivate genauer eingegrenzt werden.

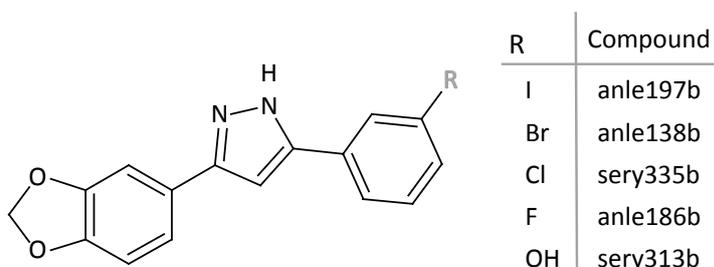
## 5.2. Die untersuchten DPP-Derivate

Zur Untersuchung der Umgebungsabhängigkeit der Fluoreszenz von anle138b, wird die Fluoreszenz und Photoreaktion weiterer DPP-Derivate herangezogen. Die Derivate

unterscheiden sich von anle138b durch ihre Substitutionen an der *meta*-Position des Phenylrings.

Alle untersuchten Moleküle sind in Abbildung 5.1 gezeigt. Bei anle197b (I) ist anstelle des Broms ein Jod substituiert, bei sery335b (Cl) ein Chlor, bei anle186b (F) ein Fluor und bei sery313b (OH) eine OH-Gruppe. Alle Substanzen wurden im SIFT-Essay positiv auf ihre anti-aggregative Wirkung getestet. Die *in vivo* Aktivität war jedoch nicht für alle gleich hoch (siehe Abschnitt 2.5).

Die beiden Substanzen anle186b (F) und sery313b (OH) wurden im letzten Kapitel parallel zu anle138b (Br) mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Dabei zeichneten sie sich durch ihre Photostabilität und höhere Quantenausbeute in wasserbasiertem Puffer aus. Da sich die Substanzen nur durch eine Substitution an der *meta*-Position unterscheiden, kann das fluoreszenzspektroskopische Verhalten relativ einfach auf die Struktur zurückgeführt werden. Die Untersuchung der Derivate soll damit zu einer Vervollständigung des Gesamtbildes zur Photophysik und Photoreaktion von anle138b beitragen.



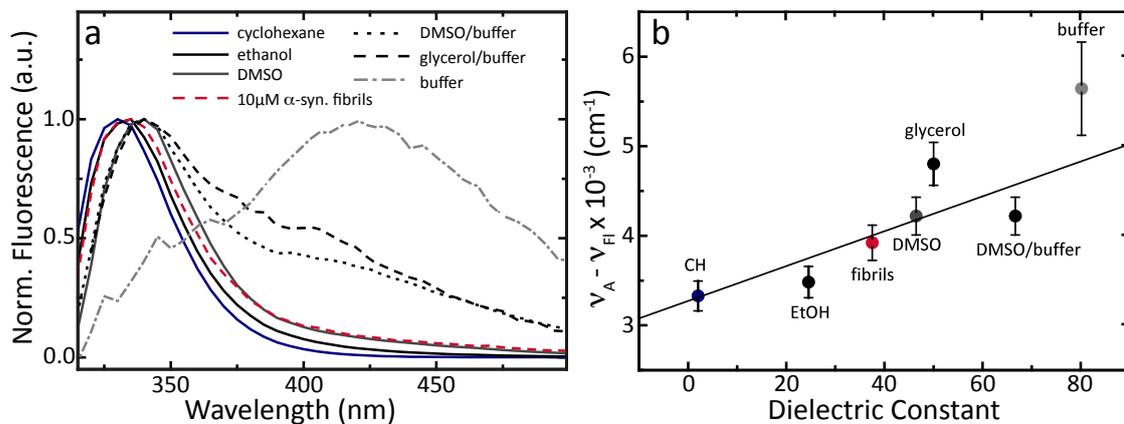
**Abbildung 5.1.:** Schema der DPP-Derivate anle197b (I), anle138b (Br), sery335b (Cl), anle186b (F) und sery313b (OH). In den Klammern steht der jeweilige Substituent an der *meta*-Position.

### 5.3. Stationäre Fluoreszenz der DPP-Derivate

Die stationäre Fluoreszenz der DPP-Derivate wird mit dem Fluoreszenzspektrometer (Fluorolog<sup>®</sup> 3 von Horiba) gemessen. Die Absorption mit einem UV-Vis Spektrometer der Firma Shimadzu (Shimadzu 2600). Lösungsmittel, die hierbei verwendet wurden sind Cyclohexan, Ethanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), ein Gemisch aus 60 % Puffer und 40 % DMSO (v/v) sowie reiner wasserbasierter Puffer, aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Polarität von unipolar nach polar. Zur Untersuchung der Viskositätsabhängigkeit werden die DPPs in einem Gemisch aus 80 % Glycerol und 20 % Puffer (v/v) gemessen. Im vorigen Kapitel wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Umgebung der DPPs in den  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen unipolar und rigide ist und es aufgrund dessen zu einer Fluoreszenzzunahme kommt. Zum Vergleich wird in diesem

Abschnitt auch die stationäre Fluoreszenz der DPP-Derivate mit Fibrillen gezeigt und mit den Ergebnissen für die verschiedenen Lösungsmittel verglichen.

Zunächst werden die drei Derivate anle138b (Br), anle186b (F) und sery313b (OH) in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Die Konzentrationen der Substanzen werden entsprechend ihrer Löslichkeit gewählt. Je nach Präparation haben die DPPs in Cyclohexan eine Konzentration von 5-10  $\mu\text{M}$  (bei 0.5 % Ethanol, v/v). In den Lösungsmitteln Ethanol, DMSO und DMSO/Puffer kann eine Konzentration von 5-10  $\mu\text{M}$  erzielt werden. In Fibrillen, Glycerol und Puffer hingegen nur bis zu 0.5  $\mu\text{M}$  (bei 1 % DMSO, v/v).



**Abbildung 5.2.:** (a) Normierte Fluoreszenz von anle186b in verschiedenen Lösungsmitteln: Cyclohexan (blau), Ethanol (schwarz),  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot gestrichelt), DMSO (grau), DMSO/Puffer (40:60) (schwarz gepunktet), Glycerol/Puffer (80:20) (schwarz gestrichelt) und Puffer (grau, strichpunktiert). (b) Stokes-Verschiebung des Emissionsmaximums aufgetragen für die einzelnen Lösungsmittel in Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante.

Da die Absorption und Fluoreszenz der einzelnen DPP-Proben in den verschiedenen Lösungsmitteln sehr ähnlich ist, ist in Abbildung 5.2 (a) beispielhaft die Fluoreszenz von anle186b (F) gezeigt. Absorption und Fluoreszenz der weiteren Proben sind im Anhang zu finden. Die Fluoreszenz der Proben anle138b (Br) und sery313b (OH) ist in Abbildung A.6 und A.7 dargestellt. Die Absorption aller hier untersuchten DPPs in Cyclohexan ist in der Abbildung A.4 zu sehen und die Absorption von anle138b, anle186b und sery313b in Lösungsmitteln verschiedener Polarität jeweils in Abbildung A.5 (a)-(c).

Die Absorption in Cyclohexan (Abbildung A.4) ist für die Derivate annähernd identisch. Alle zeigen ein Maximum bei etwa 260 nm und eine Schulter bei 300 nm. Die Absorptionsbanden sind für alle Derivate gleichermaßen ausgeprägt. Lediglich für sery313b sind sie etwas stärker voneinander getrennt.

Die Absorptionen der Derivate anle138b, anle186b und sery313b in den verschiedenen Lösungsmitteln (Abbildung A.5 (a)-(c)) sind auf das Maximum der Absorbanz

bei 260 nm normiert. Die Absorption der drei Derivate zeigt nur eine geringe Reaktion auf die Polarität der Umgebung. Die beiden Banden bei 260 nm und 300 nm sind in allen Lösungsmitteln zu finden und kaum spektral verschoben. Lediglich die Absorption von anle138b (Br) und sery313b (OH) in Puffer und DMSO sowie der Mischung DMSO/Puffer zeigen eine leichte Rotverschiebung. Gemessen an der Fluoreszenz ist der Einfluss der Lösungsmittel auf die Absorption aber vernachlässigbar klein.

Zur Messung der Fluoreszenz werden die Substanzen in der Schulter bei 300 nm (Absorptionskoeffizient bei 300 nm:  $\epsilon = 10000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) angeregt. In den Abbildungen 5.2, A.6 und A.7 (a) sind die Fluoreszenzen der drei Substanzen (anle186b, anle138b und sery313b) in den verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt. Die Fluoreszenzen sind auf ihr Maximum normiert, damit das lösungsmittelabhängige Verhalten sichtbar ist. Die Emissionsmaxima sind zur besseren Vergleichbarkeit in Tabelle 5.2 aufgelistet.

Zunächst wird die Fluoreszenz von anle186b und sery313b (Abbildung 5.2, A.6 (a) und Tabelle 5.2) beschrieben, da sie relativ ähnlich ausgeprägt ist, während die von anle138b deutlich davon abweicht. Die Substanzen zeigen in einer unpolaren Umgebung wie Cyclohexan (blau) eine stark ausgeprägte Fluoreszenz bei 330 nm (anle186b) und 325 nm (sery313b). Die Quantenausbeute  $\Phi$  ist relativ hoch und liegt für beide Substanzen bei etwa  $\Phi = 60\%$ . Diese Fluoreszenz verschiebt sich bathochrom um bis zu 10 nm in den Lösungsmitteln Ethanol und DMSO. Gleichzeitig bleibt aber die Fluoreszenzquantenausbeute der beiden Substanzen annähernd konstant zwischen 40-50 % (siehe Tabelle 5.2). So liegt das Maximum der Fluoreszenz in Ethanol (schwarz) für anle186b bei etwa 335 nm ( $\Phi = 45\%$ ) und für sery313b bei 330 nm ( $\Phi = 47\%$ ). Im relativ polaren Lösungsmittel DMSO (grau) verschiebt sich für beide Substanzen das Maximum noch weiter ins Rote zu 340 nm. Gleichzeitig erscheint eine schwach ausgeprägte rotverschobene Flanke bei 420 nm. Durch die Zugabe von wasserbasiertem Puffer (60 % Puffer 40 % DMSO, schwarz gepunktet) zeigt sich diese Flanke stärker ausgeprägt. Während die Fluoreszenzquantenausbeute in reinem DMSO für anle186b noch bei etwa 40 % liegt (für sery313b bei 78 %), sinkt sie im DMSO/Puffer-Gemisch auf 27 % (anle186b) und 38 % (sery313b). Die rotverschobene Flanke wird zu einem eigenständigen Maximum in reinem Puffer (grau, strichpunktiert), bzw. zu einer rotverschobenen ausgeprägten Schulter für sery313b. Gleichzeitig nimmt die Fluoreszenzquantenausbeute in Puffer stark ab auf bis zu 9 % und 16 % jeweils für anle186b und sery313b.

Die Fluoreszenz von anle186b und sery313b in Glycerol (5.2 und A.6 (a), schwarz, gestrichelt) zeigt ein ausgeprägtes Maximum bei etwa 340 nm und 335 nm. Dieses ist leicht bathochrom verschoben gegenüber der Fluoreszenz in Cyclohexan. Gleichzeitig erscheint auch hier eine rotverschobene Flanke bei  $\sim 420$  nm, die für anle186b sogar stärker ausgeprägt ist als für sery313b. Die Quantenausbeuten liegen für anle186b bei etwa 42% und für sery313b bei  $\sim 59\%$ . Die Quantenausbeuten sind damit deutlich höher als in reinem Puffer.

Für den direkten Vergleich ist in Abbildung 5.2 und A.6 noch einmal die Fluoreszenz der beiden Derivate mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen gezeigt (rot gestrichelt). Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei 335 nm bei einer Quantenausbeute von 30 %.

**Tabelle 5.2.:** Tabelle über die Quantenausbeuten  $\Phi$  und Emissionsmaxima der drei wichtigsten Derivate anle138b (Br), anle186b (F) und sery313b (OH) in verschiedenen Lösungsmitteln. DMSO/Puffer liegt in einem Mischungsverhältnis 40:60 vor. Glycerol/Puffer in einem Verhältnis 80:20.

	anle138b (Br)		anle186b (F)		sery313b (OH)	
	$\lambda_{max}$ (nm)	$\Phi$ (%)	$\lambda_{max}$ (nm)	$\Phi$ (%)	$\lambda_{max}$ (nm)	$\Phi$ (%)
Cyclohexan	330	49	330	63	325	63
Essigsäure	470	26	470	26	465	39
Ethanol	335	30	335	45	330	47
DMSO	340	2	340	40	340	78
DMSO/Puffer	335	1.1	340	27	335	38
Ameisensäure	500	9.6	495	9.2	495	13
Puffer	-	< 0.5	420	8.9	345/420	16.3
Glycerol/Puffer	345	25.4	340	42.0	335	59.4
$\alpha$ -Syn. Fibrillen	335	30	335	28.7	335	31.1

Anle138b zeigt in Cyclohexan zunächst das gleiche Verhalten wie die beiden anderen DPP-Derivate (siehe Abbildung A.7 (a) und Tabelle 5.2). Auch die bathochrome Verschiebung mit steigender Lösungsmittelpolarität ist identisch zu anle186b und sery313b. So liegt das Maximum der Fluoreszenz in Cyclohexan bei etwa 330 nm und die Quantenausbeute beträgt fast 50 %. In Ethanol verschiebt sich das Maximum der Emission zu 335 nm und die Quantenausbeute ist bei etwa 30 %. In DMSO ist die stärkste Veränderung festzustellen. Hier beträgt die Quantenausbeute nur noch 2 % (Maximum bei 340 nm). Gleichzeitig tritt in DMSO und in einem DMSO/Puffer-Gemisch (Quantenausbeute 1.1 %) eine rotverschobene Flanke auf. In Puffer ist die Quantenausbeute so gering (< 0.5 %), dass die Fluoreszenz mit den hier angewandten Methoden nicht exakt gemessen werden kann.

Die Fluoreszenz von anle138b in Glycerol ist gegenüber Cyclohexan stark rotverschoben, mit einem Maximum bei 345 nm. Auch die rote Flanke bei  $\sim$ 420 nm ist in diesem Spektrum gut zu sehen. Sie ist allerdings nicht so stark ausgeprägt wie für anle186b. Die Quantenausbeute ist mit  $\sim$ 25 % geringer als für die anderen beiden Substanzen, jedoch deutlich größer als in Puffer, DMSO/Puffer oder DMSO.

Wie für anle186b und sery313b ist die Fluoreszenz von anle138b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen in rot (gestrichelt) gezeigt. Das Maximum der Emission liegt bei 335 nm und die Quantenausbeute beträgt auch hier 30 %.

In Abbildung 5.2 (b) ist die Stokes-Verschiebung für das Fluoreszenzmaximum in (a) von anle186b gezeigt. Die Differenz zwischen Absorptions- und Fluoreszenzmaximum  $\nu_A - \nu_{Fl}$  ist abhängig von der Dielektrizitätskonstante der Lösungsmittel aufgetragen. Der lineare Zusammenhang ist für die Mehrzahl der Lösungsmittel erfüllt. Die Fitgerade dient hierbei als Hilfslinie, um den Zusammenhang besser sichtbar zu machen. Deutliche Abweichungen von der Geraden zeigen Puffer und Glycerol. Die Stokes-Verschiebungen für sery313b und anle138b sind im Anhang in Abbildung A.6 und A.7 (b) gezeigt. Die lineare Abhängigkeit ist auch hier nicht für alle Lösungsmittel erfüllt. Abweichungen sind für DMSO, DMSO/Puffer und Puffer zu finden. Für anle138b in Puffer existiert kein Wert, da anle138b in Puffer keine Fluoreszenz zeigt.

Die Dielektrizitätskonstante in den Fibrillen wurde aus dem Vergleich der Stokes-Verschiebung in den Fibrillen mit den Stokes-Verschiebungen der umliegenden Lösungsmittel interpoliert. Natürlich kann der tatsächliche Wert in der Fibrille abweichen. Er bleibt aber aufgrund der unbekanntenen Struktur in den Fibrillen unbestimmt.

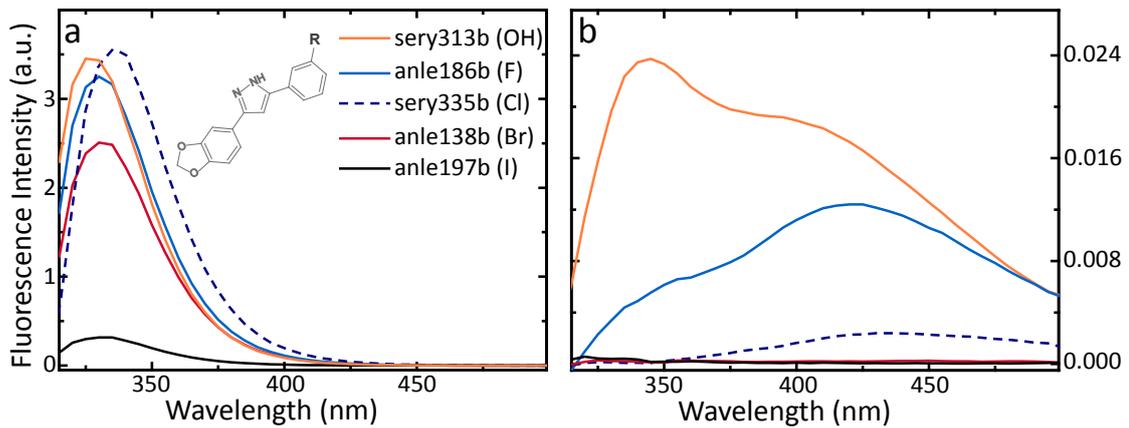
### 5.3.1. Photoreaktion in verschiedenen Lösungsmitteln

Die Belichtung der Probe durch das Fluoreszenzspektrometer ist so angepasst, dass in der Probe während einer Messung nur ein vernachlässigbar kleiner Anteil photochemisch reagiert (siehe Abschnitt 4.1.2). Wie in Deeg et al. beschrieben [30], kann anle138b durch Belichtung mit UV-Licht eine Photoreaktion eingehen, bei der das Brom abgespalten und durch ein Atom oder eine Gruppe aus dem Lösungsmittel ersetzt wird [30]. Um die Photoreaktion genauer einordnen zu können, wurden in [101] Messungen an weiteren Molekülen durchgeführt, bei denen das Brom durch andere Halogene substituiert ist und dafür die Reaktionsquantenausbeute  $\Phi_R$  bestimmt. Die Moleküle sind anle197b (I) und sery335b (Cl) (siehe Abbildung 5.1). Die Messungen zur Fluoreszenz und Reaktionsquantenausbeute dieser Derivate sowie anle138b (Br), anle186b (F) und sery313b (OH) wurden hier noch einmal wiederholt und durch Messungen in Cyclohexan ergänzt. In Abbildung 5.3 ist die Fluoreszenz der fünf Moleküle in Cyclohexan (a) und Puffer (b) gezeigt. In Cyclohexan (Abbildung 5.3 (a)) ist die Fluoreszenz von sery313b (OH) und anle186b (F) relativ stark ausgeprägt mit einem Emissionsmaximum bei  $\sim 330$  nm. Die Fluoreszenz von anle138b (Br) und anle197b (I) (Maximum bei  $\sim 330$  nm) ist durch die Halogensubstitution leicht (anle138b) bzw. stark (anle197b) gequenched.

Ein davon abweichendes Verhalten ist für sery335b (Cl) zu finden. Sery335b zeigt in Cyclohexan eine starke, gegenüber den anderen Spektren leicht rotverschobene Emission. Offensichtlich führt das Chloratom zu einer sich von den anderen Halogenen unterscheidenden Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel.

In wasserbasiertem Puffer ist die Fluoreszenz stark unterdrückt (Abbildung 5.3 (b)). Dies gilt nicht nur für die bereits bekannten Derivate anle138b, anle186b und sery313b, sondern auch für anle197b und sery335b. Sery313b (OH) zeigt zwei voneinander getrennte Maxima. Eines bei ca. 340 nm und ein zweites bei ca. 420 nm. Das Maximum

bei 340 nm ist für anle186b (F) als Schulter zu erkennen und verschwindet komplett für sery335b (Cl). Das zweite Fluoreszenzmaximum bei ca. 420 nm ist dafür für beide Substanzen noch stärker ausgeprägt. Sowohl für anle138b (Br) als auch für anle197b (I) kann in Puffer keine Fluoreszenz detektiert werden.



**Abbildung 5.3.:** Vergleich der Fluoreszenz von anle197b (schwarz), anle138b (rot), sery335b (schwarz gestrichelt), anle186b (blau) und sery313b (orange) in Cyclohexan (a) und Puffer (b).

Die Photoreaktion der Moleküle wurde mit einer LC-MS in Wasser (Puffer ist hier ungeeignet) und DMSO bestätigt [30, 101]. Durch die Reaktion der Moleküle, kann es je nach Substanz und Lösungsmittel zu einem Fluoreszenzanstieg- oder abfall kommen. Diese Fluoreszenzänderung kann genutzt werden, um die Reaktionsquantenausbeute, d.h. die Anzahl der umgesetzten Moleküle pro absorbiertem Photon zu bestimmen. In Abbildung 5.4 ist der Anstieg der Fluoreszenz von anle138b durch die Photoreaktion zu sehen. Da die Änderung der Fluoreszenz direkt mit der Erzeugung eines Photoprodukts korreliert ist, kann aus dem Anstieg der Fluoreszenz, wie er in Abbildung 5.4 gezeigt ist, die Anzahl umgesetzter Moleküle pro absorbiertem Photon (Reaktionsquantenausbeute) bestimmt werden. Die Reaktionsquantenausbeute  $\Phi_R$  ist gegeben durch

$$\Phi_R = \frac{dN_B(t)}{dN_{ap}(t)} \quad (5.1)$$

Hier ist  $dN_B(t)$  die Anzahl der durch die Photoreaktion erzeugten Moleküle und  $dN_{ap}(t)$  die Anzahl absorbierter Photonen.

Unter der Annahme, dass die Fluoreszenzänderung allein durch die Erzeugung der Photoprodukte auftritt, ist die Anzahl der bereits umgesetzten Moleküle  $dN_B(t)$  direkt proportional zur Fluoreszenzänderung. Hierbei muss beachtet werden, dass für  $t \rightarrow \infty$  alle Moleküle umgesetzt sind, d.h. es zu einer Sättigung der Fluoreszenz

auf  $F(t \rightarrow \infty) = F_{\max}$  kommt. Die Anzahl der bei  $t \rightarrow \infty$  umgesetzten Moleküle entspricht dann der Anzahl der Moleküle in der Lösung zum Zeitpunkt  $t = 0$  mit  $N_B(t \rightarrow \infty) = N_{A_0}(t = 0) = N_{A_0} = C_{A_0} V N_A$  ( $N_A$  ist die Avogadrokonstante). Pro umgewandeltem Molekül wächst die Fluoreszenz deshalb um  $F_{\max}/N_{A_0}$ . Daraus ergibt sich für  $dN_B(t)$

$$dN_B(t) = \frac{dF(t)}{F_{\max}} \cdot N_{A_0} \quad . \quad (5.2)$$

Die im Zeitintervall  $dt$  absorbierten Photonen  $dN_{ap}(t)$  sind gegeben über die im Zeitintervall  $dt$  eingestrahlenen Photonen multipliziert mit der Absorption der Ausgangsmoleküle  $N_{A_0}$

$$dN_{ap}(t) = \frac{P_0 \lambda}{hc} dt \cdot (1 - 10^{-\epsilon C_A(t)d}) \quad , \quad (5.3)$$

wobei  $P_0$  die eingestrahelte Leistung ist und  $\lambda$  die Wellenlänge. Die Absorption der Ausgangsmoleküle  $N_{A_0}$  ist abhängig von der Schichtdicke  $d$ , dem Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  und der Konzentration  $C_A(t)$ . Die Konzentration der Ausgangsmoleküle  $C_A(t)$  in der Lösung ändert sich durch die Photoreaktion mit der Zeit. Die Konzentrationsänderung ist dadurch direkt mit der Fluoreszenz korreliert. Dabei wird die geringe Änderung der Absorption durch den Anstieg der Photoprodukte in der Lösung vernachlässigt. Die Änderung der Konzentration der Ausgangsmoleküle in Abhängigkeit der Fluoreszenz der Photoprodukte ist gegeben durch

$$C_A(t) = (1 - \frac{F(t)}{F_{\max}}) \cdot C_{A_0} \quad .$$

Da es sich um eine optisch sehr dünne Probe handelt, kann die Absorption linear angenähert werden mit

$$Abs = (1 - 10^{-\epsilon C_A(t)d}) \sim \epsilon C_A(t)d \cdot \ln(10) \quad .$$

Setzt man nun Formel 5.2 und die lineare Näherung von Formel 5.3 in Formel 5.1 ein erhält man die folgende Differentialgleichung:

$$\frac{1}{\beta} \frac{dF(t)}{dt} + F(t) - F_{\max} = 0 \quad \text{mit} \quad (5.4)$$

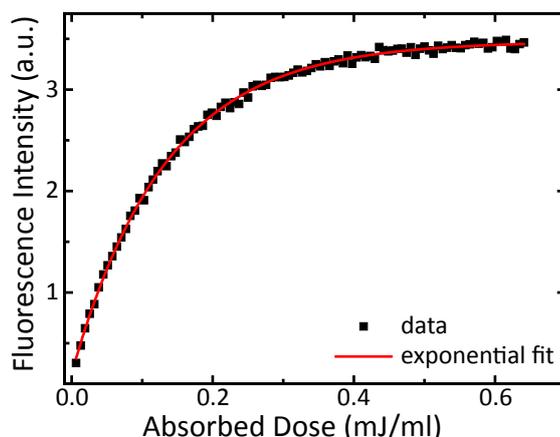
$$\beta = \frac{P_0}{V \cdot N_A} \frac{\lambda}{hc} \cdot \ln(10) \epsilon d \cdot \Phi_R \quad .$$

Die Lösung der Differentialgleichung ist gegeben durch

$$F(t) = F_{\max} (1 - \exp(-\beta t)) \quad . \quad (5.5)$$

Die Belichtungszeit  $t$  kann mithilfe des Vorfaktors  $\beta$  wie in Abbildung 5.4 zur absorbierten Dosis pro Volumen  $x_D = Abs \cdot (P_0 t / V)$  umgeschrieben werden. Dann ist

$$F(x_D) = F_{\max} (1 - \exp(-\gamma x_D)) \quad \text{mit} \quad (5.6)$$



**Abbildung 5.4.:** Änderung der Fluoreszenz von anle138b in Wasser durch die Photoreaktion. Der Anstieg der Fluoreszenz kann mit Gleichung 5.6 angepasst werden. Daraus wird die Reaktionsquantenausbeute  $\Phi_R$  bestimmt.

$$\gamma = \frac{\lambda}{hc} \cdot \frac{1}{C_{A_0} N_A} \Phi_R \quad (5.7)$$

Aus einem Fit der Gleichung 5.6 an die Daten in Abbildung 5.4 kann der Faktor  $\gamma$  bestimmt werden. Aus Gleichung 5.7 kann damit die Reaktionsquantenausbeute  $\Phi_R$  berechnet werden.

Die Reaktionsquantenausbeuten sind in Tabelle 5.3 für die fünf Moleküle in verschiedenen Lösungsmitteln aufgelistet. Mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen wurde sie nur für die drei Moleküle anle138b (Br), anle186b (F) und sery313b (OH) aufgenommen.

**Tabelle 5.3.:** Tabelle über die Reaktionsquantenausbeuten  $\Phi_R$  (in %) in Cyclohexan, DMSO, Puffer und  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen.

	anle197b (I)	anle138b (Br)	sery335b (Cl)	anle186b (F)	sery313b (OH)
Cyclohexan	26.5	2	$\leq 0.7$	1.6	1.4
DMSO	12.2	30.8	32.4	6.2	2
wasserbasierte Puffer	47.6	94.9	41.8	$\leq 5$	$\leq 2$
$\alpha$ -Syn. Fibrillen	n.a.	14	n.a.	$\leq 4$	$\leq 4$

In Cyclohexan ist die Reaktionsquantenausbeute bis auf anle197b (I) ( $\Phi_R = 26.5\%$ ) vernachlässigbar klein. Je polarer die Umgebung der Moleküle wird, desto effizienter ist auch die Reaktion. So ist die Photoreaktion in wasserbasiertem Puffer ca. doppelt so effizient wie in DMSO. Zusätzlich ist die Reaktionsquantenausbeute auch vom Substituenten abhängig. Dabei gehen die Moleküle mit schweren Halogenen verstärkt

eine Photoreaktion ein. Die Reaktionsquantenausbeute steigt aber nicht proportional mit der Größe des Halogenatoms an, sondern ist auch vom Lösungsmittel abhängig. Einzig für sery313b (OH) und anle186b (F) werden keine oder nur geringe Reaktionsquantenausbeuten gefunden. Bemerkenswert ist, dass die Reaktionsquantenausbeute von anle138b (Br) in Fibrillen mit 14 % viel geringer ist als in Wasser mit fast 95 %

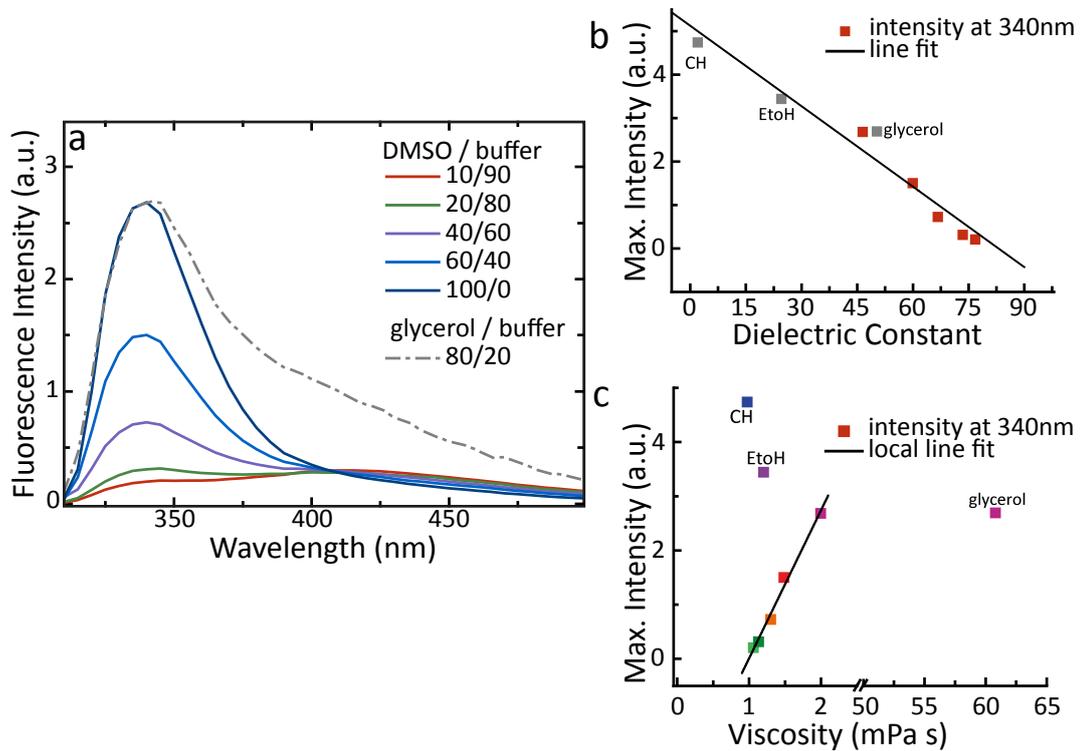
Zusammenfassend kann für die Photoreaktion ein Trend festgestellt werden: Die Photoreaktion ist für die drei Moleküle mit den schweren Halogenen Jod (anle197b), Brom (anle138b) und Chlor (sery335b) am effizientesten. Qualitativ steigt die Reaktionsquantenausbeute mit der Polarität des Lösungsmittels an.

### 5.3.2. Die DPP-Derivate in Lösungsmittelmischungen

Im vorherigen Abschnitt wurde die Fluoreszenz der DPP-Derivate anle138b, anle186b und sery313b in DMSO und in einem DMSO/Puffer-Gemisch beschrieben. Da DMSO nicht nur stark polar ist ( $\epsilon = 46.5$ ), sondern auch eine höhere Viskosität als die anderen Lösungsmittel besitzt ( $\eta = 1.996 \text{ mPas}$ ), ist es schwer, den Einfluss von Viskosität und Polarität zu trennen. Noch stärker ist diese Problematik in einem Glycerol/Puffer Gemisch (80 % Glycerol, 20 % Puffer), das hoch viskos ( $\eta = 60.8 \text{ mPas}$ ) und ebenfalls polar ist ( $\epsilon = 50$ ).

In einem DMSO/Puffer-Gemisch verschiedener Mischungsverhältnisse, kann eine kontinuierliche Variation von Polaritäten und Viskositäten erzielt werden. Dazu wird anle186b ( $10 \mu\text{M}$ ) in DMSO und Puffer in den Verhältnissen 10/90, 20/80, 40/60, 60/40 und 100/0 gelöst. In Abbildung 5.5 (a), ist der Anstieg der Fluoreszenz von anle186b bei 340 nm durch die Zugabe von DMSO deutlich zu sehen. Gleichzeitig verschwindet die rote Flanke bei etwa 420 nm, die in wasserbasiertem Puffer stark ausgeprägt ist. Die Fluoreszenz von anle186b ( $0.5 \mu\text{M}$ ) in einem Glycerol/Puffer Gemisch (80 % Glycerol, 20 % Puffer) ist in Abbildung 5.5 (a) (grau, strichpunktiert) gezeigt. Das Gemisch hat eine fast identische Polarität wie 100 % DMSO, jedoch eine viel höhere Viskosität. Das Spektrum ist auf die Konzentration von anle186b in DMSO skaliert. Die Fluoreszenz im Maximum des Spektrums ist annähernd identisch zu der in 100 % DMSO. Es bleibt aber ein signifikanter Anteil der roten Schulter bestehen, der in DMSO nicht beobachtet wird.

Der Anstieg bei 340 nm kann, wie in Abbildung 5.5 gezeigt, in Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante (b) oder der Viskosität (c) des DMSO/Puffer-Gemischs aufgetragen werden. In beiden Fällen ist eine lineare Abhängigkeit zu beobachten, die aber aus der Linearität der Verdünnung resultiert. Um die Abhängigkeiten besser einordnen zu können, ist dementsprechend auch die Fluoreszenz in Glycerol/Puffer, sowie die in Ethanol und in Cyclohexan gezeigt. Auch bei Hinzunahme der Fluoreszenzen in Cyclohexan, Ethanol und Glycerol/Puffer fällt das Maximum bei 340 nm linear mit dem Anstieg der Dielektrizität des Lösungsmittels ab. In Abbildung 5.5 (c) ist die Polarität der einzelnen Punkte durch die Farbcodierung gegeben. Unpolare Lösungsmittel sind blau dargestellt, mittelpolare rot und unpolare orange bis grün.



**Abbildung 5.5.:** (a) Fluoreszenz von anle186b in einer DMSO/Puffer-Mischung (rot-dunkelblau) und in Glycerol/Puffer (80:20), (grau, strichpunktiert). (b) Fluoreszenz im Maximum aus (a) aufgetragen über die Dielektrizitätskonstante des DMSO/Puffer-Gemischs. Die Maxima für Cyclohexan, Ethanol und Glycerol/Puffer (80:20) sind ebenfalls gezeigt (grau). (c) Fluoreszenz im Maximum aus (a) aufgetragen über die Viskosität des DMSO/Puffer-Gemischs. Die Maxima für Cyclohexan, Ethanol und Glycerol/Puffer (80:20) sind ebenfalls gezeigt. Die Farbgebung der Punkte zeigt die Polarität der Lösungsmittel an von unpolar (blau), mittelpolar (lila-rot) nach polar (orange-grün).

Für die Viskosität ist kein klarer Trend zu erkennen, jedoch ist für alle unpolaren Lösungsmittel die Fluoreszenz hoch und für alle polaren schwach. Insgesamt scheint damit die Viskosität keinen Einfluss auf den spektralen Verlauf und die Quantenausbeute im Maximum der Fluoreszenz zu haben.

Wie in Abbildung 5.5 (a) gezeigt, fällt die Fluoreszenz in der roten Flanke bei 420 nm in einem relativ zu Wasser unpolaren Medium wie 100 % DMSO stark ab. Sie steigt in einem DMSO/Puffer-Gemisch unter Zugabe von wasserbasiertem Puffer an und somit mit der Polarität. In einem hoch viskosen Lösungsmittel wie Glycerol (bei gleicher Polarität wie DMSO) ist sie jedoch sehr stark ausgeprägt, obwohl Abbildung 5.5 (a) genau das umgekehrte Verhalten im DMSO/Puffer-Gemisch zeigt: Ein Anstieg der roten Flanke mit fallender Viskosität. Die Fluoreszenz in der roten Flanke bei 420 nm kann somit weder direkt durch die Viskosität noch durch die Polarität erklärt

werden. Während es eine systematische Abhängigkeit der Fluoreszenz der Bande bei 340 nm von der Polarität gibt, findet man in der roten Flanke bei 420 nm keinen entsprechenden einfachen Zusammenhang. Offensichtlich reicht es nicht aus, nur die Polarität der Lösungsmittel zu berücksichtigen. Es gibt Hinweise, dass zusätzlich auch andere Größen, wie zum Beispiel die Protizität eine Rolle spielen.

Ein ähnliches Verhalten ist für *anle138b* und *sery313b* zu finden. Die Abbildungen sind im Anhang in A.8 und A.9 dargestellt. Für *anle138b* fällt das Maximum bei 340 nm nicht linear mit dem Anstieg der Dielektrizität des Lösungsmittels ab. Stattdessen kommt es hier zu einem Sprung zwischen Ethanol und 100 % DMSO. Dieser tritt mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der Substitution des Broms an der *meta*-Position auf.

#### 5.3.3. Die DPP-Derivate in Säuren verschiedener Polarität

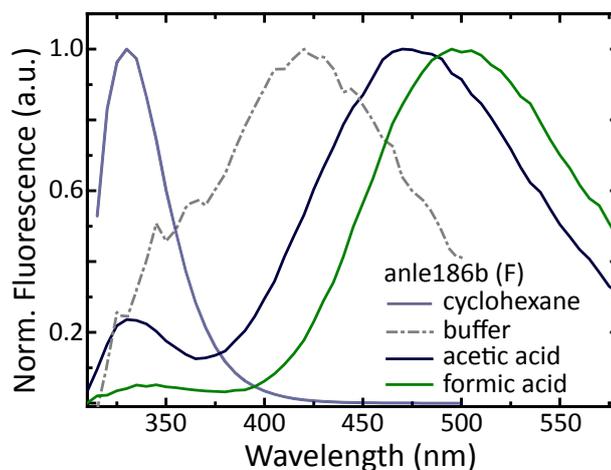
Da der rotverschobene Beitrag weder eindeutig der Polarität noch der Viskosität zugesprochen werden kann, werden zur weiteren Charakterisierung die drei Derivate *anle138b*, *anle186b* und *sery313b* in Säuren verschiedener Polarität in Absorption und Fluoreszenz gemessen. Eine Säure hoher Polarität ist die Ameisensäure ( $\epsilon = 58$ ), die Essigsäure hat eine niedrige Polarität ( $\epsilon = 6.15$ ). Beide Säuren sind starke Protonendonoren. Die Derivate werden zunächst zu 1 mM in DMSO gelöst und anschließend in den Säuren auf etwa 5  $\mu$ M verdünnt (etwa 1 % DMSO (v/v) verbleibt in der Lösung).

Die Absorptionen sind im Anhang A.10 (a)-(c) gezeigt. Während die Absorption in Essigsäure kaum von der in Cyclohexan abweicht, ist die Absorption aller drei Derivate in Ameisensäure stark rotverschoben mit einem Maximum bei etwa 315 nm.

Zur Veranschaulichung der Fluoreszenz der Derivate in den zwei Säuren, ist in Abbildung 5.6 beispielhaft die Fluoreszenz von *anle186b* (F) gezeigt. Die Fluoreszenz von *anle138b* (Br) und *sery313b* (OH) unterscheidet sich nur wenig von *anle186b* und ist im Anhang A.11 (a) und (b) dargestellt. Die Spektren sind auf ihr Maximum normiert, damit die lösungsmittelabhängige Änderung besser sichtbar wird.

Die Fluoreszenz weicht in beiden Lösungsmitteln stark von der in Cyclohexan (zum Vergleich in blassblau) ab. Es zeigt sich ein rotverschobenes Maximum, ähnlich dem in wasserbasiertem Puffer (zum Vergleich in grau, strichpunktiert). Das Maximum ist aber gegenüber dem in Puffer noch weiter rotverschoben. Für Essigsäure um 50 nm (Maximum bei 470 nm), für Ameisensäure sogar um 75 nm (Maximum bei 495 nm). In Essigsäure ist die kurzwellige Bande bei 330 nm zu finden, ähnlich der in Cyclohexan. In Ameisensäure ist sie kaum mehr sichtbar. Die Quantenausbeuten liegen in Essigsäure bei etwa 30 % und in Ameisensäure bei ca. 10 % für alle drei DPP-Derivate (siehe Tabelle 5.2).

Da beide Säuren unterschiedlich polar sind, in beiden aber eine ausgeprägte rotverschobene Emission das Spektrum dominiert, kann die zweite Bande nur aufgrund der protonierenden Eigenschaft des Lösungsmittels entstehen. Je stärker das Lö-



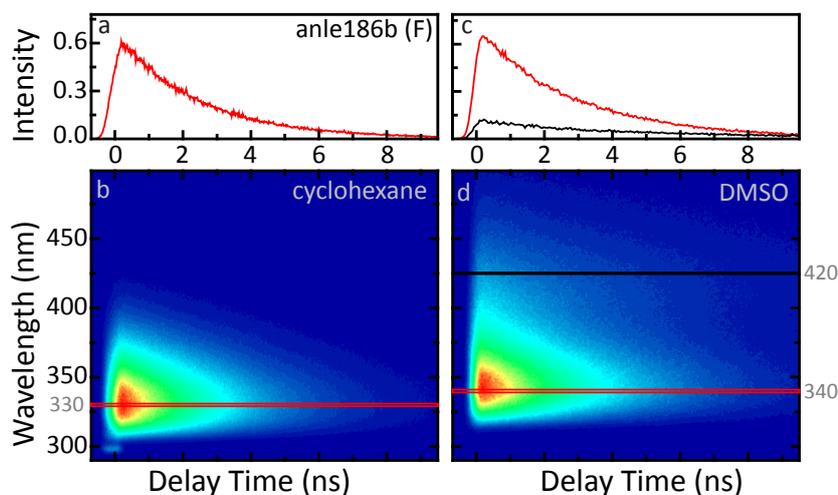
**Abbildung 5.6.:** Fluoreszenz von anle186b in Essigsäure (dunkelblau) und Ameisensäure (grün). Zum Vergleich ist noch einmal die Fluoreszenz in Cyclohexan (blau) und in Puffer (grau, strichpunktiert) dargestellt.

sungsmittel Protonen doniert, desto ausgeprägter ist die rotverschobene Bande der Fluoreszenz. In Glycerol und in Wasser, die bevorzugt Wasserstoffbrücken ausbilden scheint dies ebenfalls zuzutreffen.

## 5.4. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

Die stationären Messungen haben gezeigt, dass die charakteristische Fluoreszenz von anle138b und anderen DPP-Derivaten vom Lösungsmittel abhängig ist. Gerade in sehr polaren oder protonierenden Lösungen, wie Wasser, wasserbasiertem Puffer oder Säuren verschiedener Polarität, ist die Fluoreszenz für alle drei untersuchten Moleküle stark gequenched und/oder rotverschoben. Die Fluoreszenz von anle186b und sery313b zeigt in DMSO, in einem DMSO/Puffer-Gemisch und in reinem Puffer eine zweite rotverschobene Bande, die mit Zunahme der Polarität des Lösungsmittels stärker ausgeprägt ist. Stark protonierende Lösungsmittel wie Säuren oder Wasser begünstigen die Fluoreszenz in diesem Spektralbereich.

Das Auftreten einer zweiten eigenständigen Bande ist häufig mit der Öffnung eines zusätzlichen Fluoreszenzkanals verbunden. Die Existenz verschiedener Möglichkeiten der Fluoreszenz aus dem angeregten Zustand, kann mit einer zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung eindeutig aufgeklärt werden. Im Unterschied zur stationären Messung, die nur die akkumulierte Fluoreszenz aufnimmt, können mit der zeitaufgelösten Fluoreszenz die Beiträge der einzelnen Komponenten festgestellt werden. Die duale Fluoreszenz tritt auch in der stationären Messung mit Proteinfibrillen auf. Dieses Verhalten kann mit der Fluoreszenz der Derivate in unterschiedlichen



**Abbildung 5.7.:** Zeitaufgelöste Fluoreszenz von anle186b in Cyclohexan (b) und DMSO (d). (a) Zeitverlauf der Fluoreszenz von anle186b in Cyclohexan im Maximum bei 330 nm in (b). (c) Zeitverlauf der Fluoreszenz von anle186b in DMSO im Maximum bei 340 nm und in der rotverschobenen Flanke bei 420 nm in (d).

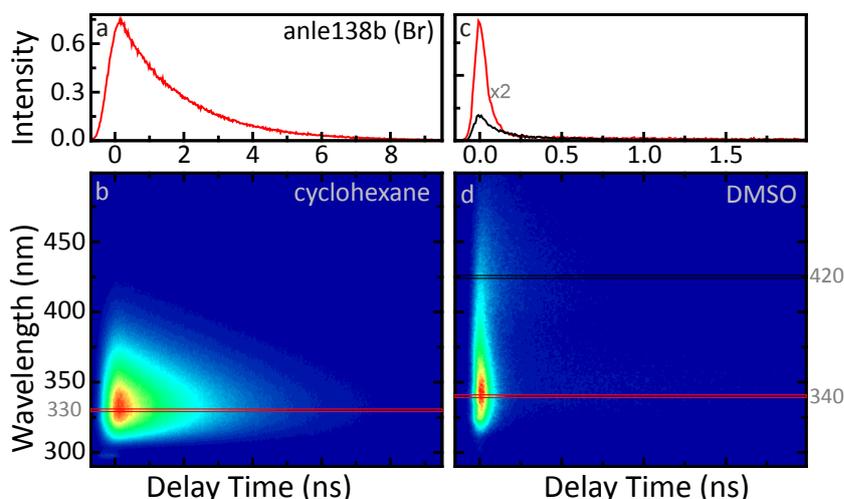
Lösungsmitteln verglichen werden. Ziel ist es, aus diesem Vergleich ein erweitertes Schema der Fluoreszenz (und Photoreaktion) von anle138b in der Fibrille zu erhalten.

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung mit der Streak-Kamera bestimmt die Lebensdauer angeregter Zustände und die zugehörigen Emissionsspektren. Die drei Derivate anle138b (Br), anle186b (F) und sery313b (OH) werden in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Da anle138b in Puffer kaum Fluoreszenz zeigt und zusätzlich sehr effizient photoreagiert, kann keine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung an anle138b in diesem Lösungsmittel durchgeführt werden. Aus Messungen mit anle186b und sery313b, die in Puffer ausreichend stark fluoreszieren, können wiederum Rückschlüsse auf das pharmakologisch relevante Molekül anle138b gezogen werden.

Entsprechend ihrer Löslichkeit werden die drei Derivate in den Lösungsmitteln verdünnt. In Cyclohexan, Ethanol, DMSO und DMSO/Puffer (40:60) kann eine Konzentration von 5-8  $\mu\text{M}$  erzielt werden. Absolute Fluoreszenzen, die miteinander verglichen werden, werden jeweils auf die Konzentration skaliert. In Puffer werden nur Konzentrationen von 0.5  $\mu\text{M}$  verwendet. Das gilt auch für die Messungen mit Proteinen.

In den Abbildungen 5.7 und 5.8 sind die Streak-Bilder (b,d) für anle186b (5.7) und anle138b (5.8) in Cyclohexan (b) und DMSO (d) gezeigt. Der zeitliche Verlauf ist für unterschiedliche Wellenlängen in (a) und (c) gezeigt.

In Cyclohexan zeigt sowohl anle186b (Abbildung 5.7) als auch anle138b (Abbildung 5.8) nur ein Fluoreszenzmaximum bei  $\sim 330$  nm mit einer mittleren Lebensdauer bei einigen Nanosekunden. Dem gegenüber steht die Fluoreszenz in einem polarerem



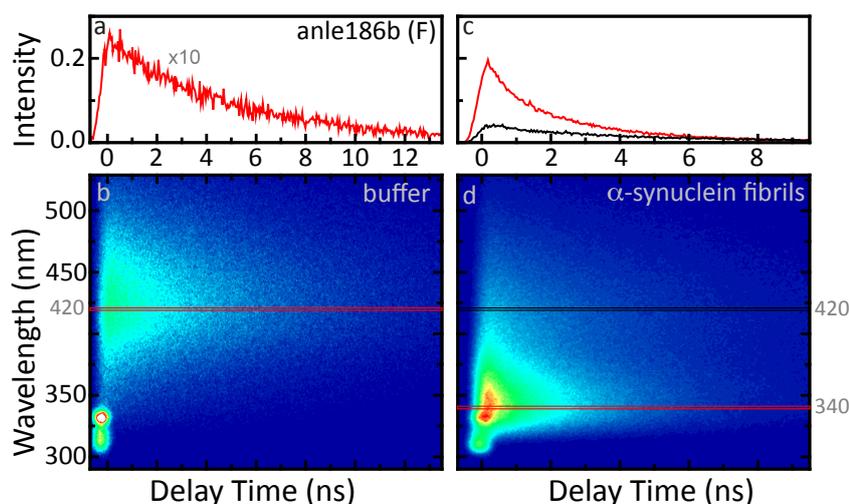
**Abbildung 5.8.:** Zeitaufgelöste Fluoreszenz von anle138b in Cyclohexan (b) und DMSO (d). (a) Zeitverlauf der Fluoreszenz von anle138b in Cyclohexan im Maximum bei 330 nm in (b). (c) Zeitverlauf der Fluoreszenz von anle138b in DMSO im Maximum bei 340 nm und in der rotverschobenen Flanke bei 420 nm in (d).

Lösungsmittel wie DMSO. Anle186b zeigt hier eine Rotverschiebung des Maximums von 10 nm und einen ausgeprägten Rotanteil, der in Cyclohexan nicht beobachtet wird. Die Fluoreszenzlebensdauer im Maximum bleibt durch den Wechsel in ein polares Lösungsmittel unbeeinflusst. Der Rotanteil mit Maximum bei  $\sim 420$  nm hat eine sichtbar längere Lebensdauer.

Die Fluoreszenz von anle138b reagiert auf den Wechsel in ein polares Medium stärker. Zunächst geht die Emission deutlich zurück und das Maximum verschiebt sich gegenüber dem in Cyclohexan um fast 10 nm. Gleichzeitig zeigt sich auch hier eine schwache rotverschobene Fluoreszenz. Die Fluoreszenzlebensdauer im Maximum bei 340 nm verkürzt sich auf ca. 36 ps. Auch der rote Anteil mit einem Maximum bei 420 nm lebt mit etwa 180 ps deutlich kürzer als für anle186b in DMSO (7 ns). Für sery313b ist der Unterschied zwischen Cyclohexan und DMSO noch geringer als für anle186b (siehe Anhang A.12).

Die Streak-Bilder zur Fluoreszenz der drei Substanzen in Ethanol und DMSO/Puffer sind im Anhang A.13 gezeigt. Alle drei Moleküle haben in Ethanol ein ausgeprägtes Maximum bei 330-335 nm, mit mittlerer Lebensdauer im Bereich weniger Nanosekunden. Anders als in Cyclohexan, zeigt sich schon hier eine schwache rotverschobene Flanke. Die Lebensdauer dieser Flanke ist für anle186b und sery313b länger als im Maximum. Für anle138b erscheint die Lebensdauer in der Flanke kürzer.

In DMSO/Puffer sind die Ergebnisse der zeitaufgelösten Messung für die drei Derivate sehr unterschiedlich. Auf sery313b hat die Mischung kaum einen verändernden Einfluss gegenüber Ethanol. Den großen Beitrag liefert die kurzwellige Bande



**Abbildung 5.9.:** Zeitaufgelöste Fluoreszenz von anle186b in Puffer (b) und mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (d). (a) Zeitverlauf der Fluoreszenz von anle186b in Puffer im Maximum bei 420 nm in (b). (c) Zeitverlauf der Fluoreszenz von anle186b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen im Maximum bei 340 nm und in der rotverschobenen Flanke bei 420 nm in (d).

bei  $\sim 335$  nm, eine geringe rotverschobene Fluoreszenz zeigt sich bei  $\sim 420$  nm. Die Fluoreszenzlebensdauer von anle186b im Maximum bei  $\sim 335$  nm ist deutlich verkürzt und liegt im Pikosekundenbereich. Gleichzeitig steigt der Beitrag der rotverschobenen Flanke, während sich die Lebensdauer hier nicht ändert. Gleiches Verhalten kann für anle138b gefunden werden. Hier sind die Lebensdauern jedoch noch kürzer als für anle186b.

In Abbildung 5.9 sind exemplarisch die Streak-Bilder ((b) und (d)) und Zeitverläufe ((a) und (c)) von anle186b in Puffer und mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen ( $10 \mu\text{M}$  Proteinkonzentration) dargestellt. In Puffer zeigt anle186b ein Maximum bei  $\sim 420$  nm im roten Spektralbereich mit einer langen Lebensdauer. Durch Zugabe der Fibrillen geht der Beitrag dieser Fluoreszenz zurück und die Fluoreszenz im blauen Spektralbereich mit kürzerer Lebensdauer zeigt sich stark ausgeprägt (siehe Abbildung 5.9 (d)). Ähnliches kann für sery313b gefunden werden. Im Anhang in Abbildung A.14 sind die Streak-Bilder des Moleküls in Puffer und in Puffer mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen ( $10 \mu\text{M}$  Proteinkonzentration) dargestellt. Im Unterschied zur stationären Fluoreszenz, zeigt die zeitaufgelöste Messung in Puffer nur eine ausgeprägte rotverschobene Fluoreszenz mit langer Lebensdauer. Analog zu den Ergebnissen der stationären Fluoreszenz, führt die Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen zu einem Rückgang der rotverschobenen Fluoreszenz und zu einem ausgeprägten Maximum im blauen Spektralbereich mit kurzer Lebensdauer. Da anle138b keine messbare Fluoreszenz in Puffer zeigt und außerdem die Photoreaktion eine Messung mit der Streak-Kamera nicht erlaubt, wird hier auf die zeitaufgelöste Messung von anle138b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen verzichtet.

### 5.4.1. Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen

Die transienten Daten werden mit einem multiexponentiellen Modell global über alle Wellenlängen angepasst. Dabei werden, außer in Cyclohexan, mindestens zwei Lebensdauern pro Fit angenommen. Die Fluoreszenzlebensdauern und Amplituden sind in der Tabelle 5.4 für alle drei Derivate in den gemessenen Lösungsmitteln aufgelistet. Die Lösungsmittel sind entsprechend ihrer Polarität von unpolar nach polar sortiert.

In Cyclohexan kann für alle drei Derivate nur eine Lebensdauer gefunden werden. Diese liegt bei etwa 2 ns. Unabhängig vom Molekül ist die Fluoreszenz stark ausgeprägt, wie es auch in der stationären Fluoreszenz gezeigt wurde. Das Maximum bei 325-330 nm fluoresziert somit mit nur einer messbaren Lebensdauer im Nanosekundenbereich. In Ethanol und DMSO zeigen sich die Fluoreszenzlebensdauern der blauen Bande für anle186b und sery313b kaum verändert gegenüber Cyclohexan. Es tritt aber gleichzeitig eine zweite etwas längere Lebensdauer auf mit deutlich rotverschobener Amplitude. Der Beitrag dieser Fluoreszenz an der Gesamtamplitude ist mit  $\sim 10\%$  jedoch sehr klein.

Der Einfluss des Lösungsmittels ist auf die Fluoreszenz von anle138b deutlich ausgeprägter. Während die Lebensdauer in Ethanol mit 1.4 ns im blauen Spektralbereich noch relativ lang ist, zeigt sie sich in DMSO drastisch verkürzt auf 36 ps. Gleichzeitig tritt auch hier in beiden Lösungsmitteln eine zweite rote Bande auf mit Lebensdauern im Bereich von  $\sim 200$ -700 ps und schwacher Amplitude. In DMSO existiert für anle138b sogar eine dritte lange Zeitkonstante im roten Spektralbereich mit nur kleinem Beitrag von 1 % zur Gesamtamplitude. Ihr wird jedoch aufgrund der geringen Amplitude keine weitere Bedeutung beigemessen.

Während die Mischung Puffer und DMSO im Verhältnis 60 % zu 40 % auf die Fluoreszenz von sery313b im blauen Spektralbereich kaum Einfluss hat, nimmt die Lebensdauer für anle186b deutlich ab auf 66 ps. Der Rotanteil der Fluoreszenz von anle186b mit einer Lebensdauer von 5 ns, ist mit einem Anteil von 23 % viel stärker ausgeprägt als noch in reinem DMSO. Für sery313b wird die Fluoreszenzlebensdauer im roten Spektralbereich etwas länger. Das Amplitudenverhältnis bleibt jedoch gleich wie in DMSO. Anle138b hat im Lösungsmittelgemisch DMSO/Puffer im Maximum bei  $\sim 340$  nm eine noch kürzere Lebensdauer von 17 ps. Zeiten und Amplituden der roten Bande bleiben aber unverändert gegenüber reinem DMSO.

Die größte Änderung der Fluoreszenz tritt für alle drei Derivate in Puffer auf. Für anle138b verschwindet die Fluoreszenz komplett und konnte deshalb in Puffer nicht aufgenommen werden. Die Fluoreszenz von anle186b und sery313b ist in Puffer zwar stark unterdrückt, kann aber noch zeitaufgelöst gemessen werden. Während anle186b nur eine rote Fluoreszenz mit einer Lebensdauer von  $\sim 5$  ns zeigt, können für sery313b zwei Lebensdauern gefunden werden, die beide rotverschoben sind. Eine bei ca. 4 ns und die zweite bei fast 7 ns. Die beiden Zeiten sind aber im Fit nur sehr schwer voneinander zu trennen.

**Tabelle 5.4.:** Tabelle über die Lebensdauer der angeregten Zustände der drei wichtigsten Moleküle anle138b (Br), anle186b (F) und sery313b (OH) in den Lösungsmitteln Cyclohexan, Ethanol, DMSO, DMSO/Puffer (40:60), Puffer und  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen. In den Klammern ist jeweils der Anteil der Zeit an der Gesamtamplitude in Prozent angegeben. Die Lebensdauer von anle138b in Puffer und in  $\alpha$ -Synuclein kann aufgrund der geringen Fluoreszenz nicht aufgenommen werden.

<b>anle138b (Br)</b>		
$\tau$ (ns) $\sim \lambda_{max}$ (nm)	$\tau_1$ blau	$\tau_2$ rot
Cyclohexan	1.8 (100%)	-
Ethanol	1.4 (94%)	0.7 (6%)
DMSO	0.036 (93%)	0.18 (6%)
DMSO/Puffer	0.017 (92%)	0.2 (7%)
<b>anle186b (F)</b>		
$\tau$ (ns) $\sim \lambda_{max}$ (nm)	$\tau_1$ blau	$\tau_2$ rot
Cyclohexan	2.3 (100%)	-
Ethanol	2.2 (92%)	4.4 (8%)
DMSO	2.7 (91%)	7 (9%)
DMSO/Puffer	0.066 (77%)	5.3 (23%)
Puffer	-	5.2 (100%)
$\alpha$ -Syn. Fibrillen (10 $\mu$ M)	1.6 (79%)	5 (21%)
<b>sery313b (OH)</b>		
$\tau$ (ns) $\sim \lambda_{max}$ (nm)	$\tau_1$ blau	$\tau_2$ rot
Cyclohexan	2.2 (100%)	-
Ethanol	2.3 (93%)	4.8 (7%)
DMSO	2.3 (90%)	5 (10%)
DMSO/Puffer	1.9 (91%)	7.2 (9%)
Puffer	3.5 (83%)	6.6 (17%)
$\alpha$ -Syn. Fibrillen (10 $\mu$ M)	1 (70%)	3.7 (30%)

Durch die Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen in die Pufferlösung, ändern sich Spektrum und Lebensdauern von anle186b und sery313b. Für beide Moleküle kann ein großer Beitrag von 70-80 % im blauen Spektralbereich gefunden werden. Diese Bande hat eine Lebensdauer von 1.6 ns für anle186b und 1 ns für sery313b. Die rotverschobene Emission, die das Spektrum in Puffer dominiert hat, bleibt für beide Moleküle bestehen. Die Lebensdauer ändern sich hierbei nicht. Einzig der Beitrag der Amplitude sinkt auf knapp 20-30 %.

Aus den zeitaufgelösten Messungen geht hervor, dass sich die Emission der DPP-Derivate in allen verwendeten Lösungsmitteln, außer in Cyclohexan, aus zwei Fluoreszenzkomponenten zusammensetzt, die zwei verschiedenen Zuständen zugesprochen werden können. Im Rahmen der Zeitauflösung der Messung kann kein Aufbau der Fluoreszenz beobachtet werden. Beide Fluoreszenzen erscheinen instantan und bauen sich nicht mit der Zerfallsrate des jeweilig anderen Zustands auf. In unpolaren Lösungsmitteln kommt es zu einer Fluoreszenz im Bereich von 330 nm bei vergleichsweise kurzer Lebensdauer um die 2 ns. Polare und protonierende Lösungsmittel wie Wasser verursachen nicht nur eine Rotverschiebung dieser Komponente und eine Verkürzung der Lebensdauer, sondern auch das Auftreten der zweiten, im roten Spektralbereich bei 420 nm angesiedelten Komponente, mit längerer Zeitkonstante. Anle138b reiht sich in diese Beobachtungen ein, weist aber auch einige Unterschiede zu den anderen beiden Derivaten auf, gerade was die Lebensdauern betrifft. In unpolaren Lösungsmitteln sind diese insgesamt kürzer.

Die zeitaufgelöste Fluoreszenz in Puffer und in Puffer mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen wurde für anle138b nicht aufgenommen. Durch den Vergleich mit den Ergebnissen für anle186b aus stationärer und zeitaufgelöster Messung, kann aber auf anle138b rückgeschlossen werden. Da sich die stationäre Fluoreszenz und Struktur der Spektren der beiden Moleküle nicht wesentlich unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass auch eine zeitaufgelöste Messung ähnliche Resultate liefert. Die Lebensdauer der blauen und roten Komponente von anle138b in  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen wird jedoch kürzere Lebensdauern aufweisen (ähnlich denen im DMSO/Puffer-Gemisch) als anle186b. Auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei DPP-Derivate wird im nächsten Abschnitt eingegangen. Dabei werden die Ergebnisse in einem gemeinsamen Modell zusammengefasst, bei dem auch die Fluoreszenz in Proteinfibrillen mit einbezogen wird.

### 5.5. Modell zur Fluoreszenz der DPP-Derivate

Aus den zeitaufgelösten und stationären Messungen geht zunächst hervor, dass die Fluoreszenz (mit Maximum bei  $\sim 340$  nm) der DPP-Derivate und im speziellen anle138b von der Polarität des Lösungsmittels abhängig ist. In unpolaren Lösungsmitteln zeigen sie eine starke Fluoreszenz im blauen Spektralbereich. In polaren Lösungsmitteln ist die Fluoreszenz gequenched. Der Rückgang der Quantenausbeute mit der Polarität hängt dabei auch von der Halogensubstitution ab. Schwere Halogene wie Jod oder Brom führen bereits zu einem Rückgang der Fluoreszenz in Cyclohexan, Ethanol oder DMSO, während für leichte Halogene wie Chlor und Fluor die Quantenausbeute erst in sehr polarer Umgebung ab einer Dielektrizitätskonstante von  $\epsilon = 60$  abnimmt. Dies spiegelt sich auch in der Fluoreszenzlebensdauer wieder. Der Rückgang der Quantenausbeute führt gleichermaßen zu einem Rückgang der Fluoreszenzlebensdauer. Das Maximum bei  $\sim 340$  nm zeigt eine klare von der Polarität

abhängige Stokes-Verschiebung. Auch die Photoreaktion der Proben mit schweren Halogenen ist insgesamt von der Polarität der Umgebung abhängig.

Mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels bildet sich zusätzlich zur Emission bei  $\sim 340$  nm eine zweite rotverschobene Flanke aus (Maximum bei  $\sim 420$  nm). Bei genauerer Betrachtung ist diese jedoch nicht streng von der Polarität des Lösungsmittels abhängig. Sie ist beispielsweise im bereits polaren DMSO ( $\epsilon = 46.5$ ) relativ schwach ausgeprägt, dominiert aber das komplette Spektrum der Derivate in Wasser. Deshalb werden auch andere Ursachen, wie die Viskosität und die Protonierung/Deprotonierung des Moleküls durch das Lösungsmittel als möglicher Einfluss herangezogen.

Der Vergleich mit einem polaren, hoch viskosen Lösungsmittel wie Glycerol (80 % Glycerol 20 % Puffer,  $\epsilon = 50$ ), das Wasserstoffbrücken ausbilden kann, hat gezeigt, dass die Viskosität keinen Einfluss auf den spektralen Verlauf der Fluoreszenz hat. In einer DMSO/Puffer-Mischung ändert sich aufgrund des Mischungsverhältnisses von DMSO zu Puffer die Polarität. Zusätzlich ist DMSO ein deprotonierendes Lösungsmittel, während wasserbasierter Puffer Wasserstoffbrücken ausbildet. Damit wird eine DMSO/Puffer-Mischung mit zunehmendem Wassergehalt nicht nur polarer sondern auch protischer. Der Anstieg der Polarität aufgrund des höheren Wassergehalts führt zu einem Rückgang der Fluoreszenz bei 340 nm und gleichzeitig zu einem Anstieg der roten Flanke. Da aber das Lösungsmittel durch die Zugabe von Wasser gleichzeitig protischer wird, sind hier Polaritätseffekte und Effekte aufgrund von Wasserstoffbrückenbindung nicht zu trennen.

Eine klarere Aussage liefert eine Messung der Fluoreszenz der drei Derivate anle138b (Br), anle186b (F) und sery313b (OH) in zwei Säuren verschiedener Polarität. Unabhängig von der Polarität der Säuren, zeigen alle drei Derivate ein stark rotverschobenes Emissionsmaximum. In der unpolaren Essigsäure ist hierbei die Quantenausbeute relativ hoch bei etwa 30 % und ein zweites Maximum der blauen Emission bei  $\sim 340$  nm ist ebenfalls noch sichtbar. In der polaren Ameisensäure ist die Quantenausbeute deutlich niedriger mit 10 % und die blaue Komponente verschwindet fast komplett.

Eine Säure kann protonierend auf ein Molekül wirken. Im Falle der Diphenylpyrazole ist der Stickstoff am Pyrazol der Teil, der am wahrscheinlichsten protoniert werden kann [25]. Eine Protonierung eines Moleküls führt zu einer Verschiebung des Elektronensystems und damit zu einer Änderung der Absorption, wenn das Molekül bereits im Grundzustand protoniert ist, oder zu einer Änderung der Emission, wenn die Protonierung erst nach Anregung in einen höheren Zustand stattfindet. Die Protonierung des Pyrazols kann zu einer Verschiebung der Ladung hin zum Benzodioxolring führen. Das delokalisierte Elektronensystem des gesamten Moleküls wäre dann im angeregten Zustand ladungstrennt und würde damit zu einer typischen CT Konfiguration führen. Diese Art der Ladungstrennung kann nicht nur in Säuren stattfinden. In Wasser oder wasserbasiertem Puffer können sich Wasserstoffbrücken

bilden, die zu einer Verschiebung führen, allerdings schwächer als eine vollständige Protonierung. Auch eine Deprotonierung am Pyrazol durch DMSO wäre denkbar.

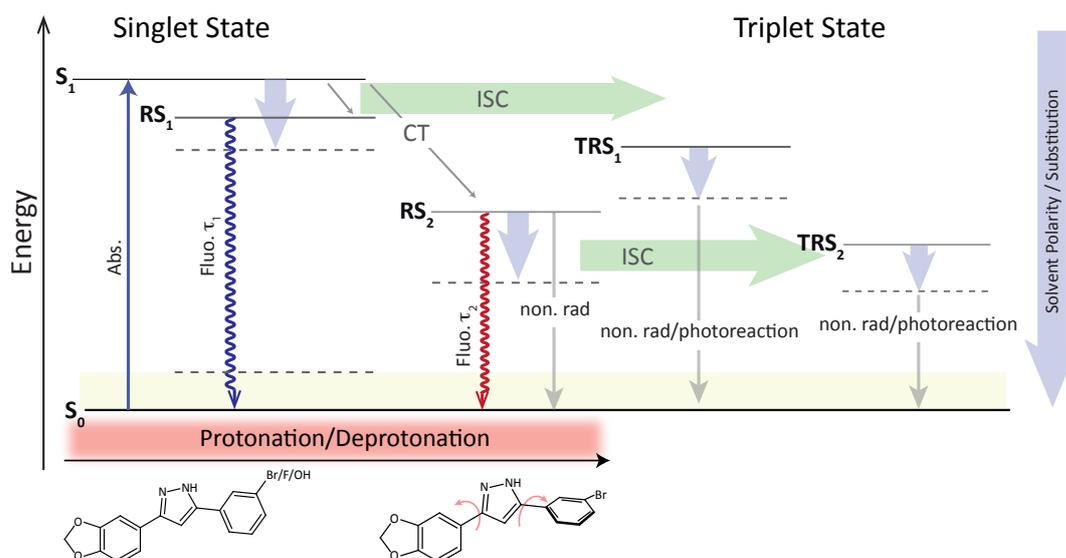
Die Ursache des rotverschobenen Zustands wäre damit eine Protonierung/Deprotonierung oder eine Wasserstoffbrückenbindung am Pyrazol. Diese führt zu einer Verschiebung und Trennung der Ladung zwischen Pyrazol und dem Benzodioxolring. Aufgrund der Ladungstrennung ist der Zustand sehr polar und kann in polaren Lösungsmitteln wie Wasser stabilisiert werden.

Die zeitaufgelösten Messungen haben gezeigt, dass es in allen Lösungsmitteln, außer Cyclohexan, zwei Zustände gibt mit zwei unterschiedlichen Zeiten, die spektral voneinander getrennt sind. Beide Zustände werden instantan gebildet und simultan besetzt. Es gibt in den zeitaufgelösten Messungen keinen Hinweis darauf, dass sich einer der Zustände verzögert bildet und dementsprechend aus dem anderen Zustand besetzt wird. Der kurzweilige Zustand wird der Fluoreszenz in unpolaren Umgebungen zugesprochen, der rotverschobene Zustand ist vermehrt in polaren Lösungsmitteln stabilisiert.

Damit ergibt sich ein erstes Bild des Reaktionsmodells, siehe Abbildung 5.10. Nach der Anregung in den Franck-Condon Bereich des ersten angeregten Zustands geht das Molekül in einen „Relaxed“-State  $RS_1$  über. Dieser Zustand wird bevorzugt in unpolaren Lösungsmitteln besetzt. Jedoch unterliegt er den normalen Lösungsmiteleinflüssen, die zu einer Absenkung des Energieniveaus führen und damit zu einer geringen Stokes-Verschiebung des Maximums bei 330-340 nm (in Abbildung 5.10 durch die großen blauen Pfeile angedeutet).

Gleichzeitig kann das Molekül aber auch den Zustand  $RS_2$  besetzen. Dieser wird durch eine Protonierung des Pyrazols und der sich daraus ergebenden Ladungstrennung (CT) hervorgerufen und in polaren Lösungsmitteln stabilisiert. Der zweite Zustand  $RS_2$  kann auch durch ein polares Lösungsmittel abgesenkt werden, was wiederum zu einer Rotverschiebung des zweiten Maximums, aber auch zu einer erhöhten internen Konversion führen kann. Da das Molekül durch die beiden Einfachbindungen zum Pyrazol sehr beweglich ist, wäre es auch möglich, dass der CT zwischen den Molekülteilen zu einer Verdrehung des Pyrazols gegen die beiden Benzolringe und damit zu einem TICT-Zustand führen kann, wie er für Thioflavin T oder ANS beobachtet wurde [14, 38].

Das Modell berücksichtigt noch nicht den starken Rückgang der Quantenausbeute aller Derivate in Wasser oder der Moleküle mit schweren Halogenen in DMSO oder sogar Cyclohexan (anle197b (I)). Dieser Rückgang beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem „Heavy Atom Effect“, bei dem die Substitution schwerer Halogene zu einem verstärkten Übergang in einen Triplettzustand führt. Aus einem Triplettzustand kann ein Halogen leicht abgespalten werden. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Prozess steigt auch hier mit der Schwere des Halogens [35], [89, Kapitel 38]. Da die Photoreaktion von anle197b (I) sogar in Cyclohexan stattfindet für andere Derivate aber nur in polaren Lösungsmitteln, gibt es sowohl für  $RS_1$  als auch für  $RS_2$  einen zugehörigen Triplett (siehe Abbildung 5.10). Das ist auch sehr wahrscheinlich, da in



**Abbildung 5.10.:** Modell zur Fluoreszenz der DPP-Derivate in den verschiedenen Lösungsmitteln.

der Literatur vielfach ein sehr niederenergetischer Triplettzustand als zugehörig zu einem CT diskutiert wird [102]. Daraus folgend ist es auch möglich, dass der Triplett aus dem  $RS_2$  effektiver besetzt wird.

In dieses Bild soll nun im Folgenden die Fluoreszenz der DPP-Derivate in der Fibrille integriert werden.

### 5.5.1. Modell zur Bindungsstelle von anle138b in der Fibrille

Bei der Betrachtung der Fluoreszenz von anle138b und den anderen DPP-Derivaten mit  $\alpha$ -Synuclein oder hTau46 Fibrillen, ist zunächst die starke Veränderung gegenüber Puffer augenfällig. Die Fluoreszenz zeigt die kurzwellige Bande wie in unpolaren Lösungsmitteln und die Quantenausbeute steigt gleichermaßen für alle drei Derivate an. Aus einer Analyse der Stokes-Verschiebung liegt die Fluoreszenz in  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen für anle186b und sery313b spektral zwischen der in DMSO und Ethanol und für anle138b zwischen Cyclohexan und Ethanol. Die Quantenausbeute (etwa 30 % im Vergleich zu fast 50 % in Ethanol) und Fluoreszenzlebensdauer von anle186b und sery313b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen unterscheidet sich jedoch deutlich von den Werten in DMSO oder Ethanol. Hier liegt die Lebensdauer der kurzwelligen Emission bei etwa 2 ns, während sie in den Fibrillen nur 1 ns beträgt. Der blaue Anteil der Fluoreszenz der drei Derivate in Fibrillen stammt, wie in den unpolare bis mittelpolaren Lösungsmitteln aus dem angeregten Zustand  $RS_1$ . Die Position des Maximums lässt auf Regionen in der Fibrille mit mittlerer Polarität wie die in Ethanol schließen.

Aufgrund der Fluoreszenzquantenausbeute und der Fluoreszenzlebensdauer, ist jedoch eine etwas polarere Umgebung wahrscheinlich.

Die rotverschobene Fluoreszenz aus dem  $RS_2$  ist auch in Fibrillen nicht komplett verschwunden. Zwar wird die rotverschobene Emission schwächer mit steigender Proteinkonzentration (siehe Anhang), verschwindet aber nicht vollständig. Demzufolge sind einige Moleküle entweder an Stellen gebunden, die teilweise dem Lösungsmittel ausgesetzt sind oder die Bindungsstellen führen zu einer Deformation des Elektronensystems bzw. bilden Wasserstoffbrücken zu den Molekülen aus. Solche Bindungsstellen können bevorzugt an der Oberfläche der Proteinfibrillen liegen. Diese Bindungsstellen sind unter Umständen nur schwach polar und tragen aus diesem Grund auch zu einer Fluoreszenz im blauen Spektralbereich bei, aber mit deutlich kürzerer Lebensdauer und kleinerer Quantenausbeute.

Die Fluoreszenz der DPP-Derivate in den Fibrillen könnte folglich auch von zwei unterschiedlichen Bindungsstellen stammen. Eine Bindungsstelle ist in einer unpolaren Umgebung der Fibrille lokalisiert und dem Lösungsmittel abgewandt, die andere befindet sich an der Oberfläche, dem Lösungsmittel exponiert. Diese Form der Bindung könnte die Fluoreszenz aus den Zuständen  $RS_1$  und  $RS_2$  erklären.

Die gleichzeitige Bindung kleiner Fluoreszenzmarker in verschiedenen Umgebungen wurde bereits in der Literatur untersucht. Die nichtkovalente Bindung von ANS-Derivaten an der Oberfläche der Fibrille wurde z.B. von Celej et al. [22] beschrieben. Die Probe befindet sich in einer hydrophoben Umgebung. Aus einem biexponentiellen Zerfall der Fluoreszenz mit einer kurzen und einer langen Zeitkonstante, konnten zwei Bindungsstellen in der Fibrille festgestellt werden. Eine vom Lösungsmittel abgegrenzte Bindungsstelle, die aus dem zentralen Kern der Fibrille aus definierten  $\beta$ -Faltblattstrukturen gebildet wird. Diese wird der langen Fluoreszenzlebensdauer zugesprochen. Sowie eine dem Lösungsmittel ausgesetzte Bindungsstelle, die durch die kurze Lebensdauer charakterisiert ist. Auch für Thioflavin T konnten zwei Lebensdauern gefunden werden, die für zwei Mikroumgebungen in der Fibrille sprechen [22].

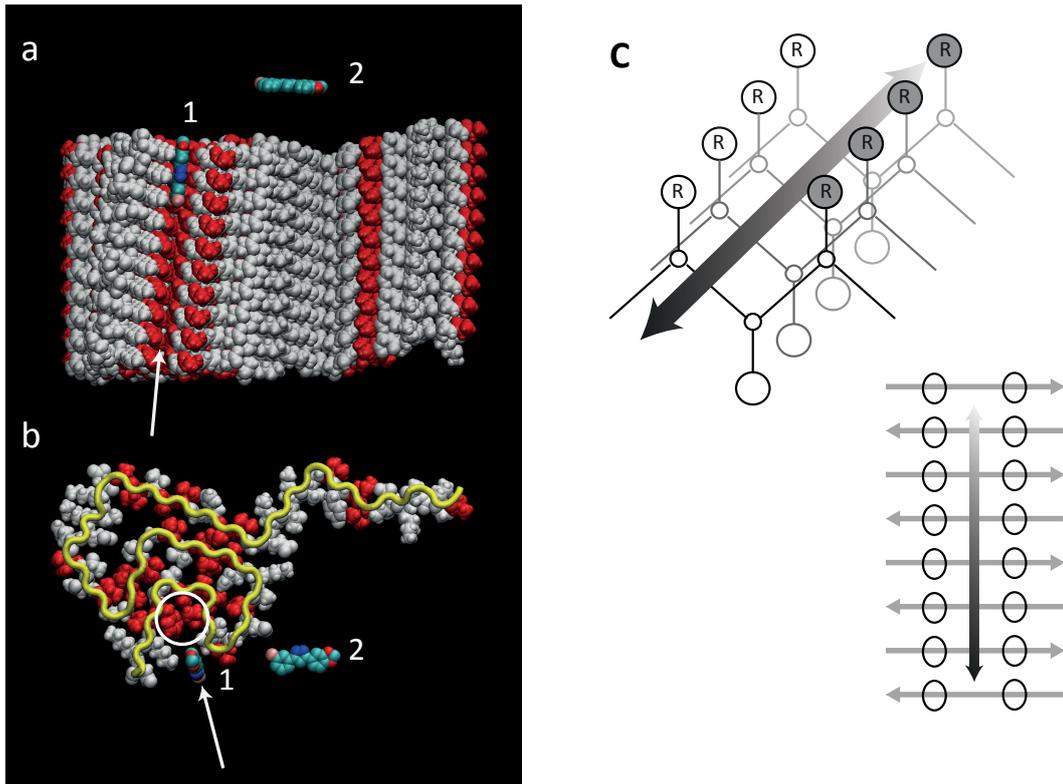
Aus der Kompetitionsmessung zwischen anle138b und ThT (siehe Abschnitt 4.4) wurde eine mögliche Bindungsstelle von anle138b an der Oberfläche längs der Fibrillenachse in einer vom Lösungsmittel abgeschirmten „Cavity“ vorgeschlagen. Diese Bindungsstelle könnte eine ähnliche Polarität wie Ethanol besitzen und z.B. durch Wasserstoffbrückenbindung das Elektronensystem der Moleküle verändern. Dies würde die kombinierte Fluoreszenz aus dem  $RS_1$  und dem  $RS_2$  erklären. Oder sie ist extrem unpolar und überlagert mit der Fluoreszenz aus einer Bindungsstelle, die dem Lösungsmittel vollständig ausgesetzt ist.

In Abbildung 5.11 wird eine mögliche Bindungsstelle im „Greek-Key“ Modell zur Fibrillenbildung von  $\alpha$ -Synuclein von Tuttle et al. vorgeschlagen [121]. Die Bilder wurden mit den Koordinaten 2n0a.pdb und der Software VMD erstellt [59]. Die in (a) mit einem Pfeil markierte Bindungsstelle könnte einen hydrophoben Kanal (rot) für ThT und anle138b bilden, wie er in (c) schematisch dargestellt ist. Ein ähnlicher

Kanal wurde auch in der Literatur als Bindungsstelle für ThT vorgeschlagen [7]. Der in (b) mit einem Kreis markierte Teil ist die Draufsicht auf die Bindungsstelle. Hier zeigt sich, dass die vorgeschlagene Stelle weitgehend vom Lösungsmittel abgeschirmt ist und von hydrophoben Residuen (rot) gebildet wird. Diese Bindungsstelle könnte die charakteristische Fluoreszenz von anle138b in der Fibrille bedingen.

Über den Wirkmechanismus lässt sich abschließend dennoch nur spekulieren. Zum einen ist es unklar wo überall anle138b binden kann, ohne dass es zu einer Änderung der Fluoreszenz kommt. Zum anderen ist aus dem Tiermodell bekannt, dass anle138b mit Oligomeren interagiert. Dies konnte fluoreszenzspektroskopisch nicht verifiziert werden [30]. Zusätzlich ist es nicht klar, ob  $\alpha$ -Synuclein Oligomere schon eine Greek-Key Struktur besitzen, wie sie in [121] vorgeschlagen wurde.

Eins lässt sich jedoch aus den Fluoreszenzmessungen ableiten: anle138b ist ein schlecht wasserlösliches, hydrophobes Molekül, das sich bevorzugt in unpolaren Regionen aufhält. Eine Möglichkeit wäre somit die Bindung des „Wirkstoffs“ an der hydrophoben Oberfläche der Oligomere, oder vereinzelt mit dem Pyrazol and hydrophile Bereiche durch Wasserstoffbrückenbindung. Eine starke Änderung der intrinsischen Fluoreszenz ist dabei nicht sichtbar, da das Molekül hier fast vollständig der Lösungsumgebung ausgesetzt ist. Eine Besetzung der Oberflächen durch anle138b könnte jedoch die Bindung der Oligomere an die Zellwand verhindern. Dadurch könnte die Porenbildung durch pathogene Strukturen reduziert und so deren Toxizität verringert werden. Dies bleibt aber bis hier hin Spekulation und bedarf weiterer Untersuchungen, um den Wirkmechanismus abschließend klären zu können.



**Abbildung 5.11.:** Modell zur Bindung von anle138b in der  $\alpha$ -Synuclein Fibrille. (a) und (b) wurden mit den Koordinaten 2n0a.pdb und der Software VMD erstellt [59]. Hydrophobe Seitenketten sind in Rot dargestellt. Anle138b ist in verschiedenen Orientierungen gezeigt (1 und 2). (a) Bindungsstelle an der Oberfläche der Fibrille, markiert mit weißem Pfeil. (b) Bindungsstelle innerhalb der „Greek-Key“-Struktur, markiert mit weißem Kreis. (c) Kanal an der Oberfläche der Fibrille und mögliche Bindungsstelle von ThT nach [7]. Der Kanal erstreckt sich parallel zur Fibrillenachse und könnte z.B. an der Position in (a) liegen.

# KAPITEL 6

---

## Zusammenfassung

---

Die abnorme Aggregation und Akkumulation von bestimmten Proteinen ist Teil des Krankheitsverlaufs von Morbus Parkinson, den Tauopathien oder der Prionenerkrankungen. Sie wird als mögliche Ursache für die Neurodegeneration, die diese Krankheiten bestimmt, gehandelt. Speziell sogenannte Oligomere werden als toxische Aggregatform eingestuft. Auf Basis dieser Annahme wurde in einem Screening mehrerer tausend Moleküle nach einem Wirkstoff gesucht, der die Aggregation hemmt und damit das Fortschreiten der Krankheiten stoppen kann. Hier ging eine Substanz der Diphenylpyrazol-Klasse (DPP), anle138b, hervor, die sich vor allem in Mausmodellen als am wirkungsvollsten zeigte. Aus histologischen Untersuchungen von Gehirnschnitten erkrankter Mäuse (Parkinson, Tauopathien und mit Prionen infizierte Mäuse) konnte gezeigt werden, dass anle138b die Aggregation der Oligomere hin zu kleineren Aggregatstrukturen modifiziert, die nicht mehr toxisch wirken. Auf Basis dessen wurde eine direkte Interaktion von anle138b mit den Aggregaten als möglicher Wirkmechanismus vermutet. Hier sollte die Fluoreszenzspektroskopie Aufschluss geben, was in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Ist die intrinsische Fluoreszenz eines Moleküls umgebungsabhängig, kann aus der Analyse der Fluoreszenz eine Wechselwirkung mit der Umgebung abgeleitet werden. Eine solche charakteristische Fluoreszenz kann an anle138b (Br) und den Derivaten anle186b (F) und sery313b (OH) beobachtet werden. Bei einer Anregung mit Licht bei 300 nm zeigen die DPP-Derivate in wasserbasiertem Puffer oder unter Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein/hTau46 Monomeren nur geringe oder keine Fluoreszenz. Mit Proteinfibrillen ( $\alpha$ -Synuclein oder hTau46) hingegen steigt die Fluoreszenz stark an. Aus diesem Verhalten wurde auf eine direkte molekulare Wechselwirkung der DPPs mit den Proteinfibrillen geschlossen. Aufgrund der fehlenden Änderung der Fluoreszenz in Verbindung mit nativem monomeren Protein, wurde hier eine selektive Interaktion ausgeschlossen. Weiterhin konnte mithilfe von Anisotropiemessungen die (nicht kovalente) Bindung der Moleküle an die Aggregate bewiesen werden.

Die charakteristische Fluoreszenzänderung erlaubt es, die Bindungsstöchiometrie von anle138b an die Fibrillen der Proteine  $\alpha$ -Synuclein und hTau46 zu bestimmen.

Da der Anstieg der Fluoreszenz von anle138b direkt mit der Bindung an die Fibrillen korreliert ist, kann aus der Änderung der Fluoreszenz die Dissoziationskonstante  $K_d$  sowie die Anzahl der Monomere im Aggregat (B), die eine Bindungsstelle für anle138b bilden, bestimmt werden. Die Messung ergibt eine starke Affinität des Moleküls für die Fibrillen mit einer Dissoziationskonstante von 160 nM für  $\alpha$ -Synuclein und 303 nM für hTau46 Fibrillen. Etwa 6 Monomere in der Fibrille bilden dabei eine Bindungsstelle für ein anle138b-Molekül.

Die Fluoreszenz von anle138b und Derivaten in der Fibrille entspricht aufgrund von Quantenausbeutemessungen und spektralem Verlauf der Fluoreszenz in unpolaren ( $\epsilon = 2$ ) bis mittelpolaren ( $\epsilon = 25$ ) Lösungsmitteln wie Cyclohexan oder Ethanol. Auch eine rigide aber mittelpolare Umgebung ( $\epsilon < 50$ ) ist denkbar. In beiden Fällen muss die Bindungsstelle jedoch abgeschirmt von umgebenden Wassermolekülen liegen. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindungsstelle zwar rigide ist, die Änderung der Fluoreszenz aber durch die Polarität und die veränderte Struktur (Abschirmung von den Wassermolekülen) entsteht.

Diese Art der Fluoreszenzänderung unter Zugabe von Proteinfibrillen ist in der Literatur bereits von Thioflavin T bekannt und sehr genau untersucht [7, 75]. Aus Simulationen und Vergleichen mit dem fluoreszenzspektroskopischen Verhalten konnten in der Literatur einige mögliche Bindungsstellen für ThT in unterschiedlichen Modellstrukturen abgeleitet werden [92]. ThT bindet bevorzugt in hydrophoben Regionen, die von Aromaten auf der Oberfläche der Fibrille gebildet werden. Diese Bindungsstellen liegen in kanalartigen Strukturen entlang der Fibrillenachse, die das Molekül von der Lösungsumgebung abschirmen. Diese Struktur in der Fibrille passt sehr gut auf die Beschreibung einer möglichen Bindungsstelle für anle138b, die sich aus den fluoreszenzspektroskopischen Daten ergibt. Da die Bindungsstelle von ThT in der Fibrille bereits genauer eingegrenzt wurde, ist es möglich aus einer Kompetitionsmessung von anle138b und ThT zur Bindung an  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen auf die Bindungsstelle für anle138b rückzuschließen. Die direkte kompetitive Vergleichsmessung ergab einen FRET von anle138b auf ThT und eine geringe Verdrängung von ThT durch anle138b. Daraus kann geschlossen werden, dass die Moleküle auf der Fibrille nah zueinander lokalisiert sein müssen. Darüber hinaus kann der Abstand zwischen den beiden Molekülen bestimmt werden. Dieser liegt bei ca. 60 Å, je nachdem, wie die Moleküle zueinander orientiert sind. Der Abstand zwischen den beiden Molekülen aus der FRET-Messung bezieht somit die Möglichkeit mit ein, dass die Moleküle hintereinander entlang der Fibrillenachse in einer hydrophoben „Cavity“ liegen. Unter Hinzunahme der Bindungsstoichiometrie für die beiden Moleküle (maximal 5 Monomere bilden eine Bindungsstelle für ThT und mindestens 6 eine für anle138b) ergibt sich bereits ein Abstand zwischen den beiden Molekülen von 55 Å auf der Fibrille. Der so errechnete Wert liegt nahe dem gemessenen Wert aus dem FRET mit  $\sim 60$  Å. Anle138b zeigt folglich eine Affinität für die gleiche Bindungsstelle wie ThT.

---

Um die Bindungsstelle noch genauer einzugrenzen wurde die Fluoreszenz von anle138b in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht und mit der Fluoreszenz unter Zugabe von Peptidfibrillen verglichen. Die signifikante spektrale Änderung der Fluoreszenz von anle138b (Br), anle186b (F) und sery313b (OH) in Puffer mit Peptidfibrillen gegenüber der Fluoreszenz in Puffer basiert auf einer sehr starken Lösungsmittelabhängigkeit der Fluoreszenz. Während alle drei Moleküle in Cyclohexan eine ausgeprägte Fluoreszenz bei etwa 330 nm mit einer Quantenausbeute von 50-60 % zeigen, ist die Fluoreszenz in wasserbasiertem Puffer stark gequenchet und rotverschoben. Für sery313b und anle186b kann eine duale Fluoreszenz beobachtet werden. In protonierenden Lösungsmitteln (Säuren) verschiedener Polarität zeigt sich eine duale Fluoreszenz bei mittlerer (10-30 %) Quantenausbeute. Diese charakteristische Fluoreszenz der DPP-Derivate wird in einem ladungsgetrennten Zustand begründet. Hier führt die Protonierung oder Wasserstoffbrückenbindung am Pyrazol zu einer Ladungsverschiebung in Richtung Benzodioxol. Dies eröffnet einen zweiten Kanal mit rotverschobener Fluoreszenz.

Zusätzlich kann ein starker Rückgang der Fluoreszenzquantenausbeute für Diphenylpyrazole beobachtet werden, die an der *meta*-Position einer der Phenylringe mit einem schweren Halogen wie Chlor (sery335b), Brom (anle138b) oder Jod (anle197b) substituiert sind. Dieses Quenchen der Fluoreszenz wird durch die Besetzung eines Triplettzustandes aus dem ersten angeregten Zustand, sowie aus dem ladungsgetrennten Zustand erklärt. Die Absenkung des Triplettts gegenüber dem Singulettzustand wird durch die Substitution schwerer Atome hervorgerufen und durch die Polarität der Umgebung noch weiter verstärkt.

In dieses Modell kann die Fluoreszenz in Fibrillen integriert werden. Demnach fluoreszieren die Moleküle unter Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein oder hTau46 Fibrillen bevorzugt kurzweilig wie in Ethanol mit einer schwachen roten Flanke aus dem ladungsgetrennten Zustand. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten der Fluoreszenz in den Fibrillen. Die Fluoreszenz stammt entweder von einer Bindungsstelle, die eine Umgebung ähnlich der in Ethanol bietet. Oder die Moleküle fluoreszieren aus zwei verschiedenen Bindungsstellen: eine der beiden Bindungsstellen ist stark hydrophob, beispielsweise wie Cyclohexan, und der wässrigen Umgebung abgewandt. Die andere Bindungsstelle ist hydrophil oder befindet sich an der Oberfläche der Fibrillen. Hier sind die Moleküle dem Lösungsmittel ausgesetzt. Aus den Messungen mit ThT geht hervor, dass anle138b sich bevorzugt in „Cavities“, die aus hydrophoben Residuen gebildet werden, anlagert und hier von umgebenden Wassermolekülen abgegrenzt ist. Die Struktur könnte eine ähnliche Dielektrizität aufweisen wie Ethanol, es könnte sich aber auch die Emission aus dieser Position mit der Emission aus anderen Bindungsstellen überlagern.

Eine kürzlich veröffentlichte Struktur der  $\alpha$ -Synuclein Fibrille schlägt eine „Greek Key“-Struktur der Monomere im Fibrillenkomplex vor [121]. In diesem Modell kann eine Bindungsstelle eingegrenzt werden, die obige Kriterien erfüllt: die Bindungsstelle ist von außen zugänglich, jedoch von Wassermolekülen abgeschirmt. Sie wird

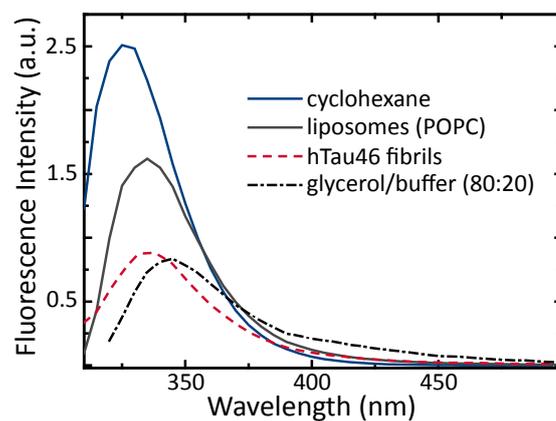
aus hydrophoben Aminosäuren gebildet und bietet keine Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung. Ein anle138b-Molekül kann in diese Bindungsstelle eingefasst werden, wenn es sich entlang der Fibrillenachse, d.h. rechtwinklig zu den Monomeren, einlagert. Damit benötigt man mindestens drei Monomere für eine Bindungsstelle für anle138b, was gut zu den gemessenen Werten passt.

Ein möglicher Wirkmechanismus kann aus diesen Daten nur postuliert werden. Demnach könnte sich anle138b an die Oberfläche von  $\alpha$ -Synuclein Oligomeren per Wasserstoffbrückenbindung über das Pyrazol oder in hydrophoben Regionen anlagern. Die Bindung von anle138b könnte eine Interaktion der Oligomere an Membranoberflächen unterbinden und somit eine mögliche Porenbildung verhindern, was die Toxizität der Oligomere reduziert. Dies bleibt aber an dieser Stelle reine Spekulation und bedarf weiterer Untersuchungen, um den Wirkmechanismus abschließend klären zu können.

# ANHANG A

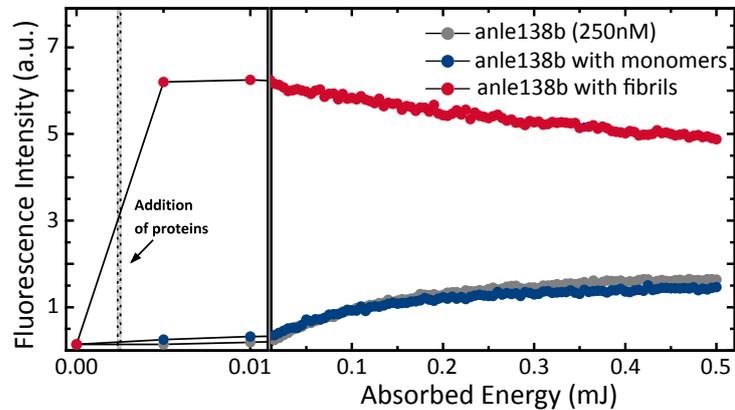
## Bilder zu den Kapiteln 4 und 5

Zu Abschnitt 4.2.2: Umgebung von anle138b in der hTau46 Fibrille



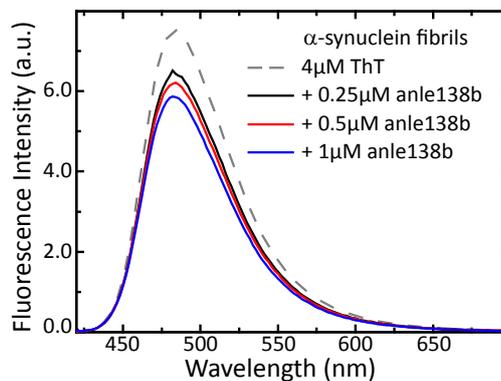
**Abbildung A.1.:** Fluoreszenz von anle138b mit hTau46 Fibrillen (rot gestrichelt), inkubiert in POPC-Liposomen (dunkelgrau), in Glycerol/Puffer (80:20) (schwarz, strichpunktiert) und in Cyclohexan (blau).

## Zu Abschnitt 4.2.2: Photoreaktion von anle138b in der hTau46 Fibrille



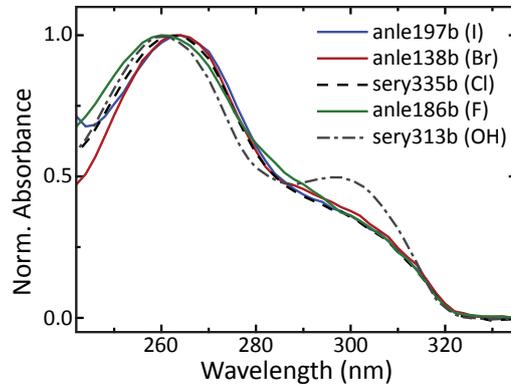
**Abbildung A.2.:** Belichtung von anle138b in Puffer (grau), mit Monomeren (blau) und mit Fibrillen (rot). Die linke Seite des Bildes zeigt den Anstieg der Fluoreszenz von anle138b durch die Zugabe von Fibrillen. Dieser Anstieg ist bei Zugabe von Monomeren nicht zu sehen.

## Zu Abschnitt 4.4: Fluoreszenz von ThT bei einer Anregung mit 412 nm

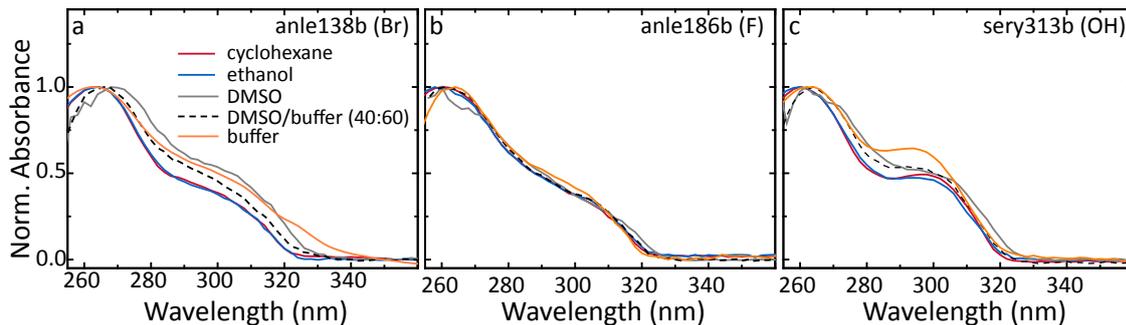


**Abbildung A.3.:** Fluoreszenz von ThT in 4 µM  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen bei einer Anregung mit 412 nm (grau gestrichelt). Durch die Zugabe geringer Mengen anle138b geht die Fluoreszenz von ThT zurück (schwarz, rot und blau).

Zu Abschnitt 5.3: Absorption der Derivate in Lösungsmitteln  
verschiedener Polarität

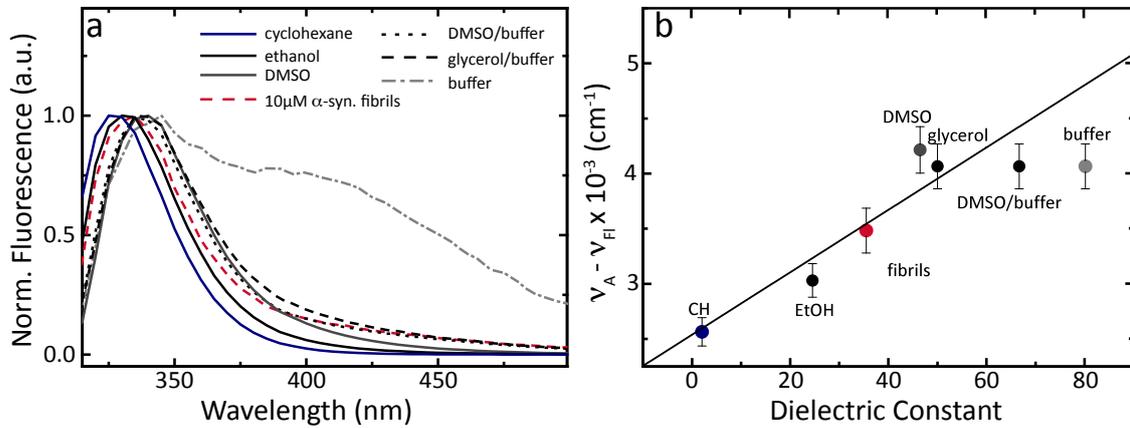


**Abbildung A.4.:** Absorption der Derivate anle197b (I, blau), anle138b (Br, rot), sery335b (Cl, schwarz gestrichelt), anle186b (F, grün) und sery313b (OH, grau strichpunktiert) in Cyclohexan.

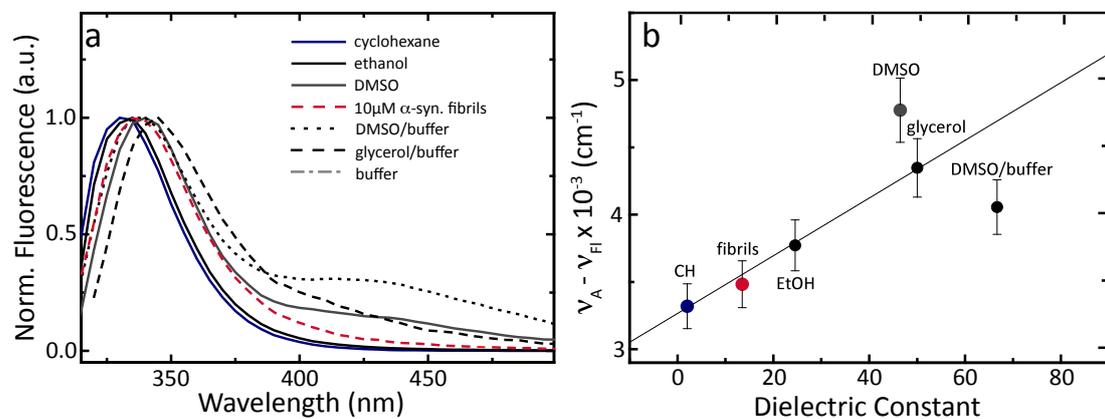


**Abbildung A.5.:** Absorption der Derivate (a) anle138b (Br), (b) anle186b (F) und (c) sery313b (OH) in Cyclohexan (rot), Ethanol (blau), DMSO (grau), DMSO/Puffer (40:60) (schwarz gestrichelt) und Puffer (orange).

Zu Abschnitt 5.3: Fluoreszenz der Derivate anle138b und sery313b in Lösungsmitteln verschiedener Polarität

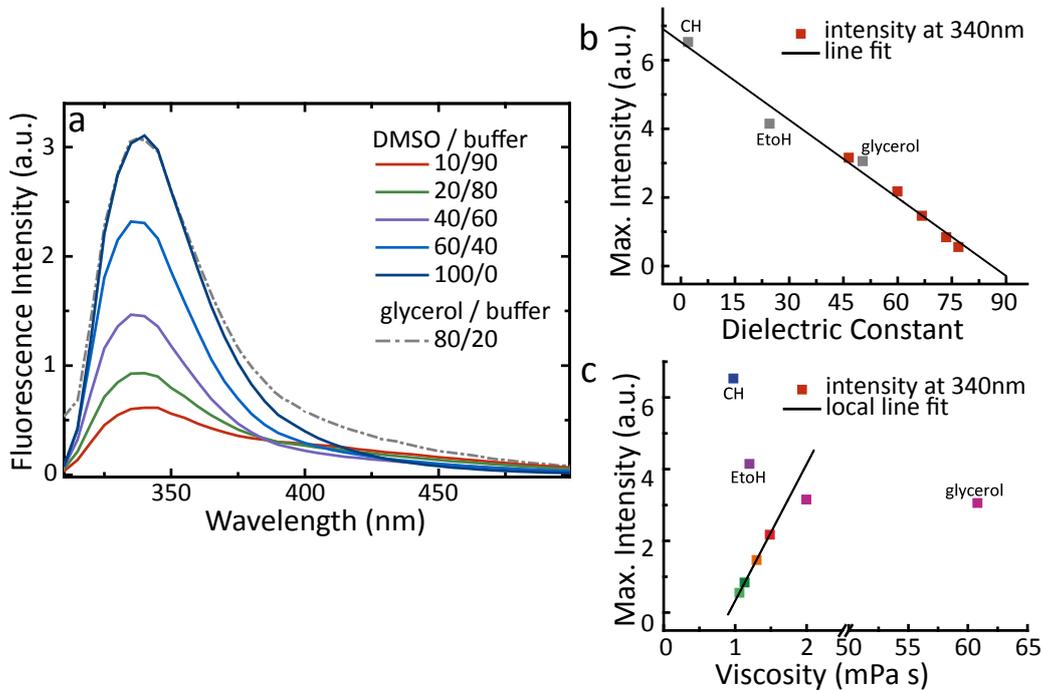


**Abbildung A.6.:** (a) Normierte Fluoreszenz von sery313b in verschiedenen Lösungsmitteln: Cyclohexan (blau), Ethanol (schwarz),  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot gestrichelt), DMSO (grau), DMSO/Puffer (40:60) (schwarz gepunktet), Glycerol/Puffer (80:20) (schwarz gestrichelt) und Puffer (grau, strichpunktiert). (b) Stokes-Verschiebung des Emissionsmaximums aufgetragen für die einzelnen Lösungsmittel in Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante.

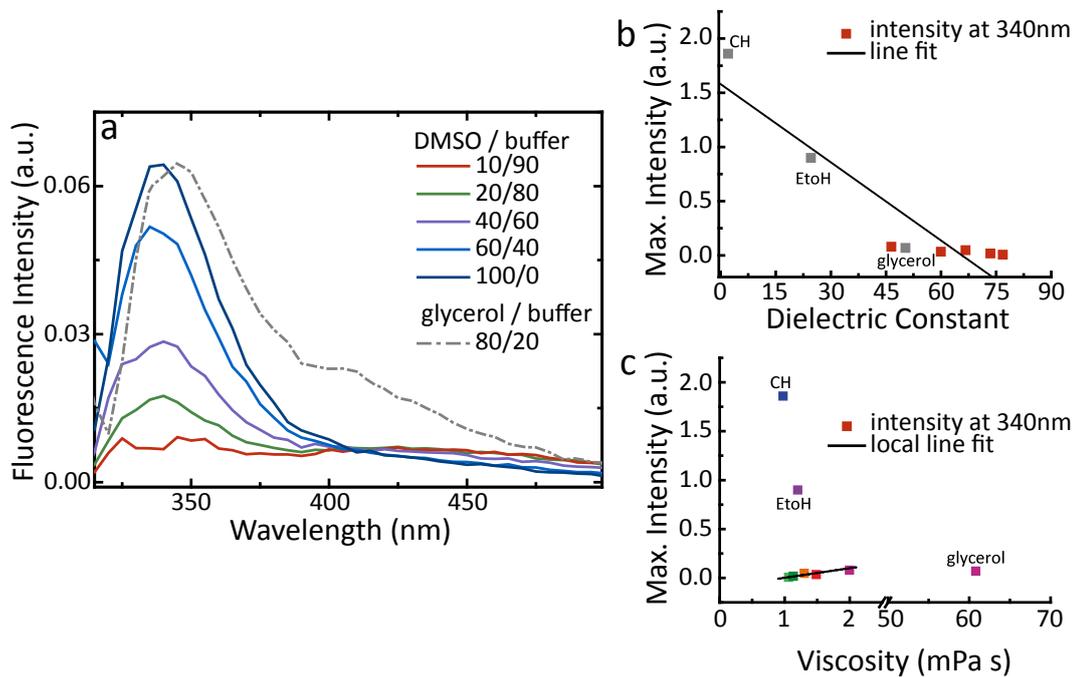


**Abbildung A.7.:** (a) Normierte Fluoreszenz von anle138b in verschiedenen Lösungsmitteln: Cyclohexan (blau), Ethanol (schwarz),  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (rot gestrichelt), DMSO (grau), DMSO/Puffer (40:60) (schwarz gepunktet), Glycerol/Puffer (80:20) (schwarz gestrichelt) und Puffer (grau, strichpunktiert). (b) Stokes-Verschiebung des Emissionsmaximums aufgetragen für die einzelnen Lösungsmittel in Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante.

Zu Abschnitt 5.3.2: Die Derivate sery313b und anle138b in Lösungsmittelmischungen

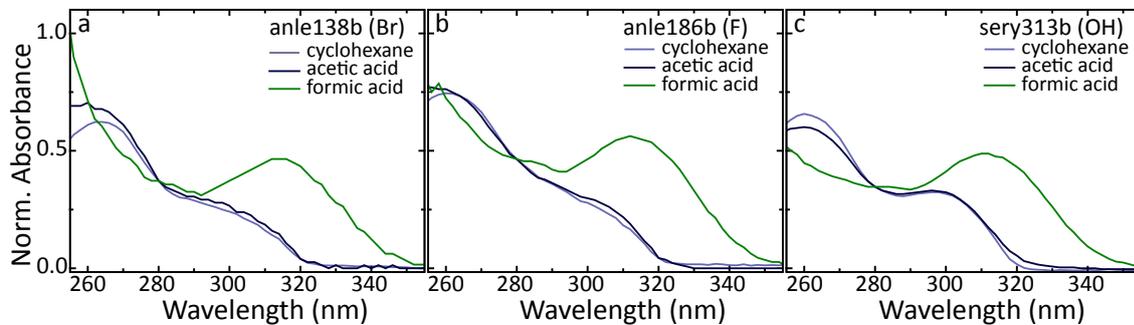


**Abbildung A.8.:** (a) Fluoreszenz von sery313b in einer DMSO/Puffer-Mischung (rot-dunkelblau) und in Glycerol/Puffer (80:20), (grau, strichpunktiert). (b) Fluoreszenz im Maximum aus (a) aufgetragen über die Dielektrizitätskonstante des DMSO/Puffer-Gemischs. Die Maxima für Cyclohexan, Ethanol und Glycerol/Puffer (80:20) sind ebenfalls gezeigt (grau). (c) Fluoreszenz im Maximum aus (a) aufgetragen über die Viskosität des DMSO/Puffer-Gemischs. Die Maxima für Cyclohexan, Ethanol und Glycerol/Puffer (80:20) sind ebenfalls gezeigt. Die Farbgebung der Punkte zeigt die Polarität der Lösungsmittel an von unpolar (blau), mittelpolar (lila-rot) nach polar (orange-grün).

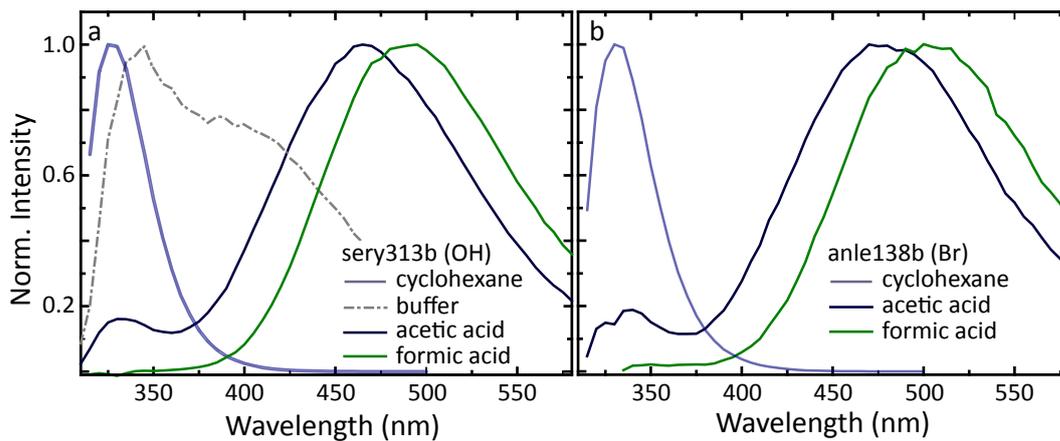


**Abbildung A.9.:** (a) Fluoreszenz von anle138b in einer DMSO/Puffer-Mischung (rot-dunkelblau) und in Glycerol/Puffer (80:20), (grau, strichpunktiert). (b) Fluoreszenz im Maximum aus (a) aufgetragen über die Dielektrizitätskonstante des DMSO/Puffer-Gemischs. Die Maxima für Cyclohexan, Ethanol und Glycerol/Puffer (80:20) sind ebenfalls gezeigt (grau). (c) Fluoreszenz im Maximum aus (a) aufgetragen über die Viskosität des DMSO/Puffer-Gemischs. Die Maxima für Cyclohexan, Ethanol und Glycerol/Puffer (80:20) sind ebenfalls gezeigt. Die Farbgebung der Punkte zeigt die Polarität der Lösungsmittel an von unpolar (blau), mittelpolar (lila-rot) nach polar (orange-grün).

Zu Abschnitt 5.3.3: Absorption und Fluoreszenz der Derivate anle138b, anle186b und sery313b in Essigsäure und Ameisensäure

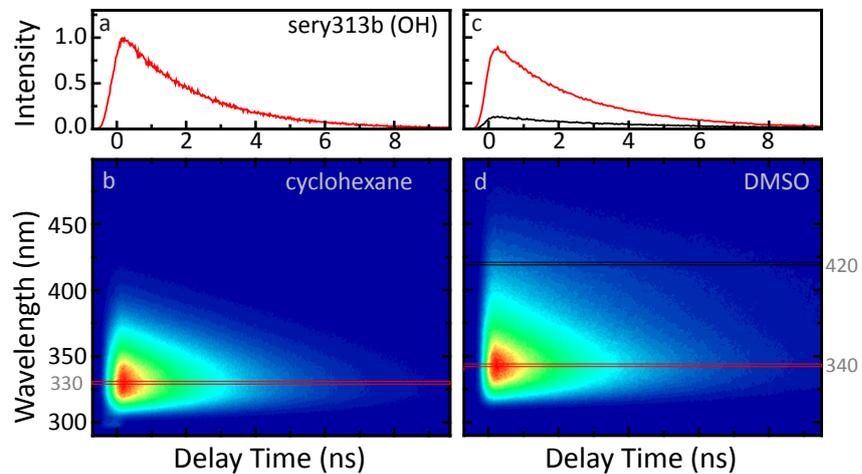


**Abbildung A.10.:** Absorption der drei Derivate anle138b (a), anle186b (b) und sery313b (OH) in Essigsäure (dunkelblau) und Ameisensäure (grün). Zum Vergleich ist noch einmal die Absorption in Cyclohexan gezeigt (blassblau).

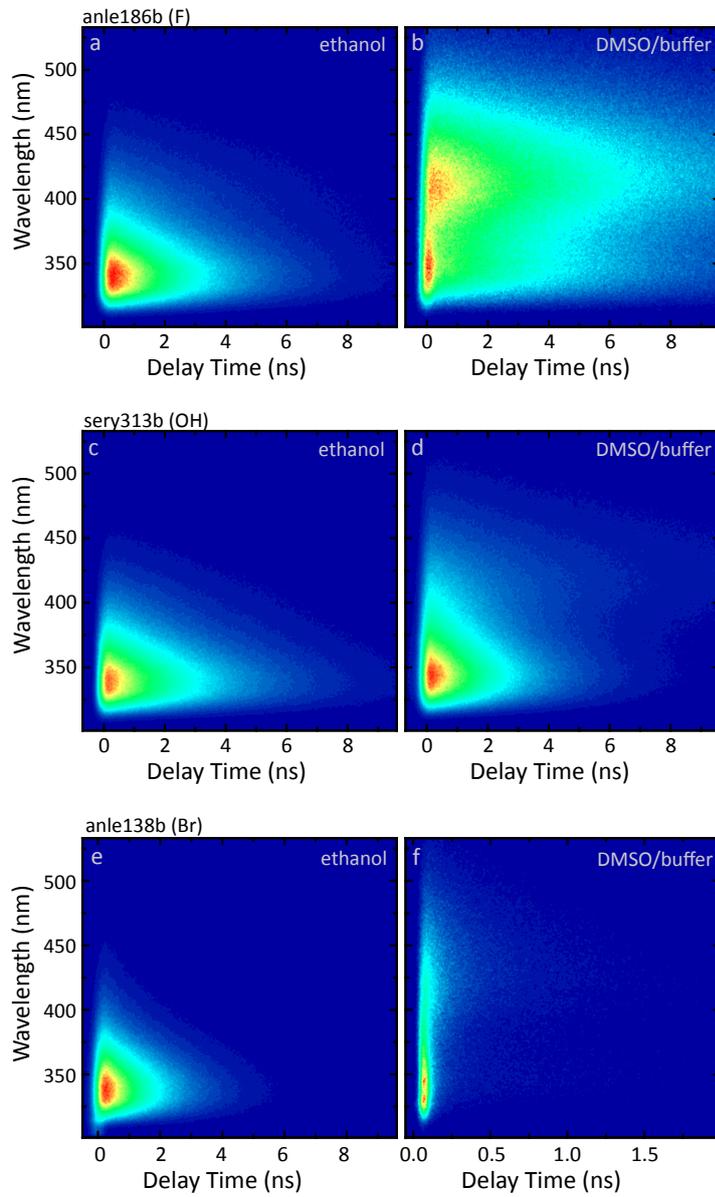


**Abbildung A.11.:** Fluoreszenz von sery313b (a) und anle138b (b) in Essigsäure (dunkelblau) und Ameisensäure (grün). Zum Vergleich ist noch einmal die Fluoreszenz in Cyclohexan (blassblau) und in Puffer (grau, strichpunktiert) dargestellt.

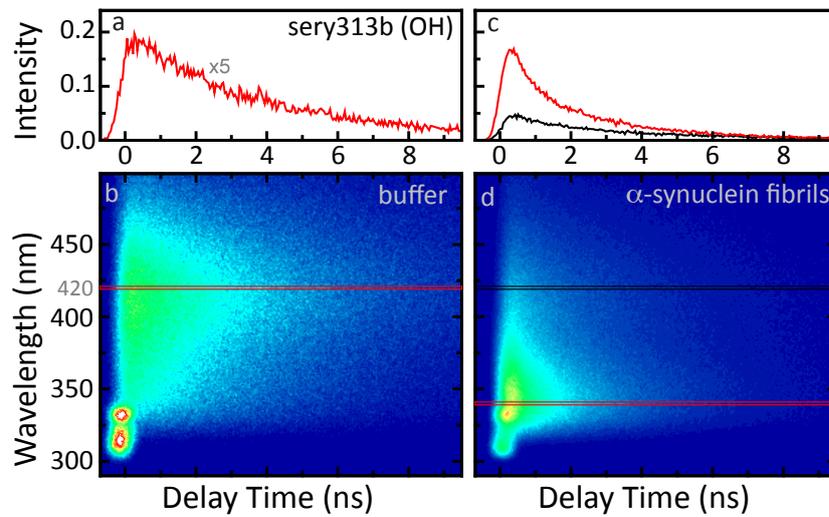
Zu Abschnitt 5.4: Zeitaufgelöste Fluoreszenz der Derivate anle138b, anle186b und sery313b



**Abbildung A.12.:** Zeitaufgelöste Fluoreszenz von sery313b in Cyclohexan (b) und DMSO (d). (a) Zeitverlauf der Fluoreszenz von sery313b in Cyclohexan im Maximum bei 330 nm in (b). (c) Zeitverlauf der Fluoreszenz von sery313b in DMSO im Maximum bei 340 nm und in der rotverschobenen Flanke bei 420 nm in (d).

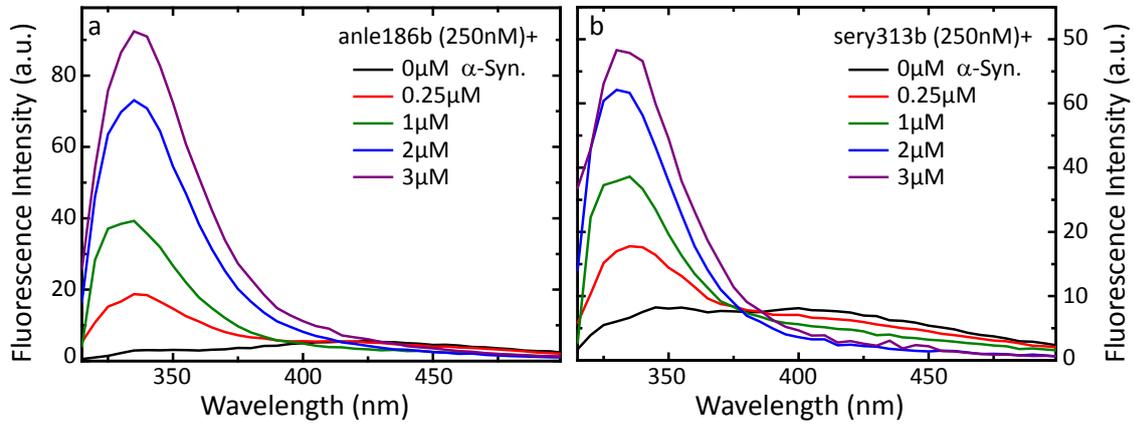


**Abbildung A.13.:** Zeitaufgelöste Fluoreszenz der Derivate in Ethanol und DMSO/Puffer (40:60). (a-b) anle186b in Ethanol und DMSO/Puffer (40:60), (c-d) sery313b in Ethanol und DMSO/Puffer (40:60) und (e-f) anle138b in Ethanol und DMSO/Puffer (40:60).



**Abbildung A.14.:** Zeitaufgelöste Fluoreszenz von sery313b in Puffer (b) und mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen (d). (a) Zeitverlauf der Fluoreszenz von sery313b in Puffer im Maximum bei 420 nm in (b). (c) Zeitverlauf der Fluoreszenz von sery313b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen im Maximum bei 340 nm und in der rotverschobenen Flanke bei 420 nm in (d).

Zu Abschnitt 5.5.1: Zunahme der Fluoreszenz von anle186b und sery313b mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen



**Abbildung A.15.:** (a) Zunahme der Fluoreszenz von anle186b (F) mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen. (b) Zunahme der Fluoreszenz von sery313b (OH) mit  $\alpha$ -Synuclein Fibrillen.



---

## Abbildungsverzeichnis

---

2.1. Proteinaggregation . . . . .	10
2.2. Aufbau einer Fibrille . . . . .	11
2.3. Molekulare Struktur von anle138b . . . . .	19
3.1. Jablonski Diagramm . . . . .	23
3.2. DMABN . . . . .	28
3.3. Streak-Tube . . . . .	33
3.4. Molekülstruktur von ThT und ANS, Fluoreszenzmodell . . . . .	39
4.1. Löslichkeit der Derivate . . . . .	44
4.2. Absorption und Fluoreszenz anle138b . . . . .	46
4.3. Absorption und Fluoreszenz anle186b und sery313b . . . . .	47
4.4. Qualitätskontrolle der Aggregation . . . . .	48
4.5. $\alpha$ -Synuclein und hTau46 mit anle138b . . . . .	49
4.6. $\alpha$ -Synuclein mit anle186b und sery313b . . . . .	50
4.7. Umgebung in der $\alpha$ -Synuclein Fibrille . . . . .	53
4.8. Belichtung anle138b in der $\alpha$ -Synuclein Fibrille . . . . .	54
4.9. Titrationskurven von anle138b mit $\alpha$ -Synuclein . . . . .	58
4.10. Titrationskurven von anle138b mit hTau46 . . . . .	58
4.11. Titrationskurven von ThT mit $\alpha$ -Synuclein . . . . .	61
4.12. FRET von anle138b auf ThT . . . . .	63
5.1. Struktur der DPP-Derivate . . . . .	71
5.2. Fluoreszenz und Stokes-Verschiebung von anle186b . . . . .	72
5.3. Fluoreszenz in Cyclohexan und Puffer . . . . .	76
5.4. Photoreaktion . . . . .	78
5.5. anle186b in DMSO und Glycerol . . . . .	80
5.6. anle186b in Säure . . . . .	82
5.7. Zeitaufgelöste Fluoreszenz anle186b in Cyclohexan und DMSO . . . . .	83
5.8. Zeitaufgelöste Fluoreszenz anle138b in Cyclohexan und DMSO . . . . .	84
5.9. Zeitaufgelöste Fluoreszenz anle186b in Puffer und $\alpha$ -Synuclein Fibrillen . . . . .	85
5.10. Modell zur Fluoreszenz . . . . .	91

5.11. Bindungsstelle in der $\alpha$ -Synuclein Fibrille . . . . .	94
A.1. Umgebung in der hTau46 Fibrille . . . . .	99
A.2. Belichtung anle138b in der hTau46 Fibrille . . . . .	100
A.3. Fluoreszenz von ThT bei ex. 412 nm . . . . .	100
A.4. Absorption der Substanzen in Cyclohexan . . . . .	101
A.5. Absorption der Substanzen in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	101
A.6. Fluoreszenz und Stokes-Verschiebung von sery313b . . . . .	102
A.7. Fluoreszenz und Stokes-Verschiebung von anle138b . . . . .	102
A.8. sery313b in DMSO und Glycerol . . . . .	103
A.9. anle138b in DMSO und Glycerol . . . . .	104
A.10. Absorption in Essigsäure und Ameisensäure . . . . .	105
A.11. Fluoreszenz in Essigsäure und Ameisensäure . . . . .	105
A.12. Zeitaufgelöste Fluoreszenz sery313b in Cyclohexan und DMSO . . . . .	106
A.13. Zeitaufgelöste Fluoreszenz der Derivate in Ethanol und DMSO/Puffer . . . . .	107
A.14. Zeitaufgelöste Fluoreszenz sery313b in Puffer und $\alpha$ -Synuclein Fibrillen . . . . .	108
A.15. Fluoreszenz von anle186b und sery313b mit $\alpha$ -Synuclein Fibrillen . . . . .	109

---

## Tabellenverzeichnis

---

2.1. Überlebenszeiten therapierter Mäuse . . . . .	17
4.1. Anisotropien und Rotationskorrelationszeiten . . . . .	51
4.2. $K_d$ und B- Werte . . . . .	60
4.3. FRET . . . . .	64
5.1. Tabelle mit Lösungsmitteln . . . . .	70
5.2. Tabelle Quantenausbeuten . . . . .	74
5.3. Tabelle Reaktionsquantenausbeuten . . . . .	78
5.4. Tabelle Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	87



- [1] A. Alzheimer. *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*. 1906.
- [2] N. J. Andrews. *Incidence of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Diagnoses and Deaths in the UK January 1994 – December 2011*. 2012.
- [3] N. Arispe, E. Rojas und H. B. Pollard. *Alzheimer Disease Amyloid Beta Protein Forms Calcium Channels in Bilayer Membranes: Blockade by Treme-thamine and Aluminum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(2) (Jan. 1993), S. 567–571.
- [4] M. Arrasate, S. Mitra, E. S. Schweitzer, M. R. Segal und S. Finkbeiner. *Inclusion Body Formation Reduces Levels of Mutant Huntingtin and the Risk of Neuronal Death*. *Nature* 431(7010) (Okt. 2004), S. 805–810.
- [5] P. E. Bendheim et al. *Nearly Ubiquitous Tissue Distribution of the Scrapie Agent Precursor Protein*. *Neurology* 42(1) (1992), S. 149–149.
- [6] U. Bertsch et al. *Systematic Identification of Antiprion Drugs by High-Throughput Screening Based on Scanning for Intensely Fluorescent Targets*. *Journal of Virology* 79(12) (Juni 2005), S. 7785–7791.
- [7] M. Biancalana und S. Koide. *Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils*. *Biochimica et biophysica acta* 1804(7) (Juli 2010), S. 1405–1412.
- [8] J. Biernat, N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow und E. Mandelkow. *Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-like Immunoreactivity and Microtubule Binding*. *Neuron* 11(1) (Juli 1993), S. 153–163.
- [9] J. Bieschke et al. *Small-Molecule Conversion of Toxic Oligomers to Nontoxic  $\beta$ -Sheet-rich Amyloid Fibrils*. *Nature Chemical Biology* 8(1) (Jan. 2012), S. 93–101.
- [10] J. B. Birks und L. G. Christophorou. *Excimer Fluorescence Spectra of Pyrene Derivatives*. *Spectrochimica Acta* 19(2) (Feb. 1963), S. 401–410.
- [11] H. Bisswanger. *Enzyme Kinetics. Principles and Methods*. 2nd Ed. WILEY-VCH, 2008.

- [12] G. Bitan, E. A. Fradinger, S. M. Spring und D. B. Teplow. *Neurotoxic Protein Oligomers — What You See Is Not Always What You Get*. *Amyloid* 12(2) (Juni 2005), S. 88–95.
- [13] N. M. Bonini und M. E. Fortini. *Human Neurodegenerative Disease Modeling Using Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience* 26(1) (2003), S. 627–656.
- [14] L. Brand und J. R. Gohlke. *Fluorescence Probes for Structure*. *Annual Review of Biochemistry* 41(1) (1972), S. 843–868.
- [15] S. Brandner et al. *Normal Host Prion Protein Necessary for Scrapie-Induced Neurotoxicity*. *Nature* 379(6563) (Jan. 1996), S. 339–343.
- [16] L. Breydo, J. W. Wu und V. N. Uversky.  *$\alpha$ -Synuclein Misfolding and Parkinson's Disease*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822(2) (Feb. 2012), S. 261–285.
- [17] M. E. Bruce et al. *Transmissions to Mice Indicate that 'New Variant' CJD is Caused by the BSE Agent*. *Nature* 389(6650) (Okt. 1997), S. 498–501.
- [18] L. Brunton, B. Chabner und B. Knollman. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*. McGraw Hill Professional, Jan. 2011.
- [19] L. Buée, T. Bussièrè, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte und P. R. Hof. *Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders*. *Brain Research Reviews* 33(1) (Aug. 2000), S. 95–130.
- [20] B. Bulic, M. Pickhardt, E.-M. Mandelkow und E. Mandelkow. *Tau Protein and Tau Aggregation Inhibitors*. *Neuropharmacology. Alzheimers Disease* 59(4–5) (Sep. 2010), S. 276–289.
- [21] M. Calamai et al. *Reversal of Protein Aggregation Provides Evidence for Multiple Aggregated States*. *Journal of Molecular Biology* 346(2) (Feb. 2005), S. 603–616.
- [22] M. S. Celej, E. A. Jares-Erijman und T. M. Jovin. *Fluorescent N-Arylamino-naphthalene Sulfonate Probes for Amyloid Aggregation of  $\alpha$ -Synuclein*. *Biophysical Journal* 94(12) (Juni 2008), S. 4867–4879.
- [23] S. W. Chen et al. *Structural Characterization of Toxic Oligomers that are Kinetically Trapped during  $\alpha$ -Synuclein Fibril Formation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(16) (Apr. 2015), E1994–2003.
- [24] Y. Chen und M. D. Barkley. *Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins*. *Biochemistry* 37(28) (Juli 1998), S. 9976–9982.
- [25] R. M. Claramunt et al. *Protonation and Phase Effects on the NMR Chemical Shifts of Imidazoles and Pyrazoles: Experimental Results and GIAO Calculations*. *New Journal of Chemistry* 27(4) (März 2003), S. 734–742.

- [26] K. A. Connors. *The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution*. Chemical Reviews 97(5) (Aug. 1997), S. 1325–1358.
- [27] H. G. Creutzfeldt. *Über eine eigenartige Herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems (vorläufige Mitteilung)*. Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie 57(1) (1920), S. 1–18.
- [28] R. E. Dale, J. Eisinger und W. E. Blumberg. *The Orientational Freedom of Molecular Probes. The Orientation Factor in Intramolecular Energy Transfer*. Biophysical Journal 26(2) (Mai 1979), S. 161–193.
- [29] R. N. Day und M. W. Davidson. *The Fluorescent Protein Palette: Tools for Cellular Imaging*. Chemical Society reviews 38(10) (Okt. 2009), S. 2887–2921.
- [30] A. A. Deeg et al. *Anle138b and Related Compounds are Aggregation Specific Fluorescence Markers and Reveal High Affinity Binding to  $\alpha$ -Synuclein Aggregates*. Biochimica Et Biophysica Acta (Mai 2015).
- [31] V. V. Didenko. *DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications*. BioTechniques 31(5) (Nov. 2001), S. 1106–1121.
- [32] M. Dittmann et al. *Photostability of 4,4'-Dihydroxythioindigo, a Mimetic of Indigo*. Angewandte Chemie (International Ed. in English) 53(2) (Jan. 2014), S. 591–594.
- [33] C. M. Dobson. *Protein Folding and Misfolding*. Nature 426(6968) (Dez. 2003), S. 884–890.
- [34] K. F. Eidman. *Formic Acid. Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- [35] S. Fery-Forgues und N. Paillous. *Photodehalogenation and Photodimerization of 2-(4-Halophenyl)Benzoxazoles. Dependence of the Mechanism on the Nature of the Halogen Atom*. The Journal of Organic Chemistry 51(5) (März 1986), S. 672–677.
- [36] M. S. Forman, J. Q. Trojanowski und V. M.-Y. Lee. *Neurodegenerative Diseases: A Decade of Discoveries Paves the Way for Therapeutic Breakthroughs*. Nature Medicine 10(10) (Okt. 2004), S. 1055–1063.
- [37] T. Förster. *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik 437(1-2) (Jan. 1948), S. 55–75.
- [38] S. Freire, M. H. de Araujo, W. Al-Soufi und M. Novo. *Photophysical Study of Thioflavin T as Fluorescence Marker of Amyloid Fibrils*. Dyes and Pigments. 1st International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials 110 (Nov. 2014), S. 97–105.

- [39] M. Fuhrmann et al. *Loss of the Cellular Prion Protein Affects the Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Hippocampal CA1 Neurons*. *Journal of Neurochemistry* 98(6) (Sep. 2006), S. 1876–1885.
- [40] P. Gambetti, Q. Kong, W. Zou, P. Parchi und S. G. Chen. *Sporadic and Familial CJD: Classification and Characterisation*. *British Medical Bulletin* 66(1) (Jan. 2003), S. 213–239.
- [41] M. Geissen et al. *From High-Throughput Cell Culture Screening to Mouse Model: Identification of New Inhibitor Classes against Prion Disease*. *Chem-MedChem* 6(10) (Okt. 2011), S. 1928–1937.
- [42] C. G. Glabe. *Amyloid Oligomer Structures and Toxicity*. *The Open Biology Journal* 2 (2009), S. 222–227.
- [43] A. M. Gorman. *Neuronal Cell Death in Neurodegenerative Diseases: Recurring Themes around Protein Handling*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12(6a) (Dez. 2008), S. 2263–2280.
- [44] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz und W. Rettig. *Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures*. *Chemical Reviews* 103(10) (Okt. 2003), S. 3899–4032.
- [45] F. F. Graupner. *Ultraschnelle Fluoreszenzspektroskopie zu Photostabilität und Photoreaktivität von Thioindigo- und Hemithioindigo-basierten Farbstoffmolekülen*. Diss. München: Ludwig-Maximilians-Universität München, 2015.
- [46] M. Groenning et al. *Study on the Binding of Thioflavin T to  $\beta$ -Sheet-Rich and Non- $\beta$ -Sheet Cavities*. *Journal of Structural Biology* 158(3) (Juni 2007), S. 358–369.
- [47] C. Haass und B. D. Strooper. *The Presenilins in Alzheimer's Disease—Proteolysis Holds the Key*. *Science* 286(5441) (Okt. 1999), S. 916–919.
- [48] M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter und E. A. Theodorakis. *Effects of Solvent Polarity and Solvent Viscosity on the Fluorescent Properties of Molecular Rotors and Related Probes*. *Bioorganic Chemistry* 33(6) (Dez. 2005), S. 415–425.
- [49] I. W. Hamley. *Bildung von Peptidfibrillen*. *Angewandte Chemie* (119) (2007).
- [50] J. Hardy und D. J. Selkoe. *The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics*. *Science* 297(5580) (Juli 2002), S. 353–356.
- [51] F. U. Hartl und M. Hayer-Hartl. *Molecular Chaperones in the Cytosol: From Nascent Chain to Folded Protein*. *Science* 295(5561) (März 2002), S. 1852–1858.

- 
- [52] A. Hawe, M. Sutter und W. Jiskoot. *Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization*. *Pharmaceutical Research* 25(7) (Juli 2008), S. 1487–1499.
- [53] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters und K. Beyreuther. *Substitutions of Hydrophobic Amino Acids Reduce the Amyloidogenicity of Alzheimer's Disease  $\beta A_4$  Peptides*. *Journal of Molecular Biology* 228(2) (Nov. 1992), S. 460–473.
- [54] T. Hogen et al. *Two Different Binding Modes of  $\alpha$ -Synuclein to Lipid Vesicles Depending on its Aggregation State*. *Biophysical Journal* 102(7) (Apr. 2012), S. 1646–1655.
- [55] Horiba. *Fluorolog®-3, Operation Manual*. 2002.
- [56] B. Hörnlimann und D. Riesner. *Prions in Humans and Animals*. Walter de Gruyter, 2007.
- [57] P. Hortschansky, V. Schroeckh, T. Christopeit, G. Zandomenighi und M. Fändrich. *The Aggregation Kinetics of Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Peptide is Controlled by Stochastic Nucleation*. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 14(7) (Juli 2005), S. 1753–1759.
- [58] S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee und J. A. Carver. *The Thioflavin T Fluorescence Assay for Amyloid Fibril Detection can be biased by the Presence of Exogenous Compounds*. *FEBS Journal* 276(20) (Okt. 2009), S. 5960–5972.
- [59] W. Humphrey, A. Dalke und K. Schulten. *VMD: Visual Molecular Dynamics*. *Journal of Molecular Graphics* 14(1) (Feb. 1996), S. 33–38, 27–28.
- [60] A. Jabłoński. *Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren*. *Zeitschrift für Physik* 94(1-2) (1935), S. 38–46.
- [61] D. Jung, K. Min, J. Jung, W. Jang und Y. Kwon. *Chemical Biology-Based Approaches on Fluorescent Labeling of Proteins in Live Cells*. 9(5) (Apr. 2013), S. 862–872.
- [62] Y. Kallberg, M. Gustafsson, B. Persson, J. Thyberg und J. Johansson. *Prediction of Amyloid Fibril-Forming Proteins*. *Journal of Biological Chemistry* 276(16) (Apr. 2001), S. 12945–12950.
- [63] M. Kasha. *Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules*. *Discussions of the Faraday Society* 9 (Jan. 1950), S. 14–19.
- [64] M. Kasha. *Collisional Perturbation of Spin-Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching. A Visual Demonstration of the Perturbation*. *The Journal of Chemical Physics* 20(1) (Jan. 1952), S. 71–74.
- [65] A. K. Kenworthy. *Imaging Protein-Protein Interactions using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy*. *Methods (San Diego, Calif.)* 24(3) (Juli 2001), S. 289–296.

- [66] R. Khurana et al. *Mechanism of Thioflavin T Binding to Amyloid Fibrils*. Journal of Structural Biology 151(3) (Sep. 2005), S. 229–238.
- [67] M. Kidd. *Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease*. Nature 197(4863) (Jan. 1963), S. 192–193.
- [68] H.-Y. Kim et al. *Structural Properties of Pore-Forming Oligomers of Alpha-Synuclein*. Journal of the American Chemical Society 131(47) (Dez. 2009), S. 17482–17489.
- [69] W. E. Klunk et al. *Uncharged Thioflavin-T Derivatives bind to Amyloid-Beta Protein with high Affinity and Readily enter the Brain*. Life Sciences 69(13) (Aug. 2001), S. 1471–1484.
- [70] R. Knight. *Creutzfeldt-Jakob Disease: A Rare Cause of Dementia in Elderly Persons*. Clinical Infectious Diseases 43(3) (Jan. 2006), S. 340–346.
- [71] M. Kostka et al. *Single Particle Characterization of Iron-Induced Pore-Forming  $\alpha$ -Synuclein Oligomers*. Journal of Biological Chemistry 283(16) (Apr. 2008), S. 10992–11003.
- [72] G. G. Kovacs. *Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine*. International Journal of Molecular Sciences 17(2) (Feb. 2016).
- [73] G. G. Kovacs und H. Budka. *Prion Diseases: From Protein to Cell Pathology*. The American Journal of Pathology 172(3) (März 2008), S. 555–565.
- [74] J. Krauth. *Fluoreszenzspektroskopie eines DPP-Derivats in Kombination mit  $\alpha$ -Synuclein Aggregaten*. Bachelorarbeit. München: Ludwig-Maximilians-Universität München, 2011.
- [75] M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley und A. M. Donald. *The Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils: Localisation and Implications*. Journal of Structural Biology 149(1) (Jan. 2005), S. 30–37.
- [76] H. A. Kretzschmar, S. B. Prusiner, L. E. Stowring und S. J. DeArmond. *Scrapie Prion Proteins are Synthesized in Neurons*. The American Journal of Pathology 122(1) (Jan. 1986), S. 1–5.
- [77] J. R. Lakowicz, Hrsg. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006.
- [78] H. A. Lashuel, D. Hartley, B. M. Petre, T. Walz und P. T. Lansbury. *Neurodegenerative Disease: Amyloid Pores from Pathogenic Mutations*. Nature 418(6895) (Juli 2002), S. 291–291.
- [79] A. J. Lees, M. Selikhova, L. A. Andrade und C. Duyckaerts. *The Black Stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff*. Movement Disorders 23(6) (Apr. 2008), S. 777–783.

- [80] J. Levin et al. *The Oligomer Modulator Anle138b Inhibits Disease Progression in a Parkinson Mouse Model Even with Treatment Started after Disease Onset*. *Acta Neuropathologica* 127 (2014), S. 779–780.
- [81] H. LeVine. *Thioflavine T Interaction with Amyloid  $\beta$ -Sheet Structures*. *Amyloid* 2(1) (Jan. 1995), S. 1–6.
- [82] F. Lewy. *Paralysis agitans. Handbuch der Neurologie, Pathologische Anatomie*. Bd. Band I. Berlin, 1912, S. 920–933.
- [83] P. B. Little und J. Thorsen. *Bovine Spongiform Encephalopathy*. *The Canadian Veterinary Journal* 30(9) (Sep. 1989), S. 712–714.
- [84] G. Mallucci et al. *Depleting Neuronal PrP in Prion Infection Prevents Disease and Reverses Spongiosis*. *Science* 302(5646) (Okt. 2003), S. 871–874.
- [85] E.-M. Mandelkow und E. Mandelkow. *Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(7) (Juli 2012).
- [86] A. A. Maskevich et al. *Spectral Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Dielectric Properties and in a Fibril-Incorporated Form*. *Journal of Proteome Research* 6(4) (Apr. 2007), S. 1392–1401.
- [87] E. Masliah et al. *Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in Alpha-Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders*. *Science (New York, N.Y.)* 287(5456) (Feb. 2000), S. 1265–1269.
- [88] A. M. Mehle. *Einzelmolekül-basierte Analyse des Aggregationsverhaltens von Tau-Protein und sein Verhalten in der Koaggregation mit  $\alpha$ -Synuklein*. Diss. München: Ludwig-Maximilians-Universität München, 2014.
- [89] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi und M. T. Gandolfi. *Handbook of Photochemistry, Third Edition*. CRC Press, Feb. 2006.
- [90] C. Morgan, M. Gupta, W. El-Feky, S. Shamim und M. Opatowsky. *Creutzfeldt-Jakob Disease: Case Discussion and Imaging Review*. *Proceedings (Baylor University Medical Center)* 22(1) (Jan. 2009), S. 69–71.
- [91] L. A. Munishkina und A. L. Fink. *Fluorescence as a Method to Reveal Structures and Membrane-Interactions of Amyloidogenic Proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. *Amyloidogenic Protein–Membrane Interaction* 1768(8) (Aug. 2007), S. 1862–1885.
- [92] N. A. Murugan et al. *Amyloid Fibril-Induced Structural and Spectral Modifications in the Thioflavin-T Optical Probe*. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 4(1) (Jan. 2013), S. 70–77.
- [93] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa und T. Takeda. *Fluorometric Determination of Amyloid Fibrils in Vitro Using the Fluorescent Dye, Thioflavin T1*. *Analytical Biochemistry* 177(2) (März 1989), S. 244–249.

- [94] C. Pacheco, L. G. Aguayo und C. Opazo. *An Extracellular Mechanism that can explain the Neurotoxic Effects of  $\alpha$ -Synuclein Aggregates in the Brain*. Membrane Physiology and Membrane Biophysics 3 (2012), S. 297.
- [95] K. M. Pan et al. *Conversion of Alpha-Helices into Beta-Sheets Features in the Formation of the Scrapie Prion Proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(23) (Dez. 1993), S. 10962–10966.
- [96] A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W.-M. Yau und R. Tycko. *Molecular Structural Basis for Polymorphism in Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid Fibrils*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(47) (Nov. 2008), S. 18349–18354.
- [97] J. Parkinson. *An Essay on the Shaking Palsy*. The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences 14(2) (Mai 2002), S. 223–236.
- [98] W. Peelaerts und V. Baekelandt.  *$\alpha$ -Synuclein Folds: The Cards are on the Table*. Nature Structural & Molecular Biology 23(5) (Mai 2016), S. 359–360.
- [99] S. B. Prusiner. *Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie*. Science (New York, N.Y.) 216(4542) (Apr. 1982), S. 136–144.
- [100] S. B. Prusiner. *Prions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(23) (Nov. 1998), S. 13363–13383.
- [101] A. Reiner. *Fluoreszenzspektroskopie zu Photoreaktion und Kopplung von DPP-Substanzen an pathologische Proteinaggregate*. Masterarbeit. München: Ludwig-Maximilians-Universität München, 2013.
- [102] W. Rettig. *TICT States and beyond: Reaction Dimensionality and Application to Photosynthesis*. Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Chemical Sciences 104(2) (1992), S. 89–104.
- [103] R. Roy, S. Hohng und T. Ha. *A Practical Guide to Single-Molecule FRET*. Nature Methods 5(6) (Juni 2008), S. 507–516.
- [104] R. Sabaté, I. Lascu und S. J. Saupe. *On the Binding of Thioflavin-T to HET-s Amyloid Fibrils Assembled at pH 2*. Journal of Structural Biology 162(3) (Juni 2008), S. 387–396.
- [105] R. Sabaté und S. J. Saupe. *Thioflavin T Fluorescence Anisotropy: An Alternative Technique for the Study of Amyloid Aggregation*. Biochemical and Biophysical Research Communications 360(1) (Aug. 2007), S. 135–138.
- [106] H. M. Schätzl, M. D. Costa, L. Taylor, F. E. Cohen und S. B. Prusiner. *Prion Protein Gene Variation among Primates*. Journal of Molecular Biology 245(4) (Jan. 1995), S. 362–374.

- [107] O. Schweers, E. Schönbrunn-Hanebeck, A. Marx und E. Mandelkow. *Structural Studies of Tau Protein and Alzheimer Paired Helical Filaments show no Evidence for Beta-Structure*. Journal of Biological Chemistry 269(39) (Sep. 1994), S. 24290–24297.
- [108] L. C. Serpell. *Alzheimer's Amyloid Fibrils: Structure and Assembly*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1502(1) (Juli 2000), S. 16–30.
- [109] G. Šimić et al. *Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies*. Biomolecules 6(1) (Jan. 2016).
- [110] N. Singh, A. Singh, D. Das und M. L. Mohan. *Redox Control of Prion and Disease Pathogenesis*. Antioxidants & Redox Signaling 12(11) (Juni 2010), S. 1271–1294.
- [111] D. M. Skovronsky, V. M.-Y. Lee und J. Q. Trojanowski. *Neurodegenerative Diseases: New Concepts of Pathogenesis and Their Therapeutic Implications*. Annual Review of Pathology 1 (2006), S. 151–170.
- [112] H. Sontheimer. *Diseases of the Nervous System*. San Diego: Academic Press, 2015.
- [113] G. G. Stokes. *On the Change of Refrangibility of Light*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series I 142 (1852), S. 463–562.
- [114] S. J. Strickler und R. A. Berg. *Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules*. The Journal of Chemical Physics 37(4) (Aug. 1962), S. 814–822.
- [115] L. Stryer. *Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler*. Annual Review of Biochemistry 47 (1978), S. 819–846.
- [116] V. I. Stsiapura et al. *Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Viscosity*. The Journal of Physical Chemistry. B 112(49) (Dez. 2008), S. 15893–15902.
- [117] C. M. Tanner et al. *Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease*. Environmental Health Perspectives 119(6) (Juni 2011), S. 866–872.
- [118] S. Thirunavukkuarasu, E. A. Jares-Erijman und T. M. Jovin. *Multiparametric Fluorescence Detection of Early Stages in the Amyloid Protein Aggregation of Pyrene-Labeled Alpha-Synuclein*. Journal of Molecular Biology 378(5) (Mai 2008), S. 1064–1073.
- [119] R. Y. Tsien. *The Green Fluorescent Protein*. Annual Review of Biochemistry 67 (1998), S. 509–544.
- [120] N. J. Turro. *The Triplet State*. Journal of Chemical Education 46(1) (Jan. 1969), S. 2.

- [121] M. D. Tuttle et al. *Solid-State NMR Structure of a Pathogenic Fibril of Full-Length Human  $\alpha$ -Synuclein*. *Nature Structural & Molecular Biology* 23(5) (Mai 2016), S. 409–415.
- [122] P. S. Vassar und C. F. Culling. *Fluorescent Stains, with Special Reference to Amyloid and Connective Tissues*. *Archives of Pathology* 68 (Nov. 1959), S. 487–498.
- [123] M. Vilar et al. *The Fold of  $\alpha$ -Synuclein Fibrils*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(25) (Juni 2008), S. 8637–8642.
- [124] M. von Bergen, S. Barghorn, J. Biernat, E.-M. Mandelkow und E. Mandelkow. *Tau Aggregation is driven by a Transition from Random Coil to Beta Sheet Structure*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. The Biology and Pathobiology of Tau* 1739(2–3) (Jan. 2005), S. 158–166.
- [125] M. von Bergen et al. *The Core of Tau-Paired Helical Filaments Studied by Scanning Transmission Electron Microscopy and Limited Proteolysis*. *Biochemistry* 45(20) (Mai 2006), S. 6446–6457.
- [126] E. S. Voropai et al. *Spectral Properties of Thioflavin T and its Complexes with Amyloid Fibrils*. *Journal of Applied Spectroscopy* 70(6) (Nov. 2003), S. 868–874.
- [127] J. Wagner. *Kausale Therapie von Prionenerkrankungen Entwicklung Und Charakterisierung Neuartiger Anti-Aggregativer Wirkstoffe in Vitro Und in Vivo*. Diss. München: Ludwig-Maximilians-Universität München, Dez. 2009.
- [128] J. Wagner et al. *Anle138b: A Novel Oligomer Modulator for Disease-Modifying Therapy of Neurodegenerative Diseases such as Prion and Parkinson's Disease*. *Acta Neuropathologica* 125(6) (Juni 2013), S. 795–813.
- [129] J. Wagner et al. *Reducing Tau Aggregates with Anle138b Delays Disease Progression in a Mouse Model of Tauopathies*. *Acta Neuropathologica* (Okt. 2015), S. 1–13.
- [130] D. M. Walsh und D. J. Selkoe. *A $\beta$  Oligomers – a Decade of Discovery*. *Journal of Neurochemistry* 101(5) (Juni 2007), S. 1172–1184.
- [131] R. G. Will et al. *A New Variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK*. *The Lancet* 347(9006) (Apr. 1996), S. 921–925.
- [132] L. S. Wolfe et al. *Protein-Induced Photophysical Changes to the Amyloid Indicator Dye Thioflavin T*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Sep. 2010).
- [133] C. Wu et al. *The Binding of Thioflavin-T and its Neutral Analog BTA-1 to Protofibrils of the Alzheimer A $\beta$ 16-22 Peptide Probed by Molecular Dynamics Simulations*. *Journal of molecular biology* 384(3) (Dez. 2008), S. 718–729.

- 
- [134] Y. Xiao et al. *A $\beta$ (1-42) Fibril Structure Illuminates Self-Recognition and Replication of Amyloid in Alzheimer's Disease*. *Nature Structural & Molecular Biology* 22(6) (Juni 2015), S. 499–505.
- [135] A. Yekta, J. Duhamel und M. A. Winnik. *Dipole-Dipole Electronic Energy Transfer. Fluorescence Decay Functions for Arbitrary Distributions of Donors and Acceptors: Systems with Planar Geometry*. *Chemical Physics Letters* 235(1) (März 1995), S. 119–125.
- [136] M. Z. Zgierski, T. Fujiwara und E. C. Lim. *Role of the P $\sigma$  State in Molecular Photophysics*. *Accounts of Chemical Research* 43(4) (Apr. 2010), S. 506–517.
- [137] W. Zinth und U. Zinth. *Optik: Lichtstrahlen - Wellen - Photonen*. Oldenbourg Verlag, Jan. 2008.



### Publikationen in Fachzeitschriften

**„Anle138b and related compounds are aggregation specific fluorescence markers and reveal high affinity binding to  $\alpha$ -synuclein aggregates“** A. A. Deeg, A. M. Reiner, F. Schmidt, F. Schueder, S. Ryazanov, V. C. Ruf, K. Giller, S. Becker, A. Leonov, C. Griesinger, A. Giese, W. Zinth *BiochBiophysActa-General Subjects*, 2015, 1884-1890

\*Shared authorship

**„Reducing tau aggregates with anle138b delays disease progression in a mouse model of tauopathies“** J. Wagner, S. Krauss, S. Shi, S. Ryazanov, J. Steffen, C. Miklitz, A. Leonov, A. Kleinknecht, B. Göricke, J.H. Weis-  
haupt, D. Weckbecker, A. M. Reiner, W. Zinth, J. Levin, D. Ehninger, S. Remy, H. A. Kretschmar, C. Griesinger, A. Giese, M. Fuhrmann *Acta Neuropathologica*, 2015, 130(5):619-31

**„2'-Methoxyacetophenone: An efficient photosensitizer for cyclobutane pyrimidine dimer formation“** L. Liu, B. M. Pilles, A. M. Reiner, J. Gontcharov, W. Zinth *ChemPhysChem*, 2015, 3483-3487

**„Twisted hemithioindigo photoswitches: Solvent polarity determines the type of light-induced rotations“** S. Wiedbrauk, B. Maerz, E. Samoylova, A. Reiner, F. Trommer, P. Mayer, W. Zinth, H. Dube *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138 (37)

Konferenzbeiträge

**„Fluorescence spectroscopy on binding of DPP compounds to pathological aggregates“** Presentation, Faltertage Oktober 2015 Halle

**„Pyrene dynamics: Covalently linked dimers accelerate the kinetics from ns to ps and produce excimers“** B. Baudisch, A. Keerthi, A. Reiner, J. Reschauer, K. Müllen, and E. Riedle International Conference on Ultrafast Phenomena 2016, Optical Society of America

**„Fluorescence spectroscopy reveals high affinity binding of anle138b to  $\alpha$ -synuclein and hTau46 aggregates“** A. Reiner, F. Schimdt, D. Weckbecker, S. Ryazanov, A. Leonov, C. Griesinger, A. Giese, W. Zinth, Poster Presentation, ADPD Conference 2017 Wien

---

## Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen möchte ich folgenden Personen danken:

- **Prof. Dr. Wolfgang Zinth** für die Möglichkeit an Ihrem Lehrstuhl promovieren zu dürfen. Für Ihre herausragende Betreuung der Arbeit, Ihr Engagement und Ihre Geduld in zahlreichen Diskussionen und Ihre Unterstützung in alle Fragen.
- **Prof. Dr. Armin Giese** für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie für die Möglichkeit der Kooperation in diesem hochinteressanten Projekt. Die vielen hilfreichen Gespräche und Anregungen für neue Herangehensweisen und Aspekte.
- **Prof. Dr. Christian Griesinger** als Kooperationspartner und Ideengeber für weitere interessante Messungen, insbesondere für die hilfreichen Kommentare im Hinblick auf die Interpretation der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse.
- **Felix Schmidt** für die Präparation der  $\alpha$ -Synuclein Monomere und Fibrillen und für Deine große Hilfsbereitschaft, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.
- **Daniel Weckbecker** für die Präparation der hTau46 Monomere und Fibrillen auch in größeren Mengen.
- **Sergey Ryazanov** für die Durchführung und Interpretation der HPLC-MS der Belichtungsexperimente.
- **Andreas Deeg** und **dem anle-Team**: Florian Schüder, Markus Heer, Bernhard Schroll, Eli Naydenova und Tim Elter, die mich tatkräftig unterstützt haben.
- **Florian Trommer**, der mich in Computerfragen nie hat hängen lassen. Vielmehr möchte ich Dir aber für die vielen interessanten Diskussionen danken, durch die das ein oder andere Problem, das während dem Verfassen der Arbeit auftrat, gelöst werden konnte.
- **Stefan Hofmann** und **Benjamin März, Luis Riegger** und **Julia Gontcharov** für das Korrekturlesen der Arbeit
- Dem **Sekretariat Frau Michaelis** und **Frau Widmann** für die Unterstützung bei der Regelung von Formalien. Der **Werkstatt** um **Rudi Schwarz** für die schnelle und kompetente Anfertigung aller möglicher Bauteile.
- **Den Mitarbeitern** des BMO, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe, für eure Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre in der Gruppe.
- **Meiner Familie** für eure liebe Unterstützung.

