

Organische Fluoreszenzreagentien für die Untersuchung von Enzymen und Proteinen

Von Yuichi Kanaoka^[*]

Bei Untersuchungen, die zum Verständnis von Lebensvorgängen führen sollen, müssen mehrere naturwissenschaftliche Disziplinen zusammenwirken. Die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie zur Lösung biologischer Probleme bietet ein Beispiel: biologische, physikalisch-chemische und organisch-chemische Methoden sowie neue technische Verfahren ergänzen einander. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten von Fluoreszenzsonden, die kovalent an spezifische Positionen von Proteinen gebunden werden. Die wichtigsten Verbindungen für die Fluoreszenzmarkierung sind in einer Tabelle zusammengestellt.

1. Einleitung

Nach der Definition von *Edelman* und *McClure*^[1] sind Fluoreszenzsonden kleine Moleküle, die eine oder mehrere ihrer Fluoreszenzeigenschaften ändern, wenn sie mit einem Protein oder anderen Makromolekülen in nicht-kovalenter Wechselwirkung treten. Allgemein kennt man bei Proteinen drei Arten von Fluoreszenzchromophoren (Fluorophoren) – arteigene, in Coenzymen vorliegende und nachträglich eingegebauten. Als arteigene Fluorophore treten die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren in Erscheinung. Untersuchungen der arteigenen und der in Coenzymen vorliegenden Fluoreszenzchromophore lieferten wertvolle Aufschlüsse über Struktur und Funktion von Proteinen. Nur hat, wie *Stryer*^[2] bemerkt, die Natur nicht immer den richtigen Chromophor an der richtigen Stelle eines Proteins vorgesehen. Deshalb wurde eine Fülle nachträglich einzubauender Fluoreszenzmarkierungen entwickelt, die man inzwischen als Fluoreszenzsonden („fluorescence probes“) bezeichnet, und zur Untersuchung von Biopolymeren herangezogen. Vor- und Nachteile der Markierungstechniken mit kovalent oder nicht-kovalent gebundenen, nachträglich eingeübten Verbindungen hängen in komplizierter Weise von Untersuchungsobjekt und gewünschter Information ab.

Der vorliegende Aufsatz beschränkt sich im wesentlichen auf Reagentien, deren *nachträgliche kovalente Bindung* an Enzyme und Proteine eine gezielte Fluoreszenzmarkierung ermöglicht; Untersuchungen über nicht-kovalent gebundene und über natürliche Markierungen wurden bereits ausführlich behandelt^[3]. Anstatt die zahlreichen Veröffentlichungen nach Art einer Enzyklopädie abzuhandeln, wollen wir versuchen, eine Übersicht über die fluorogenen Gruppen und ihre Anwendungsmöglichkeiten zu geben, da wir uns mit der Entwicklung neuer Konzepte für biologische Untersuchungen auf der Basis neuartiger organischer Fluoreszenzreagentien befassen. Das Hauptinteresse gilt dabei der spezifischen Markierung, insbesondere von funktionellen Gruppen in Proteinen; daneben werden auch einige Beispiele für unspezifische und coenzymatische Markierungen aufgeführt.

2. Grundzüge der Fluoreszenz^[4-15]

In diesem Abschnitt werden die Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie kurz zusammengefaßt. Abbildung 1 zeigt

die möglichen Übergänge eines Moleküls, das auf ein höheres Singulett-Energieniveau (S_2) angeregt wurde. Zunächst geht das Molekül schnell (in $< 10^{-10}$ s) in den niedrigsten angereg-

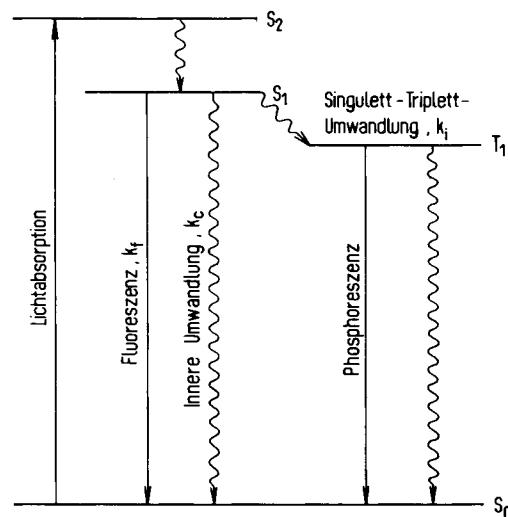


Abb. 1. Energiestufen eines Fluorophors, schematisch (siehe Text). Gerade Linien bedeuten mit Strahlung verbundene Übergänge, Wellenlinien strahlungslose Übergänge.

ten Zustand (S_1) über. Aus S_1 kann es in jedes Rotations- oder Schwingungsniveau des Grundzustandes (S_0) gelangen, und zwar durch Fluoreszenz oder durch innere Umwandlung („internal conversion“); es kann auch strahlungslos durch Singulett-Triplett-Umwandlung („intersystem crossing“) in den Triplett-Zustand T_1 übergehen. Die Lebensdauer eines Moleküls im S_1 -Zustand liegt im Bereich von 0.1 bis 100 Nanosekunden (10^{-9} s), je nach Art des Chromophors. Diese Zeit scheint kurz zu sein, genügt jedoch für chemische und physikalische Wechselwirkungen wie Rotationsvorgänge, Umorientierungen der Solvenshülle, Komplexbildung, Protonenaustausch und Energieübertragung. Für die Fluoreszenzspektroskopie sind die vom S_1 -Zustand ausgehenden Prozesse wichtig, denn sie bestimmen das Fluoreszenzspektrum sowie Quantenausbeute, Lebensdauer und Polarisation der Fluoreszenz.

Das Fluoreszenzspektrum zeigt die Intensität der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f gibt an, welcher Anteil der angeregten Moleküle fluoresziert; sie ist mit kinetischen Größen durch Gl. (a) verknüpft, in der k_f , k_c und k_i die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz aus S_1 , des strahlungslosen Energieverlustes aus S_1 bzw. der Singulett-Triplett-Umwandlung bezeichneten (siehe Abb. 1). Die Lebensdauer der Fluoreszenz, τ , wird durch Gl. (b) definiert, die die Abnahme der Fluores-

[*] Prof. Dr. Y. Kanaoka
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Hokkaido University
Sapporo, 060 (Japan)

zenintensität nach der Anregung beschreibt. τ ist die Zeit, die vergeht, bis die Intensität vom Ausgangswert F_0 auf $F_0 \cdot e^{-1}$ sinkt. Es gelten die Gleichungen (c) und (d). Damit ein Vorgang mit den Strahlungsprozessen erfolgreich konkurrieren kann, muß seine Geschwindigkeitskonstante k größer sein als die Zerfallskonstante des zugrundeliegenden angeregten Zustandes [Gl. (e)].

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_c + k_i} \quad (a)$$

$$F(t) = F_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (b)$$

$$1/\tau = k_f + k_c + k_i \quad (c)$$

$$\Phi_f = k_f \cdot \tau \quad (d)$$

$$k > 1/\tau \quad (e)$$

Wird ein Molekül mit linear polarisiertem Licht angeregt, so ist auch das emittierte Licht linear polarisiert. Für ein statistisch markiertes, starres ellipsoidisches Protein erhält man Gleichung (f) mit P und P_0 als Polarisation mit bzw. ohne Rotation und mit ρ_h als harmonischem Mittel aus den Rotationsrelaxationszeiten. 3τ und ρ_h sollten möglichst von gleicher Größenordnung sein. Diese Eigenschaften der Emission, die sich durch Messung der Fluoreszenzpolarisation untersuchen lassen, gestatten die Bestimmung der Rotation von Makromolekülen in Lösung und ermöglichen weitere Studien über Größe, Form und Starrheit von Proteinen.

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{3\tau}{\rho_h} \right) \quad (f)$$

3. Molekülstruktur und Fluoreszenz – Auswahlstrategie für Fluoreszenzreagentien

Damit die Fluoreszenz überwiegt, muß die Geschwindigkeitskonstante des Fluoreszenzübergangs (k_f) groß gegenüber den Konstanten konkurrierender Vorgänge sein. Stark fluoreszierende Moleküle haben im allgemeinen folgende Eigenschaften: a) Die längstwellige Absorption ist intensiv (ϵ_{\max} ist groß). Generell ist das Fluoreszenzspektrum (Übergang $S_1 \rightarrow S_0$) eines Moleküls ungefähr ein Spiegelbild seines Absorptionsspektrums ($S_0 \rightarrow S_1$). b) Das Molekül enthält keine Teilstrukturen oder funktionelle Gruppen, die strahlunglose Übergänge begünstigen (k_c , k_i).

In Lösung fluoreszieren die meisten unsubstituierten Arene, da sie infolge bevorzugter π, π^* -Übergänge ($\epsilon_{\max} \approx 10^4$) niedrig liegende π, π^* -Singulettzustände besitzen. In Molekülen mit anregbaren nicht-bindenden (n-)Elektronen wird gewöhnlich die Energie des n, π^* -Überganges niedriger als diejenige des π, π^* -Überganges sein. Da n, π^* -Übergänge weniger intensiv sind ($\epsilon \approx 10^2$) und zugleich längere Lebensdauern besitzen als π, π^* -Übergänge, ist k_i für den Übergang aus dem n, π^* -Zustand größer als für den Übergang aus einem π, π^* -Zustand. Daraus leitet sich die allgemeine Aussage ab, daß *ortho*-*para*-dirigierende Substituenten häufig die Fluoreszenz verstärken, während *meta*-dirigierende Gruppen sie vermindern^[16]. Viele *meta*-dirigierende Gruppen besitzen energiearme n, π^* -Zustände. Zum Beispiel führt die Substitution mit Nitrogruppen normalerweise zu vollständigem Quenching; Substituenten mit Carbonylgruppen (Keton-, Aldehyd-, Carbonsäure-Derivate) ver-

ringern die Fluoreszenz nur. Dagegen zeigen einige *ortho*-*para*-dirigierende Gruppen wie Amino-, Hydroxy- oder Methoxygruppen eine Tendenz, die Fluoreszenz von Arenen zu verstärken. Der abschwächende Einfluß großer Atome wie Brom und Iod wird als „Schweratomeffekt“ beschrieben. Einige ungesättigte Stickstoff-Heterocyclen mit n, π^* -Zustand als niedrigstem angeregtem Zustand fluoreszieren nicht.

Die Fluoreszenzeigenschaften werden außerdem stark von der Umgebung beeinflußt, z. B. vom Lösungsmittel, vom pH-Wert und von der Anwesenheit sonstiger chemischer Spezies^[4, 5]. Die Empfindlichkeit der Fluoreszenzparameter gegenüber Einflüssen aus der unmittelbaren Nachbarschaft der Chromophore macht die Fluoreszenzmarkierung zu einem wertvollen Werkzeug für das Studium von Konformation und dynamischem Verhalten.

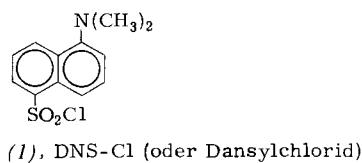
Obwohl unsere Darstellung der Grundzüge der Fluoreszenz organischer Moleküle stark vereinfacht war, soll nun abgeleitet werden, welche Gesichtspunkte bei der Auswahl einer Fluoreszenzsonde (F) – X für Proteine zu berücksichtigen sind [F] und X stehen für einen Fluorophor (fluoreszierenden Chromophor) bzw. für eine reaktive Gruppe]. Erste Voraussetzung ist, daß sich die Emissionsmaxima der Sonden von denen der Proteine unterscheiden. Die Fluoreszenzeigenschaften sollen entweder auf Struktur und Dynamik der Umgebung empfindlich reagieren – dann kann die Gruppe (F) – als Detektor benutzt werden –, oder sie sollen darauf möglichst wenig ansprechen, so daß (F) – als Markierung und als analytisches Hilfsmittel dienen kann. Die Fluoreszenzlebensdauer sollte für die geplanten Untersuchungen ausreichend sein. Zweitens sollte die Struktur der Fluoreszenzsonde die kovalente Bindung an eine spezifische Position des Proteins ermöglichen. Drittens ist eine gewisse Wasserlöslichkeit wünschenswert, da die Verbindung auf die wäßrige Lösung des Proteins einwirken soll. Schließlich wäre es für die spektroskopische Auswertung vorteilhaft, wenn man eine „alles-oder-nichts“-Eigenschaft der Art zur Verfügung hätte, daß das Reagens nicht fluoresziert, wohl aber sein Umsetzungsprodukt mit dem Protein, oder umgekehrt.

Aus diesen Anforderungen ergibt sich die folgende Strategie: a) Als Kompromiß zwischen den einander widersprechenden Wünschen nach aromatischen – und damit hydrophoben – Verbindungen einerseits und Wasserlöslichkeit andererseits sind aromatische Systeme mit zwei oder drei Ringen als Gerüst der Fluorophore zu bevorzugen. b) Es sind zusätzliche Chromophore erforderlich, z. B. Heteroatome im Ring. Eine Modifizierung mit polaren Gruppen kann auch die Wasserlöslichkeit verbessern. c) Wird ein „Detektor“ gewünscht, so muß die Fluoreszenz auf Polarität und andere Faktoren der Umgebung ansprechen. d) Gegebenenfalls muß auch berücksichtigt werden, daß Donor-Acceptor-Wechselwirkungen mit den übrigen Chromophoren, auch z. B. Tryptophanresten von Proteinen, die Absorptions- und Emissionsmaxima beeinflussen. e) Für die spezifische Markierung müssen besondere strukturelle Voraussetzungen geschaffen werden (z. B. Substrat- oder Hapteneähnlichkeit). f) Für die kovalente Bindung müssen organische funktionelle Gruppen ausgewählt werden, die nach beliebigen Mechanismen reagieren können, z. B. heterolytisch, homolytisch oder photochemisch. g) Da es weder für die „alles-oder-nichts“-Eigenschaften noch für die Zusammenhänge zwischen Struktur und Fluoreszenzlebensdauer allgemeingültige Regeln gibt, muß systematisch gesucht werden (siehe auch Tabelle 1 in Abschnitt 9).

4. Kovalente unspezifische Fluoreszenzmarkierung

Wird ein kovalent an ein Protein gebundener Fluorophor mit polarisiertem Licht angeregt, so ist das Fluoreszenzlicht zum Teil ebenfalls polarisiert, allerdings um so weniger, je mehr Brownsche Molekularbewegung zwischen Anregung und Emission stattgefunden hat. Seit Webers bahnbrechender Arbeit^[17] ist 5-(Dimethylamino)-1-naphthalinsulfonylchlorid (DNS-Cl oder Dansylchlorid) (1) bei den meisten Polarisationsexperimenten der Fluorophor der Wahl. Für die Protein-DNS-Derivate wurde, unabhängig von der Art des Proteins, stets eine Fluoreszenzlebensdauer τ von 11 bis 14 ns und eine Polarisation P_0 von etwa 0.4^[18] angenommen. DNS-Cl (1) ist demnach gut für Polarisationsuntersuchungen an modifizierten globulären Proteinen geeignet, die die gleichen hydrodynamischen Eigenschaften wie starre Kugeln mit Molekulargewichten zwischen 10000 und 200000 haben. Über Lösungsmitteneinflüsse auf die Fluoreszenz von DNS-OH und seiner Derivate wurde vor kurzem berichtet^[19].

An Proteinen, die mit (1) und anderen Reagentien modifiziert waren, erbrachte die Polarisationsmethode zahlreiche Da-



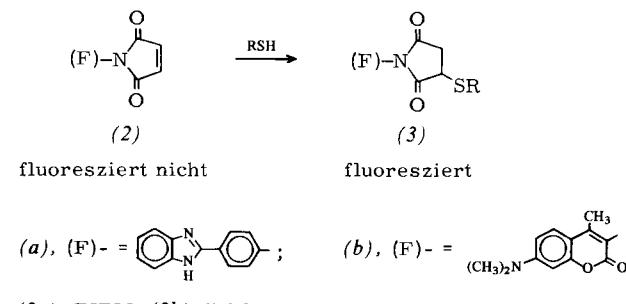
ten über die Rotationsbewegungen und die gegenseitige Orientierung der Moleküle; daraus wurden Aussagen über ihre Starrheit oder Beweglichkeit sowie über ihre Größe und Form abgeleitet. Zur kovalenten Verknüpfung der Proteine mit den Markierungsmitteln gibt es viele Verfahren^[20, 21]. Soll die Methode auf sehr große Proteine mit langen Relaxationszeiten angewendet werden, so sind lange Fluoreszenzlebensdauern τ erwünscht. Es wurden Anthracen-, Pyren- und Fluoren-Derivate dargestellt, die in der Tat größere τ -Werte als (1)-Derivate aufweisen. Leider wird dieser Vorteil, wenigstens zum Teil, durch die niedrigeren P_0 -Werte aufgehoben^[18].

Gleichung (f) zur Bestimmung der Rotationsrelaxationszeit τ_h gilt unter der Annahme, daß die Fluorophore statistisch auf die Proteine verteilt und fest gebunden sind. In vielen Fällen werden Markierungsreagentien jedoch bevorzugt an bestimmte Stellen im Molekül gebunden. Auch können sich die Fluorophore in verschiedenen mikroskopischen Umgebungen befinden und so eine heterogene Emission ergeben. Zahlreiche Beobachtungen legen nahe, daß Seitenketten beweglich sind und flexible Segmente und Untereinheiten rotieren können. An Rinderserumalbumin und γ -Globulin wurden Fluoreszenzspektren, -polarisation, -quantenausbeuten und -lebensdauern in Abhängigkeit vom Markierungsgrad und von der Art der Reagentien untersucht^[22].

5. Gezielte Fluoreszenzmarkierung: Entwicklung von Maleinsäureimiden als Reagentien für Thiole^[23]

Die Thiolgruppe ist ein überaus wichtiges funktionelles Zentrum biologischer Systeme. Man nimmt an, daß viele biologische Phänomene in irgendeiner Weise von Thiolen oder Thiol-Derivaten abhängen^[25]; für ihr Studium ist eine umfangreiche Methodik ausgearbeitet worden. Maleinsäureimide addieren

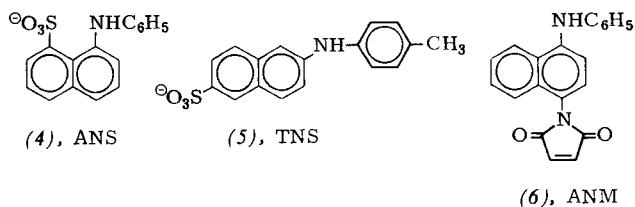
sich leicht an Thiole. Da Thiole als chemisch aktivste Gruppen in der Zelle gelten, kann man wohl davon ausgehen, daß sich bei der Reaktion mit Maleinsäureimiden bevorzugt oder sogar ausschließlich die Thiole umsetzen. Wir fanden schon früher, daß einige *N*-substituierte Maleinsäureimide (2), die selbst nicht fluoreszieren, mit Thiolen leicht zu fluoreszierenden Addukten (3) reagieren^[23a], und bauten diese in Schema 1 dargestellte Umsetzung zu einem empirischen „alles-oder-nichts“-Verfahren^[23d] für diverse fluorometrische Untersuchungen an Thiolgruppen aus.



G-1

Sorgfältige Untersuchungen der Reaktivität, des Hydrolyseverhaltens und der Fluoreszenz vieler Maleinsäureimide und ihrer Hydrierungsprodukte, der Bernsteinsäureimide^[23p], führten zur Entwicklung von Thiolreagentien mit verschiedenen Fluorophoren (F), aber etwa gleicher Reaktivität. Die systematische Suche nach Fluorophoren – ausgehend von substituierten Naphthalinen^[23o] als kleinstem bicyclischem System – erbrachte schließlich *N*-(7-Dimethylamino-4-methyl-2-oxo-3-chromenyl)-maleinsäureimid (DACM) (2b), das als vielversprechendes Reagens dieses Typs bei größeren Wellenlängen fluoresziert und in Wasser besser löslich ist als (1)^[23l]. Einer der Gesichtspunkte bei der Entwicklung von DACM war die Verbesserung der Löslichkeit durch Verwendung der polaren Gruppen Cumaryl und Dimethylamino als Auxochrome.

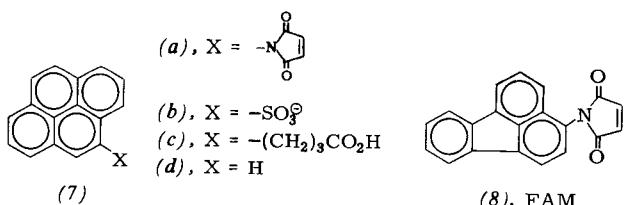
Unter den zuerst geprüften Maleinsäureimiden erwies sich *N*-[*p*-(2-Benzimidazolyl)phenyl]maleinsäureimid (BIPM) (2a) als praktisch verwendbar; auf (2a) gründet sich eine sehr empfindliche fluorometrische Bestimmungsmethode für Thiole^[23f]. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0.01 µg reduziertem Glutathion. BIPM reagiert spezifisch mit Thiolgruppen des Eialbumins zu fluoreszierenden Addukten; auch dies bestätigt die Eignung von Reagentien dieses Typs zur Proteinmodifizierung^[23k]. Aufgrund dieser Befunde wurden kinetische Untersuchungen der Reaktivität von Thiolgruppen in Proteinen durchgeführt. Durch Vergleich der Parameter für die Thiolgruppen in Takaamylase A und Myosin A wurde der Status der Thiolgruppen in diesen Proteinen untersucht^[23j]. BIPM verhindert die Bildung von Polyphenylalanin in zellfreien *E.-coli*-Systemen; das ist ein chemischer Beweis für die Beteiligung von Thiolgruppen des ribosomalen Proteins^[23e]. – Wegen seiner günstigen Fluoreszenzeigenschaften



kann für DACM eine umfangreiche Anwendung vorausgesagt werden^[23r].

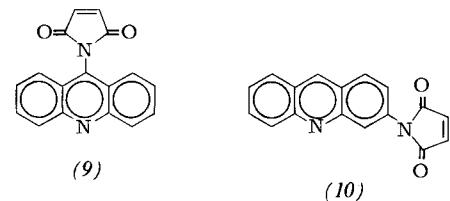
N-Arylaminonaphthalinsulfonate wie ANS (4) und TNS (5) werden als empfindliche Sonden für die Polarität ihrer Umgebung eingesetzt: Bei fallender Umgebungspolarität steigt die Quantenausbeute, und das Emissionsmaximum verschiebt sich nach blau^[1-3, 24]. Das Emissionsspektrum scheint besonders stark durch Umorientierungen der Solvenshülle während der Lebensdauer des angeregten Zustandes beeinflußt zu werden. Die Relaxation hängt von den Dipolmomenten der angeregten Zustände dieser Fluoreszenzchromophore ab, die groß gegenüber dem Dipolmoment im Grundzustand sind; daneben spielen Dipolmoment und Beweglichkeit des Lösungsmittels eine Rolle^[3, 24]. Einer der Nachteile bei Verwendung hydrophober, nicht kovalent an das Protein gebundener Reagentien besteht darin, daß es häufig unmöglich ist, die beteiligten Positionen im Molekül zu bestimmen. Ganz sicher sind die kovalent am Protein fixierten Fluorophore wertvollere Hilfsmittel. Die Chloride von (4) und (5) bilden zwar kovalente Bindungen, reagieren aber unspezifisch mit allen nucleophilen Stellen des Proteins.

N-(4-Anilino-1-naphthyl)maleinsäureimid (ANM) (6) vereinigt als Reagens für Thiolgruppen die selektive Reaktionsfähigkeit der Maleinsäureimide mit den spektralen Eigenschaften der Arylaminonaphthaline^[23g]. Wie erwartet erwies sich ANM als nützliches hydrophobes Agens für Thiolgruppen in Proteinen. Die auffällige Lösungsmittelabhängigkeit der Fluoreszenzspektren der ANM-Derivate wurde in Form von Z-Werten nach Kosower beschrieben. Zum Beispiel wurde die Hydrophobie in der Umgebung des reaktiven Thiols in Eialbumin auf 74 bis 79 Z beziffert^[23g, 23p]. Mit dem Reagens (6) wurde auch die unterschiedlich hydrophobe Natur der Thiole in den Elongationsfaktoren der Proteinsynthese aufgezeigt^[26]. Die durch Calcium-Ionen induzierte Konformationsänderung in einem kontrahierenden System wie dem Actin-Tropomyosin-Troponin-Komplex wurde durch Markieren des F-Actins mit ANM untersucht^[23h, 23i, 23n]. Eine neue Technik zur Untersuchung der Orientierung von Proteinen in Membranen, die auf einer Analyse der Winkelverteilung der Polarisation beruht, wurde an ANM-markierten Musklemembranen entwickelt^[23s].

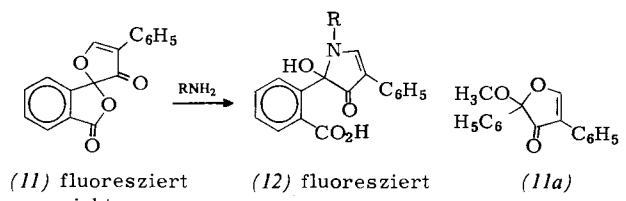


Die Fluoreszenzlebensdauern der Addukte aus Proteinen und den aufgeführten Reagentien betragen weniger als 10 ns; das ist für die Untersuchung komplexer biologischer Systeme unter Beteiligung großer Proteine zu kurz^[23l]. Auf der Basis der empirischen Regel (siehe Abschnitt 5) wurde *N*-(4-Pyrenyl)maleinsäureimid (7a) dargestellt, dessen Proteinaddukte Fluoreszenzlebensdauern um 100 ns besitzen^[28]. Durch Screening vieler polycyclischer Arene konnten wir der Reagentienliste ein neues „Zeitnormal“ im Bereich mittlerer Lebensdauern hinzufügen, nämlich *N*-(4-Fluoranthyl)maleinsäureimid (FAM) (8), dessen Proteinaddukte Fluoreszenzlebensdauern von etwa 20 ns haben^[23m]. Es wird weiterhin versucht, nütz-

liche Fluorophore zu finden, wie es z. B. die Acridin-Derivate (9) und (10) sind^[23a, 27].



Bemerkenswerte Fortschritte konnten auch bei der Markierung von Aminogruppen erzielt werden. Nicht fluoreszierende Hydroxysfuranone reagieren mit Aminen zu den stark fluoreszierenden Pyrrolin-4-onen^[29a, 29b] (Schema 2). 4-Phenylspiro-[furan-2,1'-phthalan]-3,3'-dion (11) eignet sich zum fluorometrischen Nachweis von Proteinen in Nanogrammengen^[29c], ebenso als empfindliches Aminosäurerereagens^[29d, 29e]; (11a) wurde zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen verwendet^[29b].

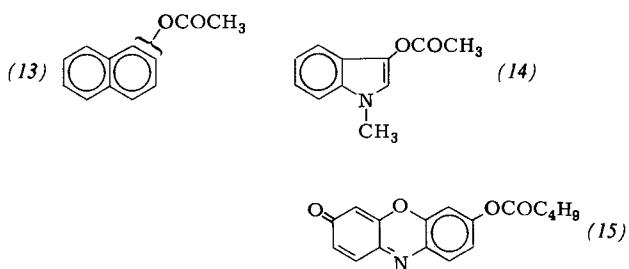


Schema 2.

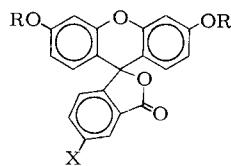
6. Spezifische Fluoreszenzmarkierung: Enzymbestimmung

Bei fluoreszierenden Molekülen für die Enzymforschung (siehe Abschnitt 3) müssen die Fluorophore so in die Substratmoleküle eingebaut sein, daß diese weiterhin als Substrate dienen können und die Fluorophore sich spektroskopisch nachweisen lassen. Möglichkeiten hierzu bestehen; viele Enzyme können das zusätzliche Volumen unterbringen, ohne daß dadurch das aktive Zentrum blockiert wird, das ja besondere strukturelle Bedingungen erfüllen muß^[30, 31]. Hier interessieren vor allem diejenigen Substrate, die für längere oder kürzere Zeit kovalente Bindungen eingehen; daneben werden auch einige fluoreszierende Gleichgewichtsinhibitoren behandelt, die mit den Proteinen in nicht-kovalenten Wechselbeziehungen stehen.

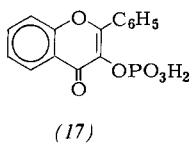
Da fluorometrische Methoden im allgemeinen um Größenordnungen empfindlicher sind als Methoden, bei denen sich Farbstoffe bilden, ist eine erhebliche Empfindlichkeitssteigerung der Messungen zu erwarten ($\approx 10^{-9}$ mol/l). Bei vielen Enzymbestimmungen wurde die Fluorometrie bereits mit Erfolg angewendet^[32-35]. Besonders wertvoll sind „alles-oder-nichts“-Verfahren: Fluorogene Substrate fluoreszieren nicht,



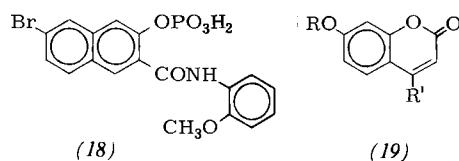
werden aber durch das Enzym in fluoreszierende Produkte überführt. Die Methode wurde oft zur Bestimmung hydrolytisch wirkender Enzyme benutzt; dabei entsteht aus einem nicht fluoreszierenden Ester ein stark fluoreszierender Alkohol. Naphthylacetate (13)^[35a] sowie *N*-Methyl-3-indolylacetat (14)^[35a] und Resorufinbutyrat (15)^[35a] wurden zur Bestimmung von Cholinesterasen herangezogen. Dibutyrylfluorescein (16a), R=R'=Butyryl, wurde zum Nachweis von Lipasen^[35a, 36], das Bis(β-D-galaktopyranosid)^[37] und das 3-*O*-Methylphosphat^[38, 39] zum Nachweis von Galaktosidase bzw. Phosphatasen benutzt. Phosphatasen lassen sich auch mit den Phosphaten (17)^[39] und (18)^[35d] bestimmen. Riboflavin-5-phosphat diente dem gleichen Zweck bei einem histochemischen Verfahren^[40].



(16a), X = H
(16b), X = NCS



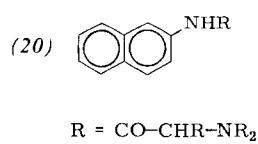
(17)



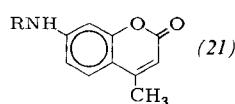
(18)

(19)

In zahlreichen Fluorophoren trifft man das Cumaringerüst an. Oft wurden Ester des Umbelliferons (7-Hydroxycumarin) (19) oder seiner 4-Methyl-Derivate (19), R'=CH₃, als fluorene Substrate für hydrolytisch wirkende Enzyme verwendet. Das Phosphat^[35e] eignet sich hervorragend zur Bestimmung von Phosphatasen; viele andere Ester wurden für Kohlenhydrat-Hydrolasen herangezogen^[33, 34]. Ähnlich werden zum Nachweis von Peptidasen und Proteasen die miteinander verwandten Naphthalin- und Cumarsinsysteme benutzt. Die β-Naphthylamide (20) von Phenylalanin^[41], L-Leucin^[42] und

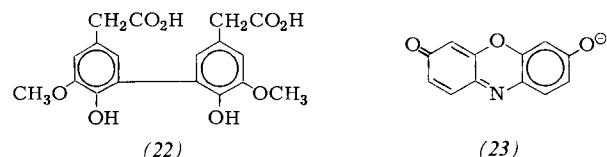


R = CO-CHR-NR₂



(21)

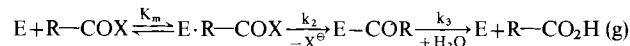
Cystin^[42] wurden bei Aminopeptidase-, Leucinaminopeptidase- bzw. Oxytocinase-Bestimmungen angewendet. Nachweisreaktionen auf Carboxypeptidase machten von *N*-(β-Naphthylloxycarbonyl)phenylalanin Gebrauch^[43, 44]. Wir fanden kürzlich, daß das L-Leucin-Derivat von (21) das Substrat der Wahl für Leucinaminopeptidase ist^[45]. Das Benzoyl-L-arginin-Derivat von (20) wurde für den Trypsin-Nachweis benutzt^[46a]. Weitere Verbesserungen sind vom entsprechenden Derivat mit Cumaringerüst [(21)] zu erwarten^[46b]. Es folgen Beispiele für den Nachweis oxidierender Enzyme. Die nicht fluoreszierende Homovanillinsäure wurde enzymatisch zum fluoreszierenden Dimer (22) oxidiert^[35f]. Dehydrogenasen können über die Umwandlung von Resazurin (Resorufin-*N*-oxid) zum Resorufin-Anion (23) unter Beteiligung des NAD-NADH- oder des NADP-NADPH-Systems bestimmt werden^[35a].



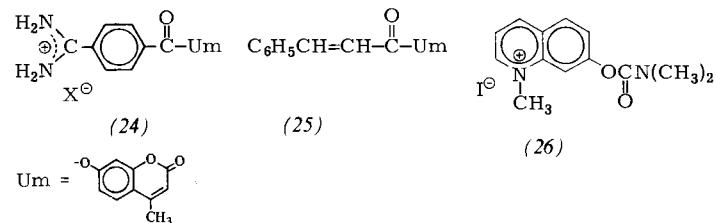
(22)

(23)

Der typische Reaktionsweg einiger hydrolytischer Enzyme (E) läßt sich mit dem Acylenzym-Modell [Gl. (g)] formulieren; X[⊖] ist die Abgangsgruppe und E-COR das intermedial gebildete Acylenzym.



Bei quantitativen Untersuchungen an Enzymen zeigt es sich immer stärker, daß es sinnvoll ist, die Konzentration der aktiven Zentren zu bestimmen und nicht irgendwelche Aktivitätseinheiten zu verwenden^[47]. Wesentliche Merkmale eines brauchbaren „Titrimetrischen“ sind: großes k₂, kleines k₃ und kleines K_m. In Verbindung (24) ist die protonierte *p*-Amidinobenzoylgruppe, die eine starke Affinität zum aktiven Zentrum des Trypsins besitzt^[48a], mit einem 4-Methylumbelliferonrest verknüpft. Aus der fluorometrischen Titration der Spaltung [Bildung von X[⊖] in Gl. (g)] und der Kinetik im stationären Zustand ergibt sich, daß (24) als Fluoreszenztitrationsmittel für Trypsin gut geeignet ist; für Chymotrypsin kann der Zimtsäureester (25) benutzt werden^[48b]. Die analogen Ester der protonierten *p*-Guanidinobenzoates und der



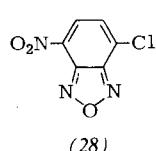
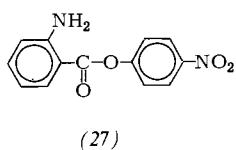
p-trimethylamino-substituierten Zimtsäure sind zur Titration von Trypsin bzw. Chymotrypsin verwendbar^[49]. 7-(Dimethylcarbamoyloxy)-1-methylchinoliniumiodid (26) wurde für Acetylcholinesterase benutzt^[50].

7. Untersuchungen zur Wirkungsweise von Enzymen

Konformationsänderungen bei der proteolytischen Aktivierung von Enzymvorläufern wurden an Chymotrypsinogen mit DNS-substituierten Peptiden [siehe (1)] untersucht^[51], ferner an Pepsinogen mit 6-(*N*-Methylanilino)-2-naphthalinsulfonyl-(MANS)-Peptiden^[52a, 52b] und an Fluorescein-markiertem Prothrombin^[53]. Es wurde vorgeschlagen, daß Chymotrypsinogen das Bindungszentrum bereits enthält^[51]. Eine Veränderung der Emission ließ sich bei der reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken in DNS-substituierter Takaamylase beobachten^[54]. Bei Trypsinogen wurde eine Aminogruppe in einen Tyrosinrest eingebaut; nach ihrer Markierung mit DNS-Cl konnte der Aktivierungsvorgang anhand der Fluoreszenz der DNS-Gruppe verfolgt werden^[55]. Andererseits diente DNS-Cl auch als Affinitätsmarkierung, mit der sich das Thyroxin-Bindungszentrum von Präalbumin lokalisieren ließ^[56].

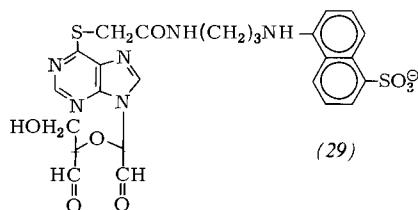
Antranilsäure-*p*-nitrophenylester (27) inhibiert α-Chymotrypsin irreversibel durch Reaktion mit dem aktiven Zentrum^[57], setzt sich dagegen mit Chymotrypsinogen nicht um.

Die Fluoreszenzspektren zeigen, daß die Umgebung des aktiven Zentrums polar ist. Die Polarisations- und Emissionskine-

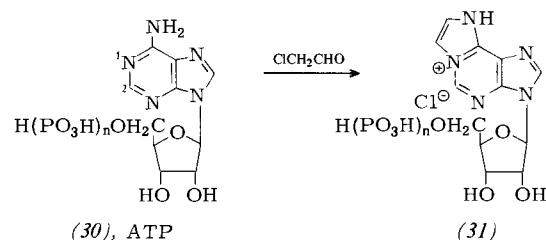


tit der Fluoreszenz im Nanosekundenbereich wies auf ein starres aktives Zentrum des Acylenzyms und auf eine eingeschränkte freie Drehbarkeit des Chromophors hin^[2, 57]. 4-Chlor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (28), ein Fluoreszenzreagens für Thiolgruppen^[58a, 58b], setzt sich mit Cystein-25 im aktiven Zentrum des Papains um^[59]. Auch bei der Untersuchung der Coenzym-induzierten Strukturveränderungen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase wurde (28) verwendet^[58c]. Wir fanden kürzlich, daß einige Ester, deren Abgangsgruppe eine kationische Stelle enthält, von Trypsin leicht hydrolytisch gespalten werden, wobei Acyltrypsin entsteht^[60a]. Nach dieser Technik des „inversen Substrates“ wurde eine DNS-Gruppe spezifisch in das aktive Zentrum des Trypsins eingebaut^[60b].

Ein fluoreszierendes Nucleotid mit der Teilstruktur (29) wurde zur Affinitätsmarkierung der Initiationsstelle der Ribonucleinsäure-Polymerase aus *E. coli* benutzt und kovalent an die β -Untereinheit gebunden^[61]. Das inaktive markierte Enzym behält seine Fähigkeit zur Bindung an DNA und an Nucleosidtriphosphate. Aus Energiestraffermessungen (vgl. Abschnitt 8) weiß man, daß die Initiationsstelle und der Rifampicin-Bindungsort mindestens 37 Å voneinander entfernt sind.



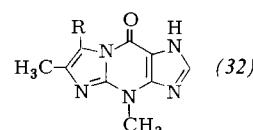
Möglichkeiten zur Verstärkung der Fluoreszenz von Purinen und Pyrimidinen sind die Vergrößerung des konjugierten Systems durch Anellierung ungesättigter Ringe und durch Quaternierung von Ring-Stickstoffatomen (vgl. Abschnitt 3). Eine solche Abwandlung der Fluoreszenz eines nucleotidhaltigen Coenzymes gelang nach Schema 3 bei Adenosintriphosphat (ATP) (30), $n=3$ ^[62a]. Auf diese Weise wurden mehrere Coenzym-Derivate für Fluoreszenzuntersuchungen zugänglich. Zum Beispiel ist ϵ -ATP (31), $n=3$, kein Substrat der Glühwürmchen-Luciferase. Synthetisches Luciferyl- ϵ -AMP dagegen wird unter Leuchterscheinung von Luciferase oxidiert^[62b]. ϵ -ATP verbindet sich zwar mit Aspartat-Transcarbamylase,



Schema 3.

inhibiert im Gegensatz zu ATP jedoch das Enzym; daraus läßt sich schließen, daß N¹ des Purinrings für die ATP-Aktivierung von entscheidender Bedeutung ist^[62c]. Die Adenylylierung eines Tyrosinrestes in den Untereinheiten der Glutamin-Synthetase spielt bei der Regulation dieses Enzyms in *E. coli* eine wichtige Rolle. ϵ -Adenylylierte Glutamin-Synthetase diente bei der Untersuchung der Enzymkonformation und der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten als „interne“ Fluoreszenzsonde^[63].

Kinetische Methoden^[64] werden bei Fluoreszenzuntersuchungen immer häufiger angewendet. Drei Zeitmaßstäbe stehen zur Verfügung: Elektronenübergänge (S₁-Lebensdauer), Diffusion (Rotationsrelaxationszeiten) und chemische Reaktionen (chemische Relaxationszeiten)^[64a]. In Tabelle 1 (Abschnitt 9) ist versucht worden, Reagentien zur Fluoreszenzmarkierung zusammenzustellen; obwohl nicht-kovalente Gruppen nicht unser eigentlicher Gegenstand sind, wurden auch einige neuere Reagentien für die Stopped-flow- ($>10^{-4}$ s) und die Temperatursprungtechnik ($>10^{-6}$ s) aufgeführt. Die Art der Bindung an allosterische Zentren von Enzymen wurde im Hinblick auf Regulationsvorgänge untersucht^[65]. Wie die Beobachtung von Zwischenstufen zeigte, bewirkt die Bindung von NAD⁺ an Leber-Alkohol-Dehydrogenase eine Konformationsänderung, die möglicherweise mit einer Protonenabspaltung gekoppelt ist^[66]. Mit Hilfe der Fluoreszenz der natür-



lich vorkommenden Y-Base (32) konnte die Bindung von tRNA^{Ph} (Hefe) an die entsprechende Synthetase untersucht werden^[67]. Die Kinetik der Gleichgewichtseinstellung bei der Aktivierung von L-Isoleucin durch Ile-tRNA-Synthetase wurde mit TNS [siehe (5)] untersucht; von allen Reaktanden setzt sich Isoleucin am langsamsten mit dem Enzym um^[68]. Die Wirkung von Papain wurde mit N-MANS-Oligopeptiden als fluoreszierenden Peptidsubstraten untersucht^[52c] (MANS = 6-(*N*-Methylanilino)-2-naphthalinsulfonyl). Es handelt sich um eine zweiphasige Reaktion, d. h. der zuerst gebildete Enzym-Substrat-Komplex wird in einem Prozeß erster Ordnung in einen anderen Komplex umgewandelt, dessen Spaltung die Endprodukte ergibt.

8. Energieübertragung und andere Methoden

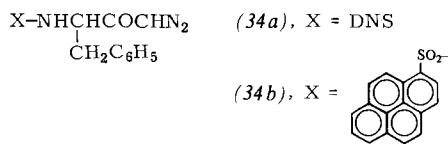
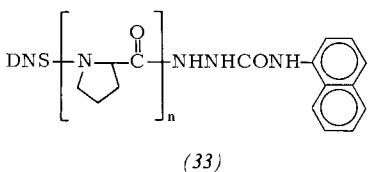
Die strahlungslose Übertragung von Anregungsenergie über größere Entferungen innerhalb eines Moleküls erlaubt Abstandsmessungen; von dieser Möglichkeit wurde bei Untersuchungen von Biopolymeren Gebrauch gemacht. Nach Förster findet ein Singulett-Singulett-Übergang durch Resonanzwechselwirkung des Dipolpaars aus den Chromophoren von Energiedonor und Energieacceptor statt^[2, 6, 8, 13, 69]. Die Entfernung R₀ (bei der der Wirkungsgrad 50 % beträgt) ist mit spektroskopischen und geometrischen Parametern durch Gl. (h) verknüpft. Darin ist n der Brechungsindex, k_f die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz des Donors [Gl. (c)], J das spektrale Überlappungsinintegral und τ_{D^*} die Lebensdauer des Donors bei Abwesenheit des Acceptors. K ist ein Faktor für die Orientierung von Donor und Acceptor. Allgemeine Vor-

aussetzung für den Übergang der Anregungsenergie ist eine Überlappung des Donor-Fluoreszenzspektrums mit dem Absorptionsspektrum des Acceptors. Gleichung (h) gilt für Abstände von etwa 10 bis 70 Å. Die experimentelle Bestimmung der Parameter wurde bereits beschrieben^[8, 69]. Die Entfernung zwischen Donor und Acceptor (r) ergibt sich aus Gl. (i); darin ist E der Wirkungsgrad des Überganges.

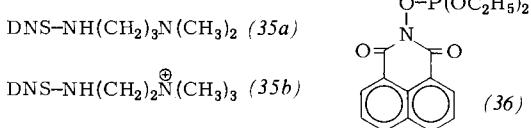
$$R_0 = (8.71 \times 10^{23} \text{ JK}^2 \text{ k}_f \tau_{D^0} n^{-4})^{1/6} [\text{\AA}] \quad (h)$$

$$E = \frac{r^{-6}}{r^{-6} + R_0^{-6}} \quad (i)$$

Die Förstersche Beziehung ist gut gesichert. Mehrere Systeme mit Donor-Acceptor-Paaren wurden synthetisiert und die Entfernung anhand der Theorie berechnet^[70]. Als flexible Modelle mit der Indolgruppe von Tryptophan (Trp) als Donor und der DNS-Gruppe als Acceptor dienten *N*-DNS—Trp^[69b, 71] und DNS—NH(CH₂)_n—CO—Trp (n = 1 bis 10)^[71]. Der Abstand r wuchs mit der Kettenlänge n. Mehrere experimentelle Techniken wurden anhand des DNS²¹—ACTH(1–24)tetrakosapeptids, das Trp in Position 9 enthält, verglichen^[69b, 73]. Zur Festlegung der Abstände dienten die substituierten starren Oligomere von Poly-L-prolin (33), in denen der Donor (α -Naphthyl) und der Acceptor (DNS) Abstände zwischen 12 und 46 Å aufweisen^[72]. Die Ergebnisse stimmten mit den Voraussagen von Gl. (i) (Abhängigkeit von r^{-6}) ausgezeichnet überein.

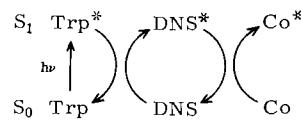


Pepsinsubstrat-Analoga vom Typ (34), die einen Acceptor-Fluorophor enthalten, wurden kovalent an das aktive Zentrum von Pepsin gebunden^[74]. Anschließend wurden die Energieübertragungsvorgänge untersucht. (35a) ließ sich als reversible Sonde für das anionische Zentrum der Cholinesterase verwenden, Maretin (36) diente als Sonde für das esteratische Zentrum;



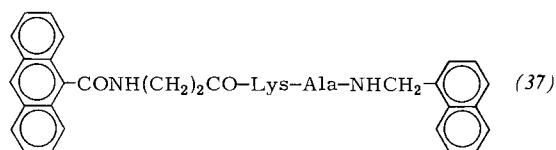
mit dem so modifizierten Enzym wurden Messungen der Kinetik und der Abstände ausgeführt^[75]. Es wurde eine Energieübertragungskette mit drei Komponenten – Cobalt-Carboxypeptidase, DNS-substituierten Peptiden als Substraten [DNS—(Gly)_n—Trp; n = 1 bis 3] und Tryptophanresten des Enzyms entworfen^[76]. Entsprechend Schema 4 diente die DNS-Gruppe als Acceptor der Trp-Anregungsenergie und zugleich als Donor für das Cobaltatom. Die Energieübertragung

zwischen Trp und der DNS-Gruppe zeigt die Bildung und den Zerfall der Enzym-Substrat-Komplexe schnell an; der anschließende Energieübergang von der gebundenen DNS-Gruppe auf das Cobaltatom ermöglicht dann die Berechnung des Abstands zwischen diesen Bestandteilen. Dieses interessante System eröffnet vielfältige Möglichkeiten, Energieübertragungstechniken für mechanistische Studien an Enzymen heranzuziehen.



Schema 4.

Die tryptische Spaltung von (37) zwischen Lys und Ala lässt sich anhand der Fluoreszenzverstärkung eines Donors (Naphthalin) verfolgen, da durch die Reaktion die Energie-

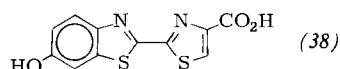


übertragung auf den Acceptor (Anthracen) unterbrochen wird^[77]. Aspartat-Transcarbamylase wird über eine Rückkopplung durch Nucleotide reguliert. Die Substrate werden an sechs katalytische Zentren und die nucleotidischen Effektoren an sechs regulatorische Zentren je Enzymmolekül gebunden. Mit den Tryptophanresten der katalytischen Untereinheit als Donorgruppen wirken als Acceptoren entweder Pyridoxaminphosphat (kovalent an eine Aminogruppe des aktiven Zentrums gebunden) oder ANS (nicht-kovalent gebunden) zusammen^[78b]. Die Pyridoxamin-Markierung wirkt ihrerseits als Donor, wenn 2-Hydroxy-5-nitroquecksilber(II) („Mercurim-trophenol“), gebunden an die Thiolgruppe im katalytischen Zentrum, der Acceptor ist. Die beobachtete Energieübertragung ermöglichte die Bestimmung des Abstandes zwischen diesen spezifischen Positionen.

Die topologischen Methoden auf der Basis der Energieübertragung in Proteinen werden derzeit noch weiter verfeinert^[79]. Die Berechnung von K²-Werten [siehe Gl. (h)] aus Messungen der Polarisationsabnahme während der Energieübertragung ist in einem Übersichtsartikel beschrieben^[80] (siehe dazu Abschnitt 9). Circularpolarisation tritt bei konformativer Asymmetrie der angeregten Moleküle auf^[81]. Außerdem wurden Wechselwirkungen von Dehydrogenasen mit ϵ -ADP [vgl. (31)] durch Verfolgung der Strukturänderungen bei der Coenzymbindung erkannt^[81c, 81d].

Zu den wichtigsten und aussichtsreichsten Methoden bei Fluoreszenzuntersuchungen gehören Messungen im Nanosekunden-Bereich^[13]. Es wurde beispielsweise ein Protein-Farbstoff-Komplex aus Rinderserumalbumin und TNS [siehe (5)] untersucht, ebenso ein Komplex aus Cystathionase und ihrem Coenzym mit Pyridoxylaminosäuren^[82]. Vor kurzem erschien ein Bericht über das Abklingen der Fluoreszenzanisotropie^[83]. Mit Hilfe der Nanosekundentechnik kann die Ionisationsgeschwindigkeit im angeregten Zustand direkt gemessen werden. So wurde die Geschwindigkeit der Protonenübertragung auf Dehydroluciferin (38) und seinen Komplex mit Luciferase untersucht^[84a]. Neue fluoreszierende und im angeregten Zu-

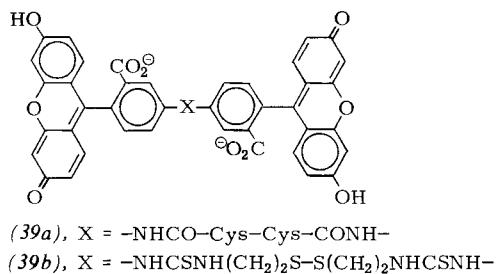
stand ionisierbare Reagentien wurden vorgeschlagen; sie können als Sonden für Mikro-Umgebungen und als empfindliche Detektoren für konformative Veränderungen dienen^[84b].



9. Anwendungen der Fluoreszenzmarkierung zur Untersuchung von Antikörpern, Membranen und anderen komplexen Systemen

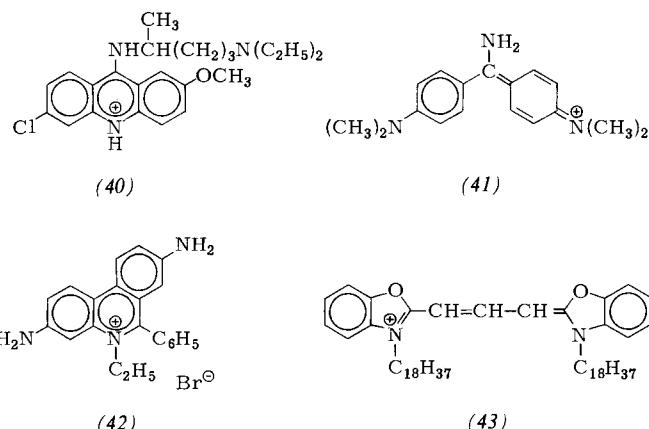
Fluorometrische Methoden wurden auch zum Studium der Immunreaktion herangezogen. Beobachten ließen sich das Quenching der Antikörperfluoreszenz durch Haptene, die Veränderung der Haptenfluoreszenz durch Antikörper sowie Polarisationserscheinungen^[81]. Die meisten Versuche zur Antikörper-Hapten-Wechselwirkung wurden allerdings mit nicht-kovalent gebundenen Fluoreszenzreagentien ausgeführt. Zum Beispiel wurden Anti-DNS-Antikörper mit ε-DNS-Lys titriert^[85]; die Herstellung von Anti-MANS-Antikörpern wurde vor kurzem beschrieben^[86]. Die Möglichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie im Nanosekundenbereich beim Studium von Systemen mit großen Proteinen wurden am Beispiel des DNS-Lys/Anti-DNS-Antikörper-Komplexes geprüft^[13, 87]. Die Experimente zur Emissionsanisotropie der DNS-Gruppe, die im aktivierten Zentrum von Immunglobulin G (IgG) sowie der F(ab')₂- und Fab-Fragmente gebunden war, ergaben eine diskrete Beweglichkeit des Antikörpers, die mit der Vorstellung einer flexiblen Verbindung zwischen dem Fab-Fragment und der schweren Kette vereinbar ist^[13, 87]. Untersuchungen mit circular und linear polarisiertem Licht an einem Komplex aus DNS-Derivaten und Anti-DNS-Antikörpern ergaben, daß die Asymmetrie durch die Komplexbildung induziert wird^[88]. Kinetische Studien der Reaktionen zwischen Fluorescein und dem Anti-Fluorescein-Antikörper wurden mit Hilfe von Messungen der Fluoreszenzpolarisation nach der statischen (≈ 5 s) und der Stopped-flow-Methode (≈ 5 ms) ausgeführt^[89]. Im wesentlichen wird die Stabilität des Hapten-Komplexes durch die Dissoziationsgeschwindigkeit bestimmt.

Zur Untersuchung der Gestalt des IgG-Moleküls in Lösung wurde ein hybrider Antikörper hergestellt: Eine Position war spezifisch an den Donor ϵ -DNS-Lys gebunden, die andere an den Acceptor Fluorescein (FLC)^[85b, 90]. Mit der Energieübertragungstheorie wurde der Abstand der beiden Haptens-Bindungszentren sowie der Winkel zwischen den Fab-Fragmenten berechnet; danach besitzen die IgG-Moleküle eine offene Y- oder T-förmige Gestalt^[90a]. Der Acceptor FLC wurde durch Disulfidaustausch mit dem FLC-Cystein-Derivat (39a)^[90a] mit den beiden Thiolgruppen kovalent verbunden, die durch selektive Reduktion der Disulfidbrücke zwischen den schweren Ketten des Anti-DNS-Antikörpers entstehen. In

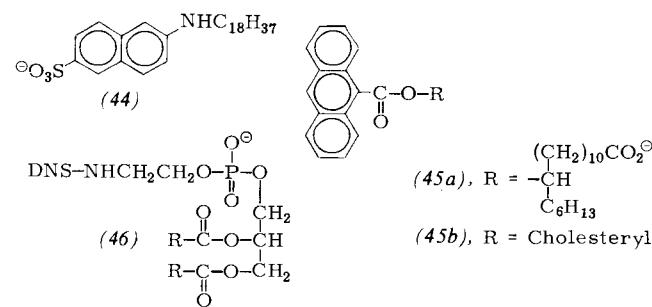


einem anderen Experiment mit $(\text{Fab}')_2$ -Fragmenten wurden die Thiolgruppen durch Spaltung der Disulfidbrücke zwischen der leichten und der schweren Kette der Fab-Fragmente erzeugt. Abstandsbestimmungen an diesen Systemen mit Hilfe der Abklingkinetik im Nanosekundenbereich ermöglichen die Lokalisierung dieser kettenverbindenden Disulfidgruppen und führen schließlich zu einer Vorstellung der Dimensionen von IgG.

Von den vielen Fluoreszenzreagentien, die bei Untersuchungen von Membranen und Makrostrukturen eine Rolle spielten, werden die meisten nicht-kovalent gebunden. Membranen sind aus höchst komplexen chemischen Bestandteilen aufgebaut, die sich nicht notwendigerweise auf Proteine beschränken. Da bereits etliche Übersichtsartikel vorliegen^[13, 91], werden hier lediglich einige typische Fluorophore angeführt. Zum Studium der Oberflächenladungen von Membranen wurden Anionen verwendet; für die Lipide wurden Anionen benutzt,



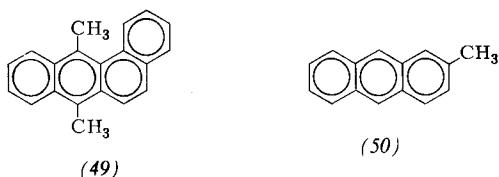
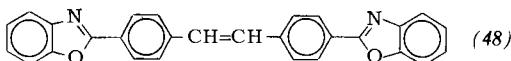
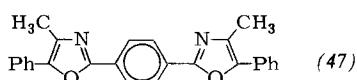
die ihren Platz im Lipidteil finden; als „Energiesonden“ in anregbaren Membranen setzte man organische Anionen wie ANS (4) und TNS (5)^[92] neben Kationen ein^[95b]. Mit (35b) wurde der membrangebundene cholinerge Rezeptor untersucht^[93]. Aus einer Serie von Aminoacridinen zeigen wir das Chinacrin-Derivat (40)^[94a]. Weitere Beispiele kationischer Reagentien sind Auramin O (41)^[94b], Ethidiumbromid (42)^[95a] und die Polymethinverbindung (43)^[91c].



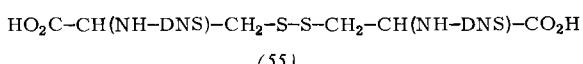
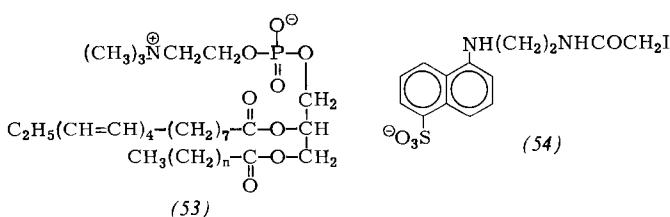
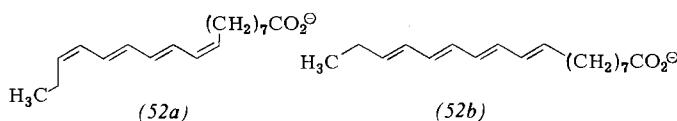
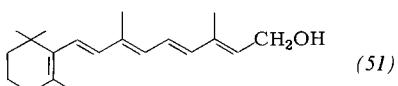
Beispiele für Anionen sind 6-(Octadecylamino)-2-naphthalsulfonat (44)^[91b, 96], 12-(9-Anthroyl)stearinsäure (45a)^[91c, 91e, 96], N-DNS-Phosphatidylethanolamin (46)^[91b, 96] und 4-Pyrensulfonat (7b)^[91d].

Neutrale Moleküle sind: *p*-Bis(4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl)benzol (47)^[91c], das Bisbenzoxazol-Derivat (48)^[96], 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (49)^[97b] und 2-Methylanthracen (50)^[97a].

Auch Fettsäure-Derivate mit einem Polyenfluorophor wurden herangezogen: Retinol (51)^[91d], zwei isomere 9,11,13,15-Octadecatetraensäuren (52a) und (52b)^[95c] und Verbindung



(53), ein Lecithin-artiges Derivat von (52a)^[95c]. Diese Reagentien wurden wegen ihrer unterschiedlichen Ladung, Lipophilie, Starrheit, Form und Größe verwendet. Die Fluoreszenz des Pyrenexcimers wurde bei der Markierung von Micellen^[98a] und Vesikeln^[98b, 98c] eingesetzt. 5-(Iodacetylaminooethylamino)-1-naphthalinsulfonat (54)^[99a, 99b] und (28)^[78c] sind Bei-

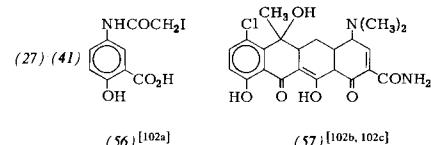


spiele kovalent bindender Reagentien für Membranen. Bewegungsvorgänge von Proteinen in anregbaren Membranen wurden an der kovalent gebundenen DNS-Gruppe durch Messung der Fluoreszenzanisotropie im Nanosekundenbereich verfolgt^[100a], ebenso die Wechselwirkung von Enzymen mit Membranen^[100b]. Ein Multienzymkomplex konnte mit der Energieübertragungsmethode analysiert werden^[78a]. Ähnlich wurden mit (54), Di-DNS-Cystin (55) und (39b) als kovalent gebundenen Fluorophoren, von denen Energie auf Retinal übergeht, Nachbarbeziehungen in Rhodopsin untersucht^[101].

In Tabelle 1 sind Strukturen von Fluoreszenzreagentien zusammengestellt, auch von solchen, die im Text nicht erwähnt wurden.

Tabelle 1. Reagentien zur Fluoreszenzmarkierung.

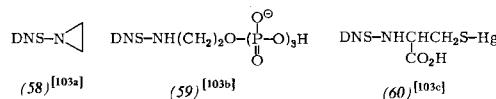
Benzol-Derivate



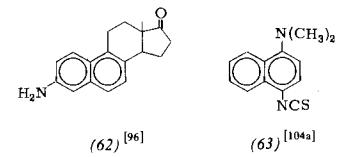
3-Salicylat und 19-Salicylyhydrazone des Strophanthidins [102d]

Naphthalin-Derivate

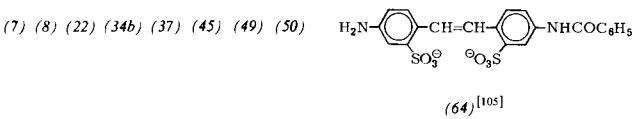
(1) (4) (5) (6) (13) (18) (20) (29) (33) (34a) (35) (36) (44) (46) (54) (55)



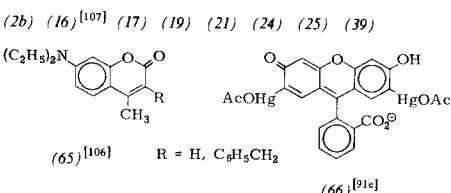
2-(N-DNS-Aminoethyl)-1-thio-β-D-galaktopyranosid (61a) [104]
und sein 2-(N-DNS-Aminohexyl)-Derivat (61b) [104]



Andere Arene

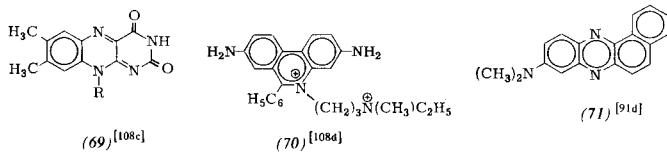
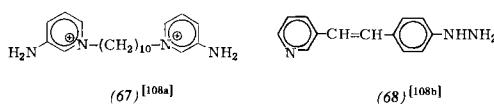


Sauerstoff-Heterocyclen



Stickstoff-Heterocyclen

(2a) (9) (10) (11) (11a) (14) (15) (23) (26) (28) (31) (32) (38) (40) (42) (43) (47) (48)



Polyene

(51) (52) (53)

10. Schlußbemerkungen

Unter den Methoden zur Untersuchung von Struktur und dynamischem Verhalten von Makromolekülen ist die Fluoreszenzspektroskopie eine der empfindlichsten und vielseitigsten. Die Anwendungsmöglichkeiten von Fluoreszenzsonden zum

besseren Verständnis biologischer Systeme wachsen rasch. In Verbindung mit den Techniken zur Untersuchung von Gleichgewichtszuständen machten die Fortschritte der Nanosekunden-Fluoreszenzspektroskopie die direkte Messung zeitabhängiger Vorgänge möglich; dadurch werden sich wertvolle Informationen über Struktur und Wirkungsweise von Makromolekülen gewinnen lassen. Ein erstrebenswertes Ziel ist die Entwicklung noch besserer Fluoreszenzreagentien, die je nach Bedarf an bestimmte Stellen der Proteine gelenkt werden können und dabei speziellen spektroskopischen Bedürfnissen gerecht werden. So besteht zum Beispiel Bedarf an gut definierten Systemen wie dem jeweils passenden Donor-Acceptor-Paar, einer Palette von Verbindungen mit abgestufter Lebensdauer des angeregten Zustandes, Reagentien für die Fluoreszenzmikroskopie, multifunktionellen Reagentien der genannten Arten sowie biosynthetisch eingebauten Markierungen.

Ich danke den Professoren T. Sekine und M. Machida sowie den anderen Mitarbeitern an den zitierten eigenen Arbeiten. Dankbar anerkannt wird die finanzielle Unterstützung dieser Studien durch das Japanische Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur.

Eingegangen am 29. Juli 1976 [A 148]
Übersetzt von Dr. Bert Peters, Stuttgart

- [1] G. M. Edelman u. W. O. McClure, *Acc. Chem. Res.* 1, 65 (1968).
 [2] L. Stryer, *Science* 162, 526 (1968).
 [3] L. Brand u. J. R. Gohlke, *Annu. Rev. Biochem.* 41, 843 (1972).
 [4] D. M. Hercules: *Fluorescence and Phosphorescence Analysis*. Wiley, New York 1966.
 [5] R. S. Becker: *Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence*. Wiley-Interscience, New York 1969.
 [6] a) Y. Kanaoka, K. Shibata, T. Sekine u. T. Takagi: *Principles of Fluorescence Spectroscopy and The Application to Studies of Biological Systems*. (In japanischer Sprache.) Kyoritsu-shuppan, Tokyo 1974; b) S. Goto in [6a], S. 180.
 [7] Experimentelle Einzelheiten siehe z. B. [6, 8–15].
 [8] L. Brand u. B. Witholt, *Methods Enzymol.* 11, 776 (1967).
 [9] a) S. Udenfriend: *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*. Academic Press, New York 1962, Bd. 1; b) *ibid.* Bd. 2, 1969.
 [10] G. Weber, *Methods Enzymol.* 16, 380 (1969).
 [11] R. F. Chen, H. Edelhoch u. R. F. Steiner in S. J. Leach: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*. Academic Press, New York 1965, Teil A, Kap. 4.
 [12] C. R. Cantor u. T. Tao in G. L. Cantoni and D. R. Davies: *Procedures in Nucleic Acid Research*. Harper & Row, New York 1971, Bd. 2, S. 31.
 [13] J. Yquerabide, *Methods Enzymol.* 26 C, 498 (1972).
 [14] G. G. Guilbault: *Practical Fluorescence*. Marcel Dekker, New York 1973.
 [15] a) R. F. Chen u. H. Edelhoch: *Biochemical Fluorescence: Concepts*. Marcel Dekker, New York 1975; b) *ibid.* Bd. 2, 1976.
 [16] E. L. Wehry in [14], Kap. 3.
 [17] G. Weber, *Biochem. J.* 51, 155 (1952); *Adv. Protein Chem.* 8, 415 (1953).
 [18] R. F. Chen in [14], Kap. 12.
 [19] Y.-H. Li, L.-M. Chan, L. Tyer, R. T. Moody, C. M. Himmel u. D. M. Hercules, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 3118 (1975).
 [20] a) H. R. Horton u. D. E. Koshland Jr., *Methods Enzymol.* 11, 856 (1967); b) M. E. Kirtley u. D. E. Koshland Jr., *ibid.* 26 C, 578 (1972).
 [21] R. F. Steiner u. H. Edelhoch, *Chem. Rev.* 62, 457 (1962).
 [22] R. F. Chen, *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 163 (1968); 133, 263 (1969).
 [23] a) Y. Kanaoka, T. Sekine, M. Machida, Y. Soma, K. Tanizawa u. Y. Ban, *Chem. Pharm. Bull.* 12, 127 (1964); b) Y. Kanaoka, M. Machida, H. Kokubun u. T. Sekine, *ibid.* 15, 1738 (1967); c) Y. Kanaoka, M. Machida, K. Ando u. T. Sekine, *Biochim. Biophys. Acta* 207, 269 (1970); e) K. Kimura, A. Watanabe, M. Machida u. Y. Kanaoka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 882 (1971); f) T. Sekine, K. Ando, M. Machida u. Y. Kanaoka, *Anal. Biochem.* 48, 557 (1972); g) Y. Kanaoka, M. Machida, M. I. Machida u. T. Sekine, *Biochim. Biophys. Acta* 317, 563 (1973); h) T. Sekine, T. Ohyashiki, M. Machida u. Y. Kanaoka, *ibid.* 351, 205 (1974); i) T. Ohyashiki, T. Sekine u. Y. Kanaoka, *ibid.* 351, 214 (1974); j) T. Sekine, K. A. Kato, K. Takamori, M. Machida u. Y. Kanaoka, *ibid.* 354, 139 (1974); k) M. Machida, T. Sekine u. Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* 22, 2642 (1974); l) M. Machida, N. Ushijima, M. I. Machida u. Y. Kanaoka, *ibid.* 23, 1385 (1975); m) Y. Kanaoka, T. Takahashi, M. Machida, K. Yamamoto u. T. Sekine, *ibid.* 24, 1417 (1976); n) T. Ohyashiki, Y. Kanaoka u. T. Sekine, *Biochim. Biophys. Acta* 420, 27 (1976); o) M. Machida, M. Bando, Y. Migita, M. I. Machida u. Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.*, im Druck; p) M. I. Machida, Thesis, Hokkaido University 1973; q) M. Machida, T. Takahashi, K. Itoh u. Y. Kanaoka, noch unveröffentlicht; r) K. Yamamoto, Y. Kanaoka u. T. Sekine, noch unveröffentlicht; s) T. Sekine, K. Kato, Y. Nishijima u. Y. Kanaoka, noch unveröffentlicht; t) Y. Kanaoka in M. Natsume: *Organic Reactions for Life Science*. (In japanischer Sprache.) Nankodo, Tokyo 1976, S. 73.
 [24] C. J. Seliskar u. L. Brand, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 5404, 5414 (1971); *Science* 171, 799 (1971).
 [25] P. C. Jocelyn: *Biochemistry of the SH Group*. Academic Press, New York 1972; M. Friedman: *The Chemistry and Biochemistry of the Sulphydryl Group in Amino Acids, Peptides and Proteins*. Pergamon Press, London 1973.
 [26] K. Arai, M. Kawakita u. Y. Kaziro, *J. Biochem.* 77, 1095 (1975).
 [27] Y. Nara u. Y. Tsujimura, *Bunseki Kagaku* 22, 451 (1973).
 [28] J. K. Weltman, R. P. Szaro, A. R. Frackelton, R. M. Dowben, J. R. Bunting u. R. E. Cathou, *J. Biol. Chem.* 248, 3173 (1973).
 [29] a) M. Weigle, S. L. DeBernardo, J. P. Tengi u. W. Leimgruber, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5927 (1972); b) M. Weigle, S. DeBernardo, W. Leimgruber, R. Cleeland u. E. Grunberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 899 (1973); c) P. Böhnen, S. Stein, W. Dairman u. S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 213 (1973); d) S. Stein, P. Böhnen, J. Stone, W. Dairman u. S. Udenfriend, *ibid.* 155, 202 (1973); e) A. M. Felix u. G. Terbeksen, *ibid.* 157, 177 (1973).
 [30] B. R. Baker: *Design of Active-Site-Directed Inversible Enzyme Inhibitors*. Wiley, New York 1967, S. 18.
 [31] C. M. Himmel u. L.-M. Chan in [15b], Kap. 14.
 [32] G. G. Guilbault, *Anal. Chem.* 38, 537 R (1966); 40, 459 R (1968); 42, 334 R (1970).
 [33] G. G. Guilbault: *Enzymatic Methods of Analysis*. Pergamon Press, Oxford 1970.
 [34] G. G. Guilbault in [14], Kap. 8.
 [35] a) G. G. Guilbault u. D. N. Kramer, *Anal. Chem.* 35, 588 (1963); 37, 130, 1219 (1965); 38, 1675 (1965); b) G. G. Guilbault, M. H. Sadar, R. G. Kzer u. S. Skou, *Anal. Lett.* 1, 717 (1968); c) M. H. Sadar, S. S. Kuang u. G. G. Guilbault, *Anal. Chem.* 42, 1770 (1970); d) G. G. Guilbault u. A. Vaughan, *ibid.* 43, 721 (1971); *Anal. Lett.* 3, 1 (1970); e) G. G. Guilbault, S. H. Sadar, R. Glazer u. J. Haynes, *ibid.* 1, 333 (1968); f) G. G. Guilbault, D. N. Kramer u. E. Hackley, *Anal. Chem.* 39, 271 (1967).
 [36] M. Fleisher u. M. K. Schwartz, *Clin. Chem.* 17, 417 (1971).
 [37] B. Rotman, J. Zdevic u. M. Edelstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 1 (1963).
 [38] J. H. Tierney, *Fed. Proc.* 23, 2381 (1964).
 [39] D. B. Land u. E. Jackim, *Anal. Biochem.* 16, 481 (1966).
 [40] T. Takeuchi u. S. Nagami, *Acta Pathol. Jpn.* 4, 277 (1954).
 [41] L. J. Greenberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9, 430 (1962).
 [42] M. Roth in R. Ruyssen u. E. L. Vandendriessche: *Enzymes in Clinical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam 1965, S. 10.
 [43] H. A. Ravin u. A. M. Seligman, *J. Biol. Chem.* 190, 391 (1951).
 [44] N. Lasser u. J. Feitelson, *Biochemistry* 10, 307 (1971).
 [45] Y. Kanaoka, T. Takahashi u. H. Nakayama, noch unveröffentlicht.
 [46] a) M. Roth, *Clin. Chim. Acta* 8, 574 (1963); b) M. Zimmerman, E. Yurewicz u. G. Patel, *Anal. Biochem.* 70, 258 (1976).
 [47] F. J. Kezdy u. E. T. Kaiser, *Methods Enzymol.* 19, 3 (1970); T. Chase u. E. Shaw, *ibid.* 19, 20 (1970).
 [48] a) K. Tanizawa, S. Ishii u. Y. Kanaoka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 893 (1968); b) H. Nakayama u. Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* 21, 2904 (1973).
 [49] G. W. Jameson, D. V. Roverts, R. W. Adams, W. S. A. Kyle u. D. T. Elmore, *Biochem. J.* 131, 107 (1973).
 [50] T. L. Rosenberry u. S. A. Bernhard, *Biochemistry* 10, 4114 (1971).
 [51] D. A. Deranleau u. H. Neurath, *Biochemistry* 5, 1413 (1966).
 [52] a) G. P. Sachdev, A. D. Brownstein u. J. S. Fruton, *J. Biol. Chem.* 248, 6192 (1973); b) 250, 501 (1975); c) J. A. Mattis u. J. S. Fruton, *Biochemistry* 15, 2191 (1976).
 [53] D. N. Fass u. K. G. Mann, *J. Biol. Chem.* 248, 3280 (1973).
 [54] T. Takagi, Y. Nakanishi, N. Okabe u. T. Isemura, *Biopolymers* 5, 627 (1967).
 [55] R. A. Kenner u. H. Neurath, *Biochemistry* 10, 551 (1971); R. A. Kenner, *ibid.* 10, 545 (1971).
 [56] S.-Y. Cheng, H. J. Cahnmann, M. Wilchek u. R. N. Ferguson, *Biochemistry* 14, 4132 (1975).
 [57] R. P. Haugland u. L. Stryer in G. N. Ramachandran: *Conformation of Biopolymers*. Academic Press, New York 1967, Bd. 1, S. 321.
 [58] a) G. K. Radda, *Biochem. J.* 122, 385 (1971); b) D. J. Birkett, N. C. Price, G. K. Radda u. A. G. Salmon, *FEBS Lett.* 6, 346 (1970); c) N. C. Price u. G. K. Radda, *Biochim. Biophys. Acta* 371, 102 (1974).
 [59] G. Allen u. G. Lowe, *Biochem. J.* 133, 679 (1973).

- [60] a) K. Tanizawa u. Y. Kanaoka, noch unveröffentlicht; b) H. Nakayama, K. Tanizawa u. Y. Kanaoka, unveröffentlichte Werte.
- [61] F. Y.-H. Wu u. C.-W. Wu, *Biochemistry* 13, 2562 (1974).
- [62] a) J. A. Sechrist III, J. R. Barrio, N. J. Leonard u. G. Weber, *Biochemistry* 11, 3499 (1972); b) M. Deluca, N. J. Leonard, B. J. Gates u. W. D. McElroy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1664 (1973); c) Y.-H. Chien u. G. Weber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 538 (1973).
- [63] P. B. Chock, C. Y. Huan, R. B. Timmons u. E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3134 (1973).
- [64] a) Q. H. Gibson, *Methods Enzymol.* 16, 187 (1969); b) H. Gut freund, *ibid.* 16, 229 (1969); G. Weber, *ibid.* 16, 380 (1969); H. Gut freund, *Annu. Rev. Biochem.* 40, 315 (1971); c) J. F. Kirsch, *ibid.* 42, 205 (1973); a) T. M. Jovin in [15a], Kap. 6.
- [65] G. von Ellenrieder, K. Kirshner u. I. Schuster, *Eur. J. Biochem.* 26, 220 (1972).
- [66] J. D. Shore, H. Gut freund u. D. Yates, *J. Biol. Chem.* 250, 5276 (1975).
- [67] G. Krauss, R. Romer, D. Reisner u. G. Maass, *FEBS Lett.* 30, 6 (1973).
- [68] E. Holler u. M. Calvin, *Biochemistry* 11, 3741 (1973).
- [69] a) A. A. Lamola u. N. J. Turro in P. A. Leermakers u. A. Weissberger: *Technique of Organic Chemistry*. Wiley-Interscience, New York 1969, Kap. 14; b) P. Schiller in [15a], Kap. 5; c) I. Z. Steinberg, *Annu. Rev. Biochem.* 40, 83 (1971).
- [70] S. A. Latt, H. T. Cheung u. E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* 87, 995 (1965); A. A. Lamola, P. A. Leermakers, G. W. Beyers u. G. S. Hammond, *ibid.* 87, 2322 (1965); R. D. Rauh, T. R. Evans u. P. A. Leermakers, *ibid.* 90, 6897 (1968).
- [71] R. H. Conrad u. L. Brand, *Biochemistry* 7, 777 (1968).
- [72] L. Stryer u. R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 719 (1967).
- [73] P. W. Schiller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 975 (1972).
- [74] R. A. Badley u. F. W. J. Teale, *J. Mol. Biol.* 44, 71 (1969).
- [75] a) C. M. Himmel, R. T. Mayer u. L. L. Cook, *J. Polymer Sci. A-1* 8, 2219 (1970); b) R. T. Mayer u. C. M. Himmel, *Biochemistry* 11, 2082 (1972); c) L. M. Chan, C. M. Himmel u. A. R. Main, *ibid.* 13, 86 (1974).
- [76] S. A. Latt, D. S. Auld u. B. L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1383 (1970); *Anal. Biochem.* 50, 56 (1972); *Biochemistry* 11, 3015, 4994 (1972).
- [77] A. Carmel, M. Zur, A. Yaron u. E. Katchalski, *FEBS Lett.* 30, 11 (1973).
- [78] a) O. A. Moe, D. A. Lerner u. G. G. Hammes, *Biochemistry* 13, 2552 (1974); b) S. Matsumoto u. G. G. Hammes, *ibid.* 14, 214 (1975); c) L. C. Cantley, Jr. u. G. G. Hammes, *ibid.* 14, 2976 (1975).
- [79] C. R. Cantor u. P. Pechukas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2099 (1971); A. Grinvald, E. Haas u. I. Z. Steinberg, *ibid.* 69, 2273 (1972); Z. Hillel u. C.-W. Wu, *Biochemistry* 15, 2105 (1976).
- [80] R. Dale u. J. Eisinger in [15a], Kap. 4.
- [81] a) I. Z. Steinberg in [15a], Kap. 3; b) J. Schlessinger u. I. Z. Steinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 769 (1972); c) J. Schlessinger u. A. Levitzki, *J. Mol. Biol.* 82, 547 (1974); d) J. Schlessinger, I. Z. Steinberg u. A. Levitzki, *ibid.* 91, 523 (1975).
- [82] a) L. Brand u. J. R. Gohlke, *J. Biol. Chem.* 246, 2317 (1971); b) D. C. H. Yang, W. E. Gall u. G. E. Edelman, *ibid.* 249, 7018 (1974); c) J. E. Churchich, T. Buler u. K. J. Oh, *ibid.* 250, 7722 (1975).
- [83] D. Wahl in [15b], Kap. 1.
- [84] a) M. Deluca, L. Brand, T. A. Cebula, H. H. Seliger u. A. F. Makula, *J. Biol. Chem.* 246, 6702 (1971); b) M. R. Loken, J. W. Hayes, J. R. Gohlke u. L. Brand, *Biochemistry* 25, 4779 (1972).
- [85] a) W. T. Shearer u. C. W. Parker in [15a], Kap. 21; b) R. E. Cathou u. J. R. Bunting, *ibid.* Kap. 22; c) T. J. Yook *ibid.* Kap. 23.
- [86] a) M. Onodera in [6a], S. 189; b) M. Onodera, H. Shiokawa u. T. Takagi, *J. Biochem.* 79, 195 (1976).
- [87] J. Yguerabide, H. F. Epstein u. L. Stryer, *J. Mol. Biol.* 51, 573 (1970).
- [88] J. Schlessinger u. I. Z. Steinberg, *J. Mol. Biol.* 87, 725 (1974).
- [89] A. J. Portmann, S. A. Levison u. W. B. Dandliker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 207 (1971); S. A. Levison, A. J. Portmann, F. Krieszenbaum u. W. B. Dandliker, *ibid.* 43, 258 (1971); S. A. Levison, A. N. Hicks, A. J. Portmann u. W. B. Dandliker, *Biochemistry* 14, 3778 (1975).
- [90] a) T. C. Werner, J. R. Bunting u. R. E. Cathou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 795 (1972); b) J. R. Bunting u. R. E. Cathou, *J. Mol. Biol.* 77, 223 (1973); c) 87, 329 (1974); d) H. Kawauchi, K. Kadooka, M. Tanaka u. K. Tazimura, *Agr. Biol. Chem.* 35, 1720 (1971).
- [91] a) I. Tasaki, L. Carnay u. A. Watanabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 1362 (1969); b) A. S. Waggoner u. L. Stryer, *ibid.* 67, 579 (1970); c) J. Yguerabide u. L. Stryer, *ibid.* 68, 1217 (1971); d) G. K. Radda, *Biochem. J.* 122, 385 (1971); e) G. K. Radda u. J. Vanderkooi, *Biochim. Biophys. Acta* 265, 509 (1972); f) A. Azzi, *Methods Enzymol.* 32, 234 (1974); g) J. Vanderkooi u. McLaughlin in [15b], Kap. 19; h) R. Kraayhof, J. R. Brocklehurst u. C.-P. Lee in [15b], Kap. 20.
- [92] a) I. Tasaki, E. Carbone, K. Sisco u. I. Singer, *Biochim. Biophys. Acta* 323, 220 (1973); b) I. Tasaki, M. Nallett u. E. Carbone, *J. Membr. Biol.* 11, 353 (1973); c) A. Azzi, B. Chance, G. K. Radda u. C. P. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 612 (1969).
- [93] a) G. Weber, D. Borris, E. DeRobertis, F. Barrantes, J. La Torre u. M. De Carlin, *Mol. Pharmacol.* 7, 530 (1971); b) J. B. Cohen u. J.-P. Changeux, *Biochemistry* 12, 4855 (1973).
- [94] a) A. Azzi, A. Fabbro, M. Santano u. P. L. Gherardini, *Eur. J. Biochem.* 21, 404 (1971); b) A. Azzi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 254 (1969).
- [95] a) C. Gitler, B. Rubalcava u. A. Caswell, *Biochim. Biophys. Acta* 193, 479 (1969); b) B. Rubalcava, D. M. de Muñoz u. C. Gitler, *Biochemistry* 8, 2742 (1969); c) L. A. Sklar, B. S. Hudson u. R. D. Simoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1649 (1975).
- [96] R. A. Badley, W. G. Martin u. H. Schneider, *Biochemistry* 12, 268 (1973).
- [97] a) M. Shinitzky, A.-C. Dianoux, C. Gitler u. G. Weber, *Biochemistry* 10, 2106 (1971); b) M.-C. Postel-Vinay u. N. T. SwisCocki, *Biochim. Biophys. Acta* 332, 156 (1974).
- [98] a) H. J. Pownall u. L. C. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 3136 (1973); b) A. K. Soutar, H. J. Pownall, A. S. Hu u. L. C. Smith, *Biochemistry* 13, 2828 (1974); c) S. Cheng, J. K. Thomas u. C. F. Kulpa, *ibid.* 13, 1135 (1974).
- [99] a) E. N. Hudson u. G. Weber, *Biochemistry* 12, 4154 (1973); b) F. Y.-H. Wu, K. Nath u. C.-W. Wu, *ibid.* 13, 2567 (1974).
- [100] a) P. Wahl, M. Kasai u. J.-P. Changeux, *Eur. J. Biochem.* 18, 332 (1971); b) J. L. Churchich u. Y.-H. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 409 (1976).
- [101] C.-W. Wu u. L. Stryer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1104 (1972).
- [102] a) A. D. B. Malcolm u. G. K. Radda, *Eur. J. Biochem.* 15, 555 (1970); b) A. H. Caswell u. J. D. Hatchison, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 43 (1971); c) G. J. Brewer, *Biochemistry* 13, 5038 (1974); d) F. Wesch, J. A. Waters, J. W. Daly u. B. Witkop, *J. Med. Chem.* 15, 757 (1972).
- [103] a) W. H. Scouten, R. Lubcher u. W. Baughman, *Biochim. Biophys. Acta* 336, 421 (1974); b) M. Onodera u. K. Yagi, *ibid.* 253, 254 (1971); c) P. C. Leavis u. S. S. Lehrer, *Biochemistry* 13, 3042 (1974).
- [104] a) J. P. Reeves, E. Shechter, R. Weil u. H. R. Kaback, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2722 (1973); S. Schuldiner, R. Weil u. H. R. Kaback, *ibid.* 73, 109 (1976); S. Schuldiner, R. D. Spencer, G. Weber, R. Weil u. H. R. Kaback, *J. Biol. Chem.* 250, 8893 (1975); b) H. Ichikawa, T. Tanimura, T. Nakajima u. Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.* 18, 1493 (1970).
- [105] A. Kotani, M. Naoi, M. Harada u. K. Yagi, *J. Biochem.* 65, 835 (1969).
- [106] O. Takenaka, Y. Nishimura, A. Takenaka u. K. Shibata, *Biochim. Biophys. Acta* 20, 1 (1970); Y. Nishimura, O. Takenaka u. K. Shibata, *J. Biochem.* 20, 293 (1971).
- [107] M. J. Lee, R. A. Harris u. D. E. Green, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 937 (1969).
- [108] a) G. Mooser, H. Schulman u. D. S. Sigman, *Biochemistry* 11, 1595 (1972); b) S. Mizutani, Y. Wakamura, N. Yoshida, T. Nakajima u. Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.* 17, 2340 (1969); c) K. Yagi in [15b], Kap. 15; d) P. Taylor u. S. Lappi, *Biochemistry* 14, 1989 (1975).