

Ab-initio-Rechnungen: Programm Gaussian 98.^[16] Møller-Plesset-Näherung 2. Ordnung (MP2) für die Elektronenkorrelation, wie in Gaussian implementiert,^[17] sowie Coupled-Cluster-Rechnung mit einfacher und doppelter Substitution (CCSD). Basissätze: F, Cl, Ar: 6-311 + G(d,p), wie in Gaussian implementiert, Kr, Xe, Br, I, As, Sb: Relativistisch korrigierte Basissätze für die Valenzelektronen und Pseudopotentiale für die 28 (Kr, Br) bzw. 46 (Xe, I) Rumpfelektronen.

Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturuntersuchungen können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Fax: (+49) 7247-808-666; E-mail: crysdata@fiz-karlsruhe.de), unter den Hinterlegungsnummern CSD-411897 ([XeCl]⁺[Sb₂F₁₁]⁻) und -411868 ([XeF]⁺[SbF₆]⁻) angefordert werden.

Eingegangen am 29. Juni 2001 [Z17395]

- [1] L. Y. Nelson, G. C. Pimentel, *Inorg. Chem.* **1967**, 6, 1758–1759; I. R. Beattie, A. German, H. E. Blayden, S. B. Brumbach, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1975**, 1659–1662; D. Boal, G. A. Ozin, *Spectrosc. Lett.* **1971**, 4, 43–46; G.-J. Perlow, M. R. Perlow, *J. Chem. Phys.* **1967**, 48, 955–961.
- [2] H. Meinert, *Z. Chem.* **1966**, 6, 71.
- [3] R. D. Willet, S. W. Peterson, B. A. Coyle, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 8202–8208.
- [4] H.-J. Frohn, T. Schroer, G. Henkel, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2751–2753; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2554–2556.
- [5] S. Seidel, K. Seppelt, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4072–4074; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3923–3925.
- [6] [XeCl]⁺[Sb₂F₁₁]⁻: Orthorhombisch, Raumgruppe *Pna*2₁, *a* = 1778.8(3), *b* = 744.8(1), *c* = 1708.7(2) pm, *V* = 2263.9 × 10⁶ pm³, *T* = –150 °C, *Z* = 8, Mo_{Kα}-Strahlung, Graphitmonochromator, Scanbreite 0.3° in *ω*, Belichtungszeit 10 s pro Aufnahme, 1800 Aufnahmen, 37397 gemessene Reflexe, 6843 unabhängige Reflexe, 273 Parameter, *R*(*F*) = 0.0365, *wR*₂ = 0.0745.
- [7] R. T. Weigner, *Phys. Rev.* **1947**, 72, 1268–1269; K. H. Bowijk, J. van der Heide, A. Vos, E. H. Wiebenga, *Acta Crystallogr.* **1956**, 9, 274–277; G. B. Carpenter, S. M. Richards, *Acta Crystallogr.* **1961**, 15, 360–364.
- [8] V. M. McRae, R. D. Peacock, D. R. Russell, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1969**, 62–63.
- [9] J. F. Lehmann, D. A. Dixon, G. J. Schrobilgen, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 3002–3017.
- [10] F. O. Sladky, P. A. Bulliner, N. Bartlett, *J. Chem. Soc. A* **1969**, 2179–2188; H. Willner, M. Bodenbinder, R. Bröckler, G. Hwang, S. J. Rettig, J. Trotter, B. von Ahsen, U. Westphal, V. Jonas, W. Thiel, F. Aubke, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 588–602.
- [11] T. M. Klapötke, *Heteroat. Chem.* **1997**, 8, 473–478.
- [12] S. Frenking, W. Koch, C. A. Dea Kyne, J. F. Liebmann, N. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 31–33.
- [13] K. O. Christe, D. A. Dixon, D. McLemore, W. W. Wilson, J. A. Sheehy, J. A. Boatz, *J. Fluorine Chem.* **2000**, 101, 151–153; I.-C. Hwang, K. Seppelt, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3803–3805; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 39, 3690–3693.
- [14] H. Schumann, W. Genthe, E. Hahn, M.-B. Hossein, D. von der Helm, *J. Organomet. Chem.* **1986**, 28, 2561–2567.
- [15] G. Sheldrick, Program for Crystal Structure Solution, Göttingen, **1986**.
- [16] G. Sheldrick, Program for Crystal Structure Refinement, Göttingen, **1993**.
- [17] Gaussian 98, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1998**. Ar, Cl, F: Basissatz 6-311 + G(d,p) und As,

Sb, Kr, Xe, Au: Basissätze vom Institut für Theoretische Chemie, Universität Stuttgart.

- [18] [XeF]⁺[SbF₆]⁻: gelbe Kristalle, erhalten aus XeF₂/HF/SbF₅-Lösung: *a* = 573.8(2), *b* = 1087.7(2), *c* = 1095.9(2) pm, *β* = 93.92(2)°, *V* = 639.6 × 10⁶ pm³, *Z* = 4, *P*2₁/c, Mo_{Kα}, *λ* = 71.069 pm, *ρ* = 4.009 g cm⁻³, *2θ*_{max} = 60°, 2000 gemessene, 1760 unabhängige Reflexe (*R*_{int} = 0.0144), Absorptionskorrektur Psi-Scan-Methode durch Messung von 7 Reflexen mit *χ* > 80° in 36 Schritten in *ψ*, *T*_{max} = 1.0, *T*_{min} = 0.76, 83 Parameter, *R*₁ = 0.0189, *wR*₂ = 0.0506.

Molekulare Erkennung von UDP-Gal durch β-1,4-Galactosyltransferase T1**

Thorsten Biet und Thomas Peters*


Professor Joachim Thiem zum 60. Geburtstag gewidmet

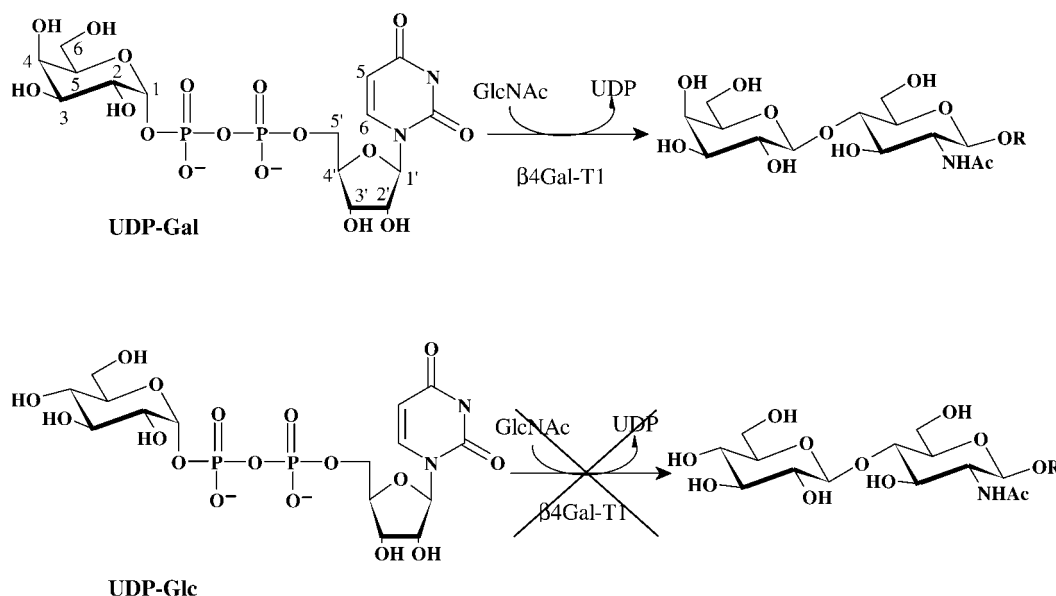
Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Kohlenhydraten nehmen bei Säugern eine wichtige Stellung bei einer Vielzahl von biologischen Erkennungsprozessen ein.^[1] Glycosyltransferasen bilden eine Gruppe von Enzymen, die an der Biosynthese von Kohlenhydraten beteiligt sind und deren Funktionsstörungen meist zu schweren Krankheitsbildern führen. Bisher gibt es nur wenige dreidimensionale Strukturdaten der Glycosyltransferasen.^[2] Von der im Golgi-Apparat lokalisierten β-1,4-Galactosyltransferase (β4Gal-T1, EC 2.4.1.90/38) ist eine Röntgenstruktur von freiem Protein und mit an das Protein gebundenem Substrat veröffentlicht.^[2c] Aufgabe dieser Transferase ist die Verknüpfung einer Galactose, die aus UDP-Gal (Uridindiphospho-α-D-galactose, Schema 1) stammt, mit der β-D-N-Acetylglucosamineinheit von Poly-N-acetyl-lactosaminketten, wie sie bei Glycoproteinen und Glycosphingolipiden zu finden sind. Die bei der Kristallstrukturuntersuchung gefundene Elektronendichte für die Galactoseeinheit der mit der β4Gal-T1 kokristallisierten UDP-Gal reichte nicht aus, um diese räumlich aufzulösen. Deshalb sind wichtige Details der molekularen Erkennung von UDP-Gal durch die β4Gal-T1 bisher nicht geklärt. Wir berichten hier über NMR-Untersuchungen des Bindungssepi-tops von an β4Gal-T1 gebundenem UDP-Gal.

Verschiedene NMR-spektroskopische Methoden zur Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind bekannt. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Bindungsaktivität von Substanzbibliotheken gegenüber Rezeptorproteinen ist

[*] Prof. Dr. T. Peters, Dipl.-Chem. T. Biet
Institut für Chemie, Medizinische Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck (Deutschland)
Fax: (+49) 451-500-4241
E-mail: thomas.peters@chemie.mu-luebeck.de

[**] Diese Arbeit wurde durch das BMBF (FKZ 031161) und die DFG (Teilprojekt B3 des SFB 470) gefördert. Weiterhin danken wir dem Verband der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung sowie Dres. T. Keller und G. Wolff (Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten) für ihre Hilfe.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. β 4Gal-T1 überträgt D-Galactose von UDP-Gal auf eine D-GlcNAc-Einheit (obere Reaktion). Das Enzym ist hochspezifisch, d. h., UDP-Glc (untere Reaktion) wird nur in vernachlässigbar kleinen Mengen umgesetzt.^[8]

die Sättigungstransfer-Differenz-NMR-Spektroskopie (STD-Methode).^[3] Diese sehr empfindliche Methode, die nur eine Proteinkonzentration im μ M-Bereich benötigt,^[4] ist auch geeignet, Aussagen über das Bindungssepitop von Liganden auf molekularer Ebene zu machen.^[5] Das Prinzip beruht darauf, dass Ligandenprotonen in Abhängigkeit ihres Abstandes vom Protein einen Sättigungstransfer erfahren. Je näher sich ein Proton am Protein befindet, desto stärker ist dieser Sättigungstransfer. Im STD-NMR-Spektrum zeigen daher Ligandenprotonen, die dem Bindungssepitop zuzuordnen sind, intensivere Signale als andere.

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von UDP-Gal und β 4Gal-T1^[6] wurde eine NMR-Probe mit einem ca. 45fachen molaren Überschuss von UDP-Gal zu β 4Gal-T1 präpariert. Um Komplikationen, die durch das paramagnetische Verhalten von Mn^{2+} zu erwarten wären, zu unterbinden, wurde Mn^{2+} durch Mg^{2+} im Puffer ersetzt. Die Enzymaktivität wird durch Mg^{2+} zwar reduziert, die Funktion des Proteins bleibt aber erhalten.^[7] Von dieser Probe wurden 1D-STD-NMR-Spektren mit variablen Sättigungszeiten (0.5–2.0 s) aufgenommen. In Abbildung 1b ist exemplarisch das STD-Spektrum mit einer Sättigungszeit von 2.0 s dargestellt. Zum Vergleich ist in Abbildung 1a das 1D- 1H -Referenzspektrum von UDP-Gal zu sehen.

Unter Verwendung des 1D-NMR-Referenzspektrums und des STD-Spektrums wurde der relative Sättigungstransfer der einzelnen Protonen berechnet (Schema 2).^[5] Diese Größen geben Aufschluss über den Grad der dipolaren Wechselwirkung der UDP-Gal-Protonen mit den Protonen der Bindungstasche des Enzyms.

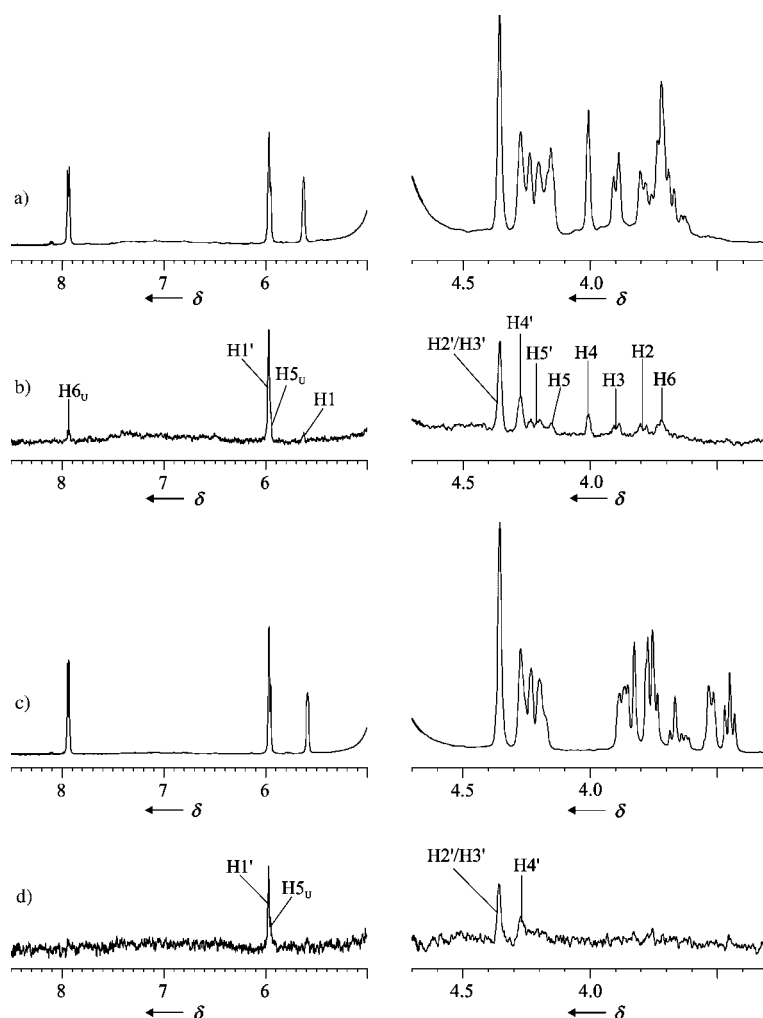
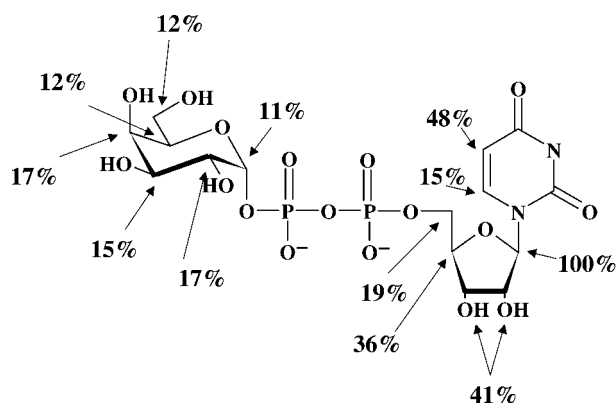


Abbildung 1. 500 MHz-1D-STD-NMR-Spektren von UDP-Gal (b, 16fach vergrößert) und UDP-Glc (d, 32fach vergrößert) in der Gegenwart von β 4Gal-T1 sowie die zugehörigen 1H -NMR-Referenzspektren von freier UDP-Gal (a) und UDP-Glc (c). Die STD-Spektren wurden mit einer selektiven Vorsättigung bei $\delta = 0$ mit einer Dauer von 2 s aufgenommen. Die Vorsättigung erfolgte durch eine Kaskade von Gauß-Pulsen (Dauer 50 ms, Abstand 1 ms). Die STD-Spektren wurden mit 2 k Scans und die Referenzspektren mit 1 k Scans aufgenommen. Die relativen STD-Effekte wurden aus den Spektren ermittelt (siehe Schema 2).



Schema 2. Relative STD-Effekte von an β 4Gal-T1 gebundenem UDP-Gal. Diese Größen wurden aus der jeweiligen Signalintensität des STD-Spektrums (I_{STD}) und der entsprechenden Signalintensität des Referenz-1D-NMR-Spektrums (I_0) berechnet.^[5] Die Verhältnisse der Intensitäten I_{STD}/I_0 wurden auf das Signal mit dem größten STD-Effekt bezogen (anomerer Proton H1' der Riboseeinheit, 100 %). Die Pfeile verweisen auf die Positionen der Protonen, die einen STD-Effekt zeigen. Die Größe von 41 % für die Protonen H2' und H3' sowie die 12 % der beiden Protonen H6 der Galactose sind jeweils als kumulative STD-Effekte für beide Protonen zu verstehen. Bei den Protonen H5 und H5' wurden die STD-Effekte lediglich abgeschätzt, da eine separate Integration der Signale nicht möglich war.

Es fällt auf, dass die Protonen der Ribose und des Uracils den größten Sättigungstransfer erfahren. Die größte Intensität zeigen dabei das anomere Proton H1' und das Proton H4' der Ribose. Diese Beobachtung kann mit den Röntgenstrukturdaten in Übereinstimmung gebracht werden. Das Uracil wird über eine Wechselwirkung mit Phe 226 in der Bindungstasche fixiert, weswegen die Protonen H1' und H4' der Ribose in das Innere der Bindungstasche zeigen. Durch die auf diese Art entstehende Wechselwirkung sind starke STD-Effekte zu erwarten. Die kleineren STD-Effekte der Galactoseeinheit lassen auf einen weniger intensiven Kontakt mit den Protonen schließen. Dies ist in soweit sinnvoll, da eine zu starke Bindung an das Protein die enzymatische Reaktion – die Übertragung der Galactose auf einen Acceptor – behindern würde.

Dass die Galactose dennoch einen Sättigungstransfer erfährt, zeigt, dass eine Wechselwirkung mit der Bindungstasche vorhanden ist. Im STD-Spektrum wird die stärkste Intensität für H4 und H2 beobachtet. Zum Vergleich wurde das Bindungsverhalten von UDP-Glc (Uridindiphospho- α -D-glucose) an β 4Gal-T1 STD-NMR-spektroskopisch untersucht. Aus den Spektren ist zu erkennen, dass auch UDP-Glc von β 4Gal-T1 gebunden wird. Die STD-Effekte sind jedoch erheblich geringer als bei der Bindung von UDP-Gal (Abbildung 1). Im Fall der UDP-Glc werden allerdings nur für die Ribose und das Uracil, nicht jedoch für die Glucose, STD-Effekte beobachtet. Lediglich für H1 konnte ein minimaler Sättigungstransfer festgestellt werden (Abbildung 1 d), der sich jedoch nicht quantifizieren lässt. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Glucose nicht in einem direkten Kontakt mit dem aktiven Zentrum des Enzyms steht. Das Enzym scheint die Glucose nicht zu erkennen. Wahrscheinlich wird dadurch eine Ausrichtung des Monosaccharids und somit eine Teilnahme an der Übertra-

gungsreaktion verhindert. Dies würde die aus anderen Untersuchungen bekannte Tatsache, dass Glucose nur in einem sehr geringen Umfang durch β 4Gal-T1 auf einen Acceptor übertragen wird, erklären.^[8] Dieses Ergebnis wird durch die Röntgenstruktur der β 4Gal-T1 mit UDP-Gal bestätigt. Durch die Stellung des UDP in der Bindungstasche der β 4Gal-T1 ergeben sich mehrere mögliche Orientierungen für die am terminalen Phosphat des UDP gebundenen Monosaccharide. Deshalb werden die spezifischen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren über eine Bindung entscheiden. Aufgrund der Daten aus den STD-NMR-Experimenten könnte man annehmen, dass die Glucose der UDP-Glc aus der Bindungstasche herausragt, während die Galactose der UDP-Gal mit den Protonen der Bindungstasche in Kontakt steht.

Die Beobachtung, dass der UDP-Teil der UDP-Glc vom Protein gebunden wird, ist nicht überraschend. Es ist bekannt, dass sowohl UMP, UDP als auch deren Derivate wie UDP-Fuc (Uridindiphospho-L-fucose) oder UDP-Man (Uridindiphospho-D-mannose) inhibierend auf β 4Gal-T1 wirken.^[9a] Diese Ergebnisse werden durch zahlreiche Studien unterstützt, die sich mit den relativen Reaktionsumsätzen diverser UDP-Gal-Derivate bei der Übertragung der jeweiligen Monosaccharideinheit auf *N*-Acetylglucosamin mittels β 4Gal-T1 beschäftigt haben.^[8, 9] Jede Modifizierung der Galactoseeinheit führt zu einer Reduktion der Reaktionsraten, z.B. hat die Desoxygenierung der 2-Position der Galactose nur einen geringen Einfluss auf den Umsatz.^[9c] Wird jedoch eine sterisch anspruchsvolle Gruppe an dieser Position eingeführt, hat das eine erhebliche Reduktion der Reaktionsrate zur Folge.^[8a] Den drastischsten Effekt auf den Umsatz hat eine gleichzeitige Modifizierung der 4- und 2-Position der Galactose. Wird beispielsweise UDP-GlcNAc (Uridindiphospho-*N*-acetyl-D-glucosamin) als Substrat verwendet, ist keinerlei Reaktion mehr zu beobachten, d.h., dieser Donor ist vollkommen inaktiv.^[8a] Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, dass H4 und H2 der Galactose den größten Sättigungstransfer der Galactosesignale erfahren (Schema 2).

Um auszuschließen, dass es sich bei den gemessenen Effekten um unspezifische Wechselwirkungen handelt, wurden weitere Kontrollexperimente durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen). Hierzu wurde UDP-Gal in der Gegenwart der beiden Lectine *Aleuria Aurantia* Agglutinin (AAA) und *Sambucus Nigra* Agglutinin (SNA) untersucht. Bei AAA handelt es sich um ein L-Fucose bindendes Lectin.^[10] SNA bindet besonders gut Epitope, die das Disaccharid α -D-Neu5Ac-(2,3)-D-Gal enthalten, sowie D-Galactose.^[4b, 11] In einer Probe, die AAA, L-Fucose und UDP-Gal enthielt, wurden lediglich STD-Signale der Fucose beobachtet, während UDP-Gal keinerlei Wechselwirkung zeigte. In Anwesenheit von SNA zeigt die Galactose der UDP-Gal starke STD-Effekte, aber nur schwache für den Rest des Moleküls. UDP-Gal zeigt für jedes der drei verwendeten Proteine, β 4Gal-T1, AAA und SNA, ein anderes Muster von STD-Signalen. Damit konnte demonstriert werden, dass die STD-Spektren die im jeweiligen Fall spezifischen Bindungsepitope wiedergeben.

Unsere NMR-Experimente haben gezeigt, dass sowohl UDP-Gal als auch, wenn auch mit einer geringeren Affinität,

UDP-Glc vom β 4Gal-T1 gebunden werden. Während UDP-Glc nur mit dem UDP-Teil des Moleküls in Kontakt mit der Proteinoberfläche steht, wird UDP-Gal komplett von β 4Gal-T1 gebunden. Durch die quantitative Analyse der STD-Effekte ist eine Definition des Bindungsepitops der UDP-Gal auf molekularer Ebene möglich. Diese Technik eröffnet die Möglichkeit, die Bindungseigenschaften einer Vielzahl von Substraten und Glycosyltransferasen zu untersuchen. Deshalb werden wir diese Methode zur Untersuchung von weiteren von Säugern stammenden Glycosyltransferasen, für die zur Zeit noch keine Röntgenstrukturdaten zur Verfügung stehen, verwenden. Diese Informationen über Bindungsepitope bilden eine sehr wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer selektiver und hochwirksamer Inhibitoren für Glycosyltransferasen.

Experimentelles

Alle Spektren wurden auf einem Bruker-DRX-500 MHz-Spektrometer mit einem 5 mm TXI-Probenkopf aufgenommen. Die STD-Spektren wurden bei 293 K mit 2 k Scans gemessen. Die Referenzspektren wurden mit 1 k Scans gemessen. Der Sättigungstransfer wurde durch eine Kaskade von 40 selektiven Gauß-Pulsen erreicht (Dauer 50 ms, Abstand 1 ms). Es wurde bei $\delta = 0$ (on-resonance) und bei $\delta = 40$ (off-resonance) eingestrahlt. Die Subtraktion wurde über den Phasenzzyklus erreicht.

Die Konzentration von β 4Gal-T1 betrug 20 μ M für UDP-Gal und 7 μ M für UDP-Glc. Probenvolumen: 300 μ L in einem Shigemi-Röhrchen. Die Konzentration von UDP-Gal betrug 0.9 mM (UDP-Glc 1 mM). Puffer: 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.4 (nicht korrigiert).

Eingegangen am 14. Mai 2001 [Z17095]

- [1] Für eine beispielhafte Übersicht: A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **1999**.
- [2] a) L. N. Gastinel, C. Bignon, A. K. Misra, O. Hindsgaul, J. H. Shaper, D. H. Joiasse, *EMBO J.* **2001**, *20*, 638–649; b) U. M. Unligil, S. Zhou, S. Yuwaraj, M. Sarkar, H. Schachter, J. M. Rini, *EMBO J.* **2000**, *19*, 5269–5280; c) L. N. Gastinel, C. Cambillau, Y. Bourne, *EMBO J.* **1999**, *18*, 3546–3557; d) U. M. Unligil, J. M. Rini, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 510–517.
- [3] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.
- [4] a) J. Klein, R. Meinecke, M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336–5337; b) M. Vogtherr, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6093–6099; c) H. Maaheimo, P. Kosma, L. Brade, H. Brade, T. Peters, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12778–12788.
- [5] M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–6117.
- [6] Rekombinante Bovine β 4Gal-T1 (M_w 38 kDa) und synthetische UDP-Gal (M_w 610.3 Da) wurden von Calbiochem bezogen.
- [7] N. J. Kuhn, S. Ward, W. S. Leong, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *195*, 243–250.
- [8] a) M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Glycobiology* **1991**, *1*, 205–209; b) L. J. Berliner, R. D. Robinson, *Biochemistry* **1982**, *21*, 6340–6343.
- [9] a) T. Endo, Y. Kajihara, H. Kodama, H. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1939–1948; b) Y. Kajihara, T. Endo, H. Ogasawara, H. Kodama, H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 273–294; c) G. Srivastava, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Carbohydr. Res.* **1993**, *245*, 137–144; d) H. Yuasa, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5891–5892.
- [10] a) H. Debray, J. Montreuil, *Carbohydr. Res.* **1989**, *185*, 15–26; b) F. Fukumori, N. Takeuchi, T. Hagiwara, H. Ohbayashi, T. Endo, N. Kochibe, Y. Nagata, A. Kobata, *J. Biochem.* **1990**, *107*, 190–196; c) T. Weimar, T. Peters, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 79–82; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 88–91.
- [11] a) W. F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters, W. J. Peumans, *Biochem. J.* **1984**, *221*, 163–169; b) E. J. M. Van Damme, A. Barre, P. Rougé, F. Van Leuven, W. J. Peumans, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 128–137.

Fluoreszenzmikroskopische Verfolgung des photooxidativen Abbaus eines einzelnen aromatischen Kohlenwasserstoffmoleküls**

Thomas Christ, Florian Kulzer, Patrice Bordat und Thomas Basché*

Chemische Reaktionen können fluoreszenzmikroskopisch auf der Ebene einzelner Moleküle verfolgt werden.^[1] Von optischen Experimenten mit einzelnen Molekülen unter Umgebungsbedingungen weiß man, dass sie durch photochemische Reaktionen beendet werden, wobei die Moleküle in einen Zustand überführt werden, in dem sie nicht mehr absorbieren oder fluoreszieren. In den meisten Fällen hängt dieses „Photobleichen“ organischer Fluorophore von der Anwesenheit von Sauerstoff ab, dessen Einfluss auf die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften einzelner Fluorophore in jüngeren Arbeiten genauer studiert wurde.^[2] Obwohl das „Photobleichen“ ein wichtiger Prozess zum Abbau von organischen Farbstoffmolekülen unter Umgebungsbedingungen ist, ist das mechanistische Verständnis weitgehend unbefriedigend – dies gilt in besonderem Maße für die Klasse der vergleichsweise photostabilen Farbstoffe, die in der Einzelmolekülspektroskopie oder für viele technologische Anwendungen eingesetzt werden. Für den hier vorgestellten Fall einzelner Terrylenmoleküle in einem *p*-Terphenyl-Wirkkristall können wir nachweisen, dass eine selbstsensibilisierte Photooxidation entweder direkt zum „Photobleichen“ führt oder den ersten Schritt dahin darstellt.

Um einzelne Terrylenmoleküle in einem *p*-Terphenyl-Wirkkristall^[3] abzubilden, wird die konfokale Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Bei der Messung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit (Emissionszeitspur) unter Umgebungsbedingungen werden verschiedenartige Intensitätsänderungen beobachtet. Entweder fällt das Fluoreszenzsignal nach einer Periode konstanter Emissionsintensität irreversibel auf den Untergrundwert ab (Abbildung 1a), oder es springt auf einen neuen Wert, nachdem es zwischenzeitlich auf den Untergrundwert abgefallen war (Abbildung 1c). Im zweiten Fall steht am Ende der Abfolge von Ereignissen ein irreversibler Abfall des Fluoreszenzsignals auf den Untergrundwert. Zusätzlich zu den Zeitspuren werden simultan in nahtlos aufeinander folgenden Intervallen (5 s) die Emissionsspektren des untersuchten Moleküls aufgezeichnet. Für das Molekül, dessen Zeitspur in Abbildung 1a dargestellt ist, sind die Emissionsspektren alle identisch bis zu dem Zeitpunkt, an dem das Signal verschwindet. Sie stimmen völlig mit dem Spektrum eines Ensembles von Terrylenmolekülen in

[*] Prof. Dr. T. Basché, Dipl.-Chem. T. Christ, Dr. F. Kulzer
Institut für Physikalische Chemie
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 55099 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-3923953
E-mail: thomas.basche@uni-mainz.de
Dr. P. Bordat
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
55128 Mainz (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken R. Schmidt, M. Gudipati und Prof. Klaus Müllen für wertvolle Diskussionen und Anregungen.