

- [1] *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2. Aufl. (Hrsg.: G. M. Blackburn, M. J. Gait), Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- [2] D. R. Eyre, *Science* **1980**, *207*, 1315–1322.
- [3] *Gramicidin And Related Ion Channel-Forming Peptides* (Hrsg.: D. J. Chadwick, G. Cardew), Wiley, Chichester, **1999b**) (Novartis Foundation Symposium 225); R. E. Koeppe II, O. S. Andersen, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 231–258; c) P. Luger, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 939–959; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 905–925.
- [4] a) T. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1997–1999; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1921–1923; b) J.-C. Meillon, N. Voyer, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1004–1006; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 967–969; c) U. Koert, M. M. Harding, J.-M. Lehn, *Nature* **1990**, *346*, 339–342.
- [5] a) D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, 2015–2022; b) S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173–180; c) V. Berl, I. Huc, R. G. Khoury, M. J. Krische, J.-M. Lehn, *Nature* **2000**, *407*, 720–723; bersichtsartikel: d) A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 65; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 63; e) R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232; f) D. Seebach, M. Albert, P. I. Arvidsson, M. Rueping, J. V. Schreiber, *Chimia* **2001**, *55*, 345–353.
- [6] Übersichtsartikel: a) Y. Kobuke in *Advances in Supramolecular Chemistry, Vol. 4* (Hrsg.: G. W. Gokel), JAI, Greenwich, **1997**, S. 163–210; b) N. Voyer, *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 1–37; c) G. W. Gokel, O. Murillo, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 425–432; neuere Beiträge: d) B. Baumeister, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2031–2034; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1955–1958; e) N. Yoshino, A. Satake, Y. Kobuke, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 471–473; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 457–459, sowie Zitate in Lit. [7b].
- [7] a) H.-D. Arndt, A. Knoll, U. Koert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2137–2140; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2076–2078; b) A. Schrey, A. Vescovi, A. Knoll, C. Rickert, U. Koert, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 928–931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 900–902.
- [8] a) W. R. Veatch, E. T. Fossel, E. R. Blout, *Biochemistry* **1974**, *13*, 5249–5257; b) V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 925–949; c) D. A. Langs, *Science* **1988**, *241*, 182–187; d) Z. Zhang, S. M. Pascal, T. A. Cross, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8822–8828; e) S. M. Pascal, T. A. Cross, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 1101–1109; f) S. M. Pascal, T. A. Cross, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 495–513; g) Y. Chen, A. Tucker, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 757–769; h) D. A. Doyle, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 963–977.
- [9] a) A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, V. F. Bystrov, *FEBS Lett.* **1985**, *180*, 33–39; b) A. N. Nekrasov, A. V. Stepanov, V. P. Timofeev, *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 35–38; c) V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, A. L. Lomize, *Bull. Magn. Reson.* **1987**, *8*, 84–94.
- [10] a) A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, V. F. Bystrov, A. L. Lomize, Y. A. Ovchinnikov, *FEBS Lett.* **1985**, *186*, 168–174; b) R. R. Ketchum, W. Hu, T. A. Cross, *Science* **1993**, *261*, 1457–1460; c) F. Tian, T. A. Cross, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1993–2003; d) R. Fu, M. Cotton, T. A. Cross, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 261–268.
- [11] a) F. Kovacs, J. Quine, T. A. Cross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7910–7915; b) O. S. Andersen, H.-J. Apell, E. Bamberg, D. D. Busath, R. E. Koeppe II, F. J. Sigworth, G. Szabo, D. W. Urry, A. Woolley, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 609; c) T. A. Cross, A. S. Arseniev, B. A. Cornell, J. H. Davis, J. A. Kilian, R. E. Koeppe II, L. K. Nicholson, F. Separovic, B. A. Wallace, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 610–611; d) B. M. Burkhart, W. L. Duax, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 611–612.
- [12] a) H.-D. Arndt, A. Knoll, U. Koert, *ChemBioChem* **2001**, *221*–223; b) H.-D. Arndt, A. Vescovi, A. Schrey, J. R. Pfeifer, U. Koert, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2789–2801.
- [13] a) M. C. Goodall, *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *157*, 514; b) D. W. Urry, C. M. Venkatachalam, A. Spisni, R. J. Bradley, T. L. Trapane, K. U. Prasad, *J. Membr. Biol.* **1980**, *55*, 29–51; c) C. J. Stankovic, S. H. Heinemann, J. M. Delfino, F. J. Sigworth, S. L. Schreiber, *Science* **1989**, *244*, 813–817; d) D. Lelievre, Y. Trudelle, F. Heitz, G. Spach, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *33*, 379–385; e) C. J. Stankovic, S. H. Heinemann, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3702–3704; f) S. Crouzy, T. B. Woolf, B. Roux, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1370–1386.
- [14] I. L. Barsukov, A. L. Lomize, A. S. Arseniev, V. F. Bystrov, *Biol. Membr. (USSR)* **1987**, *4*, 171–193.
- [15] R. Gratias, H. Kessler, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2027–2031.
- [16] K. Wuthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [17] M. Nilges, S. I. O'Donoghue, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, *32*, 107–139.
- [18] A. T. Brunger, *X-PLOR: A System for X-ray Crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, **1992**.
- [19] Die symmetrische Struktur **B** weist auf eine gerade Zahl gebundener Cs<sup>+</sup>-Ionen hin. Die NMR-Titration von **1** mit CsI zeigt zwei Cs<sup>+</sup>-Ionen an, wie auch das ESI-Massenspektrum, das vom [1+2Cs]<sup>2+</sup>-Ion dominiert wird. Wahrscheinlich sind die Cs<sup>+</sup>-Ionen im unteren bzw. oberen Drittel der Kanalpore gebunden. Da wir jedoch die genaue Position der Cs<sup>+</sup>-Ionen im Konformer **B** bislang nicht NMR-spektroskopisch eingrenzen konnten, wurden diese in der Strukturrechnung nicht berücksichtigt.
- [20] a) J. A. Killian, K. U. Prasad, D. Hains, D. W. Urry, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4848–4855; b) D. V. Greathouse, J. F. Hinton, K. S. Kim, R. E. Koeppe II, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4291–4299.
- [21] a) B. W. Urban, S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1978**, *37*, 2628–2632; b) B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2. Aufl., Sinauer, Sunderland, **1992**.
- [22] S. B. Hladky, D. A. Haydon in *Current Topics in Membranes and Transport, Vol. 21* (Hrsg.: F. Bronner), Academic Press, New York, **1984**, S. 327–372.


## Nichtinvasive Transformation von Proteinen in optische pH-Sensoren durch Austausch von Tryptophan gegen Aminotryptophan\*\*

Nediljko Budisa,\* Marina Rubini, Jae H. Bae, Elisabeth Weyher, Waltraud Wenger, Ralph Golbik, Robert Huber und Luis Moroder

Unter den genkodierten natürlichen Aminosäuren kommt Tryptophan in Proteinen nur selten vor (ca. 1.2 %),<sup>[1]</sup> nimmt jedoch wegen der Beteiligung an vielfältigen spezifischen inter- und intramolekularen Wechselwirkungen eine besondere Stellung ein.<sup>[2]</sup> Tryptophan ist hauptsächlich für die UV-Absorption und Fluoreszenz von Proteinen verantwortlich<sup>[3]</sup> und wurde frühzeitig als nützliche intrinsische Sonde für Struktur- und Funktionsuntersuchungen von Proteinen sowie als attraktives Target für klassisches Protein-Engineering und -design erkannt. Die klassischen Protein-Engineering-Verfahren sind auf das Standardrepertoire der kanonischen Aminosäuren beschränkt. Diese Limitierung konnte aber in den letzten Jahren durch neuere Methoden überwunden werden, die eine Erweiterung des Aminosurerepertoires

[\*] Dr. N. Budisa, M. Rubini, J. H. Bae, E. Weyher, W. Wenger, Prof. Dr. R. Huber, Prof. Dr. L. Moroder  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz 18A, 82152 Martinsried (Deutschland)  
Fax: (+49)89-8578-3516  
E-mail: budisa@biochem.mpg.de  
Dr. R. Golbik  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
06120 Halle/Saale (Deutschland)

[\*\*] Wir danken Monika Franke für die Hilfe bei der deutschen Übersetzung.

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

ermöglichen (siehe zum Beispiel Lit. [4]). Wir entwickelten ein Verfahren für den In-vivo-Einbau nichtkanonischer Aminosäuren, das auf der traditionellen Nutzung von auxotrophen *E. coli*-Stämmen basiert,<sup>[5]</sup> die einem Selektionsdruck ausgesetzt werden (selective pressure incorporation (SPI)-Methode).<sup>[6]</sup> Diese Methode nutzt das Fehlen einer absoluten Substratspezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die eine entscheidende Rolle bei der Interpretation des genetischen Codes spielen.<sup>[7]</sup> Verschiedene strukturell und chemisch ähnliche Substrat-Analoga können aktiviert werden, was eine entsprechende tRNA-Beladung unter definierten Bedingungen ermöglicht (siehe z. B. Lit. [8]). Dadurch werden neue Codonzuordnungen möglich und somit Änderungen in der Interpretation des genetischen Codes unter experimentell ausgeübtem starkem Selektionsdruck. So wurde z. B. das Repertoire des UGG-Triplets, das eigentlich für Tryptophan codiert, mit neuen, bei der Translation aktiven Aminosäurechromophoren wie 4-Fluortryptophan, 5-Fluortryptophan, 6-Fluortryptophan,<sup>[9]</sup> 7-Azatriptophan<sup>[10]</sup> und 5-Hydroxytryptophan<sup>[11]</sup> oder sogar mit Tryptophan-ähnlichen Aminosäuren wie  $\beta$ -Thienopyrrolylalanin<sup>[12]</sup> oder  $\beta$ -Selenolo[3,2-*b*]pyrrolylalanin<sup>[13]</sup> erweitert.

Bezüglich der spektralen Eigenschaften von substituierten Indolen<sup>[14,15]</sup> ist bekannt, dass die Einführung von Elektromendonorengruppen in den Indolring zu intramolekularen Ladungsverschiebungen führt, die äußerst empfindlich auf pH-Änderungen reagieren.<sup>[16]</sup> So sind Aminosubstituenten aromatischer Ringe im angeregten Zustand weniger basisch als im Grundzustand.<sup>[17]</sup> Folglich beeinflusst der Protonierungsgrad im angeregten Zustand die Resonanzintegration der freien Elektronen in konjugierten Ringsystemen und verursacht Ladungsverschiebungen, die in Form von blau- oder rotverschobenen Spektralbanden beobachtbar sind.

Ausgehend von L-Serin und kommerziell verfügbaren Amino- und Hydroxyindolen wurden die Tryptophan-Analoga 4-Aminotryptophan **2**, 5-Aminotryptophan **3**, 4-Hydroxytryptophan **4**, 5-Hydroxytryptophan **5**, 6-Aminotryptophan **6** und 7-Aminotryptophan **7** (siehe Abbildung 1) mittels Tryptophan-Synthase<sup>[18]</sup> enzymatisch hergestellt und spektroskopisch charakterisiert<sup>[19]</sup> (Details dieser Synthesen werden an anderer Stelle veröffentlicht).

Für die Expressionsexperimente nach der SPI-Methode wurde die Pseudo-Wildtyp-Variante C40A/C82A/P27A des Ribonucleaseinhibitors Barstar als Modellprotein gewählt (**1-b\***), da sie drei Tryptophanreste enthält (Abbildung 2). Die Reste Trp38 und Trp44 sind ganz oder teilweise Solvens-exponiert, während Trp53 im hydrophoben Kern des Proteins eingebettet ist. Dieser Rest ist entscheidend an der strukturellen Integrität des Proteins beteiligt und kann durch ortsspezifische DNS-Mutagenese durch keine der restlichen 19 kanonischen Aminosäuren ersetzt werden.<sup>[20]</sup> Unter Verwendung der SPI-Methode mit dem Tryptophan-auxotrophen *E. coli*-Stamm ATCC 49980 als Expressionswirtszelle<sup>[21]</sup> wurden alle drei Tryptophanreste von **1-b\*** jeweils durch die Analoga **2**, **3**, **4** und **5** ersetzt. Die Ausbeute an Proteinvarianten war der des **1-b\***-Proteins ähnlich (10–30 mg mL<sup>-1</sup>).<sup>[22]</sup> Die erzeugten Proteinvarianten sind alle in Pufferlösungen stabil, mit Ausnahme von **4-b\***, das eine starke Tendenz zur Aggregation zeigt. Überraschenderweise konnten die Trypto-

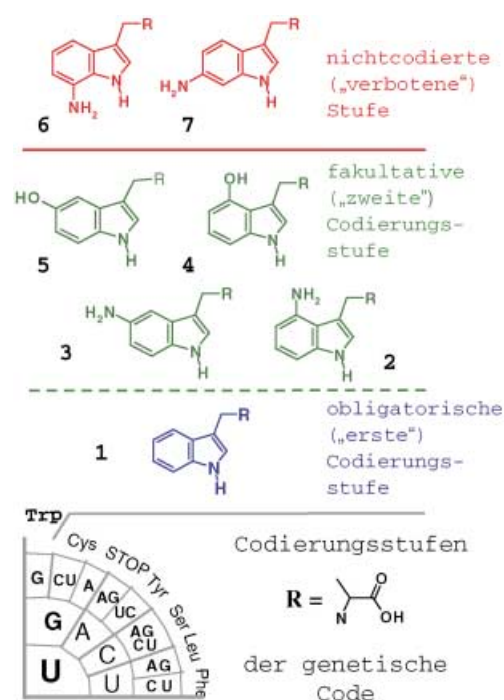


Abbildung 1. Engineering des genetischen Codes durch Erweiterung der Codierungsmöglichkeiten des Tryptophan-Triplets UGG unter experimentell ausgeübtem selektivem Druck. Der universelle genetische Code ordnet UGG als codierendes Triplet L-Tryptophan **1** zu, hier als obligatorische oder erste Codierungsstufe bezeichnet. Durch die SPI-Methode werden die Aminosäuren **2–5** in den genetischen Code eingeführt und bilden eine zweite oder fakultative Codierungsstufe. Die bei der Translation inaktiven Aminosäuren **6** und **7** werden beim gegenwärtigen Entwicklungsstand der SPI-Methode als außerhalb des genetischen Codes (nichtcodierte Stufe) liegend betrachtet.

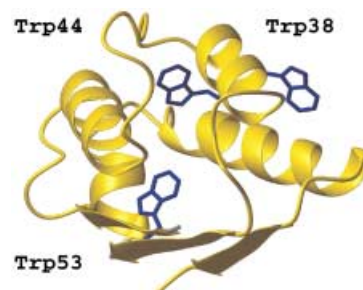


Abbildung 2. Die Struktur des Ribonucleaseinhibitors Barstar<sup>[23]</sup> mit markierten Tryptophanresten, dargestellt als Bändermodell mit dem Programm MOLSCRIPT.<sup>[24]</sup>

phan-Analoga **6** und **7** nicht eingebaut werden, was auf eine schlechte Erkennung durch den Proteintranslationsapparat hinweist.

Als qualitatives Kriterium für einen erfolgreichen Einbau wurden die Absorptions- und Fluoreszenzprofile der Proteinvarianten verwendet. Eine Hydroxygruppe an Position 5 des Indolrings führt zu einer deutlichen Erweiterung der <sup>1</sup>L<sub>b</sub>-Übergangsbande,<sup>[15]</sup> und im Spektrum der **5-b\***-Variante bei 310 nm wird eine ausgeprägte Schulter beobachtet ( $\epsilon_{310} = 8180 \pm 395 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; siehe Hintergrundinformation, Tabelle 1). Hingegen ist das Absorptionsmaximum von **4**<sup>[19]</sup> dem des Tyrosins ähnlich, dessen phenolische OH-Gruppe im Grundzustand einen pK<sub>a</sub>-Wert von etwa 10 hat.<sup>[3]</sup> Daher ergab

sich für **4-b\*** im untersuchten pH-Bereich keine Verschiebung im UV-Spektrum. Die Molekulargewichtsdifferenzen zwischen **1** und **2**, zwischen **1** und **3** (jeweils 15 Da) sowie zwischen **1** und **4** und zwischen **1** und **5** (jeweils 16 Da) sind groß genug, um eine quantitative massenspektrometrische Analyse zu erlauben. Während die Tryptophan-Analoga **2** und **3** quantitativ in Barstar eingebaut werden konnten (ber.:  $M_r = 10298.2$ ; gef.:  $M_r = 10299 \pm 2.0$ ), überstieg die Einbauquote der Tryptophan-Analoga **4** und **5** nie 80 %. Obwohl das **1-b\***-Protein nicht mehr nachweisbar war und die global substituierten Spezies in den Proben dominierten ( $10300 \pm 2.4$  Da), waren immer auch Kontaminationen von Barstar-Varianten mit einem 4-Hydroxy- oder 5-Hydroxytryptophanrest ( $10269 \pm 4.1$  Da) oder mit zwei 4-Hydroxy- oder 5-Hydroxytryptophanresten ( $10285 \pm 2.0$  Da) nachweisbar.

Wie zu erwarten, waren bei allen Barstar-Varianten die UV-spektralen Eigenschaften der Tryptophan-Analoga **2-5** zu beobachten. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Spektren von **2-b\*** und **3-b\*** pH-empfindlich sind (Abbildung 3).

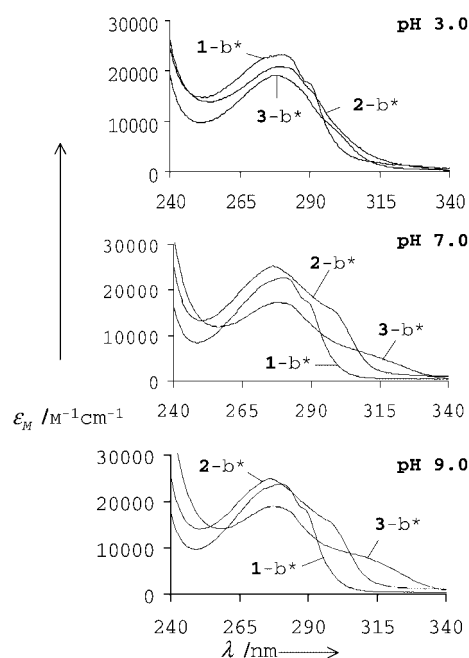


Abbildung 3. UV-Absorptionsspektren von **1-b\*** und seinen Varianten **2-b\*** und **3-b\*** bei verschiedenen pH-Werten. Unter neutralen und basischen Bedingungen erscheint eine prominente Schulter, für **2-b\*** bei 300 nm und für **3-b\*** bei 305 nm.

Die Absorptionsprofile von **1-b\***, **2-b\*** und **3-b\*** sind bei pH 3.0 – hier wird die Aminogruppe zum Monokation protoniert – einander sehr ähnlich. Dagegen ist bei pH 7.0 und 9.0 das Absorptionsmaximum von **3-b\*** um fast 6 nm ( $\lambda_{\max} = 275$  nm) blauverschoben, während die Absorptionsschulter von **3-b\*** um fast 15 nm ( $\lambda_{\max} = 310$  nm) markant rotverschoben ist. Ähnliche Eigenschaften, wenn auch in abgeschwächter Form, sind bei **2-b\*** zu beobachten. Alle diese Änderungen können auf die erhöhte Basizität der Iminogruppe im Indolring und letztlich auf die Anionisierung bei  $\text{pH} > 6.0$  zurückgeführt werden. Tatsächlich ergaben Lösungsmittelstudien an 5-Aminoindol, dass infolge der Depro-

tonierung der Iminogruppe im Indolring ein Monoanion entsteht.<sup>[17]</sup>

Sowohl der UV-Übergang als auch die Fluoreszenz des Indols sind auf die zwei überlappenden Übergänge  $^1L_a$  und  $^1L_b$  zurückzuführen, die zueinander fast orthogonal polarisiert sind.<sup>[3]</sup> Das Absorptionsprofil von 5-Aminoindol ist ebenfalls eine Mischung der  $^1L_a$ - und  $^1L_b$ -Bande, wobei die kleinere Absorptionsbande (Schulter) bei etwa 285 nm auf den Übergang vom Grund- zum  $^1L_a$ -Zustand (lange Achse) und das Maximum bei etwa 275 nm auf den Übergang vom Grund- zum  $^1L_b$ -Zustand (kurze Achse) zurückzuführen ist. Die Aminogruppe, die auf der langen Achse (d.h. in Position 5) lokalisiert ist, sollte den  $^1L_b$ -Zustand mehr stören als den  $^1L_a$ -Zustand. Deshalb lässt sich die größere Rotverschiebung bei 5-Aminoindol dadurch erklären, dass die Stickstoffladung innerhalb der  $\pi$ -Elektronenwolke des Indolrings stärker delokalisiert ist als bei Hydroxyindol. Da die Polarisierung der Aminogruppe ( $1.44 \times 10^{-24}$  mL pro Molekül) fast doppelt so hoch ist wie die der Hydroxygruppe ( $0.733 \times 10^{-24}$  mL pro Molekül),<sup>[25]</sup> ist dies durchaus denkbar. Die im Vergleich zu den Sauerstoffelektronen weniger fest gebundenen Stickstoffelektronen neigen weit mehr zu räumlichen Verschiebungen. Deshalb ist es auch nicht überraschend, dass sich die Absorptionseigenschaften der Hydroxytryptophan-b\*-Varianten **4-b\*** und **5-b\*** im Bereich von pH 3.0 bis 9.0 nicht bedeutsam ändern. Entsprechend muss die relative pH-Unempfindlichkeit von **4-b\*** und **5-b\*** eher den intrinsischen spektroskopischen Eigenschaften dieser Hydroxytryptophanreste als ihren Proteinumgebungen zugeordnet werden, - d. h., das Protein ist nur ein Träger für die eingebauten Chromophore. Tatsächlich haben CD-Messungen ergeben, dass sich die Sekundärstruktur der Proteinvarianten im Bereich von pH 6.0 bis 9.0, in dem Barstar stabil ist, ebenso wie die von **1-b\*** nicht verändert (unveröffentlichte Ergebnisse). Im sauren Bereich ( $\text{pH} < 4.0$ ) liegt das **1-b\*** Protein als „molten globule“ vor, während es unter basischeren Bedingungen ( $\text{pH} > 10$ ) denaturiert.<sup>[20]</sup>

Bekanntlich führen elektronenspendende Amino- und Hydroxygruppen an verschiedenen Positionen des Indolrings zu einem Fluoreszenzspektrum mit zwei Maxima bei 350 und 520 nm.<sup>[14,15,16]</sup> Allerdings hängen die Spektraleigenschaften von verschiedenen Indolen stark von der Polarität des Lösungsmittels ab.<sup>[3]</sup> So dient im  $S^0$ -Zustand Wasser als Protonendonator, während im  $S^1$ -Zustand die intramolekulare Ladungsverschiebung von der Aminogruppe zum Indolring am effektivsten ist.<sup>[17]</sup> Dass mit steigendem pH-Wert die relative Fluoreszenzintensität von **2-b\*** und **3-b\*** im Vergleich zu der von **1-b\*** stark abnimmt (Abbildung 4), kann mit Wechselwirkungen wie der Entstehung von Wasserstoffbrücken zwischen Wassermolekülen und dem Aminoindolring im  $S^1$ -Zustand erklärt werden. Diese Wechselwirkungen führen zu erhöhten Geschwindigkeiten strahlungsfreier Prozesse und bieten eine Erklärung für das durch Steady-State-Fluoreszenzmessungen bestätigte Fehlen der zweiten Fluoreszenzbande der jeweiligen Proteinvarianten in wässriger Lösung. Die zweite Bande tritt wieder auf, wenn die Proteinvarianten in geeigneten organischen Lösungsmitteln gelöst werden. Somit stehen pH-Sensoren auf Proteinbasis mit dualer Fluoreszenz in nichtpolaren Medien wie Membranumgebungen zur Verfügung.

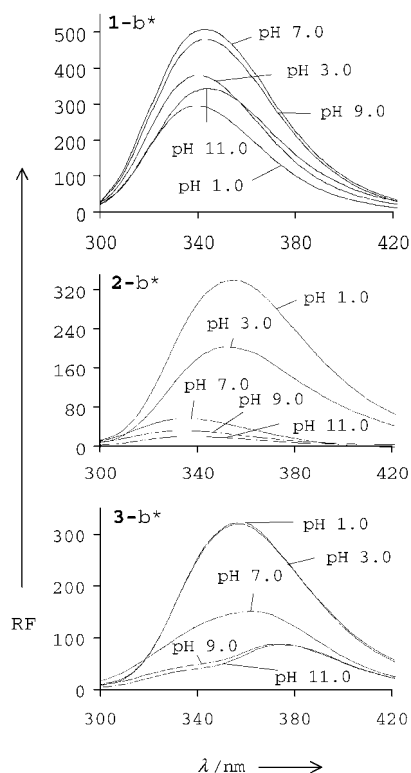


Abbildung 4. pH-Einfluss auf die Fluoreszenzemissionsprofile von 1-b\*, 2-b\* und 3-b\*.

Die Änderungen der relativen Fluoreszenzintensität bei 1-b\*, 4-b\* und 5-b\* sind im analysierten pH-Bereich graduell und monoton (Abbildung 5), wobei nur bei 4-b\*, höchstwahrscheinlich wegen seiner hohen Tendenz zur Aggregation, die Quantenausbeute merklich verringert ist. Die niedrigere Fluoreszenzintensität unter sauren Bedingungen wird wahrscheinlich durch den Übergang zum „Molten-Globule“-Zustand unterhalb von pH 4.0 verursacht. Unter basischen Bedingungen (pH > 10.0) denaturiert Barstar, was zur verminderten Fluoreszenzintensität in diesem pH-Bereich führt.<sup>[20]</sup> Andererseits nehmen bei 2-b\* und 3-b\* im Bereich von pH 4.0 bis 9.0 die Fluoreszenzintensitäten mit steigendem pH-Wert deutlich ab, wobei bei pH > 9.0 ein Plateau erreicht

wird (Abbildung 4 und 5). Die Trends der Fluoreszenzintensitätsänderungen von den 2-b\*- und 3-b\*-Varianten sind völlig unterschiedlich zu denen der 1-b\*, 4-b\*- und 5-b\*-Varianten.

Die Positionen des Emissionsmaximums bei pH 3.0 für 4-b\* und 5-b\* ähneln der für 1-b\*, während die für 2-b\* und 3-b\* um 18 nm rotverschoben ist (Abbildung 4 und 5). Beim Übergang zu höheren pH-Werten (pH 7.0 und 9.0) variiert die Position des Emissionsmaximums für 1-b\*, 4-b\* und 5-b\* kaum, während für 2-b\* und 3-b\* zwei deutlich unterschiedliche Trends vorliegen. Für die 2-b\*-Variante erhält man eine blauverschobene kooperative Titrationskurve mit einem Übergangsmittelpunkt zwischen pH 5 und 6. Dagegen ist der kooperative Übergang des Emissionsmaximums für 3-b\* mit dem Übergangsmittelpunkt bei pH 8 rotverschoben (Abbildung 5). Diese großen Unterschiede beruhen auf Änderungen in der Ladungsdichteverteilung entlang des Indolrings, welche von der Art, der Orientierung und der Position der Substituenten am Indolring in einem bestimmten Lösungsmittel abhängen. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren lässt sich die beobachtete Rotverschiebung für 3-b\* folgendermaßen erklären: 5-Aminoindol ist im S<sup>1</sup>-Zustand ein besserer Protonendonator als Wasser, d.h., es ist im angeregten Zustand weniger protoniert als 4-Aminoindol. Anders gesagt, die für 2-b\* gemessene Blauverschiebung ist ein Hinweis auf eine stärkere Protonierung des 4-Aminoindols in angeregtem Zustand (d.h., Wassermoleküle als Lösungsmittel sind bessere Protonendonoren als 4-Aminoindol im S<sup>1</sup>-Zustand). Offensichtlich ist für eine starke Rotverschiebung eine Aminosubstitution an Position 5 des Indolrings (diese Position liegt auf dem Dipolübergangsmoment) sehr viel günstiger als an Position 4, was mit Literaturdaten zu Modellverbindungen vollkommen übereinstimmt.<sup>[3,16,17]</sup> Zudem ist der beobachtete Übergang eine Folge der Gleichgewichte im Grundzustand und im angeregten Zustand zwischen den jeweiligen ionisierten Formen. Diese Gleichgewichte sind nicht nur pH-abhängig, sondern sie bedingen auch die Konzentrationsunterschiede der Formen im Grund- und im angeregten Zustand.

Die pH-Empfindlichkeit der 2-b\*- und 3-b\*-Varianten in Bezug auf das Fluoreszenzemissionsmaximum und die Fluoreszenzintensität ist das Ergebnis eines intramolekularen Ladungstransfers, der ausschließlich aus Kation-zu-Anion-Übergängen der Aminoindole bei ca. pH 6 entsteht. Daher ist die Umwandlung von Barstar von einem pH-unempfindlichen in ein pH-empfindliches Fluoreszenzprotein in erster Linie das Ergebnis der intrinsischen Eigenschaften der Aminotryptophan-Analoga 2 und 3, die in die Barstar-Struktur integriert sind. Wegen der vielfältigen Funktionen der Tryptophanreste in Proteinen ist es vorstellbar, dass mit dem Einbau von Amino- und Hydroxyindolen oder anderen indolähnlichen Seitenketten maßgeschneiderte Proteine hergestellt werden können, die nützliche nichtinvasive Werkzeuge für eine In-vivo- und In-vitro-Beobachtung von Proteinfaltungen wie auch von Protein/Membran-, Protein/Protein-, Protein/Ligand- und Enzym/Substrat-Wechselwirkungen sein können. Proteinvarianten, in denen sämtliche Tryptophanreste durch verwand-

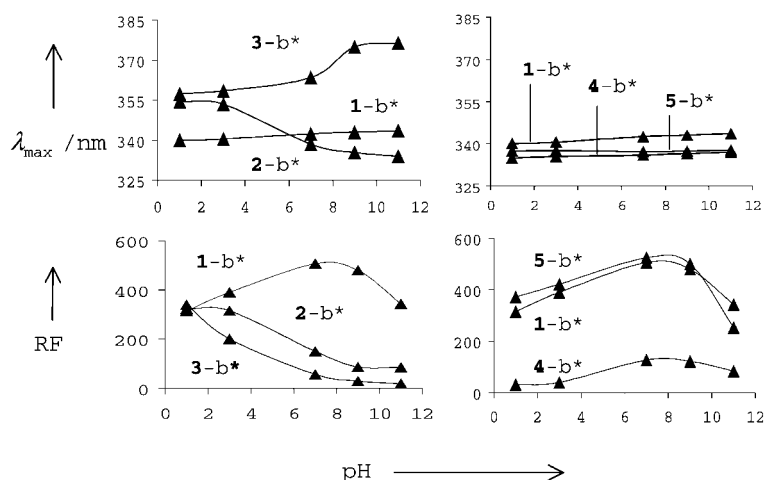


Abbildung 5. Änderung der Fluoreszenzemissionsmaxima ( $\lambda_{max}$ ) und der relativen Intensitäten (RF) in Abhängigkeit vom pH-Wert.

te Analoga mit vordefinierten spektralen Eigenschaften ersetzt sind, stehen jetzt durch die SPI-Methode zur Verfügung und bereiten den Weg zum Design von proteinbasierten molekularen Sensoren.

Eingegangen am 18. März 2002,  
veränderte Fassung am 5. Juni 2002 [Z18926]

- [1] a) M. O. Dayhoff, *Atlas of protein sequence and structure*, Vol. 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, **1972**; b) G. D. Rose, A. R. Geselowitz, G. J. Lesser, R. H. Lee, M. H. Zehfus, *Science* **1985**, 229, 834–838; c) H. O. Villar, R. T. Koehler, *Biopolymers* **2000**, 53, 226–232.
- [2] a) D. A. Dougherty, *Science* **1996**, 271, 163–168; b) U. Samanta, D. Pal, P. Chakrabarti, *Proteins* **2000**, 38, 288–300; c) U. Samanta, P. Chakrabarti, *Protein Eng.* **2001**, 14, 7–15.
- [3] a) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, **1999**; b) O. S. Andersen, D. V. Greathouse, L. L. Providence, M. D. Becker, R. E. Koeppe, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5142–5146; c) M. Cotton, C. L. Tian, D. D. Busath, R. B. Shirts, T. A. Cross, *Biochemistry* **1999**, 38, 9185–9197.
- [4] a) S. M. Hecht, B. L. Alford, Y. Kuroda, S. Kitano, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 4517–4520; b) J. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, R. A. Chamberlin, R. S. Dalia, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8013–8014; c) L. E. Steward, C. S. Collins, M. A. Gilmore, J. E. Carlson, J. B. Ross, R. A. Chamberlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6–11; d) C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, 244, 182–188; e) M. Sisido, *Prog. Polym. Sci.* **1992**, 17, 699–764; f) T. Hohsaka, D. Kajihara, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 34–40; g) N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. Dong, L. Moroder, R. Huber, *FASEB J.* **1999**, 13, 41–51; h) C. M. van Hest, K. L. Kiick, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1282–1288; i) D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 645–652.
- [5] a) G. Brawerman, M. Ycas, *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, 68, 112–117; b) M. H. Richmond, *Bacteriol. Rev.* **1962**, 26, 398–420; c) S. Schlessinger, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 3877–3883.
- [6] a) C. Minks, S. Alefelder, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9431–9442; b) C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 949–951; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 923–925.
- [7] N. Budisa, L. Moroder, R. Huber, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, 55, 1626–1635.
- [8] a) J. B. A. Ross, A. G. Szabo, C. W. V. Hogue, *Methods Enzymol.* **1997**, 278, 151–190; b) N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 230, 788–796; c) W. Karnbrock, E. Weyher, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 913–914; d) D. Besse, N. Budisa, W. Karnbrock, C. Minks, H. J. Musiol, S. Pegoraro, F. Siedler, E. Weyher, L. Moroder, *Biol. Chem.* **1997**, 378, 211–218; e) N. Budisa, G. Pifat, *Croat. Chem. Acta* **1988**, 71, 179–187; f) N. Budisa, R. Huber, R. Golbik, C. Minks, E. Weyher, L. Moroder, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 53, 1–9; g) N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, L. Moroder, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1997**, 270, 616–623; h) C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Anal. Biochem.* **2000**, 284, 29–34.
- [9] a) E. Pratt, C. Ho, *Biochemistry* **1975**, 14, 3035–3040; b) P. M. Bronskill, J. T. Wong, *Biochem. J.* **1988**, 249, 305–308; c) C. Y. Wong, M. R. Eftink, *Biochemistry* **1998**, 37, 8938–8946; d) C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Biochemistry* **1999**, 38, 10649–10659.
- [10] P. Soumillion, L. Jespers, J. Vervoort, J. Fastrez, *Protein Eng.* **1995**, 8, 451–456.
- [11] C. W. V. Hogue, I. Rasquinha, A. G. Szabo, J. P. Macmanus, *FEBS Lett.* **1992**, 310, 269–272.
- [12] N. Budisa, S. Alefelder, J. H. Bae, R. Golbik, C. Minks, R. Huber, L. Moroder, *Protein Sci.* **2001**, 10, 1281–1292.
- [13] J. H. Bae, S. Alefelder, J. T. Kaiser, R. Friedrich, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *J. Mol. Biol.* **2001**, 309, 925–936.
- [14] S. Undenfriend, D. F. Bogdanski, H. Weisbach, *Science* **1955**, 122, 972–973.
- [15] T. Kishi, M. Tanaka, J. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, 50, 1267–1271, zit. Lit.
- [16] H. K. Sinha, S. K. Dogra, M. Krishnamurthy, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 4401–4407, zit. Lit.
- [17] R. Golbik, H. Neef, G. Hübner, S. König, B. Seliger, L. Meshalkina, G. A. Kochetov, A. Schellenberger, *Bioorg. Chem.* **1991**, 19, 10–17, zit. Lit.
- [18] E. Wilson Miles, H. Kawasaki, A. S. Ahmed, H. Morita, S. Nagata, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 6280–6287.
- [19] Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten der Tryptophan-Analoga wurden bei 25 °C bestimmt. **2** bei pH 3.0:  $\lambda_{\max} = 274$  nm,  $\epsilon_{274} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; bei pH 7.0:  $\lambda_{\max} = 272$  nm,  $\epsilon_{274} = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; bei pH 9.0 sind die Werte identisch mit denen bei pH 7.0. **3** bei pH 3.0:  $\lambda_{\max} = 278$  nm,  $\epsilon_{278} = 5580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; bei pH 7.0:  $\lambda_{\max 1} = 271$  nm,  $\epsilon_{271} = 4750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_{\max 2} = 305$  nm,  $\epsilon_{305} = 2450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; bei pH 9.0:  $\lambda_{\max 1} = 270$  nm,  $\epsilon_{270} = 5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_{\max 2} = 305$  nm,  $\epsilon_{305} = 3050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Absorptionseigenschaften und -maxima von **1**, **4** und **5** sind im Bereich von pH 3–9 kaum pH-abhängig. Mittelwerte sind für **1**  $\lambda_{\max} = 280$  nm,  $\epsilon_{280} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; für **4**  $\lambda_{\max} = 262$  nm,  $\epsilon_{262} = 6130 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; für **5**  $\lambda_{\max 1} = 275$  nm,  $\epsilon_{275} = 5300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda_{\max 2} = 295$  nm,  $\epsilon_{295} = 4350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .
- [20] a) R. Swaminathan, U. Nath, J. B. Udgaonkar, N. Periasamy, C. Krishnamoorthy, *Biochemistry* **1996**, 35, 9150–9157; b) R. Khurana, A. T. Hate, U. Nath, J. B. Udgaonkar, *Protein Sci.* **1995**, 4, 1133–1144; c) B. R. Rami, J. B. Udgaonkar, *Biochemistry* **2002**, 41, 1710–1716.
- [21] Die Fermentationskultur mit **5** nach der Proteinexpression behält dieselbe Farbe wie die Barstar-Kultur, während die Kulturen mit **4** wie die Substanz selbst gefärbt waren (mattes Dunkelgrün). Ähnliche Effekte wurden bei **2** (mattes Orange) und **3** (dunkles Orange) beobachtet.
- [22] R. Golbik, G. Fischer, A. R. Fersht, *Protein Sci.* **1999**, 8, 1505–1514.
- [23] C. Martin, R. W. Hartley, Y. Mauguen, *FEBS Lett.* **1999**, 452, 128–132.
- [24] P. J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24, 946–950.
- [25] S. K. Burley, G. A. Petsko, *Adv. Protein Chem.* **1988**, 39, 125–186.

## Präparation und Charakterisierung eines bimetalischen Modellkatalysators: Co-Pd-Nanopartikel auf Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>\*\*

Michael Heemeier, Anders F. Carlsson,  
Matthias Naschitzki, Martin Schmal,  
Marcus Bäumer\* und Hans-Joachim Freund

Eine wichtige Voraussetzung für Studien, die auf ein mikroskopisches Verständnis katalytischer Systeme abzielen, ist die Entwicklung geeigneter, wohldefinierter Modellsysteme. Dabei kommt der Anpassung eines Modellsystems an die strukturelle Komplexität der Realsysteme, der Überwindung

[\*] Priv.-Doz. Dr. M. Bäumer, M. Heemeier, Dr. A. F. Carlsson, M. Naschitzki, Prof. Dr. H.-J. Freund  
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft  
Abteilung Chemische Physik  
Faradayweg 4–6, 14195 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-8413-4101  
E-mail: baeumer@fhi-berlin.mpg.de

Prof. Dr. M. Schmal  
NUCAT-COPPE  
Federal University of Rio de Janeiro (Brasilien)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Max-Planck-Gesellschaft sowie die Deutsche Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt. A.F.C. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium. Wir danken Prof. V. Matolin (Prag), Prof. J. Nørskov (Lyngby) und Dr. T. Risse (Fritz-Haber-Institut, Berlin) für wertvolle Diskussionsbeiträge sowie K. H. Hansen (Arbeitsgruppe Prof. F. Besenbacher, Århus) für experimentelle Beiträge zu Beginn des Projektes.