

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen  
Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Dipl.-Phys. Alexa Freifrau von Ketteler  
aus München

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2012



# Fluoreszenzspektroskopie von carba-Dihydronikotinamidadenindinukleotid

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Petrich  
Prof. Dr. Matthias Weidemüller



FÜR RICHARD, MEINE ELTERN UND MEINE GESCHWISTER



## Fluoreszenzspektroskopie von carba-Dihydrornikotinamidadenindinukleotid

Die spektroskopischen Eigenschaften des stabilen NAD-Analogs carba-Nikotinamidadenindinukleotid (cNAD) wurden sowohl von physikalischer Seite als auch im Hinblick auf die Anwendbarkeit in einem optischen Glucosesensor untersucht. Entgegen der Literatur weist cNADH den gleichen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 6.2(2)mM^{-1}cm^{-1}$  wie NADH auf. Die experimentell beobachtete Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von 340nm (NADH) zu 360nm (cNADH) konnte auf Basis quantenchemischer Rechnungen nachvollzogen werden und begründet sich letztlich in der Ladungsverschiebung am Cyclopentanring. Die maximale Fluoreszenzemission tritt sowohl bei NADH als auch bei cNADH bei einer Wellenlänge von 464(2)nm auf, wobei cNADH mit  $Q=0,024(2)$  eine um 50% höhere Quantenausbeute als NADH besitzt. Es konnte ferner verifiziert werden, dass beide Fluorophore innerhalb der Fehlergrenzen die gleichen Fluoreszenzlebensdauern von  $\tau_1 = 0,32(3)ns$  und  $\tau_2 = 0,68(3)ns$  aufweisen. Mehrere Hypothesen zur Ursache des Auftretens von *zwei* Lebensdauern wurden untersucht. Fluoreszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff, Protonierung /Deprotonierung im elektronisch angeregten Zustand und die cis/trans-Isomerie konnten ausgeschlossen werden. Ebenso wurde eine spektrale Abhängigkeit der Lebensdauern nicht beobachtet. Während ein 2-Zustands-Modell für NADH noch Fragen offen lässt, konnten die beiden Fluoreszenzlebensdauern von cNADH in H<sub>2</sub>O auf eine offene und eine geklappte Konformation des Moleküls zurückgeführt werden. Die Bindung des Coenzym NADH bzw. cNADH an ein Enzym (hier: Glucosedehydrogenase) erhöht sowohl die Quantenausbeute als auch die Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau_{geb} = 2,9(1)ns$ ). In diesem Kontext wurde die Fluoreszenzlebensdauerermessung als neuartiges Verfahren zur zuverlässigen Bestimmung der Bindungskonstante zwischen Enzym und Fluorophor vorgeschlagen und experimentell demonstriert. Ferner wurde die Option der Fluoreszenzlebensdauerermessung von cNADH für einen - auch bei variierender Enzymaktivität - robusten Glucosesensor belegt.

## Fluorescence spectroscopy of carba-dihydrornicotinamideadeninedinucleotide

The spectroscopic properties of the stable NAD-analogue carba-nicotinamide adenine dinucleotide (cNAD) were analyzed both from a physical point of view and regarding its applicability for glucose sensing. In contrast to literature the extinction coefficient of cNADH and NADH match ( $\epsilon = 6.2(2)mM^{-1}cm^{-1}$ ). Quantum chemical calculations supported the redshift observed experimentally between the absorption maximum of cNADH (360nm) compared to that of NADH (340nm) and linked it to the charge transfer at the cyclopentane ring. The maximum of fluorescence emission occurs at 464(2)nm for both, NADH and cNADH, whereby the quantum yield of cNADH  $Q=0,024(2)$  is 50% higher compared to NADH. Furthermore, both cNADH and NADH show two fluorescence lifetimes ( $\tau_1 = 0,32(3)ns$  and  $\tau_2 = 0,68(3)ns$ ) of identical values (within the error margins). Different hypotheses concerning the origin of the occurrence of *two* fluorescence lifetimes were investigated. Fluorescence quenching due to molecular oxygen, an excited state protonation/deprotonation as well as cis/trans isomerization could be excluded. Moreover, the fluorescence lifetimes show no spectral dependence. While a two-state model for NADH leaves some questions unanswered, the two lifetimes of cNADH in H<sub>2</sub>O could be related to an open and a folded conformation of the molecule.

If the coenzymes NADH or cNADH bind to an enzyme (here glucose dehydrogenase) the quantum yield as well as the fluorescence lifetime increases ( $\tau_{geb} = 2,9(1)ns$ ). In this context the use of fluorescence lifetime detection was proposed and successfully demonstrated as a novel approach for the reliable determination of the association constant between an enzyme and a fluorophore. Furthermore, it was shown that the fluorescence lifetime measurement of cNADH can be applied to glucose sensing even at varying enzyme activity.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen und Methoden</b>	<b>5</b>
2.1	Strukturen . . . . .	5
2.2	Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	8
2.3	Messmethoden . . . . .	13
2.3.1	UV/Vis Spektroskopie . . . . .	13
2.3.2	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	13
2.3.3	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	14
2.4	Bestimmung der Bindungskonstante mittels NADH . . . . .	20
2.5	Glucosebestimmung mittels NADH . . . . .	22
2.6	Bestimmung der Aktivität eines Enzyms mittels Fluoreszenzlebensdauermessung . . . . .	25
2.7	Probenpräparation . . . . .	26
2.8	Sauerstofffrei messen . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Quantenchemische Rechnungen</b>	<b>29</b>
3.1	Methode und Durchführung . . . . .	29
3.1.1	Grundzustand . . . . .	29
3.1.2	Elektronisch angeregte Zustände . . . . .	30
3.1.3	Durchführung . . . . .	30
3.1.4	Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten . . . . .	31
3.2	Absorption . . . . .	32
3.3	Fluoreszenz . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Spektroskopische Eigenschaften von freiem NADH und cNADH in H<sub>2</sub>O</b>	<b>41</b>
4.1	Absorption . . . . .	41
4.2	Fluoreszenz . . . . .	43
<b>5</b>	<b>Modelle zur Erklärung der 2 Fluoreszenzlebensdauern von freiem (c)NADH</b>	<b>47</b>
5.1	Isomeriemodell . . . . .	50
5.1.1	Dihydronikotinamid . . . . .	51
5.1.2	Cisoide Modellverbindung . . . . .	52
5.2	Protonierung und Deprotonierung . . . . .	54
5.2.1	Isotopeneffekt . . . . .	55
5.2.2	pH Abhängigkeit . . . . .	57
5.2.3	Aprotisches Lösungsmittel . . . . .	57
5.3	Spektralmodell . . . . .	61
5.4	Gleichgewichtsmodell . . . . .	64



5.5	Konformationsmodell . . . . .	68
5.5.1	Spektroskopischer Vergleich (c)NADH mit (c)NMNH . . . . .	69
5.5.2	Untersuchung der geklappten Konformation durch Anregung bei 260nm . . . . .	70
5.5.3	Messung von (c)NADH und (c)NMNH in Methanol . . . . .	73
5.6	Zusammenfassung . . . . .	75
<b>6</b>	<b>Anwendungsmöglichkeiten von Fluoreszenzlebensdauer- messungen von (c)NADH</b>	<b>77</b>
6.1	Fluoreszenzeigenschaften von freiem und gebundenem NADH . . . . .	77
6.2	Bestimmung der Bindungskonstante . . . . .	79
6.2.1	Bestimmung über die Messung der Fluoreszenzintensität . . . . .	79
6.2.2	Bestimmung über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	80
6.3	Fluoreszenzlebensdauerbasierter Glucosesensor . . . . .	82
6.3.1	Messung mit NADH . . . . .	83
6.3.2	Messung mit cNADH . . . . .	83
6.4	Messung der Aktivität eines Enzyms über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	85
6.5	Zusammenfassung . . . . .	86
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
7.1	Spektroskopische Eigenschaften von freiem NADH und cNADH . . . . .	87
7.2	Modelle zur Erklärung von zwei Fluoreszenzlebensdauern . . . . .	92
7.3	Anwendungsmöglichkeit der Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	98
7.3.1	Bestimmung der Bindungskonstante . . . . .	98
7.3.2	NADH vs. cNADH als Glucosesensor . . . . .	100
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>103</b>
A.1	Lösung der Differentialgleichung des Gleichgewichtsmodells . . . . .	103
A.2	Herleitung der Gleichung zur Bestimmung der Bindungskonstante über die Messung der Fluoreszenzintensität . . . . .	103
A.3	Herleitung der Gleichung zur Bestimmung der Bindungskonstante über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	105
A.4	Bestimmung des Extinktionskoeffizientens von cNAD mittels Reduzierung mit ADH . . . . .	105
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>109</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>110</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>111</b>



## 1 Einleitung

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselkrankheit, die auftritt, wenn der Körper entweder nicht genug Insulin produziert, oder es nicht effektiv nutzen kann (Resistenz) [1]. Das Hormon Insulin regelt dabei den Transport und Abbau der Glucose („Blutzucker“) aus dem Blutplasma und der Gewebsflüssigkeit in das Innere der Zelle, um dort für die Energiegewinnung und -Umsetzung zur Verfügung zu stehen [2].

Man unterscheidet im wesentlichen zwischen drei Hauptformen der Krankheit:

- **Typ-1 Diabetes mellitus** ist eine Autoimmunkrankheit, bei der das körpereigene Immunsystem die Insulin-produzierenden Zellen im Pankreas attackieren. Die Zellen werden funktionsuntüchtig und können nicht mehr genug Insulin herstellen. Folglich sind Typ-1 Patienten vollständig von externer Insulinzugabe abhängig. Dieser Typus ist altersunspezifisch, d.h. er kann in jedem Lebensalter auftreten.
- **Typ-2 Diabetes mellitus** zeichnet sich durch eine unterschiedlich ausgeprägte Resistenz gegen das körpereigene Insulin aus. Circa 90% der Menschen mit Diabetes leiden an Typ-2. Normalerweise sind Erwachsene von dieser Krankheit betroffen, die Anzahl an Kindern, bei denen Typ-2 Diabetes diagnostiziert wird, ist jedoch steigend. Typ-2 Diabetiker brauchen meist keine externe Insulinzufuhr, sondern werden häufig medikamentös und durch eine spezielle Diät behandelt.
- **Gestationsdiabetes** kann ausschließlich bei schwangeren Frauen auftreten und verschwindet normalerweise nach der Geburt. Nichtsdestotrotz haben Frauen mit diagnostizierter Gestationsdiabetes ein erhöhtes Risiko später an Typ-2 Diabetes zu erkranken.

Laut der „International Diabetes Federation“ (IDF) waren im Jahr 2011 366 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt [3]. Deutschland hat mit 7,5 Millionen Patienten die höchste Diabetesprävalenz innerhalb Europas. Allein 4,6 Millionen Menschen starben 2011 weltweit im Zuge dieser Krankheit. Die Prognosen sind erschreckend. Im Jahr 2030 soll sich die Anzahl der Menschen mit Diabetes auf 552 Millionen erhöhen. Insbesondere nimmt die Anzahl an Kindern (0-13 Jahre) bei denen Typ-1 Diabetes diagnostiziert wird zu.[3] Nicht nur auf medizinischer Ebene, sondern auch durch ihre Kostenintensität stellt diese Krankheit eine große Herausforderung dar. In Deutschland betragen die Kosten durch Diabetes oder durch Diabetes hervorgerufene Folgekrankheiten ungefähr 20% der Gesamtausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung [4].

Mit der Erkrankung des Glucosestoffwechsels kann es gerade bei Typ-1 Diabetikern zu besonders hohen (Hyperglykämie, Glucosekonzentration  $\geq 200\text{mg/dl}$ ), oder besonders niedrigen (Hypoglykämie, Glucosekonzentration  $\leq 60\text{mg/dl}$ ) Konzentrationen von Glucose im Blut kommen. In Folge dessen können Folgeerkrankungen des Herzkreislaufsystems, der Netzhaut (Diabetische Retinopathie), des Nervensystems (Neuropathie), sowie Niereninsuffizienz etc. entstehen. Darüber hinaus ist eine Diabeteserkrankung die häufigste Ursache für Amputationen [5]. Gleichzeitig kann die Hypoglykämie zu Bewusstlosigkeit,

Schäden des Gehirns und sogar zum Tod führen [6].

Die häufige Kontrolle und Anpassung des Blutzuckerspiegels hilft Hypo- und Hyperglykämie zu vermeiden und beugt Folgekrankheiten vor. Hierfür stehen in der Regel kleine Messgeräte mit Teststreifen zur Verfügung, bei denen die Glucosekonzentration eines kleinen Blutstropfens ( $\approx 1\mu\text{l}$ ) zu einer quantitativen Nachweisreaktion führt, aus der der Glucosewert ermittelt werden kann. Obgleich hier in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte in puncto Messgenauigkeit und Handhabung erzielt wurden, gibt es noch eine Reihe von wichtigen Verbesserungsoptionen. In der Schwere und Häufigkeit der Erkrankung wird deutlich, dass die Weiterentwicklung existierender Techniken und die Entwicklung von neuen Techniken zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels von essentieller Wichtigkeit sind.

Alle heutzutage erhältlichen Teststreifen zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels basieren auf einer enzymatischen Reaktion. Dabei katalysiert das Enzym die Oxidation von Glucose (Glu) zu Gluconolacton (GluLac). Die meisten dieser Systeme brauchen Mediatoren, welche die Elektronen der Glucoseoxidation akzeptieren, und dabei reduziert werden. Im Anschluss transferiert der reduzierte Mediator die Elektronen entweder auf eine Elektrode für eine elektrochemische Messung, oder auf einen Indikator (Farbstoff) für den photochemischen Ansatz [7].

Diese Reaktionskette kann stark vereinfacht werden, indem Glucose direkt über Dihydrornikotinamidadenindinukleotid (NADH) in Kombination mit dem Enzym Glucosedehydrogenase (GlucDH) detektiert wird [8].

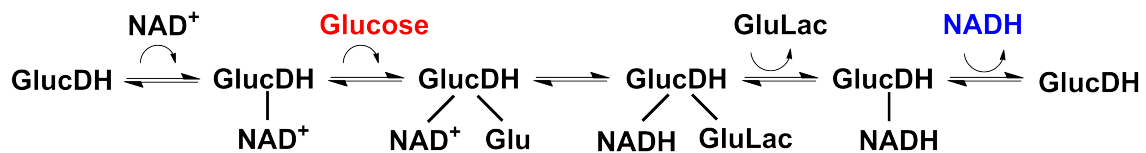


Abbildung 1.1: Skizze der Reaktionskette zur Detektion von Glucose mittels NADH

Abbildung 1.1 zeigt die derzeitige Vorstellung der Reaktionskette zur Detektion von Glucose mittels NADH/GlucDH. Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) bindet an das Enzym GlucDH. In Anwesenheit von Glucose katalysiert GlucDH die Oxidation von Glucose zu GluLac, während NAD zu NADH reduziert wird. Dies führt zur Ausbildung eines Ternärkomplexes NADH-GlucDH-GluLac. Im nächsten Schritt dissoziiert Gluconolacton (GluLac) vom Enzym, wodurch ein binärer Komplex GlucDH-NADH entsteht. Zum Schluss dissoziiert NADH und GlucDH ist wieder für einen neuen Reaktionszyklus bereit.

Das NAD/GlucDH System hat als Glucosesensor mehrere Vorteile im Vergleich zu konventionellen Systemen: Erstens braucht es keine Mediatoren, sondern bietet eine direkte Methode zur Messung des Blutzuckerspiegels. Zweitens kann NADH über drei verschiedene Wege direkt detektiert werden: über Absorptionsmessungen, Fluoreszenzintensitätsmessungen und Fluoreszenzlebensdauermessungen [9–12]. Selbst

eine Kombination dieser verschiedenen Ansätze ist möglich und kann zu einer weiteren Verbesserung der Genauigkeit des Systems führen.

NAD hat als Coenzym der Reaktion den Nachteil, dass es anfällig gegenüber hydrolytischer Spaltung ist [13]. Es hat sich allerdings gezeigt, dass ein NAD-Analog, carba-Nikotinamidadenindinukleotid (cNAD), stabiler ist und ebenfalls als Coenzym der enzymatischen Reaktion mit GlucDH funktioniert [14]. Die erhöhte Stabilität von cNAD sollte auch zu einer erhöhten Langzeitstabilität des Glucoseteststreifens führen.

Da die Bestimmung der Konzentration von Glucose im Blut über eine spektroskopische Detektion von NADH bzw. cNADH (im Folgenden als Synonym (c)NADH) erfolgt, ist eine genaue Kenntnis und das grundlegende Verständnis der spektroskopischen Eigenschaften von (c)NAD und (c)NADH von großer Wichtigkeit.

In der Literatur ist nur wenig über die spektroskopischen Eigenschaften von cNADH zu finden. Das Absorptionsmaximum soll laut Slama et al. bei  $\lambda=360\text{nm}$  liegen das Emissionsmaximum bei  $\lambda=456\text{nm}$  [15]. Ein Ziel dieser Arbeit soll es sein, die spektroskopischen Eigenschaften, d.h. Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von cNADH zu untersuchen und sie mit denen von NADH zu vergleichen. Die experimentelle spektroskopische Analyse wird dabei durch quantenchemische Rechnungen an NADH und cNADH vervollständigt.

Der besondere Fokus dieser Arbeit liegt allerdings auf der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie. In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben zur Fluoreszenzlebensdauer von NADH. Zur Diskussion steht, ob der Zerfall des angeregten Zustandes von NADH mono- oder biexponentiell ist. Die einzelnen Widersprüche gehen über die Werte der einzelnen Lebensdauern bis hin zu unterschiedlichen Begründung warum NADH zwei Fluoreszenzlebensdauern haben könnte [16–26]. Die Werte der Lebensdauer bzw. Lebensdauern von NADH sind in Abbildung 1.2 als Funktion ihres Publikationsdatums dargestellt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit betrifft die genaue Untersuchung des Zerfalls des angeregten Zustandes von NADH und cNADH und der Versuch ein geeignetes Modell zur Erklärung der zwei auftretenden Lebensdauern zu finden.

Im dritten Teil der Arbeit rücken die Anwendungsmöglichkeiten der Messung der Fluoreszenzlebensdauer in den Fokus. Es wird gezeigt, dass aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern von freiem und gebundenen (c)NADH die Möglichkeit besteht die Bindungskonstanten von (c)NADH an ein Enzym zu bestimmen. Diese neue Methode soll mit einer bereits bekannten Methode (Messung der Fluoreszenzintensität) [27–29] verglichen und verifiziert werden.

Als weiterer Punkt wird die Idee von Petrich et. al [30] zur Bestimmung der Konzentration von Glucose im Blut über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von NADH aufgegriffen. Anhand von Messungen in Lösung und an Teststreifen soll überprüft werden, ob dieses Konzept auch auf cNADH als Coenzym übertragbar ist.

Darüber hinaus soll überprüft werden, ob die zusätzliche Messung der Fluoreszenzlebensdauer bei einer Glucosemessung, die Abweichungen des Ergebnisses,

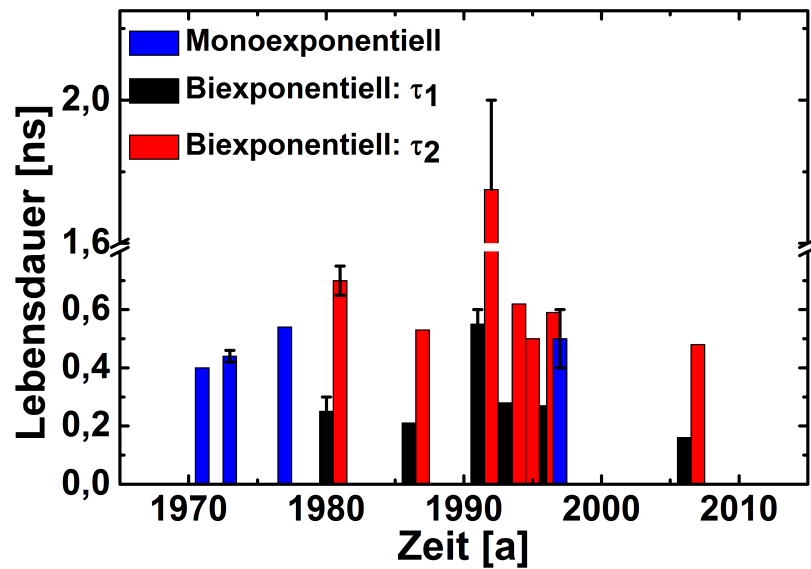


Abbildung 1.2: Zusammenfassung der publizierten Lebensdauer bzw. Lebensdauern von NADH von 1971 bis 2007 (Werte vgl. Ref. [16–26]).

welche durch lagerbedingte Aktivitätsverluste des Enzyms hervorgerufen werden, kompensieren kann. Dies böte die Möglichkeit durch die Kombination von zwei Messprozessen (Fluoreszenzlebensdauer und z.B. Absorption) zusätzlich eine Kontrollinstanz in den Messprozess einzuführen, um die Funktionalität des Teststreifens noch robuster und störungsunempfindlicher zu machen.

## 2 Grundlagen und Methoden

Im folgenden Kapitel sollen die Grundlagen, Materialien und Methoden erläutert werden, um zum Verständnis der durchgeführten Experimente und erzielten Ergebnisse beizutragen. Zu Beginn werden die chemischen Strukturen der untersuchten Moleküle vorgestellt. In Abschnitt 2.2 folgt eine Erläuterung der Grundlagen der Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie mit besonderem Augenmerk auf die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie. In den beiden darauf folgenden Abschnitten sollen Anwendungsmethoden der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie erläutert werden: Dies beinhaltet die Bestimmung von Bindungskonstanten von Enzymen an einen Fluorophor (Abschnitt 2.4). Ebenso soll im letzten Abschnitt 2.5 die Messung der Blutglucosekonzentration mittels Fluoreszenzlebensdauermessungen vorgestellt werden, sowie die Möglichkeit lagerbedingte Aktivitätsverluste bei den Ergebnissen einer Blutglucosemessung mittels zusätzlicher Fluoreszenzlebensdauermessung zu kompensieren.

### 2.1 Strukturen

Im Fokus dieser Arbeit steht der spektroskopische Vergleich und die Analyse von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) und von einem Analog carba-Nikotinamidadenindinukleotid (cNAD), sowie ihrer jeweils reduzierten Formen NADH und cNADH. Abbildung 2.1 vergleicht die chemischen Strukturen von NAD mit cNAD. Beide Moleküle bestehen aus einem Nikotinamid-Rest (rot) und einem Adenin-Rest (blau), die über zwei Zucker und eine Phosphatbrücke miteinander verbunden sind. Im Vergleich zu NAD wurde bei cNAD der  $\beta$ -D-ribonukleotid Ring durch einen 2,3-hydroxycyclopentan Ring ersetzt. Dies führt dazu, dass cNAD stabiler gegenüber hydrolytischer Spaltung ist als NAD und damit als Coenzym für einen Glucoseteststreifen von Vorteil ist[13, 14].

Wenn NAD bzw. cNAD (im Folgenden als Synonym: (c)NAD) zu NADH bzw. cNADH reduziert wird (z.B. durch gleichzeitige Oxidation von Glucose zu Gluconolacton, katalysiert durch das Enzym Glucosedehydrogenase (GlucDH)), wird das Nikotinamid zu einem Dihydrornikotinamid reduziert. Die Strukturen von NADH und cNADH sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

In der Literatur wird der Einfluss des Adeninrests auf die Fluoreszenz und die Fluoreszenzlebensdauer von NADH diskutiert. Um diesen Einfluss näher untersuchen zu können, wurden Dihydrornikotinamidmononukleotid (NMNH) und carba-Dihydrornikotinamidmononukleotid (cNMNH) untersucht. Vergleicht man Abbildung 2.2 mit Abbildung 2.1, so erkennt man, dass (c)NMNH im Vergleich zu (c)NADH kein Adenosinmonophosphat aufweist.

Für die quantenchemischen Rechnungen wurden die elektronischen Anregungen unter anderem anhand von Dihydrornikotinamidmononukleosid berechnet. Im Vergleich zu NMNH besitzt das Nukleosid keine Phosphatgruppe. In den quantenchemischen

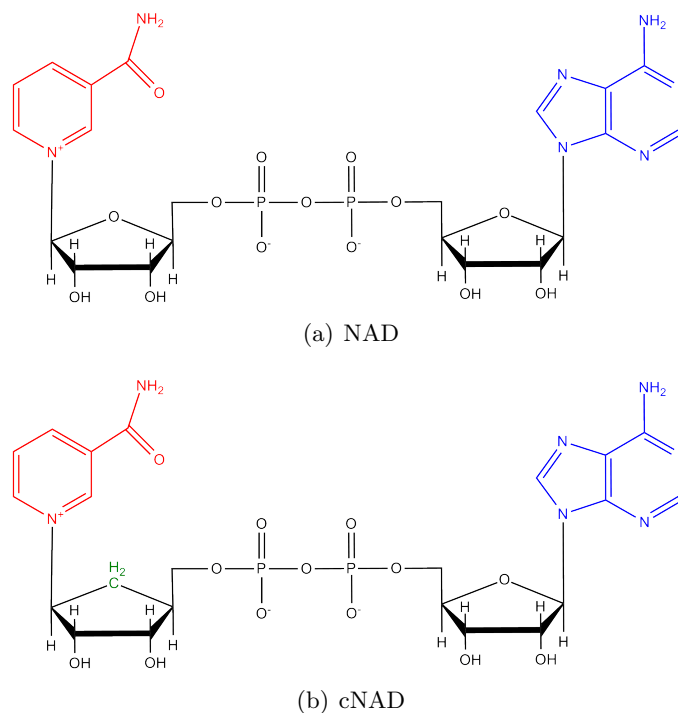
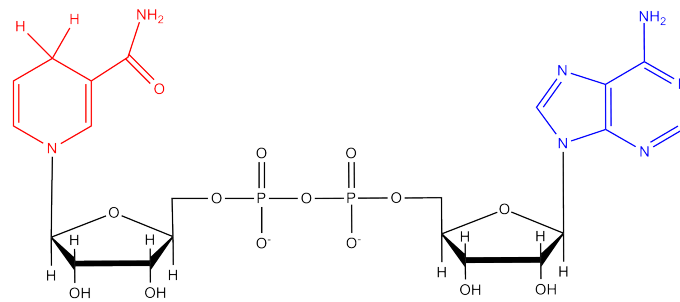


Abbildung 2.1: **Vergleich der chemischen Struktur von NAD und cNAD:** Bei cNAD wird im Vergleich zu NAD der Sauerstoff an der Ribose durch eine Methylengruppe ersetzt.

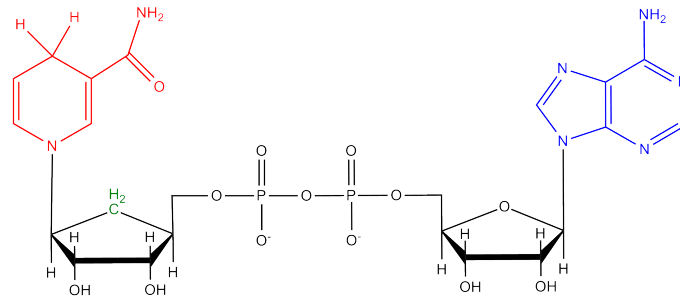
Rechnungen wird Dihydrornicotinamidmononucleosid mit NMNH' abgekürzt.

Für die Fluoreszenzeigenschaften des NADHs ist der Dihydrornicotinamid-Rest verantwortlich. Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors allein, d.h. des Dihydrornicotinamidrests, wurden zudem mit Hilfe von Dichlorbenzyl-dihydrornicotinamid untersucht. Die chemische Struktur ist in Abbildung 2.4 (a) dargestellt. Die Amidgruppe des Dihydrornicotinamids kann in zwei verschiedenen Isomeren vorliegen, transoid und cisoid. Bei der transoiden Isomerie zeigt der Sauerstoff der Amidgruppe zum Stickstoff (N1), während bei der cisoiden Isomerie die Aminogruppe (NH<sub>2</sub>) zum Stickstoff zeigt. P. Fischer et al. konnten mittels NMR nachweisen, dass Dichlorbenzyl-dihydrornicotinamid (Dihydro) im Grundzustand in Lösung nur in der transoiden Form vorkommt [31]. Um zusätzlich eventuelle Einflüsse der Isomerie auf die Absorption und Fluoreszenz untersuchen zu können, wurde eine cisoiden Modellverbindung des Dihydro, Dichlorbenzyltetrahydropyrrolopyridinon (MV) untersucht (vgl. Abb. 2.4(b)). Durch einen Ringschluss der Amidgruppe mit dem Dihydropyridin zeigt der Sauerstoff zwangsläufig vom Stickstoff (N1) weg. Die Amidgruppe steht damit cisoid.



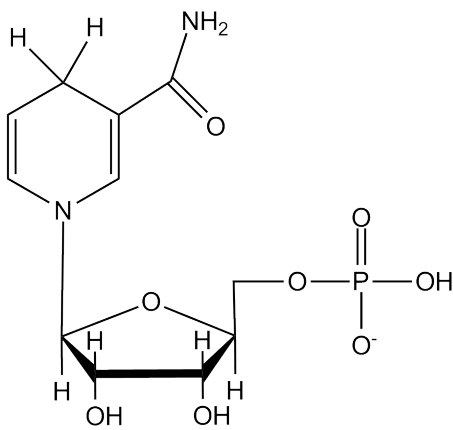


(a) NADH

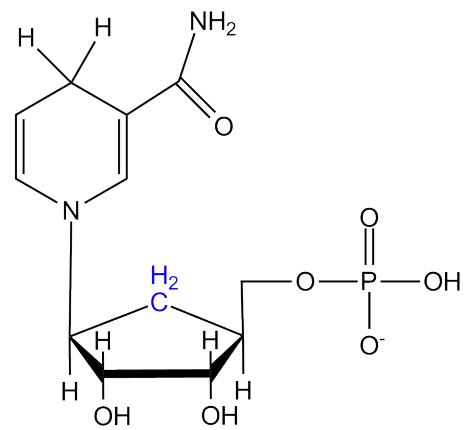


(b) cNADH

Abbildung 2.2: **Vergleich der chemischen Struktur von NADH und cNADH:** Wird (c)NAD zu (c)NADH reduziert, so wird das Nikotinamid zu einem Dihydrornikotinamid reduziert.



(a) NMNH



(b) cNMNH

Abbildung 2.3: **Vergleich der chemischen Struktur von NMNH und cNMNH:** Im Vergleich zu (c)NADH hat (c)NMNH keinen Adenosinmonophosphatrest.

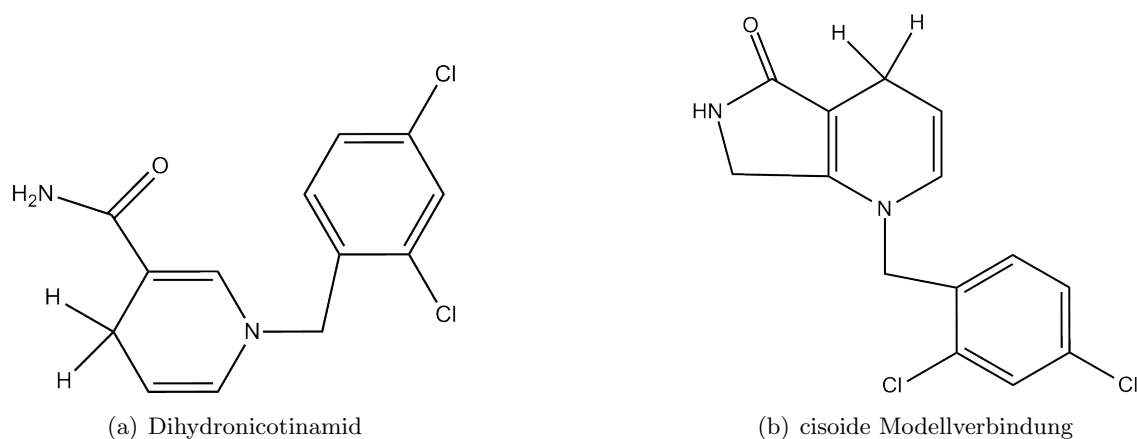


Abbildung 2.4: **Vergleich der chemischen Struktur von Dichlorbenzyl-dihydronicotinamid und der cisoiden Modellverbindung:** Bei Dichlorbenzyl-Dihydronicotinamid liegt die Amidgruppe in einer transoiden Stellung vor, während sie bei der Modellverbindung nur in einer cisoiden Stellung vorliegen kann.

## 2.2 Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie

NADH kann über 3 unterschiedliche Ansätze spektroskopisch detektiert werden, nämlich über die Absorption, Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer [32]. Im Folgenden Abschnitt sollen die Grundlagen und Begrifflichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie und naturgemäß auch der für die Fluoreszenzanregung relevanten Absorptionsspektroskopie kurz erläutert werden. Tiefergehende Abhandlungen finden sich beispielsweise in den Werken von J. Lakowicz [33] und B. Valeur [34].

Die Begriffe Absorption und Fluoreszenz, sowie die charakteristischen Zeiten der verschiedenen Übergänge sollen anhand des Jablonski Diagramms in Abbildung 2.5 erklärt werden: ein Molekül befindet sich im Singulettgrundzustand  $S_0$  und wird durch die Absorption eines Photons der Energie  $E=h\nu$  in ein höheres Vibrationsniveau der elektronisch angeregten Zustände ( $S_1, S_2, \dots$ ) angeregt.  $\nu$  bezeichnet hierbei die Frequenz und  $h$  ist das Plancksche Wirkungsquantum.

Nach Relaxation in das niedrigste Vibrationsniveau des angeregten Zustandes kann das elektronisch angeregte Molekül durch Emission eines Photons der Energie  $E=h\nu'$  in eines der Vibrationsniveaus des Singulettgrundzustandes übergehen. Der Übergang vom angeregten Singulettzustand in den Singulettgrundzustand unter Emission eines Photons nennt man Fluoreszenz. Alternativ kann das Molekül strahlungslos über innere Konversion (engl. internal conversion: IC) in einen Zustand derselben Multiplizität übergehen. Auf IC folgt üblicherweise ebenfalls eine anschließende Vibrationsrelaxation (grauer Pfeil). Eine weitere Möglichkeit stellt auch ein Übergang vom angeregten Singulettzustand in den Triplettzustand ( $T_1$ ) durch das sogenannte „intersystem crossing“ dar.

Unter der Lebensdauer versteht man die Zeit, die ein Molekül im Mittel im angeregten Zustand ist, bevor es in den Grundzustand zurückkehrt. Für Übergänge unter Aussendung eines Photons unterscheidet man zwischen der Lebensdauer der Fluoreszenz und der

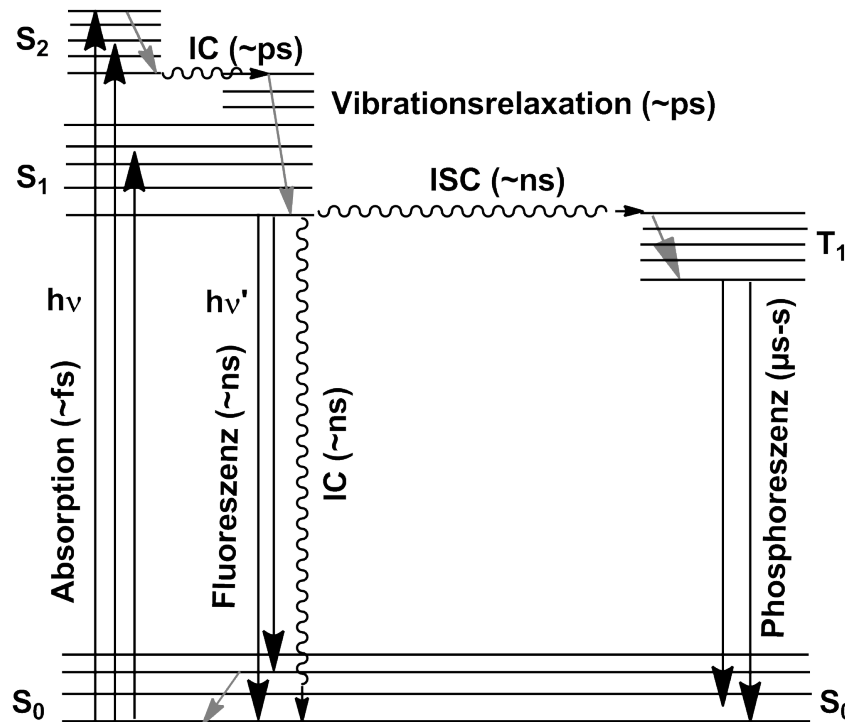


Abbildung 2.5: **Jablonski Diagramm** mit den charakteristischen Größenordnungen für die Zeiten der verschiedenen möglichen Übergänge

Phosphoreszenz. Den Übergang vom Triplett in den Singulettgrundzustand nennt man Phosphoreszenz. Da er aufgrund der Dipolwahlregeln verboten ist und der Übergang damit unwahrscheinlicher ist, sind die Lebensdauern der Phosphoreszenz im  $\mu\text{s}$  bis s-Bereich und damit sehr viel länger als die Lebensdauer der Fluoreszenz, welche typischerweise im ns-Bereich liegt.

Ein angeregter Zustand kann aber auch ohne Emission eines Photons - d.h. strahlungslos - in den Grundzustand übergehen. Die gemessene Fluoreszenzlebensdauer setzt sich aus der natürlichen Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_n = \frac{1}{\Gamma}$  und der inversen Rate der strahlungslosen Prozesse  $1/k_{nr}$  zusammen, wobei  $\Gamma$  für die Rate des Fluoreszenzprozesses steht:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.1)$$

Sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenzlebensdauer können durch viele verschiedene Prozesse verkleinert werden. Die Verringerung der Fluoreszenzintensität durch solche Prozesse nennt man Fluoreszenzlöschung.

Die wichtigsten Photoprozesse, die zu Fluoreszenzlöschung führen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst und sollen hier kurz dargestellt werden:

- Bei Fluoreszenzlöschung durch Stöße kehrt das angeregte Molekül  $M^*$  nach Stoß mit einem anderen Molekül Q (dem Löscher engl. Quencher) strahlungslos in den Grundzustand über, wobei die Energie in Form von Wärme abgegeben wird.
- Der resonante Energietransfer (RET) läuft über eine Dipol-Dipol Wechselwirkung,

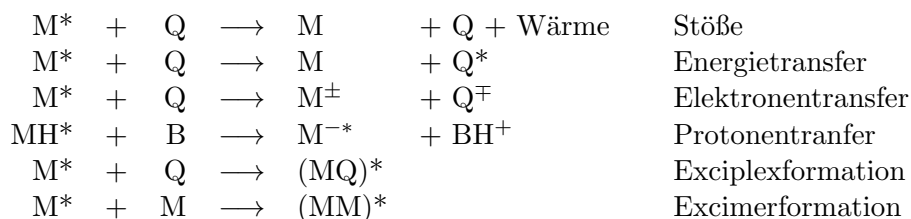


Tabelle 2.1: **Zusammenfassung der wichtigsten Fluoreszenzlöschprozesse:**  $M^*$  steht für das angeregte Molekül,  $Q$  für das für den Löschprozess verantwortliche Molekül (engl. Quencher) und  $H$  für ein Wasserstoffatom

bei der die Energie des angeregten Donors auf den Akzeptor übertragen wird, wodurch dieser angeregt wird. Die Effizienz dieses Energietransfers ist dabei vom Überlapp des Fluoreszenzspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, von ihrer Orientierung bzw. ihres Abstandes voneinander, sowie von der Quantenausbeute des Donors abhängig. Die Effizienz des Energietransfers zeigt dabei eine  $r^{-6}$  Abhängigkeit vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor.

- Der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) beruht auf einer Redoxreaktion im angeregten Zustand, welche auf einer Verstärkung der reduzierenden und oxidierenden Eigenschaften von Molekülen im angeregten Zustand zurückzuführen ist. Es kommt zur Bildung eines Ladungstransferkomplexes aus Donor und Akzeptor im angeregten Zustand, welcher sowohl strahlungslos, als auch durch Exciplexformation<sup>1</sup> in den Grundzustand zurückkehren kann. Wird der Akzeptor angeregt, so kann in das so entstandene Elektronenloch des HOMOs (highest occupied molecular orbital) ein Elektron des HOMOs des Donors übertragen werden. Der Fluorophor wird reduziert und der Quencher oxidiert. Ist der angeregte Fluorophor der Donor, so kann das Elektron aus dem LUMO des Donors auf das LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) des Akzeptors übertragen werden. Der Fluorophor wird oxidiert und der Quencher reduziert. Die Effizienz dieses Prozesses ist allein von den Redoxpotentialen zwischen Donor und Akzeptor, sowie der Lage und dem Abstand der Reaktanden zueinander abhängig.
- Wie auch bei PET liegt die Ursache des photoinduzierten Protonentransfers (PPT) in der Änderung der Elektronendichte und damit in der Änderung der säure- bzw. basischen Eigenschaften des Moleküls im angeregten Zustand gegenüber dem Grundzustand. Ein möglicher PPT ist schematisch in Abbildung 2.6 dargestellt. Die Säureeigenschaften der Säure  $AH$  sind im angeregten Zustand stärker als im Grundzustand ( $pK_S^* > pK_S$ ).  $\tau_r$  und  $\tau_0'$  stehen für die Lebensdauern der sauren ( $AH^*$ ) und basischen Form ( $A^{-*}$ ) und  $k_1$  und  $k_{-1}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der De- und Reprotonierung. Ist der pH-Wert größer als 2, so findet die Rückreaktion  $k_{-1}$  nicht innerhalb der Lebensdauer statt [34].
- Die Bildung eines Exciplex ist ein Spezialfall des Elektronentransfers. Im angeregten

<sup>1</sup> Angeregter Komplex, Kurzform von „excited complex“.

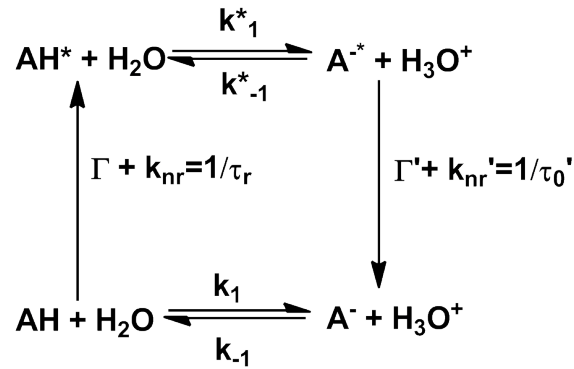


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des photoinduzierten Protonentransfers (PPT): AH: Säure, A<sup>-</sup>: Säureanion, Index \*: angeregtes Molekül.

Zustand wird unter Übertragung eines Elektrons zwischen Fluorophor und Quencher ein Komplex gebildet, welcher nur im elektronisch angeregten Zustand stabil ist.

- Die Bildung eines Excimers ist wiederum ein Spezialfall des Exciplex, wobei es zur Bildung eines Dimers<sup>2</sup> im angeregten Zustand kommt.

Generell wird zwischen dynamischen und statischen Fluoreszenzlöschprozessen unterschieden. Bei dynamischen Fluoreszenzlöschprozessen (Abb. 2.7 (b)) wird die Fluoreszenz über einen der oben genannten Prozesse gelöscht und das angeregte Molekül kehrt wieder in den Grundzustand über. Der Löschprozess hat dabei sowohl Einfluss auf die Fluoreszenzintensität als auch auf die Lebensdauer. Das Verhalten der Fluoreszenzintensität in Abwesenheit bzw. Anwesenheit eines Quenchers wird durch die Stern-Volmer Gleichung repräsentiert [33]:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2.2)$$

Dabei steht  $I_0$  bzw.  $I$  für die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des Quenchers und  $\tau_0$  bzw.  $\tau$  für die Lebensdauer des Moleküls in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des Quenchers.  $k_q$  steht für die Rate des Löschprozesses,  $[Q]$  für die Konzentration des Quenchers und  $K_{SV} = k_q\tau_0$  für die Stern-Volmer Konstante. Diese stellt ein direktes Maß für die Stärke der Fluoreszenzlöschprozesse dar. Im Gegensatz dazu stehen statische Fluoreszenzlöschprozesse (Abb. 2.7 (a)) Unter diese Prozesse fällt z.B. die Bildung eines nicht fluoreszierenden Komplexes im Grundzustand. Der Fluoreszenzlöschprozess führt zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität, nicht aber der Fluoreszenzlebensdauer. Die Stern-Volmer Gleichung ist linear von der Konzentration des Quenchers abhängig, wobei  $K_S$  für die Stabilitätskonstante des Grundzustandskomplexes steht:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S[Q] \quad (2.3)$$

<sup>2</sup> Dimer: Molekül bestehend aus zwei identischen Untereinheiten.

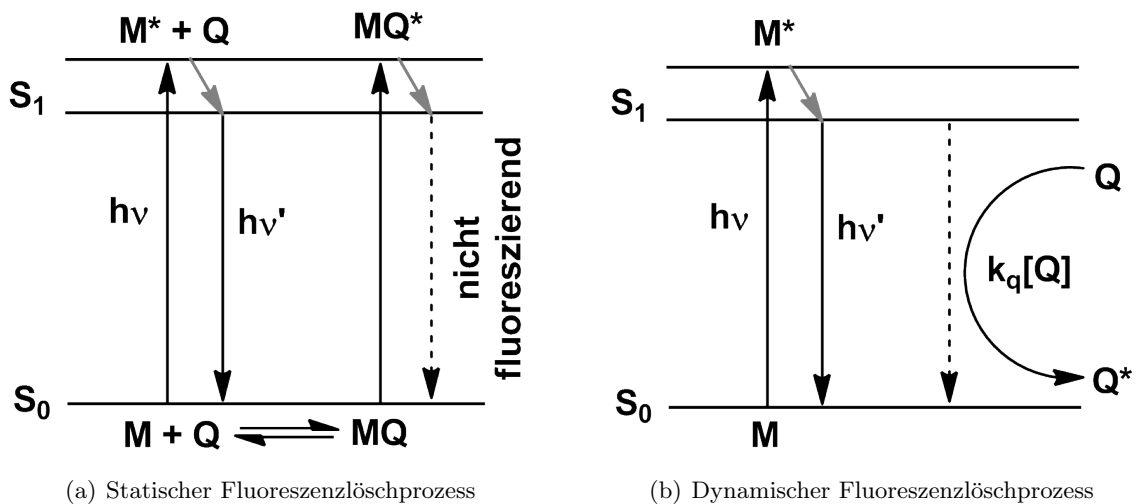


Abbildung 2.7: **Schematischer Vergleich dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschprozesse:** Ein dynamischer Fluoreszenzlöschprozess wirkt sich sowohl auf die Quantenausbeute als auch auf die Fluoreszenzlebensdauer aus, während sich ein statischer Fluoreszenzlöschprozess nur auf die Quantenausbeute auswirkt.

Dynamische Fluoreszenzlöschprozesse kann man von Statischen durch ihr unterschiedliches Temperaturverhalten unterscheiden (Abb. 2.8). Sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenzlebensdauer wird bei dynamischen Löschprozessen mit steigender Temperatur geringer. Die Moleküle besitzen bei höheren Temperaturen eine höhere Brownsche Molekularbewegung und damit nimmt die Anzahl der Zusammenstöße pro Zeiteinheit zwischen Quencher und angeregtem Molekül zu, wodurch die Löschrates erhöht wird.  $K_{SV}$  steigt bei höheren Temperaturen an. Im Gegensatz dazu nimmt die Fluoreszenzintensität bei einem statischen Fluoreszenzlöschprozess mit steigender Temperatur zu. Durch Erhöhung der Temperatur verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen dem nichtfluoreszierenden Komplex und den

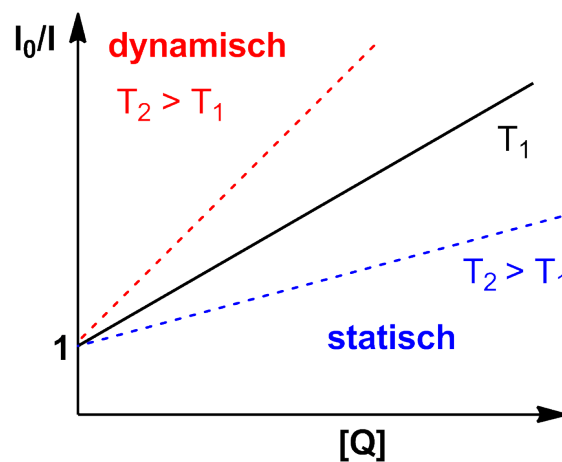


Abbildung 2.8: **Stern-Volmer Diagramm:** Statische und dynamische Löschprozesse lassen sich durch ihr unterschiedliches Temperaturverhalten voneinander unterscheiden.

Edukten, auf die Seite der Edukte und die Fluoreszenzintensität nimmt zu.

In der Praxis finden statische und dynamische Fluoreszenzlöschprozesse auch häufig gleichzeitig statt. Die Stern-Vollmer Gleichung weicht dann von der linearen Abhängigkeit der Quencherkonzentration ab und nimmt folgende Form an:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_S[Q]) \quad (2.4)$$

## 2.3 Messmethoden

### 2.3.1 UV/Vis Spektroskopie

Die Absorptionsspektren wurde mit einem UV/VIS Gitterspektrometer Cary 500 (Varian, Deutschland) gemessen. Das Cary 500 ist für Messungen im UV-Bereich mit einer Deuterium-Lampe (D<sub>2</sub>) und für Messungen im sichtbaren Wellenlängenbereich mit einer Halogen Lampe (QH) ausgestattet. Zur Detektion im UV/Vis-Bereich wird beim Cary 500 ein R928 Photomultiplier verwendet. Der Küvettenhalter des Cary 500 wurde durch ein externes Kühlthermostat (Circulator Cooling 1197, VWR, Deutschland) temperiert. Der Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe des Lambert-Beer Gesetzes bestimmt.

$$I = I_0 10^{-\epsilon cd} \quad (2.5)$$

$\epsilon$  ist der dekadische Extinktionskoeffizient,  $I$  die Intensität,  $c$  steht für die Konzentration des Absorbers und  $d$  für die Schichtdicke der Küvette.

Die Absorbanz (Abs) - auch die Extinktion genannt - ist in Anwesenheit von Streuung und Reflexion definiert als der negative dekadische Logarithmus der Transmission. Das Lambert-Beer Gesetz (vgl. 2.5) nimmt somit folgende Form an:

$$Abs = \epsilon cd \quad (2.6)$$

Die Absorbanzspektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 210nm bis 600nm mit einer Durchstimmgeschwindigkeit von 980nm/min aufgenommen. Um den Einfluss der verwendeten Küvette sowie des darin enthaltenen Puffers vom Absorbanzspektrum zu reduzieren, wurde das Absorbanzspektrum der Küvette, welche nur den Puffer enthielt, aufgenommen. Diese Basislinie wurde dann von den Absorbanzspektren jeder Probe abgezogen.

Für die Messungen wurden Quarzglasküvetten (Hellma, Deutschland) mit einer Schichtdicke von  $d = 1\text{cm}$  verwendet.

### 2.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe des Cary Eclipse (Varian, Deutschland) aufgenommen. Dieses verwendet eine Xenon Blitzlampe als Lichtquelle und ein R928 Photomultiplier als Detektor. Zusätzlich bietet das Gerät die Möglichkeit der

Temperierung der Probe mittels eines Peltierelements (Varian, Germany).

NADH wurde bei 340nm angeregt und cNADH bei 360nm. Anregungs- und Emissionsspalt wurden auf 5nm spektrale Bandbreite eingestellt. Die Spannung an den Photomultipliern betrug 600V. Das Verhältnis der von einem Molekül emittierten Photonen im Vergleich zu den absorbierten Photonen wird als Quantenausbeute  $Q$  bezeichnet und durch folgende Gleichung berechnet:

$$Q = Q_R \frac{I \cdot OD_R \cdot n^2}{I_R \cdot OD \cdot n_R^2} \quad (2.7)$$

$I$  ist die über das Emissionsspektrum integrierte Intensität.  $OD$  steht für die optische Dichte bei Anregungswellenlänge und  $n$  für den Brechungsindex. Der Index  $R$  weist auf den Referenzfluorophor mit bekannter Quantenausbeute hin. Als Referenzfluorophor wurde Quinin Hemisulfat (22640, Sigma Aldrich, USA) mit  $Q=0.577$  bei  $T=22^\circ\text{C}$  verwandt [33, 35]. Da sich herausgestellt hat, dass die Quantenausbeute von Quinin Hemisulfat unabhängig von der Anregungswellenlänge ist, [36, 37] konnte es auch als Referenz für die Messungen bei 260nm Anregung benutzt werden. Die Brechungsindizes von Trispuffer, 0,1M Schwefelsäure, Methanol und DMSO wurden mit einem Refraktometer (Reichert, Deutschland) bei 589nm gemessen. Der Brechungsindex für 0,1M Schwefelsäure betrug  $n_R=1,352$ , für Trispuffer  $n=1,327$ , für  $\text{D}_2\text{O}$   $n=1,332$ , für Methanol  $n=1,329$  und für DMSO  $n=1,479$ . Laut Literaturangaben ändern sich die Brechungsindizes der verwendeten Lösungsmittel im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 600nm um ca. 1% [38–41]. Da die Fehler bei der Bestimmung der Quantenausbeute bei mindestens 10% lag, konnten Dispersionseffekte bei der Berechnung der Quantenausbeute vernachlässigt werden.

Die Effizienz des Energietransfers zwischen dem Adenin-Rest und dem Dihydranonikotinamid-Rest kann bestimmt werden, indem das Verhältnis zwischen der Quantenausbeute bei Anregung mit 260nm und der Quantenausbeute bei 370nm Anregung gebildet wird. Die Quantenausbeute bei 260nm Anregung wird zusätzlich um den Einfluss des Dihydranonikotinamids korrigiert, indem die Quantenausbeute von (c)NMNH bei 260nm Anregung subtrahiert wird [42].

### 2.3.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzlebensdauer eines Moleküls  $M$  kann man über den Abfall der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit bestimmen. Betrachtet man im Folgenden die zeitliche Entwicklung der Konzentration der elektronisch angeregten Moleküle  $[M^*]$  mit  $\Gamma$  und  $k_{nr}$  gemäß Gleichung 2.1

$$\frac{d[M(t)^*]}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})[M(t)] = -(\Gamma + k_{ISC} + k_{IC})[M(t)] \quad (2.8)$$

Diese lineare Differentialgleichung wird durch folgende Gleichung gelöst:

$$[M^*(t)] = M_0 \exp(-t/(\Gamma + k_{nr})) = M_0 e^{(-t/\tau)} \quad (2.9)$$



In verdünnten Lösungen  $OD \ll 1$  ist die Konzentration des Fluorophors proportional zur Intensität und damit gilt:

$$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)} \quad (2.10)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer ist folglich die Zeit, bei der die Fluoreszenzintensität auf  $1/e$  ihres Ausgangswertes abgefallen ist.

Die Fluoreszenzlebensdauer wurde in dieser Arbeit über das Prinzip TCSPC (time correlated single photon counting) bestimmt. Bei dieser Methode wird die Zeit zwischen dem Anregungspuls und dem ersten detektierten Fluoreszenzphoton gemessen und diese Zeitinformation für  $\geq 10^6$  Pulse in ein Histogramm gespeichert. Ist die zur Anregung eingestrahlte Energie zu hoch, treffen mehr als ein Photon auf den Detektor. Da der Detektor nur die Ankunftszeit des ersten Photons registriert, kommt es zu einer systematisch zu kürzeren Zeiten verschobenen Lebensdauer (pile-up effect) [43]. Ist die Konzentration des Farbstoffes zu hoch, so wird die gemessene Fluoreszenzlebensdauer durch Reabsorption und Reemission verlängert, weswegen verdünnte Lösungen ( $\mu\text{M}$ ) empfehlenswert sind [44, 45]. Erfahrungsgemäß sollten die Konditionen bei der Messung so eingestellt werden, dass nur bei jedem zwanzigsten Puls ein Fluoreszenzphoton gemessen wird [46].

Zur Anregung werden typischerweise gepulste Laserdioden (LD) oder Leuchtdioden (LED) verwendet. Der Anregungspuls hat eine Pulsbreite von ca. 200-500ps. Dies führt dazu, dass die Moleküle in der Probe nicht zum selben Zeitpunkt angeregt werden. Das heißt die gemessene Fluoreszenzabklingkurve entspricht nicht der Fluoreszenzabklingkurve bei hypothetischer Anregung mit einem  $\delta$  Puls, sondern enthält noch als zusätzliche Information das Anregungsprofil der verwendeten Lichtquelle, sowie charakteristische Eigenschaften der Elektronik und des verwendeten Detektors. Folglich muss die gemessene Fluoreszenzabklingkurve  $F_{exp}$  mit der sogenannten Instrumentenantwort (IRF) entfaltet werden, um die tatsächliche Fluoreszenzantwort  $F(t)$  zu erhalten. Die IRF begrenzt die Zeitauflösung des Systems [47]. Eine Daumenregel besagt, dass Lebensdauern mit bis zu  $1/5$  der Breite der IRF aufgelöst werden können [48].

$$F_{exp} = \int_{-\infty}^t IRF(t') F(t - t') dt' \quad (2.11)$$

Die Fluoreszenzlebensdauern wurden mit dem Fluoreszenzlebensdauerspektrometer FluoTime 100 (PicoQuant, Deutschland) bestimmt. Die Proben wurden bei 370nm mit einer durch den Pulstreiber (PDL 800B, PicoQuant, Deutschland) gepulsten LED (PLS 370, PicoQuant, Deutschland) mit einer Wiederholungsrate von 20MHz angeregt. Die Ausgangsleistung betrug  $4,0(2)\mu\text{W}$ . Darüber hinaus wurden einige Proben auch bei 265nm mit einer gepulsten LED (PLS 265, PicoQuant, Deutschland) mit einer Wiederholungsrate von 10MHz und einer Ausgangsleistung von  $2\mu\text{W}$  angeregt. Das System ist zur Detektion mit einem Einzelphotonendetektor PMA 182P (Hamamatsu, Japan) ausgestattet. Die Daten werden durch das PicoHarp 200 TCSPC Modul

(PicoQuant, Deutschland) aufgenommen. Um den Einfluss des gestreuten Anregungslichts zu minimieren, wurde im Detektionsstrahlengang ein vorinstallierter UVB-375nm Hochpass Filter gewählt. Damit nur bei maximal jedem zwanzigsten Anregungspuls ein Fluoreszenzphoton emittiert wird, wurde die Anregungsleistung durch einen Graufilter auf 10% des Maximalwertes reduziert. Die Instrumentenantwort (IRF) des Systems wurde durch das Streulicht einer nicht fluoreszierenden, verdünnten kolloidalen Silizium Suspension (Ludox, 420816, Sigma Aldrich, USA) aufgenommen. Bei der Aufnahme der IRF wurden in diesem Fall keine Filter im Detektionskanal benutzt. Die Halbwertsbreite (FWHM) der IRF bei 370nm Anregung betrug ungefähr 0,42ns und bei 265nm FWHM=0,35ns. Um die Messungen unter „magic angle“ Konditionen<sup>3</sup> durchzuführen, wurden zwei UV-Polarisationsfilter (Typ UV 2, Linos, Deutschland) verwendet. Das durch den ersten Filter vertikal polarisierte Anregungslicht wurde unter dem magic angle (54,7°) detektiert, wodurch sichergestellt wurde, dass das Signal proportional zur Gesamtfluoreszenzintensität ist. Neben dem UVB-375nm Hochpassfilter konnten für die Messungen der spektralen Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer noch zwei weitere Filter im Detektionsstrahlengang gewählt werden: ein 427/10 Bandpassfilter (FF01-427/10-25, Semrock, NY, USA) und ein 513/17 Bandpassfilter (FF01-513/17-25, Semrock, NY, USA).

Das FluoTime100 wurde durch ein externes Kältebad (Minichiller, Huber, Deutschland) temperiert. In dem Kältebad befand sich ein Tauchsieder (Sicherheitstauchsieder TS 1001 Firma: Rommelsbacher). Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Thermostats (Universal Thermostat UT 200, Firma: Conrad Electronics) geregelt.

Die Messungen wurden mit dem FluoFit Software Paket (PicoQuant, Deutschland) analysiert. Die Fluoreszenzabklingkurven wurden mit Hilfe eines Nonlinear Least Square Fits mit einem exponentiellen Model angepasst:

$$F_{fit} = \int_{-\infty}^t IRF(t') \left[ \sum_{i=1}^n a_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} \right] dt' \quad (2.12)$$

$a_i$  steht für die Amplitude und  $\tau_i$  für die Fluoreszenzlebensdauer der i-ten Zerfallskomponente.

Die Qualität des Fits wurde über verschiedene Verfahren überprüft: über das reduzierte  $\chi_r^2$ , die gewichteten Residuen, sowie die Autokorrelation der Residuen.

- Die  $\chi_r^2$  Methode beruht auf der kleinsten quadratischen Abweichung zwischen gemessenen Daten  $F_{exp}$  und angepassten Daten  $F_{fit}$ , normiert durch den statistischen

---

<sup>3</sup> Der Zweck der „magic angle“ Konditionen ist, die Fluoreszenzlebensdauer unabhängig von der Rotation des Moleküls im angeregten Zustand zu messen, die zu einer Änderung der Orientierung des Dipolmomentes im angeregten Zustand führt. Hierzu wird vertikal polarisiert angeregt und im Vergleich zum Anregungspolarisator unter 54,7° detektiert. Ohne Polarisationsfilter entspricht die detektierte Intensität  $I = I_{parallel} + I_{senkrecht}$  nicht der Gesamtintensität  $I = I_{parallel} + 2I_{senkrecht}$ . Dies wird nur unter oben genannten Bedingungen erreicht [33].

Gewichtungsfaktor jedes Datenpunktes (Rauschen):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{F_{fit}(t_i) - F_{exp}(t_i)}{\sigma} \right]^2 \quad (2.13)$$

Das Rauschen folgt bei TCSPC einer Poisson Statistik. Wenn die Anzahl der Ereignisse in einem TCSPC Kanal hoch genug ist (größer als 10 Ereignisse), dann kann das Poissonrauschen durch eine Gaussverteilung approximiert werden [43]. Die Normierung skaliert mit der Wurzel der Datenpunkte (detektierten Photonen pro Kanal)  $\sigma = \sqrt{F_{exp}(t_i)}$ . Das  $\chi^2$  hängt von der Anzahl der Datenpunkte ab, weswegen das reduzierte  $\chi_r^2$  zur Untersuchung des Fits herangezogen wird. Dieses berücksichtigt zusätzlich die Anzahl der Freiheitsgrade, welche sich aus der Subtraktion der Anzahl der freien Parameter  $p$  von der Anzahl der Datenpunkte  $N$  ergibt.

$$\chi_r^2 = \frac{1}{N - p} \sum_{i=1}^N \left[ \frac{F_{fit}(t_i) - F_{exp}(t_i)}{\sigma} \right]^2 \quad (2.14)$$

Für einen guten Fit, sollte das  $\chi_r^2$  im Bereich von  $\chi_r^2 \approx 1,0$  liegen.

- Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung ob das benutzte Modell die experimentellen Daten adequat beschreibt sind die gewichteten Residuen:

$$R(t_i) = \frac{F_{fit}(t_i) - F_{exp}(t_i)}{\sqrt{F_{exp}(t_i)}} \quad (2.15)$$

Für einen gute Fit sollten die Residuen stochastisch um Null verteilt sein. Es sollten weder Tendenzen noch Merkmale wie Oszillationen erkennbar sein.

- Kleine Tendenzen in der Verteilung der Residuen können besser durch die Autokorrelation der Residuen untersucht werden:

$$A(t) = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} R(\tau + t)R(\tau)d\tau}{\int_{-\infty}^{+\infty} R(\tau)^2d\tau} \quad (2.16)$$

Die Autokorrelation ist ein Maß dafür, inwieweit ein Ereignis mit einem anderen Ereignis innerhalb einer Messreihe korreliert. Die Autokorrelation der Residuen sollte deswegen ebenfalls statistisch um Null verteilt sein.

- Ein weiterer Schritt zur Verifizierung des verwendeten Modells/Fits ist eine Fehlerabschätzung (Abschätzung der Konfidenzintervalle). Der Fitalgorithmus berechnet den sogenannten asymptotischen Standardfehler [49]. Dieser berechnet sich wie folgt: Bei einem Satz von bereits optimierten Parametern verändert man einen Parameter leicht von seinem optimierten Wert. Der Algorithmus überprüft dann, wie stark er diesen Parameter ändern kann, ohne dass das  $\chi_r^2$  ein gewisses Toleranzlevel überschreitet. Diese Fehlerabschätzung ist nur dann richtig, wenn die verschiedenen Parameter unkorreliert sind. Dies ist jedoch für zeitaufgelöste

Messungen fast nie der Fall: Ändert man bei einem monoexponentiellen Fit z.B. den Parameter für die Amplitude, so wird der Parameter der Lebensdauer versuchen dies zu kompensieren [33, 43].

- Alternativ kann man den Fehler durch die „support plane analysis“ (SPA) abschätzen. Prinzipiell funktioniert die SPA wie die Bestimmung des asymptotischen Standardfehlers: Man nimmt einen Parameter aus dem Set von optimierten Parametern und ändert seinen Wert leicht von seinem optimalen Wert. Im Gegensatz zum Standardfehler fixiert man diesen Parameter und fittet alle anderen Parameter des Sets. Das sich aus diesem neuen Fit errechnete  $\chi_r^2$  dient dann als Definition für das Konfidenzintervall. Prinzipiell sucht die SPA nach einem neuen Satz von Parametern mit einem geringeren  $\chi_r^2$ , so dass der zu untersuchende Parameter noch weiter von seinem optimierten Wert abweichen darf.

Anhand von Abbildung 2.9 soll der Prozess der Verifizierung des Fitmodells kurz erläutert werden. Abgebildet ist eine aufgenommene Fluoreszenzabklingkurve und die Instrumentenantwort des Systems. Diese Fluoreszenzabklingkurve wurde mit einem monoexponentiellen (links) und einem biexponentiellen Modell gefittet. Darüber hinaus werden die zum Fitmodell gehörenden gewichteten Residuen (Res) und die Autokorrelation der Residuen (Autokorr.) gezeigt. Beim monoexponentiellen Modell ist der Wert des  $\chi_r^2 = 1,914$ , d.h. größer 1. Darüber hinaus zeigen sowohl die Residuen als auch die Autokorrelation Muster bzw. Tendenzen. Im Gegensatz dazu wird bei einem biexponentiellen Modell das  $\chi_r^2$  deutlich reduziert auf  $\chi_r^2 = 1,063$  und weder die Residuen noch die Autokorrelation zeigen Muster oder Tendenzen. Folglich sollte das biexponentielle Modell gewählt werden, da es die experimentellen Daten besser beschreibt als das monoexponentielle Modell.

Trotz der Überprüfung durch  $\chi_r^2$ , Residuen, Autokorrelation und SPA kann es unter Umständen schwierig sein sich für ein Fitmodell (z.B. monoexponentiell oder biexponentiell) zu entscheiden. Durch den oben beschriebenen Fitalgorithmus wird schon vor dem Fit das Modell (monoexponentiell oder biexponentiell) vorgegeben. Ein alternativer Ansatz beruht darauf, dem Fit kein explizites Modell vorzugeben, sondern von bis zu 100 verschiedenen Lebensdauern, die zu Beginn des Fits alle gleich wahrscheinlich sind, auszugehen. Diesen Ansatz nennt man die Maximum Entropie Methode (MEM). Sie beruht auf der Shannon Informationsentropie  $S$ , welche ein Maß für den Informationsgehalt einer Nachricht darstellt. Sie besagt, „ist auf der Grundlage unzureichender Information aus einer Vielzahl von Wahrscheinlichkeitsverteilungen eine Verteilung auszuwählen, dann ist genau diejenige zu nehmen, welche die größte Entropie besitzt und mit der gesamten verfügbaren Information übereinstimmt.“ [50] Würde man eine Verteilung mit niedrigerer Entropie wählen, so würde man Information voraussetzen, die man nicht besitzt. Würde man eine Verteilung mit höherer Entropie auswählen, so würde man einen Teil der Information nicht benutzen. Die Methode findet Anwendung bei der optimalen Extraktion von Information aus verrauschten Signalen.

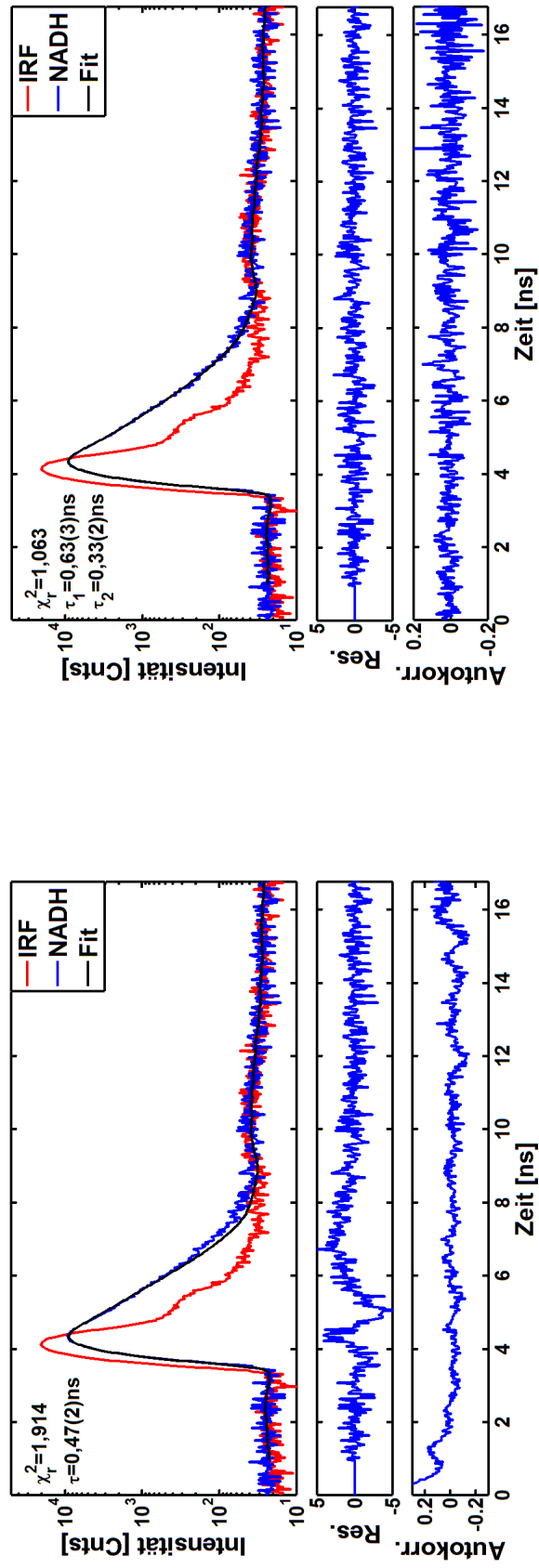


Abbildung 2.9: **Beispiel für die Verifizierung des verwendeten Fitmodells:** Überprüfung des  $\chi_r^2$ , der Residuen und der Autokorrelation der Residuen zeigen, dass die Fluoreszenzabklingkurve besser durch einen biexponentiellen Fit als durch einen monoexponentiellen Fit beschrieben werden kann.

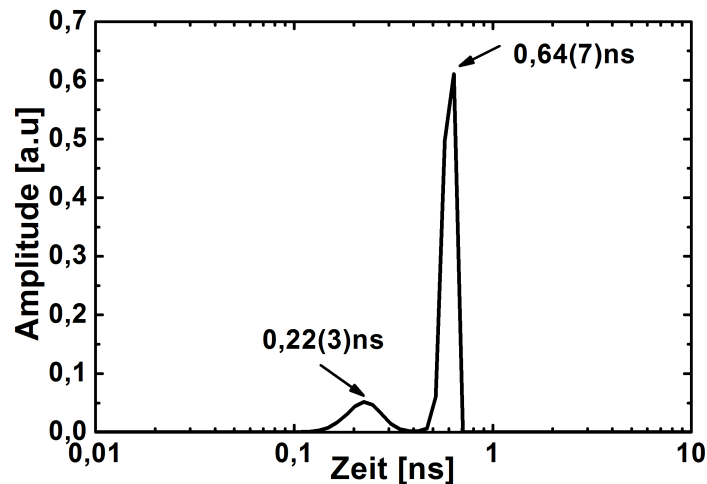


Abbildung 2.10: **Beispiel einer Analyse der Lebensdauerverteilung mittels MEM:** Die MEM Analyse ergibt in Übereinstimmung mit der Fitanalyse zwei Lebensdauern (vgl. Abb. 2.9)

Angewandt auf die Fluoreszenzlebensdauer bedeutet die MEM, dass zu Beginn davon ausgegangen wird, dass alle möglichen Lebensdauern in einem gegebenen Zeitintervall die gleiche Wahrscheinlichkeit haben. Die Verteilung ist folglich zu Beginn des Algorithmus flach. Die Daten werden nun mit bis zu 100 Lebensdauern (100-exponentiell) gefittet und anhand des  $\chi_r^2$  entschieden, welche Modelle die Daten adäquat beschreiben. Gibt es nun mehrere Modelle (z.B. mono-, bi- und triexponentiell), die der  $\chi_r^2$  Anforderungen genügen ( $\chi_r^2 \approx 1$ ), so wird die Verteilung bzw. das Modell ausgewählt dessen Entropie maximal ist, d.h. den gesamt zur Verfügung stehenden Informationsgehalt der Daten ausnutzt.[51–53]

Zur Illustration wurde der Datensatz von Abbildung 2.9 zusätzlich mittels MEM analysiert. Die verwendete MEM Software stammt von Swaminathan et al. [51]. Abbildung 2.10 kann man entnehmen, dass die Fluoreszenzabklingkurve durch zwei Lebensdauern beschrieben werden muss. Die MEM Analyse bestätigt somit in Übereinstimmung mit der Auswertung von Abbildung 2.9 das biexponentielle Modell für den Fit der Daten.

## 2.4 Bestimmung der Bindungskonstante mittels NADH

Die Bindungskonstante  $K_B$ , auch Assoziationskonstante genannt, ist ein Maß dafür auf welcher Seite bei einer Dissoziationsreaktion das Gleichgewicht liegt. Sie ist definiert als[54]:



$$K_B = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (2.18)$$

[A] und [B], sowie [AB] stehen für die Konzentration der Einzelsubstanzen A und B, sowie für die Konzentration des Komplexes. Die Bindungskonstante ist das inverse der Dissoziationskonstante.

Handelt es sich bei mindestens einem der beiden Moleküle um einen Fluorophor und ändert der Fluorophor seine Fluoreszenzeigenschaften, wenn er an ein anderes Molekül bindet, so kann die Bindungskonstante über die sich ändernde Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die Messung der Fluoreszenz ist eine besonders sensitive Technik, die in der Lage ist selbst einzelne Moleküle zu detektieren [33].

Während der Ansatz, die Bindungskonstante über die Fluoreszenzintensität zu messen, bereits bekannt ist,[27–29] soll in dieser Arbeit unter anderem ein neuer, sensitiverer Ansatz zur Bestimmung der Bindungskonstante bzw. Dissoziationskonstante vorgestellt werden und mit der intensitätsbasierten Methode verglichen werden. Die Methode soll anhand der fluoreszierenden Coenzyme (c)NADH und dem Enzym Glucosedehydrogenase (GlucDH) erläutert werden. Die Messungen der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzlebensdauer wurden jeweils parallel an zwei Aliquots derselben Stammlösung durchgeführt: Um verschiedene Konzentrationen an freiem und gebundenem (c)NADH zu generieren wurde die Konzentration an GlucDH im Bereich zwischen  $0,23\mu\text{M}$  und  $2,3\text{mM}$  variiert, während die Konzentration an (c)NADH konstant bei  $23\mu\text{M}$  belassen wurde. Die Variation der Enzymkonzentration statt der Variation des Fluorophors hat den Vorteil, dass die optische Dichte bei der Anregungswellenlänge ( $370\text{nm}$ ) unter einem Wert von  $0,2$  bleibt, d.h. Effekte der optischen Dichte vernachlässigt werden können. Die Messungen wurden einmal in Kaliumphosphatpuffer ( $0,1\text{M}$  pH7) und in Trispuffer ( $0,1\text{M}$ , pH8,5 versetzt mit  $0,2\text{M}$  NaCl) durchgeführt. Die Daten wurden über drei verschiedene Messungen gemittelt, welche bei verschiedenen Temperaturen im Bereich zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $40^\circ\text{C}$  durchgeführt worden sind.

Abhängig von der GlucDH-Konzentration wurden unterschiedliche Methoden zum Anpassen der Fluoreszenzabklingkurven angewandt. Bei sehr hohen Enzymkonzentrationen wurde die Fluoreszenzabklingkurve mit einer biexponentiellen Funktion gefittet, wobei die Fluoreszenzlebensdauer von gebundenem NADH  $\tau_{geb} = 2,9\text{ns}$  und die mittlere Lebensdauer von freiem NADH  $\tau_{free} = 0,46\text{ns}$  festgehalten wurden. Bei sehr niedrigen GlucDH Konzentrationen wurde die Fluoreszenzabklingkurve ebenfalls biexponentiell gefittet, wobei die beiden Lebensdauern des freien NADHs  $\tau_1 = 0,33\text{ns}$  und  $\tau_2 = 0,69\text{ns}$  konstant gehalten wurden. In dem dazwischenliegenden Konzentrationsbereich wurden die Kurven mit einem triexponentiellen Modell gefittet, wobei  $\tau_1, \tau_2$  und  $\tau_{geb}$  konstante Parameter waren.

Die mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer

$$\tau_{av} = \sum_{i=1}^N \frac{a_i \tau_i^2}{a_i \tau_i} \quad (2.19)$$

sowie die Fluoreszenzintensität wurden in Abhängigkeit von der GlucDH Konzentration bestimmt. Die Bindungskonstante konnte aus der Kurve analog zur in der Literatur bereits beschriebenen Methodik durch den Fit mit der folgenden Funktion ermittelt werden [29]:

$$I = \frac{I_{min} + I_{max}K_B[GlucDH]}{1 + K_B[GlucDH]} \quad (2.20)$$

$I_{min}$  steht für die Intensität des freien und  $I_{max}$  für die Intensität des gebundenen NADHs.  $K_B$  steht für die Bindungskonstante und  $[GlucDH]$  für die Konzentration an Glucosedehydrogenase.

Analog zu Gleichung 2.20 wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Funktion zur Bestimmung der Bindungskonstante mittels Fluoreszenzlebensdauermessungen entwickelt (Herleitung siehe Anhang):

$$\tau_{av} = \frac{\tau_{min} + q\tau_{max}K_B[GlucDH]}{1 + qK_B[GlucDH]} \quad (2.21)$$

$\tau_{min}$  entspricht in diesem Fall der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von freiem NADH und  $\tau_{max}$  der Lebensdauer von gebundenem NADH.  $q$  ist ein zusätzlicher Faktor, der den Unterschied der Quantenausbeute zwischen gebundenem und freiem NADH mit berücksichtigt. Er berechnet sich aus dem Quotienten der Quantenausbeute von gebundenem zu freiem NADH und beträgt  $q = 7,25$ .  $K_B$  steht wieder für die Bindungskonstante und  $[GlucDH]$  für die Konzentration an GlucDH.

## 2.5 Glucosebestimmung mittels NADH

Ein herausragender Vorteil von NADH als potentieller Glucosesensor besteht darin, dass NADH über drei verschiedene Methoden spektroskopisch detektiert werden kann: über Absorptionsspektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie und über zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie [8].

Bei der Detektion mittels Absorptionsspektroskopie nutzt man die Tatsache aus, dass sich die Absorptionseigenschaften von NAD im Vergleich zu NADH unterscheiden. Das Absorptionsmaximum von NAD liegt bei 260nm, während die reduzierte Form von NAD, NADH, noch ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340nm aufweist (vgl. Abb. 2.11) Die Konzentration an gebildetem NADH kann mittels des Extinktionskoeffizienten bei 340nm  $\epsilon = 6,2mM^{-1}$  [55] bestimmt werden. Da die Konzentration von gebildetem NADH direkt von der Glucosekonzentration abhängt, kann so die Konzentration der Glucose direkt aus der NADH-Konzentration ermittelt werden.

Ein weiterer Ansatz beruht auf der Bestimmung der NADH- und damit der Glucose-Konzentration über die Messung der Fluoreszenzintensität. Unter anderem haben Narayanaswamy et al. einen linearen Anstieg der intrinsischen Fluoreszenz von NADH durch Zugabe von Glucose im Konzentrationsbereich zwischen 1.1 und 11mM berichtet [10]. Evans et al. schlugen darüber hinaus die Autofluoreszenz von NAD(P)H in Gewebe für nicht-invasives (also nicht auf Blutentnahme basiertes) Glucosemessen vor [11].



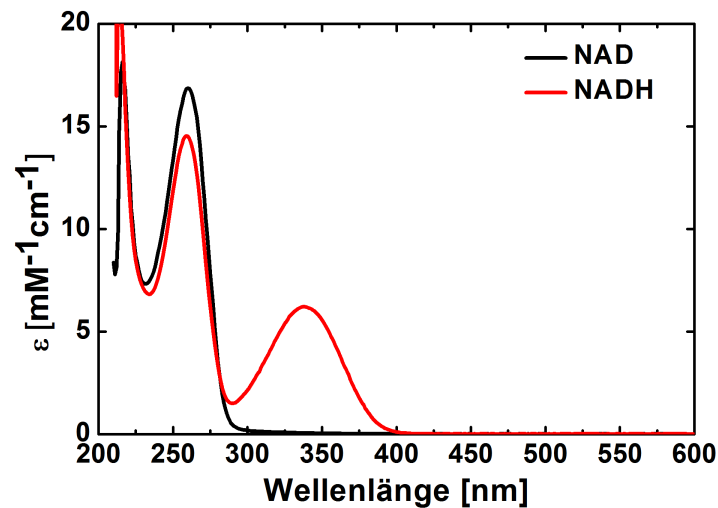


Abbildung 2.11: **Vergleich Extinktionsspektrum NAD versus NADH:** NADH hat ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340nm. (Bildquelle: analog zu Ref. [32])

Die Messung der Fluoreszenzintensität wird durch Fluktuationen der Intensität der Anregungslichtquelle, Veränderung der Transmissionseigenschaften der verwendeten optischen Komponenten, Lichtstreuung und manchmal auch von photochemischen Prozessen wie Photobleichen beeinflusst [33]. Der dritte Detektionsansatz, die Fluoreszenzlebensdauer, umgeht diese Nachteile. Eine Möglichkeit die Glucosekonzentration über die Fluoreszenzlebensdauer zu detektieren wurde von W. Petrich et al. vorgeschlagen [30]. Die Idee dahinter soll anhand von Abbildung 2.12 und NADH als Beispiel kurz erläutert werden: Analog zur Bestimmung der Bindungskonstante wird die Fluoreszenzlebensdauer von NADH als eine mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  ausgedrückt. Diese besteht aus den zwei Lebensdauern von freiem NADH und gebundenem NADH. In Abbildung 2.12 ist die mittlere Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis Enzym zu Coenzym, sprich GlucDH zu NADH, dargestellt. Ist die Konzentration des gebildeten NADHs hoch, dies ist bei hoher Glucosekonzentration der Fall, sind der Großteil der NADH Moleküle frei und die mittlere Fluoreszenzlebensdauer entspricht annähernd der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von freiem NADH. Wenn umgekehrt die NADH Konzentration gering ist, also die Glucosekonzentration niedrig ist, so ist der Großteil der NADH Moleküle gebunden und NADH entspricht der Lebensdauer von gebundenem NADH. Dies bedeutet, dass die mittlere Fluoreszenzlebensdauer davon abhängt, ob NADH gebunden oder frei vorliegt und damit - bei gegebener Enzymaktivität - von der Konzentration an gebildetem NADH, folglich von der Glucosekonzentration. [30] Die Durchführung der Messung zu Abbildung 2.12 wurden mit NADH und GlucDH analog zu den Messungen der Bestimmung der Bindungskonstante durchgeführt und die Fluoreszenzabklingkurven mit derselben Methode und denselben Parametern gefittet. Die Anwendbarkeit dieses Glucosesensors konnte für NADH und GlucDH bereits bestätigt

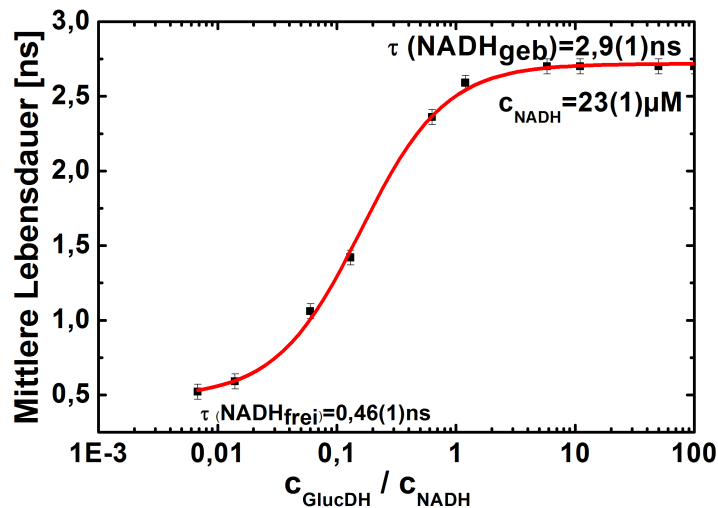


Abbildung 2.12: **Prinzip eines Lebensdauerbasierten Glucosesensors:** Mittlere Lebensdauer aufgetragen gegen das Konzentrationsverhältnis GlucDH zu NADH. (Bildquelle: analog zu Ref. [32])

werden. In Abbildung 2.13 ist die mittlere Fluoreszenzlebensdauer und das Verhältnis zwischen der freien und der gebundenen Komponente  $R_{frei/geb}$  in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration aufgetragen. Diese Messungen wurden an Teststreifen durchgeführt, wobei Blut, welches verschiedene Konzentrationen an Glucose enthielt, appliziert wurde. Sowohl  $\tau_{av}$  als auch  $R_{frei/geb}$  zeigen für den hier dargestellten Bereich eine lineare Abhängigkeit von der Glucosekonzentration und bestätigen die Anwendbarkeit dieser Idee für einen Glucosesensor [32].

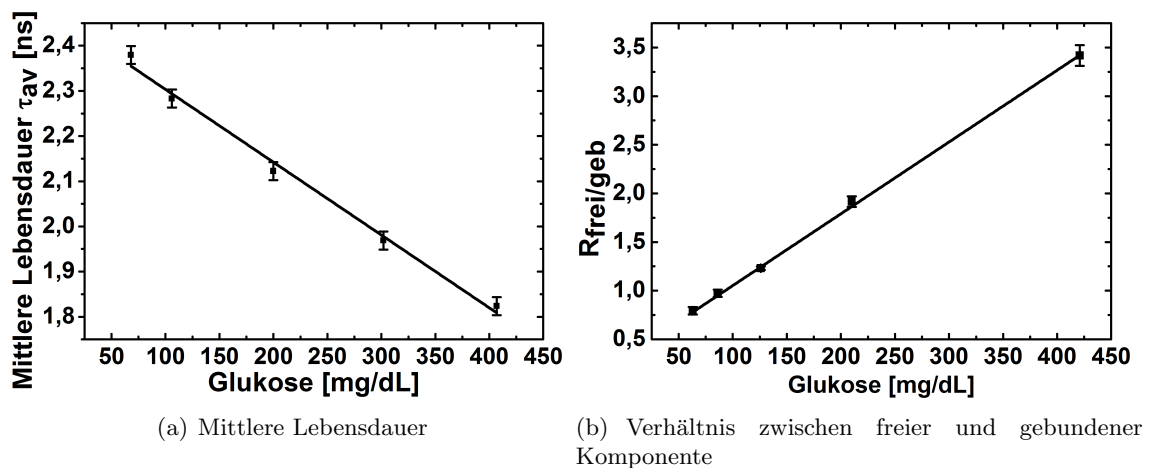


Abbildung 2.13: **Messungen an Teststreifen mit Blut:** Sowohl die mittlere Fluoreszenzlebensdauer als auch das Verhältnis zwischen freier und gebundener Komponente  $R_{f/b}$  sind linear von der Glucosekonzentration abhängig. (Bildquelle: [32])

Ziel dieser Arbeit war zu überprüfen, ob dieses Prinzip auch auf cNADH als Coenzym angewandt werden kann. Die Durchführung der Messung für cNADH wurde analog zu

Abschnitt 2.4 bei vier verschiedenen Temperaturen im Bereich zwischen 10°C und 40°C durchgeführt.

## 2.6 Bestimmung der Aktivität eines Enzyms mittels Fluoreszenzlebensdauerermessung

In der Biochemie ist die Aktivität ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der ein Substrat von einem Enzym (Katalysator) umgesetzt wird. Ihre Einheit 1 unit gibt den Umsatz von 1  $\mu$ mol Substrat pro Minute an. Die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  einer Enzymreaktion kann über die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden [54]:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2.22)$$

$V_{max}$  ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $[S]$  die Substratkonzentration und  $K_M$  steht für die Michaelis-Menten Konstante.  $K_M$  ist definiert als die Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit gleich  $\frac{1}{2}V_{max}$  ist. Sie ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat. Je höher  $K_M$ , desto höher muss die Substratkonzentration sein, damit die Reaktion bei halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft.

Die Aktivität ( $A$ ) eines Enzyms kann über viele verschiedene Techniken bestimmt werden, unter anderem photometrisch und fluorometrisch. Photometrisch wird die Aktivität über die Absorbanzänderung  $\Delta Abs$  pro Zeit  $\Delta t$  nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta Abs \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot V_p \cdot \Delta t} \quad (2.23)$$

$c$  steht für die Konzentration der absorbierenden Substanz,  $d$  für die Schichtdicke der Küvette,  $V$  für das Gesamtvolumen der Küvette und  $V_p$  für das Probevolumen und  $\epsilon$  für den dekadischen Extinktionskoeffizienten [54].

Der Einfluss der Enzymaktivität auf die Fluoreszenzlebensdauer wurde auf mit Teststreifenmasse beschichteten Deckgläsern (D 263 M, Schott, Deutschland) gemessen. Die Teststreifenmasse enthielt unter anderem das Coenzym cNAD und das Enzym GlucDH. Obgleich die Ortsauflösung für die Messung am Teststreifen keine Rolle spielt, wurde aus praktischen Gründen die Fluoreszenzlebensdauern über FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) mit einem Axioplan 1 (Carl Zeiss, Deutschland) gemessen. Die Teststreifen wurden hierbei mit einer gepulsten Laserdiode (LD) bei 375nm (LDH 375 mit Pulstreiber PDL 800B, PicoQuant, Deutschland) mit einer Wiederholungsrate von 40MHz angeregt. Die LD wurde über eine Multimode-Glasfaser in das Mikroskop eingekoppelt. Das Anregungslicht wurde über einen dichroitischen Strahlteiler (FT 395nm, Filter Satz 2, Carl Zeiss, Deutschland) durch das Objektiv (Plan-Neofluar 10x 0,3, Carl Zeiss, Deutschland) auf den Teststreifen gelenkt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde zur Detektion über dasselbe Objektiv gesammelt und durch den dichroitischen Strahlteiler auf eine Bildverstärkerkamera (Picostar HR 12 Bildverstärker gekoppelt mit einer gekühlten

CCD camera; LaVision, Deutschland) durchgelassen. Vor der Bildverstärkerkamera wurde ein Langpassfilter (LP 420nm, Carl Zeiss, Deutschland) installiert, um das Fluoreszenzlicht noch weiter vom Streulicht zu trennen. Die Belichtungszeit betrug 1s, die Öffnungszeit des Bildverstärkers 500ps und die Spannung am Bildverstärker 600V. Die Zeitauflösung der Kamera betrug 200ps. Die Kamera wurde im Zeitfenstermodus betrieben. Es wurden zwei Zeitfenster bei 1,5ns bis 2ns (hauptsächlich kurze Lebensdauer des cNADHs) und bei 3,5-4ns (hauptsächlich lange Lebensdauer des cNADHs) gewählt. Eine effektive Fluoreszenzlebensdauer wurde über das Verhältnis der Intensitäten der beiden Zeitfenster über folgende Gleichung bestimmt:

$$\tau_{eff} = \frac{\Delta t}{\ln(I_1/I_2)} \quad (2.24)$$

$\Delta t$  steht für den Zeitabstand zwischen den beiden Zeitfenster (2 ns),  $I_1$  ist die Intensität des ersten Zeitfensters (freies cNADH) und  $I_2$  die Intensität des zweiten Zeitfensters (gebundenes cNADH).

Die Teststreifen wurden mit je 5 $\mu$ l Glucoselösungen unterschiedlicher Konzentrationen (75mg/dL, 150mg/dL und 300mg/dL) benetzt. Diese Messung wurde für jeden Teststreifen zwei Mal durchgeführt: einmal 5s und einmal 17s nach Benetzung.

Um den Einfluss einer reduzierten Aktivität auf die Fluoreszenzlebensdauer testen zu können, wurde ein Teil der Teststreifen für 2 und 4 Tage bei 60°C und 80% Luftfeuchtigkeit, d.h. abseits der erlaubten Lagerbedingungen, eingelagert. Die Aktivität des Enzyms in jeweils unterschiedlichen Teststreifen wurde unabhängig über ein Standardverfahren photometrisch bestimmt und die gemessene Aktivität mit der für GlucDH bekannten Aktivität (22,0U/cm<sup>2</sup>) ins Verhältnis gesetzt<sup>4</sup>

## 2.7 Probenpräparation

NAD und NADH wurden von Roche (10127973001 und 10107735001, Roche Applied Science, Deutschland) geliefert. cNAD, cNMN wurden analog zum Protokoll von Lee et al. [56] synthetisiert und zusammen mit NMN (N3501, Sigma Aldrich) zu cNADH, cNMNH und NMNH nach dem Protokoll von Panza et al. reduziert[57].<sup>5</sup> Vor jeder Messung wurden die Substanzen in Trispuffer (10708976001, Roche Applied Science, Deutschland)(0,1M pH8,5), welcher 0,2M NaCl (567440,Merck, Deutschland) enthielt gelöst. Dichlorbenzylidihydronikotinamid und die cisoide Modellverbindung wurden als 0,1M Stocklösung in Ethanol (Ethanol puris, 32221, Sigma Aldrich, USA) angerührt und kurz vor der Messung mit dem jeweiligen Lösungsmittel verdünnt. Der Ethanolgehalt betrug nach der Verdünnung weniger als 0,1% und hat laut P. Fischer et al. keinen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften [31]. Zusätzlich zu den Messungen in Trispuffer wurden Messungen in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO

---

<sup>4</sup> Die photometrische Aktivitätsbestimmung wurde von Dr. Susanne Gawenda durchgeführt.

<sup>5</sup> Die Synthese und Reduktion der Moleküle wurde von Heribert März aus der Arbeitsgruppe von Dr. Dieter Heindl, Roche Penzberg durchgeführt

mit Molekularsieb, 41641, Sigma Aldrich, USA), deuteriertem Trispuffer (bestehend aus D<sub>2</sub>O (191701) und Deuteriumchlorid (543047), Sigma Aldrich, USA) und Methanol (spectroscopic grade, 154903, Sigma Aldrich, USA) durchgeführt. Mit Ausnahme des Dichlorbenzylidihydronikotinamids und der cisoiden Modellverbindung wurden alle Substanzen direkt in den jeweiligen Lösungsmitteln gelöst.

Die Absorptionsspektren, Emissionsspektren und Fluoreszenzlebensdauern wurden anhand von 3 Aliquots derselben Probe parallel durchgeführt. Alle Messungen wurden in der Regel bei 4 verschiedenen Temperaturen von 10°C bis 40°C in 10°C Schritten durchgeführt. Der pH-Wert des Trispuffers zeigt eine starke Temperaturabhängigkeit. Der pH-Wert wurde deswegen für jede Temperatur vor der Messung überprüft und erneut eingestellt.

Alle Substanzen wurden bei 3 verschiedenen Konzentrationen untersucht (45µM, 33µM und 23µM) um Effekte der optischen Dichte für die Fluoreszenzmessung ausschließen zu können. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse über jeweils mindestens 30 unabhängige Messungen gemittelt.

Für die Messung von gebundenem (c)NADH wurde GlucDH (Roche Penzberg, Deutschland) sowohl in Kaliumphosphatpuffer (0,1M pH7), als auch in Trispuffer (0,1M pH8,5 mit 0,2M NaCl) gelöst. Für die UV-Vis Spektroskopie wurden Quarzglasküvetten (111-10-40, Hellma, Deutschland) mit einer Schichtdicke von  $d = 1\text{cm}$  und für die Fluoreszenzmessungen Quarzglasküvetten (114F-10-40, Hellma, Deutschland) mit einer Schichtdicke von  $d_1 = 1\text{cm}$  und  $d_2 = 0,4\text{cm}$  verwendet.

## 2.8 Sauerstofffrei messen

Um den Einfluss von molekularem Sauerstoff auf die spektroskopischen Eigenschaften von NADH und cNADH untersuchen zu können wurden Messungen in sauerstofffreiem Puffer durchgeführt. Dazu wurde der Puffer 5 Minuten im Ultraschallbad und unter Einhaltung gängiger Schlenktechniken [58] 20 Minuten mit Argon entgast. Das Argongas wurde zusätzlich über eine selbstgestopfte Säule (enthielt mehrere Lagen einer Mischung aus Natriumhydroxid (NaOH, 655104, Sigma Aldrich, USA) und Pyrogallol (P0381, Sigma Aldrich, USA) durch Watte getrennt) gefiltert und eventuell vorhandener Sauerstoff und H<sub>2</sub>O entfernt. Verschließbare Quarzglasküvetten (117104F-10-40, Hellma, Deutschland) wurden mit ca. 0,8mg (c)NADH-Pulver befüllt, mit einem Kautschukseptum (EC92.1, Roth, Deutschland) verschlossen und ebenfalls mit Argon entgast. Im Anschluss wurde 1ml entgaster Trispuffer mit einer Spritze vom Schlenkkolben in die verschlossene Küvette überführt.

Um überprüfen zu können, dass die Lösung keinen Sauerstoff enthält, wurde die selbe Prozedur mit Pyrogallol (P0381 Sigma Aldrich, USA) in 33% NaOH (Pulver, 655104, Sigma Aldrich, USA) durchgeführt. Pyrogallol reagiert mit kleinsten Mengen an Sauerstoff, was mit eine Änderung des Absorptionsspektrums einhergeht. Durch Oxidation zerfällt Pyrogallol unter anderem in Purpurogallin (Trihydroxybenztropolon).

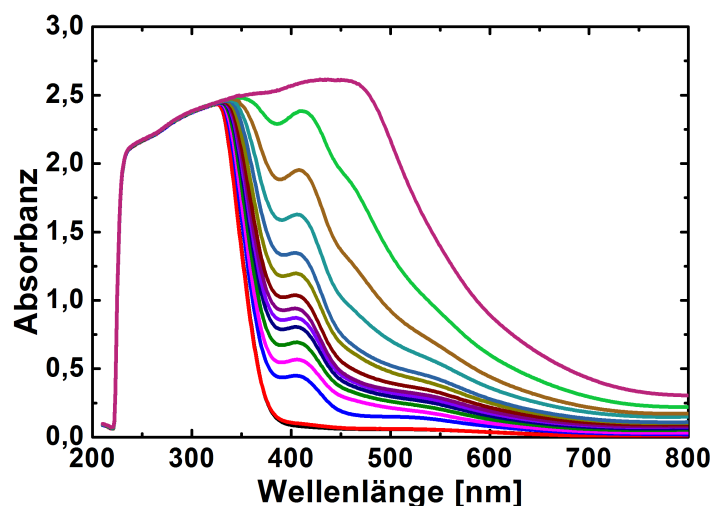


Abbildung 2.14: **Quantitativer Sauerstoffnachweis mittels Pyrogallol:** Änderung des Extinktionsspektrums von Pyrogallol unter Zugabe von Sauerstoff.

Purpurogallin weist im Gegensatz zu Pyrogallol ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 420nm auf [59]. Durch Untersuchung der Absorbanz dieses zusätzlichen Peaks kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 2.47 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) auf die Sauerstoffkonzentration zurückgeschlossen werden, wobei es zu einer 1:3 Umsetzung (3 mol Sauerstoff ergeben 1 mol Purpurogallin) kommt [60]. In Abbildung 2.14 wurde das Extinktionsspektrum von entgastem Pyrogallol aufgenommen. Zu Beginn (schwarze Kurve) und auch nach 30min (rote Kurve) gibt es nur eine sehr geringe Änderung der Absorption bei 420nm. Im Anschluss an diese Messung wurden 6 mal  $5\mu\text{l}$  Luft zugegeben, anschließend 3 mal  $10\mu\text{l}$  Luft, dann 2 mal  $20\mu\text{l}$  und zuletzt 2 mal  $50\mu\text{l}$ . Die Luft wurde mittels einer Spritze durch das Septum appliziert. 1 Minute nach Injektion wurden die Spektren von Abbildung 2.14 aufgenommen. Deutlich zu erkennen ist die Entstehung eines zusätzlichen Absorptionsmaximums bei 420nm.

Die Messbedingungen der sauerstofffreien (c)NADH Lösungen entsprachen der schwarzen Kurve. Die Lösung enthielt weniger als  $20(9)\mu\text{M}$  Purpurogallin. Der große Fehler ist auf eine gerätebedingte Messungenauigkeit bei der Aufnahme der Basislinie zurückzuführen. Mit oben erwähnter 1:3 Umsetzung folgt ein Sauerstoffgehalt von  $18(8)\mu\text{M}$  bzw.  $0,018(8)\text{mM}$  (ungefähr  $5 \cdot 10^2 \text{ppm}$ ) in der entgasten Lösung.

Mit Hilfe der Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser ( $K=1,3\text{mMl}^{-1}\text{bar}^{-1}$ )[61] und dem Henry Gesetz  $c = K \cdot x_i \cdot p$  lässt sich der Sauerstoffgehalt in Wasser bei Normaldruck ( $p=1,013\text{bar}$ ) und einem Stoffmengenanteil  $x_i$  von Sauerstoff in Luft von 0,209 zu  $0,28\text{mM}$  abschätzen[61]. Dies entspricht einem Sauerstoffgehalt von ungefähr  $5 \cdot 10^3 \text{ppm}$  in nicht entgaster Lösung. Folglich wäre der Sauerstoffgehalt in entgaster Lösung nur um mindestens einen Faktor 10 niedriger als in der nicht entgasten Lösung. Dieser Wert stellt eine Obergrenze dar. In der Chemie wird davon ausgegangen, dass unter Einhaltung der gängigen Schlenktechniken der Sauerstoffgehalt nur wenige ppm beträgt.

## 3 Quantenchemische Rechnungen

Aus der Literatur ist bekannt, dass NADH Absorptionsmaxima bei 260nm (Absorptionsbande des Adenins) und bei 340nm (Absorptionsbande des Dihydrinikotinamids) hat [55]. Erste Messungen an einem cNADH Gemisch ergaben, dass die Absorptionsbande des Dihydrinikotinamids von cNADH im Vergleich zu NADH 20nm rot verschoben ist und bei 360nm liegt [15].

Ziel dieses Abschnittes ist es, den elektronischen Grundzustand und die elektronisch angeregten Zustände von NADH und cNADH quantenchemisch zu beschreiben. Ein besonderes Augenmerk soll dabei darauf liegen, ob es möglich ist, die in der Literatur beschriebenen experimentell gefundenen Unterschiede in den Absorptionsspektren von NADH und cNADH erklären zu können. Zusätzlich zu den Rechnungen in Gasphase wurden auch Lösungsmittelleffekte durch Anwendung des PCM-Models (polarizable continuum model) berücksichtigt und ihr Einfluss auf die Ergebnisse untersucht.

### 3.1 Methode und Durchführung

Im folgenden Abschnitt sollen die Grundideen der verwendeten Methoden kurz erläutert werden. Für eine tiefere und gründliche mathematische Beschreibung der Hatree-Fock-Methode [62] und der Dichtefunktionaltheorie soll an diesem Punkt auf die Werke von Dreizler [63], Eschrig [64] und Parr [65] verwiesen werden. Für die Berechnung der angeregten Zustände soll hier auf die Publikationen von Dreuw und Harbach et al. verwiesen werden [66, 67].

#### 3.1.1 Grundzustand

Um Anregungen rechnen zu können ist zu Beginn die Charakterisierung des elektronischen Grundzustandes notwendig. Diesen kann man z.B. durch Verwendung der Dichtefunktionaltheorie (DFT) berechnen. Diese drückt die Gesamtenergie des Systems als Funktional der Elektronendichte aus. DFT ist die Methode der Wahl speziell bei der Beschreibung von größeren Molekülen. Der Rechenaufwand ist vergleichbar mit dem von Hartree-Fock (HF) Rechnungen, [62] wobei im Gegensatz zu HF zusätzlich die Elektronen-Korrelation durch ein Austausch-Korrelationsfunktional berücksichtigt wird [68]. Eine überlegte Wahl des Austausch-Korrelationsfunktionals führt zu einer recht genauen Beschreibung des zu untersuchenden Systems und damit zu den bestmöglichen Ergebnissen.[66]

Als Austausch-Korrelationsfunktional ist besonders die Verwendung von Hybridfunktionalen beliebt, bei denen nur ein Teil der Austausch-Korrelations-Funktion mit Hilfe der DFT berechnet wird. Der andere Teil wird als Austausch-Energie wie in der Hartree-Fock-Methode bestimmt. Dabei ist insbesondere Becke-3-Lee Yang Paar (B3LYP) als am häufigsten verwendetes Hybridfunktional zu erwähnen[69].

### 3.1.2 Elektronisch angeregte Zustände

Angeregte Zustände kann man z.B. mit CIS (Configuration Interaction Singles) berechnen. Im Rahmen dieser Methode konstruiert man die angeregte Wellenfunktion durch Austausch eines besetzten Molekülorbitals (MO) mit einem virtuellen (unbesetzten) MO in der Grundzustands-Slater Determinante. Normalerweise ist der angeregte Zustand eine Linearkombination vieler solcher angeregter Slater-Determinanten. Hat nur eine oder zwei dieser Determinanten signifikant am angeregten Zustand teil, so kann der Übergang durch nur ein besetztes und ein virtuelles MO (z.B. HOMO-LUMO)<sup>6</sup> beschrieben werden. Die Energien der virtuellen Orbitale (z.B. des LUMOs) werden allerdings für ein N+1 Elektronensystem beschrieben. Damit liefert CIS nur eine schlechte Näherung für Anregungsenergien. Sie führen typischerweise zu einer Überschätzung der Energien um 0.5-2eV [66].

Eine bessere Beschreibung der Anregungsenergien liefert die zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie (TDDFT). Analog zu DFT sagen die Runge-Gross Theoreme, dass die totale Energie als Funktional der zeitabhängigen Elektronendichte beschrieben werden kann [70]. Die Anregungsenergien und dazugehörigen Oszillatorstärken erhält man, indem die Elektronendichte des Grundzustandes mit einem externen zeitabhängigen Feld gestört wird und man die lineare Antwort der Dichte auf diese Störung analysiert. Die Pole dieser Funktion in erster Ordnung (linear response) entsprechen den Anregungsenergien. TDDFT beschreibt die Einteilchenenergie eines angeregten Elektrons besser als HF, da sie aus der Energiedifferenz der Kohn-Sham-Orbitale eines N-Elektronensystems hervorgehen. Die Fehler der Anregungsenergien liegen im Bereich von 0,1-0,5eV [66]. Die Rechenzeit von TDDFT ist im Vergleich zu anderen Methoden gering und kann somit auch zur Beschreibung lokaler Einfachanregungen von Molekülen mit mehr als 20 Atomen angewandt werden [66].

### 3.1.3 Durchführung

Die quantenmechanischen Rechnungen wurden mit dem Programmpaket *Gaussian 09* durchgeführt [71]. Eine kristallographisch bestimmte Struktur von NAD wurde für NADH leicht modifiziert und als Anfangsstruktur für die Geometrieoptimierung verwendet.[72] Für die Berechnungen von cNADH wurde die Struktur ebenfalls modifiziert, indem der Sauerstoff am Zucker durch eine Methylengruppe ersetzt wurde.

In den folgenden Rechnungen wurde sowohl für die Berechnung des Grundzustandes, als auch für die Berechnung der elektronischen Anregungen das Hybrid-Funktional CAM-B3LYP mit dem Standard polarisierten Doppel- $\zeta$  Basissatz cc-pVDZ verwendet [73]. Die Wahl des Austausch-Korrelationsfunktionals fiel auf CAM-B3LYP, da TDDFT normalerweise bei der Beschreibung von Ladungstransferanregungen versagt. CAM-B3LYP ist ein long-range korrigiertes B3LYP Hybridfunktional, d.h. das Funktional bestimmt die Abstände der verschiedenen Atome und mischt zur Berechnung der

---

<sup>6</sup> HOMO: highest occupied molecular orbital; LUMO: lowest unoccupied molecular orbital



Anregungsenergien bei kürzeren Abständen wenig Hartree Fock Anteile (19%) bei, während bei großen Abständen große Anteile an Hartree-Fock (65%) beigemischt werden. Der Fehler der Anregungsenergien von TDDFT für charge-transfer Zustände wird mit Verwendung von CAM-B3LYP somit geringer.[74]

Im Anschluss an die Geometrieoptimierung (Energiminimierung) des Grundzustandes mittels DFT wurden 20 vertikale elektronische Anregungen mittels TDDFT gerechnet (nur erlaubte Übergänge, d.h. Singulett-Singulett Übergänge).

Für die Untersuchung der Fluoreszenz wurde nochmals eine Geometrieoptimierung, in diesem Fall vom angeregten Zustand (S1) durchgeführt und im Anschluss wiederum 20 elektronische Anregungen gerechnet. Um den Fehler der Methode abschätzen zu können wurde die Energie der ersten Anregung von NADH mit dem Literaturwert (340nm $\hat{=}$  3,647eV) [55] verglichen und auf diesen normiert. Die absoluten Anregungsenergien der folgenden Rechnungen (von NADH, cNADH, NMNH' und cNMNH' sowohl Absorptionals auch Fluoreszenzrechnungen) wurden um diesen Energiefehler ( $\Delta E=-0,485\text{eV}$ ) verschoben.

### 3.1.4 Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten

Um die aus den bisherigen quantenchemischen Rechnungen (im Vakuum) erzielten Ergebnisse mit den experimentellen Ergebnissen in Lösungsmittel besser vergleichen zu können, wurden Lösungsmittelleffekte mit Hilfe des polarizable continuum models (PCM) berücksichtigt. Anstatt jedes Lösungsmittelmolekül explizit zu beschreiben, benutzt man ein dielektrisches Medium, welches die Lösungsmittelmoleküle implizit als Ganzes repräsentiert. Der gelöste Stoff befindet sich in einer Kavität, wobei das dielektrische Medium durch seine Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  repräsentiert wird. Das gelöste Molekül wird als Ladungsverteilung behandelt, welches das dielektrische Kontinuum polarisiert, wodurch Oberflächenladung induziert wird. Diese Oberflächenladung definiert das Lösungsmittelreaktionsfeld, welches wiederum die Ladungsverteilung des gelösten Moleküls polarisiert. Die Kavität wird als Satz von ineinandergreifenden Kugeln, welche um jeden Kern des Moleküls zentriert sind, definiert. Die Grenze jeder Kavität ist dabei die Oberfläche des Moleküls. Die auf die Oberfläche induzierte Ladung muss dabei numerisch berechnet werden [75]. In Abbildung 3.1 wird die Durchführung der Rechnungen ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten (Nicht-PCM) und unter Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten (PCM) miteinander verglichen. Die PCM Rechnungen wurden mit Wasser als Lösungsmittel d.h. mit einer Dielektrizitätskonstante von  $\epsilon = 78.3553\text{Fm}^{-1}$  mit *Gaussian 09* durchgeführt. Im Gegensatz zu den Berechnungen ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten wurde zusätzlich eine zustandsspezifische Anregung und Abregung durchgeführt. Bei der zustandsspezifischen Anregung und Abregung (Emission) wird die Antwort der durch die Anregung geänderten Ladungsverteilung des Moleküls auf das polarisierende Lösungsmittel mitberücksichtigt. Das heißt durch die Durchführung der PCM Rechnungen wird sowohl der Einfluss des polarisierenden Mediums auf die

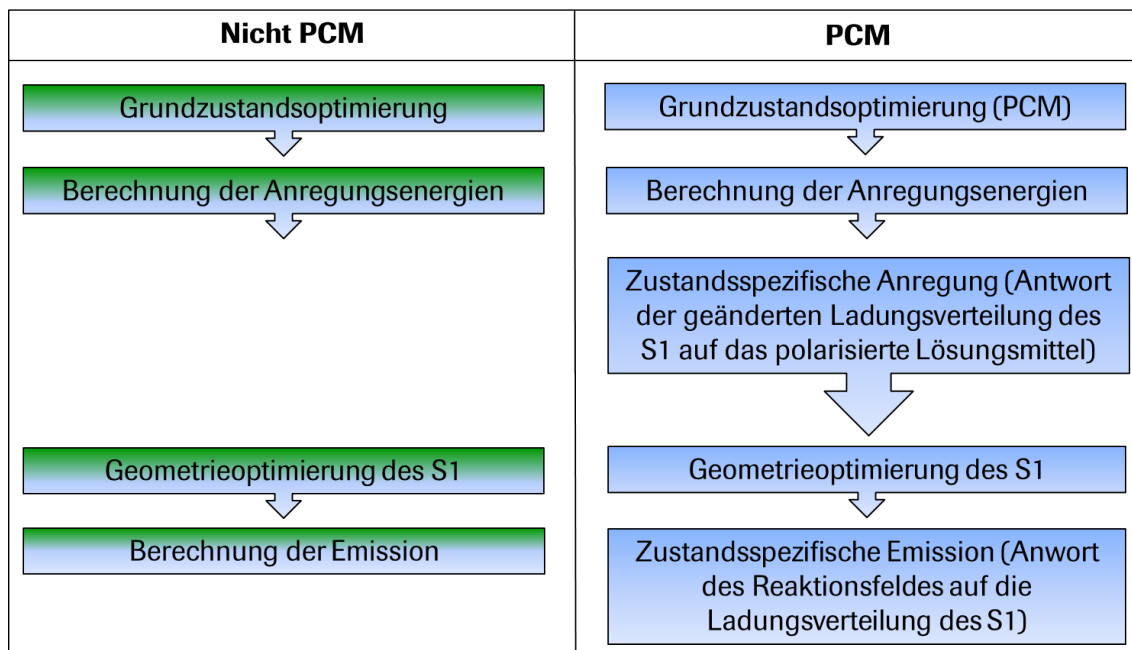


Abbildung 3.1: Vergleich Durchführung für PCM und Nicht-PCM Rechnung.

Anregung/Abregung des Moleküls, als auch der umgekehrte Einfluss der durch die Anregung veränderten Ladungsverteilung des Moleküls auf das Lösungsmittel bzw. das Reaktionsfeld berücksichtigt. Analog zu den vorherigen Rechnungen wurden jeweils 20 elektronische Anregungen gerechnet. Der Fehler der PCM-Methode wurde wiederum durch Normierung der ersten Anregung den Literaturwert der Energie des NADH abgeschätzt. Alle Anregungsenergien der PCM-Rechnungen wurden auf dieser Basis um  $\Delta E = -0,287\text{eV}$  verschoben.

### 3.2 Absorption

Zu Beginn wurden die Grundzustandsenergien von NADH und cNADH mittels DFT mit CAM-B3LYP als Austausch-Korrelationsfunktional und dem Basissatz cc-pVDZ berechnet. Auf die optimierte Grundzustandsgeometrien wurden jeweils 20 vertikale elektronische Anregungen (Singulett-Singulett Übergänge) mit den dazugehörigen Oszillatorstärken gerechnet. Dabei wurden die Anregungen für zwei verschiedene Konfigurationen der Amidgruppe am Dihydrornicotinamid berechnet (transoid und cisoid). Die transoide Form soll dabei NMR Studien zu Folge die präferierte Stellung sein [31]. Bei der transoiden Form zeigt der Sauerstoff der Amidgruppe in Richtung des Stickstoffs (N1), während bei der cisoiden Stellung die Aminogruppe (NH<sub>2</sub>) zum Stickstoff zeigt.

In Abbildung 3.2 ist die berechnete Oszillatorstärke in Abhängigkeit von der Wellenlänge für transoides NADH und transoides cNADH aufgetragen. Im Anschluss wurden die Anregungsenergien mit einer Lorentzfunktion mit einer Linienbreite von 20nm gefaltet. Vergleicht man nun das so erhaltene Spektrum von NADH und cNADH, so erkennt man, dass die erste Anregung von cNADH im Vergleich zu NADH um  $\Delta E = 0,161\text{eV}$

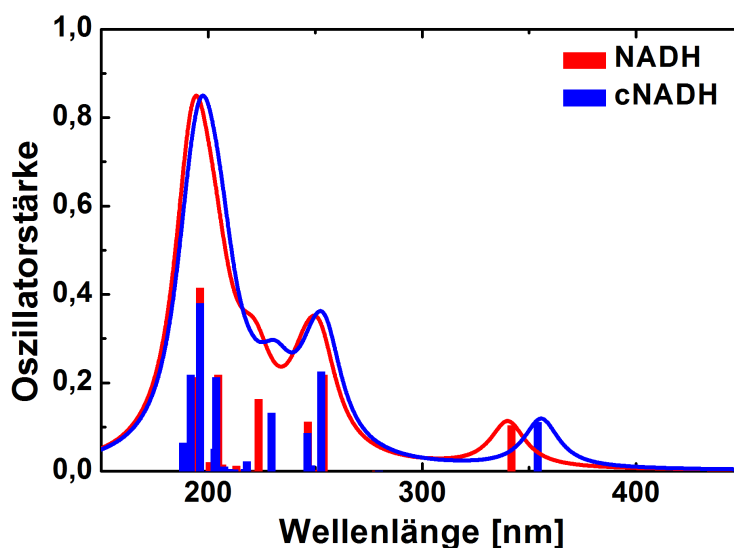


Abbildung 3.2: Vergleich Absorption transoides NADH vs. transoides cNADH: Das Spektrum wurde aus den Anregungsenergien mittels einer Faltung mit einer Lorentzfunktion mit 20nm Linienbreite erstellt.

bzw.  $\Delta\lambda=15,7\text{nm}$  nm rot verschoben ist und beide Anregungen ungefähr dieselbe Oszillatorstärke haben. Darüber hinaus haben beide Moleküle eine weitere Anregung bei 260nm. Diese Anregung entspricht in Übereinstimmung mit Literaturangaben der Anregung des Adenins [55]. Schaut man sich die Orbitale der Übergänge an, so handelt es sich bei der ersten Anregung vom  $S_0$  in den  $S_1$  um einen HOMO-LUMO Übergang, genauer gesagt um einen  $\pi\pi^*$  Übergang.

Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturangaben [31]. Vergleicht man nun HOMO und LUMO von NADH und cNADH anhand von Abbildung 3.3, so erkennt man, dass bei diesem Übergang zum überwiegenden Teil der Dihydronikotinamidrest und der Zuckerrest involviert sind. In Übereinstimmung mit der Literatur ist die Absorptionsbande bei  $\lambda=340\text{nm}$  auf die Anregung des Dihydronikotinamids zurückzuführen [55]. Der Übergang vom  $S_0$  in den  $S_1$  von cisoidem cNADH zeigt eine geringere Verschiebung von  $\Delta E=0,094\text{eV}$  bzw.  $\Delta\lambda=10,1\text{nm}$  im Vergleich zu cisoidem NADH. Darüber hinaus sind die Energien des transoiden Grundzustandes sowohl bei NADH als auch bei cNADH niedriger als die Energien des cisoiden Zustandes ( $\Delta E \approx 0,988E_H$ )<sup>7</sup>. In Übereinstimmung mit den NMR Messungen ist transoides (c)NADH energetisch niedriger und damit die bevorzugte isomere Struktur.[31]

<sup>7</sup>  $E_H$ : 1 Hartree=  $4,35974434 \cdot 10^{-18}\text{J}$  atomare Einheit der Energie

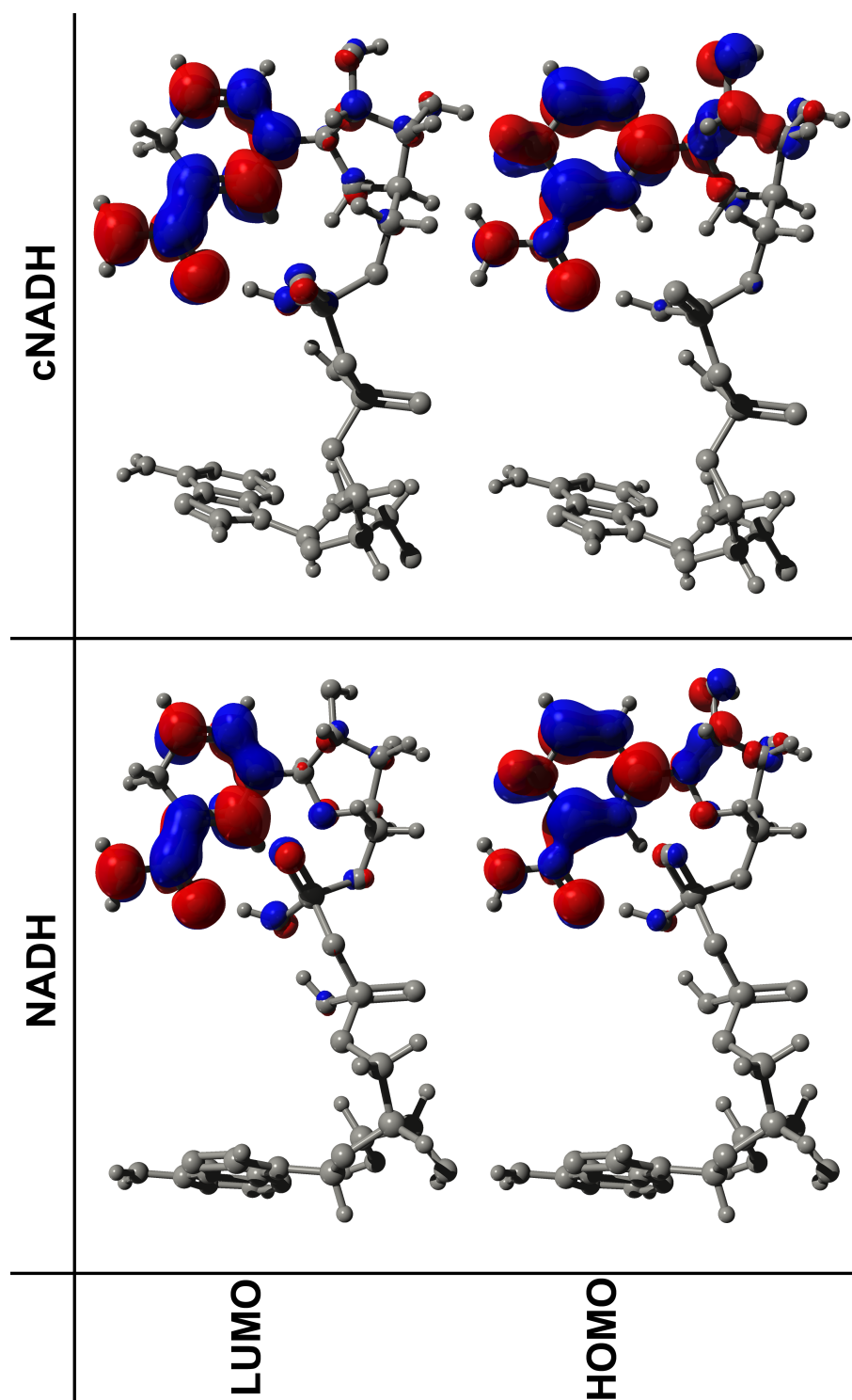


Abbildung 3.3: Vergleich HOMO und LUMO des transoiden NADHs bzw. cNADHs: Blaue Färbung: positives Vorzeichen der Wellenfunktion; Rote Färbung: negatives Vorzeichen der Wellenfunktion.

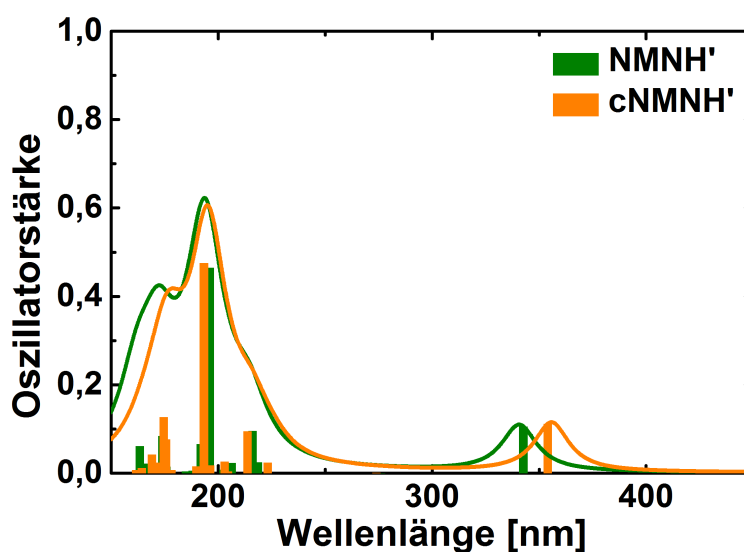


Abbildung 3.4: Vergleich Absorption transoides NMNH' vs. cNMNH': Das Spektrum wurde aus den Anregungsenergien mittels einer Faltung mit einer Lorentzfunktion mit 20nm Linienbreite erstellt.

Um die Rechenzeit minimieren zu können, wurde überprüft, ob es möglich ist die Absorptionseigenschaften des Dihydrinikotinamids durch die Berechnung von Dihydrinikotinamidmononukleosid (NMNH'), einem Molekül, welches nur aus dem Dihydrinikotinamidteil und dem Zuckerrest besteht, darstellen zu können.

Analog zu (c)NADH wurden die Absorptionsspektren von (c)NMNH' berechnet und erstellt. In Abbildung 3.4 erkennt man, dass analog zu NADH, die erste Anregung von transoidem cNMNH' um  $\Delta E=0,155\text{eV}$  bzw.  $\Delta\lambda=15,1\text{nm}$  rot verschoben ist im Vergleich zu transoidem NMNH'. Der Übergang vom  $S_0$  in den  $S_1$  entspricht analog zu NADH ebenfalls einem HOMO-LUMO-Übergang und ebenfalls einem  $\pi\pi^*$  Übergang, in den nur das Dihydrinikotinamid und der Zucker involviert sind (vgl. Abb. 3.5). Die Oszillatorstärken von NMNH' und cNMNH' sind ebenfalls annähernd gleich. Die Spektren von (c)NMNH' haben erwartungsgemäß keine zusätzliche Anregung bei 260nm, da (c)NMNH' keinen Adeninrest aufweist.

Analog zu den Rechnungen für (c)NADH wurden auch für (c)NMNH' Rechnungen an den cisoiden Konformationen durchgeführt. Auch hier sind die cisoiden Zustände energetisch ungünstiger als die transoiden Zustände. Allerdings beträgt die spektrale Verschiebung von cisoidem NMNH' zu cisoidem cNMNH' nur  $\Delta E=0,084\text{eV}$  bzw.  $\Delta\lambda=8,1\text{nm}$ , ist also für die cisoiden Konformation geringer als für die transoide. Transoides NMNH' und transoides cNMNH' lassen sich folglich als Modell für die Charakterisierung der Anregung des Dihydrinikotinamids von transoidem NADH und transoidem cNADH verwenden.

In Abbildung 3.6 werden die effektiven Atomladungen von NMNH' und cNMNH' miteinander verglichen. Durch die Substitution des Sauerstoffs durch eine Methylengruppe am Zucker kommt es zu Ladungsverschiebungen im Zucker: Die Ladung des Kohlenstoffs des Zuckers, welcher an den Stickstoff des Dihydrinikotinamidrests bindet, ist bei cNMNH'

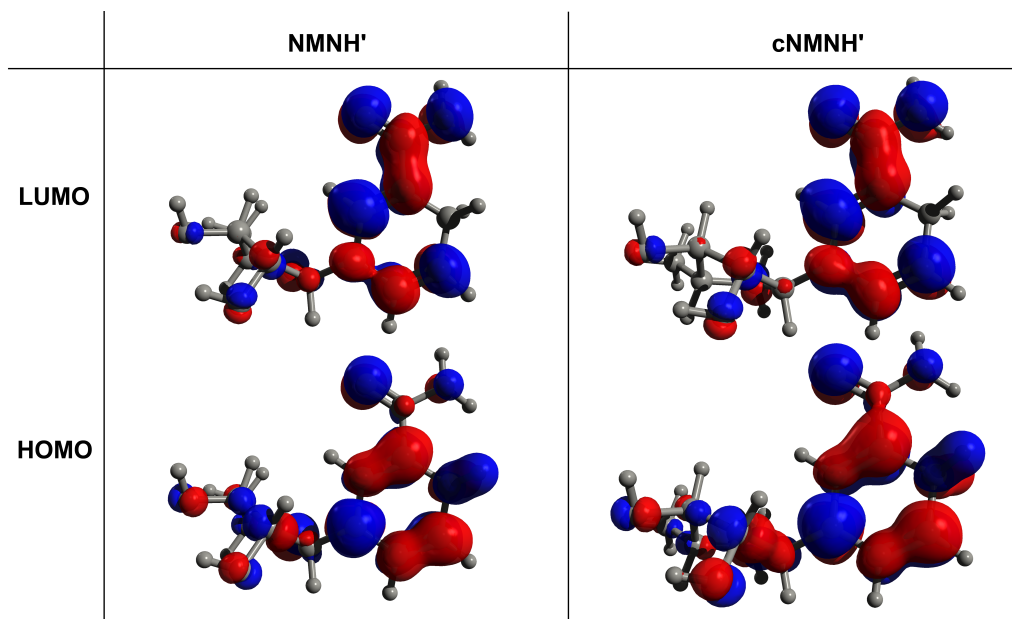


Abbildung 3.5: Vergleich HOMO und LUMO von transoidem NMNH' vs. cNMNH': Blaue Färbung: positives Vorzeichen der Wellenfunktion; Rote Färbung: negatives Vorzeichen der Wellenfunktion.

mit 0,026e annähernd neutral, während sie für NMNH' deutlich positiv geladen ist (0,228e). Darüber hinaus ist der Sauerstoff des Zuckers bei NMNH' negativ geladen (-0,297e), während der Kohlenstoff der Methylengruppe des Zuckers beim cNMNH' leicht positiv (0,087e) geladen ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der höheren Elektronegativität des Sauerstoffs (NMNH') im Vergleich zum Kohlenstoff (cNMNH'). Der Sauerstoff des Zuckers von NMNH' hat eine höhere Elektronegativität als die Methylengruppe des Zuckers bei cNMNH'. Diese Ladungsverschiebung hat Auswirkungen auf das Dihydrornikotinamid und diese scheinen wiederum der Grund für die Verschiebung der Absorptionsbande des Dihydrornikotinamids bei cNMNH' im Vergleich zu NMNH' zu sein.

### 3.3 Fluoreszenz

Im Anschluss an die Absorptionseigenschaften von NADH und cNADH wurden die Fluoreszenzeigenschaften mittels TDDFT berechnet. Analog zur Berechnung der Absorptionseigenschaften wurde CAM-B3LYP als Austausch-Korrelationsfunktional mit dem Basissatz cc-pVDZ verwendet. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Fluoreszenzeigenschaft von (c)NADH auf den Dihydrornikotinamid-Rest des Moleküls zurückzuführen ist. Im Abschnitt 3.2 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die spektroskopischen Eigenschaften des Dihydrornikotinamid von (c)NADH durch (c)NMNH' beschrieben werden können. Zur Berechnung der Fluoreszenzeigenschaften von NADH und cNADH wurden daher NMNH' und cNMNH' als Modellverbindungen verwendet.

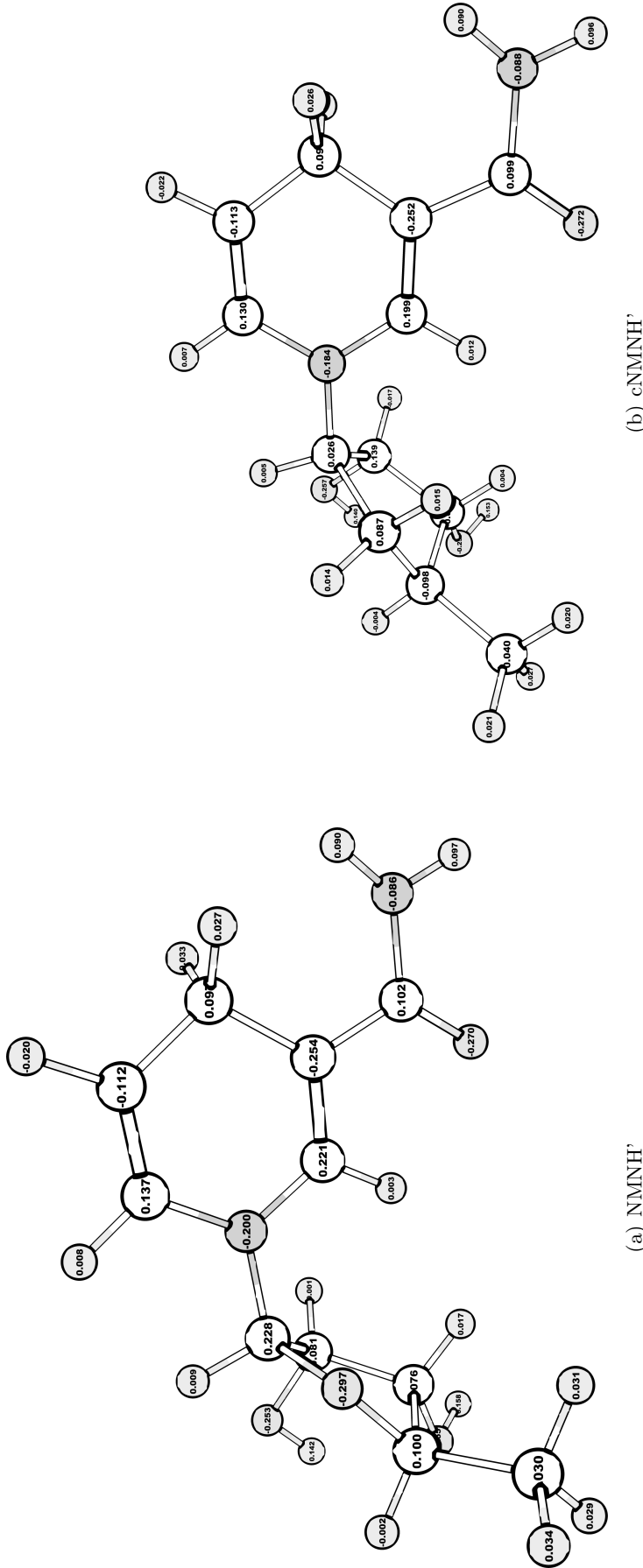


Abbildung 3.6: Vergleich der effektiven Ladung pro „Atom“, von NMNH' und cNMNH' in Einheiten der Elementarladung: Durch Substitution des Sauerstoffs am Zucker durch eine Methylengruppe kommt es zu Ladungsverschiebungen. Der Kohlenstoff des Zuckers, welcher an den Stickstoff des Dihydroneotinamids bindet ist bei cNMNH' annähernd neutral und bei NMNH' positiv geladen.

Stil	Nicht-PCM			
	NMNH'	cNMNH'	NMNH' trans	cNMNH' trans
Absorption [nm]	348	356	341	356
Fluoreszenz [nm]	474	485		445
Shift [ev]	-0,485	-0,485	-0,485	-0,485
PCM				
	NMNH'	cNMNH'	NMNH' trans	cNMNH' trans
Absorption [nm]	342	350	333	349
Fluoreszenz [nm]	447	444	425	431
Shift [eV]	-0,287	-0,287	-0,287	-0,287

Tabelle 3.1: Vergleich Absorption und Fluoreszenz des Dihydronikotinamids mit und ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten.

Zu Beginn wurde eine Geometrieoptimierung des  $S_1$  durchgeführt und auf die optimierte Geometrie 20 vertikale elektronische Anregungen gerechnet, wobei nur die durch die Auswahlregeln erlaubten Übergänge, d.h. Singulett-Singulett Übergänge gerechnet wurden. Bei der optimierten Geometrie des  $S_1$  fällt im Vergleich zur optimierten Geometrie des Grundzustandes ( $S_0$ ) auf, dass die Bindungslänge zwischen dem Ring des Dihydronikotinamids und der Amidgruppe geringer wird. Sie beträgt im  $S_0$  1,482Å, während die Bindungslänge im  $S_1$  nur noch 1,443Å beträgt. Bei der Fluoreszenz wurde in der Gasphase ebenfalls eine spektrale Verschiebung zwischen NMNH' und cNMNH' berechnet. Bei cisoidem NMNH' und cNMNH' beträgt die Verschiebung 9nm und stimmt damit mit der spektralen Verschiebung bei der Absorption von cisoidem NMNH' und cNMNH' überein. Für transoides NMNH' ist die Rechnung trotz zahlreicher Versuche letztendlich nicht konvergiert. Dementsprechend kann über die Energieverschiebung der transoiden Fluoreszenzübergänge keine Aussage getroffen werden. Für transoides cNMNH' beträgt der Fluoreszenzübergang  $\Delta E=2,7861\text{eV}$ , was einer Wellenlänge von  $\Delta\lambda=445\text{nm}$  entspricht.

Die bis zu diesem Punkt durchgeführten Rechnungen wurden ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten durchgeführt. Um die quantenchemischen Rechnungen später mit den experimentell erzielten Ergebnissen vergleichen zu können, sollen diese im Folgenden berücksichtigt werden. Dies wird im Rahmen des PCM Modells durchgeführt, wobei Wasser mit einer Dielektrizitätskonstante von  $\epsilon = 78.3553\text{Fm}^{-1}$  als Lösungsmittel gewählt wurde. Die Rechnungen wurden für transoides und cisoides (c)NMNN' durchgeführt und die Ergebnisse in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Im Vergleich zu den Rechnungen ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten beschreiben die Ergebnisse unter Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten (PCM) die Literaturwerte besser. So müssen die Energien im Rahmen des PCM Modells nur noch um  $\Delta E=-0,287\text{eV}$  verschoben werden, anstatt  $\Delta E=-0,485\text{eV}$  ohne PCM. Darüber hinaus bleiben die spektrale Verschiebungen zwischen NMNH' und cNMNH' bei der Absorption erhalten und betragen im transoiden Fall auch  $\Delta\lambda=15\text{nm}$ . Das PCM Modell wirkt sich besonders stark auf die Fluoreszenzeigenschaften aus. So reduziert sich die spektrale



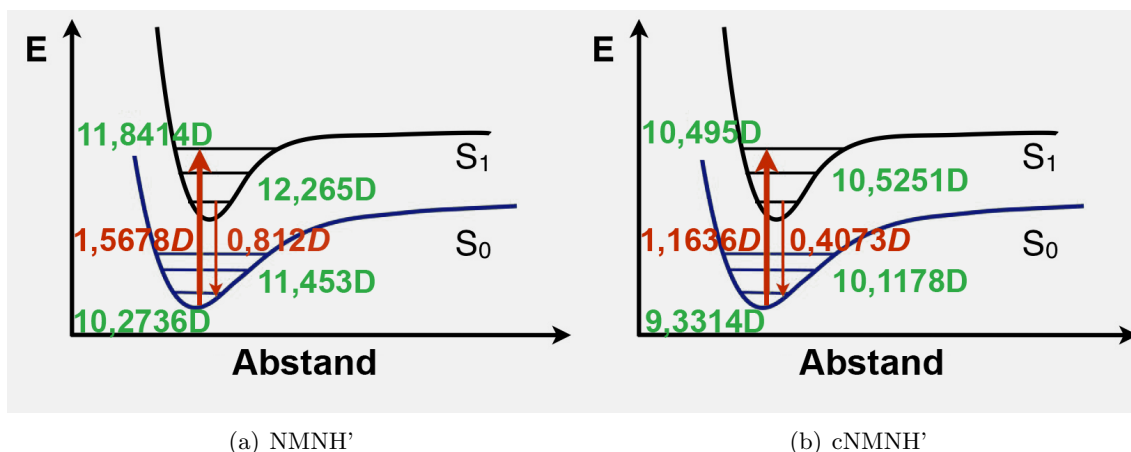


Abbildung 3.7: **Schematischer Vergleich der statischen elektrischen Dipolmomente von NMNH' vs. cNMNH'**: Die absoluten statischen elektrischen Dipolmomente des  $S_0$  und des  $S_1$  sind in grün dargestellt, während die Differenzen der Dipolmomente in Rot dargestellt sind. Die Rotverschiebung der Wellenlänge beim Übergang  $S_1$  in den  $S_0$  ist im Vergleich zur Absorption stärker, je größer das Dipolmoment des Fluorophors ist.

Verschiebung im Rahmen des PCM Modells für transoides NMNH' auf 6nm und im Falle von cisoidem NMNH' auf nur  $\Delta\lambda=3\text{nm}$ . Folglich bleibt ihm Rahmen des PCM Modells die Verschiebung in der Absorption erhalten, während sie sich bei der Fluoreszenz reduziert. Eine Möglichkeit die Reduzierung der spektralen Verschiebung bei der Fluoreszenz von NMNH' und cNMNH' zu verstehen, ist die Betrachtung der statischen elektrischen Dipolmomente des Grundzustandes  $S_0$  und des angeregten Zustandes  $S_1$  im Rahmen der Ergebnisse des PCM-Modells, d.h. in Wasser. Die Relaxation der Solvathülle im angeregten Zustand ist ein Grund für die Rotverschiebung in der Wellenlänge der Fluoreszenz gegenüber der Absorption [33]. Diese Rotverschiebung ist stärker, je polarer das Lösungsmittel und je größer das Dipolmoment des Fluorophors ist [33, 76–78]. Abbildung 3.7 vergleicht schematisch die absoluten statischen Dipolmomente (grün) sowie die Differenz der statischen elektrischen Dipolmomente (rot) des Grundzustandes und des angeregten Zustandes. Sowohl die absoluten Werte, als auch die Differenzen zwischen angeregtem- und Grundzustand sind für NMNH' größer als für cNMNH'. Folglich wird die Wellenlänge beim Übergang vom  $S_1$  in den  $S_0$  für NMNH' stärker rotverschoben als für cNMNH'. Mit anderen Worten: Die Energiedifferenz zwischen  $S_1$  und  $S_0$  wird bei NMNH' geringer und damit nähern sich die Energien bzw. Wellenlängen des Fluoreszenzübergangs von NMNH' an die von cNMNH' an.



## 4 Spektroskopische Eigenschaften von freiem NADH und cNADH in H<sub>2</sub>O

Die quantenmechanischen Rechnungen ergaben, dass die Absorptionsbande des Dihydrornikotinamids von cNADH im Vergleich zu NADH 16nm rot verschoben ist. Gleichzeitig ergaben die Rechnungen in Gasphase, dass die Lage des Fluoreszenzmaximums bei cNMNH' im Vergleich zu NMNH' um 11nm rot verschoben ist. Berücksichtigt man Lösungsmittelleffekte im Rahmen des PCM-Modells, so verringert sich die spektrale Verschiebung in Wasser auf 5,9nm für transoides (c)NMNH' und auf 3nm für cisoides (c)NMNH'.

Ziel des folgenden Kapitels ist es, die spektroskopischen Eigenschaften von cNADH experimentell mittels Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie zu bestimmen und mit denen von NADH zu vergleichen. Die Fluoreszenzlebensdauern von NADH und cNADH sind ebenfalls Gegenstand der experimentellen Untersuchung.

### 4.1 Absorption

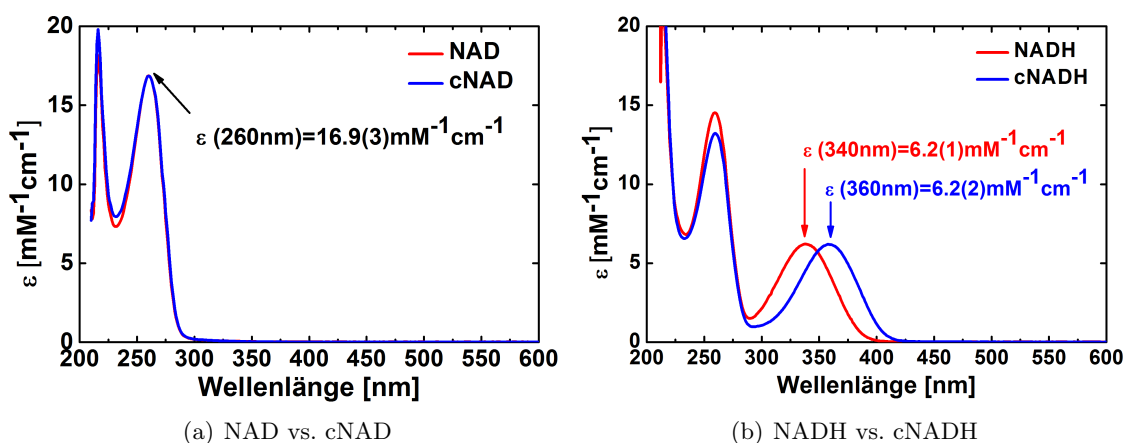


Abbildung 4.1: **Vergleich der Extinktionsspektren von NAD, cNAD, NADH und cNADH in Trispuffer pH 8,5:** (c)NAD hat ein Absorptionsmaximum bei 260nm, während (c)NADH noch ein zusätzliches Absorptionsmaximum aufweist. Dieses zweite Absorptionsmaximum ist bei cNADH im Vergleich zu NADH 20nm rot verschoben.

Das Absorptionsmaximum von cNAD und NAD stimmen miteinander überein und liegen beide bei 260(1)nm. Dieses Absorptionsmaximum ist auf die Absorptionseigenschaften des Adenins [79] und des Nikotinamids [80] zurückzuführen. Vergleicht man das Extinktionsspektrum von cNAD mit dem von NAD (vgl. 4.1 (a)), so sind die Extinktionskoeffizienten bei 260nm gleich und betragen  $\epsilon = 16,9(3)\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [81]. Wie erwartet, hat eine Temperaturänderung im Bereich zwischen 5°C und 40°C keinen Einfluss auf die Absorptionseigenschaften von cNAD und NAD (vgl. Abb. 4.2).

Wird NAD bzw. cNAD zu NADH und cNADH reduziert, so wird das Nikotinamid zu einem Dihydrornikotinamid reduziert. Mit der Reduktion geht eine Änderung des

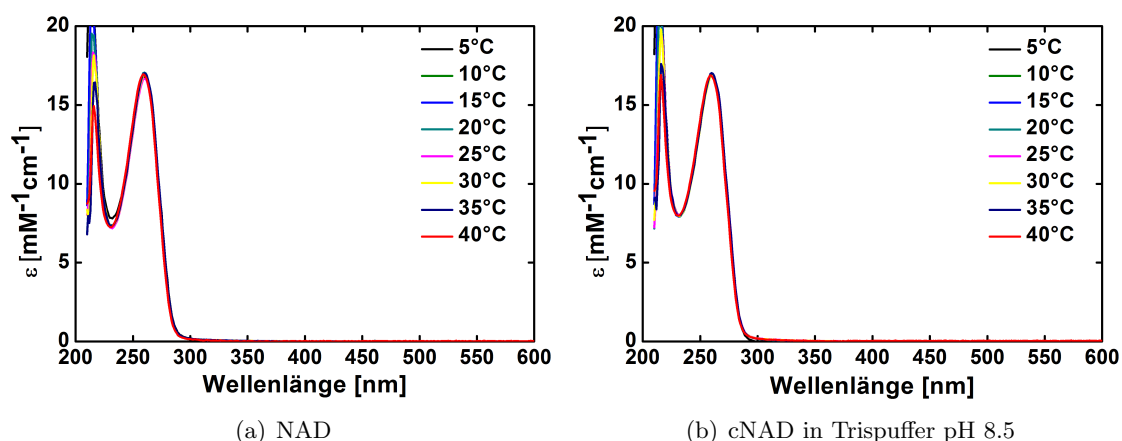


Abbildung 4.2: **Temperaturabhängigkeit des Extinktionsspektrums von (c)NAD in Trispuffer pH 8,5:** Die Absorptionseigenschaften von NAD und cNAD sind unabhängig von der Temperatur im Bereich zwischen 5°C und 40°C.

Absorptionsspektrums einher (vgl. 4.1 (b)). Der Peak bei 260nm nimmt ab, während ein neues Absorptionsmaximum entsteht, welches auf die Absorptionseigenschaften des Dihydrornicotinamids zurückzuführen ist. Die Absorptionsbande des Dihydrornicotinamids bei NADH liegt bei 340(1)nm. Im Vergleich dazu ist die Absorptionsbande des Dihydrornicotinamids bei cNADH 20nm rot verschoben und liegt bei 360(1)nm (blaue Linie in Abb. 4.1 (b)).

Der Extinktionskoeffizient des Dihydrornicotinamids von cNADH beträgt  $\epsilon = 6,2(2)\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und stimmt mit dem von NADH überein [82].

Analog zu (c)NAD zeigt Abbildung 4.3, dass die Absorptionseigenschaften von NADH und cNADH erwartungsgemäß im Bereich von 5°C bis 40°C unabhängig von der Temperatur sind.

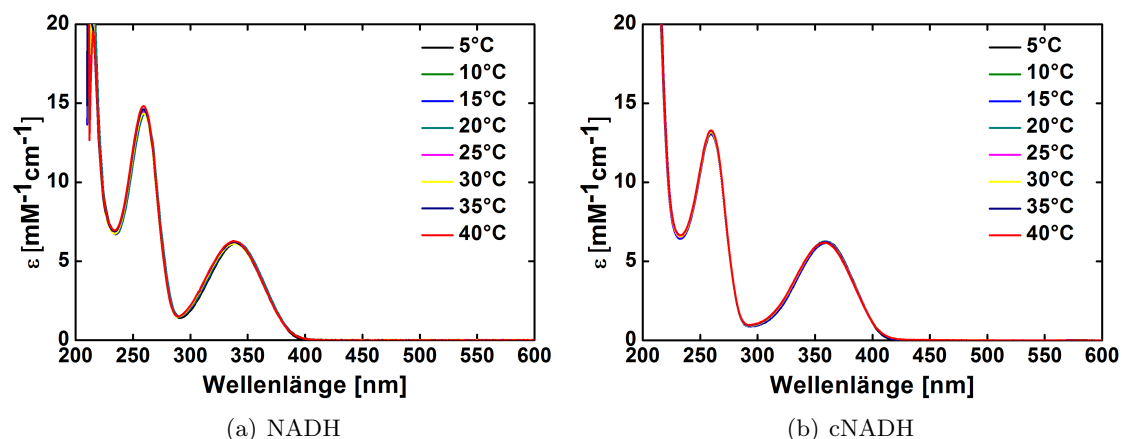
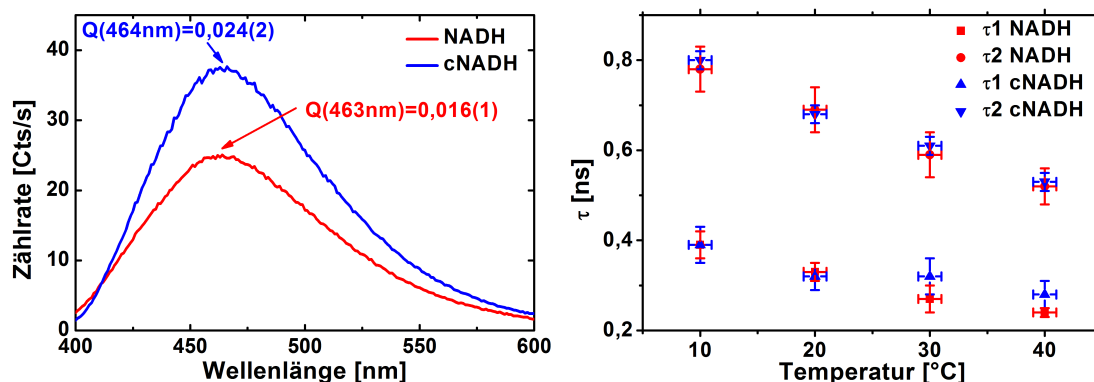


Abbildung 4.3: **Temperaturabhängigkeit des Extinktionsspektrums von (c)NADH in Trispuffer pH 8,5:** Die Absorptionseigenschaften von NADH und cNADH sind unabhängig von der Temperatur im Bereich zwischen 5°C und 40°C.

## 4.2 Fluoreszenz

Vergleicht man das Emissionsspektrum von cNADH anhand von Abbildung 4.4 (a) mit dem von NADH, so stimmt die Lage der Emissionsmaxima innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein. Das Emissionsmaximum von NADH liegt bei 463(2)nm und für cNADH bei 464(2)nm. Allerdings ist die Quantenausbeute von cNADH größer als die von NADH. Bei 20°C beträgt sie für cNADH  $Q = 0,024(2)$  und für NADH  $Q = 0,016(1)$ .



(a) Emission NADH versus cNADH

(b) Fluoreszenzlebensdauern von NADH und cNADH als Funktion der Temperatur

Abbildung 4.4: **Fluoreszenzeigenschaften (c)NADH:** Die Lage des Fluoreszenzmaximums von NADH und cNADH stimmen miteinander überein. NADH und cNADH haben beide 2 Fluoreszenzlebensdauern, welche ebenfalls miteinander übereinstimmen.

Betrachtet man nun die Fluoreszenzlebensdauer, so folgt der Zerfall des angeregten Zustandes einem biexponentiellen Verlauf, d.h. NADH und cNADH haben je zwei Fluoreszenzlebensdauern, die innerhalb der Fehlergrenzen jeweils miteinander übereinstimmen (Abb. 4.4 (b)). Abbildung 4.5 zeigt exemplarisch den Zerfall des angeregten Zustandes von NADH in Trispuffer bei pH 8,5 und 20°C. Dargestellt sind sowohl der Rohdatensatz, die Instrumentenantwort, als auch der dazugehörige Fit, sowie die Residuen und die Autokorrelation der Residuen. Die Güte des Fits wurde, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, über das  $\chi_r^2$ , die Residuen und die Autokorrelation der Residuen bestimmt.

Ein monoexponentieller Fit, hätte zu einer signifikanten Verschlechterung des reduzierten  $\chi_r^2$  geführt. Darüber hinaus zeigen die Residuen und die Autokorrelation der Residuen bei einem biexponentiellen Fit keinen Trend, während dies bei einem monoexponentiellen Fit der Fall ist (vgl. Abb. 2.9). Zusätzlich wurden dieselben Rohdaten auch mit Hilfe der Maximum Entropy Methode (MEM) ausgewertet (vgl. Kapitel 2.3.3) Auch die Auswertung mittels MEM bestätigten die Existenz von zwei Lebensdauern:  $\tau_1 = 0,22(3)$ ns und  $\tau_2 = 0,64(7)$ ns (vgl. Abb. 2.10). Im Gegensatz zu den Absorptionseigenschaften sind die Fluoreszenzeigenschaften von NADH und cNADH stark temperaturabhängig. Abbildung 4.7 (a) vergleicht die Quantenausbeute von cNADH und NADH in Abhängigkeit von

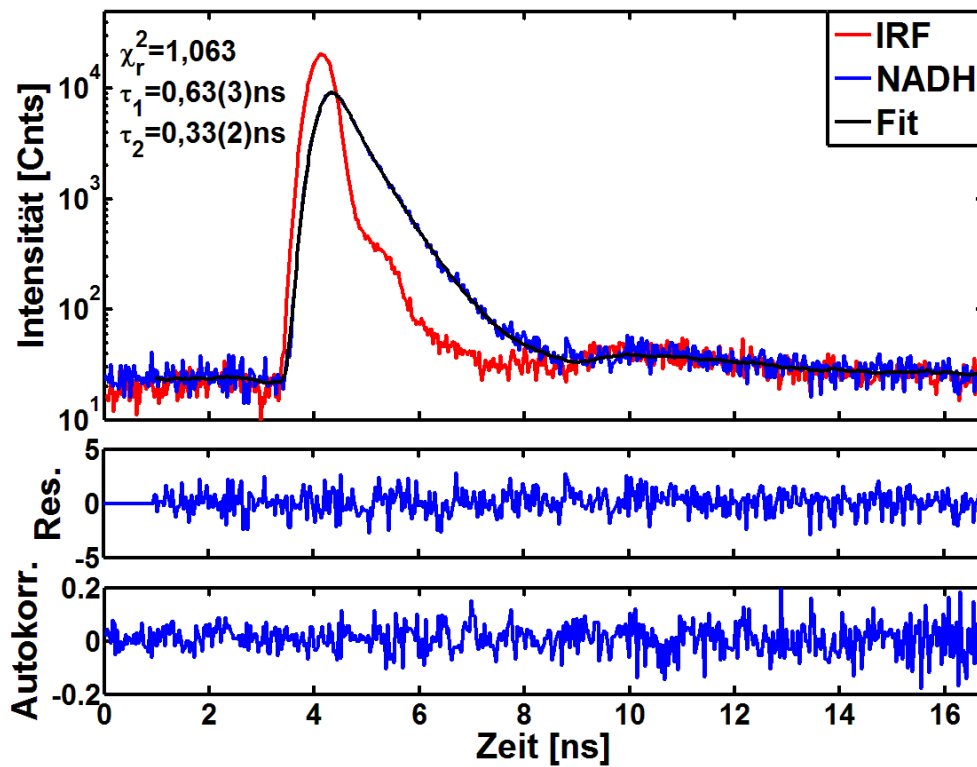


Abbildung 4.5: **Fluoreszenzabfall NADH in Tris pH 8,5 20°C**: Fitparameter: Lebensdauern:  $\tau_1 = 0,36(3)\text{ns}$ ;  $\tau_2 = 0,69(2)\text{ns}$ ; Amplituden:  $A_1=11440(1640)$ ;  $A_2=14000(1500)$ ; Hintergrund:  $Bkr\text{-Zerfall} = 20(1)\text{Cts}$ ;  $Bkr\text{-IRF} = 24(1)\text{Cts}$ ; Verschiebung IRF und Zerfall:  $Shift = 0.091(6)\text{ns}$

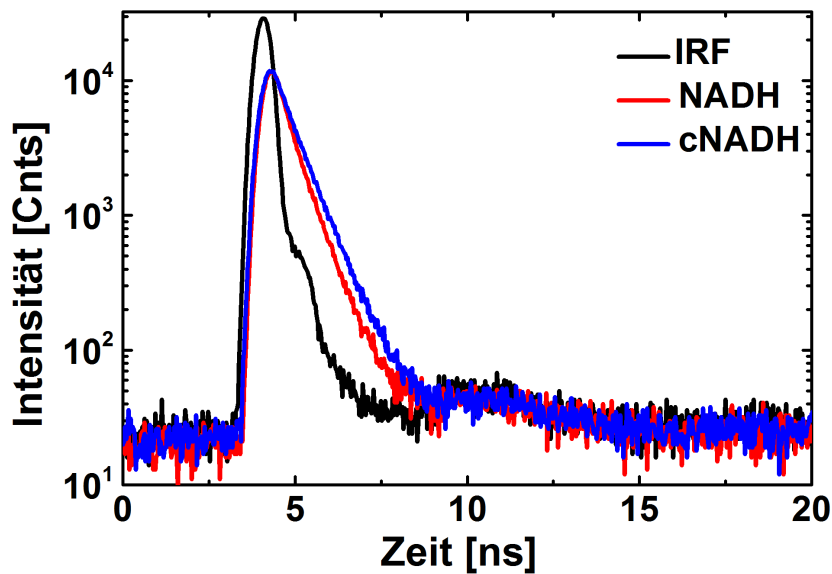
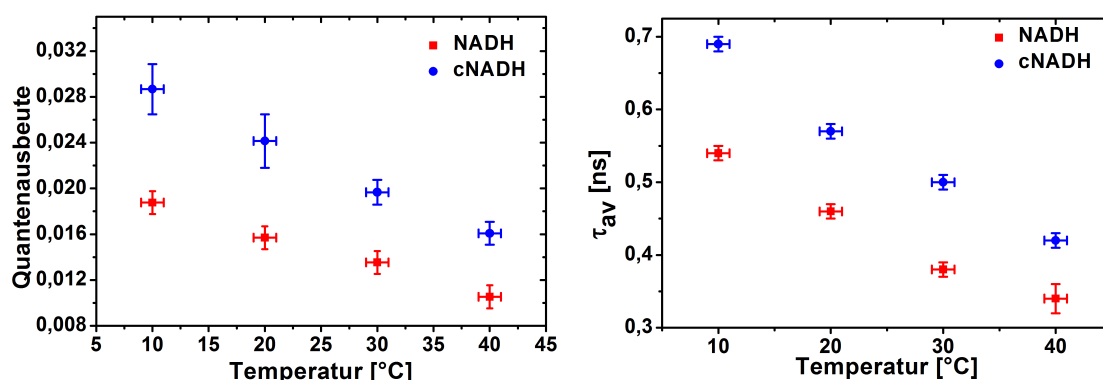


Abbildung 4.6: Vergleich Fluoreszenzabklingkurve NADH vs. cNADH in Tris pH 8,5 20°C



(a) Quantenausbeute von NADH und cNADH als Funktion der Temperatur

(b) Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von NADH und cNADH als Funktion der Temperatur

Abbildung 4.7: **Quantenausbeute und Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von(c)NADH versus der Temperatur:** Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer und die Quantenausbeute verhalten sich gleich mit Änderungen der Temperatur. Folglich unterliegen NADH und cNADH einem dynamischen Fluoreszenzlöschprozess. (Quelle: in Anlehnung an Ref. [81])

Temperaturänderungen im Bereich von 5°C bis 40°C. Die Quantenausbeute von cNADH ist grundsätzlich höher als die Quantenausbeute von NADH. Gleichzeitig steigt die Quantenausbeute von (c)NADH an, wenn die Temperatur sinkt.

Betrachten wir nun die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauern: Die mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer (vgl. Abb. 4.7 (b)), sowie auch die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern (vgl. Abb. 4.4 (a)) von cNADH und NADH, werden mit zunehmender Temperatur kürzer. Gleichzeitig ist die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von cNADH höher als von NADH (vgl. Abb. 4.7 (b)). Dies bedeutet, dass der Intensitätsanteil der längeren Fluoreszenzlebensdauer an der Gesamtintensität bei cNADH mit 69(3)% höher ist, als bei NADH (45%). Dadurch lässt sich auch der Unterschied in der Fluoreszenzabklingkurve von cNADH im Gegensatz zu NADH erklären, trotz der gleichen einzelnen Fluoreszenzlebensdauern (vgl. Abb. 4.6).

Vergleicht man nun das Verhalten der Quantenausbeute mit der Temperatur (Abb. 4.7 (a)) mit dem der mittleren intensitätsgewichteten Fluoreszenzlebensdauer (Abb. 4.7 (b)), so erkennt man, dass sich beide gleich verhalten. Sowohl die Quantenausbeute, als auch die mittlere Fluoreszenzlebensdauer steigen für cNADH um ungefähr einen Faktor 1,7(1) an und für NADH um einen Faktor 1,2(1), wenn die Temperatur von 40°C auf 10°C reduziert wird. Für NADH bestätigt dies Ergebnisse von Scott et al., denen zu Folge die Fluoreszenz von NADH einem dynamischen Fluoreszenzlöschprozess unterliegt [19]. Mit steigender Temperatur kommt es zu mehr Stößen zwischen (c)NADH mit den umgebenden Molekülen. Der Löschprozess wird effizienter und die Quantenausbeute sowie die Lebensdauer nehmen ab. Anhand der Tatsache, dass sich die Quantenausbeute und die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von NADH und cNADH gleich mit der Temperatur verhalten, könnte man spekulieren, dass cNADH den selben Fluoreszenzlöschprozessen

unterliegt, wie NADH. Auf der anderen Seite ist die Quantenausbeute von cNADH höher als von NADH, was eher als Indiz gegen diese Spekulation gewertet werden kann. Im folgenden Kapitel soll der Ursache für die Existenz der beiden Lebensdauern auf den Grund gegangen werden.



## 5 Modelle zur Erklärung der 2 Fluoreszenzlebensdauern von freiem (c)NADH

In Kapitel 4 wurde gezeigt, dass der Zerfall des angeregten Zustandes von NADH und cNADH durch eine biexponentielle Funktion beschrieben werden muss, d.h. dass NADH und cNADH zwei Fluoreszenzlebensdauern haben, die jeweils miteinander übereinstimmen. Darüber hinaus wissen wir, dass NADH und cNADH einem dynamischen Fluoreszenzlöschprozess unterliegen, d.h. die Quantenausbeute und die Fluoreszenzlebensdauern verhalten sich gleich mit der Temperaturänderung (Abb. 4.7).

Im folgenden Kapitel soll die Frage nach dem Ursprung der beiden Fluoreszenzlebensdauern behandelt werden. Zu Beginn soll dabei die Frage beantwortet werden, wie ein einfaches Modell zur Erklärung zweier Lebensdauern aussehen müsste. Ein mögliches Modell ist in Abbildung 5.1 dargestellt: Nach Anregung aus dem Grundzustand

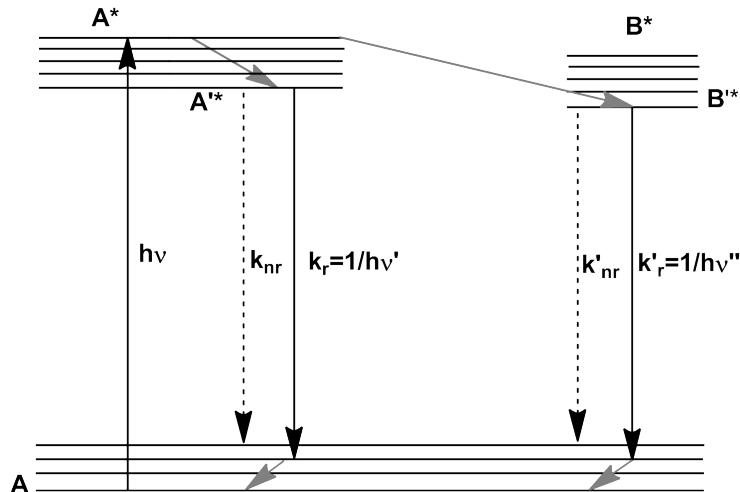


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung eines Modells zur Erklärung zweier Lebensdauern.

(A) in den angeregten Zustand  $A^*$  relaxiert der angeregte Zustand in zwei Zustände ( $A'^*$  und  $B'^*$ ).  $A'^*$  und  $B'^*$  emittieren mit der Rate  $k_r = 1/\tau_1 = 1/h\nu'$  und  $k'_r = 1/\tau_2 = 1/h\nu''$ .  $k_{nr}$  und  $k'_{nr}$  sind die Raten der strahlungslosen Übergänge von  $A'^*$  und  $B'^*$  in den Grundzustand. Stellt man die Differentialgleichung eines solchen Systems auf und löst diese z.B. für die Randbedingung, dass die beiden Zustände  $A'^*$  und  $B'^*$  zum Zeitpunkt  $t=0$  gleich stark bevölkert sind ( $[A'^*(0)]=[B'^*(0)]=A_0$ ) und unter der Annahme von verdünnten Lösungen, d.h. die Fluoreszenzintensität  $I$  ist proportional zur Summe der Population der beiden angeregten Zustände  $I \propto A'^* + B'^*$ , so erhält man einen biexponentiellen Zerfall der Fluoreszenzintensität

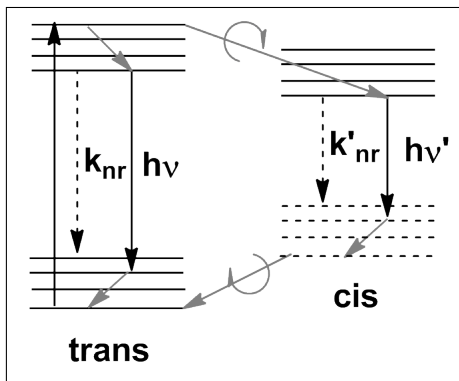
$$\begin{pmatrix} \dot{A}'^* \\ \dot{B}'^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(k_r + k_{nr}) & 0 \\ 0 & -(k'_r + k'_{nr}) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A'^* \\ B'^* \end{pmatrix} \quad (5.1)$$

$$A'^* = A_0 e^{-(k_r + k_{nr})t} \quad (5.2)$$

$$B'^* = A_0 e^{-(k'_r + k'_{nr})t} \quad (5.3)$$

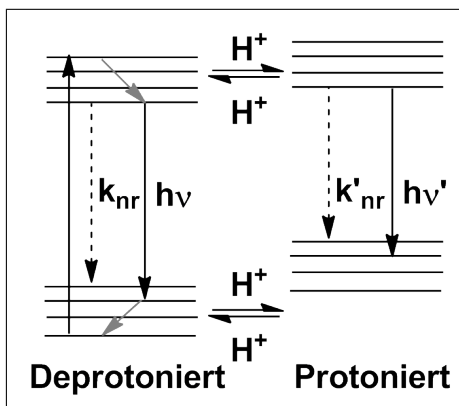
$$I \propto A'^* + B'^* = A_0 (e^{-t/\tau_1} + e^{-t/\tau_2}) \quad (5.4)$$

mit  $\tau_1 = 1/(k_r + k_{nr})$  und  $\tau_2 = 1/(k'_r + k'_{nr})$ . Entscheidend für die zwei Lebensdauern in diesem Modell ist die Existenz eines zweiten angeregten Zustandes B'\*. Die Frage, die sich nun stellt ist: Was könnte der Zustand B'\* sein? Diese Frage zu beantworten ist Ziel des folgenden Kapitels. Es wurden verschiedene Modelle aufgestellt die hier zur Übersicht kurz erläutert und in den folgenden Abschnitten tiefergehend erklärt und überprüft werden sollen:



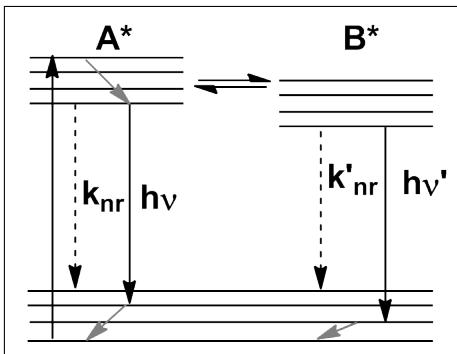
### 1. Isomeriemodell

- 2 Isomere: cisoid und transoid.
- Im Grundzustand transoid.
- B\* entspricht cisoider Isomerie.
- Cisoid und transoid Form haben unterschiedliche Lebensdauern.
- Lebensdauer cisoid vs. transoid.



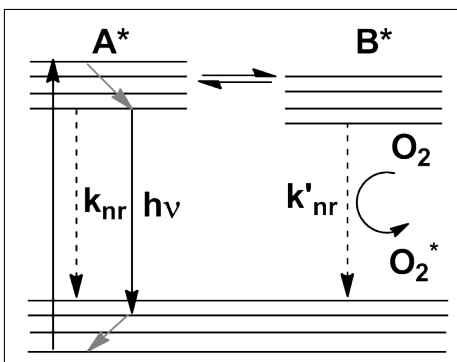
### 2. Protonierung/Deprotonierung

- Protonierte und deprotonierte Form.
- B\* ist protonierte Form des Moleküls.
- Überprüfung pH-Abhängigkeit.
- Überprüfung Messung in aprotischem Lösungsmittel.



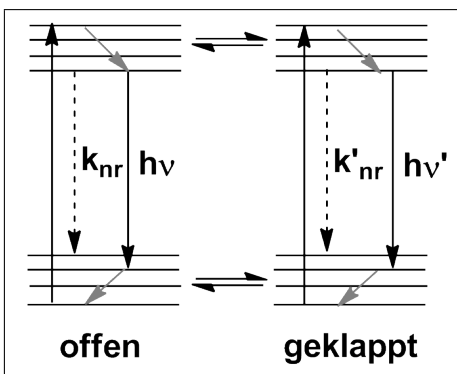
### 3. Spektralmodell

- 2 angeregte Zustände A\* und B\*.
- B\* unterscheidet sich energetisch von A\*.
- $\nu \gg \nu'$
- Spektrale Abhängigkeit der Lebensdauer am blauen und roten Ende des Emissionsspektrums untersuchen.



### 1. Gleichgewichtsmodell

- 2 Zustände A\* und B\*.
- Der Übergang B\* in den Grundzustand ist strahlungslos.
- Durch Stöße von z.B. O<sub>2</sub> mit B\* kommt es zur strahlungslosen Abregung.
- Lebensdauer in sauerstofffreiem vs. sauerstoffhaltigem Puffer.



### 5. Konformationsmodell

- Geklappte und offene Konformation.
- B\* ist geklappte Konformation.
- Überprüfung offene Konformation: (c)NMNH
- Überprüfung geklappte Konformation: Anregung Adenin + Energietransfer.

### 5.1 Isomeriemodell

Eine Möglichkeit zur Erklärung von zwei Lebensdauern wäre die Existenz von zwei isomeren Zuständen. Der Dihydronikotinamid-Rest kann in zwei isomeren Formen als cis-Dihydronikotinamid und als trans-Dihydronikotinamid vorliegen. In wässriger Lösung liegt – NMR Studien zu Folge – das Dihydronikotinamid im Grundzustand in der transoiden Form vor [31]. Abbildung 5.2 illustriert diesen Prozess:

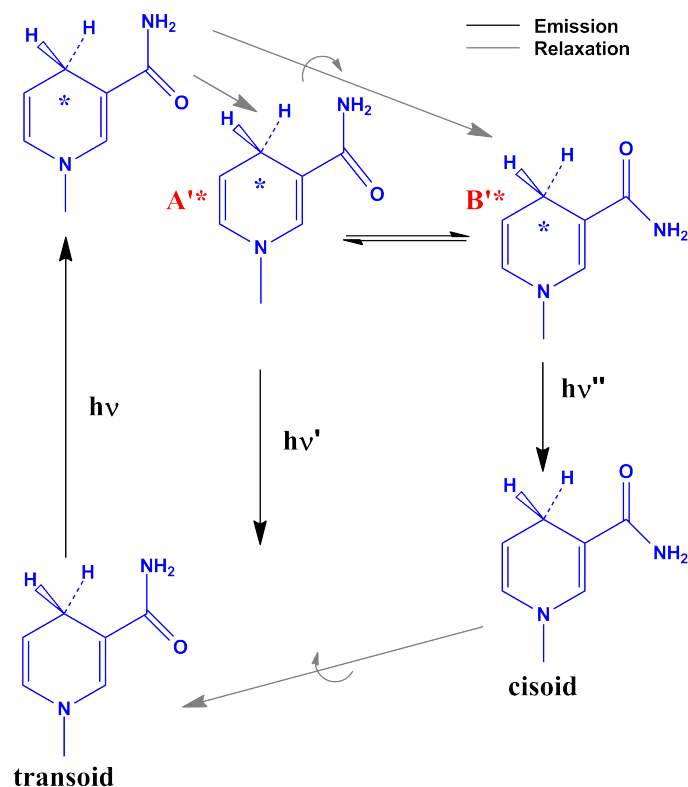


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Isomeriemodells zur Erklärung der zwei Fluoreszenzlebensdauern

Das Dihydronikotinamid in der transoiden Form wird durch die Absorption eines Photons der Energie  $E = h\nu$  angeregt. Nach Relaxation (grauer Pfeil) in das niedrigste Vibrationsniveau des angeregten Zustandes könnte das Dihydronikotinamid in transoider oder in cisoider Form vorliegen. Die transoide Form geht unter Emission eines Photons der Energie  $E = h\nu'$  in den transoiden Grundzustand über. Die cisoiden Form geht ebenfalls unter Emission eines Photons der Energie  $E = h\nu''$  sowie unter Drehung der Amidgruppe in den transoiden Grundzustand über.

Das Modell kann überprüft werden, indem man die Fluoreszenzlebensdauer von Dihydronikotinamid (hier abgekürzt durch „Dihydro“) mit einer analogen Modellverbindung (MV) vergleicht, welche nur als cisoiden Verbindung vorkommt. Die chemischen Strukturen der beiden Verbindungen sind im Grundlagen und Methoden Teil (vgl. Kapitel 2.1) dargestellt.

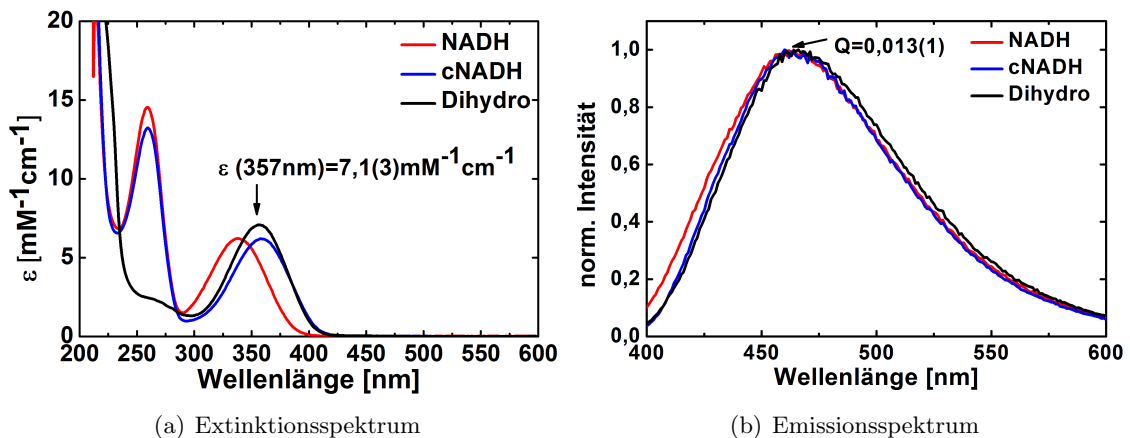


Abbildung 5.3: **Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum Dihydro vs. (c)NADH:** Das Absorptionsmaximum von Dihydro liegt bei 357(1)nm und hat erwartungsgemäß nur ein Maximum. Die Form des Emissionsspektrums stimmt bei Dihydro mit dem von cNADH überein

Sollte das Modell richtig sein, so müsste das Dihydrinikotinamid zwei Lebensdauern aufweisen, welche identisch mit den Lebensdauern von (c)NADH sind. Der Zerfall des angeregten Zustandes der cisoiden Modellverbindung sollte dagegen durch eine monoexponentielle Fitfunktion beschreibbar sein, dessen Lebensdauer einer der beiden Lebensdauern von (c)NADH entspricht.

### 5.1.1 Dihydrinikotinamid

Abbildung 5.3 vergleicht das Extinktionsspektrum und das Fluoreszenzspektrum von Dihydro mit denen von (c)NADH. Abbildung 5.3 (a) zeigt, dass das Absorptionsmaximum von Dihydro bei 357(1)nm liegt mit einem im Vergleich zu (c)NADH leicht erhöhten Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 7,0(1)\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Erwartungsgemäß hat das Dihydro keine Absorptionsbande bei 260nm, da das Molekül keinen Adenin-Rest hat.

In Abbildung 5.3 (b) ist die auf das jeweilige Emissionsmaximum normierte Fluoreszenzintensität gegen die Wellenlänge aufgetragen. Das Emissionsspektrum von Dihydro stimmt mit dem von cNADH überein. Das Emissionsspektrum von NADH zeigt im Vergleich zu dem von cNADH und Dihydro eine leichte Abweichung im Wellenlängenbereich zwischen 400-450nm. Die Lage des Emissionsmaximums von Dihydro stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit der von (c)NADH überein und liegt bei 466(3)nm. Die Quantenausbeute des Dihydro ist mit  $Q = 0,013(1)$  niedriger als die Quantenausbeute von NADH und cNADH.

Betrachten wir als nächstes die Fluoreszenzlebensdauer des Dihydro: Die Fluoreszenzabklingkurve (Abbildung 5.4) kann überraschenderweise durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden. Die Fluoreszenzlebensdauer von Dihydro beträgt  $\tau = 0,037(2)\text{ns}$ . Die zusätzliche Auswertung mit Hilfe der Maximum Entropie Methode bestätigte die Existenz von nur einer Lebensdauer ( $\tau = 0,034(4)\text{ns}$ ) für

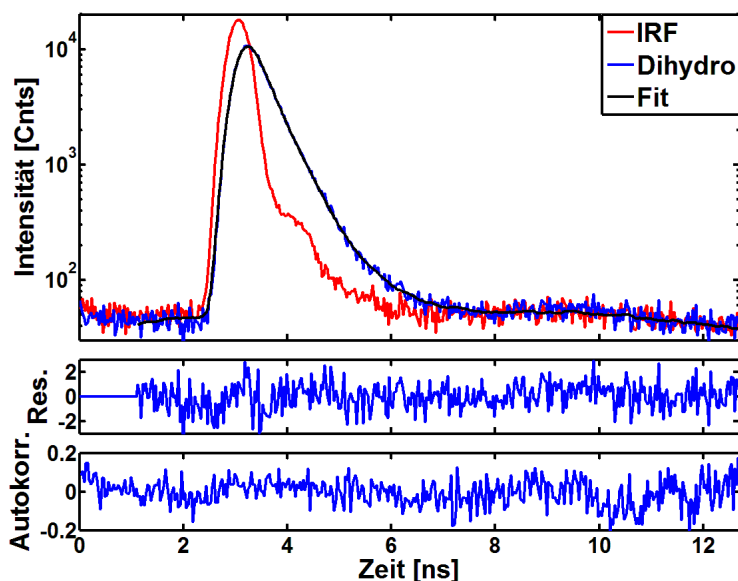


Abbildung 5.4: **Fluoreszenzabklingkurve von Dichlorbenzyl Dihydro**: Dihydro hat nur eine Fluoreszenzlebensdauer. Fitparameter:  $\tau = 0,37(2)\text{ns}$ ;  $A = 27800(300)\text{Cnts}$ ;  $Bkgr_{Dec} = 41(1)\text{Cnts}$ ;  $Bkgr_{Dec} = 44(1)\text{Cnts}$ ;  $Shift_{IRF} = 0,021(1)\text{ns}$

Dihydro. Dieser Sachverhalt an sich deutet schon darauf hin, dass die Substitution des Adenosindiphosphatrestes durch den Dichlorbenzylrest einen entscheidenden Einfluss hat. Daher kommt dem Vergleich von Dihydro mit einem möglichst ähnlichem aber cisoidem System, d.h. der cisoiden Modellverbindung MV (Abb. 2.4), eine wesentliche Bedeutung zu.

### 5.1.2 Cisoide Modellverbindung

Die cisoide Modellverbindung (MV) sollte nach dem Isomeriemodell nur eine Lebensdauer haben, die einer der beiden Lebensdauern von (c)NADH entsprechen sollte.

Abbildung 5.5 vergleicht das, auf das jeweilige Absorbanzmaximum normierte, Absorbanzspektrum und das Emissionsspektrum von MV mit Dihydro. Das Absorbanzmaximum von MV liegt bei  $337(1)\text{nm}$ , ist also im Vergleich zum Absorbanzmaximum von Dihydro  $20\text{nm}$  blau verschoben.

Abbildung 5.5 (b) zeigt, dass auf das jeweilige Emissionsmaximum normierte Emissionsspektrum von MV im Vergleich zu Dihydro. Sowohl die Lage des Emissionsmaximums bei  $428(4)\text{nm}$ , als auch die Form des Spektrums stimmen nicht mit dem von Dihydro und damit auch nicht mit dem von (c)NADH überein.

MV hat analog zu Dihydro nur eine Lebensdauer  $\tau = 0,40(1)\text{ns}$ , die innerhalb der Fehlergrenzen mit der von Dihydro, aber ebenfalls nicht mit einer der beiden Lebensdauern von (c)NADH übereinstimmt.

Das Isomeriemodell, sprich die Erklärung der zwei Fluoreszenzlebensdauern durch zwei verschiedene Isomere, wird folglich durch die Tatsache widerlegt, dass Dichlorbenzyl Dihydro nur eine und keine zwei Fluoreszenzlebensdauern

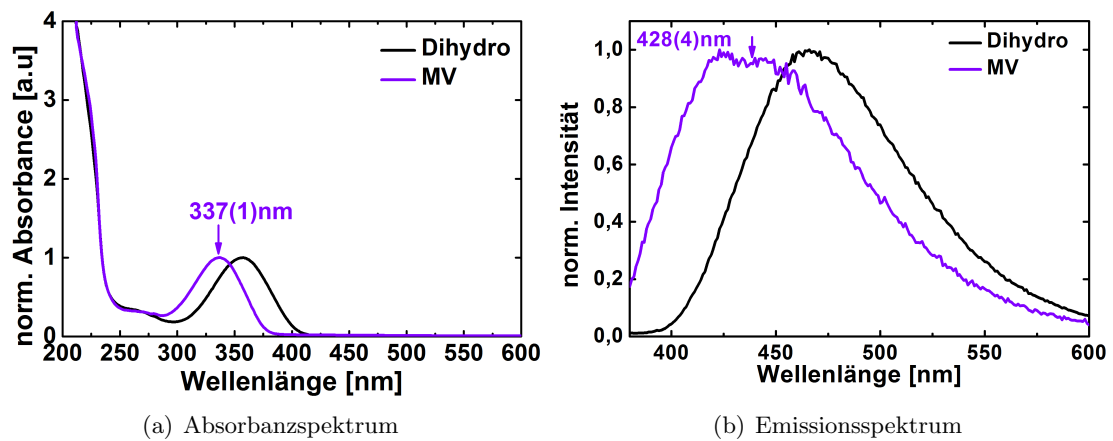


Abbildung 5.5: **Vergleich normiertes Absorbanz- und Emissionsspektrum MV vs. Dihydro:** Das Absorptionsmaximum der cisoiden Modellverbindung liegt bei 337(1)nm. Weder die Lage noch die Form des Emissionsspektrums stimmen mit dem von Dihydro bzw. (c)NADH überein.

aufweist. Der Widerspruch erhärtet sich zudem durch den Fakt, dass die eine Lebensdauer der cisoiden Modellverbindung nicht mit einer der Lebensdauern von (c)NADH, dafür aber innerhalb der Fehlergrenzen mit der von Dihydro übereinstimmt. Dies bedeutet im Umkehrschluss, sollte es im angeregten Zustand zwei isomere Zustände geben, hätten diese zufällig im Rahmen der Messgenauigkeit dieselbe Fluoreszenzlebensdauer.

## 5.2 Protonierung und Deprotonierung

Ein protonierter und deprotonierter Zustand könnte ebenfalls die Existenz von zwei Zuständen und damit von zwei Fluoreszenzlebensdauern erklären. Abbildung 5.6 stellt schematisch ein mögliches Modell für diesen Prozess dar:

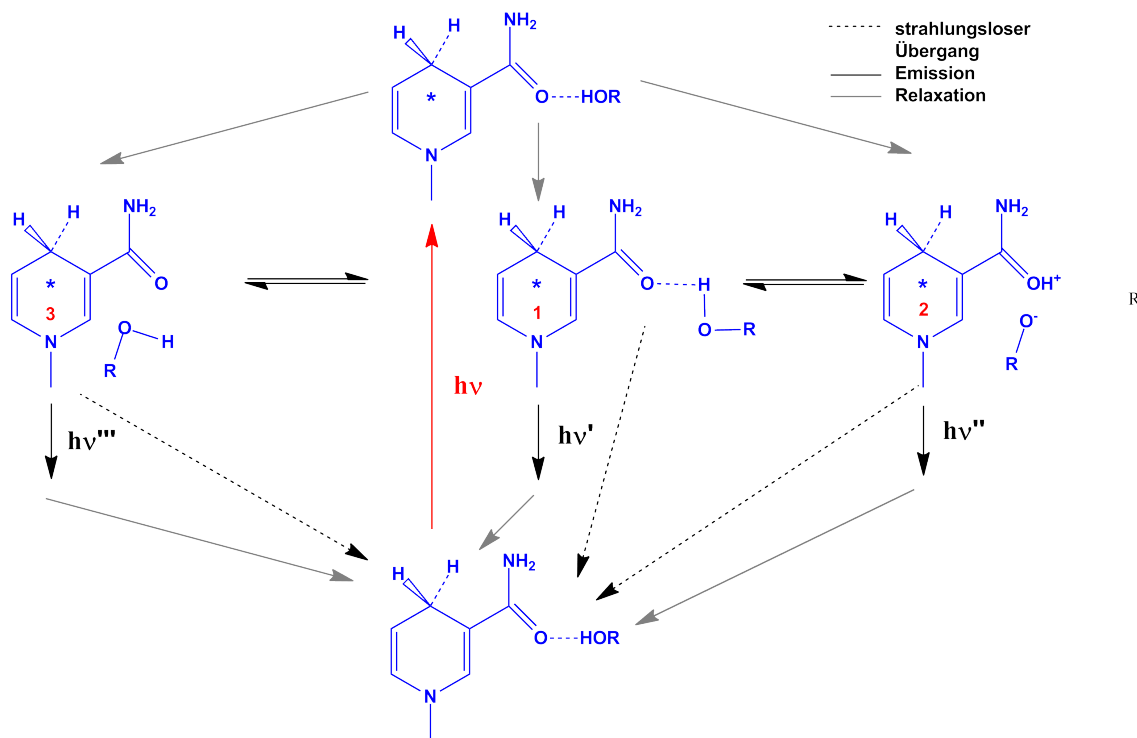


Abbildung 5.6: **Protonierung/Deprotonierung:** Modell zur Erklärung der zwei Fluoreszenzlebensdauern

In protischem Lösungsmittel bildet der Sauerstoff an der Carbonylgruppe der Amidgruppe des Dihydrornicotinamids eine Wasserstoffbrücke mit einem Wasserstoff in seiner Umgebung aus (z.B. mit  $\text{H}_2\text{O}$ , in diesem Fall würde der Rest „R“ für ein Wasserstoffmolekül stehen)[83]. Das Dihydrornicotinamid wird durch Absorption eines Photons der Energie  $E = h\nu$  angeregt (roter Pfeil). Das in ein höheres elektronisches Niveau angeregte Dihydrornicotinamid kann in drei mögliche Zustände relaxieren (grauer Pfeil). Die Wasserstoffbrücke kann erhalten bleiben (1), der Sauerstoff der Amidgruppe kann eine Bindung mit einem Wasserstoff in seiner Umgebung eingehen (2), oder die Wasserstoffbrücke bricht (3). Im Fall der erhaltenen Wasserstoffbrücke (Fall (1)) geht das Dihydrornicotinamid entweder unter Emission der Energie  $E = h\nu'$  oder durch einen strahlungslosen Übergang (gestrichelter Pfeil) in den elektronischen Grundzustand über und relaxiert dort in das niedrigste Vibrationsniveau. Die zusätzliche Möglichkeit eines strahlungslosen Übergangs soll der Tatsache Rechnung tragen, dass die Quantenausbeuten von NADH und cNADH sehr niedrig sind (vgl. Abb. 4.4). Im Fall (2), d.h. wenn der Sauerstoff eine Bindung mit dem Wasserstoff eingeht, sollte dieser angeregte Zustand entweder strahlungslos oder durch Emission eines Photons der Energie  $E = h\nu''$  in



den Grundzustand übergehen. Zustand 1 und 2 stehen miteinander im Gleichgewicht. Beim dritten Fall (Wasserstoffbrücke gebrochen) geht der angeregte Zustand ebenfalls entweder strahlungslos oder durch Emission eines Photons der Energie  $E = h\nu'''$  in den elektronischen Grundzustand über und steht ebenso mit dem Zustand 1 im Gleichgewicht. Die 2 Lebensdauern kommen durch die Gleichgewichtsreaktion zwischen den verschiedenen Zuständen zustande. Wenn es alle drei Zustände gäbe und die Gleichgewichtskonstanten in derselben Größenordnung wären, ließe sich mit diesem Modell bis zu 3 Lebensdauern beschreiben.

Das Protonierungsmodell kann durch drei Experimente überprüft werden:

1. Zuerst muss überprüft werden, ob Protonierung überhaupt einen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstanten der Gleichgewichtsreaktionen nehmen kann. Dies kann man mit Hilfe eines Isotopeneffektes nachweisen, d.h. durch das Ersetzen von Trispuffer mit deuterierten Trispuffer. Aufgrund der höheren Masse des Deuteriums gegenüber Wasser sollte es zu einer Verlangsamung der Fluoreszenzlöschprozesse (aufgrund einer Verkleinerung der Stoßrate) und damit zu einer Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer kommen.
2. Zustand 1 und Zustand 2 stehen darüber hinaus miteinander im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht ist abhängig vom pH-Wert. Folglich sollte sich eine Änderung des pH-Werts auf die Amplitude der beiden Lebensdauern auswirken.
3. Darüber hinaus gibt es bei der Messung in aprotischem (keine H-Donoren) Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO) nur den Zustand 3. (c)NADH sollte in aprotischem Lösungsmittel dementsprechend nur eine Fluoreszenzlebensdauer haben.

### 5.2.1 Isotopeneffekt

Zu Beginn muss der Nachweis geliefert werden, dass Protonierung überhaupt einen Einfluss auf die Lebensdauern haben kann. Dies geschieht, indem man die Lebensdauern von Trispuffer mit denen von deuteriertem Trispuffer vergleicht. Die Lebensdauer sollte sich demnach verlängern, da es – aufgrund der höheren Masse des Deuteriums gegenüber Wasser – zu einer Reduzierung der Stoßrate mit (c)NADH durch Deuterierung, kommen müsste.

Abbildung 5.7 (a) vergleicht die auf den Dihydrinikotinamid-Peak normierte Absorbanz versus der Wellenlänge von NADH und cNADH in deuteriertem Trispuffer. Die Maxima liegen bei 339(1)nm für NADH und 359(1)nm für cNADH. Die Absorbanzmaxima in D<sub>2</sub>O stimmen mit denen in H<sub>2</sub>O überein. Auch die Lage des Emissionsmaximums (464(2)nm) für (c)NADH stimmt in D<sub>2</sub>O mit dem in H<sub>2</sub>O überein (Abb. 5.7 (b)). Allerdings kommt es in deuteriertem Trispuffer jeweils zu einem Anstieg der Quantenausbeute um ungefähr einen Faktor 1,5, so dass die Quantenausbeute von NADH in D<sub>2</sub>O  $Q = 0,024(3)$  und von cNADH in D<sub>2</sub>O  $Q = 0,033(2)$  beträgt. In deuteriertem Puffer verlängern sich sowohl bei NADH als auch bei cNADH die einzelnen Lebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$  und die mittlere

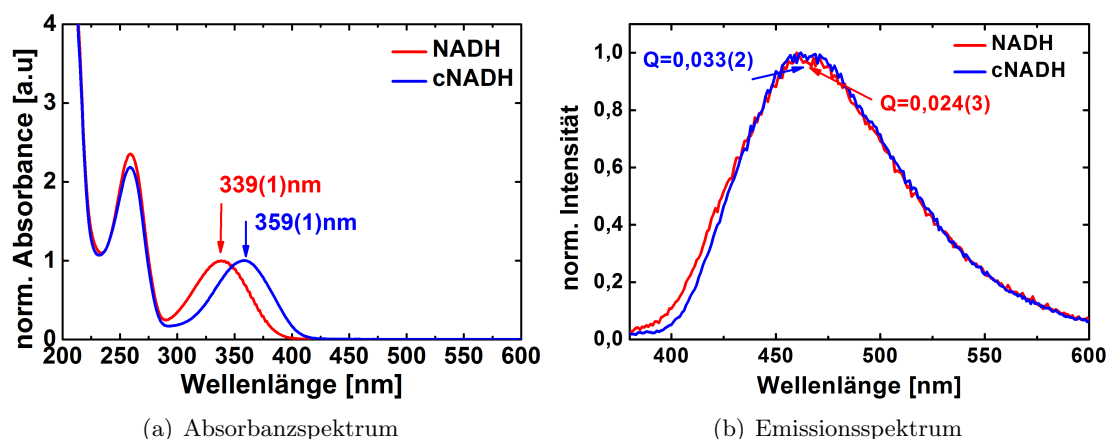


Abbildung 5.7: **Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum (c)NADH in D<sub>2</sub>O**: Die Lage der Absorptionsmaxima und des Emissionsmaximums von (c)NADH sind unabhängig von der Deuterierung. Allerdings steigt die Quantenausbeute ungefähr um den Faktor 1,5 an.

intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  um ungefähr den Faktor 1,5 (vgl. Abb. 5.8). Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer in D<sub>2</sub>O beträgt für NADH  $\tau_{av} = 0,73(2)$  ns und für cNADH  $\tau_{av} = 0,90(2)$  ns. Die Fluoreszenzlebensdauer ändert sich mit dem Wechsel des Lösungsmittels und verhält sich, wie auch bei H<sub>2</sub>O, analog zur Quantenausbeute. Der Fluoreszenzlöschprozess ist damit auch in deuteriertem Lösungsmittel dynamisch. Die Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer und der Anstieg der Quantenausbeute in deuteriertem Puffer im Vergleich zu nicht-deuteriertem Puffer belegt, dass Protonen/Deuteronen einen Einfluss auf die Fluoreszenzlöschprozesse, bzw. -Lebensdauern haben.

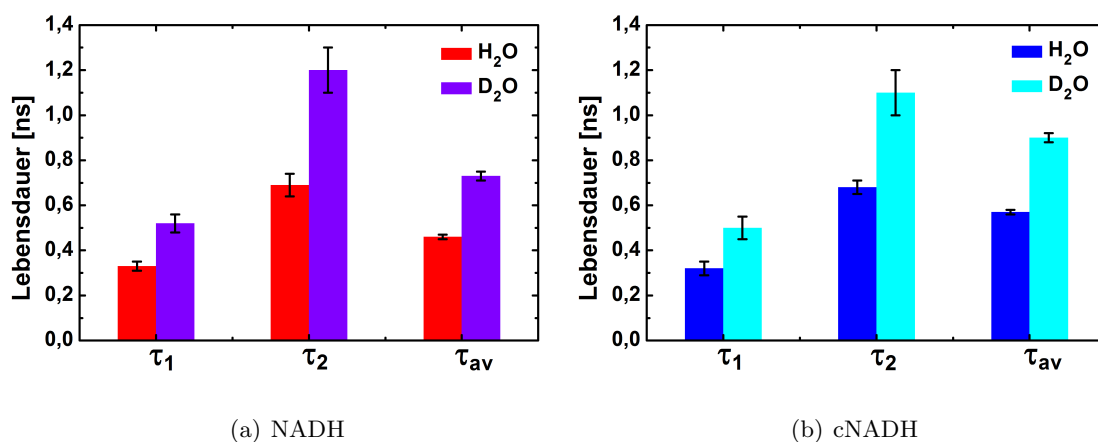


Abbildung 5.8: **Vergleich Lebensdauern D<sub>2</sub>O vs. H<sub>2</sub>O**: Die einzelnen sowie die mittlere Lebensdauer verlängert sich in D<sub>2</sub>O im Vergleich zu H<sub>2</sub>O um den Faktor 1,5.

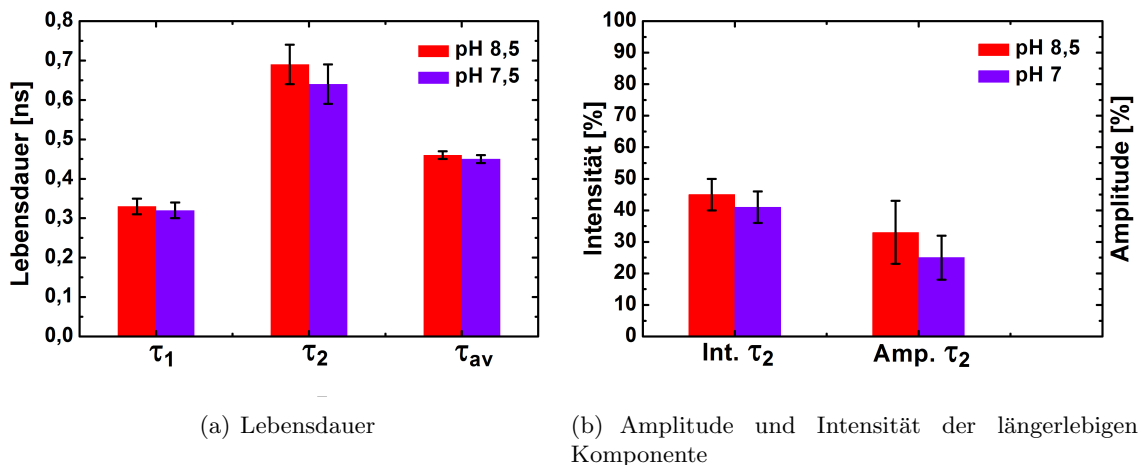


Abbildung 5.9: **Vergleich der Lebensdauern und Amplituden von NADH in Abhängigkeit des pH Wertes:** Der pH Wert hat weder Einfluss auf die Amplitude noch auf die Werte der einzelnen Fluoreszenzlebensdauern.

### 5.2.2 pH Abhängigkeit

Die rechte Seite des Modells in Abb. 5.6 lässt sich durch die pH-abhängige Verschiebung des Gleichgewichts überprüfen. Durch Änderung des pH-Wertes sollte sich der Anteil der Zustände 1 und 2 verschieben, d.h. die Amplituden und der Intensitätsanteil der einzelnen Lebensdauern sollten sich ändern.

Abbildung 5.9 (a) zeigt die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern von NADH und die mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit des pH-Wertes. Der Vergleich zwischen pH 7,5 und pH 8,5 zeigt, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf die Lebensdauern hat. Dies gilt auch für die Amplitude und den Anteil der Einzelintensitäten der einzelnen Lebensdauern an der Gesamtintensität. Da keine pH-Abhängigkeit der Lebensdauern, Amplituden und Intensitätsverteilungen festgestellt werden konnte, kann der rechte Teil des Protonierungsmodells nicht zur Erklärung der beiden Lebensdauern herangezogen werden.

Die Messungen konnten nicht mit cNADH durchgeführt werden, da cNADH in wässriger Lösung unterhalb eines pH-Wertes von pH 8,5 instabil ist.

### 5.2.3 Aprotisches Lösungsmittel

Die linke Seite des Modells (vgl. Abb. 5.6) kann durch Experimente in aprotischem Lösungsmittel überprüft werden. Da in aprotischem Lösungsmittel (d.h. das Lösungsmittel ist kein H-Donor) nur der Zustand 3 vorkommen sollte könnten zwei Dinge passieren: Wenn der Übergang strahlunglos verläuft, dürfte keine Fluoreszenz und keine Fluoreszenzlebensdauer beobachtbar sein. Im Falle der Emission eines Photons beim Übergang in den Grundzustand sollte maximal eine Lebensdauer detektiert werden können.

Abbildung 5.10 (a) vergleicht die auf die jeweiligen Maxima normierte Absorbanz von

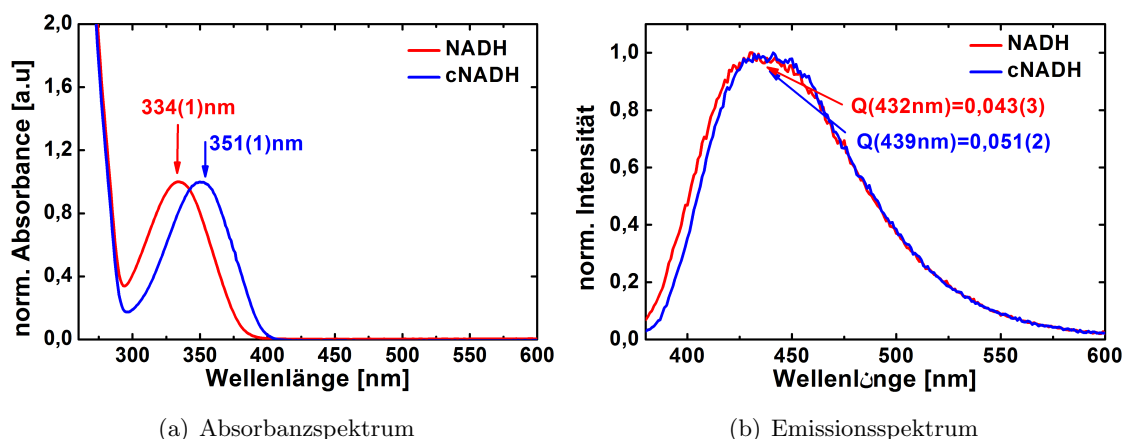


Abbildung 5.10: **Vergleich Absorbanzspektrum und Emissionsspektrum (c)NADH in DMSO:** Die Absorbanz des Dihydrornikotinamids von (c)NADH ist in DMSO im Vergleich zu H<sub>2</sub>O blau verschoben. Die Lage der Emissionsmaxima stimmt innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein. Das Emissionsspektrum in DMSO ist im Vergleich zu H<sub>2</sub>O blau verschoben.

NADH mit cNADH in DMSO. Das Absorbanzmaximum von NADH liegt bei 334(1)nm und ist im Vergleich zum Absorbanzmaximum in Wasser (340(1)nm) blau verschoben. Das Absorbanzmaximum von cNADH in DMSO liegt bei 351(1)nm und ist im Vergleich zum Absorbanzmaximum in H<sub>2</sub>O (360(1)nm) ebenfalls blau verschoben.

Die Lage der Emissionsmaxima von NADH und cNADH in DMSO stimmt innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein und liegen bei 432(5)nm für NADH und bei 439(5)nm für cNADH. Insgesamt ist die Lage des Emissionsmaximums in DMSO im Vergleich zu H<sub>2</sub>O ebenfalls blau verschoben. Der Stokesshift wird in DMSO im Vergleich zu H<sub>2</sub>O geringer. Die Quantenausbeuten steigen in DMSO im Vergleich zu H<sub>2</sub>O um ungefähr einen Faktor 2,4(2) an (vgl. Abbildung 5.10 (b)). Folglich scheinen Protonen am Fluoreszenzlöschprozess beteiligt zu sein, weswegen in aprotischem Lösungsmittel die Quantenausbeute ansteigt.

Abbildung 5.11 vergleicht die beiden einzelnen Lebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$  und die mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer von (c)NADH in DMSO mit denen in H<sub>2</sub>O. Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_1$  stimmt in DMSO mit der Lebensdauer  $\tau_2$  in H<sub>2</sub>O innerhalb der Fehlergrenzen überein. Sowohl die mittlere  $\tau_{av}$  als auch die zweite Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_2$  verlängern sich.

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von NADH beträgt  $\tau_{av} = 1,49(8)$ ns und für cNADH  $\tau_{av} = 1,40(3)$ ns. In DMSO stimmen, im Gegensatz zu den protischen Lösungsmitteln, die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von NADH und cNADH innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein. Die Auswertung über die Maximum Entropie Methode ergab ebenfalls zwei Fluoreszenzlebensdauern für NADH ( $\tau_1 = 0,31(3)$ ns und  $\tau_2 = 1,4(1)$ ns) und cNADH ( $\tau_1 = 0,31(3)$ ns und  $\tau_2 = 1,6(1)$ ns), welche innerhalb der Fehlergrenzen mit den Ergebnissen der Fits übereinstimmen. Die Quantenausbeuten von NADH und cNADH stimmen allerdings nicht miteinander überein. Quantenausbeute und

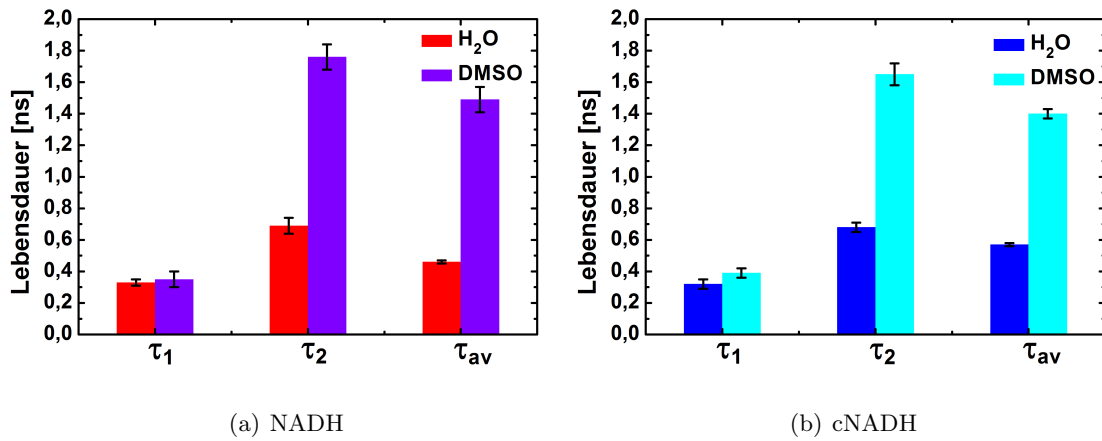


Abbildung 5.11: **Vergleich Lebensdauern DMSO vs. H<sub>2</sub>O:**  $\tau_1$  stimmt in DMSO innerhalb der Fehlergrenzen mit  $\tau_1$  in H<sub>2</sub>O überein. Die zweite Lebensdauer sowie die mittlere Lebensdauer verlängern sich in DMSO im Vergleich zu H<sub>2</sub>O

Fluoreszenzlebensdauer verhalten sich unterschiedlich.

Im Vergleich zu H<sub>2</sub>O zeigt das Emissionsspektrum in DMSO ein Plateau, so dass man den Eindruck gewinnen könnte, das Emissionsspektrum würde sich aus zwei Spektren zusammensetzen. Messungen der Fluoreszenzlebensdauern mit unterschiedlichen Emissionsfiltern im Detektionsstrahlengang (427/10, 513/17 und Langpassfilter ab 390nm) zeigten weder einen Unterschied in den Lebensdauern noch einen spektralen Einfluss der Amplituden- und Intensitätsanteile (Abb 5.12).

Zusammenfassend wurde auch das Protonierungs/Deprotonierungsmodell in der in Abbildung 5.6 vorgestellten Form widerlegt. Zwar konnten Experimente mit deuteriertem Puffer und in aprotischem Lösungsmittel zeigen, dass Protonierung/Deprotonierung einen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer haben, allerdings konnte keine

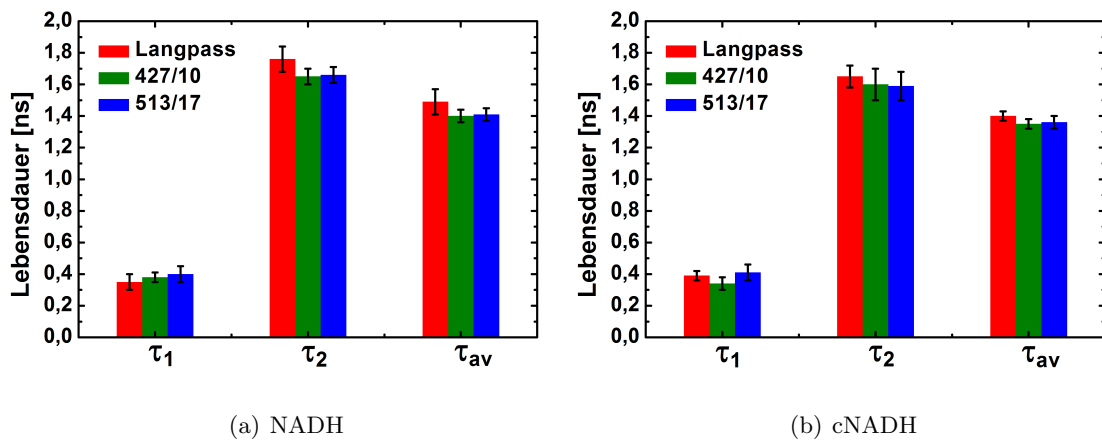


Abbildung 5.12: **Spektrale Abhängigkeit der Lebensdauern von (c)NADH in DMSO:** Sowohl die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , als auch die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von (c)NADH sind in DMSO spektral unabhängig.

pH Abhängigkeit der Amplituden, Intensitätsverteilung und der Lebensdauern nachgewiesen werden, wodurch der Protonierungsteil des Modells widerlegt wurde. Für die Richtigkeit des deprotonierten Teils des Modells hätte maximal eine Fluoreszenzlebensdauer in aprotischem Lösungsmittel detektiert werden dürfen. Die *zwei* Lebensdauern in DMSO konnten darüber hinaus auch durch die MEM-Auswertung verifiziert werden.

### 5.3 Spektralmodell

Nachdem gezeigt werden konnte, dass weder eine zweite isomere (cisoide) Konformation noch die protonierte Form des Moleküls die zwei Lebensdauern von NADH und cNADH erklären bzw. den Zustand B\* repräsentieren können, soll im Folgenden ein verallgemeinertes Modell der zwei angeregten Zustände betrachtet werden. Dies soll zusätzlich Informationen über die Energiedifferenzen zwischen den beiden angeregten Zuständen A\* und B\* im Vergleich zum Grundzustand liefern. In Abbildung 5.13 befindet

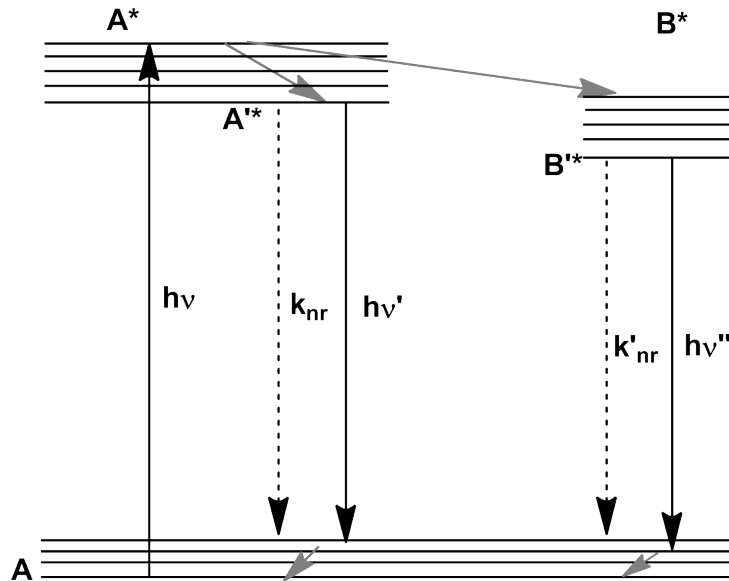


Abbildung 5.13: **Spektralmodell:** Schematische Erklärung der zwei Lebensdauern über 2 verschiedene Übergänge.

sich das Molekül zu Anfang im Grundzustand A und wird durch Absorption eines Photons der Energie  $E = h\nu$  angeregt (A\*). A\* relaxiert in das niedrigste Vibrationsniveau des angeregten Zustandes (grauer Pfeil), wobei dieser Zustand sowohl A'\* , als auch B'\* sein kann. A'\* geht durch Emission eines Photons der Energie  $E = h\nu'$  in ein höheres Vibrationsniveau des Grundzustandes A über. B'\* emittiert ein Photon der Energie  $E = h\nu''$  beim Übergang in den Grundzustand A.

In diesem Abschnitt soll der Fall betrachtet werden, dass  $\nu' \gg \nu$  ist, d.h. dass die Emissionsspektren von A'\* $\rightarrow$ A und B'\* $\rightarrow$ A nicht zufälligerweise gleich sind. Um diese These überprüfen zu können, müssen die Lebensdauern von (c)NADH in verschiedenen spektralen Bereichen gemessen werden. Dies wird erreicht, indem in den Detektionsstrahlengang des Fluoreszenzlebensdauerspektrometers unterschiedliche Detektionsfilter eingebaut werden:

1. Langpassfilter (ab 390nm)
2. 427/10 Bandpassfilter
3. 513/17 Bandpassfilter

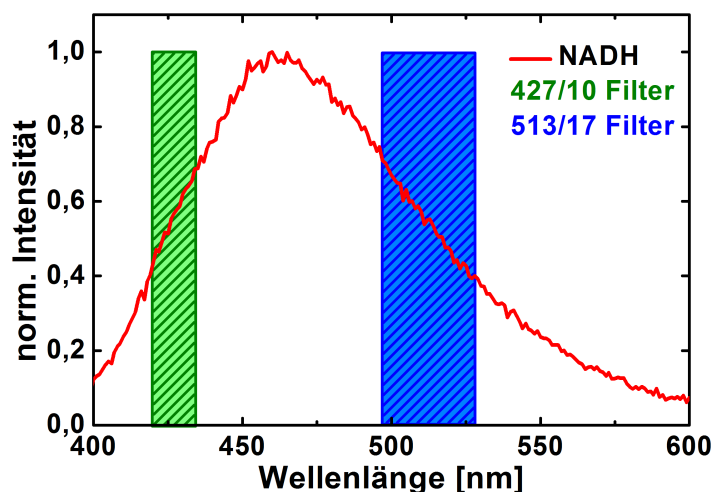


Abbildung 5.14: **Verwendete Filter zur Untersuchung der spektralen Abhängigkeit** der Fluoreszenzlebensdauer

Abbildung 5.14 zeigt, dass auf das Intensitätsmaximum von NADH normierte Emissionsspektrum von NADH in Abhängigkeit der Wellenlänge. Die Lage der verwendeten Bandpassfilter am rot verschobenen und am eher blauen Teil des Emissionsspektrums ist ebenfalls dargestellt.

Abbildung 5.15 zeigt die beiden einzelnen Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , sowie die mittlere Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit der verwendeten Detektionsfilter. Sowohl die einzelnen, als auch die mittleren Fluoreszenzlebensdauern stimmen innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein.

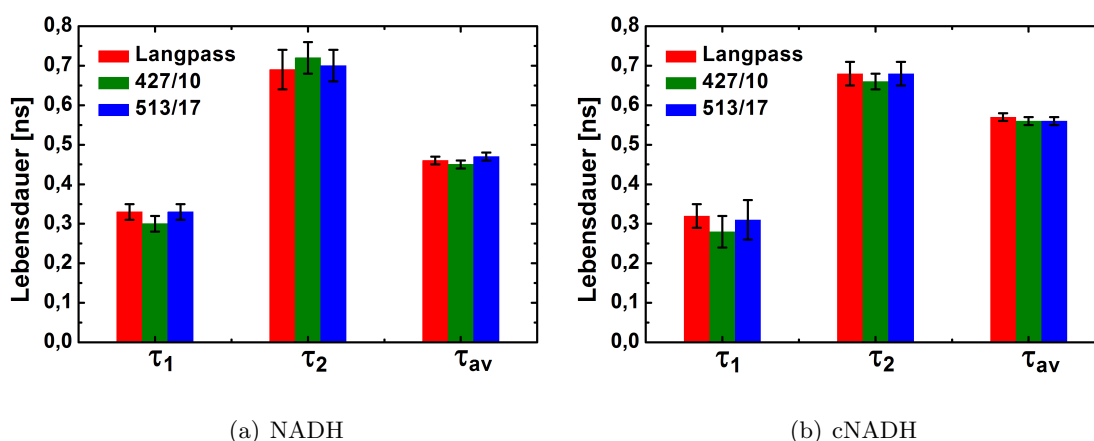


Abbildung 5.15: **Vergleich der spektralen Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH:** Sowohl die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , als auch die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von (c)NADH sind spektral unabhängig. Folglich handelt es sich bei (c)NADH nur um eine fluoreszierende Spezies.



Die Tatsache, dass die mittleren Fluoreszenzlebensdauern des Langpass Filters mit denen der schmalbandigen Filter übereinstimmen illustriert, dass die Amplituden und die Intensitätsverteilung der beiden Lebensdauern in diesem Spektralbereich unabhängig vom gewählten spektralen Detektionsbereich sind. Da die Lebensdauern spektral unabhängig sind, fluoresziert (c)NADH entweder nur aus einem Zustand, d.h. es gibt jeweils nur eine fluoreszierende Spezies, oder aber die Energieniveaus  $A^*$  und  $B^*$  unterscheiden sich nur sehr geringfügig.

Im Folgenden sollen Modelle überprüft werden, bei denen es entweder nur eine fluoreszierende Spezies gibt, oder aber die Lage der Energieniveaus  $A^*$  und  $B^*$  sich nur sehr geringfügig voneinander unterscheiden.

## 5.4 Gleichgewichtsmodell

In Abschnitt 5.3 konnte gezeigt werden, dass es entweder nur eine fluoreszierende Spezies gibt oder, dass die beiden angeregten Zustände sich energetisch nur geringfügig unterscheiden. Ersteres soll im folgenden Abschnitt in Form eines Gleichgewichtsmodells untersucht werden. Das Gleichgewichtsmodell ist in Abbildung 5.16 dargestellt. Nach

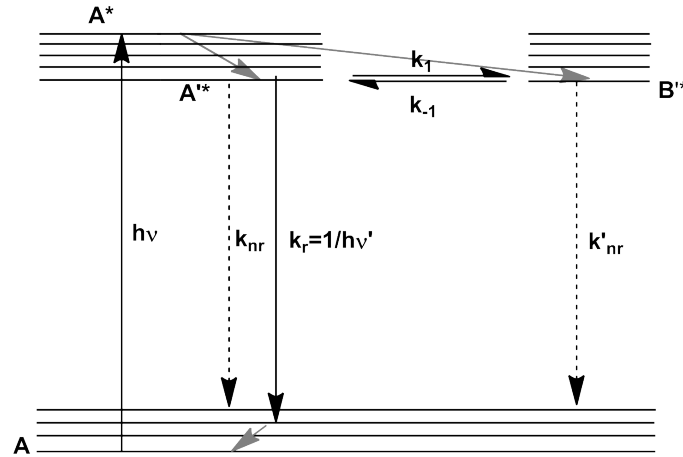


Abbildung 5.16: Schematische Darstellung des Gleichgewichtsmodells.

Anregung aus dem Grundzustand (A) in den angeregten Zustand  $A^*$  relaxiert der angeregte Zustand in zwei Zustände ( $A'^*$  und  $B'^*$ ), die miteinander im Gleichgewicht stehen. Nur einer der beiden Zustände emittiert mit der Rate  $k_r = 1/\tau = 1/h\nu'$ .  $k_{nr}$  und  $k'_{nr}$  sind die Raten der strahlungslosen Übergänge von  $A'^*$  und  $B'^*$  in den Grundzustand. Stellt man die Differentialgleichung eines solchen Systems auf und löst diese z.B. für die Randbedingung, dass die beiden Zustände  $A'^*$  und  $B'^*$  zum Zeitpunkt  $t=0$  gleich stark bevölkert sind ( $[A'^*(0)] = [B'^*(0)] = A_0$ ), so erhält man eine biexponentielle Funktion (vollständiger Ausdruck siehe Anhang), wobei die beiden Lebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$  von den fünf Gleichgewichtskonstanten  $k_1, k_{-1}, k_{nr}, k_r = 1/h\nu'$  und  $k'_{nr}$  abhängen.

$$\begin{pmatrix} \dot{A}'^* \\ \dot{B}'^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(k_r + k_{nr} + k_1) & k_{-1} \\ -(k'_{nr} + k_{-1}) & k_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A'^* \\ B'^* \end{pmatrix} \quad (5.5)$$

$$A'^* = (f e^{-t/\tau_1} + f e^{-t/\tau_2}) \frac{A_0}{2m} \quad (5.6)$$

$$I \propto A'^* = (f e^{-t/\tau_1} + f e^{-t/\tau_2}) \frac{A_0}{2m} \quad (5.7)$$

Die Fluoreszenzintensität kann in verdünnten Lösungen als proportional zur Konzentration der Moleküle im angeregten Zustand  $A'^*$  angesehen werden.

Mit dem Vorwissen aus Kapitel 4, dass NADH und cNADH dynamisch gelöscht werden, muss es sich auch beim strahlungslosen Übergang von  $B'^*$  in den Grundzustand A um einen dynamischen Fluoreszenzlöschprozess handeln.

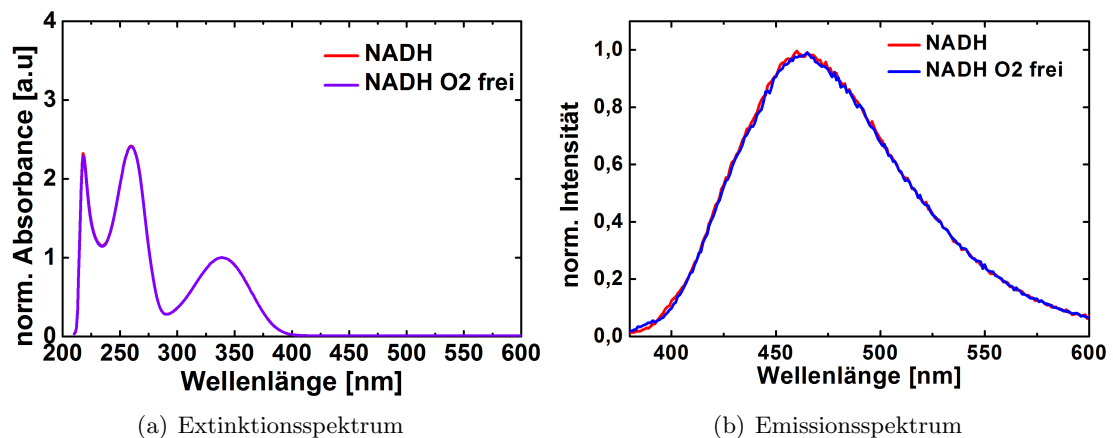


Abbildung 5.17: **Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum NADH in sauerstofffreiem und sauerstoffhaltigem Puffer:** Sauerstoff scheint weder einen signifikanten Einfluss auf das Absorptions-, noch auf das Emissionsspektrum zu haben.

In Zusammenhang mit dynamischen Fluoreszenzlöschprozessen, ist die Fluoreszenzlöschung durch Stöße z.B. mit molekularem Sauerstoff ein häufig auftretendes Phänomen. Der genau dahinterstehende Fluoreszenzlöschprozess ist noch unklar. Höchstwahrscheinlich löscht molekularer Sauerstoff jedoch durch intersystem crossing [84]. Dabei geht man davon aus, dass die Fluoreszenz reduziert wird, indem das angeregte Singulett Molekül durch den Zusammenstoß mit dem Triplett Sauerstoff Molekül in den angeregten Triplettzustand übergeht, anstatt über die Emission eines Photons in den Singulettgrundzustand überzugehen. Der Beitrag der Phosphoreszenz in der Fluoreszenzspektroskopie wird in der Regel vernachlässigt, da Triplettzustände zum Einen bezüglich des strahlenden Zerfalls (Phosphoreszenz) deutlich langlebiger als Singulettzustände sind (im Bereich von  $\mu s$  im Vergleich zu  $ns$ ) und zum Anderen auch der Triplettzustand strahlungslos abgeregt werden kann. [33]

Im Rahmen des Gleichgewichtsmodells muss die Fluoreszenz von  $B'^*$  vollständig durch Stöße mit molekularem Sauerstoff gelöscht werden. Um den Einfluss von molekularem Sauerstoff auf die spektroskopischen Eigenschaften von (c)NADH zu überprüfen, wurden Messungen in sauerstoffhaltigem- und in sauerstofffreiem Puffer miteinander verglichen. Der Sauerstoffgehalt der nicht-entgasten Probe betrug  $0,28\text{mM}$ . Der Sauerstoffgehalt der entgasten Probe wurde mittels einer Kontrolllösung, welche Pyrogallol in Natriumhydroxid (NaOH) enthielt, überprüft. Sobald in NaOH gelöstes Pyrogallol mit Sauerstoff in Berührung kommt, ändert sich die Absorbanz bei  $420\text{nm}$ . Die vorher transparente Flüssigkeit wird braun. Die Absorbanzänderung lässt sich mittels UV-Vis Spektroskopie überprüfen und quantifizieren. [85] Der Sauerstoffgehalt bei der „sauerstofffreien“ Probe betrug maximal (siehe Abschnitt 2.8)  $0,018(8)\text{mM}$ .

Abbildung 5.17 und 5.18 vergleichen den Einfluss des Absorptionsspektrums und des Emissionsspektrums von cNADH und NADH in sauerstoffhaltigem- gegenüber sauerstofffreiem Puffer. Das Absorptionsmaximum von NADH in sauerstofffreiem

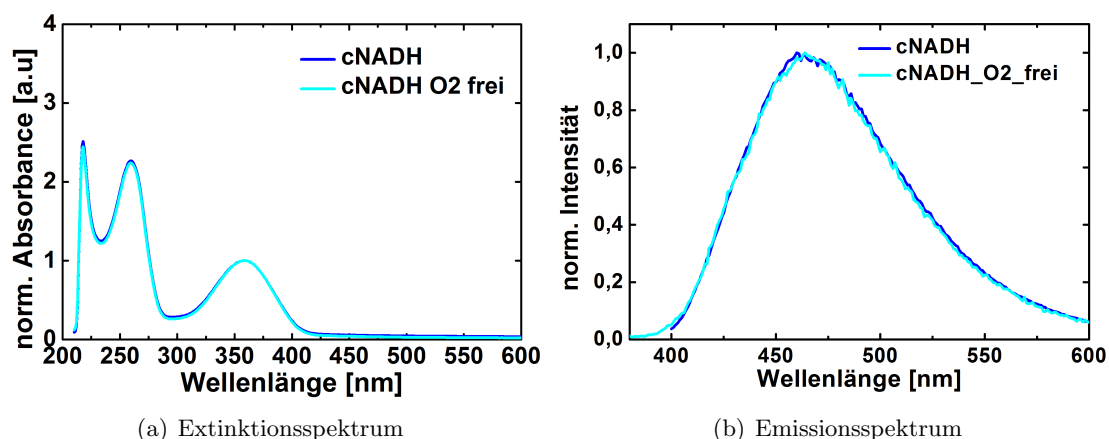


Abbildung 5.18: **Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum cNADH in sauerstofffreiem und sauerstoffhaltigem Puffer:** Sauerstoff scheint weder einen Einfluss auf das Absorptions-, noch auf das Emissionsspektrum zu haben.

Puffer liegt bei 338(1)nm und stimmt damit innerhalb der Fehlergrenzen mit dem Absorptionsmaximum von NADH in sauerstoffhaltigem Puffer überein. Dasselbe gilt für das Absorptionsmaximum des Dihydrornicotinamids von cNADH:

Dieses liegt bei 359(1)nm und stimmt innerhalb der Fehlergrenzen auch mit dem in sauerstoffhaltigem Puffer überein. Sauerstoff hat darüber hinaus weder einen signifikanten Einfluss auf die Lage des Emissionsmaximums von (c)NADH bei 463(2)nm, noch auf die Quantenausbeute. Diese beträgt für NADH in sauerstofffreiem Puffer  $Q = 0,016(2)$  und stimmt mit der in sauerstoffhaltigem Puffer überein. Die Quantenausbeute von cNADH in sauerstofffreiem Puffer beträgt  $Q = 0,022(1)$  und stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit der Quantenausbeute von cNADH in sauerstoffhaltigem Puffer überein.

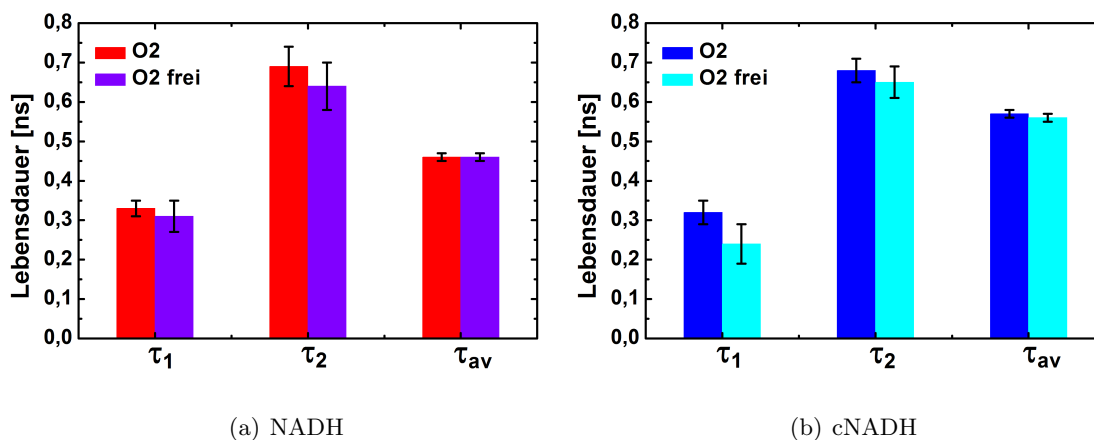


Abbildung 5.19: **Vergleich Einfluss  $O_2$  auf die Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH:** Sowohl die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , als auch die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von (c)NADH sind unabhängig von molekularem Sauerstoff.

Folglich scheint molekularer Sauerstoff weder einen signifikanten Einfluss auf die Absorptionseigenschaften noch auf das Emissionsspektrum von NADH und cNADH zu haben.

Abbildung 5.19 vergleicht die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , sowie die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  von (c)NADH in sauerstoffhaltigem und sauerstofffreiem Puffer. Sowohl die beiden einzelnen, als auch die mittlere Fluoreszenzlebensdauer in sauerstofffreiem Puffer stimmen mit denen in sauerstoffhaltigem Puffer innerhalb der Fehlergrenzen überein. Somit scheint molekularer Sauerstoff keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH zu haben.

Die Löschung der Fluoreszenz durch molekularen Sauerstoff verkürzt keine der beiden Fluoreszenzlebensdauern und kann dadurch auch nicht die Existenz von 2 Fluoreszenzlebensdauern im Rahmen des Gleichgewichtsmodells erklären.

Das Gleichgewichtsmodell ist damit nicht widerlegt, allerdings scheint ein anderer Prozess als Stöße durch molekularen Sauerstoff für die strahlungslose Abregung von  $B^*$  verantwortlich zu sein.

## 5.5 Konformationsmodell

Eine in der Literatur häufig diskutierte Hypothese zur Erklärung der zwei Lebensdauern ist das sogenannte „Konformationsmodell“ [18]. NADH soll demnach in einer offenen Konformation und in einer geklappten Konformation vorliegen, wobei sich bei der geklappten Konformation der Adeninrest und der Dihydrinikotinamidteil überlagern. Die Existenz dieser beiden Konformationen konnte durch NMR-Studien [86, 87] und über Fluoreszenzspektroskopie [42, 88, 89] nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit dem Konformationsmodell geht man davon aus, dass die Fluoreszenz des NADHs durch den Adeninrest gelöscht wird, vermutlich durch die Bildung eines Charge-Transfer Komplexes [33].

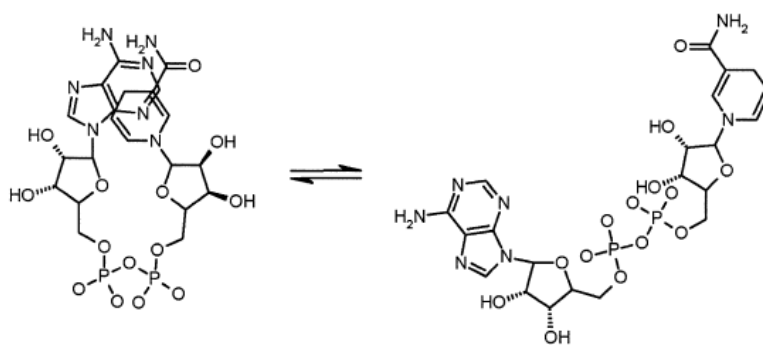


Abbildung 5.20: Vergleich der gefalteten und offenen Konformation von NADH [88].

Das Konformationsmodell wird in dem folgenden Abschnitt durch 3 Experimente überprüft:

1. Erstens wird der Einfluss des Adenins auf die Fluoreszenzlebensdauer von NADH überprüft, indem Dihydrinikotinamidmononucleotid (NMNH) und carba Dihydrinikotinamidmononucleotid cNMNH spektroskopisch untersucht werden. Diese besitzen im Gegensatz zu (c)NADH keinen Adenosinmonophosphatrest (Strukturen vgl. Kapitel 2.1). Sollte der Adeninrest am Fluoreszenzlöschprozess beteiligt sein, sollte (c)NMNH nur eine Lebensdauer aufweisen. Nach dem Konformationsmodell entsprechen die spektroskopischen Eigenschaften von (c)NMNH denen der offenen Konformation von (c)NADH.
2. Zweitens wird die geklappte Konformation untersucht, indem man den Adeninrest von (c)NADH bei 260nm anregt. Das Maximum der Fluoreszenz von Adenin in wässriger Lösung bei Raumtemperatur liegt bei 321nm mit einer Quantenausbeute von  $Q = 2,6 \cdot 10^{-4}$  [90, 91]. Zwischen dem Adenin- und dem Dihydrinikotinamidrest kommt es aber alternativ zur Emission eines Photons um  $\lambda = 321\text{nm}$  zu einem resonanten Energietransfer (RET) wenn die beiden nur wenige Ångstrom voneinander entfernt sind [19, 88]. Durch Anregung des (c)NADHs bei 260nm und der Detektion im Bereich zwischen 400 und 600nm kann somit selektiv die geklappte Konformation von (c)NADH untersucht werden.

3. Zum Schluss wird (c)NADH in Methanol spektroskopisch analysiert, da Methanol die geklappte Konformation „denaturieren“ soll, d.h. in Methanol liegt (c)NADH hauptsächlich in der offenen Konformation vor [92, 93].

### 5.5.1 Spektroskopischer Vergleich (c)NADH mit (c)NMNH

In Abbildung 5.21 (a) ist der Extinktionskoeffizient gegen die Wellenlänge von (c)NMNH und (c)NADH aufgetragen. Wie zu erwarten hat (c)NMNH kein Absorptionsmaximum bei 260nm, da (c)NMNH keinen Adeninrest aufweist. Das Absorptionsmaximum von NMNH liegt bei 338(1)nm und stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit dem von NADH überein. Der Extinktionskoeffizient ist im Vergleich zu NADH leicht erhöht und beträgt  $\epsilon = 7,0(1)\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Das Absorptionsmaximum von cNMNH ist im Vergleich zu dem von NMNH 20nm rot verschoben und liegt bei 358(1)nm. Die spektrale Verschiebung zwischen NADH und cNADH bleibt bei NMNH und cNMNH erhalten. Der Extinktionskoeffizient von cNMNH stimmt mit dem von NMNH überein.

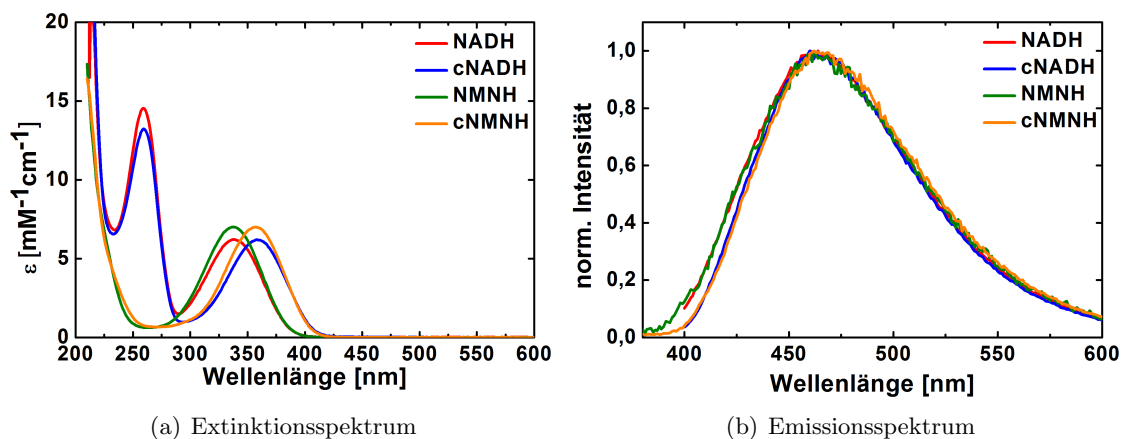


Abbildung 5.21: **Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum (c)NADH und (c)NMNH Trispuffer pH 8.5 bei 20°C:** Die spektrale Verschiebung in der Absorption zwischen cNADH und NADH bleibt bei cNMNH und NMNH erhalten. Die Lage des Emissionsmaximums stimmt bei (c)NADH und (c)NMNH überein.

Vergleicht man die Emissionsspektren von (c)NADH und (c)NMNH, so stimmt die Lage der Emissionsmaxima innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein. Gleichzeitig stimmen die auf das jeweilige Emissionsmaximum normierte Emissionsspektren von NADH und NMNH, sowie von cNADH und cNMNH im Wesentlichen miteinander überein (Abb. 5.21 (b)). Die Quantenausbeute von NMNH ist niedriger als von NADH und beträgt  $Q = 0,011(1)$ . Im Gegensatz zu den Quantenausbeuten von NADH und cNADH stimmen die Quantenausbeute von NMNH und cNMNH ( $Q = 0,012(2)$ ) innerhalb der Fehlergrenzen überein. Die spektroskopischen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen NADH und cNADH bleiben somit mit Ausnahme der Quantenausbeute bei NMNH und cNMNH erhalten.

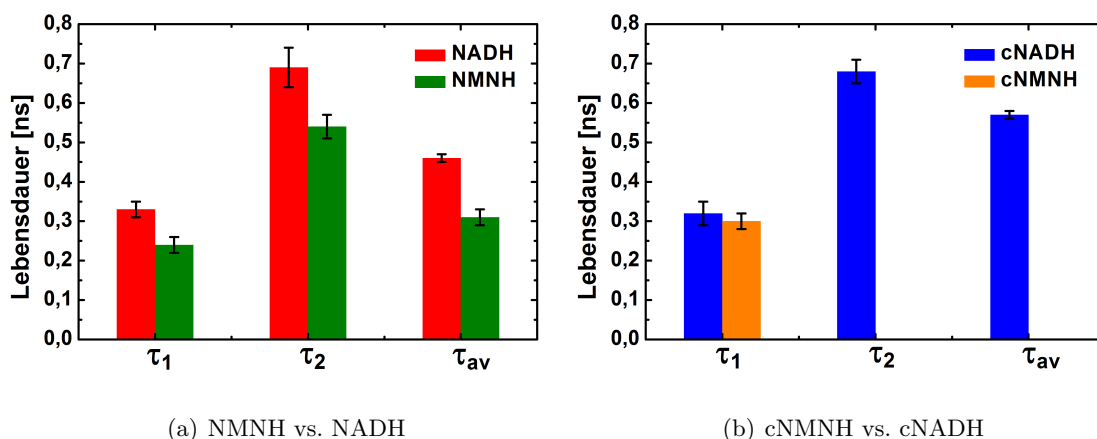


Abbildung 5.22: **Vergleich Fluoreszenzlebensdauern (c)NMNH mit (c)NADH:** NMNH hat zwei Lebensdauern, während cNMNH nur eine Fluoreszenzlebensdauer hat.

Abbildung 5.22 vergleicht die einzelnen Lebensdauern und die mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer von (c)NADH mit denen von (c)NMNH. Die Zerfallskurve des angeregten Zustandes lässt sich bei NMNH durch eine biexponentielle Fitfunktion beschreiben:  $\tau_1 = 0,24(2)\text{ns}$ ,  $\tau_2 = 0,54(3)\text{ns}$  und  $\tau_{av} = 0,31(2)\text{ns}$ . Aus Abbildung 5.22 (a) wird ersichtlich, dass weder die einzelnen noch die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von NMNH mit denen von NADH übereinstimmt. Die Lebensdauern von NMNH sind tendenziell kleiner als die von NADH.

cNMNH hat im Gegensatz zu cNADH nur eine Fluoreszenzlebensdauer, die innerhalb der Fehlergrenzen mit  $\tau_1$  von cNADH übereinstimmt (Abb. 5.22 (b)). Die zusätzliche Auswertung der Rohdaten mit der Maximum Entropie Methode ergab ebenso zwei Lebensdauern für NMNH ( $\tau_1 = 0,19(3)\text{ns}$  und  $\tau_2 = 0,43(4)\text{ns}$ ) und nur eine Lebensdauer für cNMNH ( $\tau = 0,27(2)\text{ns}$ ).

Wenden wir dieses Ergebnis auf das Konformationsmodell an, so ergibt sich folgendes Bild: Wäre Adenin, wie im Modell beschrieben, für die Fluoreszenzlöschung verantwortlich, so dürften die Moleküle ohne Adenin nur eine Lebensdauer aufweisen. Dies ist für cNMNH der Fall, aber für NMNH nicht. Folglich scheinen NADH und cNADH nicht wie vorher angenommen vollständig demselben Fluoreszenzlöschprozess zu unterliegen. Diese These wird auch durch die Unterschiede im Emissionsspektrum von NADH und NMNH im Vergleich zu cNADH und cNMNH im Wellenlängenbereich unterhalb von 450nm gestützt.

### 5.5.2 Untersuchung der geklappten Konformation durch Anregung bei 260nm

Wie bereits im oberen Abschnitt erläutert, kann NADH in einer geklappten Konformation vorkommen, in der sich der Adenin- und der Dihydrinikotinamid Rest sehr nahe kommen. Der Einfluss dieser „geklappten“ Konformation auf den Fluoreszenzlöschprozess kann untersucht werden, indem (c)NADH bei 260nm - sprich nur der Adeninrest -



angeregt wird. In der geklappten Konformation findet ein Energietransfer zwischen Adenin und Dihydrinikotinamid statt [19, 88]. Somit kann man, unter der Annahme, dass kein Energietransfer zwischen dem Adenin- und dem Dihydrinikotinamidrest bei der offenen Konformation stattfindet, selektiv die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der geklappten Konformation von (c)NADH durch Anregung bei 260nm untersuchen. Abbildung 5.23 vergleicht die auf das Maximum der Intensität

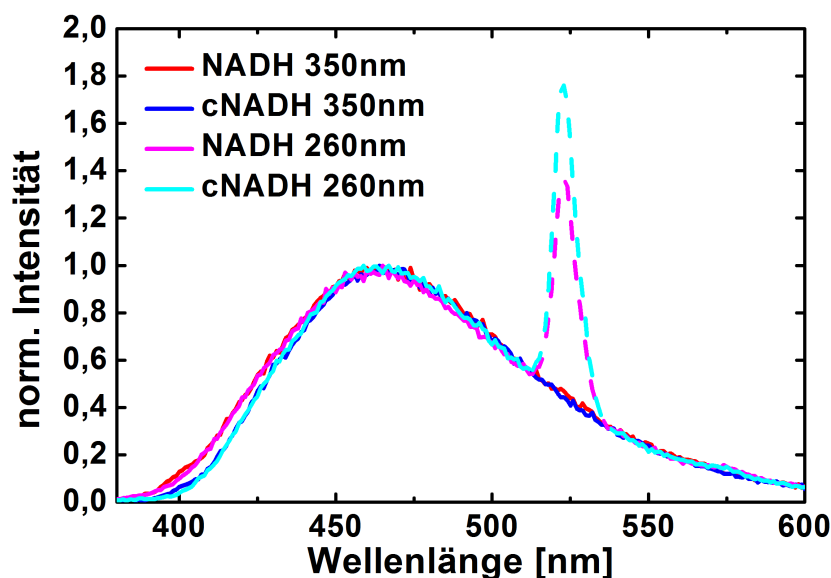


Abbildung 5.23: Vergleich der Emissionsspektren von NADH und cNADH bei Anregung mit 260nm und 350nm.

normierte Emissionsspektren von (c)NADH bei Anregung mit 260nm und mit 350nm. Der zweite Peak (gestrichelte Linie) bei den Spektren mit 260nm Anregung ist auf das Maximum der 2. Ordnung des Gitters des verwendeten Spektrometers zurückzuführen. Die Emissionsspektren von (c)NADH sind unabhängig von der gewählten Anregungswellenlänge. Unter der Annahme, dass bei der offenen Konformation keine Kopplung zwischen Adenin und Dihydrinikotinamid besteht, bedeutet das, dass die geklappte Konformation innerhalb der Detektionsgenauigkeit dasselbe Spektrum wie die offene Konformation hat. Die Transfereffizienz vom Adeninrest auf den Dihydrinikotinamidrest kann bestimmt werden, indem das Verhältnis zwischen der Quantenausbeute bei 260nm (nur die geklappte Konformation wird angeregt) mit der Quantenausbeute bei 350nm (beide Konformationen werden angeregt) gebildet wird, wobei die Quantenausbeute bei 260nm, um den Einfluss des Dihydrinikotinamids bei 260nm korrigiert wird (vgl. Kapitel 2.3.2). Die Transfereffizienz vom Adenin- auf den Dihydrinikotinamidrest beträgt bei cNADH 71(7)% und stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit der von NADH überein (67(6)%).

Im folgenden Schritt wird die Fluoreszenzlebensdauer der geklappten Konformation untersucht: Die Fluoreszenzabklingkurve von NADH ist bei Anregung mit 260nm

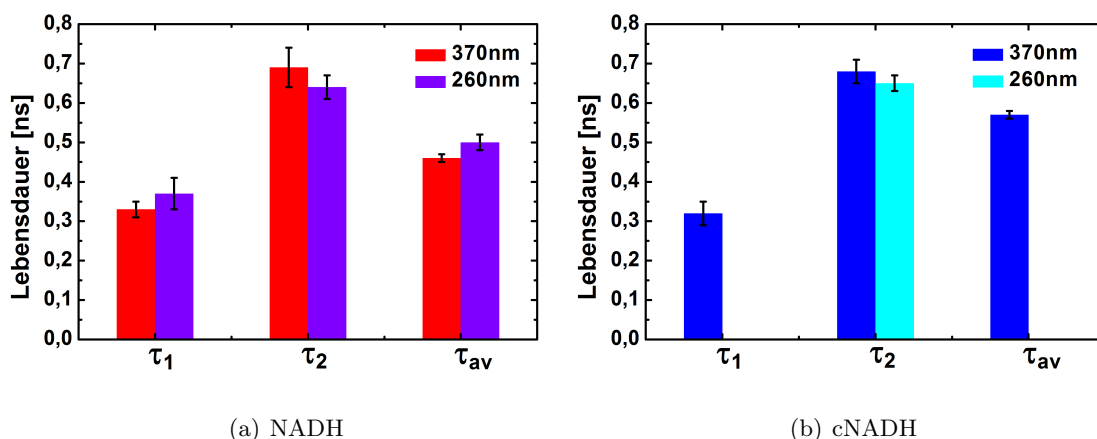


Abbildung 5.24: **Vergleich der Lebensdauern bei 260nm und 370nm**  
**Anregung:** Bei NADH hat die gewählte Anregungswellenlänge keinen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauern. Bei cNADH wird die Fluoreszenzabklingkurve bei Anregung mit 260nm monoexponentiell. Die Lebensdauer stimmt mit der längeren Lebensdauer von cNADH (370nm) überein.

biexponentiell (Abb. 5.24 (a)). Die geklappte Konformation hat 2 Lebensdauern, die mit den Lebensdauern von NADH bei 370nm Anregung (beide Konformationen werden angeregt) übereinstimmen. Bei NADH hat die gewählte Anregungswellenlänge somit keinen Einfluss auf die Lebensdauer. Die Auswertung mit MEM ergab ebenfalls zwei Lebensdauern ( $\tau_1=0,27(3)$ ns und  $\tau_2=0,54(6)$ ns).

cNADH zeigt dagegen ein anderes Verhalten. Die Fluoreszenzabklingkurve kann bei Anregung mit 260nm mit einer monoexponentiellen Fitfunktion beschrieben werden. Die Lebensdauer von cNADH bei 260nm Anregung entspricht dabei innerhalb der Fehlergrenzen der längeren Lebensdauer  $\tau_2$  von cNADH bei Anregung mit 370nm. Somit entspricht die längere Fluoreszenzlebensdauer von cNADH  $\tau_2$  der Lebensdauer der geklappten Konformation. Dies wird wiederum durch Auswertung mit der Maximum Entropie Methode bestätigt ( $\tau=0,61(5)$ ns).

Fasst man die bis hierhin erzielten Ergebnisse zusammen, so ist der Einfluss des Adenins bzw. der geklappten Konformation bei NADH anders als bei cNADH. Sowohl die offene (NMNH) als auch die geklappte Konformation (NADH bei 260nm Anregung) zeigten bei NADH jeweils 2 Lebensdauern, während die beiden Lebensdauern von cNADH durch eine offene Konformation (Lebensdauer cNMNH entspricht  $\tau_1$  von cNADH bei 370nm Anregung) und eine geklappte Version (Lebensdauer von cNADH bei 260nm Anregung entspricht  $\tau_2$  von cNADH bei 370nm Anregung) erklärt werden können. Beide Konformationen haben dasselbe Fluoreszenzspektrum, was in Einklang mit der geforderten spektralen Unabhängigkeit der Lebensdauern steht (vgl. Abschnitt 5.3).

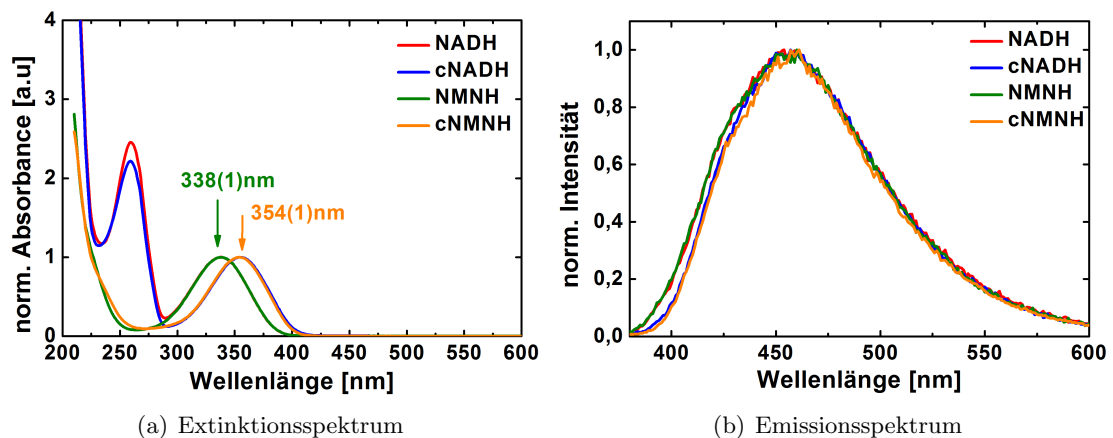


Abbildung 5.25: **Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum (c)NADH und (c)NMNH in Methanol:** Die Lage der Absorptionsmaxima und des Emissionsmaximums von (c)NADH und (c)NMNH ist in MeOH im Vergleich zu Messungen in  $\text{H}_2\text{O}$  blau verschoben.

### 5.5.3 Messung von (c)NADH und (c)NMNH in Methanol

Um das Konformationsmodell noch weiter zu überprüfen wurden die spektroskopischen Eigenschaften von (c)NADH und (c)NMNH in Methanol (MeOH) bestimmt. Messungen von NADH in MeOH sollen NMR und fluoreszenzspektroskopischen Messungen zu Folge die geklappte Konformation von NADH denaturieren bzw. öffnen. Der Energietransfer zwischen Adenin und Dihydrinikotinamid wird unterbunden [88, 92, 93].

Abbildung 5.25 (a) vergleicht das auf die maximale Absorbanz der Dihydrinikotinamidbande normierte Absorbanzspektrum von (c)NADH und (c)NMNH in MeOH. Die Lage der Fluoreszenzmaxima (vgl. Abbildung 5.25 (b)) stimmen für NADH und NMNH und für cNADH und cNMNH überein. Sie sind allerdings im Vergleich zu den Messungen in  $\text{H}_2\text{O}$  blau verschoben. Die Quantenausbeuten erhöhen sich im Vergleich zu Messungen in  $\text{H}_2\text{O}$  und betragen für NADH  $Q = 0,023(2)$ , für cNADH  $Q = 0,034(2)$ , für NMNH  $Q = 0,025(2)$  und für cNMNH  $Q = 0,027(2)$ . Die Quantenausbeuten erhöhen sich für (c)NMNH in MeOH im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}$  stärker als für (c)NADH.

Abbildung 5.26 vergleicht die Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH in MeOH mit den Fluoreszenzlebensdauern in  $\text{H}_2\text{O}$  bei Anregung mit 260nm und 370nm. Bei Anregung mit 370nm verhalten sich NADH und cNADH gleich. Die Lebensdauern verlängern sich und verhalten sich analog zu den Quantenausbeuten. NADH und cNADH haben in MeOH jeweils zwei Fluoreszenzlebensdauern. Unter der Annahme, dass (c)NADH in MeOH nur in der offenen Konformation vorliege, hätte (c)NADH nur eine Lebensdauer haben dürfen. Hier liegt ein Widerspruch im Bild der Konformationshypothese zu den Literaturangaben vor. Bei Anregung mit 260nm verlängert sich die Lebensdauer von NADH in MeOH ebenfalls. Die Fluoreszenzabklingkurve bleibt biexponentiell. Die Fluoreszenzabklingkurve von cNADH bei 260nm Anregungswellenlänge wird in MeOH biexponentiell. Die Messungen in  $\text{H}_2\text{O}$  ergaben dagegen nur eine Lebensdauer.

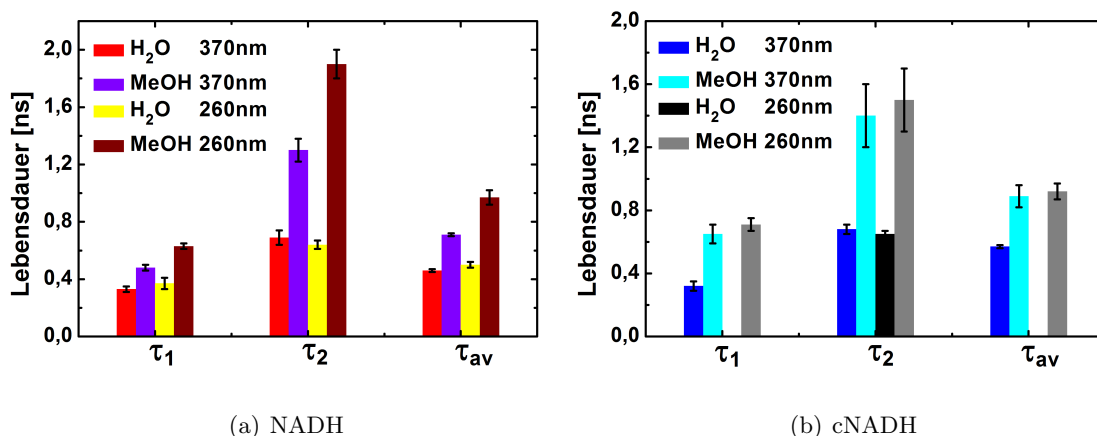


Abbildung 5.26: **Vergleich der Lebensdauer von (c)NADH in MeOH zu H<sub>2</sub>O bei 260nm und 370nm Anregung:** Die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH sowie die mittlere Fluoreszenzlebensdauer verlängert sich in MeOH im Vergleich zu H<sub>2</sub>O. Die Fluoreszenzabklingkurve von cNADH bei 260nm Anregung wird in MeOH biexponentiell.

Dies ist auch höchst überraschend, hätte man doch erwartet, dass die Fluoreszenz der geklappten Konformation in MeOH vollkommen verschwindet, bzw. monoexponentiell bleibt. Die zusätzliche Auswertung der Rohdaten bei 260nm Anregung mit der Maximum Entropie Methode ergaben ebenfalls je zwei Lebensdauern für NADH ( $\tau_1=0,61(5)$ ns und  $\tau_2=1,7(2)$ ns) und cNADH ( $\tau_1=0,67(5)$ ns und  $\tau_2=1,4(1)$ ns). Betrachtet man zusätzlich die Effizienz des Energietransfers vom Adenin- auf den Dihydronikotinamidrest so beträgt er für NADH 14(4)% und für cNADH 16(3)%. Der Energietransfer ist folglich erwartungsgemäß in MeOH sehr viel geringer als in H<sub>2</sub>O.

Die Ergebnisse bei 370nm Anregung ließen sich durch die These erklären, dass MeOH die geklappte Konformation nur zum Teil öffnet, so dass in MeOH beide Konformationen vorhanden sind, wobei die offenen Konformation die dominantere ist. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass der Intensitätsanteil und der Anteil der Amplitude der längeren Fluoreszenzlebensdauer (der geklappten Konformation) in MeOH kleiner sind, als in H<sub>2</sub>O.

Somit konnte für NADH das Konformationsmodell in dieser Form nicht bestätigt werden. NMNH hat zwei Lebensdauern, die innerhalb der Fehlergrenzen nicht mit denen von NADH übereinstimmen. NADH hat bei 260nm ebenfalls zwei Lebensdauern, die innerhalb der Fehlergrenzen mit denen von NADH bei 370nm Anregung übereinstimmen. Für das Konformationsmodell bedeutet das, dass sowohl die offene als auch die geklappte Konformation jeweils zwei Lebensdauern hätten, sprich, dass die Fluoreszenzabklingkurve von NADH bei 370nm Anregung in H<sub>2</sub>O (beide Konformationen) durch 4 Lebensdauern beschrieben werden müsste.

Dagegen konnte für cNADH das Konformationsmodell in H<sub>2</sub>O unter Berücksichtigung zweier Annahmen bestätigt werden. Erstens darf bei der offenen Konformation

kein Energietransfer zwischen Adenin und Dihydrornikotinamid stattfinden und Zweitens unterliegt NADH einem anderen Fluoreszenzlöschprozess als cNADH. Treffen diese beiden Annahmen zu, so kann die kurze Fluoreszenzlebensdauer von cNADH in H<sub>2</sub>O durch die offene Konformation (Lebensdauer cNMNH) und die lange Fluoreszenzlebensdauer durch die geklappte Konformation erklärt werden (Lebensdauer cNADH bei 260nm Anregung).

## 5.6 Zusammenfassung

Diese Zusammenfassung dient dazu einen kurzen Überblick über die in Kapitel 5 aufgestellten und überprüften Modelle zur Erklärung der zwei Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH zu verschaffen:

- Das Isomeriemodell (cisoide und transoide Stellung der Amidgruppe am Dihydrornikotinamid) konnte widerlegt werden, da transoides Dichlorbenzyl-dihydrornikotinamid zwei anstatt eine Lebensdauer hat und die eine Lebensdauer der cisoiden Modellverbindung nicht mit einer der beiden Lebensdauern von (c)NADH übereinstimmt.
- Protonierung/Deprotonierung hat zwar einen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer von (c)NADH, allerdings konnte das Protonierungs-/Deprotonierungsmodell in dieser Form nicht bestätigt werden. Weder zeigten die Lebensdauern eine Abhängigkeit vom pH-Wert noch hatte (c)NADH in aprotischem Lösungsmittel nur eine Lebensdauer.
- Die Erklärung der zwei Fluoreszenzlebensdauern über zwei angeregte Zustände, wobei  $\nu \gg \nu'$  gilt, konnte aufgrund der spektralen Unabhängigkeit der Lebensdauern nicht bestätigt werden. Folglich gibt es entweder nur eine fluoreszierende Spezies (B\* wird strahlungslos abgeregt) oder die Energiedifferenz zwischen den angeregten Zuständen A\* und B\* und dem Grundzustand unterscheidet sich nur geringfügig.
- Molekularer Sauerstoff hat keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauern von NADH. Diese Tatsache widerlegt das aufgestellte Gleichgewichtsmodell nicht, allerdings scheint ein anderer dynamischer Löschprozess für die strahlungslose Abregung von B\* verantwortlich zu sein.
- Das Konformationsmodell stimmt für NADH nicht, da die Fluoreszenzabklingkurve sowohl für NMNH (offene Konformation) als auch für NADH bei einer Anregungswellenlänge von 260nm (geklappte Konformation) biexponentiell ist. Wenn beide Konformationen durch Anregung mit 370nm angeregt werden, müsste NADH in H<sub>2</sub>O vier Lebensdauern aufweisen.
- Dagegen konnte unter verschiedenen Annahmen das Konformationsmodell für cNADH in H<sub>2</sub>O bestätigt werden. Die kurze Lebensdauer des cNADHs kann durch die offene- und die lange Lebensdauer durch die geklappte Konformation erklärt werden. Allerdings lässt die Tatsache, dass cNADH einem anderen Löschprozess unterliegt als NADH und dass das geklappte cNADH in MeOH 2 Lebensdauern hat, doch noch Zweifel an der Richtigkeit des Modells aufkommen.



## 6 Anwendungsmöglichkeiten von Fluoreszenzlebensdauer-messungen von (c)NADH

In den vorherigen Kapiteln wurden die spektroskopischen Eigenschaften von freiem NADH und cNADH untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften von NADH ändern, wenn NADH an ein Enzym gebunden ist [94–96]. Im folgenden Kapitel werden die Fluoreszenzeigenschaften von gebundenem (c)NADH untersucht. Es wird gezeigt, dass der Unterschied in der Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer von freiem und gebundenem (c)NADH die Möglichkeit bietet, Bindungskonstanten von Enzymen an (c)NADH zu bestimmen. Darüber hinaus wird erläutert, dass die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von NADH nicht nur zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels benutzt, sondern auch als zusätzliche Kontrollinstanz in einem diagnostischen Messprozess zur Überprüfung der Aktivität von Enzymen Verwendung finden kann.

### 6.1 Fluoreszenzeigenschaften von freiem und gebundenem NADH

Die Fluoreszenzeigenschaften zeigen eine starke Abhängigkeit davon, ob NADH frei oder an ein Enzym gebunden vorliegt [94–96]. In Abbildung 6.1 werden das Emissionsspektrum und die Quantenausbeute von freiem und an das Enzym Glucosedehydrogenase (GlucDH) gebundenem NADH miteinander verglichen. Die Lage des Emissionsmaximums bei gebundenem NADH liegt bei 455(1)nm und ist damit im Vergleich zu freiem NADH leicht blau verschoben. Dieser Trend ist in Übereinstimmung mit Literaturangaben. [95, 97] Gleichzeitig erhöht sich bei gebundenem NADH die Quantenausbeute um ungefähr einen Faktor 7 auf  $Q = 0,10(1)$ .

Analog zur Quantenausbeute verlängert sich die Fluoreszenzlebensdauer von NADH, wenn dieses an ein Enzym gebunden ist (Abbildung 6.2) um einen Faktor 7 auf  $\tau_{geb} = 2,9(1)$ ns. Ist NADH (1kDa) an GlucDH (ca. 1000kDa) gebunden, so ist die allgemeine Vorstellung, dass der Dihydronekotinamid-Rest in der Bindungstasche des Enzyms besser vor inter- und intramolekularen Fluoreszenzlöschprozessen geschützt ist [33]. Dies motiviert die höhere Quantenausbeute und Lebensdauer des gebundenen NADHs.

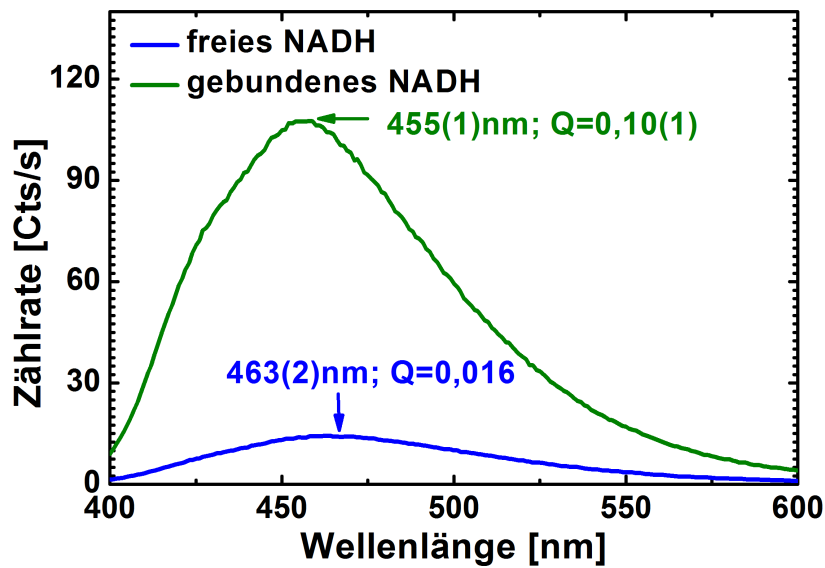


Abbildung 6.1: Vergleich des Emissionsspektrums von freiem und gebundenem NADH: Das Emissionsmaximum von gebundenem NADH ist blau verschoben und die Quantenausbeute steigt ca. um den Faktor 7 an.(Bildquelle: analog zu Ref. [32])

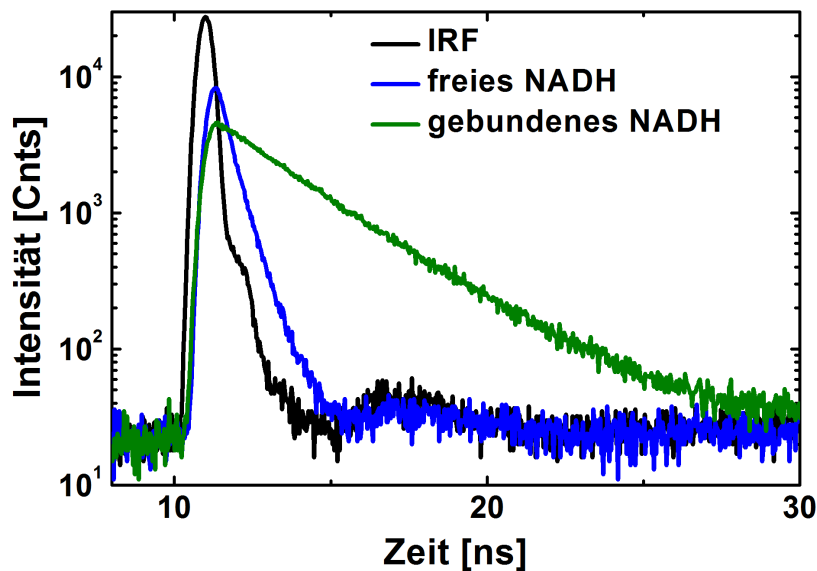


Abbildung 6.2: Vergleich Fluoreszenzabklingkurve von freiem- (blau) und gebundenem NADH (grün): Die Fluoreszenzlebensdauer von gebundenem NADH ist ca. um den Faktor 7 höher und beträgt 2,9(1)ns.(Bildquelle: analog zu [32])



## 6.2 Bestimmung der Bindungskonstante

Die Bestimmung der Bindungs- bzw. Dissoziationskonstante über die Messung der Fluoreszenzintensität ist bereits bekannt [27–29]. In diesem Abschnitt soll eine neue Methode zur Bestimmung der Bindungs- bzw. Dissoziationskonstante vorgestellt werden und mit der Intensitätsmessung verglichen werden. Das Grundkonzept besteht darin, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften von gebundenem und freiem NADH ändern und somit über die Fluoreszenz eine quantitative Aussagen getroffen werden kann, wie hoch die Konzentration des gebundenen NADHs im Vergleich zu freiem NADH ist.

### 6.2.1 Bestimmung über die Messung der Fluoreszenzintensität

Die Bindungskonstante von Enzymen an NADH kann über die Fluoreszenzintensität bestimmt werden, indem zu einer konstant gehaltenen Menge an NADH verschiedene Konzentrationen GlucDH titriert werden. Abbildung 6.3 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei verschiedenen Temperaturen.

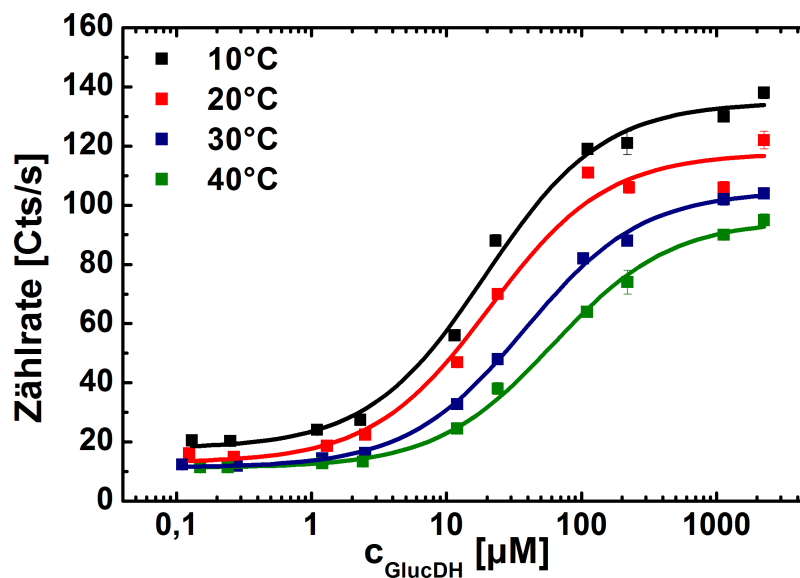


Abbildung 6.3: Bestimmung der Bindungskonstante von NADH an GlucDH in Phosphatpuffer über die Fluoreszenzintensität. Die NADH Konzentration wurde konstant bei  $23\mu\text{M}$  gehalten, während GlucDH bis zu einem 100fachen Überschuss hinzu titriert wurde.

Bei einer sehr geringen Enzymkonzentration im Vergleich zur Konzentration an NADH ( $23\mu\text{M}$ ) liegen der Großteil der NADH Moleküle frei vor und damit entspricht die Fluoreszenzintensität zu Beginn der Messung der von freiem NADH. Mit zunehmender Enzymkonzentration nimmt die Konzentration des gebunden vorliegenden NADHs zu und somit kommt es zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität. Ab einer gewissen Konzentration liegen praktisch alle NADH Moleküle gebunden vor. Die

Fluoreszenzintensitätskurve saturiert und die Fluoreszenzintensität entspricht dem von gebundenem NADH.

$$I = \frac{I_{min} + I_{max}K_B[GlucDH]}{1 + K_B[GlucDH]} \quad (6.1)$$

Die Bindungskonstante bestimmt man nach Ref. [29], indem man an die so erhaltenen Kurven die Funktion 6.1 anpasst (Herleitung der Gleichung siehe Anhang), wobei  $I_{min}$  der Intensität von freiem und  $I_{max}$  der Intensität von gebundenem NADH entspricht.  $K_B$  steht für die Bindungskonstante und  $[GlucDH]$  für die Konzentration an Glucosedehydrogenase. Die über die Fluoreszenzintensität aus Gleichung 6.1 bestimmte Bindungskonstante von NADH in 0,1M Phosphatpuffer bei pH 7 und 20°C beträgt  $K_B = 0,048(6)\mu M^{-1}$ . Die Dissoziationskonstante  $K_D$  erhält man durch Bildung des Kehrwertes der Bindungskonstante.

### 6.2.2 Bestimmung über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer

Im folgenden Abschnitt soll eine neue Methode zu Bestimmung der Bindungskonstante eines Enzyms (GlucDH) an ein Fluorophor ((c)NADH) vorgestellt werden: Die Bestimmung der Bindungskonstante eines Enzyms über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer.

In Abschnitt 6.1 wurde erläutert, dass nicht nur die Fluoreszenzintensität, sondern auch die Fluoreszenzlebensdauer davon abhängt, ob NADH gebunden oder frei vorliegt.

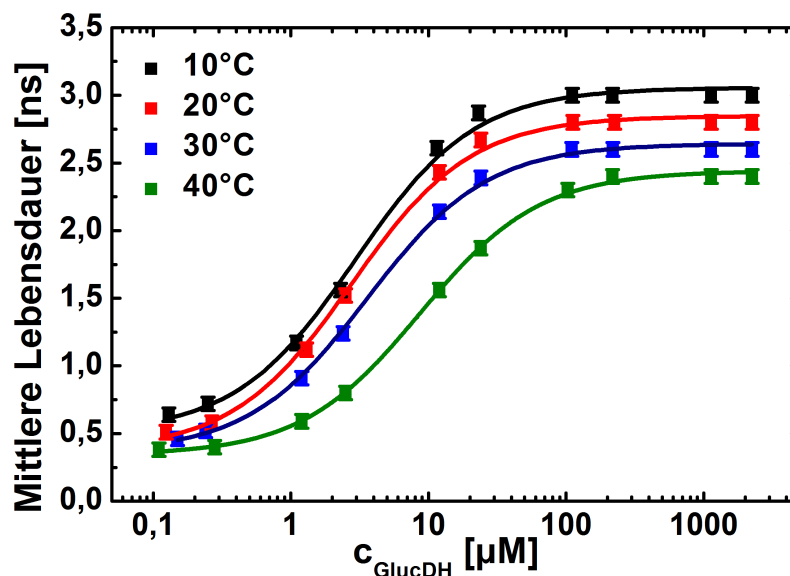


Abbildung 6.4: Bestimmung der Bindungskonstante von NADH an GlucDH in Phosphatpuffer über die Fluoreszenzlebensdauer

Analog zur Messung der Fluoreszenzintensität wird zur Bestimmung der Bindungskonstanten über die Fluoreszenzlebensdauer die Konzentration an NADH

konstant gehalten, während die Konzentration an Enzym im Konzentrationsbereich von  $0,23\mu M$  bis  $2,3mM$  variiert wird.

Abbildung 6.4 zeigt exemplarisch die Titrationskurve für NADH in  $0,1M$  Phosphatpuffer bei pH 7, wobei die mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  in Abhängigkeit der Enzymkonzentration aufgetragen ist. Bei niedrigen Enzymkonzentrationen liegt NADH zum Großteil frei vor. In diesem Fall entspricht  $\tau_{av}$  der mittleren Lebensdauer von freiem NADH, die bei  $20^\circ C$   $\tau = 0,46(1)ns$  beträgt (vgl. Kapitel 4.2). Mit zunehmender Enzymkonzentration nimmt die Konzentration des gebundenen NADHs zu. Folglich steigt  $\tau_{av}$  an, bis alle NADH Moleküle gebunden vorliegen und die Kurve saturiert. Die Bindungskonstante lässt sich dann durch das Anpassen einer im Vergleich zu Gleichung 6.1 leicht abgewandelten Funktion an die Kurve bestimmen (Herleitung siehe Anhang).

$$\tau_{av} = \frac{\tau_{min} + q\tau_{max}K_B[GlucDH]}{1 + qK_B[GlucDH]} \quad (6.2)$$

$\tau_{min}$  entspricht in diesem Fall der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von freiem NADH und  $\tau_{max}$  der Lebensdauer von gebundenem NADH.  $q$  ist ein zusätzlicher Faktor, der den Unterschied der Quantenausbeute zwischen gebundenem und freiem NADH mit berücksichtigt. Er berechnet sich aus dem Quotienten der Quantenausbeute von gebundenem zu freiem NADH und beträgt  $q = 7,25$ .  $K_B$  steht wieder für die Bindungskonstante und  $[GlucDH]$  für die Konzentration an GlucDH. Bei  $20^\circ C$  beträgt die über die Lebensdauer bestimmte Bindungskonstante von NADH in Phosphatpuffer bei pH 7  $K_B = 0,050(4)\mu M^{-1}$ .

Die über die Fluoreszenzlebensdauer und die Fluoreszenzintensität bestimmten Bindungskonstanten für NADH an GlucDH stimmen innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein. Dies bestätigt die Möglichkeit  $K_B$  über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen.

Es ist interessant zu bemerken, dass die größte Empfindlichkeit der Messung, d.h. der Punkt der größten Steigung (der Wendepunkt) der Intensitätsmessung bei  $K_B = [GlucDH]^{-1}$  und bei der Fluoreszenzlebensdaueremessung bei  $qK_B = [GlucDH]^{-1}$  auftritt. Da  $q > 1$  ist, ist die Empfindlichkeit der Messung bereits bei geringeren Konzentrationen an GlucDH maximal.

Um die Bindungskonstante von NADH an GlucDH mit der von cNADH an GlucDH zu vergleichen, werden die Messungen in  $0,1M$  Tris Puffer mit  $0,2M$  NaCl bei pH 8,5 wiederholt. Der Wechsel des Puffers begründet sich aus einer Degradation von cNADH in Phosphatpuffer. Die Bindungskonstante von NADH in Trispuffer bei pH 8,5 und  $0,2M$  NaCl beträgt bei  $20^\circ C$   $K_B = 0,0096(2)\mu M^{-1}$ . Vergleicht man die Bindungskonstante von NADH in Phosphatpuffer mit der in Trispuffer, so erkennt man eine starke Abhängigkeit der Bindungskonstante vom pH-Wert und der Salzkonzentration.

Abbildung 6.5 vergleicht die Titrationskurven von NADH (Abb.6.5 (a)) mit der von cNADH (Abb.6.5 (b)), wobei die Konzentration von (c)NADH konstant  $23\mu M$  betrug und

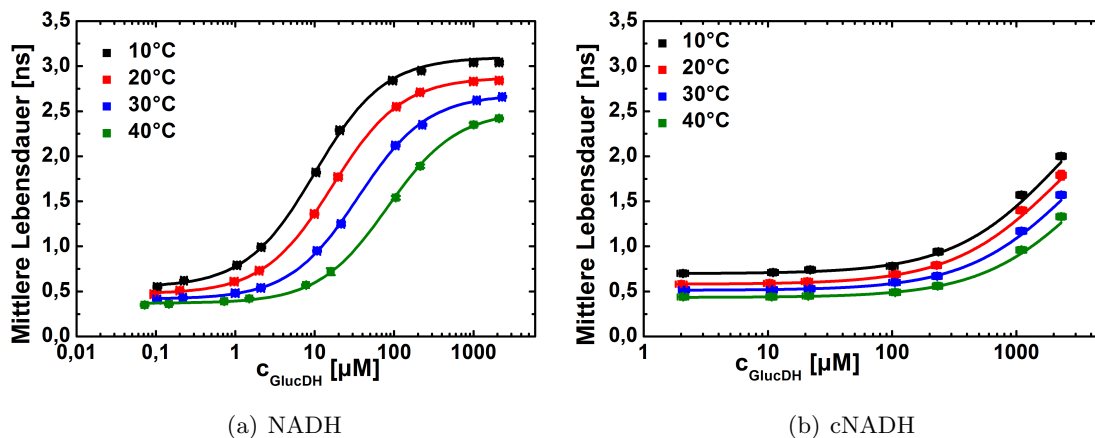


Abbildung 6.5: **Vergleich Bindungskonstante NADH vs. cNADH in Trispuffer:** Die Bindungsaffinität von NADH an GlucDH ist größer als von cNADH an GlucDH. Gleichzeitig zeigt die Bindungskonstante eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert und der Salzkonzentration.

die GlucDH Konzentration im Bereich zwischen  $0,23\mu M$  bis  $2,3mM$  variiert wurde. Die mittlere Lebensdauer ist wieder in Abhängigkeit der GlucDH Konzentration aufgetragen. Es fällt auf, dass die mittlere Lebensdauer von cNADH nicht in Sättigung geht, sprich in dem gewählten Konzentrationsbereich des Enzyms nicht der Großteil aller cNADH Moleküle gebunden sind. Die Bindungskonstante des Enzyms an cNADH und damit die Bindungsaffinität ist für cNADH sehr viel geringer als für NADH. Aufgrund der Kurvenform ist auch der Fehler des Fits dementsprechend hoch. Die Bindungskonstante von cNADH an GlucDH in Trispuffer bei  $20^{\circ}C$  beträgt  $K_B=7(4 \cdot 10^{-5}\mu M^{-1})$ .

Mit oben angesprochenem Argument und  $q=7,25$  folgt zudem, dass die Bindungs- und Dissoziationskonstante mit der Fluoreszenzintensitäts- und Lebensdauermessung so nicht bestimmbar ist, da GlucDH oberhalb einer Konzentration von  $2,3mM$  nicht mehr gelöst werden konnte.

### 6.3 Fluoreszenzlebensdauerbasierter Glucosesensor

Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von gebundenem und freiem NADH kann nicht nur zur Bestimmung von Bindungskonstanten herangezogen werden, aber kann auch Anwendung im Bereich der Diagnostik, genauer in der Bestimmung der Blutglucosekonzentration im Rahmen der Behandlung von Diabetikern finden. Ein solcher Glucosesensor wurde von W. Petrich et al. vorgeschlagen [30]. Das Prinzip dahinter wurde bereits in Abschnitt 2.5 erläutert und wird hier nur kurz anhand von NADH dargestellt. Der Fokus dieses Abschnittes liegt darin, ob das Prinzip dieses Glucosesensors auch auf cNADH übertragen werden kann.

### 6.3.1 Messung mit NADH

In Abbildung 6.6 wurde die mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses des Enzyms GlucDH zum Coenzym NADH bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Dabei wurde bei der Messung der Fluoreszenzlebensdauer die NADH Konzentration konstant bei  $23\mu\text{M}$  gehalten, während die Enzymkonzentration im Bereich zwischen  $0,23\mu\text{M}$  bis  $23\text{mM}$  variiert wurde. Das Prinzip des Glucosesensors ist wie folgt:

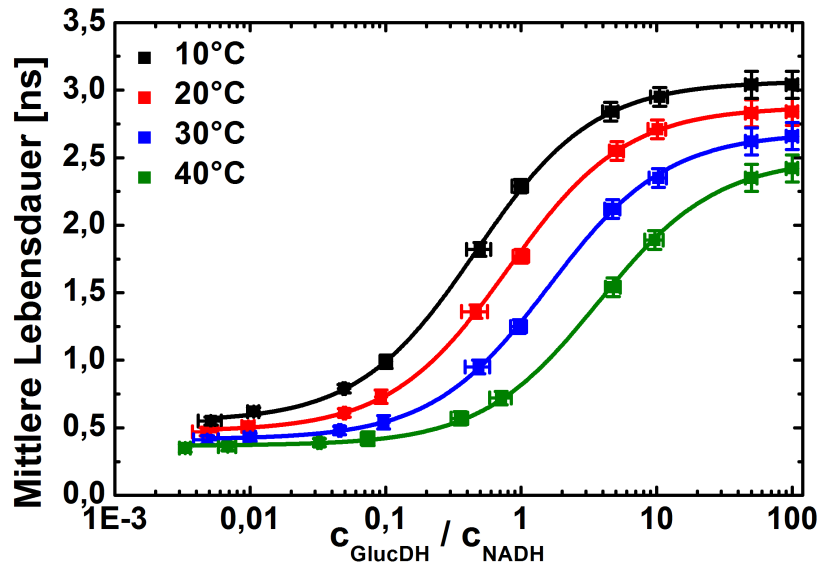


Abbildung 6.6: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von NADH vs. Konzentrationsverhältnis NADH zu GlucDH bei verschiedenen Temperaturen

Ist die NADH Konzentration sehr viel höher als die GlucDH Konzentration (viel Glucose), so ist der Großteil der NADH Moleküle frei und die mittlere Lebensdauer  $\tau_{av}$  entspricht der mittleren Fluoreszenzlebensdauer von freiem NADH  $\tau_{frei} = 0,46(1)\text{ns}$  (bei  $20^\circ\text{C}$ ). Dominiert die GlucDH Konzentration gegenüber der NADH Konzentration (wenig Glucose), so ist der Großteil der NADH Moleküle gebunden und folglich entspricht  $\tau_{av}$  der Lebensdauer von gebundenem NADH ( $\tau_{geb} = 2,9(1)\text{ns}$  bei  $20^\circ\text{C}$ ). Im Bereich zwischen diesen zwei Extrema kommt es zu einer starken Änderung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer mit dem Konzentrationsverhältnis.

Gleichzeitig kann man anhand der Abbildung 6.6 eine Temperaturabhängigkeit der mittleren Lebensdauer und damit des Sensors erkennen.

### 6.3.2 Messung mit cNADH

Die Messung von Abschnitt 6.3.1 wurde analog für cNADH wiederholt. Abbildung 6.7 zeigt die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  von cNADH in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses von GlucDH und cNADH. Analog zur Messung der

Bindungskonstante saturiert die Kurve nicht. Nicht alle cNADH Moleküle sind an das GlucDH gebunden.

Ein Versuch die GlucDH Konzentration zu erhöhen, scheiterte an der Löslichkeit des verwendeten Lyophilisats. Ein weiterer Versuch die Sättigung der Kurve zu erreichen, bestand in der Verdünnung der Konzentration des Coenzym ((c)NADH) um den Faktor 10. Dadurch wäre ein Konzentrationsverhältnis von über 1000 möglich gewesen. Ein Vergleich der Messung mit einer Coenzymkonzentration von  $23\mu\text{M}$  und  $2,3\mu\text{M}$  ist in Abbildung 6.8 dargestellt.

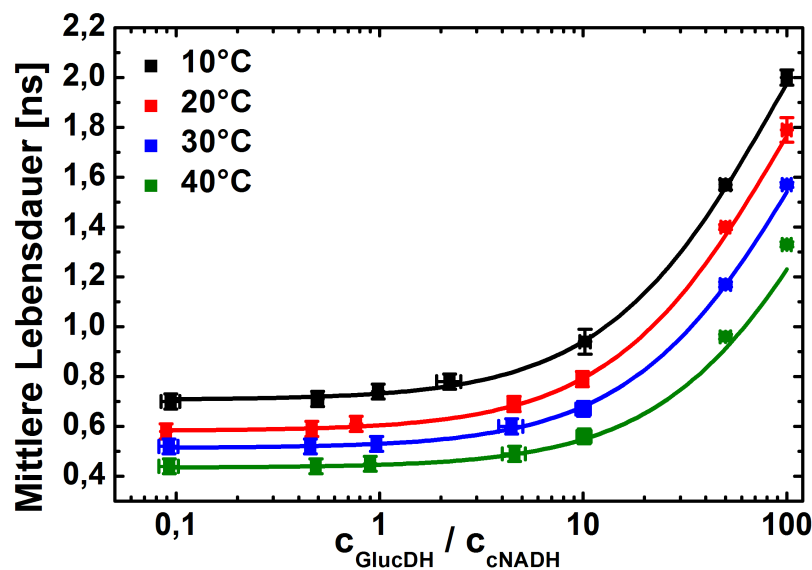


Abbildung 6.7: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von cNADH vs. Konzentrationsverhältnis cNADH zu GlucDH bei verschiedenen Temperaturen

Die Fluoreszenzlebensdauer hängt dabei von der Konzentration des Coenzym und nicht allein von dem Konzentrationsverhältnis ab. Die Messung wurde mit NADH durchgeführt, da die Substratmenge an cNADH sehr beschränkt war.

Um dieses Phänomen erklären zu können, wurde eine weitere Messung durchgeführt, in der das Konzentrationsverhältnis in Trispuffer bei  $20^\circ\text{C}$  konstant bei 1 belassen wurde, aber die Einzelkonzentration von GlucDH und NADH im Bereich zwischen  $2,8\mu\text{M}$  bis  $90\mu\text{M}$  variiert wurde. Anhand von Abbildung 6.8 rechts erkennt man, dass die Fluoreszenzlebensdauer sich mit der steigender Coenzym (NADH) Konzentration erhöht. Die so erhaltene Kurve kann mit Gleichung 6.2 gefittet werden, wobei die hierbei ermittelte Bindungskonstante mit  $K_B=0,007(3)\mu\text{M}^{-1}$  innerhalb der Fehlergrenzen mit der Bindungskonstante von Abschnitt 6.2 übereinstimmt.

Folglich ist die mittlere Fluoreszenzlebensdauer in Übereinstimmung mit dem Massenwirkungsgesetz von der totalen GlucDH- bzw. NADH Konzentration und nicht nur vom Konzentrationverhältnis GlucDH zu NADH abhängig. In dem gewählten Konzentrationsbereich verhält sich das Enzym analog zur Michaelis-Menten Kinetik.

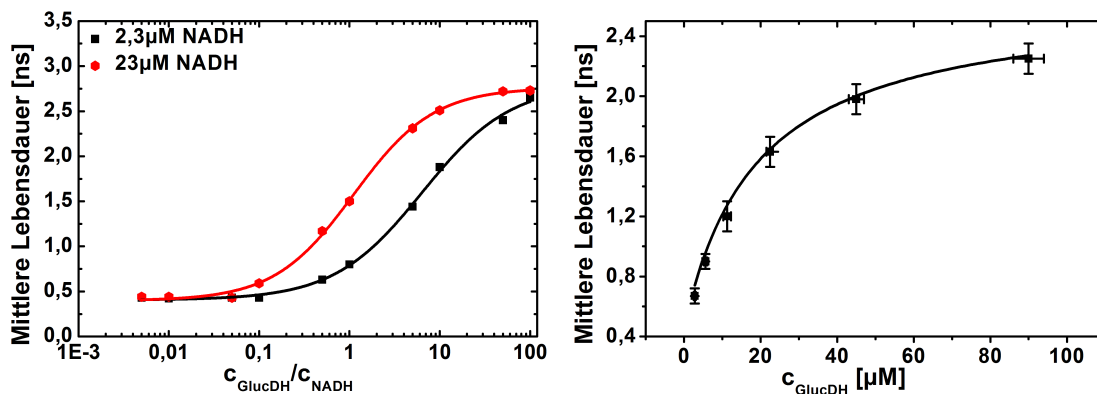


Abbildung 6.8: **Einfluss der Coenzymkonzentration auf die Lebensdauer:** links: Lebensdauer in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses GlucDH zu NADH bei verschiedenen NADH Konzentrationen. Rechts: Verdünnungsreihe NADH/GlucDH bei gleichbleibendem Konzentrationsverhältnis von 1.

#### 6.4 Messung der Aktivität eines Enzyms über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer

Betrachten wir noch einmal näher die Abbildungen 6.6 und 6.7: Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer ist gegen das Konzentrationsverhältnis Enzym zu Coenzym d.h. GlucDH zu (c)NADH aufgetragen. Streng genommen ist die Tatsache, ob (c)NADH an das Enzym gebunden oder frei vorliegt, nicht von der Konzentration des Enzyms, sondern von der Konzentration des *aktiven* Enzyms abhängig. Dies bedeutet, dass man mit Hilfe der Messung der Fluoreszenzlebensdauer die Aktivität des Enzyms bestimmen können müsste. Um dies näher zu untersuchen wurden Deckgläser mit Teststreifenmasse beschichtet, welche unter anderem cNAD und das Enzym enthielt. Ein Teil dieser „Teststreifen“ wurde 2 und 4 Tage bei 60°C und 80% Luftfeuchtigkeit eingelagert, um die Aktivität des Enzyms zu reduzieren. Die Aktivität dieser „Teststreifen“ wurde über ein herkömmliches Verfahren von Dr. S. Gawenda photometrisch bestimmt. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzlebensdauer der Teststreifen jeweils nach Benetzung mit 5 µl einer 60mg/dl, einer 150mg/dl und einer 300mg/dl Glucoselösung gemessen.

In Abbildung 6.9 (a) ist die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit der Glucosekonzentration für verschiedene Aktivitäten des Enzyms dargestellt. Mit steigender Glucosekonzentration sinkt die Fluoreszenzlebensdauer. Dies ist zu erwarten, da mit steigender Glucosekonzentration mehr NADH gebildet wird und somit die Konzentration an NADH und damit die Konzentration an freiem NADH ansteigt. Folglich muss die Fluoreszenzlebensdauer mit steigender Glucosekonzentration abnehmen.

Zusätzlich kann man erkennen, dass die Fluoreszenzlebensdauer mit sinkender Aktivität steigt. (Abb.6.9 (b)). Dieser Trend lässt sich dadurch erklären, dass bei einer geringeren Aktivität weniger NADH gebildet wird und folglich die Konzentration an freiem NADH sehr gering ist.

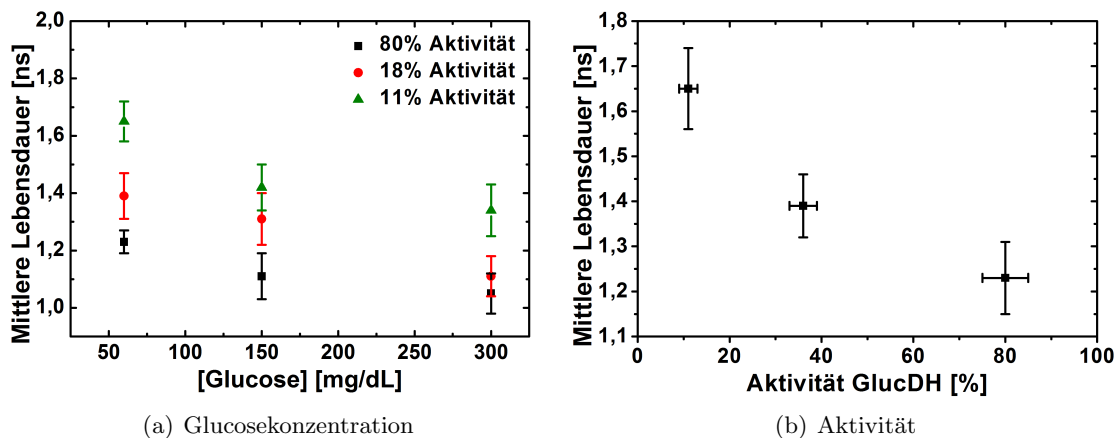


Abbildung 6.9: **Lebensdauer vs. Glucosekonzentration und Aktivität:** Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer sinkt mit steigender Glucosekonzentration und steigt mit sinkender Aktivität des Enzyms.

## 6.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass man durch Messung der Fluoreszenz zwischen gebundenem und freiem NADH unterscheiden kann. Dies kann dazu benutzt werden, Bindungskonstanten eines Enzyms (GlucDH) mit einem Fluorophor ((c)NADH) zu bestimmen. Insbesondere wurde eine neue Methode zur Bestimmung der Bindungskonstante über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer eingeführt und die Ergebnisse mit einer bekannten Methode (Fluoreszenzintensität) verifiziert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NADH und cNADH über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer als Glucosesensor, Temperatursensor und Aktivitätssensor dienen können. Eine herkömmliche Glucosebestimmung kann bei gegebener Temperatur durch eine zusätzliche Fluoreszenzlebensdauermessung lagerbedingte Aktivitätsverluste kompensieren und das Ergebnis der Glucosebestimmung somit verbessern.



## 7 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die spektroskopischen Eigenschaften des Nikotinamidadenindinukleotid-Analogs (NAD) carba-Nikotinamidadenindinukleotid (cNAD) zu untersuchen, welches sich durch erhöhte Stabilität auszeichnet [13]. NAD und cNAD können zur Detektion von Glucose verwendet werden, wobei die Produkte der enzymatischen Umsetzung NADH bzw. cNADH über die Messung der Absorption, der Fluoreszenzintensität und/oder der Fluoreszenzlebensdauer detektiert werden können [8, 32]. Folglich ist es von großer Wichtigkeit die spektroskopischen Eigenschaften von (c)NAD und (c)NADH im Detail zu kennen und zu verstehen.

Der Fokus dieser Arbeit lag insbesondere auf der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie. cNADH hat zwei Fluoreszenzlebensdauern, die innerhalb der Fehlergrenzen mit denen von NADH übereinstimmen. Um der Ursache dieser beiden Lebensdauern auf den Grund zu gehen, wurden verschiedene Modelle aufgestellt und überprüft. Die betrachteten Fluoreszenzlöschprozesse beinhalteten Löschung durch Stöße, Reaktionen im angeregten Zustand, sowie die Existenz zweier Zustände.

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften von an ein Enzym (z.B. Glucosedehydrogenase) gebundenes (c)NADH von denen von frei vorliegendem (c)NADH unterscheiden. Dieser Unterschied bietet die Möglichkeit, präzise enzymatische Charakteristika wie die Bindungskonstante über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen. Dabei kann insbesondere durch Kombination zweier Messverfahren (z.B. der Absorption und der Fluoreszenzlebensdauer) die Aktivitätsbestimmung als zusätzliche Kontrollinstanz in diagnostische Messsysteme integriert werden.

Im Folgenden werden zunächst die spektroskopischen Eigenschaften von freiem NADH und cNADH eingehender diskutiert und mit der Literatur verglichen. Experimentell erzielte Ergebnisse werden mit den Ergebnissen der quantenchemischen Rechnungen verknüpft und ein tiefergehendes Verständnis für die spektroskopischen Eigenschaften von (c)NADH entwickelt. Das Kapitel schließt mit einer kritischen Betrachtung zur Anwendung von Fluoreszenzlebensdauermessungen in der Bestimmung der Bindungs- und Dissoziationskonstanten, sowie in der Glucosemessung.

### 7.1 Spektroskopische Eigenschaften von freiem NADH und cNADH

Das Absorptionsmaximum von cNAD liegt bei 260(1)nm und stimmt mit der Lage des Absorptionsmaximums von NAD überein [55]. Die Absorptionsbande ist dabei auf die Absorptionseigenschaften des Adenins [79] und des Nikotinamids [80] zurückzuführen. Der Extinktionskoeffizient bei 260nm von cNAD stimmt ebenfalls mit dem von NAD überein ( $\epsilon = 16,9mM^{-1}cm^{-1}$ ) [55]. Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen konnte erstmalig der Extinktionskoeffizient von reinem cNAD bestimmt werden. Der Unterschied zum Literaturwert ( $\epsilon_{cNAD} = 15,4mM^{-1}cm^{-1}$ ) ist in der Tat darauf zurückzuführen, dass Slama et al. den Extinktionskoeffizienten einer cNAD-Mischung, welche cNAD und sein

Diastereomer „pseudo cNAD“<sup>8</sup>, enthielt, bestimmten [15].

Durch die Reduzierung von (c)NAD zu (c)NADH entsteht ein weiteres Absorptionsmaximum. Dieses liegt für NADH bei 340(1)nm [55] und für cNADH bei 360nm in Übereinstimmung mit Literaturangaben. [15] Der Extinktionskoeffizient von cNADH bei 360nm stimmt mit dem Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340(1)nm [55] überein und beträgt  $\epsilon_{cNADH} = 6,2(2)mM^{-1}cm^{-1}$ . Slama et al. haben einen um den Faktor 2 geringeren Extinktionskoeffizienten für ein cNADH-pseudo-cNAD Gemisch bestimmt [15]. Der Unterschied im Extinktionskoeffizient lässt sich dadurch erklären, dass pseudo-cNAD kein Coenzym der in Ref. [15] verwendeten Alkoholdehydrogenase (ADH) ist, d.h. pseudo cNAD kann nicht durch ADH zu pseudo-cNADH reduziert werden. [15] Damit hat pseudo cNAD keinen Anteil an der Absorptionsbande bei 360nm, wodurch der niedrigere Extinktionskoeffizient erklärt werden kann. Darüber hinaus konnte der Extinktionskoeffizient von cNADH durch eine zusätzliche Messung, der Reduzierung von purem cNAD mit ADH, bestätigt werden (siehe Anhang).

Erwartungsgemäß sind weder die Absorptionseigenschaften von (c)NAD noch von (c)NADH von der Temperatur im Bereich zwischen 5°C und 40°C abhängig.

Betrachtet man den Unterschied der Absorptionseigenschaften von NADH und cNADH in Bezug auf einen möglichen zukünftigen Glucosesensor, so hat die spektrale Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von cNADH den Vorteil, dass die Verfügbarkeit von Leuchtdioden mit einer Zentralpeakwellenlänge bei 360nm größer ist als bei 340nm (für NADH). Gleichzeitig hätte ein niedrigerer Extinktionskoeffizient bei cNADH zu einem schwächeren Absorptions- und Fluoreszenzsignal geführt, so dass der Nachweis des identischen Extinktionskoeffizienten eine erfreuliche Nachricht für die Glucosesensorik ist.

Im Gegensatz zu den Absorptionsmaxima stimmt die Lage des Fluoreszenzmaximums von cNADH innerhalb der Fehlergrenzen mit dem von NADH überein und liegt bei 464(2)nm. Die Literaturangaben der Lage des Fluoreszenzmaximums von NADH variieren zwischen 470nm und 440nm. [17, 19, 24, 94] Analog zu den Absorptionseigenschaften ist dies das erste Mal, dass die Fluoreszenzeigenschaften von praktisch reinem cNADH ( $\geq 98\%$ ) bestimmt wurden. Die leichte Abweichung zum Wert von Slama et al. (456nm) kann unter Umständen darauf zurückzuführen sein, dass sich in der von Slama et al. bestimmten Lösung zusätzlich das Enzym ADH befand [15]. Bindet cNADH an das Enzym so müsste dies zu einer leichten Blauverschiebung der Lage des Fluoreszenzmaximums führen, wie schon für NADH bei Bindung an ein Enzym berichtet [95–97].

Die Quantenausbeute von cNADH ist höher als von NADH und beträgt bei 20°C  $Q=0,024(2)$ . Die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Quantenausbeute von NADH ( $Q = 0,016(1)$ ) stimmt nicht mit dem in Ref. [19] bestimmten Literaturwert überein. Dieser Unterschied kann sich dadurch erklären lassen, dass Scott et al. als Referenzquantenausbeute von Quinine Hemisulfat nicht den häufig zitierten Wert von

---

<sup>8</sup> Die Nomenklatur „pseudo cNAD“ wurde aus Ref. [15] übernommen, um die Einheitlichkeit der Nomenklatur zu gewährleisten.

$Q = 0,055$  [33, 35], sondern  $Q = 0,070$  [19] verwendet haben.

Die höhere Quantenausbeute von cNADH im Vergleich zu NADH und damit das höhere Fluoreszenzsignal von cNADH führen zu einem besseren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und verbessern folglich die Präzision eines auf Fluoreszenzmessung basierten Glucosesensors.

Zusammenfassend führt die Ersetzung des Sauerstoffs an der Ribose von NADH durch eine Methylengruppe zu einer Verschiebung in der Absorption um 20nm, allerdings bleibt die Lage des Fluoreszenzmaximums von der Änderung der chemischen Struktur unberührt. Zum besseren Verständnis dieser spektroskopischen Eigenschaften wurden quantenchemische Rechnungen an NADH und cNADH mittels zeitabhängiger Dichtefunktionaltheorie (TDDFT, CAM-B3LYP/cc-pVDZ) durchgeführt. Rechnungen in der Gasphase bei idealisierten 0K ergaben eine Verschiebung der Absorption um  $\Delta E=0,161\text{eV}$  bzw.  $\Delta\lambda=15,7\text{nm}$ . Die Anregung vom  $S_0$  in den  $S_1$  entspricht einem HOMO-LUMO Übergang<sup>9</sup>. Diese Anregung liegt nur auf dem Dihydrinikotinamidnukleotid-Rest des Moleküls und entspricht in Übereinstimmung mit der Literatur einer  $\pi\pi^*$  Anregung [31]. Eine Überprüfung, ob die spektroskopischen Unterschiede von cNADH und NADH auch durch eine Modellverbindung, welche nur aus dem Dihydrinikotinamid-Rest und der Ribose aufgebaut ist (Dihydrinikotinamidmononukleosid, NMNH'), beschrieben werden kann, wurde bestätigt. Die Energiedifferenz zwischen NMNH' und cNMNH' betrug  $\Delta E=0,155\text{eV}$  bzw.  $\Delta\lambda=15,1\text{nm}$ . Der Übergang vom  $S_0$  in den  $S_1$  ist analog zu den Rechnungen von NADH und cNADH erwartungsgemäß ein HOMO-LUMO Übergang.

Zur Ursachenfindung der spektralen Verschiebung wurden die effektiven Atomladungen von NMNH' und cNMNH' über die Mulliken Ladungen bestimmt. Durch Ersetzung des Sauerstoffs durch eine Methylengruppe bei cNADH kommt es zu einer Ladungsverschiebung am Cyclopentanring (des veränderten Zuckers). Der Sauerstoff des NMNH' ist negativ geladen, während der Kohlenstoff der Methylengruppe von cNMNH' positiv geladen ist. Gleichzeitig ist der Kohlenstoff zwischen dem Stickstoff am Dihydrinikotinamid und der Methylengruppe bzw. dem Sauerstoff für NMNH' positiv geladen, während er für cNMNH' annähernd neutral ist. Diese Ladungsverschiebung lässt sich durch die höhere Elektronegativität des Sauerstoffs gegenüber dem Kohlenstoff der Methylengruppe erklären. Die Auswirkungen dieser Ladungsverschiebung scheint somit die Ursache der spektralen Verschiebung in der Absorption zu sein.

NADH und cNADH können in zwei verschiedenen isomeren Formen der Amidgruppe des Dihydrinikotinamids vorliegen. Die quantenchemischen Rechnungen bestätigten die auf NMR-Messungen basierten Ergebnissen von Fischer et al., denen zu Folge die transoide Form (Sauerstoff der Amidgruppe zeigt zum Stickstoff des Dihydrinikotinamids) die energetisch günstigere und damit präferierte Isomerie ist [31].

Die quantenchemischen Rechnungen zur Fluoreszenz in der Gasphase ergaben, dass die spektrale Verschiebung zwischen NMNH' und cNMNH' bei der Fluoreszenz 11nm beträgt.

<sup>9</sup> HOMO: highest occupied molecular orbital, LUMO: lowest unoccupied molecular orbital

Berücksichtigt man Lösungsmittelleffekte über das „polarizable continuum model“ (PCM), in dem die Eigenschaften des Lösungsmittels als Ganzes (Kontinuum) betrachtet werden, so hat der Einfluss des Lösungsmittels keine Auswirkung auf die spektrale Verschiebung von NMNH' und cNMNH' bei der Absorption, wohl aber auf die Fluoreszenz. Unter Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten verkleinert sich die spektrale Verschiebung für transoides NMNH' auf  $\Delta E=0,04\text{eV}$  ( $\Delta\lambda=5,9\text{nm}$ ) im Vergleich zu transoidem cNMNH' und auf  $\Delta E=0,019\text{eV}$  ( $\Delta\lambda=3,1\text{nm}$ ) für cisoides (c)NMNH'. Tendenziell wird unter Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten die spektrale Verschiebung zwischen NMNH' und cNMNH' und damit auch zwischen NADH und cNADH bei der Fluoreszenz geringer, in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen. Darüber hinaus ist die Abweichung der absoluten Energien der quantenchemischen Rechnungen von den experimentell erzielten Werten bei zusätzlicher Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten geringer, d.h. der Fehler der Methode beträgt bei den PCM-Rechnungen  $\Delta E=0,287\text{eV}$  im Vergleich zu  $\Delta E=0,485\text{eV}$  bei den Rechnungen in der Gasphase. Folglich können die experimentell erzielten Ergebnisse durch Rechnungen innerhalb des PCM besser beschrieben werden.

Gleichzeitig handelt es sich beim PCM um ein implizites Modell, d.h. das Lösungsmittel wird als Ganzes betrachtet und nicht der Einfluss jedes einzelnen Lösungsmittelmoleküls explizit. Dadurch kann das PCM den Einfluss von beispielsweise Wasserstoffbrücken nicht beschreiben bzw. berücksichtigen. Der Einfluss der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke an der Carbonylgruppe der Amidgruppe wäre z.B. in Hinsicht auf einen möglichen Fluoreszenzlöschprozess äußerst interessant, bedarf aber weitaus aufwändigerer Modelle. Eine mögliche Erklärung für die Übereinstimmung der Lage der Fluoreszenzmaxima von NADH und cNADH (bzw. (c)NMNH') können die Unterschiede in den statischen elektrischen Dipolmomenten darstellen. Die durch die Relaxation der Solvathülle hervorgerufene Rotverschiebung der Wellenlänge bei der Fluoreszenz gegenüber der Absorption ist stärker je polarer das Lösungsmittel und je größer das elektrische Dipolmoment des Fluorophors ist [33, 76–78]. Die Dipolmomente sind im Grundzustand und im angeregten Zustand für NMNH' größer als für cNMNH' und deren Differenz ist für NMNH' ebenfalls größer als für cNMNH'. Folglich käme es für NMNH' (bzw. NADH) zu einer stärkeren Rotverschiebung der Wellenlänge bei der Fluoreszenz, als für cNMNH' (bzw. cNADH), wodurch sich die Lage der Fluoreszenzmaxima einander annähern würde. Diese Hypothese kann experimentell überprüft werden, indem man die spektralen Verschiebungen der Fluoreszenz in Lösungsmitteln mit geringerer Dielektrizitätskonstante untersucht. Vergleicht man die Verschiebung in Wasser mit der in Methanol oder DMSO (vgl. Tab. 7.1), so bleibt die 20nm Verschiebung innerhalb der Fehlergrenzen erhalten, was folglich die aufgestellte These widerlegt.

Die quantenchemischen Rechnungen haben gezeigt, dass sich die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von NADH und Analogmolekülen von NADH durch TDDFT mit CAM-B3LYP/cc-pVDZ beschreiben lassen. Für die Entwicklung von Messsystemen, die auf der Detektion von NADH beruhen, hat dies den Vorteil, dass man die

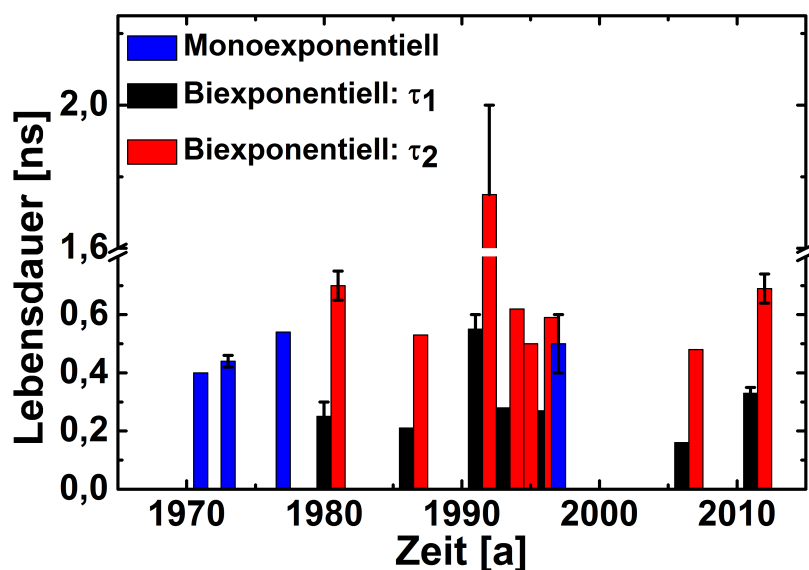


Abbildung 7.1: Zusammenfassung der publizierten Lebensdauer bzw. Lebensdauern von NADH von 1971 bis 2012.[16–26, 81]

spektroskopischen Eigenschaften von in Frage kommenden Coenzymen (NADH-Analoga) zuerst quantenchemisch (kostengünstig) voruntersuchen kann, um eine darauf basierende spektroskopische Selektion vor der Synthese vornehmen zu können. Auf diese Art ließe sich möglicherweise ein NADH Analoga finden, dessen Lage des Absorptionsmaximums noch weiter rot in Richtung des sichtbaren Wellenlängenbereichs verschoben ist.

Im Folgenden werden die Fluoreszenzlebensdauern von NADH und cNADH betrachtet. Wie bereits in der Einleitung erläutert variieren die Angaben sowohl der Anzahl der Fluoreszenzlebensdauern als auch der Werte der Lebensdauern stark [16–21, 88]. Nach gründlicher Überprüfung mittels  $\chi_r^2$ , der gewichteten Residuen, der Autokorrelation der Residuen und der zusätzlichen Auswertung durch die Maximum Entropie Methode (MEM), konnte sowohl für NADH als auch für cNADH ein biexponentieller Abfall der Fluoreszenzabklingkurve festgestellt werden. Die einzelnen Lebensdauern von NADH und cNADH stimmen dabei innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein und betragen für cNADH bei 20°C  $\tau_1 = 0,32(3)ns$  und  $\tau_2 = 0,68(3)ns$ . Die Werte stimmen für NADH innerhalb der Fehler mit den Werten von Couprie et al. und Visser et al. überein [18, 21]. Die seit 1971 publizierten Lebensdauern von NADH sind in Abbildung (Abb. 7.1) dargestellt und um einen zusätzlichen Eintrag im Vergleich zu Abb. 1.2 erweitert. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer ist analog zur Quantenausbeute für cNADH ( $\tau_{av} = 0,57(1)ns$ ) höher als für NADH ( $\tau_{av} = 0,46(1)ns$ ). Im Gegensatz zu den Absorptionseigenschaften sind die Fluoreszenzeigenschaften stark temperaturabhängig. Vergleicht man die Temperaturabhängigkeit der Quantenausbeute mit der Temperaturabhängigkeit der mittleren Fluoreszenzlebensdauer, so verhalten sich

beide gleich mit der Temperatur. Folglich wird nicht nur die Fluoreszenz von NADH in Übereinstimmung mit der Literatur dynamisch gelöscht, sondern auch die Fluoreszenz von cNADH.

## 7.2 Modelle zur Erklärung von zwei Fluoreszenzlebensdauern

Um jedoch die Ursache für die Existenz *zweier* Fluoreszenzlebensdauern ausfindig zu machen, wurden verschiedene Modelle aufgestellt und untersucht. Die Modelle beruhen alle auf der Existenz eines zweiten angeregten Zustandes. Es wurde untersucht, ob dieser zweite angeregte Zustand eine weitere isomere Form des (c)NADH Moleküls beinhaltet oder eine protonierte bzw. deprotonierte Form. Gleichzeitig wurden die spektralen Eigenschaften dieses hypothetischen Zustandes untersucht. In diesem Zusammenhang wurden als weitere Modelle das Löschen durch molekularen Sauerstoff und die Existenz einer geklappten und einer offenen Konformation untersucht.

Als erste Möglichkeit wurde ein Isomeriemodell überprüft, im Rahmen dessen die Existenz zweier isomerer Zustände (transoide und cisoider Ausrichtung der Amidgruppe des Dihydrornicotinamids) die zwei Lebensdauern erklären soll. Dazu wurde die Fluoreszenzlebensdauer des Chromophors (Dihydrornicotinamid, hier: „Dihydro“) und von einer cisoiden Modellverbindung (MV) des Dihydro untersucht. Sowohl Dihydro ( $\tau = 0,37(2)ns$ ), als auch die cisoider Modellverbindung ( $\tau = 0,40(1)ns$ ) haben jeweils nur eine Lebensdauer. Dies ist höchst überraschend, da man analog zu (c)NADH für Dihydro erwartet hätte, dass der Abfall biexponentiell ist. Dagegen war für MV nur eine Lebensdauer erwartet worden, allerdings hätte diese innerhalb der Fehlergrenzen mit einer der beiden Lebensdauern von (c)NADH übereinstimmen müssen. Aus diesen Gründen muss das Isomeriemodell verworfen werden.

Protonierung/Deprotonierung ist eine Reaktion im angeregten Zustand, die die Existenz von zwei Lebensdauern erklären könnte [34]. Dabei kann die Carbonylgruppe der Amidgruppe mit dem Lösungsmittel (Wasser) entweder eine Wasserstoffbrücke ausbilden oder protoniert oder deprotoniert vorliegen [83]. Protonierung und Deprotonierung sowie die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke stehen miteinander im Gleichgewicht. Dieses Modell wurde durch zwei Experimente überprüft. Zum Einen müssten die Fluoreszenzlebensdauern pH-abhängig sein, zum Anderen dürfte es in aprotischem Lösungsmittel nur noch eine Fluoreszenzlebensdauer geben.

Messungen in aprotischem Lösungsmittel (wasserfreies Dimethylsulfoxid, DMSO) ergaben ebenfalls die Existenz von zwei Lebensdauern, wobei das Lösungsmittel nur auf die zweite Lebensdauer einen signifikanten Einfluss hat ( $\tau_2 = 1,76(8)ns$ , Intensitätsanteil 79(7)% an der Gesamtintensität). Krishnamoorthy et al. haben die Fluoreszenzabklingkurve von NADH in DMSO triexponentiell gefittet, wobei die 3. Lebensdauer von 2,9ns einen Amplitudenanteil von ungefähr 3% hat [16]. Die dritte Lebensdauer kann unter Umständen auf Hintergrund zurückgeführt werden, zumal Krishnamoorthy et al. bei 310nm angeregt haben und DMSO im UV-Bereich absorbiert [38]. Die zusätzliche Auswertung der in

der vorliegenden Arbeit gemessenen Fluoreszenzabklingkurven über MEM bestätigten die Existenz von *zwei* Lebensdauern.

Darüber hinaus wurden die Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH bei pH 8,5 und pH 7 miteinander verglichen. Eine Abschätzung wie stark sich die Intensitätsanteile bei Änderung des pH-Wertes hätten ändern müssen, wurde mittels der Henderson-Hasselbach Gleichung durchgeführt. Dabei wurde angenommen, dass bei stark verdünnten Lösungen die Intensitätsanteile mit der Konzentration der Spezies gleichzusetzen sind:

$$pH - pH' = \log\left(\frac{[c_2]}{[c_1]}\right) - \log\left(\frac{[c_2']}{[c_1']}\right) \quad (7.1)$$

$[c_1]$  steht für die Konzentration der Säure (Intensitätsanteil  $\tau_1$ ) und  $[c_2]$  für die Konzentration der Base (Intensitätsanteil  $\tau_2$ ), Der Index ' steht für die jeweiligen Konzentrationen bei verändertem pH Wert (pH=8,5, pH'=7,  $[c_2]=0,55$  und  $[c_1]=0,45$ ). Die pH-Änderung von pH 8,5 auf pH 7 hätte zu einer ungefähr 96% Änderung des Intensitätsanteils von  $\tau_1$  führen müssen. Das Experiment zeigt jedoch, dass weder die Fluoreszenzlebensdauern noch die Intensitäts- und Amplitudenanteile der Fluoreszenzlebensdauern messbar vom pH-Wert beeinflusst werden. Da somit weder eine pH Abhängigkeit nachgewiesen werden konnte, noch der Fluoreszenzabfall in aprotischem Lösungsmittel monoexponentiell ist, kann das Protonierungs/Deprotonierungs Modell die Existenz der beiden Lebensdauern nicht erklären.

Nachdem weder eine zweite isomere (cisoide) Konformation noch eine protonierte bzw. deprotonierte Form des Moleküls den zweiten Zustand repräsentieren, sollten im Rahmen einer Verallgemeinerung des Isomeriemodells die spektralen Eigenschaften der beiden hypothetischen Zustände untersucht werden (Spektralmodell). Betrachtet wurde der Fall, dass  $\nu \gg \nu'$  ist, d.h. sich die beiden Zustände deutlich spektral unterscheiden. Am blauen und am roten Ende des Fluoreszenzspektrums sollten sich folglich die Intensitätsanteile der einzelnen Lebensdauern an der Gesamtintensität ändern. Die spektrale Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauern wurde durch zwei Bandpassfilter (427/10 und 513/17) im Detektionsstrahlengang des Lebensdauerspektrometers verwirklicht. Die Intensitätsanteile der beiden Lebensdauern an der Gesamtintensität stimmen innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein. Die Lage der Detektionsfilter wurde anhand des Fluoreszenzspektrums von NADH optimiert (vgl. Abb. 7.2). Das Fluoreszenzspektrum lässt sich mittels zweier hypothetischer Gaussfunktionen mit Zentralwellenlängen bei 447(2)nm und 493(20)nm fitten. Die zu erwartende Änderung der Intensitätsanteile durch spektrale Selektion wurde dann durch die Bestimmung der Flächenanteile der jeweiligen Peaks bei den jeweiligen Filtern überprüft. Die Flächenanteile wurden über Integration der gefitteten Kurven bestimmt. Mit einem Langpassfilter (ab 390nm) betragen die Anteile von Spezies 1 (grün) damit 53,5% und von Spezies 2 (violett) 47,5% an der Gesamtfläche. Vergleicht man diese Werte mit den Intensitätsanteilen der beiden Lebensdauern von NADH an der Gesamtintensität (vgl. Tab. 7.1), so würden diese Werte in der Tat innerhalb der Fehlergrenzen miteinander

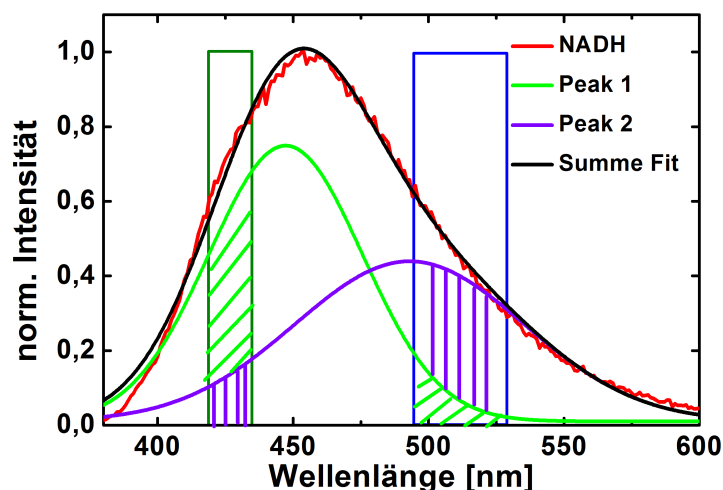


Abbildung 7.2: Abschätzung der erwarteten Veränderung der Intensitätsanteile der beiden Lebensdauern bei unterschiedlichen Detektionsfiltern.

übereinstimmen.

Bei Verwendung eines der beiden Bandpassfilter hätten sich die Intensitätsanteile nach der Abschätzung um 31% im Vergleich zum Langpassfilter ändern müssen. Dies ist nicht der Fall gewesen. Folglich scheint es entweder, in Übereinstimmung mit der Literatur, nur eine fluoreszierende Spezies zu geben [98], oder aber die beiden Zustände unterscheiden sich spektral nur sehr geringfügig, wodurch ihre spektrale Abhängigkeit innerhalb der Messgenauigkeit nicht detektierbar war.

Daraufhin wurde zuerst ein sogenanntes Gleichgewichtsmodell aufgestellt, bei dem die beiden angeregten Zustände miteinander im Gleichgewicht stehen, allerdings in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der spektralen Analyse, nur ein Zustand emittiert, während der andere strahlungslos in den Grundzustand übergeht. Damit der Fluoreszenzlöschprozess den Anforderungen eines dynamischen Fluoreszenzlöschprozesses genügt, muss der zweite Zustand entweder durch Stöße z.B. mit Lösungsmittelmolekülen gelöscht werden, oder durch eine weitere Reaktion des angeregten Zustandes (z.B. durch photoinduzierten Elektronentransfer, PET). Ein typischer dynamischer Fluoreszenzlöschprozess ist die strahlungslose Abregung durch Stöße mit molekularem Sauerstoff, höchstwahrscheinlich über intersystem crossing (ISC) [84, 99]. Der Einfluss von Sauerstoff wurde durch den Vergleich der Fluoreszenzlebensdauer in sauerstoffhaltigem gegenüber sauerstofffreiem Puffer untersucht. Weder die mittlere Fluoreszenzlebensdauer, noch die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern, bzw. deren Intensitätsanteile an der Gesamtintensität unterschieden sich in sauerstofffreiem Puffer von denen in sauerstoffhaltigem Puffer. Anhand einer Referenzmessung mit Sauerstoff-sensitivem Pyrogallol konnte abgeschätzt werden, dass „Sauerstofffreier“ Puffer im Gegensatz zu sauerstoffhaltigem Puffer einen um mindestens eine Größenordnung geringeren Sauerstoffgehalt (vgl. Kapitel 2.8) hat. Diese Abschätzung stellt eine



Obergrenze dar. Bei Einhaltung der gängigen Schlenktechnik [58] geht man in der Chemie davon aus, dass der Sauerstoffgehalt typischerweise im Bereich von wenigen ppm liegt, d.h. um einen Faktor 1000 geringer ist, als in sauerstoffhaltiger Lösung. Schätzt man die Rate des strahlungslosen Zerfalls durch die Stoßrate  $k_{nr} = \sigma \cdot nv$  ab, wobei  $\sigma$  der Wirkungsquerschnitt,  $n$  die Teilchendichte des Quenchers ( $O_2$ ) und  $v$  die mittlere Geschwindigkeit des Quenchers ist, so hätte sich die Rate des strahlungslosen Zerfalls im sauerstofffreiem Puffer um mindestens den Faktor 10 verringern müssen. Möchte man das Gleichgewichtsmodell durch Löschung mit  $O_2$  erklären, so müsste die strahlungslose Rate  $k_{nr}$  im Vergleich zur strahlenden Rate  $\Gamma$  der dominanter Prozess sein. Es gilt  $\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \approx 1/k_{nr}$  und damit hätte die Lebensdauer um mindestens einen Faktor 10 ansteigen müssen. Die einzelnen Fluoreszenzlebensdauern, sowie die mittlere Fluoreszenzlebensdauer stimmten aber in „sauerstofffreiem“ Puffer innerhalb der Fehlergrenzen mit denen in sauerstoffhaltigem Puffer überein. Folglich hat molekularer Sauerstoff keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer von NADH und cNADH und kann als Ursache für die Existenz der zweiten Lebensdauer ausgeschlossen werden. Gleichzeitig ist mit diesem Ergebnis allerdings das Gleichgewichtsmodell nicht widerlegt, sondern lediglich ein möglicher dynamischer Fluoreszenzlöschprozess innerhalb dieses Modells ausgeschlossen worden. Weitere Untersuchungen in anderen Lösungsmitteln müssen hier noch folgen.

Im Einklang mit den Ergebnissen des Spektralmodells ist die Alternative zu einer strahlungslosen Abregung des zweiten Zustandes, die Tatsache, dass die Energiedifferenz zwischen dem angeregten Zustand und dem Grundzustand für beide Zustände annähernd gleich sind. Durch NMR-Messungen und spektroskopische Überprüfung eines Energietransfers zwischen Adenin und Dihydrinikotinamid konnte nachgewiesen werden, dass NADH in einer offenen und in einer geklappten Konformation in wässriger Lösung vorliegt [86–88, 100]. Bei der geklappten Konformation ist ein Energietransfer vom Adenin auf das Dihydrinikotinamid möglich, da die beiden Aromaten nahe beieinander sind.[42, 89] Dies ist bei der offenen Konformation nicht der Fall. Desweiteren wird in der Literatur über den Einfluss des Adenins auf die zwei Fluoreszenzlebensdauern diskutiert [16, 17, 20, 21, 88]. Die Hypothese besagt, dass die beiden Lebensdauern auf die beiden unterschiedlichen Konformationen zurückzuführen sind [18]. Im Rahmen eines Konformationsmodells wurde sowohl der Einfluss des Adenins als auch der beiden Konformationen auf die Fluoreszenzlebensdauer untersucht. Die geklappte Konformation konnte dabei selektiv durch Anregung bei 260nm und Detektion der Fluoreszenz bei 380 bis 600nm, aufgrund des Energietransfers vom Adeninrest zum Dihydrinikotinamid, untersucht werden. Die Effizienz des Energietransfers wurde durch das Verhältnis von  $Q$  bei 260nm zu  $Q$  bei 340nm bzw. 360nm bestimmt, wobei die Quantenausbeuten um die Absorption des Dihydrinikotinamids bei 260nm (über (c)NMNH bestimmt) korrigiert wurden. Der Energietransfer bei cNADH ist mit 71(7)% innerhalb der Fehlergrenzen genauso effizient wie bei NADH (67(6)%). Der Wert stimmt für NADH mit der Literaturangabe überein [88].

Die offene Konformation konnte selektiv untersucht werden, indem eine Modellverbindung ohne Adenosinmonophosphat (Dihydrornikotinamidmononukleotid (NMNH) bzw. cNMNH) untersucht wurde. Die Fluoreszenzabklingkurve der geklappten und der offenen Konformation von cNADH konnten beide monoexponentiell gefittet werden, wobei die Lebensdauer der offenen Konformation (cNMNH) mit  $\tau = 0,30(2)ns$  innerhalb der Fehlergrenzen mit der kürzeren Lebensdauer von cNADH übereinstimmt. Die Lebensdauer der geklappten Konformation ( $\tau = 0,65(2)ns$ ) entspricht dagegen innerhalb der Fehlergrenzen der langen Lebensdauer von cNADH. Folglich können die beiden Lebensdauern von cNADH über die offene und die geklappte Konformation beschrieben werden. Das Fluoreszenzspektrum der geklappten Konformation stimmt mit dem der offenen Konformation überein. Beide Zustände sind somit innerhalb der Messgenauigkeit energetisch entartet und stehen damit nicht im Widerspruch zu dem Ergebnis der spektralen Unabhängigkeit der beiden Lebensdauern.

Bei NADH haben sowohl die offene Konformation ( $\tau_1 = 0,24(2)ns$ ,  $\tau_2 = 0,54(3)ns$ ), als auch die geklappte Konformation ( $\tau_1 = 0,37(4)ns$ ,  $\tau_2 = 0,64(3)ns$ ) jeweils 2 Lebensdauern. Die Werte der offenen Konformation (NMNH) stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den Literaturwerten überein,[16, 20] sind allerdings im Vergleich zu den Lebensdauern von NADH zu niedrigeren Werten verschoben. Die Konformationshypothese kann folglich für NADH nicht aufrechterhalten werden. Eine biexponentielle Funktion hätte laut Hypothese die Fluoreszenzabklingkurve von NADH bei Anregung mit 370nm (es werden sowohl die offene-, als auch geklappte Konformation angeregt) nicht adäquat beschreiben dürfen. Folglich muss NADH im Vergleich zu cNADH unterschiedlichen Fluoreszenzlöschprozessen unterliegen. Diese These wird durch die höhere Quantenausbeute von cNADH gegenüber NADH unterstützt, sowie der geringfügigen aber konsistent auftretenden Abweichung des Emissionsspektrums von NADH im Vergleich zu cNADH in einem Wellenlängenbereich unterhalb von 450nm.

Zusätzlich wurde bei (c)NADH der Einfluss von Methanol (MeOH) im Speziellen auf die geklappte Komponente überprüft. NMR-Studien zu Folge sollen sich der Adeninrest und der Dihydrornikotinamidrest in MeOH weiter voneinander entfernen. Dadurch wird der Energietransfer ineffizienter [87, 88, 93, 101, 102]. Die Literaturangaben konnten in der Hinsicht bestätigt werden, als dass die Quantenausbeute von (c)NADH bei Anregung der geklappten Komponente um über einen Faktor 5 abnimmt. Das bedeutet die Effizienz des Energietransfers nimmt drastisch ab (vgl. Tabelle 7.1). Auf der anderen Seite hat die geklappte Konformation von cNADH überraschenderweise 2 Lebensdauern, die mit den beiden Lebensdauern von cNADH in Methanol bei Anregung beider Konformationen (370nm) übereinstimmen. Sie betragen  $\tau_1 = 0,63(2)ns$  und  $\tau_2 = 1,9(1)ns$ . Man hätte eigentlich wiederum nur eine Lebensdauer erwartet, die mit der längeren Lebensdauer von cNADH in MeOH übereinstimmen hätte müssen. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av} = 0,97(5)ns$  verhält sich gegensätzlich zur Quantenausbeute, d.h.  $Q$  nimmt ab, während  $\tau_{av}=0,92(5)ns$  zunimmt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die geringere Effizienz des Energietransfers der Anteil des bei 260nm anregbaren Dihydrornikotinamids

größer wird. Folglich wird die offene Konformation durch die Anregung bei 260nm in MeOH verstärkt angeregt. Dies hätte sich allerdings auf die Intensitätsanteile der beiden Lebensdauern auswirken müssen. Die Intensitätsanteile hätten sich im Vergleich zur Messung in MeOH bei 370nm (beide Konformationen werden angeregt) verändern müssen. Die Intensitätsanteile stimmen aber innerhalb der Fehlergrenzen miteinander überein.

Dieses überraschende Ergebnis und die Tatsache, dass den Ergebnissen zu Folge NADH und cNADH in Wasser unterschiedlichen Fluoreszenzlöschprozessen unterliegen soll, lässt am Konformationsmodell, zumindest für NADH in H<sub>2</sub>O und MeOH und cNADH in MeOH, Zweifel aufkommen.

Zusammenfassend konnte widerlegt werden, dass eine zweite isomere Konformation für die zwei Lebensdauern verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass Protonierung und Deprotonierung zwar einen Einfluss auf die längere Lebensdauer hat, allerdings konnte das vorgeschlagene Modell so nicht bestätigt werden. Gleichzeitig werden die Lebensdauern weder vom pH-Wert, noch von Sauerstoff beeinflusst, allerdings konnte eine starke Lösungsmittelabhängigkeit der Lebensdauern nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der spektralen Untersuchungen ergaben, dass es entweder nur eine fluoreszierende Spezies gibt, oder sich die Übergänge der beiden angeregten Zustände in den Grundzustand kaum energetisch unterscheiden. Die Fluoreszenzabklingkurven sind zum Großteil biexponentiell, teilweise aber auch monoexponentiell. cNADH unterliegt einem anderen Fluoreszenzlöschprozess als NADH. Für cNADH konnte die lange Lebensdauer in H<sub>2</sub>O durch eine geklappte Konformation und die kurze Lebensdauer durch eine offene Konformation von cNADH erklärt werden. Für NADH gilt dies nicht. Allerdings konnte sowohl für NADH als auch für cNADH das sogenannte Gleichgewichtsmodell nicht widerlegt werden. Der Vorteil dieses Modells liegt darin, dass es sowohl zwei Lebensdauern, als auch eine Lebensdauer erklären kann. Ist z.B. die Rückreaktion  $k_{-1}$  sehr viel schneller als alle anderen Reaktionen, so wird die Fluoreszenzlebensdauer von  $k_r$  und  $k_{nr}$  dominiert und folglich gibt es nur eine Lebensdauer. Gleichzeitig kann auch die starke Lösungsmittelabhängigkeit durch deren Einfluss auf die verschiedenen Gleichgewichtskonstanten erklärt werden, sowie die spektrale Unabhängigkeit der beiden Lebensdauern.

Die geringen Quantenausbeute von NADH und cNADH lässt darüber hinaus den Schluss zu, dass es einige Reaktionen im angeregten Zustand geben muss, die aufgrund der Zeitauflösung im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten. Zukünftig könnten Untersuchungen mit höherer Zeitauflösung z.B. durch transiente Absorptionsspektroskopie mehr Informationen über den zweiten angeregten Zustand liefern, um zum Verständnis der Reaktionen im angeregten Zustand und damit auch der beiden Lebensdauern beizutragen. In diesem Zusammenhang wäre besonders die genauere Untersuchung der Ergebnisse von Czochralska et al. und Boldrige et al. von Interesse [103–105]. Durch transiente Absorptionsspektroskopie nach Anregung mit 355nm fanden diese eine transiente Absorptionsbande, die auf den Ausstoß eines Elektrons und der

Bildung eines  $\text{NADH}^+$  zurückzuführen sei. Da die Bildung von  $\text{NADH}^+ + e^-$  4 mal länger brauche als die Pulsdauer der Anregung gehen Brochon et al. davon aus, dass es einen intermediären Zustand  $S^\ddagger$  gebe, der vom schwingungsangeregten Zustand  $S_1^*$  populiert werde und dann zum Elektronenausstoß  $\text{NADH}^+ + e^-$  führe. Stünde  $S^\ddagger$  mit  $S_1^*$  im Gleichgewicht, so könnte dieser Zustand im Rahmen des Gleichgewichtsmodells zu einer zweiten Lebensdauer führen. Alternativ könnte der intermediäre Zustand eventuell auch selber emittieren. Die Energiedifferenz zwischen  $S^\ddagger$  und dem Grundzustand müsste dann im Rahmen der spektralen Untersuchungen ähnlich sein wie die Energiedifferenz zwischen  $S_1$  und  $S_0$ . Weitere Untersuchungen sollten hier folgen.

Die Ergebnisse der spektroskopischen Eigenschaften von (c)NADH und (c)NMNH in verschiedenen Lösungsmitteln sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

### 7.3 Anwendungsmöglichkeit der Fluoreszenzlebensdauer

In Übereinstimmung mit Literaturangaben konnte gezeigt werden, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften von NADH stark ändern, wenn es an ein Enzym bindet [94–96]. Die Lage des Emissionsmaximums ist gegenüber freiem NADH blau verschoben und liegt bei 455(1)nm. Darüber hinaus steigen die Quantenausbeute ( $Q=0,10(1)$ ), sowie die Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau = 2,9(1)ns$ ) um einen Faktor 7,25 an. Dies wird in der Literatur darauf zurückgeführt, dass NADH in der Bindungstasche des Enzyms vor Fluoreszenzlöschung durch Stöße, oder auch aufgrund seiner offenen Konformation vor intramolekularen Löschprozessen geschützt ist [33]. Die Werte der Quantenausbeute und der Fluoreszenzlebensdauer sind dabei davon abhängig an welches Enzym NADH bindet [94–96].

Durch den Unterschied in der Quantenausbeute und der Fluoreszenzlebensdauer ist es möglich gebundenes NADH von freiem NADH mittels Fluoreszenzmessung zu differenzieren. Es wurde gezeigt, dass dieser Unterschied dazu verwendet werden kann, Charakteristika von Enzymen in Bezug auf (c)NADH zu bestimmen, wie zum Beispiel Bindungskonstanten. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass man die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von (c)NADH als Glucosesensor verwenden kann. Diese Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzlebensdauerermessung von (c)NADH sollen im Folgenden diskutiert werden:

#### 7.3.1 Bestimmung der Bindungskonstante

Die Bindungskonstante wurde über die Änderung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer durch Binden des Enzyms (GlucDH) und das Anpassen einer Funktion für verschiedene Temperaturen bestimmt. Bei niedrigen GlucDH Konzentrationen sind der Großteil der (c)NADH Moleküle frei und die mittlere Lebensdauer entspricht der von freiem (c)NADH, bei einer hohen GlucDH Konzentration sind der Großteil der NADH Moleküle gebunden und die mittlere Lebensdauer entspricht der von gebundenem (c)NADH. Die so erzielte Ergebnisse werden in Abbildung 7.3 mit den Ergebnissen

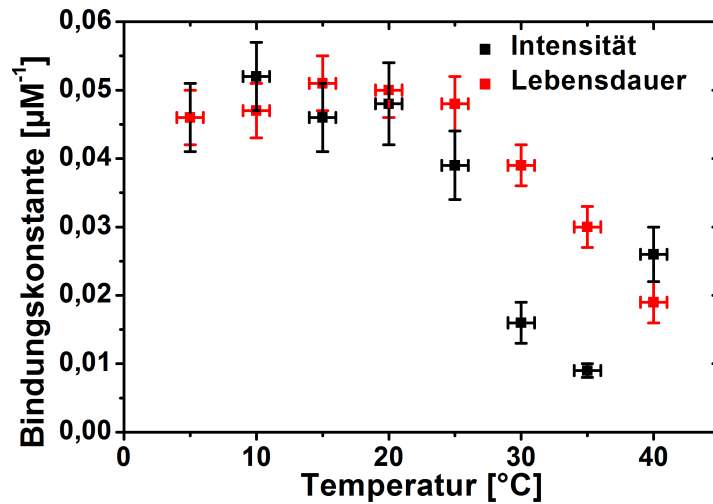


Abbildung 7.3: Vergleich der über die Fluoreszenzlebensdauer bestimmten Bindungskonstanten, mit den über die Fluoreszenzintensität gemessenen Bindungskonstanten: Die Messung über die Fluoreszenzlebensdauer liefert verlässlichere Ergebnisse.

einer bereits etablierten Technik (Änderung der Fluoreszenzintensität) verglichen [27–29]. Vergleicht man die Werte miteinander, so stimmen diese innerhalb der Fehlergrenzen für niedrigere Temperaturen überein. Bei 20°C beträgt die über die Fluoreszenzlebensdauer bestimmte Bindungskonstante  $K_B=0,050(4)\mu\text{M}^{-1}$  und stimmt mit dem über die Intensitätsmessung bestimmten Wert überein ( $K_B=0,048(6)\mu\text{M}^{-1}$ ). Bei höheren Temperaturen wurden bei den vorliegenden Messungen beobachtet, dass die über die Intensität bestimmten Werte von  $K_B$  fluktuieren, während die auf der Lebensdauerermessung basierten Werte kontinuierlich abnehmen. Darüber hinaus ist die Sensitivität der intensitätsbasierten Methode am höchsten, wenn  $[\text{GlucDH}]=1/K_B$ , während sie bei der lebensdauerbasierten Methode bei  $[\text{GlucDH}]=(\eta K_B)^{-1}$  liegt. Da das Verhältnis der Quantenausbeuten von gebundenem zu freiem (c)NADH  $\eta > 1$  ist, ist die Sensitivität somit bei geringeren GlucDH Konzentrationen beim lebensdauerbasierten Ansatz höher. Gleichzeitig sieht man, dass die Sensitivität mit steigendem  $\eta$  steigt, d.h. je größer der Unterschied in der Quantenausbeute bzw. Lebensdauer zwischen gebundenem und freiem NADH (Fluorophor) ist, desto sensitiver ist die Messung. Die Bestimmung der Bindungskonstante über die Fluoreszenzlebensdauer führt im Vergleich zur Bestimmung über die Fluoreszenzintensität zu verlässlicheren Ergebnissen.

Das mit steigender Temperatur kontinuierliche Abnehmen von  $K_B(T)$  ist zu erwarten und ist auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zurückzuführen. Neben der Temperatur konnte auch gezeigt werden, dass sowohl die Ionenstärke, als auch der pH-Werte erwartungsgemäß Einfluss auf die Bindungskonstante haben. Die Bindungskonstante von NADH in Trispuffer bei pH 8,5 und 0,2M NaCl beträgt ( $K_B=0,0096(2)\mu\text{M}^{-1}$ ) und ist niedriger als in Phosphatpuffer bei pH 7.

Die Bindungskonstante von cNADH beträgt  $K_B=7(4)\mu\text{M}^{-1}$  und ist damit geringer als

für NADH. Der große Fehler ist darauf zurückzuführen, dass die Kurve der Lebensdauer gegen die Enzymkonzentration nicht in Sättigung gegangen ist, sprich der Großteil der cNADH Moleküle ungebunden waren.<sup>10</sup>

Für einen zukünftigen Glucosesensor hat die niedrige Bindungskonstante von cNADH den Vorteil, dass es weniger zu Substrathemmung durch cNADH kommen kann, als bei NADH.

### 7.3.2 NADH vs. cNADH als Glucosesensor

(c)NADH hat im Vergleich zu anderen Glucosesensoren den Vorteil über 3 verschiedene Wege detektiert werden zu können. Dies bedeutet, dass man durch Kombination dieser verschiedenen Messprinzipien (z.B. der Absorption und der Fluoreszenzlebensdauer) das Ergebnis noch präziser und den Messprozess noch unanfälliger gegenüber Fehlern bzw. Schwankungen des Systems machen kann. Darüber hinaus hat cNAD gegenüber NAD den Vorteil der erhöhten Stabilität und der höheren Quantenausbeute. Zudem ist das Absorptionsmaximum bei gleichem Extinktionskoeffizienten um 20nm rot verschoben, was die Anregung mit kostengünstigen Lichtquellen wie beispielsweise Leuchtdioden vereinfacht. Somit ist cNAD eine geeignete Alternative für NAD als Coenzym zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels in diagnostischen Messsystemen.

Die Idee von Petrich et al. eines Glucosesensor auf Basis von Fluoreszenzlebensdauermessungen konnte bereits für NADH sowohl in Lösung als auch an Teststreifen gezeigt werden [30]. Ziel war es zu erforschen, ob dieses Messprinzip auch auf cNADH als Coenzym übertragbar ist. Die Idee beruht darauf, dass die mittlere Fluoreszenzlebensdauer sowohl davon abhängt ob (c)NADH gebunden oder frei vorliegt als auch von dessen Konzentration.

Analog zu NADH konnte auch für cNADH in Lösung und anhand von Teststreifen das Messprinzip verifiziert werden. Dabei setzt der signifikante Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer bei einem höheren Konzentrationsverhältnis Enzym zu Coenzym ein, als das bei NADH der Fall ist. Dies ist auf die geringere Bindungskonstante von GlucDH an cNADH im Vergleich zu NADH zurückzuführen, d.h. die Substratkonzentration oder GlucDH Konzentration muss – in Übereinstimmung mit dem Massenwirkungsgesetz – höher sein, damit der selbe Anteil an cNADH gebunden ist wie bei NADH. Die mittlere Lebensdauer ist also nicht nur vom Konzentrationsverhältnis Enzym zu Coenzym abhängig, sondern auch von der Gesamtkonzentration an eingesetzter Substanz (Coenzym). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzlebensdauer temperaturabhängig ist, d.h. es bestünde die Möglichkeit durch zusätzliche Messung der Fluoreszenzlebensdauer das Ergebnis einer vorhergehenden Messung (z.B. durch Absorption) auf die Temperatur zu korrigieren.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzlebensdauer weniger von der Menge als vielmehr von der Aktivität an eingesetztem GlucDH abhängt. Anhand von Messungen an Teststreifen, bei denen die Enzymaktivität durch Einlagerung

---

<sup>10</sup> Beim Fit war die Lebensdauer von gebundenem cNADH fest auf den Wert von  $\tau=2,9\text{ns}$  gesetzt.

bei 60°C und 80% Luftfeuchtigkeit reduziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die mittlere Fluoreszenzlebensdauer erwartungsgemäß mit sinkender Aktivität steigt. Bei geringerer Aktivität wird weniger (c)NADH gebildet. Dadurch sind mehr (c)NADH Moleküle gebunden und die Lebensdauer steigt an. Folglich kann die Messung der Fluoreszenzlebensdauer als Aktivitätstest dienen. Gleichzeitig kann sie aber auch als Kontrollinstanz in diagnostischen Testsystemen (z.B. bei einem Glucosesensor) dienen. Eine herkömmliche Glucosebestimmung kann so z.B. bei gegebener Temperatur mit der Fluoreszenzlebensdauerermessung zur Kompensation von lagerbedingten Aktivitätsverlusten dienen. Ist die (c)NADH Konzentration durch eine vorhergehende Messung bekannt, so kann durch die zusätzliche Messung der Fluoreszenzlebensdauer die Konzentration an aktivem Enzym bestimmt werden und somit überprüft werden, ob der Test (die enzymatische Reaktion) richtig abgelaufen ist bzw. ein zuverlässiges Ergebnis geliefert hat.

<b>NADH</b>	$\tau_{av}$ [ns]	$\tau_1$ [ns]	$\tau_2$ [ns]	<b>Int</b> $\tau_2$ [%]	<b>Amp</b> $\tau_2$ [%]	<b>Absmax</b> [nm]	<b>Emmax</b> [nm]	$Q$
H <sub>2</sub> O	0,46(1)	0,33(2)	0,69(5)	45(5)	33(10)	340(1)	463(2)	0,016(1)
H <sub>2</sub> O 260nm	0,50(2)	0,37(4)	0,64(3)	43(5)	34(10)		464(2)	0,011(1)
O <sub>2</sub> frei	0,46(1)	0,31(4)	0,64(6)	50(6)	31(9)	338(1)	465(2)	0,016(2)
D <sub>2</sub> O	0,73(2)	0,52(4)	1,2(1)	33(9)	20(9)	339(1)	464(2)	0,024(3)
MeOH	0,71(1)	0,48(2)	1,30(8)	31(3)	15(2)	338(1)	455(2)	0,023(2)
MeOH 260nm	0,97(5)	0,63(2)	1,9(1)	25(3)	9(1)		454(2)	0,0033(7)
DMSO	1,49(8)	0,35(5)	1,76(8)	79(7)	51(3)	334(1)	432(5)	0,043(3)
<b>NMNH</b>								
H <sub>2</sub> O	0,31(2)	0,24(2)	0,54(3)	24(3)	11(1)	338(1)	463(2)	0,011(1)
D <sub>2</sub> O	0,48(1)	0,37(3)	0,88(6)	21(3)	10(2)	336(1)	464(2)	0,015(1)
MeOH	0,76(3)	0,46(2)	1,1(1)	47(4)	27(3)	338(1)	455(3)	0,025(2)
DMSO	1,20(7)	0,25(2)	1,44(6)	81(2)	41(4)	334(1)	431(1)	0,032(1)
<b>cNADH</b>								
H <sub>2</sub> O	0,57(1)	0,32(3)	0,68(3)	69(3)	52(3)	360(1)	464(2)	0,024(2)
H <sub>2</sub> O 260nm			0,65(2)				463(5)	0,017(1)
O <sub>2</sub> frei	0,56(1)	0,24(5)	0,65(4)	77(5)	54(4)	359(1)	463(2)	0,022(1)
D <sub>2</sub> O	0,90(2)	0,50(5)	1,1(1)	72(3)	53(5)	359(1)	463(3)	0,033(2)
MeOH	0,89(7)	0,65(6)	1,4(2)	32(6)	18(5)	355(1)	457(2)	0,034(1)
MeOH 260nm	0,92(5)	0,71(4)	1,5(2)	27(7)	15(6)		456(2)	0,0053(9)
DMSO	1,40(3)	0,39(3)	1,65(7)	81(3)	50(2)	351(1)	439(4)	0,051(2)
<b>cNMNH</b>								
H <sub>2</sub> O		0,30(2)				358(1)	465(3)	0,012(2)
D <sub>2</sub> O		0,45(1)	4(2)	2(1)	0,2(1)	356(1)	466(2)	0,015(1)
MeOH		0,78(1)				354(1)	459(4)	0,027(1)
DMSO								

Tabelle 7.1: Zusammenfassung der spektroskopischen Eigenschaften von (c)NADH und (c)NMNH in verschiedenen Lösungsmitteln



## A Anhang

### A.1 Lösung der Differentialgleichung des Gleichgewichtsmodells

$$\begin{pmatrix} \dot{A}^* \\ \dot{B}^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(k_r + k_{nr} + k_1) & k_{-1} \\ -(k'_{nr} + k_{-1}) & k_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A^* \\ B^* \end{pmatrix} \quad (\text{A.1})$$

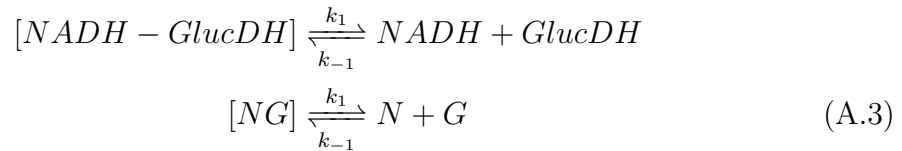
Die Differentialgleichung wird unter der Randbedingung  $[A^*(0)] = [B^*(0)] = A_0$  gelöst, d.h. nach der Anregung und Relaxation, zum Zeitpunkt  $t=0$  sind die Zustände  $A^*$  und  $B^*$  gleich bevölkert.

$$A^* = (f e^{-t/\tau_1} + f e^{-t/\tau_2}) \frac{A_0}{2m} \quad (\text{A.2})$$

Dabei lauten die Ausdrücke von  $f, \tau_1, \tau_2$  und  $m$  wie folgt:

$$\begin{aligned} f &= k_r + k_{nr} + k_1 - 3k'_{nr} - k_{-1} + m \\ m &= \frac{\sqrt{(k_r + k_{nr} + k_1 + k'_{nr} + k_{-1})^2 - 4(k_r k'_{nr} + k_{nr} k'_{nr} + k_r k_{-1} + k_{nr} k_{-1} + k_1 k_{-1})}}{2} \\ \tau_{1/2} &= \frac{2}{-k_r - k_{nr} - k_1 - k'_{nr} - k_{-1} \pm m} \end{aligned}$$

### A.2 Herleitung der Gleichung zur Bestimmung der Bindungskonstante über die Messung der Fluoreszenzintensität



Aufstellung der Differentialgleichung und Lösung mittels der folgenden Randbedingungen: Die Gesamtkonzentration an NADH  $[N]_t$ , bestehend aus der Konzentration an gebundenem NADH  $[NG]$  und freiem NADH  $[N]$ , bleibt konstant. Darüber hinaus ist das Enzym im Überschuss vorhanden, d.h. die Gesamtkonzentration an GlucDH  $[G]_t$  entspricht ungefähr der Konzentration an freiem GlucDH  $[G]$ .

$$\frac{d[NG]}{dt} = -k_1[NG] + k_{-1}[N][G] \stackrel{!}{=} 0 \quad (\text{A.4})$$

$$[N]_t = [N] + [NG] \stackrel{!}{=} const \Leftrightarrow [N] = [N]_t - [NG] \quad (\text{A.5})$$

$$[G]_t = [G] + [NG] \stackrel{!}{\approx} [G] \quad (\text{A.6})$$

$$\begin{aligned}
0 &= k_{-1}([N]_t - [NG])[G] - k_1[NG] \\
[N]_t[G] &= [NG][G] + \underbrace{\frac{k_1}{k_{-1}}}_{1/K_B}[NG] \\
[NG] &= \frac{[N]_t[G]}{[G] + 1/K_B} \\
[NG] &= \frac{[N]_t[G]K_B}{1 + K_B[G]} \tag{A.7}
\end{aligned}$$

In verdünnten Lösungen ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration des Fluorophors, wobei der Proportionalitätsfaktor  $\gamma = \sigma QB$  vom Absorptionsquerschnitt  $\sigma$ , der Quantenausbeute  $Q$  und der Bestrahlungsintensität  $B$  abhängt. Die Gesamtfluoreszenzintensität setzt sich zusammen aus der Intensität des gebundenen NADH  $I_{NG}$  und von freiem NADH  $I_N$ .

$$I_{NG} = \gamma[NG] = \frac{\overbrace{\gamma[N]_t}^{I_{max}} K_B[G]}{1 + K_B[G]} \tag{A.8}$$

$$I_N = \gamma'[N] = \overbrace{\gamma'[N]_t}^{I_{min}} - \frac{\overbrace{\gamma'[N]_t}^{I_{min}} K_B[G]}{1 + K_B[G]} \tag{A.9}$$

$$\begin{aligned}
I &= I_{NG} + I_N = I_{min} - \frac{I_{min}K_B[G]}{1 + K_B[G]} + \frac{I_{max}K_B[G]}{1 + K_B[G]} \\
I &= \frac{I_{min} + K_B I_{max}[G]}{1 + K_B[G]} \tag{A.10}
\end{aligned}$$

$I_{min}$  steht für die Fluoreszenzintensität, wenn alle Moleküle frei sind, während  $I_{max}$  der Fluoreszenzintensität entspricht, wenn alle NADH Moleküle an GlucDH gebunden vorliegen. Die Gleichung 8.10 stimmt erwartungsgemäß mit der von DiCaesare et al. [29] vorgeschlagenen Gleichung zur Bestimmung der Bindungskonstante über die Messung der Fluoreszenzintensität überein.

### A.3 Herleitung der Gleichung zur Bestimmung der Bindungskonstante über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer

Die mittlere intensitätsgewichtete Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  ist definiert als:[33]

$$\tau_{av} = \frac{I_{NG}\tau_{max} + I_N\tau_{min}}{I_{NG} + I_N} \quad (\text{A.11})$$

$$\tau_{av} = \frac{\frac{I_{max}K_B[G]}{1+K_B[G]}\tau_{max} + (I_{min} - \frac{I_{min}K_B[G]}{1+K_B[G]})\tau_{min}}{\frac{I_{max}K_B[G]}{1+K_B[G]} + \frac{I_{min} - I_{min}K_B[G]}{1+K_B[G]}} \quad (\text{A.12})$$

$$\tau_{av} = \frac{I_{max}K_B[G]\tau_{max} + I_{min}\tau_{min}}{I_{min} + I_{max}K_B[G]} \quad (\text{A.13})$$

$$\text{mit } \frac{I_{max}}{I_{min}} = \frac{\gamma}{\gamma'} = \frac{\sigma QB}{\sigma' Q' B} \approx \frac{Q}{Q'} = q \quad (\text{A.14})$$

$$\tau_{av} = \frac{qK_B[G]\tau_{max} + \tau_{min}}{1 + qK_B[G]} \quad (\text{A.15})$$

dabei gilt  $I_{max}/I_{min} \approx \frac{Q}{Q'} = q$ , da es in der Absorption zwischen gebundenem und freiem NADH zu keiner detektierbaren Veränderung des Extinktionskoeffizienten kommt, sowie die Absorptionsmaxima innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmen. Darüber hinaus werden gebundenes und freies NADH bei den Fluoreszenzlebensdauermessungen mit derselben LED angeregt, d.h. die Bestrahlungsstärke bleibt ebenso gleich.  $\tau_{min}$  steht für die Lebensdauer von freiem NADH und  $\tau_{max}$  für die Lebensdauer von gebundenem NADH.

### A.4 Bestimmung des Extinktionskoeffizientens von cNAD mittels Reduzierung mit ADH

Slama et. al hatten für cNADH einen Extinktionskoeffizienten berechnet, der um einen Faktor 2 kleiner ist ( $\epsilon = 3,1mM^{-1}cm^{-1}$ ), als der Extinktionskoeffizient, der im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurde ( $\epsilon = 6,2(2)mM^{-1}cm^{-1}$ ).[15] Zur Überprüfung des Experiments zur Bestimmung des Extinktionskoeffizientens von cNADH von Slama et al. wurden  $45\mu M$  cNAD in  $0,1M$  Trispuffer pH 8,5 mit  $0,2M$  NaCl mittels  $9,2\mu M$  Alkoholdehydrogenase (ADH, A7011 Sigma Aldrich, USA) und  $0,5mM$  Ethanol zu

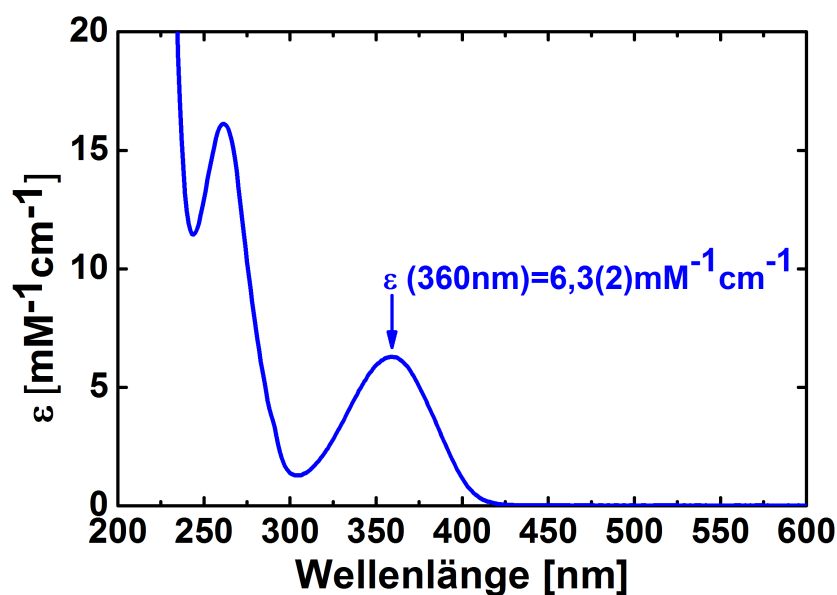


Abbildung A.1: Extinktionsspektrum von durch ADH und Ethanol reduziertem cNADH. Der Extinktionskoeffizient entspricht innerhalb der Fehlergrenzen dem Extinktionskoeffizienten von cNADH ohne vorherige Reduzierung mit ADH.

cNADH reduziert. Das Absorptionsspektrum wurde wie im Methoden Teil dieser Arbeit beschrieben mit einem Cary 500 Absorptionsspektrometer bestimmt (Varian, Deutschland), sowie Küvetten (Hellma, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1cm verwendet. 5 Minuten nach dem Anrühren der Probe, betrug die Änderung des Absorptionsspeaks von cNADH bei 360nm weniger als 0,01%, wodurch festgestellt werden konnte, dass die Reaktion vollständig abgelaufen ist. Der Extinktionskoeffizient bei 360nm wurde mittels des Lambert-Beer Gesetzes bestimmt und beträgt, in Übereinstimmung mit dem Extinktionskoeffizienten von cNADH ohne Reduzierung mit ADH,  $\epsilon = 6,3(2)\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (vgl. Abb. A.1). Dies unterstützt noch einmal die Richtigkeit des Extinktionskoeffizienten von cNADH, der im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurde.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Skizze der Reaktionskette zur Detektion von Glucose mittels NADH . . . . .	2
1.2	Zusammenfassung der publizierten Lebensdauer bzw. Lebensdauern von NADH von 1971 bis 2007 (Werte vgl. Ref. [16–26]). . . . .	4
2.1	Vergleich der chemischen Struktur von NAD und cNAD . . . . .	6
2.2	Vergleich der chemischen Struktur von NADH und cNADH . . . . .	7
2.3	Vergleich der chemischen Struktur von NMNH und cNMNH . . . . .	7
2.4	Vergleich der chemischen Struktur von Dihydrornikotinamid und der cisoiden Modellverbindung . . . . .	8
2.5	Jablonski Diagramm . . . . .	9
2.6	Schematische Darstellung des Protonentransfers (PPT) . . . . .	11
2.7	Schematischer Vergleich dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschprozesse	12
2.8	Stern-Volmer Diagramm . . . . .	12
2.9	Beispiel für die Verifizierung des verwendeten Fitmodells . . . . .	19
2.10	Beispiel einer Analyse der Lebensdauervertelung mittels MEM . . . . .	20
2.11	Vergleich Extinktionsspektrum NAD versus NADH . . . . .	23
2.12	Prinzip eines Lebensdauerbasierten Glucosesensors . . . . .	24
2.13	Messungen an Teststreifen mit Blut . . . . .	24
2.14	Quantitativer Sauerstoffnachweis mittels Pyrogallol . . . . .	28
3.1	Vergleich Durchführung für PCM und Nicht-PCM Rechnung. . . . .	32
3.2	Vergleich Absorption transoides NADH vs. transoides cNADH . . . . .	33
3.3	Vergleich HOMO und LUMO des transoiden NADHs bzw. cNADHs . . . . .	34
3.4	Vergleich Absorption transoides NMNH' vs. cNMNH' . . . . .	35
3.5	Vergleich HOMO und LUMO von transoidem NMNH' vs. cNMNH' . . . . .	36
3.6	Vergleich der effektiven Ladung pro „Atom“ von NMNH' und cNMNH' . . . . .	37
3.7	Schematischer Vergleich der statischen elektrischen Dipolmomente von NMNH' vs. cNMNH' . . . . .	39
4.1	Vergleich der Extinktionsspektren von NAD, cNAD, NADH und cNADH in Trispuffer pH 8,5 . . . . .	41
4.2	Temperaturabhängigkeit des Extinktionsspektrums von (c)NAD in Trispuffer pH 8,5 . . . . .	42
4.3	Temperaturabhängigkeit des Extinktionsspektrums von (c)NADH in Trispuffer pH 8,5 . . . . .	42
4.4	Fluoreszenzeigenschaften (c)NADH . . . . .	43
4.5	Fluoreszenzabklingkurve von NADH in Tris pH 8,5 20°C und IRF . . . . .	44
4.6	Vergleich Fluoreszenzabklingkurve NADH vs. cNADH in Tris pH 8,5 20°C . . . . .	44
4.7	Quantenausbeute und Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von (c)NADH versus der Temperatur . . . . .	45
5.1	Schematische Darstellung eines Modells zur Erklärung zweier Lebensdauern	47
5.2	Schematische Darstellung des Isomeriemodells . . . . .	50

---

5.3	Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum Dihydro vs. (c)NADH	51
5.4	Fluoreszenzabfall von Dichlorbenzylidihydronikotinamid . . . . .	52
5.5	Vergleich normiertes Absorbanz- und Emissionsspektrum MV vs. Dihydro .	53
5.6	Protonierung/Deprotonierung: . . . . .	54
5.7	Vergleich Absorbanzspektrum und Emissionsspektrum (c)NADH in D <sub>2</sub> O . .	56
5.8	Vergleich Lebensdauern D <sub>2</sub> O vs. H <sub>2</sub> O . . . . .	56
5.9	Lebensdauern und Amplituden von NADH in Abhängigkeit des pH Wertes	57
5.10	Vergleich Absorbanzspektrum und Emissionsspektrum (c)NADH in DMSO	58
5.11	Vergleich Lebensdauern DMSO vs. H <sub>2</sub> O . . . . .	59
5.12	Spektrale Abhängigkeit der Lebensdauern von (c)NADH in DMSO . . . . .	59
5.13	Spektralmodell . . . . .	61
5.14	Verwendete Filter zur Untersuchung der spektralen Abhängigkeit . . . . .	62
5.15	Vergleich der spektralen Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH . . . . .	62
5.16	Schematische Darstellung des Gleichgewichtsmodells . . . . .	64
5.17	Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum NADH in sauerstofffreiem und sauerstoffhaltigem Puffer . . . . .	65
5.18	Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum cNADH in sauerstofffreiem und sauerstoffhaltigem Puffer . . . . .	66
5.19	Vergleich Einfluss O <sub>2</sub> auf die Fluoreszenzlebensdauern von (c)NADH . . . . .	66
5.20	Vergleich der gefalteten und offenen Konformation . . . . .	68
5.21	Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum (c)NADH und (c)NMNH Trispuffer pH 8.5 bei 20°C . . . . .	69
5.22	Vergleich Fluoreszenzlebensdauern (c)NMNH mit (c)NADH . . . . .	70
5.23	Vergleich der Emissionsspektren von NADH und cNADH bei Anregung mit 260nm und 350nm . . . . .	71
5.24	Vergleich der Lebensdauern bei 260nm und 370nm Anregung . . . . .	72
5.25	Vergleich Extinktionsspektrum und Emissionsspektrum (c)NADH und (c)NMNH in Methanol . . . . .	73
5.26	Vergleich der Lebensdauer von (c)NADH in MeOH zu H <sub>2</sub> O bei 260nm und 370nm Anregung . . . . .	74
6.1	Vergleich des Emissionsspektrums von freiem und gebundenem NADH . . .	78
6.2	Vergleich Fluoreszenzabklingkurve von freiem- und gebundenem NADH . .	78
6.3	Bestimmung der Bindungskonstante von NADH an GlucDH in Phosphatpuffer über die Fluoreszenzintensität . . . . .	79
6.4	Bestimmung der Bindungskonstante von NADH an GlucDH in Phosphatpuffer über die Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	80
6.5	Vergleich Bindungskonstante NADH vs. cNADH in Trispuffer . . . . .	82
6.6	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von NADH vs. Konzentrationsverhältnis NADH zu GlucDH . . . . .	83

---

6.7	Mittlere Fluoreszenzlebensdauer von cNADH vs. Konzentrationsverhältnis cNADH zu GlucDH . . . . .	84
6.8	Einfluss der Coenzymkonzentration auf die Lebensdauer . . . . .	85
6.9	Lebensdauer vs. Glucosekonzentration und Aktivität . . . . .	86
7.1	Zusammenfassung der publizierten Lebensdauer bzw. Lebensdauern von NADH von 1971 bis 2012.[16–26, 81] . . . . .	91
7.2	Abschätzung der erwarteten Veränderung der Intensitätsanteile der beiden Lebensdauern bei unterschiedlichen Detektionsfiltern. . . . .	94
7.3	Vergleich der über die Fluoreszenzlebensdauer bestimmten Bindungskonstanten, mit den über die Fluoreszenzintensität gemessenen Bindungskonstanten: Die Messung über die Fluoreszenzlebensdauer liefert verlässlichere Ergebnisse. . . . .	99
A.1	Extinktionsspektrum von durch ADH und Ethanol reduziertem cNADH. Der Extinktionskoeffizient entspricht innerhalb der Fehlergrenzen dem Extinktionskoeffizienten von cNADH ohne vorherige Reduzierung mit ADH.	106

## Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammenfassung der wichtigsten Fluoreszenzlöschprozesse . . . . .	10
3.1	Vergleich Absorption und Fluoreszenz des Dihydronikotinamids mit und ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten. . . . .	38
7.1	Zusammenfassung der spektroskopischen Eigenschaften von (c)NADH und (c)NMNH in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	102



---

## Literatur

- [1] K. Alberti, P. Zimmet, and R. Defronzo, eds., *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Wiley VCH, 2nd ed., 1997.
- [2] H. Schatz, ed., *Diabetologie kompakt. Grundlagen und Praxis*. Georg Thieme Verlag, 4th ed., 2006.
- [3] International Diabetes Federation, “IDF Diabetes Atlas 5th ed,” 2011.
- [4] DiabetesDE, ed., *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes*. Kirchheim Verlag, 2011.
- [5] S. Morbach, E. Müller, H. Reike, A. Risse, and M. Rümenapf, G. Spraul, *Diabetisches Fußsyndrom*. Georg Thieme Verlag, 4th ed., 2004.
- [6] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, “The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 329, pp. 977–986, 1993.
- [7] J. Hönes, P. Müller, and N. Surridge, “The Technology Behind Glucose Meters: Test Strips,” *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 10, pp. 10–26, 2008.
- [8] J. D. Newman and A. P. F. Turner, “Home Blood Glucose Biosensors: A Commercial Perspective,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, pp. 2435–2453, 2005.
- [9] A. Duerkop, M. Schaeferling, and O. S. Wolfbeis, “Glucose Sensing,” in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Springer Verlag, 2006.
- [10] R. Narayanaswamy and F. Sevilla, “An Optical Fibre Probe for the Determination of Glucose Based on Immobilized Glucose Dehydrogenase,” *Anal. Lett.*, vol. 21, pp. 1165–1175, 1988.
- [11] N. D. Evans, L. Gnudi, O. J. Rolinski, B. D. J. S., and J. C. Pickup, “Non-Invasive Glucose Monitoring by NAD(P)H Autofluorescence Spectroscopy in Fibroblasts and Adipocytes: A Model for Skin Glucose Sensing,” *Diabetes Technol Ther.*, vol. 5, pp. 807–816, 2003.
- [12] N. D. Evans, L. Gnudi, O. J. Rolinski, B. D. J. S., and J. C. Pickup, “Glucose-Dependent Changes in NAD(P)H-Related Fluorescence Lifetime of Adipocytes and Fibroblasts in Vitro: Potential for Non-Invasive Glucose Sensing in Diabetes Mellitus,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 80, pp. 122–129, 2005.
- [13] D. Heindl, C. Horn, C. Gaessler-Dietsche, and J. Hoenes, “Stabilization of Dehydrogenases Using Stable Coenzymes,” 2009. WO 2009/103540.
- [14] J. Hoenes, D. Heindl, C. Horn, and C. Gaessler-Dietsche, “Stable NAD/NADH-derivate,” 2007. WO 2007/012494.

- [15] J. T. Slama and A. M. Simmons, "Carbanicotinamide Adenine Dinucleotide: Synthesis and Enzymological Properties of a Carbocyclic Analogue of Oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide," *Biochemistry*, vol. 27, pp. 183–193, 1988.
- [16] G. Krishnamoorthy, N. Periasamy, and B. Venkataraman, "The Origin of Heterogeneity of Fluorescence Decay Kinetics of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol. 144, pp. 387–392, 1987.
- [17] A. Gafni and L. Brand, "Fluorescence Decay Studies of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Solution and Bound to Liver Alcohol Dehydrogenase," *Biochemistry*, vol. 15, pp. 3165–3171, 1976.
- [18] M. E. Couprie, F. Merola, P. Tauc, D. Garzella, A. Delboulbe, T. Hara, and M. Billardon, "First Use of the UV Super-ACO Free-Electron Laser: Fluorescence Decays and Rotational Dynamics of the NADH Coenzyme," *Rev. Sc. Instrum.*, vol. 65, pp. 1485–1495, 1994.
- [19] T. G. Scott, R. D. Spencer, N. J. Leonard, and G. Weber, "Emission Properties of NADH. Studies of Fluorescence Lifetimes and Quantum Efficiencies of NADH, AcPyADH, and Simplified Synthetic Models," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 92, pp. 687–695, 1970.
- [20] B. Kierdaszuk, H. Malak, I. Gryczynski, P. Callis, and J. P. Lakowicz, "Fluorescence of reduced nicotinamides using one- and two-photon excitation," *Biophys. Chem.*, vol. 62, pp. 1–13, 1996.
- [21] A. J. W. G. Visser and A. van Hoek, "The Fluorescence Decay of Reduced Nicotinamides in Aqueous Solution after Excitation with a UV-Mode Locked Ar Ion Laser," *Photochem. Photobiol.*, vol. 33, pp. 35–40, 1981.
- [22] R. Schuyler, I. Isenberg, and D. Dyson, "The Measurement of Sub-Nanosecond Lifetimes by Monophoton Fluorometry," *Photochem. Photobiol.*, vol. 15, pp. 395–398, 1972.
- [23] M. Wakita, G. Nishimura, and M. Tamura, "Some Characteristics of the Fluorescence Lifetime of Reduced Pyridine Nucleotides in Isolated Mitochondria, Isolated Hepatocytes, and Perfused Rat Liver In Situ," *J. Biochem.*, vol. 118, pp. 1151–1160, 1995.
- [24] B. Zelent, T. Troxler, and A. M. Vanderkooi, "Temperature Dependence for Fluorescence of NADH in Glycerol/Water Solution and in Trehalose/Sucrose Glass," *J. Fluoresc.*, vol. 17, pp. 37–42, 2007.
- [25] H. Schneckenburger and K. König, "Fluorescence Decay Kinetics and Imaging of NAD(P)H and Flavins as Metabolic Indicators," *Opt. Eng.*, vol. 31, pp. 1447–1451, 1992.

- [26] R. J. Paul, "Oxygen Concentration and the Oxidation-Reduction State of Yeast: Determination of Free/Bound NADH and Flavins by Time-Resolved Spectroscopy," *Naturwissenschaften*, vol. 83, pp. 32–35, 1996.
- [27] A. D. Winer, G. W. Schwert, and D. B. S. Millar, "Lactic Dehydrogenases VI Fluorimetric Measurements of the Complex of Enzyme and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide," *Biol. Chem.*, vol. 234, pp. 1149–1154, 1959.
- [28] P. A. Gainey and C. F. Phelps, "The Binding of Oxidized and Reduced Nicotinamide-Adenine Dinucleotides to Bovine Liver Uridine Diphosphate Glucose Dehydrogenase," *Biochem. J.*, vol. 141, pp. 667–673, 1974.
- [29] N. DiCesare and J. R. Lakowicz, "Evaluation of Two Synthetic Glucose Probes of Fluorescence-Lifetime-Based Sensing," *Anal. Chem.*, vol. 294, pp. 154–160, 2001.
- [30] W. Petrich, H. P. Haar, J. Hönes, and C. Horn, "Method and Device for Determining the Concentration of an Analyte by Means of Fluorescence Measurement," 2009. WO 2009/015870.
- [31] P. Fischer, J. Fleckenstein, and J. Hönes, "Spectroscopic Investigation of Dihydronicotinamides-I: Conformation, Absorption, and Fluorescence," *Photochem. Photobiol.*, vol. 47, pp. 193–199, 1988.
- [32] A. von Ketteler, D. Siegberg, D. P. Herten, and W. Petrich, "Fluorescence Lifetime Based Glucose Sensing Using NADH," *SPIE Proc.*, vol. 8229, pp. 82290P–82290P–8, 2012.
- [33] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 3rd ed., 2006.
- [34] B. Valeur, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. Wiley VCH Weinheim, 2002.
- [35] J. W. Eastman, "Quantitative Spectrofluorimetry - the Fluorescence Quantum Yield of Quinine Sulfate," *Photochem. Photobiol.*, vol. 6, pp. 55–72, 1981.
- [36] A. M. Brouwer, "Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 83, pp. 2213–2228, 2011.
- [37] J. N. Demas and G. A. Crosby, "The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review," *J. Phys. Chem.*, vol. 75, pp. 991–1024, 1971.
- [38] Sigma Aldrich, "Datasheet DMSO," 2012.
- [39] M. Daimon and A. Masumura, "Measurement of the Refractive Index of Distilled Water from the Near-Infrared Region to the Ultraviolet Region," *Appl. Opt.*, vol. 46, pp. 3811–3820, 2007.

- [40] D. N. Nikogosyan, *Properties of Optical and Laser-Related Materials: A Handbook*. Wiley VCH, 1997.
- [41] H. El-Kashef, “The Necessary Requirements Imposed on Polar Dielectric Laser Dye Solvents,” *Physica B*, vol. 279, pp. 295–301, 2000.
- [42] G. Weber, “Transfert d’Énergie dans la Dihydro-Diphosphopyridine nucléotide,” *J. Chim. Phys.*, vol. 55, pp. 877–886, 1958.
- [43] M. Patting, “Evaluation of Time-Resolved Fluorescence Data: Typical Methods and Problems,” *Springer Ser. Fluoresc.*, vol. 5, pp. 233–258, 2008.
- [44] A. Boens, M. Ameloot, and B. Valeur, “Practical Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy Avoiding Artifacts and Using Lifetime Standards,” *Springer Ser. Fluoresc.*, vol. 5, pp. 215–232, 2008.
- [45] P. R. Hammond, “Self-Absorption of Molecular Fluorescence, the Design of Equipment for Measurement of Fluorescence Decay, and the Decay Time of some Laser Dyes,” *J. Chem Phys.*, vol. 70, pp. 3884–3894, 1979.
- [46] D. V. O’Connor and D. Philipps, “Time-Correlated Single Photon Counting,” *App. Opt.*, vol. 25, pp. 460–463, 1984.
- [47] J. R. Lakowicz, “Techniques,” *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 1, 1991.
- [48] M. Wahl, “Time Correlated Single Photon Counting,” 2009. PicoQuant Technical Note.
- [49] M. L. Johnson and L. M. Faunt, “Parameter Estimation by Least-Squares Methods,” *Methods Enzymol.*, vol. 240, pp. 1–36, 1994.
- [50] C. Duller, “Die Maximum-Entropie-Methode zur Bestimmung von Mischanteilen,” *Aust. J. Stat.*, vol. 32, pp. 183–200, 2003.
- [51] R. Swaminathan and N. Periasamy, “Analysis of Fluorescence Decay by Maximum Entropy Method: Influence of Noise and Analysis Parameters on the Width of the Distribution of Lifetimes,” *Proc. Indian. Acad. Sci.*, vol. 108, pp. 39–49, 1996.
- [52] A. Siemiarczuk, B. D. Wagner, and W. R. Ware, “Comparison of the Maximum Entropy and Exponential Series Methods for Recovery of Distributions of Lifetimes from Fluorescence Lifetime Data,” *J. Phys. Chem.*, vol. 94, pp. 1661–1666, 1990.
- [53] A. A. Maskevich, V. I. Stsiapura, and P. T. Balinski, “Analysis of Fluorescence Decay Kinetics of Thioflavin by a Maximum Entropy Method,” *J. Appl. Spec.*, vol. 77, pp. 194–201, 2010.
- [54] F. Lottspeicher and J. W. Engels, eds., *Bioanalytik*. Springer Spektrum, 2nd ed., 2006.

- [55] E. Hald, P. Lehmann, and J. Ziegenhorn, "Molar absorptivities of  $\beta$ -NADH and  $\beta$ -NAD at 260nm," *Clin. Chem.*, vol. 21, pp. 884–887, 1975.
- [56] H. C. Lee, W. B. Choi, J. E. Lynch, F. E. Roberts, R. P. Volante, and P. J. Reider, "A Chemical Synthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD+)," *Chem. Commun.*, vol. 8, pp. 729–730, 1991.
- [57] J. L. Panza, A. J. Russel, and E. J. Beckman, "Synthesis of Fluorinated NAD as Soluble Coenzyme for Enzymatic Chemistry in Fluorous Solvents and Carbon Dioxide," *Tetrahedron*, vol. 58, pp. 4091–4104, 2002.
- [58] W. Schlenk and A. Thal, "Über Metallketyle, eine Große Klasse von Verbindungen mit Dreiwertigem Kohlenstoff II," *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, vol. 46, pp. 2840–2854, 1913.
- [59] H. Abrash, E. Shih, W. Woodrow, and F. Malekmehr, "A Kinetic Study of the Air Oxidation of Pyrogallol and Purpurogallin," *Int. J. Chem. Kin.*, vol. 21, pp. 465–476, 1989.
- [60] M. B. McCarty and R. E. White, "Functional differences between peroxidase compound i and the cytochrome p-450 reactive oxygen intermediate," *J. Biol. Chem.*, vol. 10, pp. 9153–9158, 1983.
- [61] P. Atkins and J. de Paula, *Physikalische Chemie*. Wiley VCH, 4th ed., 2010.
- [62] A. Szabo and N. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Dover Publication Inc., New York, 1982.
- [63] R. M. Dreizler and E. K. U. Gross, *Density Functional Theory*. Springer Verlag Heidelberg, 1995.
- [64] H. Eschrig, *The Fundamentals of Density Functional Theory*. Teubner Verlag Stuttgart, 1996.
- [65] R. G. Parr and W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford Science Publication New York, 1989.
- [66] A. Dreuw and M. Head-Gordon, "Single Reference ab initio Methods for the Calculation of Excited States of Large Molecules," *Chem. Rev.*, vol. 105, pp. 4009–4037, 2005.
- [67] P. H. P. Harbach and A. Dreuw, "The Art of Choosing the Right Quantum Chemical Excited-State Method for Large Molecular Systems," in *Modeling of Molecular Properties*, pp. 27–48, Wiley VCH, 2011.
- [68] R. A. Friesner, "Ab initio quantum chemistry: Methodology and applications," *PNAS*, vol. 102, pp. 6648–6653, 2005.

- [69] A. D. Becke, "A New Mixing of Hartree Fock and Local Density-Functional Theories," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, pp. 5648–5654, 1993.
- [70] E. Runge and E. K. U. Gross, "Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 52, pp. 997–1000, 1984.
- [71] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, . Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, "Gaussian09 revision a.1," 2009. Gaussian Inc. Wallingford CT.
- [72] K. Yamamoto, G. Kurisu, M. Kusunoki, S. Tabata, I. Urabe, and S. Osaki, "Crystal Structure of Glucose Dehydrogenase from *Bacillus Megaterium* IWG3 at 1.7 Å Resolution," *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 129, pp. 303–312, 2001.
- [73] T. H. Dunning Jr., "Gaussian Basis Sets for Use in Correlated Molecular Calculations. I. The Atoms Boron through Neon and Hydrogen," *J. Chem. Phys.*, vol. 90, pp. 1007–1023, 1989.
- [74] T. Yanai, D. P. Tew, and N. C. Handy, "A New Hybrid Exchange-Correlation Functional Using the Coulomb-Attenuating Method (CAM-B3LYP)," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 393, pp. 51–57, 2004.
- [75] J. Tomasi, B. Mennucci, and R. Cammi, "Quantum Mechanical Continuum Solvation Models," *Chem. Rev.*, vol. 105, pp. 2999–3093, 2005.
- [76] E. G. McRae, "Theory of Solvent Effects on Molecular Electronic Spectra. Frequency Shifts," *J. Phys. Chem.*, vol. 61, pp. 562–572, 1957.
- [77] M. Homocianu, A. Airinei, and D. O. Dorohoi, "Solvent Effects on the Electronic Absorption and Fluorescence Spectra," *J. Adv. Res. Phys.*, vol. 2, pp. 1–9, 2011.
- [78] S. Joshi and D. Pant, "Solvatochromic Shift and Estimation of Dipole Moment of Quinine Sulphate Indication," *Int. J. Chem. Biol. Eng.*, vol. 6, pp. 225–229, 2012.

- [79] C. Santhosh and P. C. Mishra, "Electronic Spectra of Adenine and Guanine: Assignments and Effects of Solution Environment," *Proc. Indian. Acad. Sci.*, vol. 104, pp. 649–660, 1992.
- [80] H. H. G. Jellinek and M. G. Wayne, "Nicotinamide; Ultraviolet Absorption Spectra and Dissociation Constants," *J. Phys. Colloid. Chem.*, vol. 55, pp. 173–180, 1951.
- [81] A. von Ketteler, D. P. Herten, and W. Petrich, "Fluorescence Properties of Carba Nicotinamide Adenine Dinucleotide for Glucose Sensing," *Chem. Phys. Chem.*, vol. 13, pp. 1302–1306, 2012.
- [82] R. B. Dawson, *Data for Biochemical Research*. Oxford, Clarendon Press, 3rd ed., 1985.
- [83] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*. Spektrum, 3rd ed., 2004.
- [84] D. Evans, "Perturbation of Singlet-Triplet Transitions of Aromatic Molecules by Oxygen under Pressure," *J. Chem. Soc.*, pp. 1351–1357, 1957.
- [85] I. A. Duncan, A. Harriman, and G. Porter, "Detection of Small Quantities of Photochemically Produced Oxygen by Reaction with Alkaline Pyrogallol," *Anal. Chem.*, vol. 51, pp. 2206–2208, 1979.
- [86] O. Jardetzky and N. G. Wade-Jardetzky, "The Conformation of Pyridine Dinucleotides in Solution," *J. Biol. Chem.*, vol. 241, pp. 85–91, 1966.
- [87] W. A. Catterall, D. P. Hollis, and C. F. Walter, "Nuclear Magnetic Resonance Study of the Confirmation of Nicotinamide-Adenine Dinucleotide and Reduced Nicotinamide-Adenine Dinucleotide in Solution," *Biochemistry*, vol. 8, pp. 4032–4036, 1969.
- [88] R. V. Hull, P. S. Conger, and R. J. Hoobler, "Conformation of NADH Studied by Fluorescence Excitation Transfer Spectroscopy," *Biophys. Chem.*, vol. 90, pp. 9–16, 2001.
- [89] G. Weber, "Intramolecular Transfer of Electronic Energy in Dihydro Diphosphopyridine Nucleotide," *Nature*, vol. 180, p. 1409, 1957.
- [90] W. Hauswirth and M. Daniels, "Fluorescence of the Purine and Pyrimidine Bases of the Nucleid Acids in Neutral Aqueous Solution," *Science*, vol. 171, pp. 675–677, 1971.
- [91] P. R. Callis, "Electronic States and Luminescence of Nucleic Acid Systems," *Ann. Rev. Phys. Chem.*, vol. 34, pp. 329–357, 1983.

- [92] J. Toreilles and A. Crastes de Paulet, "Studies of NAD(H) Conformations in Solution: A New Method Using the PMR Spectra of Cobalt Ion Dinucleotide Complexes," *Biochim. Biophys. Act.*, vol. 362, pp. 375–381, 1974.
- [93] J. Tropp and A. G. Redfield, "Proton Magnetic Resonance of NADH in Water-Methanol Mixtures. Conformational Change and Behavior of Exchangeable Proton Resonances as a Function of Temperature," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, pp. 534–538, 1980.
- [94] H. Schneckenburger, M. Wagner, P. Weber, W. S. L. Strauss, and R. Sailer, "Autofluorescence Lifetime Imaging of Cultivated Cells Using a UV Picosecond Laser Diode," *J. Fluoresc.*, vol. 14, pp. 647–651, 2004.
- [95] N. B. Oza and J. Shore, "The Effects of Adenine Nucleotides on NADH Binding to Mitochondrial Malate Dehydrogenase," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 154, pp. 360–365, 1973.
- [96] B. Baumgarten and J. Hönes, "Spectroscopic Investigation of Dihyronicotinamides-II: Dihyronicotinamide Adenine Dinucleotide Complexes with Dehydrogenases," *Photochem. Photobiol.*, vol. 47, pp. 201–205, 1988.
- [97] T. Galeotti, G. D. V. van Rossum, D. H. Mayer, and C. B., "On the Fluorescence of NAD(P)H in Whole-Cell Preparations of Tumours and Normal Tissue," *Eur. J. Biochem.*, vol. 17, pp. 485–496, 1970.
- [98] A. Gafni, "Circular Dichroism and Circular Polarization of Luminescence of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Solution and Bound to Dehydrogenases," *Am. Chem. Soc.*, vol. 17, pp. 1301–1304, 1978.
- [99] J. R. Lakowicz and G. Weber, "Quenching of Fluorescence by Oxygen. A Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules," *Biochemistry*, vol. 12, pp. 4161–4170, 1973.
- [100] N. J. Oppenheimer, L. J. Arnold, and N. O. Kaplan, "A Structure of Pyridine Nucleotides in Solution," *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol. 68, pp. 3200–3205, 1971.
- [101] J. Torreilles and A. Crastes de Paulet, "Studies of NAD(H) Conformations in Solution: A New Method using the PMR Spectra of Cobalt Ion-Dinucleotide Complexes," *Biochim. Biophys. Act.*, vol. 362, pp. 375–381, 1974.
- [102] G. McDonald, B. Brown, D. Hollis, and C. Walter, "Some Effects of Environment on the Folding of Nicotinamide-Adenine Dinucleotides in Aqueous Solutions," *Biochemistry*, vol. 11, pp. 1920–1930, 1972.
- [103] B. Czochralska and L. Lindqvist, "Biphotonic One-Electron Oxidation of NADH on Laser Excitation at 353 nm," *Chem Phys. Lett.*, vol. 101, pp. 297–300, 1983.



- [104] D. W. Boldrige, M. T. H., and S. G.W., "Formation Kinetics and Quantum Yield of Photon-Induced Electron Ejection From NADH in Aqueous Solution," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 108, pp. 461–465, 1984.
- [105] B. Lindqvist, L. Czochralska and I. Grigorov, "Determination of the Mechanism of Photo-Ionization of NADH in Aqueous Solution on Laser Excitation at 355nm," *Chem Phys. Lett.*, vol. 119, pp. 494–498, 1985.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen allen Personen zu danken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben und so einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Daher geht mein Dank an...

- Meinen Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Petrich für die großartige Unterstützung auf allen Ebenen, für die Möglichkeit an diesem spannenden Thema arbeiten zu dürfen, für die Chance durch die gekoppelten Universitäts- und Industriepromotion von beiden nur das Beste mitnehmen zu dürfen, für die Motivation, die mich immer weiter angestachelt hat und für den Rahmen, die hervorragende Zusammenarbeit und das Vertrauen, das es mir ermöglichte über mich hinauswachsen zu dürfen.
- Prof. Dr. Matthias Weidemüller für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie den anregenden Diskussionen und den Input beim Zusammenschreiben.
- PD Dr. Dirk Peter Hertel und seinem Arbeitskreis (Daniel Barzan, Christina Spassova, Dominic Dollé, Dominik Brox, Kristin Grussmeier, Anton Kurz, Arina Rybina, Dr. Konstantinos Lymperopoulos, Dr. Michael Schwering, Anne Seefeld, Tanja Erhard und Jessica Balbo) am Physikalisch Chemischen Institut, bei denen ich nicht nur die spektroskopischen Experimente durchführen durfte, sondern mich auch immer als adoptiertes Gruppenmitglied fühlen durfte. Ich danke für die schöne Zeit, die hilfreichen Diskussionen, die Unterstützung bei den Experimenten und dafür, dass ich mit Euch zusammen nicht nur wissenschaftlich jede schwarze Piste runterfahren konnte.
- Die Kollegen des Geschäftsbereiches Diabetes Care, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim für die Unterstützung und die Hilfe in den letzten drei Jahren und besonders an Dr. Matthias Essenpreis und Dr. Dirk Voelkel für die Chance meine Promotion bei Roche durchführen zu können und dafür, immer wieder die Anwendungsmöglichkeiten der Grundlagenforschung vor Augen geführt zu bekommen.
- Die Arbeitsgruppe „Photonics in Chemistry“, bei der ich die letzten 3 Jahre mit großer Freude mitarbeiten durfte (Patrick Lösch, Dr. Michael Haussmann, Dr. Markus Plum, Dr. Christian Ringemann und Dr. Andreas Weller), für die großartige Unterstützung in allen Belangen, dafür dass ich von Eurer Erfahrung und Eurem Wissen in der Physik, Chemie und Biophysik immer Nutznießen durfte, für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und für die schöne gemeinsame Zeit als „Büromitbewohner“.

- 
- Dr. Carina Horn und ihrer Gruppe (insbesondere Angie Fürst, Dr. Susanne Gawenda, Gerhard Lettau und Dr. Nelli Steinke) für das Auffrischen meiner Biochemiekenntnisse, für diverse Beschichtungen und Aktivitätsbestimmungen sowie das harmonische Miteinander im Labor.
  - Dr. Joachim Hönes für das schier unerschöpfliche Wissen über NADH und NADH Analoga sowie für die lebhaften Diskussionen und die Unterstützung bei den Modellen für die zwei Lebensdauern.
  - Dr. Dieter Heindl und Heribert März Roche, Penzberg, für die Synthese von cNADH und den Modellverbindungen und dafür, dass vorübergehenden Instabilitäten Sie nie abgeschreckt haben für mich weiter zu synthetisieren. Ohne den Zugang zu diesen Modellverbindungen wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.
  - Den guten Seelen der Abteilung: Sabine Sporer und Christine Scholtyssek dafür, dass ihr mir so viel von dem „Drum herum“ abgenommen habt (Bestellungen, Abrechnungen, Reisen, IT etc.) und ich mich dadurch auf die Dr. Arbeit fokussieren durfte.
  - Dr. Ortrud Quarder für die gute „Nachbarschaft“, die vielen geleisteten Unterschriften sowie die zahllosen Ausfuhrscheine.
  - Reinhold Mischler für die Unterstützung im Bereich IT.
  - Dr. Uwe Anders für die NMR Untersuchungen an NADH und cNADH.
  - Dr. Peter Kupser für den Zugang zu Mathematika sowie die vielen Tipps.
  - Prof. Dr. Andreas Dreuw und seiner Arbeitsgruppe, besonders bei Philipp Harbach, für die Einführung in die Welt der quantenchemischen Rechnungen bzw. der DF-Theorie, für die hervorragende Unterstützung, so dass der Theoretikeranteil im „Vollblutexperimentator“ wachsen durfte sowie für die hilfreichen Diskussionen rund um NADH.
  - Prof. Dr. Herbert Schneckenburger und Michael Wagner für die Möglichkeit an der Fachhochschule Aalen die Experimente an den Teststreifen durchführen zu dürfen sowie die nette Zeit in der Schwäbische Alb.

Zum Schluss gilt mein ganz besonderer Dank meinem Mann Richard, der mir immer den Rücken gestärkt hat, in allen Phasen des Studiums und der Doktorarbeit meine wichtigste Stütze war und mich immer gefördert und motiviert hat. Gleichzeitig möchte ich mich speziell bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben, meine Wahl immer unterstützt haben und mir durch ihre Erziehung, große Liebe und Vorbild zu all dem verholfen haben. Zum Schluss bin ich ganz besonders meinen Geschwistern, meinen Freunden und meiner Großfamilie für die großartige Hilfe zu großem Dank verpflichtet sowie dafür, dass ihr mein Leben außerhalb der Physik so bereichert.

## Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Mannheim, den

.....  
Alexa Freifrau von Ketteler