



Doctoral Thesis

Erweiterung der Anwendbarkeit der Fluoreszenzspektroskopie auf Biopolymere

Author(s):

Lutz, Hanspeter

Publication Date:

1982

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000284409> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 7107

Erweiterung der Anwendbarkeit
der Fluoreszenzspektroskopie
auf Biopolymere

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der technischen
Wissenschaften

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

HANSPETER LUTZ

Dipl. Chem. Ing. ETH

geboren am 22. April 1954

von Basel BS

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. P.L. Luisi, Referent

Prof. Dr. U. Wild, Korreferent

KURZFASSUNG

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit Fragen auf dem Gebiet der Fluoreszenzspektroskopie von Proteinen. Fluoreszenzspektroskopie wird wegen ihrer Empfindlichkeit in der Biochemie häufig verwendet, so z.B. für Studien der Bindung von Liganden an Proteine. Die Interpretation von Fluoreszenzdaten wird aber oft durch messtechnische Probleme erschwert. Ein solches Problem ist der Mangel an Linearität zwischen der Konzentration des Fluorophoren und des Fluoreszenzsignals durch sogenannte Innerfiltereffekte. Diese entstehen durch Absorption des Anregungs- oder des Emissionslichts innerhalb der Küvette. Für die Innerfiltereffekte sind in der Literatur zwar Korrekturmethode beschrieben, aber diese sind aufwendig und kompliziert. Darum wurde hier versucht, ein eigenes automatisches Korrektursystem zu entwickeln, das einfach und zuverlässig arbeitet. Die Methode arbeitet auf dem Prinzip der Beobachtung der Fluoreszenz an zwei Stellen in der Messküvette. Die Messstellen sind so gewählt, dass die Weglänge des Anregungslichtes und die Weglänge des Emissionslichtes in gleicher Weise verändert werden (die Messstellen liegen auf der Diagonalen der Küvette). Aus diesen zwei Fluoreszenzintensitäten kann dann mit Hilfe eines durch die Weglängen bestimmten Parameters ohne Kenntnis der optischen Dichte diejenige Intensität berechnet werden, welche ohne Innerfiltereffekte beobachtet werden könnte. Dadurch wird erreicht, dass Innerfiltereffekte, verursacht durch Absorption des Anregungslichts und Innerfiltereffekte durch Absorption des Emissionslichts gleichzeitig korrigiert werden können. Die Zuverlässigkeit des Korrektursystems wurde überprüft und es wurden Linearitätsabweichungen von maximal 2% bis zur optischen Dichte von 2 festgestellt. Zur Vervollständigung des Messkomforts wurde gleichzeitig eine Titriervorrichtung für das Fluorimeter gebaut, wobei ein eigener Mischer entwickelt wurde. Dieser besteht im wesentlichen aus einer

Scheibe, die in der Küvette auf und ab bewegt wird, und eine Lösung sanft und vollständig zu mischen vermag.

Zur Verbesserung der Anwendbarkeit der Fluoreszenzspektroskopie für Bindungsstudien, wurde ein Computerprogramm entwickelt, mit dem Fluoreszenzquenchingdaten von Bindungsstudien mit Proteinen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, ausgewertet werden können. Es werden keine unabhängigen Schätzungen oder Messungen für das maximale Fluoreszenzquenching oder die Bindungskapazität des Proteins benötigt. Das Programm erlaubt auch unterschiedliche Quenchings für die verschiedenen Bindungsschritte und unterschiedliche Aktivitäten für verschiedene Proteinkonzentrationen. Zusätzlich erlaubt das Programm auch einen Vergleich der Anwendbarkeit verschiedener, in der Literatur beschriebener Modelle für die kooperative Wechselwirkung der Untereinheiten. Die Zuverlässigkeit der Methode wird anhand von simulierten Daten demonstriert.

Unter Anwendung des Innerfiltereffekt - Korrektursystems und des neuen Computerprogramms wurde die Bindung von NAD⁺ an GPDH (Glyceraldehyd - 3 - phosphat Dehydrogenase) mit Hilfe von Fluoreszenzquenching - Experimenten untersucht. In der Literatur wird die Kooperativität der Bindung von NAD⁺ an das tetramerische GPDH entweder sequenziellen konformationellen Änderungen oder der Existenz von zwei Klassen von Bindungsstellen zugeschrieben, wobei endgültige Aussagen noch nicht gemacht werden können. Die Studie in dieser Arbeit hat ergeben, dass das tetrahedrale KNF-Modell (sequenzielle Änderungen) die Daten gut beschreiben kann, dass aber das Dimer von Dimeren Modell (zwei Klassen von Bindungsstellen) die Daten signifikant schlechter beschreibt. Diese Studie unterstützt also die These, dass die Bindung nach einem sequenziellen Modell verläuft. Weiter wurde gefunden, dass die Aktivität (Bindungskapazität) des Enzyms bei tiefen Konzentrationen abnimmt, und dass das Fluoreszenzquenching für den ersten Bindungsschritt am grössten ist und für die

weiteren Bindungsschritte sukzessive kleiner wird. Bei der Untersuchung der Bindung von N-Br⁸-AD⁺ an GPDH wurde kein signifikanter Unterschied zur Bindung von NAD⁺ festgestellt. Dies unterstützt die These, dass die Induktion der Konformationsänderungen in den Nachbaruntereinheiten nicht von der Struktur des Adenin - Teils von NAD⁺ abhängig ist.

ABSTRACT

In a first part of this work an automatic system for the correction of innerfiltereffects in fluorescence spectroscopy was developed. This system works with the so called "cell shift method". The fluorescence intensity is measured at two points on the cell diagonal. From these two intensities, the "true fluorescence" (fluorescence, corrected for innerfiltereffects due to absorption of the exciting or fluorescence radiation) can easily be calculated without knowing the optical density of the probe. The accuracy of the method was found to be better than 2% for sample absorbances as high as 2.

In a second part, a new computer program for studying the binding of ligands to proteins having several subunits has been developed. The method is described for fluorescence quenching measurements, but can also be applied to other spectroscopic techniques. The method does not require an estimation or measurement of the maximal fluorescence quenching and the binding capability of the protein and it even takes into consideration different maximal quenchings for different ligand binding steps and different activities for various protein concentrations. In addition the method permits the comparison of the different models presented in literature for cooperativity. The efficacy of the method is demonstrated with several simulated data sets.

In a third part the innerfiltereffect correction and the new program was used to study the negative cooperative behaviour of the binding of nicotinamide - adenine dinucleotide to glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase from sturgeon muscle by fluorescence quenching experiments. The best fit is obtained with an induced fit model (KNF-model). However different maximal fluorescence quenchings for the four binding steps must be postulated.

Furthermore the binding capability decreases by decreasing the protein concentration. Using the same approach, nicotinamide - 8 - bromoadenine dinucleotide is shown to bind to glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase in a similar manner.