

Methoden der molekularen Biophysik: Moderne Techniken der Biospektroskopie *J.Fitter*

WS 2002/2003: 2SWS Vorlesung

Inhalt der Vorlesung

Einführung /Wiederholung der Molekülphysik

- Moleküle des Lebens
- Moleküle in elektrischen Feldern
- Theorie der chemischen Bindung
- Wechselwirkung von Molekülen mit Licht

Methoden der Molekülspektroskopie: Theorie und Messtechniken

- Schwingungsspektroskopie (Infrarot- / Raman-Spektroskopie): Anwendungen z.B. auf Photorezeptoren, Ladungstransferreaktionen in Proteinen
- Absorptionsspektroskopie (CD-, Fluoreszenz-Spektroskopie)
- Spezielle Techniken der Fluoreszenz-Spektroskopie (FCS, FRET, Anwendungen auf Einzelmoleküle)

Literatur und Quellen

Atomphysik, Molekülphysik, optische Spektroskopie, Biophysik

- Experimentalphysik III, Demtröder, Springer-Verlag, 1996
- Molekülphysik und Quantenchemie, Haken, Wolf, Springer-Verlag, 1998
- Fundamental University Physics III, Alonso, Finn, Addison-Wesley Publishing Company, 1983
- Structure and Mechanism in Protein Science, Alan Fersht ,W.H. Freeman an Company, 1999
- Proteins: Structures and Molecular Properties, Thomas Creighton ,W.H. Freeman and Company, 1996
- Methoden der Biophysikalischen Chemie, R. Winter/ F. Noll, Teubner, Stuttgart, 1998
- Biophysical Chemistry, Part I-III, Cantor/Schimmel W.H. Freeman and Company, 1980
-

Übersicht über die Methoden der Molekülspektroskopie

Spektralbereiche

UV : 200 – 400 nm

Vis: 400 – 700 nm

IR: > 750 nm

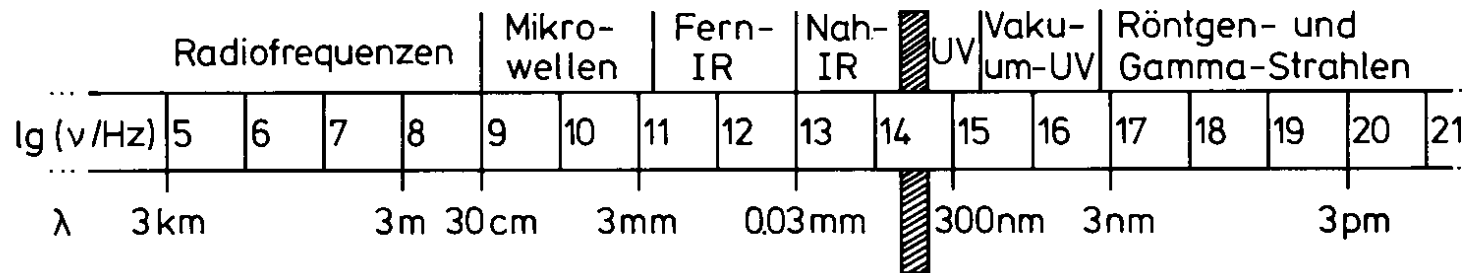
Art der Spektroskopie

➤ Absorption

➤ Emission

➤ Polarisiert (linear, zirkular)

➤ zeitaufgelöst



Häufig werden die Energien der Photonen auch in Wellenzahlen angegeben (z.B. in der Schwingungsspektroskopie).

$$\tilde{n}[\text{cm}^{-1}] = \frac{10^7}{l[\text{nm}]}$$

Beispiel:

$$1000 \text{ nm} = 10^{-6} \text{ m} \Rightarrow \tilde{n} = 10000 \text{ cm}^{-1}$$

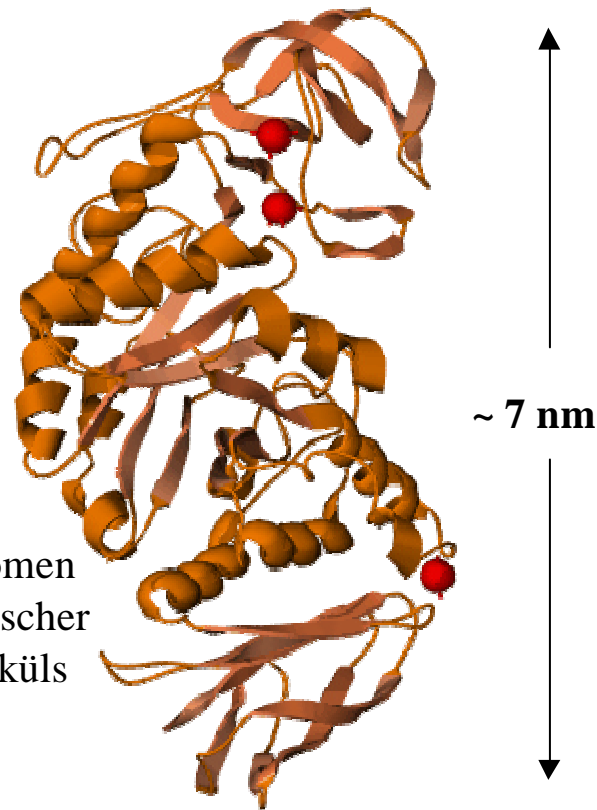
Übersicht: Biomoleküle

Wichtigste Vertreter der makromolekularen Biomoleküle

- Proteine (z.B. Strukturproteine, Enzyme, Rezeptoren)
- Nukleinsäuren (z.B. DNA, RNA)
- Lipide (z.B. DPPC, POPC, DMPC)

Beispiel eines Enzyms: α-Amylase

- Makromolekül besteht aus einigen tausend Atomen
- komplexer und hierarchischer Aufbau des Makromoleküls

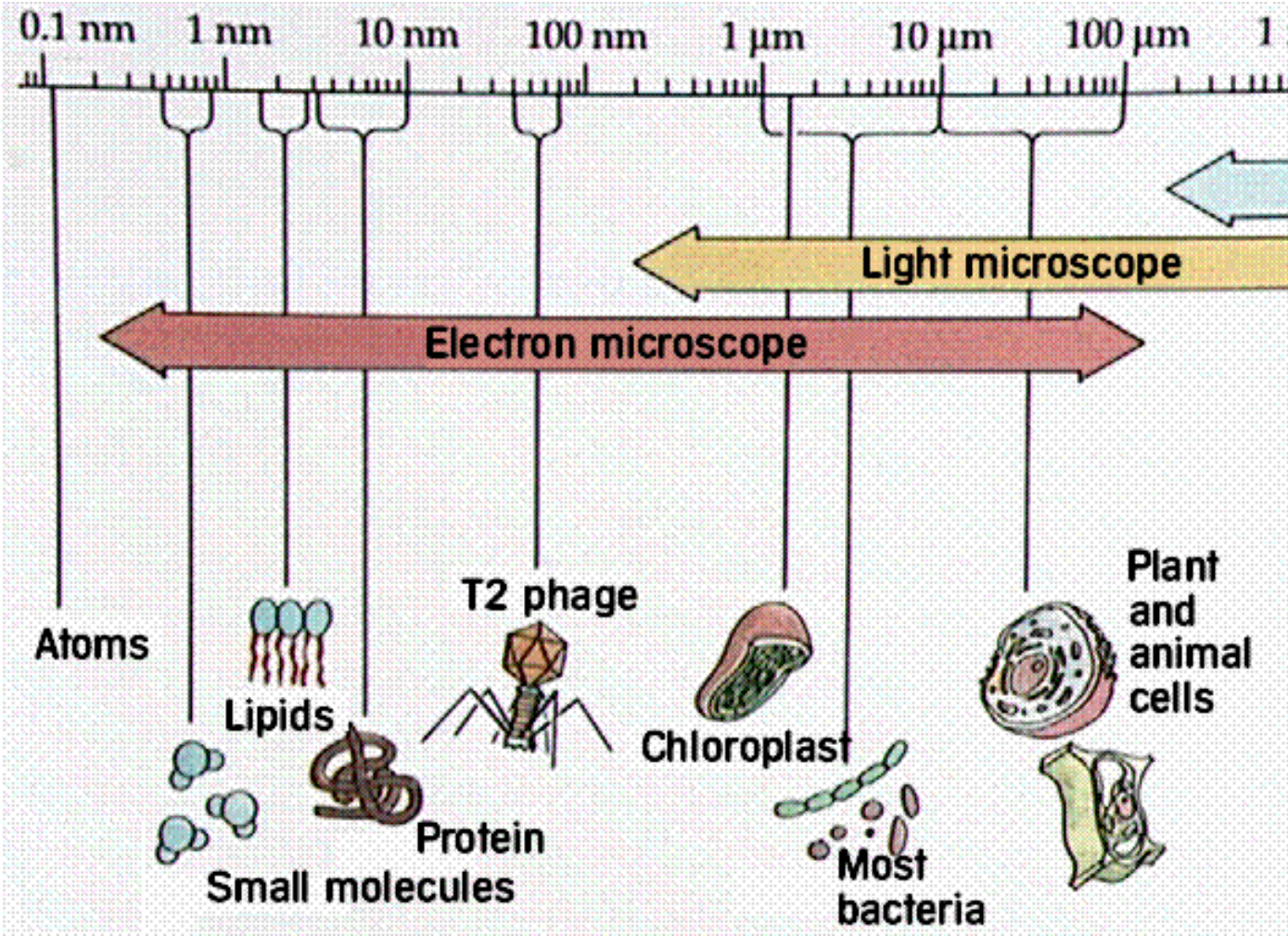


Biospektroskopie

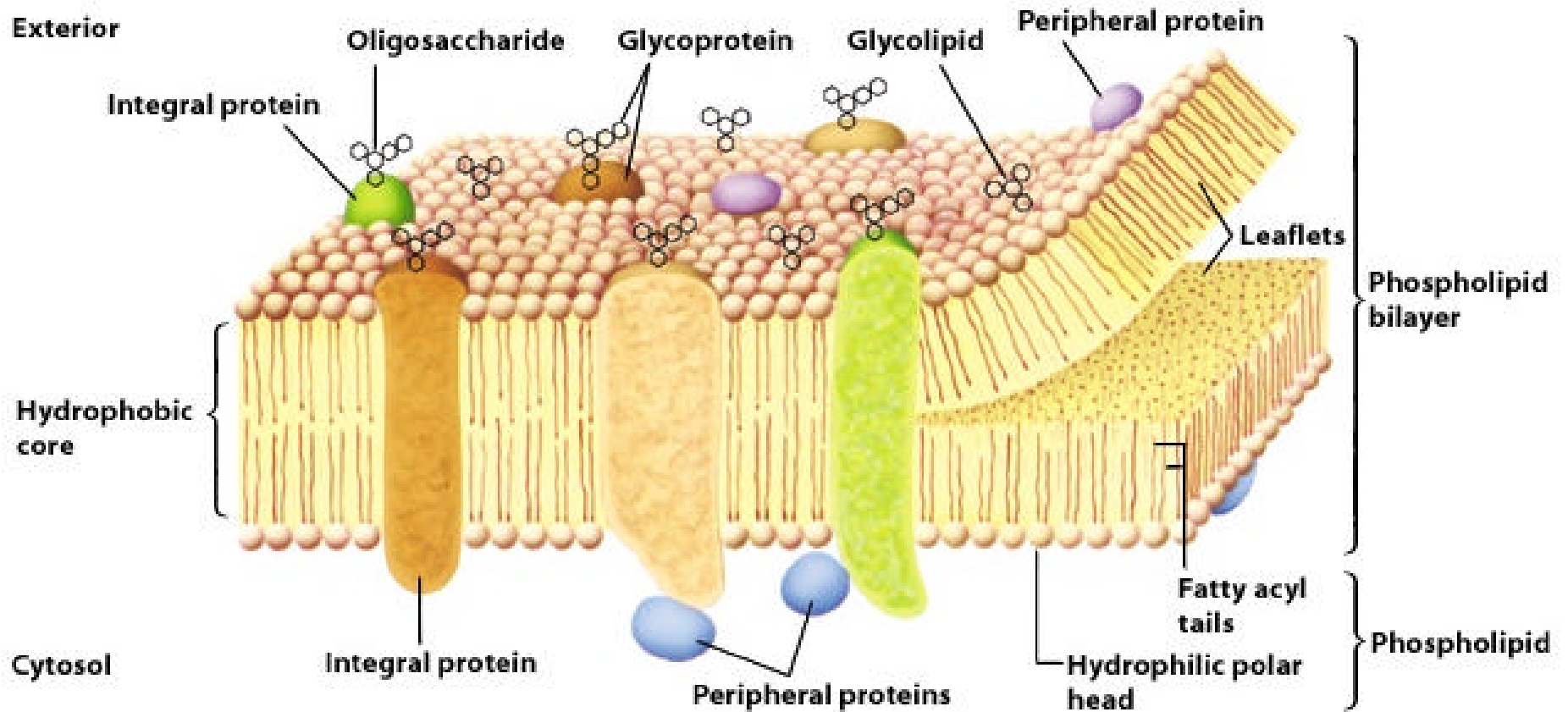
Fragestellungen und Untersuchungsgebiete

- Struktur
- Dynamik
- Wechselwirkung zwischen Biomolekülen
- Funktionsweise

Größenordnungen biologischer Objekte



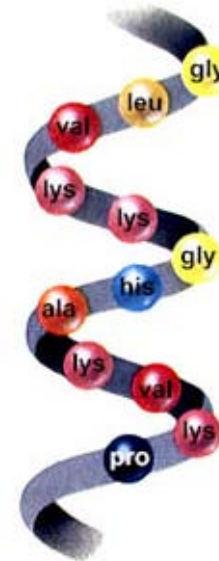
Schema einer Biomembran



Aufbau und Struktur der Proteine



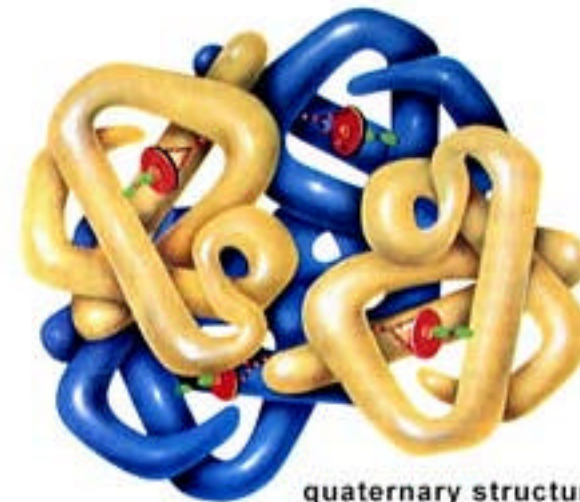
primary structure
(amino acid sequence)



secondary structure
(α -helix)



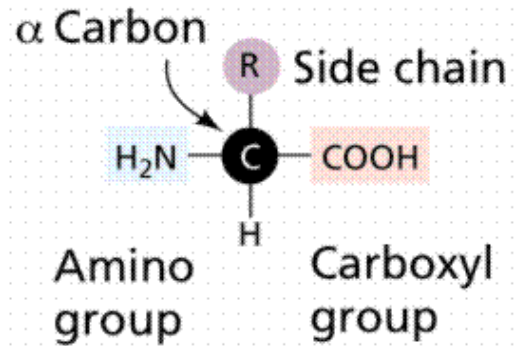
tertiary structure
(folded individual peptide)



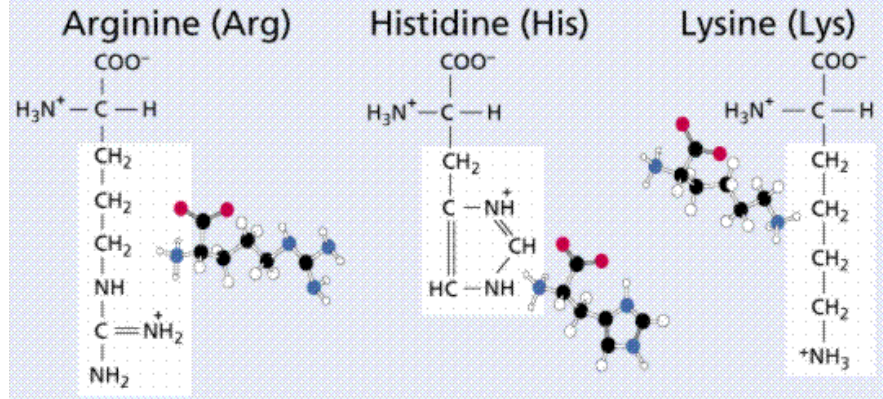
quaternary structure
(aggregation of two or more peptides)

Aminosäuren

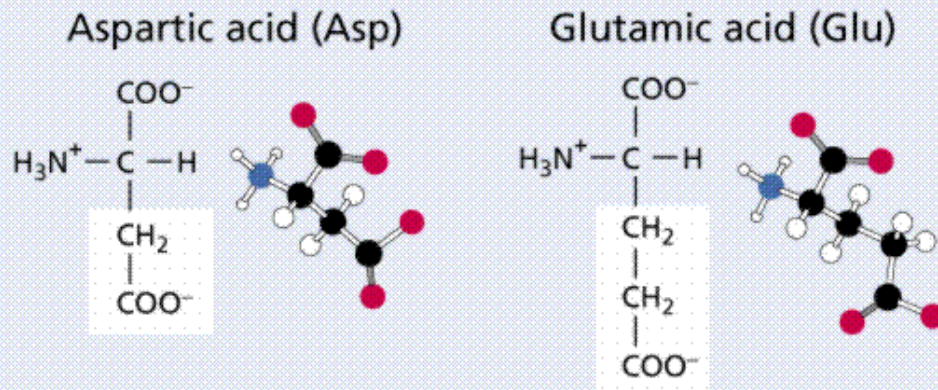
Conventional depiction



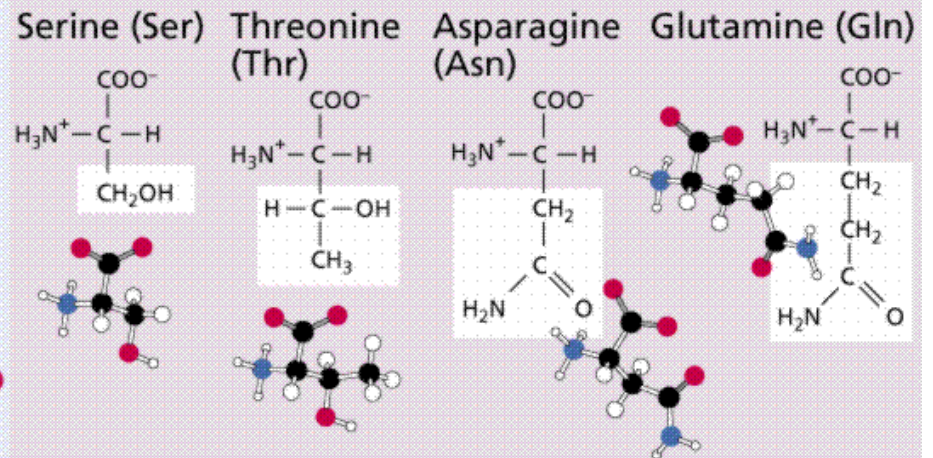
A. Amino acids with electrically charged side chains: Positive



A. Amino acids with electrically charged side chains: Negative

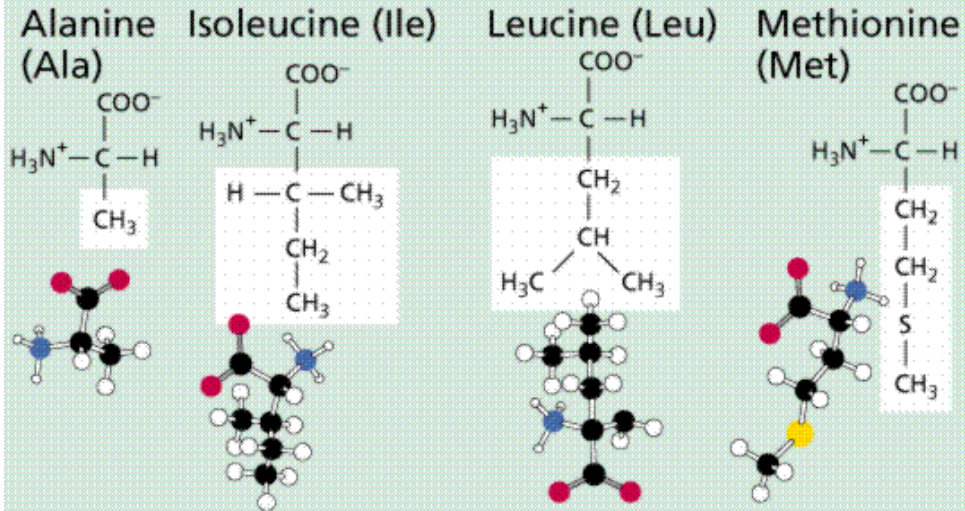


B. Amino acids with polar but uncharged side chains

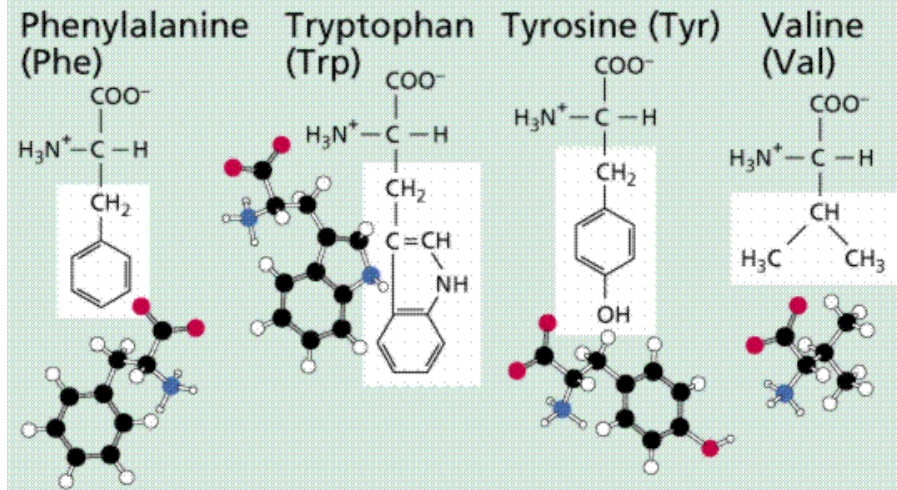


Aminosäuren

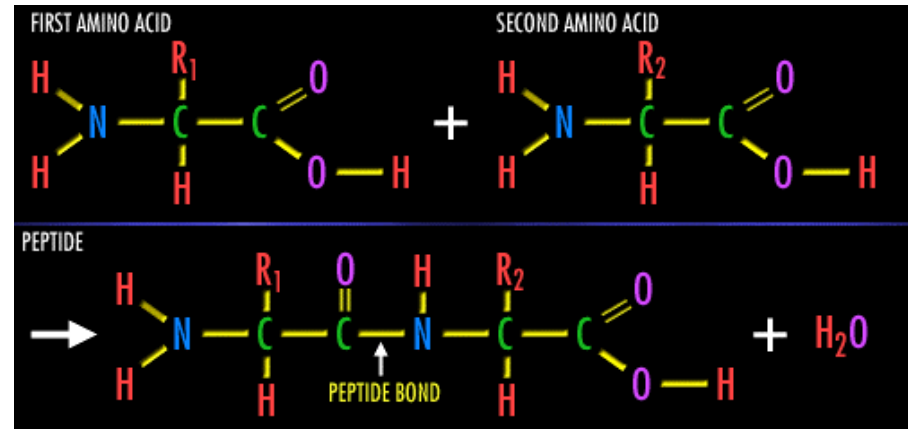
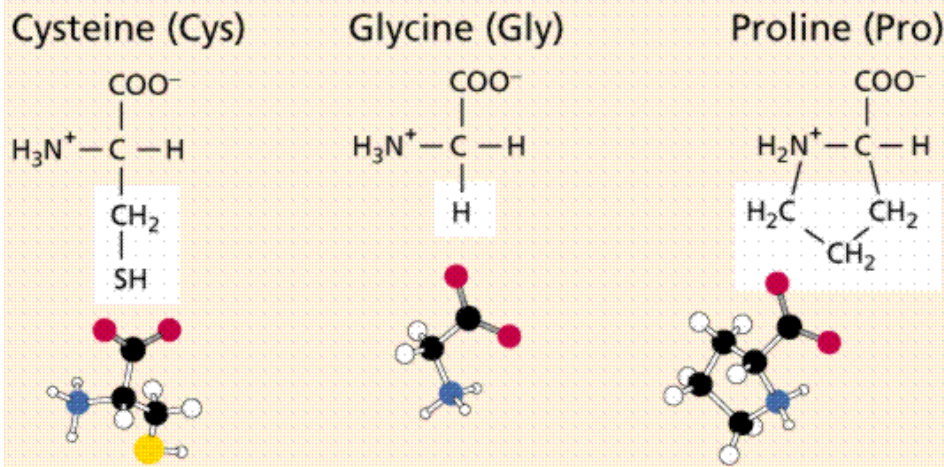
D. Amino acids with hydrophobic side chains



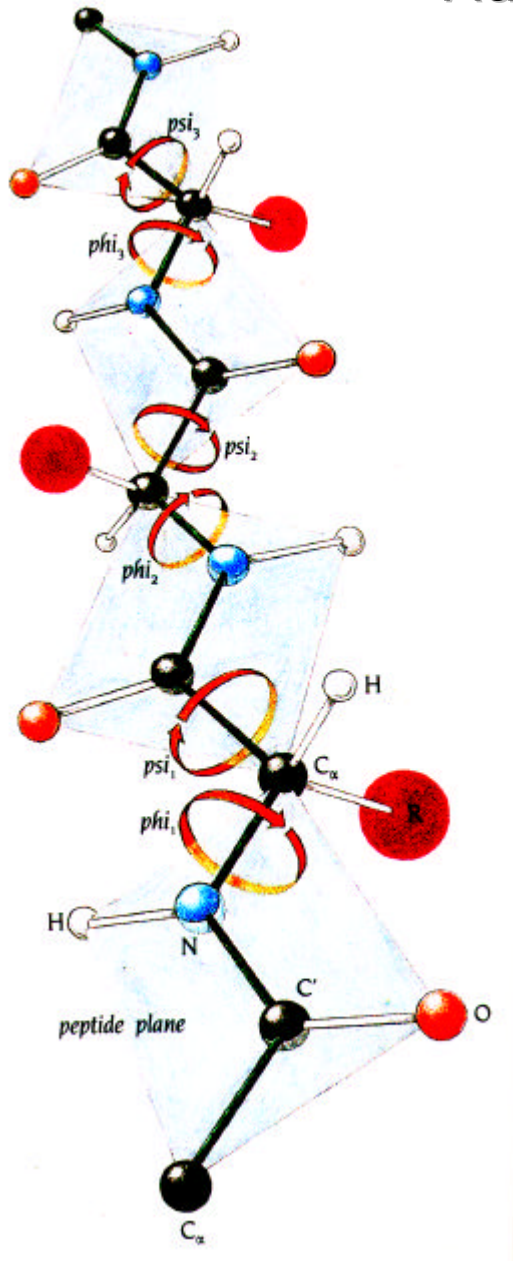
D. Amino acids with hydrophobic side chains (continued)



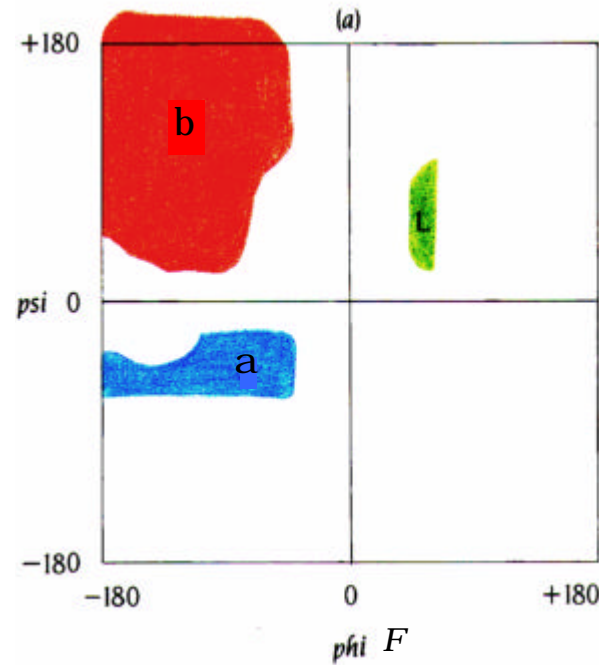
C. Special cases



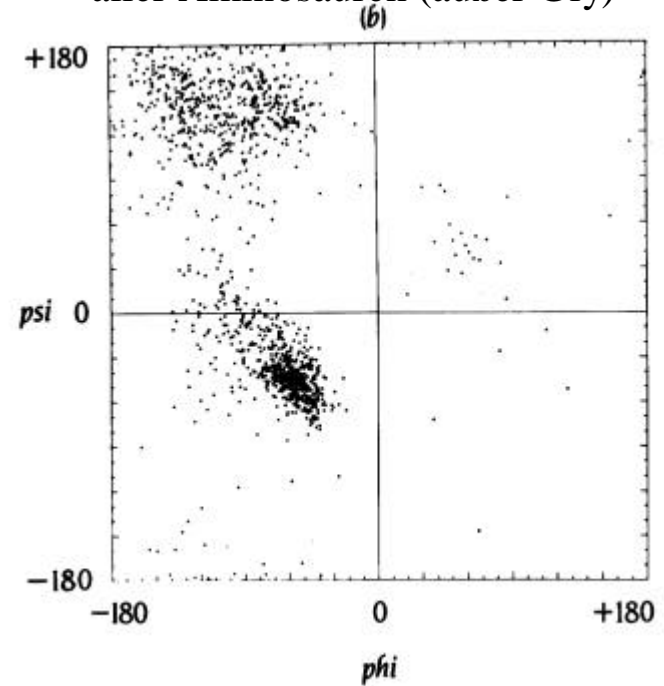
Aufbau und Struktur der Proteine



Ramachandran-Plot

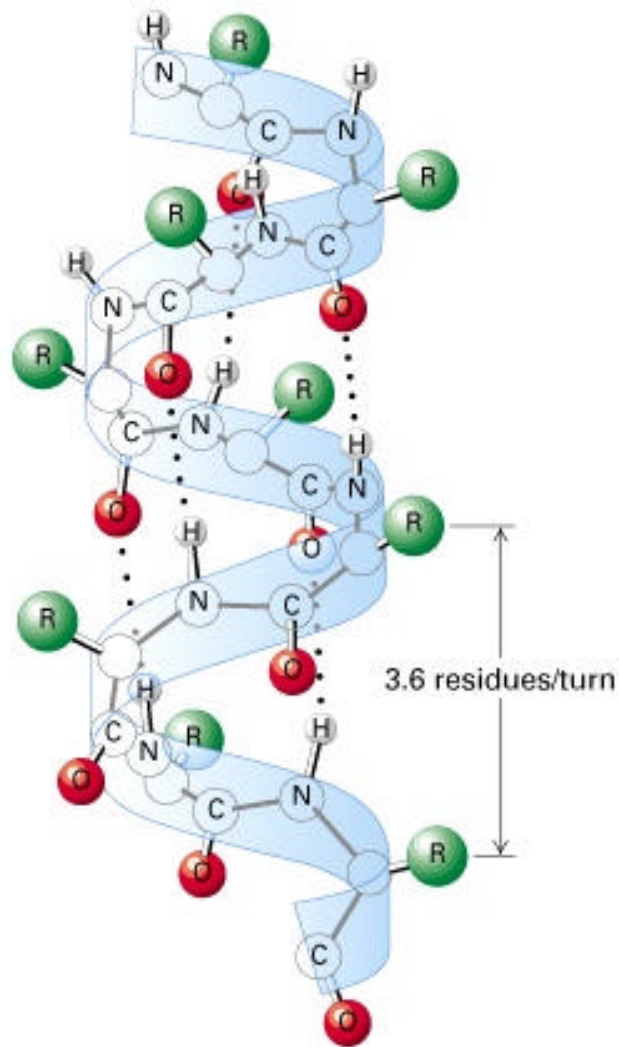


Experimentell bestimmte Φ, Ψ -Winkel aller Aminosäuren (außer Gly)

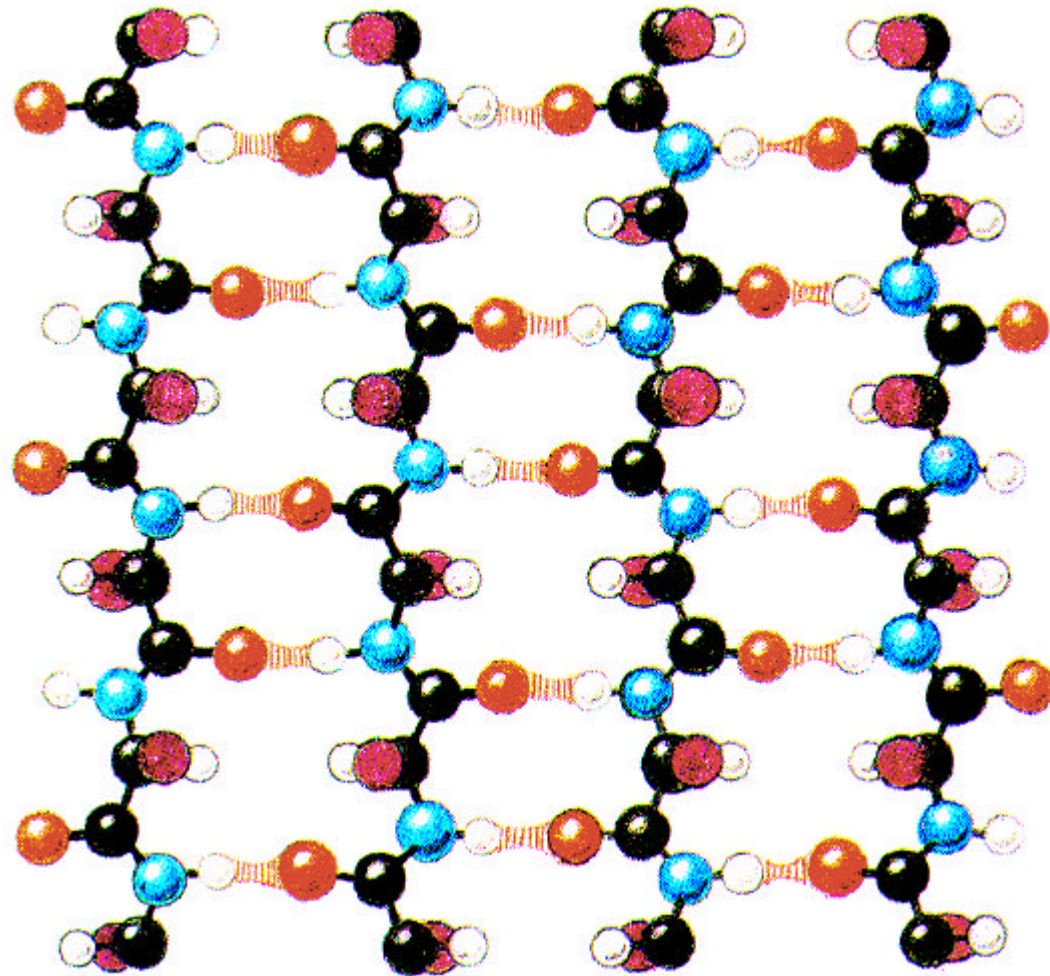


Sekundärstruktur der Proteine

Die α -Helix



Das β -Faltblatt



Proteine

Wichtige Typen von Proteinen und ihre Aufgabe in der Zelle:

Enzyme → Katalyse chemischer Reaktionen → Trypsin, α -Amylase

Rezeptoren → Signaldetektion (z.B. Licht) → Rhodopsin

Transportproteine → Transport von Stoffen (z.B. O_2 , CO_2) → Myoglobin

Kanalproteine (Poren) → Transport durch Membranen (z.B. Ionen) → Ionenkanäle

Motorproteine → gerichtete Bewegung in der Zelle → Myosin, Kinesin

Strukturproteine → Stützfunktion in der Zelle (Zytoskelett) → Aktin, Tubulin

Wichtige Eigenschaften von Proteinen

- 1.) Gut definierte dreidimensionale Raumstruktur → hohe Spezifität der Funktion
(z.B. Spezifität in der Substratbindung)

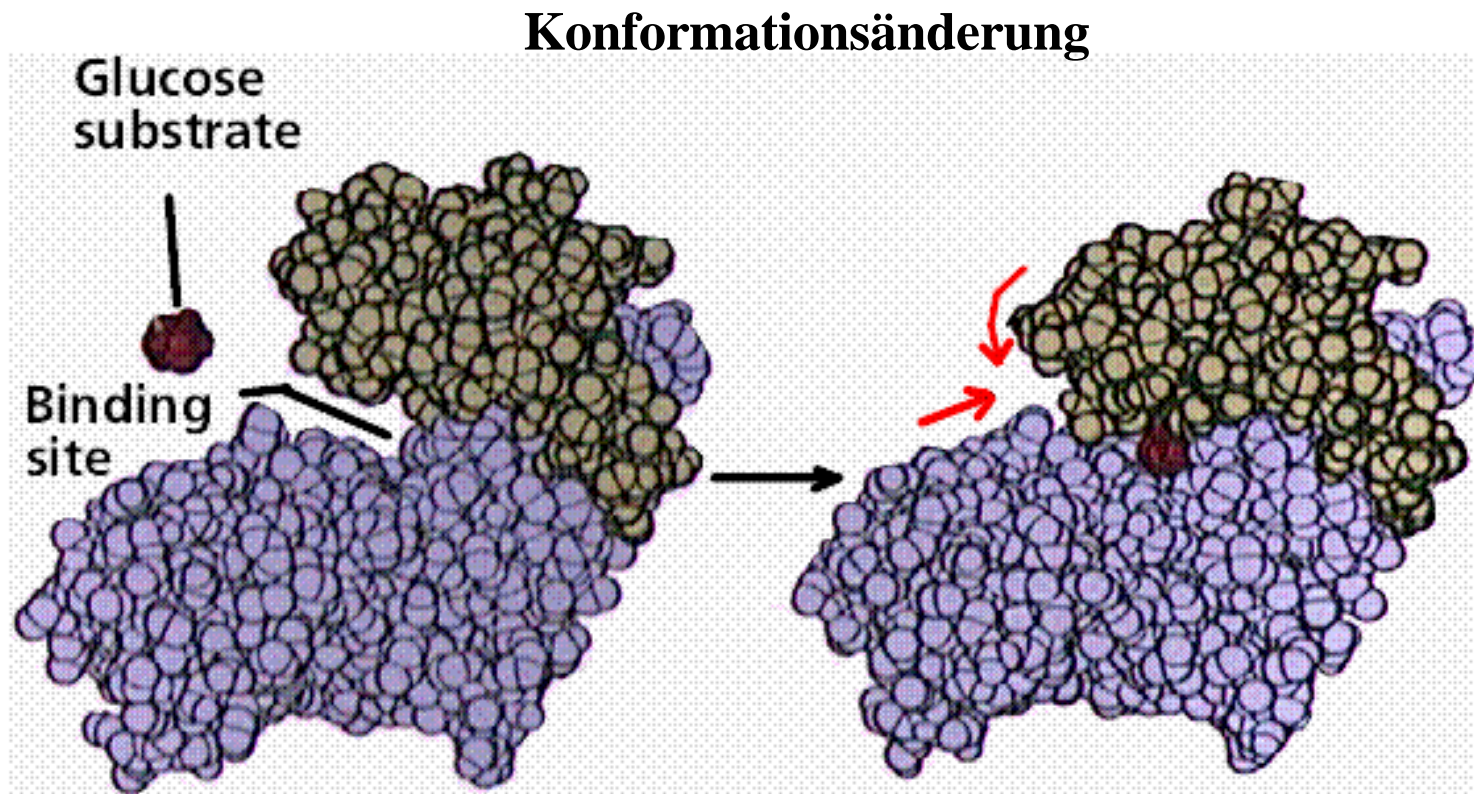
Beispiel: α -Amylase
katalysiert die Spaltung von
glykosidischen Bindungen in
Stärke



aktives Zentrum
Bindung des Substrats

Wichtige Eigenschaften von Proteinen

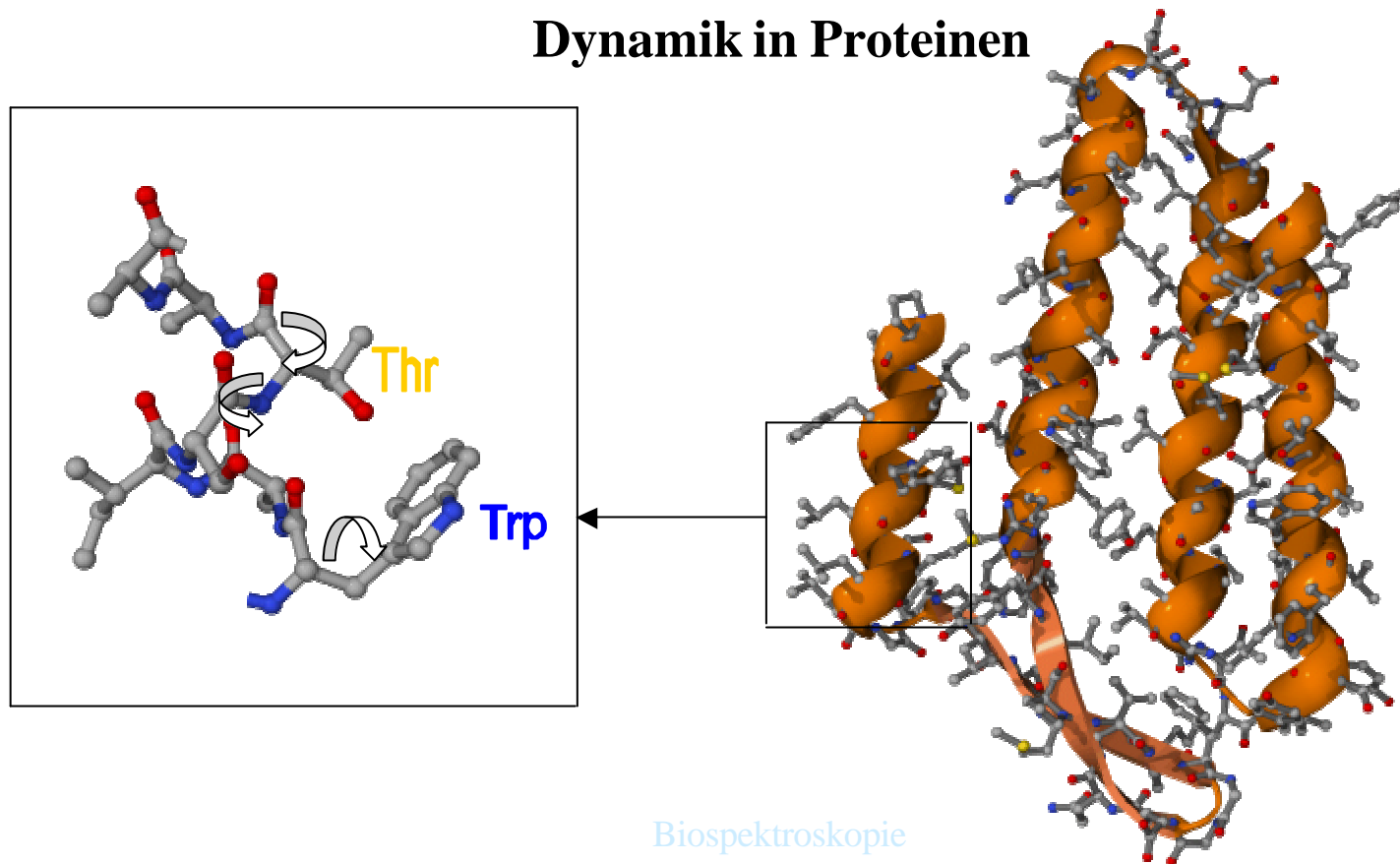
- 2.) Arbeitszyklus eines Proteins (z.B. Enzym) ist oft mit Konformationsänderungen verbunden
→ Unterschiede zwischen Grundzustandsstruktur und Intermediatstrukturen



Wichtige Eigenschaften von Proteinen

- 3.) Essentiell für die Konformationsänderungen im Arbeitszyklus und die Kinetik sind thermische Gleichgewichtsfluktuationen in der Proteinstruktur
→ wichtig für die Funktion: Balance zwischen Stabilität \Leftrightarrow Flexibilität der Proteinstruktur

Dynamik in Proteinen



Wichtige Eigenschaften von Proteinen

Ein detailliertes Verständnis der Funktionsweise und des Funktionsmechanismus eines Proteins ist i.a. nur möglich, wenn die folgenden Eigenschaften bekannt sind:

- 3D- Raumstrukturen (Grundzustand, Intermediatstrukturen)
- Kinetik der Konformationsänderungen (Zeitskala 10^{-3} s; Millisekunden)
- „schnelle“ Gleichgewichtsfluktuationen (Zeitskala 10^{-12} s; Pikosekunden)

→ Ein Film über den gesamten Arbeitszyklus des Proteins mit Mikrosekunden Zeitauflösung und atomarer Ortsauflösung.

Methoden zur Bestimmung von Struktur und Dynamik von Proteinen

Proteinkristallographie → „atomare“ Strukturinformation
Diffraktion (Beugung), Röntgenstrahlung,
Neutronen- und Elektronendiffraktion

NMR → hochaufgelöste Strukturinformationen, Dynamik, Konformationsänderungen

Spektroskopie: FTIR, Raman, CD, Fluoreszenz → Information über verschiedene Bindung
(z.B. H-Bindung), Protonierungszustände,
Chromophore, Trp- und Tyr-Seitengruppen

Differential Scanning Calorimetrie (DSC) → Thermodynamik von Faltungsübergängen und
Protein-Liganden Wechselwirkung

Molekulardynamik Simulation → „Rechnergestützte“ Analyse von Struktur und Dynamik

Kraftmikroskopie (AFM), Laserpinzette (Optical tweezer) → Struktur der Oberfläche,
Mechanik in der Zelle (z.B. gerichtete
Bewegung von Motorproteinen)

Moleküleigenschaften

Moleküle und Bindungen

➤ Wenn zwei oder mehrere Atome sich zu einer neuen Einheit verbinden, so nennt man das entstehende Teilchen Molekül (lat. *molecula*: „kleine Masse“). So wie ein Atom die kleinste Einheit eines chemischen Elementes ist, so ist das Molekül die **kleinste Einheit einer chemischen Verbindung**.

➤ Die Bindungen zwischen den Atomen in einem Molekül variieren in ihrer Stärke und werden durch die spezifischen Atomeigenschaften bestimmt (z.B. Valenzzustand). Gerade der Charakter der Bindungen in einem Molekül spielt häufig bei spektroskopischen Methoden eine zentrale Rolle.

Bindungen im Molekül bzw. zwischen Molekülen

- kovalente Bindungen (homöopolare Bindung)
- ionische Bindungen (heteropolare Bindung)
- Wasserstoffbrückenbindung
- Van der-Waals Bindung

Moleküleigenschaften

Makroskopische Stoffgrößen wie die Dielektrizitätskonstante ϵ und die Permeabilität μ sind durch die elektrischen und magnetischen Eigenschaften der Bausteine der Materie (hier Moleküle) bestimmt. Die Messung dieser Stoffgrößen ermöglichen die Bestimmung wichtiger Moleküleigenschaften

Dielektrischen Eigenschaften

Moleküle sind im allgemeinen elektrisch neutral. Sie können aber ein elektrisches Dipolmoment (und auch höhere Momente) besitzen und ihre elektrische Polarisierbarkeit ist im allgemeinen anisotrop.

Für die **elektrische Verschiebung** in einem Medium mit ϵ gilt:

$$\mathbf{D}_m = \mathbf{e} \cdot \mathbf{E}$$

$$\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r$$

Für die elektrische Polarisation gilt:

$$\mathbf{P} = \mathbf{D}_m - \mathbf{D} \quad \text{mit} \quad \mathbf{D}_m = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}$$

el. Feldkonstante

$$\epsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-12} \text{ AS/Vm}$$

Dielektrizitätszahl

$$\epsilon_r = C/C_0$$

$$\text{oder} \quad \mathbf{P} = (\epsilon - 1)\epsilon_0 \mathbf{E} = \mathbf{c}\epsilon_0 \mathbf{E}$$

Dielektrische Suszeptibilität

$$\chi = \epsilon - 1$$

\mathbf{P} mißt den Beitrag der Materie (Moleküle) zur elektrischen Verschiebung

Moleküleigenschaften

Molekulare Deutung der Polarisation

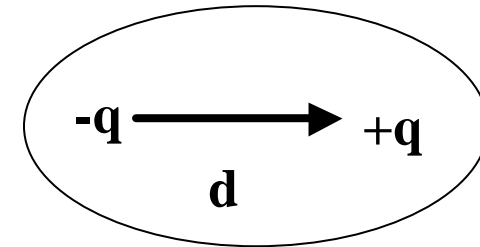
$$\mathbf{P} = \frac{1}{V} \sum_{i=1}^N \mathbf{p}_i = \mathbf{p}'N$$

$$N = \frac{N_A r}{M}$$

N : Teilchenzahldichte
 r : Dichte
 M : Molekulargewicht

molekulares Dipolmoment

$$\mathbf{p} = q\mathbf{d} \text{ [As m]}$$



So kann zwischen der makroskopischen Meßgröße ϵ eine Beziehung zur mikroskopischen Moleküleigenschaft des Dipolmoments \mathbf{p} hergestellt werden.

gängige Einheit:

$$1 \text{ Debye (D): } 3.336 \cdot 10^{-30} \text{ [As m]}$$

Unpolare Moleküle

Zentrosymmetrische Moleküle (H_2 , O_2 , CO_2) sind unpolare und haben kein permanentes Dipolmoment. Bei angelegtem Feld ($\mathbf{E} \neq 0$) kann jedoch ein **induziertes Dipolmoment** entstehen. Für dieses durch Polarisation im Feld induziertes Dipolmoment gilt

$$\mathbf{p}_{ind} = \mathbf{a} \cdot \mathbf{E}_{loc} \quad \text{bzw. im Volumen} \quad \mathbf{P} = N\mathbf{p}_{ind} = N\mathbf{a} \cdot \mathbf{E}_{loc}$$

Die **Polarisierbarkeit** α ist ein Maß für die Verschiebbarkeit von positiver relativ zu negativer Ladung im Molekül und damit eine wichtige Moleküleigenschaft (Verschiebungspolarisation) \Rightarrow siehe Ramanspektroskopie.

Moleküleigenschaften

Anteile zur Verschiebungspolarisation

- **Elektronenpolarisation:** Das induzierte Dipolmoment entsteht durch Verschiebung der Elektronenwolke relativ zum positiven schweren Kern
- **Ionenpolarisation:** Verschiebung von positiven relativ zu negativen Ionen im Moleküle

Die gemessene Polarisierbarkeit ist die Summe aus beiden Anteilen. Anstelle der Polarisierbarkeit α [As m²/V] gibt man häufig das **Polarisierbarkeitsvolumen** an:

$$a' = \frac{a}{4\pi\epsilon_0}$$

Die Polarisierbarkeit in Molekülen ist im allgemeinen nicht räumlich isotrop. Daher wird diese Größe (bzw. $\hat{\alpha}$) in Komponenten oder als Tensor dargestellt.

Clausius-Mosotti-Gleichung

$$\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} \frac{M}{r} = \frac{1}{3} \frac{N_A}{\epsilon_0} a \equiv P_{Mol}$$

Beispiele für einfache Moleküle

	Polarisierbarkeitsvolumina α' , in 10^{-30} m^3		
	$\bar{\alpha}'$	α'_{\perp}	$\alpha'_{ }$
H ₂	0,79	0,61	0,85
O ₂	1,60		
Cl ₂		3,2	6,6
C ₆ H ₆	10,3	6,7	12,8
H ₂ O	1,44		
CCl ₄	10,5		

Moleküleigenschaften

Frequenzabhängigkeit der Polarisation

- Bei kleinen Frequenzen bis hin zum Infrarot-Bereich kann die elektromagnetische Strahlung die Materie mit der gegebenen Frequenz umpolarisieren, d.h. die Polarisation folgt dem Wechselfeld.
- Wird die Frequenz darüber hinaus erhöht (z.B. im Sichtbaren Bereich), so trägt nur noch die Elektronenpolarisierbarkeit zur Polarisierbarkeit bei. Die schweren Kerne der Ionen sind zu träge um dem schnellen Wechselfeld zu folgen.

Die Frequenzabhängigkeit wird durch die **Lorentz-Lorenz-Gleichung** beschrieben

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \frac{M}{\mathbf{r}} = \frac{1}{3} \frac{N_A}{\mathbf{e}_0} \mathbf{b} \equiv R_M$$

Maxwell – Beziehung: $\epsilon \mu = n^2$

Für die Permeabilität bei Molekülen gilt

in der Regel: $\mu = 1$

Daraus folgt für den Brechnungsindex: $n = \sqrt{\epsilon}$

R_M : Mol-Refraktion

Die **optische Polarisierbarkeit** β ist die Polarisierbarkeit bei Frequenzen im UV-Vis Bereich.
=> Dispersion

Moleküleigenschaften

Polare Moleküle

Im Unterschied zu unpolaren Molekülen besitzen polare Moleküle ein **permanentes Dipolmoment p_p** . In diesem Fall tritt neben der Verschiebungspolarisation die sogenannte **Orientierungspolarisation** auf.

Permanente Dipolmomente p_p in 10^{-30} As m ($1D = 3,3356 \cdot 10^{-30}$ As m)

Vergleich zu p_{ind} :

für $E = 10^5$ V/cm

$\alpha' = 10^{-24}$ cm³

$\Rightarrow p_{ind} = 10^{-33}$ As m

HF	6,0	H ₂	0
HCl	3,44	H ₂ O	6,17
HBr	2,64	CH ₃ OH	5,71
CO	0,4	KF	24,4
CO ₂	0	KCl	34,7
NH ₃	4,97	KBr	35,1
C ₆ H ₆	0		

- Die Orientierungspolarisierung beruht auf der Ausrichtung permanenter Dipole in einem von außen angelegten Feld. Diese Orientierung ist stark temperatur- und frequenzabhängig.
- Permanente Dipolmomente lassen Rückschlüsse auf die Struktur der Moleküle zu.

Bsp.: CO₂ mit $p_p = 0 \Rightarrow$ lineares Molekül

H₂O mit $p_p \neq 0 \Rightarrow$ gewinkeltes Molekül

Moleküleigenschaften

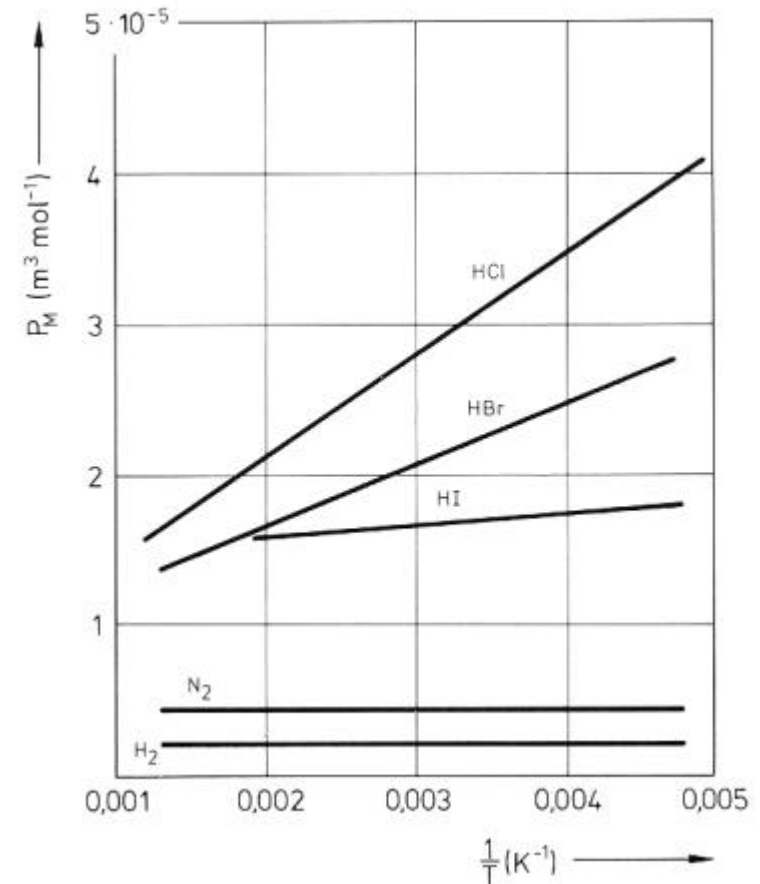
Temperaturabhängigkeit der Polarisation

Der Ausrichtung der permanenten Dipole (Orientierungspolarisation) steht die thermische Energie $W_{th} @ k_B T$ entgegen, die eine Gleichverteilung anstrebt. Dies führt zu einer ausgeprägten Temperaturabhängigkeit der Polarisation, die mit der **Debye-Gleichung** beschrieben wird:

$$\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} \frac{M}{\rho} = \frac{1}{3} N_A \left(\mathbf{a} + \frac{p_p^2}{3k_B T} \right) \equiv P_M$$

P_M : Molpolarisation

Wenn bei angelegten Wechselfeldern die Moleküle (bzw. die p_p) dem Feld nicht mehr folgen können, geht die Debye-Gleichung in die Clausius-Mosotti-Gleichung über (ab Mikrowellen Bereich).



Moleküleigenschaften

Brechungsindex und Dispersion

Im Wechselfeld hoher Frequenzen (z.B. sichtbares Licht) mißt man statt ϵ häufig einfacher den Brechungsindex n (bei $\mu = 1 \Rightarrow n = \sqrt{\epsilon}$). Die Frequenzabhängigkeit von ϵ oder n spiegelt die verschiedenen Anteile der Polarisierung, der Verschiebung und der Orientierung wider. Im sichtbaren Bereich des Lichts ist nur noch die elektronische Verschiebungspolarisation wirksam.

Die Dispersion (Frequenzabhängigkeit von n) läßt sich in guter Näherung bei einem Molekül mit einem gedämpften harmonischen Oszillator beschreiben.

Schwingungsgleichung:

$$m\ddot{x} + g\dot{x} + m\omega_0^2 x = eE_0 e^{i\omega t}$$

stationäre Lösung: $x(t) = X e^{i\omega t}$

m : Molekülmasse

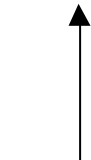
x : Auslenkung

e : Ladung

γ : Dämpfung

komplexe Größe

$$X = X' - iX''$$

$$\text{mit } X = \frac{eE_0}{m(\omega_0^2 - \omega^2) + ig\omega} = \left(\frac{em(\omega_0^2 - \omega^2)}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + g^2\omega^2} - i \frac{eg\omega}{m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + g^2\omega^2} \right) E_0$$


Moleküleigenschaften

Brechungsindex und Dispersion

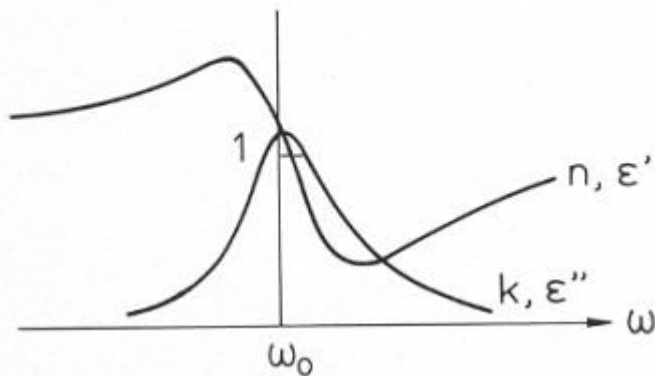
Entsprechend gilt für das Dipolmoment $p = e \cdot x$ (Ladung e und Abstand x) und damit

$$\mathbf{e} = 1 + \frac{N}{\mathbf{e}_0} \mathbf{a} = 1 + \frac{Ne \cdot x}{\mathbf{e}_0 E_0} \longrightarrow \mathbf{e} = \mathbf{e}' - i\mathbf{e}''$$

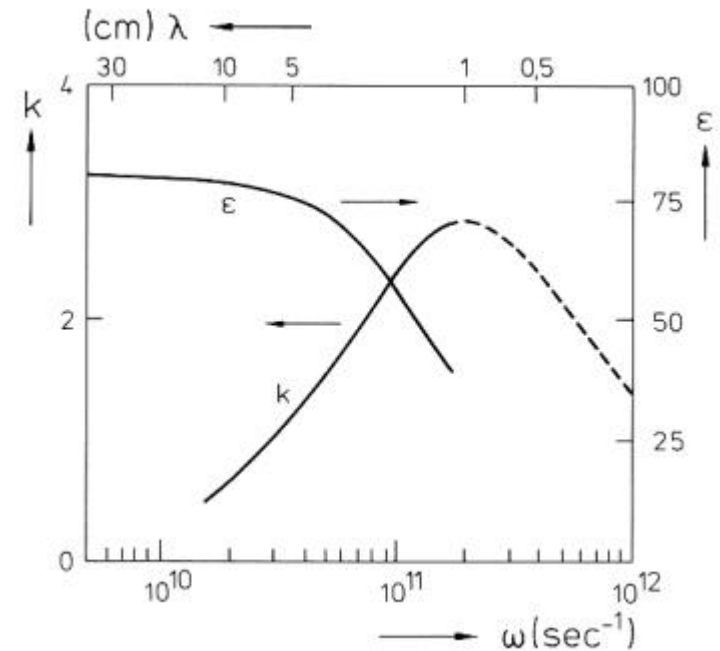
d.h. man erhält eine komplexe Dielektrizitätszahl, wobei Realteil und Imaginärteil über die sogenannte Kronig-Kramers-Relation miteinander verknüpft sind (Verluste: Absorption, ϵ'' und Brechung: Dispersion, ϵ'). Da ϵ komplex ist, wird auch der Brechungsindex n eine komplexe Größe:

$$\tilde{n} \equiv \sqrt{\mathbf{e}' - i\mathbf{e}''} = n + ik$$

Darstellung von n für gedämpften Oszillator



Dispersion und Absorption in Wasser



Moleküleigenschaften

Anisotropie der Polarisierbarkeit

Im allgemeinen sind Moleküle in ihrer Polarisierbarkeit anisotrop. Aus Kenntnis dieser Anisotropie kann z.B. auch auf die Form der Moleküle geschlossen werden. Eine direkte Messung der Anisotropie kann nur mit orientierten Molekülen durchgeführt werden (z.B. in einem Molekülkristall).

Weitere Aspekte der Anisotropie

- elektrooptischer Kerreffekt
- Depolarisation von gestreutem Licht
- optische Aktivität
 - => Zirkulardichroismus
(CD-Spektroskopie)

Anmerkung: Magnetische Eigenschaften spielen hauptsächlich für Techniken wie NMR, ESR eine Rolle und werden hier nicht behandelt.

Die Rayleigh-Streuung hängt charakteristisch vom Streuwinkel ab

