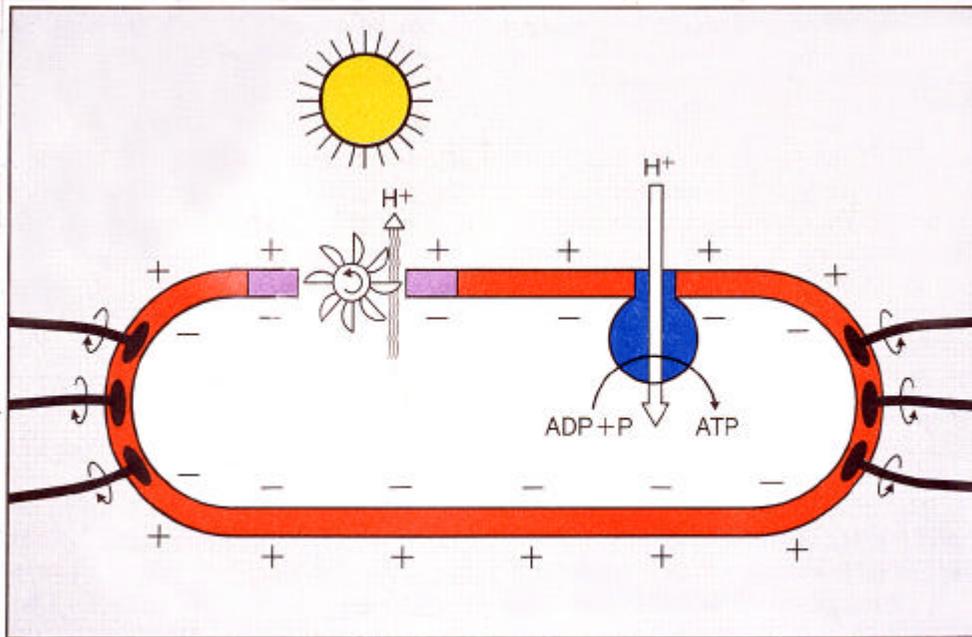
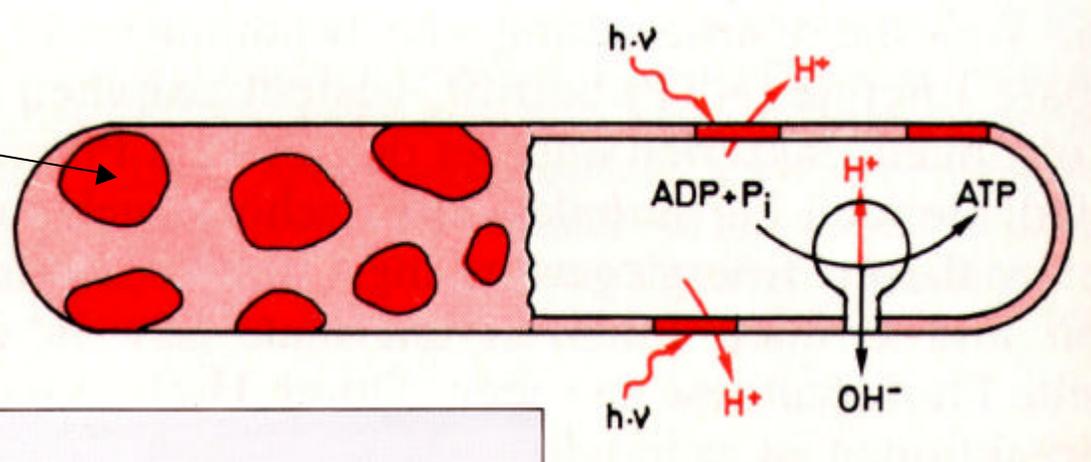


Bacteriorhodopsin: Ein Modellsystem der molekularen Biophysik

Licht-getriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin im *Halobacterium salinarum*

Purpurmembranen



Bei Nährstoffmangel:
Phototrophe Energieversorgung

Protonenmotorische
Energie z.B. zum Antrieb
des Flagellenmotors

Protonengradienten in der Biologie:
Zentrales Prinzip der Energie-
umwandlung (Mitchell-Hypothese) !

BACTERIORHODOPSIN

A biopolymer for optical information processing

Increasingly powerful computers are providing our working environment, bringing with them the need for data storage and processing media. At present, magnetic recording media prevail, but there has been serious competition from optical media, which have considerably higher storage capacities. Not only optical data storage, but also optical data processing has important advantages over conventional electronic processing. Dr. Wilfried Hampp, member of the International Council of the Max-Planck-Gesellschaft, and Dr. Albert Müller from the Corporation for Microchemicals Industry, the research company of Wacker-Chemie, are actively engaged in research in this promising area of optical information technology. In the following paragraphs, for example, they describe the possibilities offered by future information recording and processing technologies.



Bacteriorhodopsin

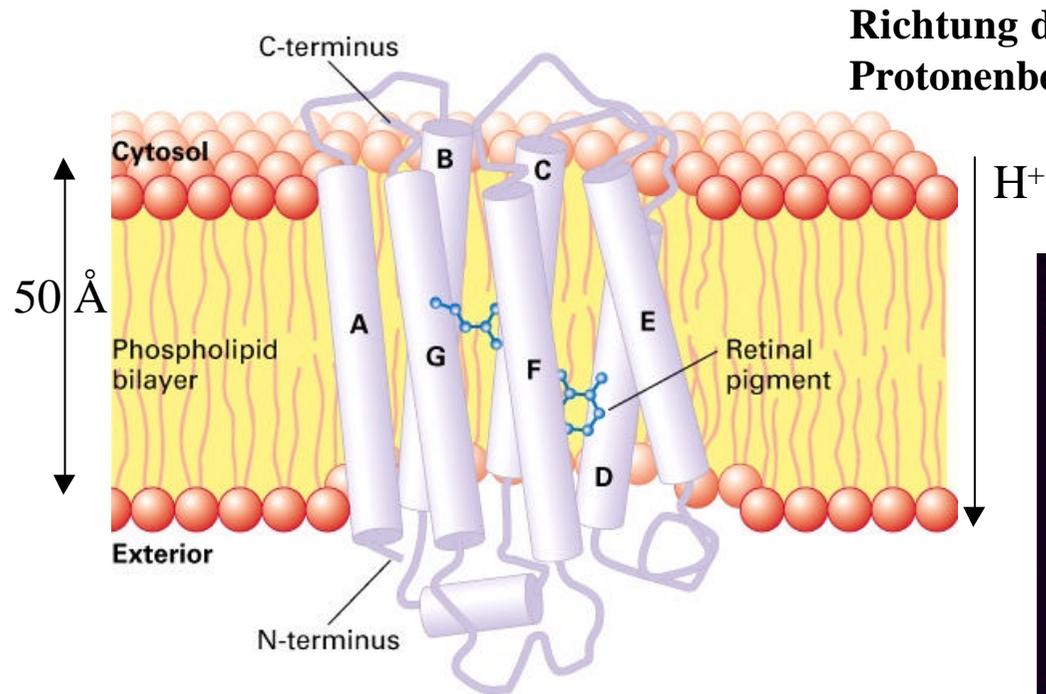
Bacteriorhodopsin ist ein integrales Membranprotein, dass seit nahezu 30 Jahren mit zahlreichen Methoden untersucht wird. Deshalb stellt es im Bereich der molekularen Biophysik ein wichtiges Modellsystem dar.

Einsatz Biophysikalischer Methoden im Falle des Bacteriorhodopsins

- Strukturuntersuchung (Beugung am 2D Gitter, 3-D Proteinkristallographie, Elektronenmikroskopie, Neutronenbeugung), Messungen von Konformationsänderungen, zeitaufgelöste Strukturänderungen, Lokalisation von Labeln und Wassermolekülen
- Zeitaufgelöste UV-Vis-Spektroskopie: Photozyklus
- FTIR-Spektroskopie und Raman-Spektroskopie: Lokalisation von Protonierung, Strukturänderung, zeitaufgelöste Studien
- Fluoreszenz-Spektroskopie mit gebundenen Farbstoffen: Untersuchung und Lokalisation von Protonen während des Photozyklus
- Neutronenspektroskopie, MD-Simulation: schnelle Proteindynamik

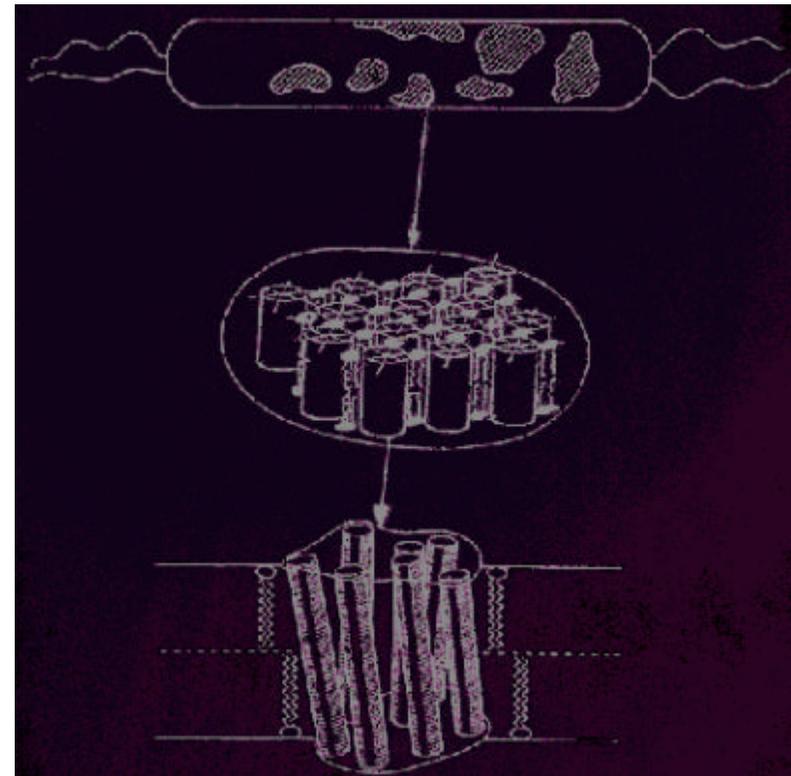
Bacteriorhodopsin

Model-Struktur



**Richtung der
Protonenbewegung**

**Struktur und Anordnung der
BR-Moleküle**



BR bildet mit den Lipiden in der
Purpurmembraan ein natürliches
2-dimensionales Gitter, das sich
für Diffraktionsmessungen eignet.

Absorptionsspektroskopie

Lichtabsorption (Lambert-Beer Gesetz)

$$I(d) = I_0 \cdot 10^{-\epsilon C d}$$

$I(d)$: Intensität des von der Probe durchgelassenen Lichts

I_0 : Intensität des einfallenden Lichts

C : Konzentration der absorbierenden Moleküle [mol/l]

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient [l/mol/cm]

d : Lichtstrecke in der Probe [cm]

Die Absorption wird angegeben durch die **Optische Dichte**

$$OD = \log I_0/I(d) = \epsilon C d$$

Beispiel: $OD = 1$

=> 90% des Lichts wurde absorbiert

Messbereich: $OD = 10^{-3} - 0.5$

Elektronische Übergänge in Proteinen

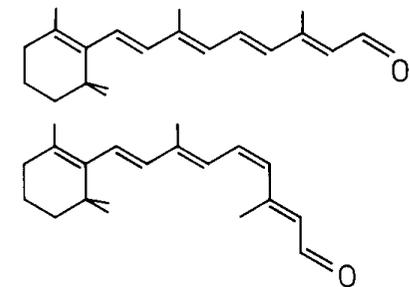
Chromophor	λ_{\max} (nm)	ϵ bei λ_{\max} (l · mol ⁻¹ · cm ⁻¹)
Peptid $\pi \rightarrow \pi^*$	~ 190	~ 7 000
Peptid $n \rightarrow \pi^*$	~ 220	~ 100
Phenylalanin	257	200
	206	9 300
	188	60 000
Tyrosin	274	1 400
	222	8 000
	193	48 000
Tryptophan	280	5 600
	219	47 000
Adenosin	259	14 900
Guanosin	276	9 000
Cytidin	271	9 100
Thymidin	267	9 700
Uridin	261	10 100
FAD	438	14 600
Chlorophyll	362	60 000
	780	85 000

Bacteriorhodopsin

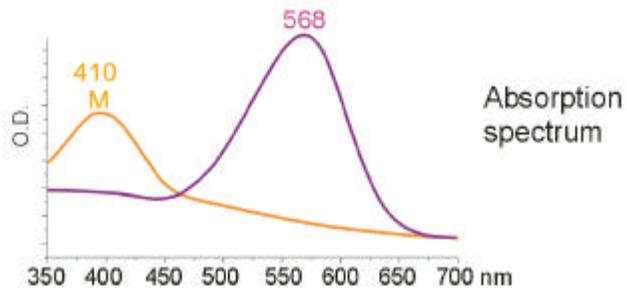
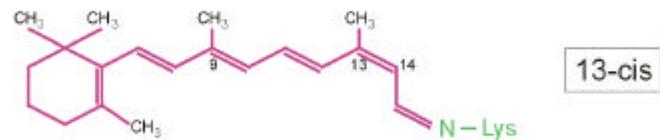
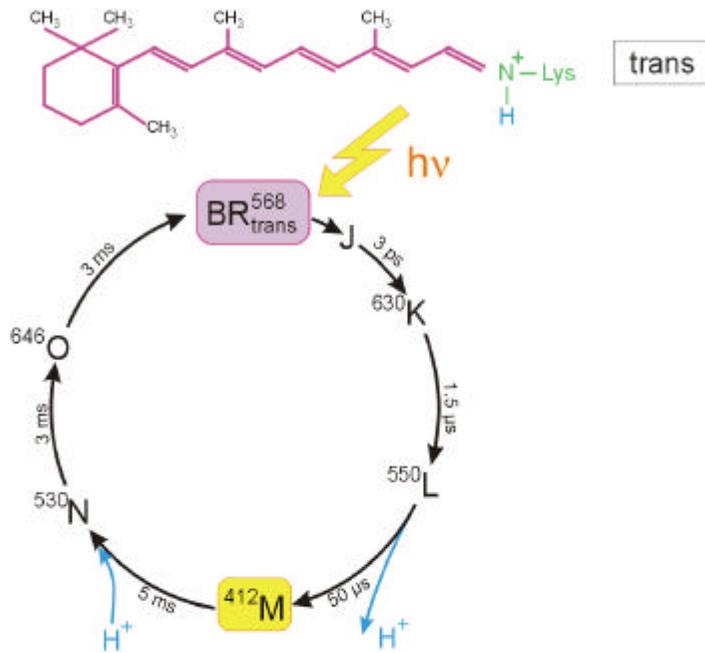
→ Retinal:

$\epsilon \sim 47.000$ bei

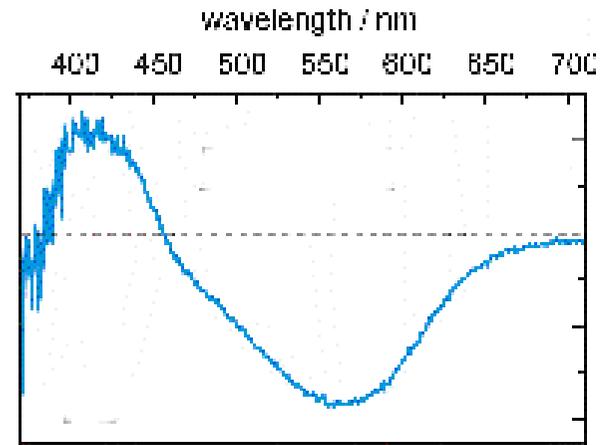
$\lambda_{\max} = 570$ nm



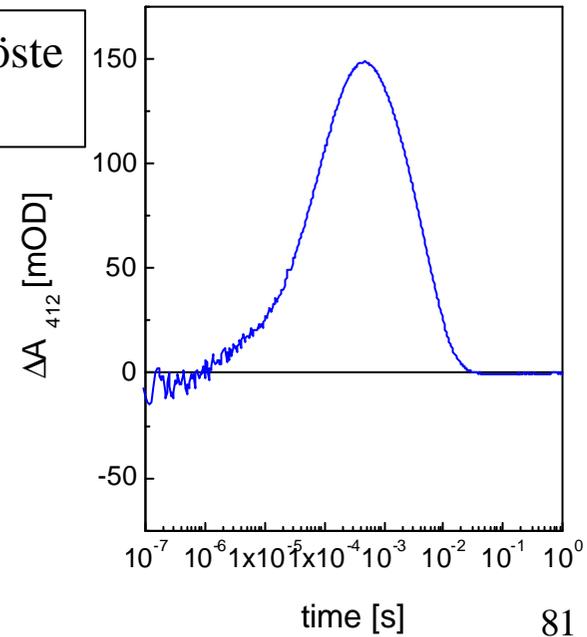
Der Photozyklus von Bacteriorhodopsin



Differenzspektrum

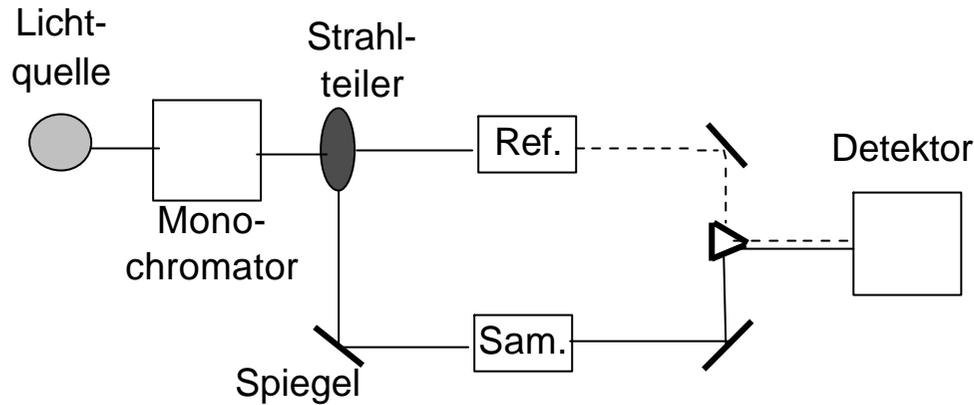


Zeitaufgelöste Messung



Wie mißt man Absorptionsspektren ?

Zweistrahl-Photometer



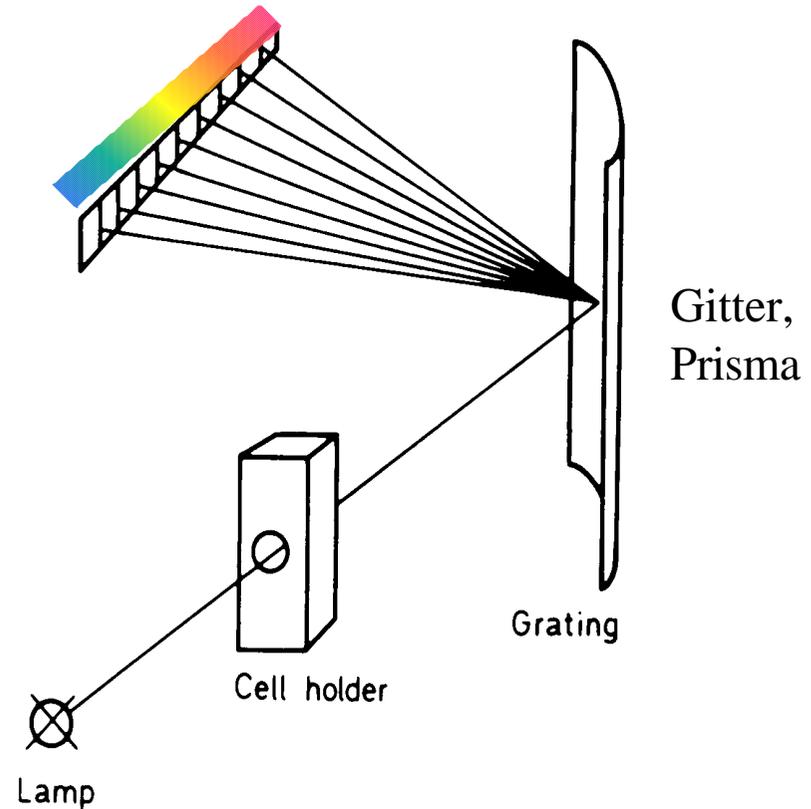
I und I_0 werden simultan gemessen

⇒ z.B. für Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Korrekturen:

- Empfindlichkeit des Detektors als Funktion der Wellenlänge
- Streulicht, Winkelabhängigkeit des gestreuten Lichts

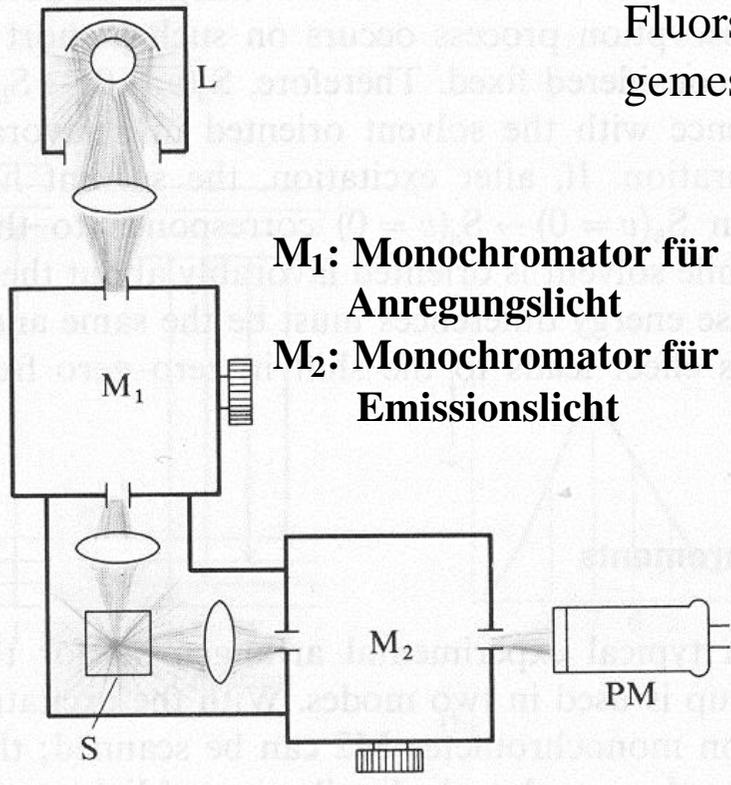
Diodenarray-Spektrometer



- sehr gute Zeitauflösung bei Absorptionsdifferenzen die während eines Arbeitszyklus des Proteins auftreten
- bei Differenzmessungen ist keine Referenzstrahlmessung nötig.

Messanordnung in der Fluoreszenzspektroskopie

Schema eines Fluoreszenzspektrometers



Das Anregungslicht ist gegenüber dem Emissionslicht spektral nur geringfügig verschoben, daher wird die Fluoreszenzemission im Winkel von 90° zum Anregungslicht gemessen.

Emissionsspektrum: M₁ wird auf eine feste Wellenlänge fixiert (im Bereich der Absorption) und der Monochromator M₂ tastet das Emissionsspektrum ab.

Anregungsspektrum: M₂ wird auf eine feste Wellenlänge fixiert (im Bereich der Emission) und der Monochromator M₁ tastet das Anregungsspektrum ab. Das Anregungsspektrum ist nicht notwendigerweise das Absorptionsspektrum (=> Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz).

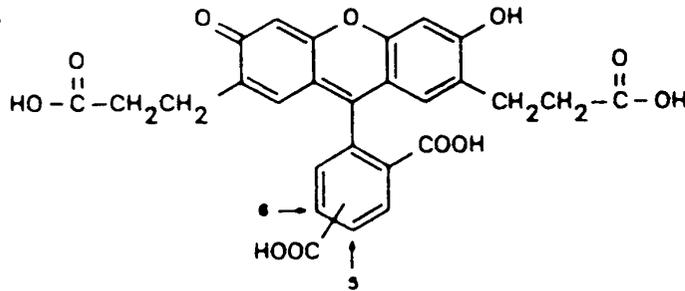
Korrekturen

- Empfindlichkeit des Photomultipliers und Intensität der Lichtquelle sind Funktionen der Wellenlänge
- Ramanstreuung

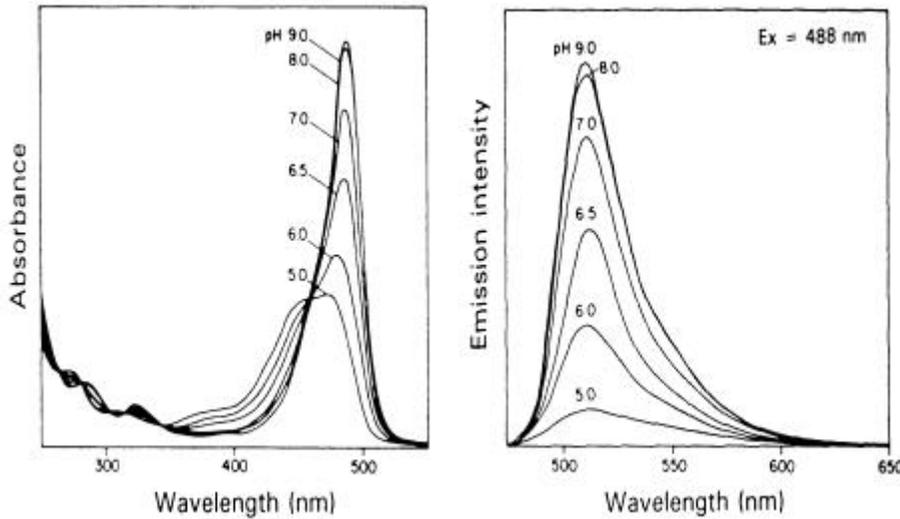
Der Photozyklus von Bacteriorhodopsin

Beobachtung der gepumpten Protonen über
pH – sensitive Fluorophore

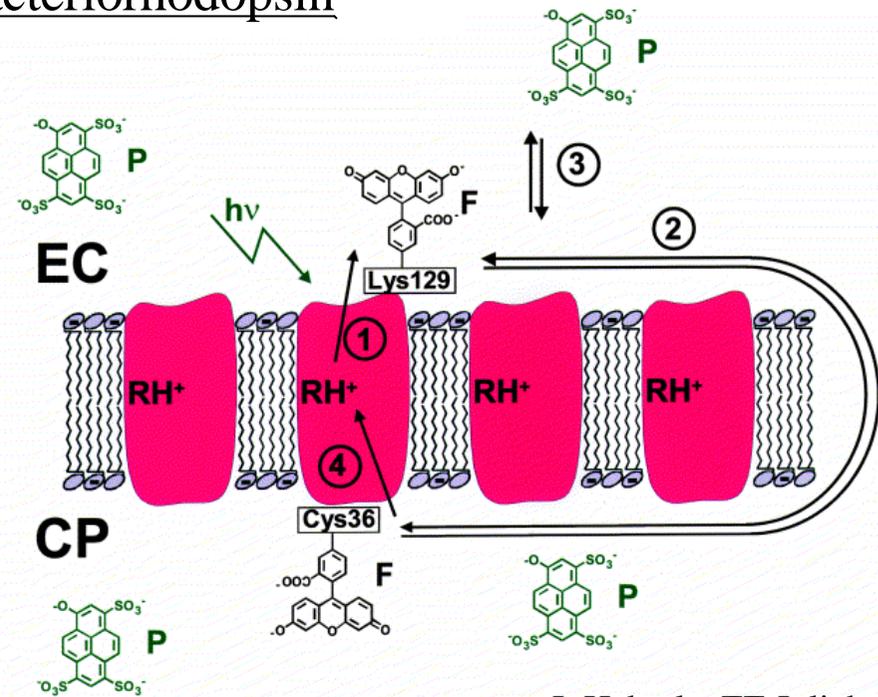
Fluorescein-
Derivat



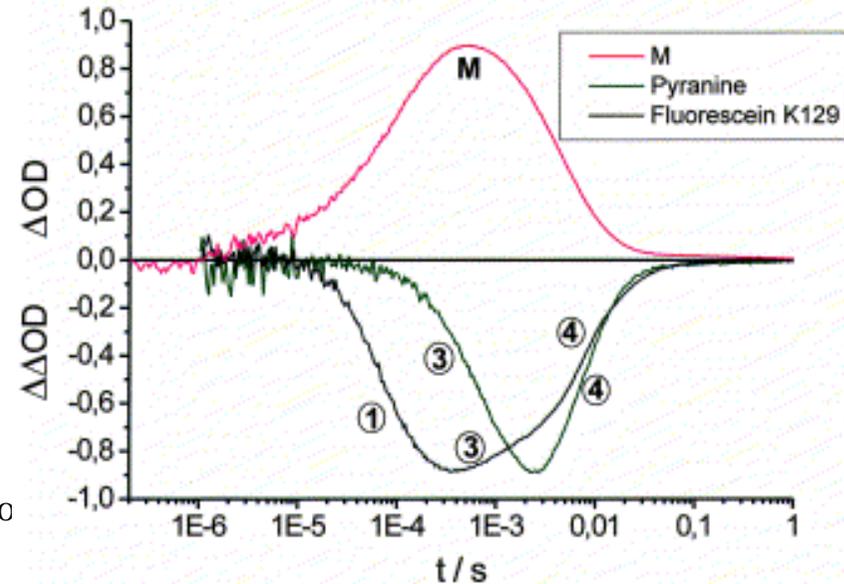
membranimpermeabel,
stark fluoreszierender pH-Indikator



Biospektrosko



J. Heberle, FZ-Jülich



Schwingungsspektroskopie

Die Übergangsenergie zwischen den Schwingungszuständen innerhalb eines elektronischen Niveaus sind viel kleiner als die zwischen elektronischen Niveaus. Aus diesem Grund sind die Energien für die Strahlung die diese Übergänge charakterisieren (Absorption) in der Größenordnung von 2,000 nm ($5,000 \text{ cm}^{-1}$) und 50,000 nm (200 cm^{-1}), also Strahlung jenseits des sichtbaren Lichts im Infraroten.

Infrarotspektroskopie

Die Molekülschwingungen tragen zum Übergangsdipolmoment bei, das schon bei den elektronischen Übergängen definiert wurde. Da die Kernschwingungen von den Schwingungen der Elektronenhülle separiert werden können (unterschiedliche Zeitskalen: Born-Oppenheimer Näherung), kann die Änderung des Dipolmomentes das nur von den Kernschwingen im Molekül hervorgerufen wird isoliert betrachte werden:

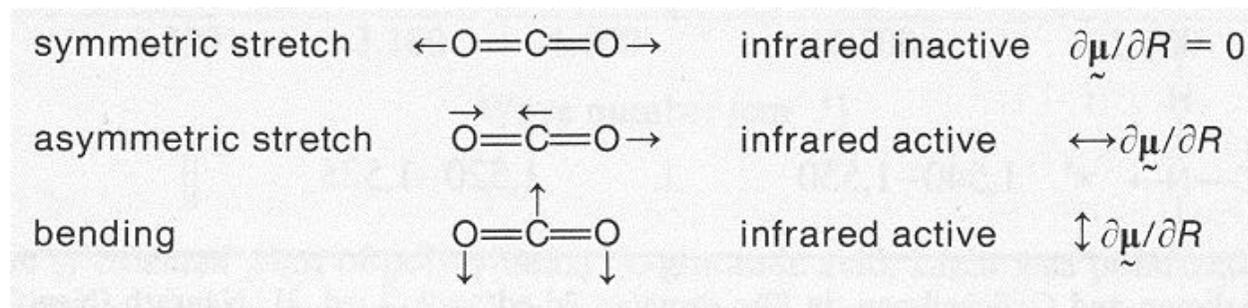
$$\mathbf{M}_{i,i+1} = \langle \mathbf{p}_{IR} \rangle = e \cdot \langle \mathbf{r}_K \rangle = e \cdot \int \mathbf{y}^* \mathbf{r}_K \mathbf{y} dt$$

In der Infrarotspektroskopie werden gerade diese Übergänge gemessen. Allerdings ist Extinktion des Lichts aufgrund solcher Übergänge um ca. eine Größenordnung kleiner als bei elektronischen Übergängen (=> größer Probenmengen).

Infrarotspektroskopie

Während der **elektronische Anteil** der Wellenfunktion die Änderung des **permanenten (zeitlich gemittelten) Dipolmoments** beschreibt, wird in der IR-Absorption die **zeitliche Änderung des Dipolmoments** gemessen. Anhand einer Molekülstruktur kann man häufig erkennen, ob bestimmte Schwingungen **IR-aktiv** sind oder nicht.

Beispiele der Änderung des Dipolmoment für ausgewählte Schwingungen



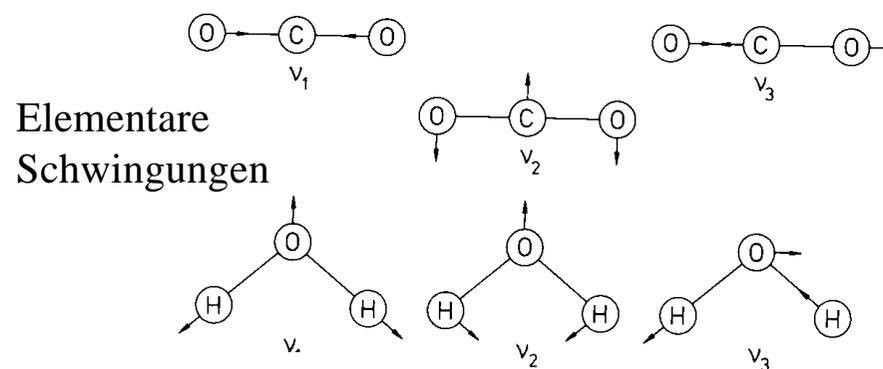
In der Biologie hat man bei der IR-Spektroskopie neben den Intensitätsproblemen auch Probleme damit, dass Wasser (allgegenwärtiges Lösungsmittel für Biomoleküle) in vielen Bereichen des IR-Spektrums relative starke Absorptionsbanden besitzt.

Strategien

- H₂O durch D₂O ersetzen
- Oberflächenmessungen statt übliche Transmissionsmessungen
(=> ATR-IR: Attenuated Total-Reflection-IR)
- Differenzspektren

IR- Schwingungsspektroskopie

- IR-Strahlung wird von Bindungselektronen absorbiert
- für IR-Absorption muss sich das Übergangsdipolmoment ändern
- Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade ist $3N-6$ für ein nichtlineares Molekül ($N = \text{Anzahl der Atome}$)

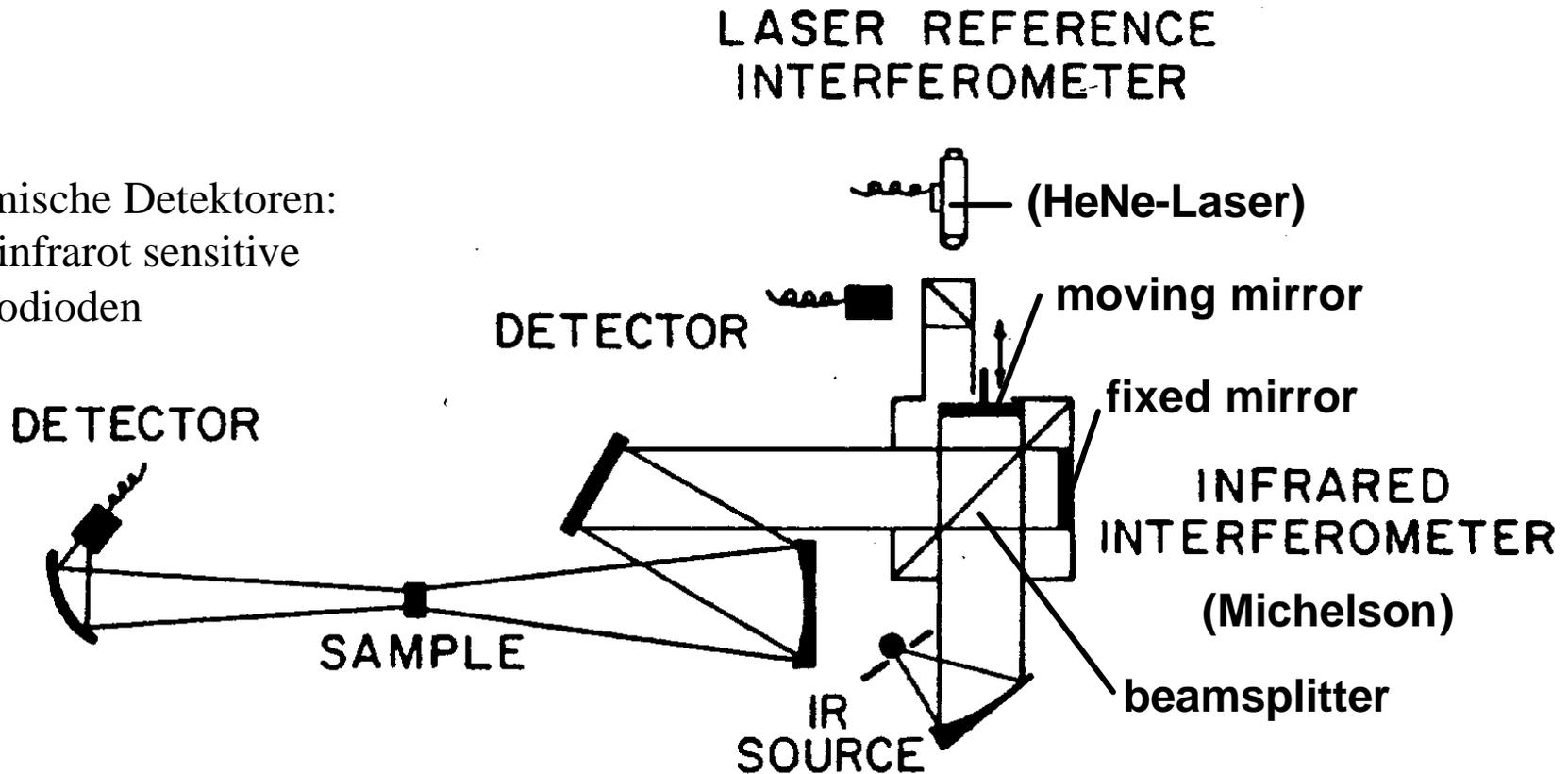


Infrarot aktive Schwingungen in Biomolekülen

Frequency (cm ⁻¹)	Type of vibration	Mainly observed in
2900	C-H stretching	lipids
2850	C-H stretching	lipids
1740	C=O stretching in esters, carboxylic acids	lipids, amino acid side chains
1650	C=O stretching in amides, (amide I)	proteins
1540	N-H bending in amides, (amide II)	proteins
1460	C-H bending	lipids
1400	C-O stretching in carboxylates	amino acid side chains, lipids
1235	P=O stretching in phosphate esters	lipids, nucleic acids
1100	C-O stretching	carbohydrates

FT-IR-Spektrometer (Interferometer)

thermische Detektoren:
z.B. infrarot sensitive
Photodioden

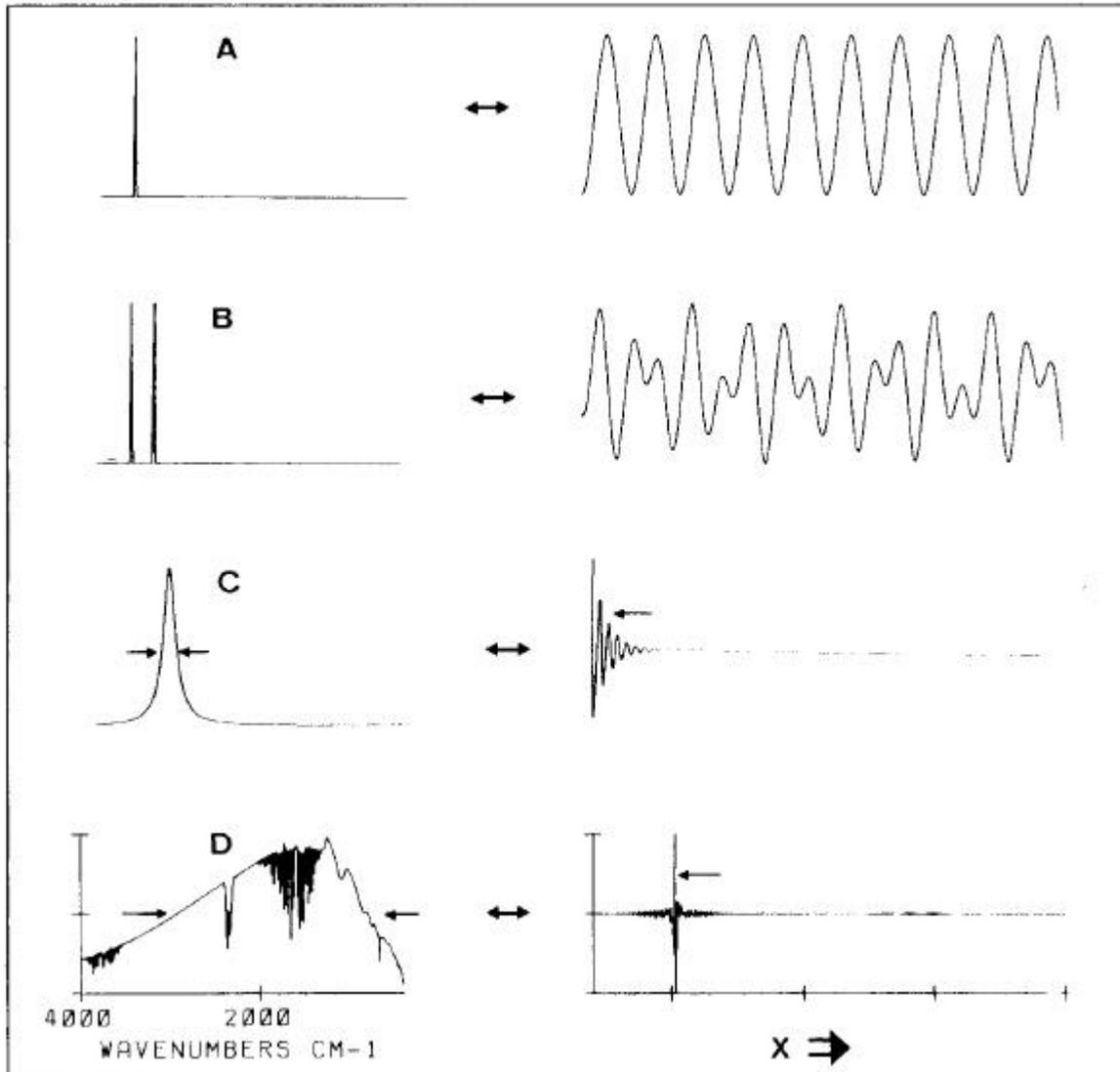


Schwingungsspektren werden
meist als **Absorptionsspektren**
untersucht (spontane Emission aus
angeregten Zuständen hat geringe
Wahrscheinlichkeit)

IR-Quelle: thermische Strahler
Nernst-Stift (85% ZrO_2 ; 15% Y_2O_3)
Globar (SiC auf 1500 K)

Prinzip der FT-Interferometrie

Spektrum \xleftrightarrow{FT} Interferogramm

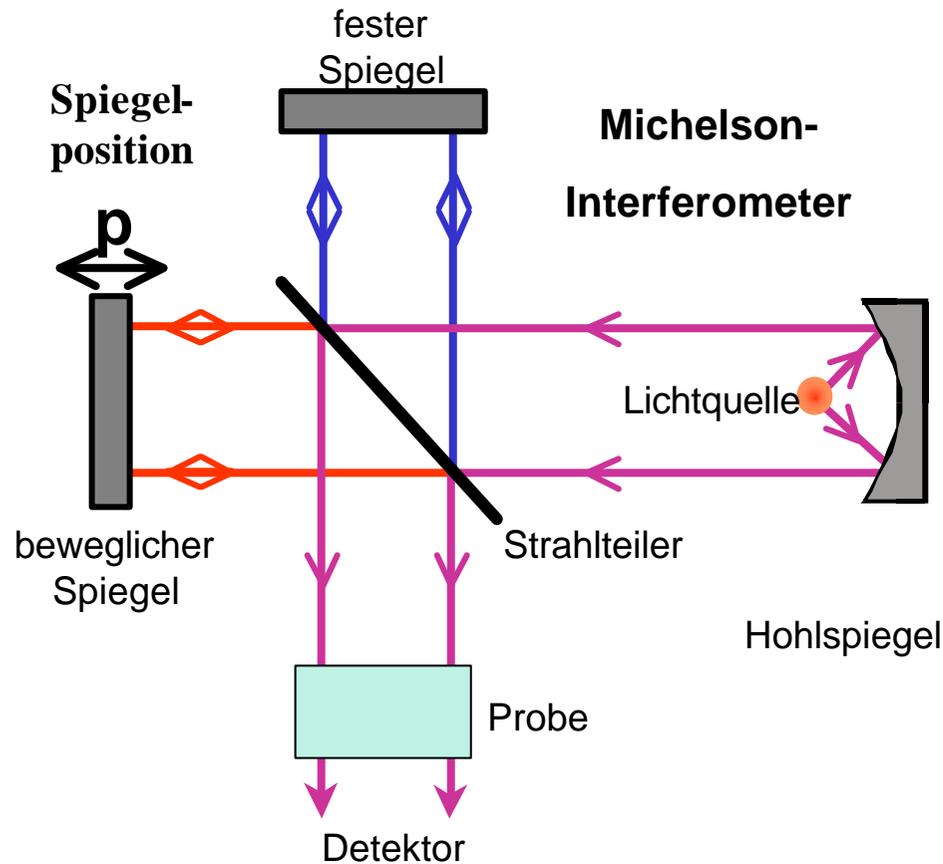


Vorteile der FT-Spektroskopie:

- gesamtes Spektrum wird auf einmal gemessen
- volle Intensität der Strahlungsquelle wird genutzt (z.B. kein Verlust in Monochromatoren)
- HeNe-Laser als Frequenzstandard
- FT-Methode schließt andere Frequenzen strikt aus (z.B. Streulicht)

- Zeitersparnis
- besseres Signal/Untergrund Verhältnis
- Genauigkeit und Reproduzierbarkeit
- keine Artefakte

Prinzip der Fourier-Transform-Methode



Bei monochromatischer Lichtquelle gilt für die Intensität am Detektor folgende Abhängigkeit von der Wegstrecke des beweglichen Spiegels:

$$I(p) = I(\tilde{n}) \cos(2p\tilde{n}p)$$

für gesamtes Frequenzband der Strahlungsquelle gilt:

$$I(p) = \int_0^{\infty} I(\tilde{n}) \cos(2p\tilde{n}p) d\tilde{n}$$

Fourier-Transformation liefert aus dem Interferogramm ein Spektrum:

$$I(\tilde{n}) = \int_0^{\infty} I(p) \cos(2p\tilde{n}p) dp$$

Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie

- rapid-scan (Zeitauflösung limitiert durch max. Geschwindigkeit des Spiegels)
- step-scan (nur durch Detektorelektronik limitiert, setzt aber streng wiederholbare Prozesse voraus)

Reaktionsinduzierte Differenzspektroskopie

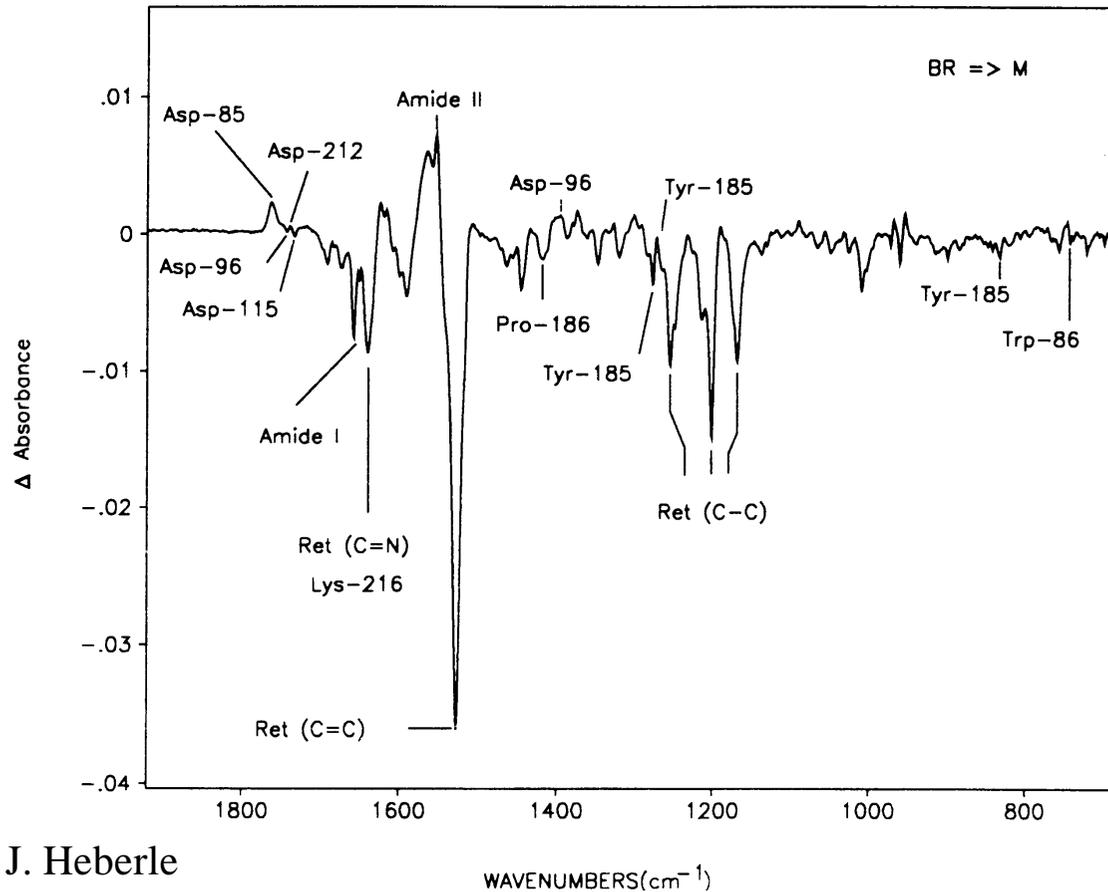
Problem: 3N-6 Schwingungsfreiheitsgrade

⇒ in Proteinen viele Banden (N sehr groß !) mit starker Überlappung

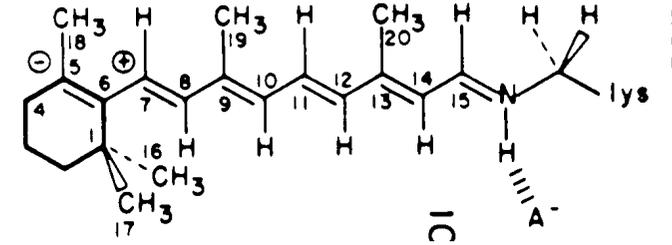
Lösung: Differenzspektrum zwischen 2 Arbeitszuständen eines Proteins

⇒ es tauchen nur solche Banden auf, die von Gruppen stammen, die ihre Schwingungen während der Aktion eines Proteins ändern

Beispiel: M-BR Differenzspektrum von Bacteriorhodopsin



Retinal



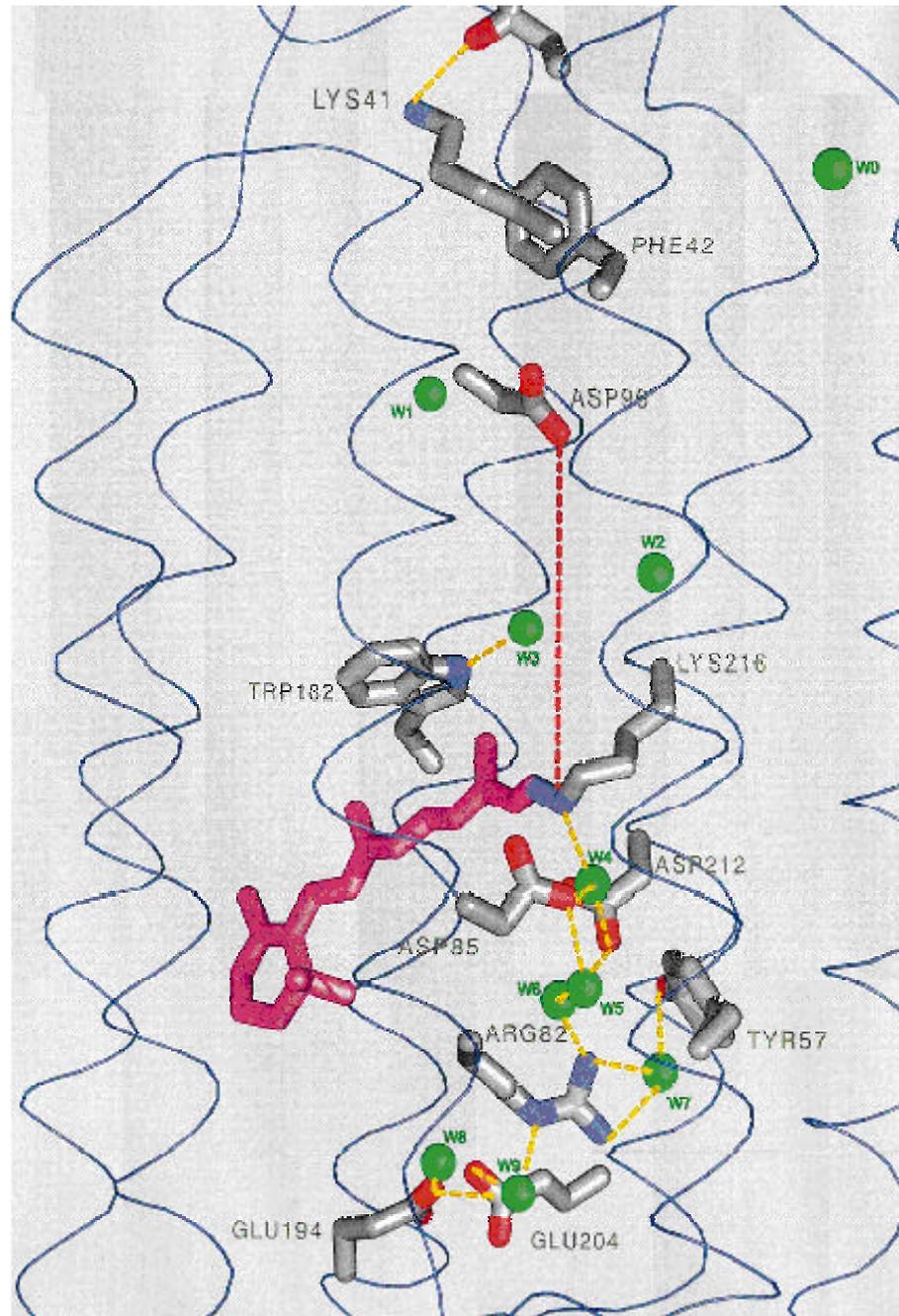
Bandenzuordnung:

- Schwingungsfrequenz (tentativ)
- Normalmodenanalyse
- Isotopen-Ersatz (D, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O)
- 'site-directed mutagenesis'
- ortsspezifischer Isotopenersatz

Ausschnitt der BR Struktur im Grundzustand BR₅₆₈

Bestimmte Seitengruppen spielen bei der Protonenleitung eine wichtige Rolle.

Negativ geladene Seitengruppen (Asp, Glu) können Protonen binden und wieder abgeben. Dieses Verhalten wird durch den lokalen pK-Werte dieser Gruppen gesteuert. Zeitliche Änderungen der lokalen pK-Werte können durch Konformationsänderung der Proteinstruktur hervorgerufen werden und sind ursächlich für die Lichtinduzierte Protonentranslokation.



IR-Differenzspektren von
BR Intermediaten

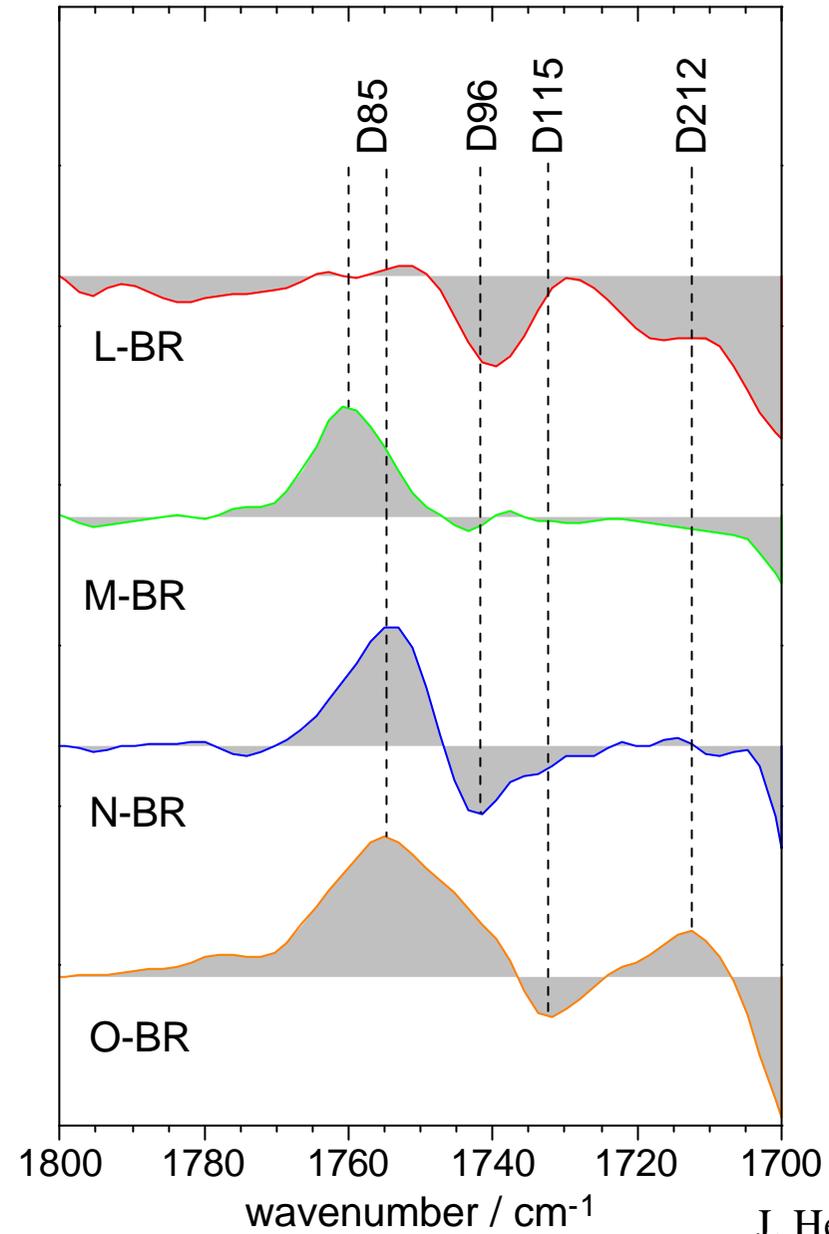
**Protonierungsänderungen einiger
Asparaginsäuren während
des Photozyklus**

C=O Streckschwingung

Wenn protoniert: gekoppelt mit
O-H Biegeschwingung

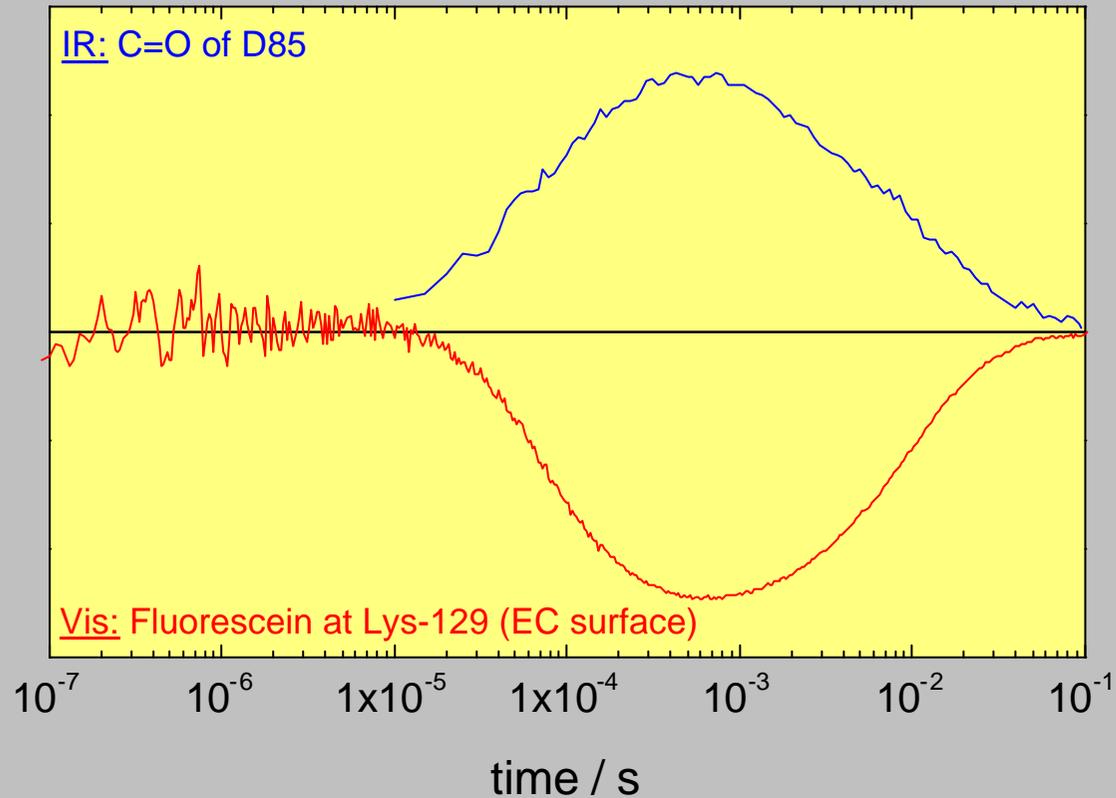
➤ Protonen-Akzeptor D85

➤ Protonen-Donor D96



J. Heberle

Kombination von Zeitaufgelöster IR und Vis - Spektroskopie



=> proton release at the extracellular surface is concomitant with protonation of D85
=> proton transfer within the protein is not rate-limiting

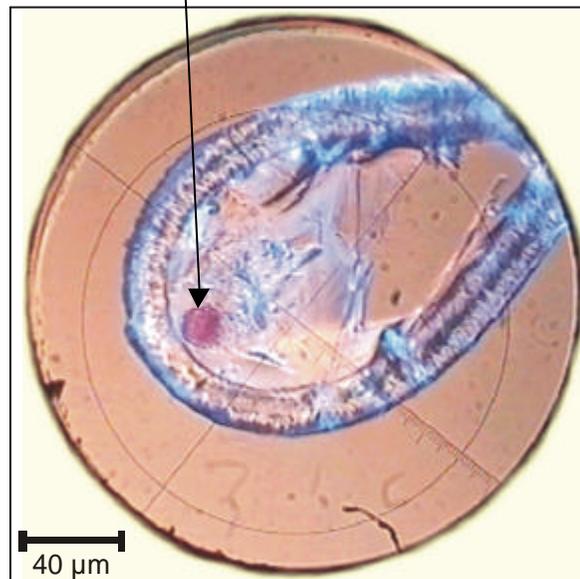
J. Heberle

Charakterisierung von BR im Kristall

Zeigt BR auch im Kristall die gleiche Photozyklus Kinetik wie unter Physiologischen Bedingungen? => Ja !!

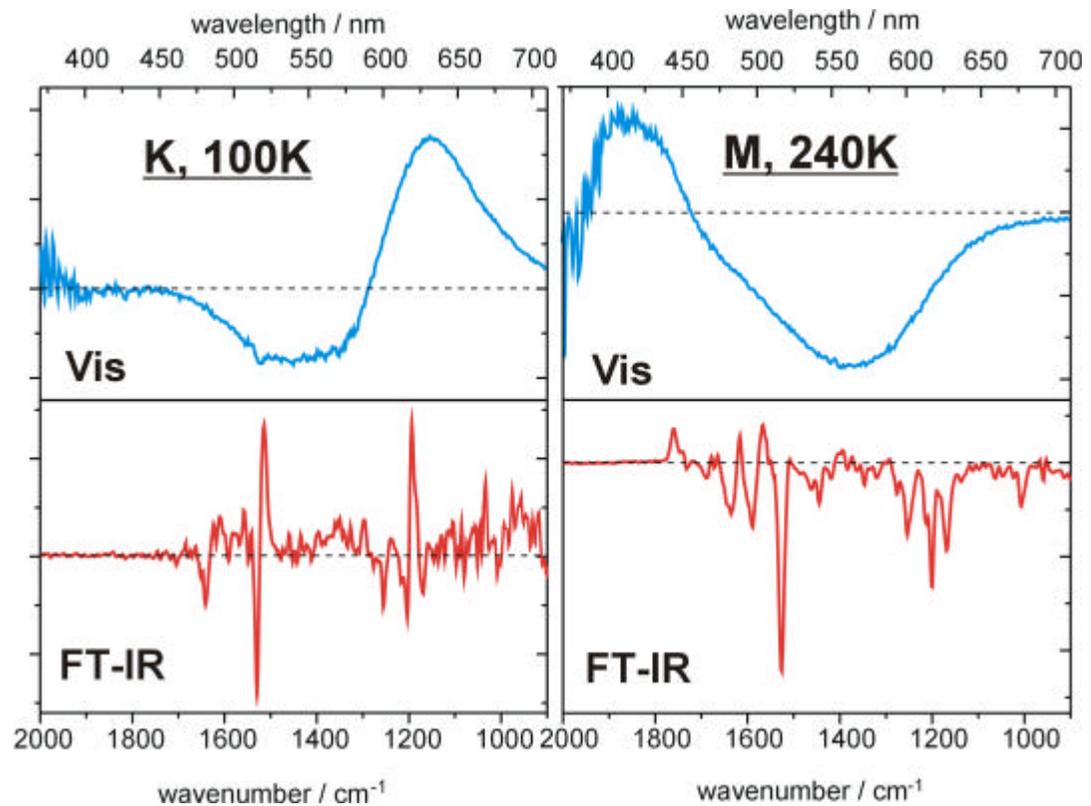
Zur Strukturbestimmung von BR Intermediaten muß die Intermediatanreicherung direkt im Kristall gemessen werden !

BR-Kristall im Cryo-loop



Heberle et al. 1997

Absorptionseigenschaften des BR Kristalls



Biospektroskopie