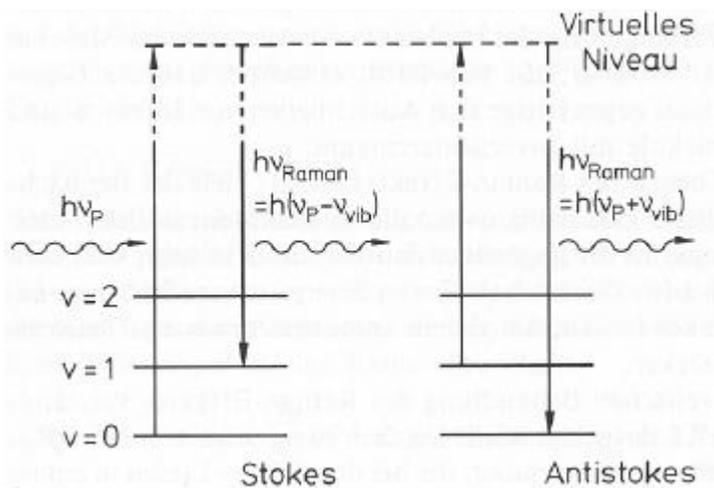
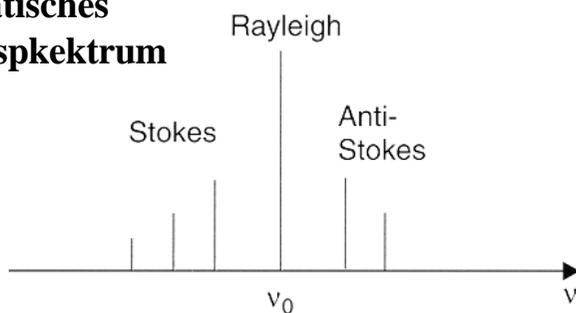


Raman-Spektroskopie

Neben der Infrarot-Spektroskopie ist die Raman-Spektroskopie eine weitere wichtige Methode zur Untersuchung von Schwingungsspektren. Sie beruht auf einer inelastischen Streuung von Licht (Raman-Effekt) an den Molekülen. Durch Molekülschwingungen wird neben der elastischen Rayleigh-Streuung auch eine inelastische Streuung beobachtet, die durch eine zeitliche **Änderung der Polarisierbarkeit** des Moleküls hervorgerufen wird.



**Schematisches
Ramanspektrum**

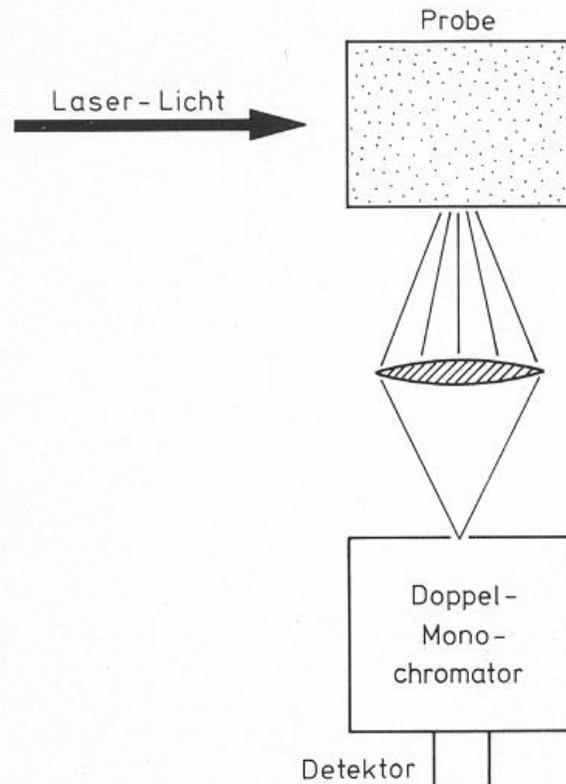


Das Raman-gestreuete Licht ist im Gegensatz zur Rayleigh-Streuung nicht kohärent mit dem Primärlicht. Man beobachtet Frequenz-Verschiebungen hinzu kleineren Energien (Stokes-Linien) und nach höheren Energien (Anti-Stokes-Linien). Die **Größe der Frequenzverschiebung** ist dabei **unabhängig von der Frequenz des Primärlichts**. Vielmehr hängt sie nur von den Moleküleigenschaften ab.

Eine Schwingung ist **Raman-aktiv** wenn gilt:
 $\frac{d\alpha}{dR} \neq 0$ (R: Kernabstände im Molekül)

Raman-Spektroskopie

Schematische Anordnung zur Messung eines Ramanspektrums



Die Verschiebung der Stokes-Linien bezüglich der elastischen Linie können sehr klein sein (bis zu 1 cm^{-1}). Außerdem ist die Intensität der Ramanlinien sehr klein im Vergleich zur Rayleigh-Linie. Dies hat folgende messtechnischen Konsequenzen:

- Monochromatisches intensives Licht mit einer sehr geringen Linienbreite => Laserlicht
- spektrale Trennung der Linien mit mehrfach - Monochromatoren
- Beobachtung des Streulichts unter 90° um die Primärstrahlung zu vermeiden.

Bei vielen Molekülen (mit Inversionszentrum) ergänzen sich Infrarot- und Raman-spektroskopie, wenn man die Schwingungen der Moleküle analysieren will. Bei diesen Molekülen sind infra-rot-aktive Normalschwingungen Raman-inaktiv und umgekehrt sind infrarot-verbotene Normalschwingungen Raman-erlaubt.

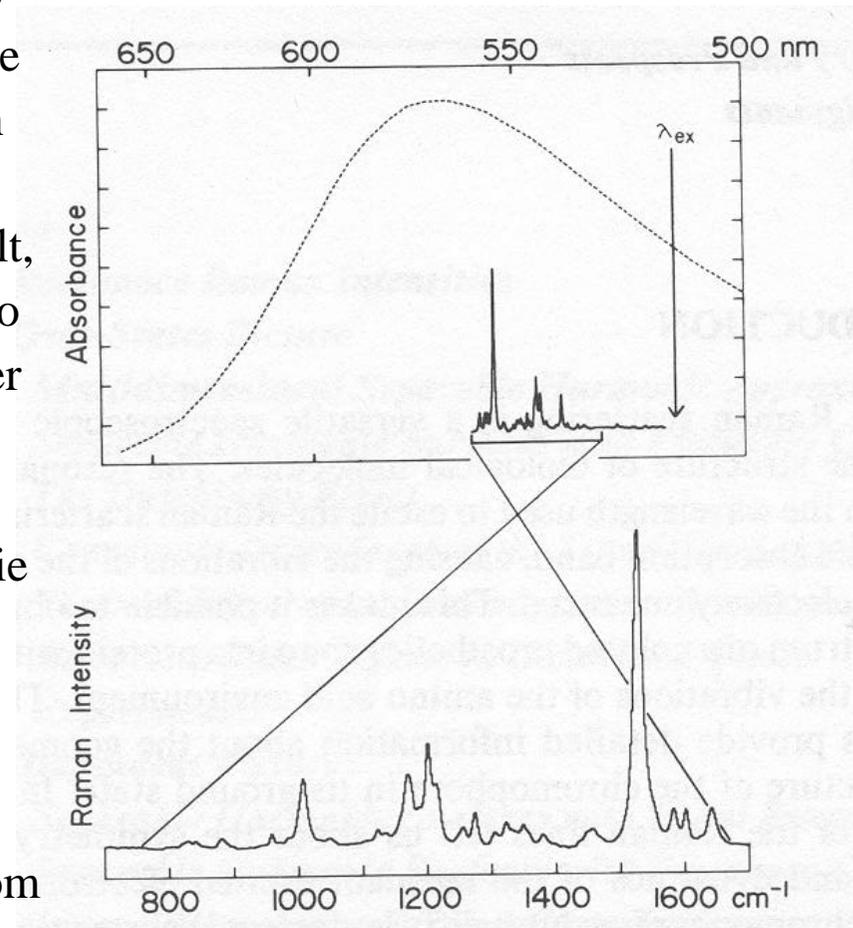
Raman-Spektroskopie

Da die Frequenz der Untersuchungslichts in der Ramanspektroskopie keinen Einfluss auf die Lage der Ramanlinien hat, ist die Anregungswellenlänge im Prinzip frei wählbar (z.B. intensive Laserlinien etc.).

Wird jedoch die Anregungswellenlänge so gewählt, dass ein elektronischer Übergang angeregt wird, so kommt es zu einem Verstärkungseffekt bestimmter Ramanlinien (Resonanzeffekt). In einer solchen **Resonanz-Ramanspektroskopie** werden nur die Schwingungsbanden des Molekülteils verstärkt, die am elektronischen Übergang beteiligt sind.

Im Falle biologische Proben mit Chromophoren (z.B. das Retinal im BR) kann gezielt das Schwingungsspektrum dieser Gruppen sichtbar gemacht werden. Andere Schwingungsbeiträge vom Proteingerüst bleiben in ihrer Intensität viel schwächer.

Absorption und Resonanz-Raman Spektrum von Bacteriorhodopsin im Grundzustand



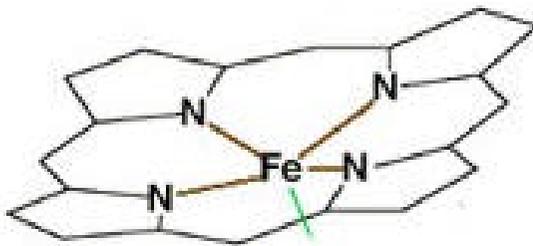
Mathies, 1987

Prothetische Gruppen in Proteinen

Diese zusätzlichen Gruppen zeigen fast alle im UV-Vis Bereich eine starke Absorption. In nahezu allen Fällen stellen diese Gruppen ein **aktives Zentrum** in der Proteinstruktur dar, das relevant für die Funktion der Proteinstruktur ist.

Spektroskopische Untersuchungen der prothetischen Gruppen liefern Erkenntnisse über die **Funktionsabläufe im Protein**.

Beispiel der Hämstruktur im Cytochrom, Hämoglobin, Myoglobin



Spektroskopische Eigenschaften von Proteinen die prothetische Gruppen enthalten

Protein	Prosthetic group	Longest-wavelength absorption band		Second-longest absorption band	
		λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($\times 10^{-4}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($\times 10^{-4}$)
Amino acid oxidase, rat kidney	FMN	455	1.27	358	1.07
Azurin, <i>P. fluorescens</i>	Cu ^{II}	781	0.32	625	0.35
Ceruloplasmin, human	8 Coppers (3 distinct classes)	794	2.2	610	1.13
Cytochrome <i>c</i> , reduced, human	Fe ^{II} -heme	550	2.77	—	—
Ferredoxin, <i>Scenedesmus</i>	(2 Fe ^{III} , 2 sulfide) cluster	421	0.98	330	1.33
Flavodoxin, <i>C. pasteurianum</i>	FMN	443	0.91	372	0.79
Monoamine oxidase, bovine kidney	Flavins plus Cu	455	4.7	—	—
Pyruvic dehydrogenase, <i>E. coli</i>	FAD	460	1.27	438	1.46
Rhodopsin, bovine	Retinal-Lys	498	4.2	350	1.1
Reubredoxin, <i>M. aerogenes</i>	(Fe ^{III} , 4 Cys) tetrahedron	570	0.35	490	0.76
Threonine deaminase, <i>E. coli</i>	4 Pyridoxal phosphates	415	2.6	—	—
Xanthine oxidase	Fe, Mo	550	2.2	—	—

Retinal-Proteine

Das Retinals (prothetische Gruppe und Derivat des Karotins) kommt in vielen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen vor (**Retinalproteine**).

Ionenpumpen: Bacteriorhodopsin, Halorhodopsin (Chlorpumpe), Proteorhodopsin

Lichtrezeptoren: Rhodopsine, Sensory-rhodopsin

Photorezeptoren im Sehprozess

Stäbchenzellen: hell/dunkel Sehen

Zapfenzellen: Farbsehen (3 Farbpigmente)

Chromophor: 11-cis retinal (λ_{abs} : 440 nm in organischer Lösung)

=> Apoprotein (Opsin) + Retinal = Rhodopsin

Rhodopsine

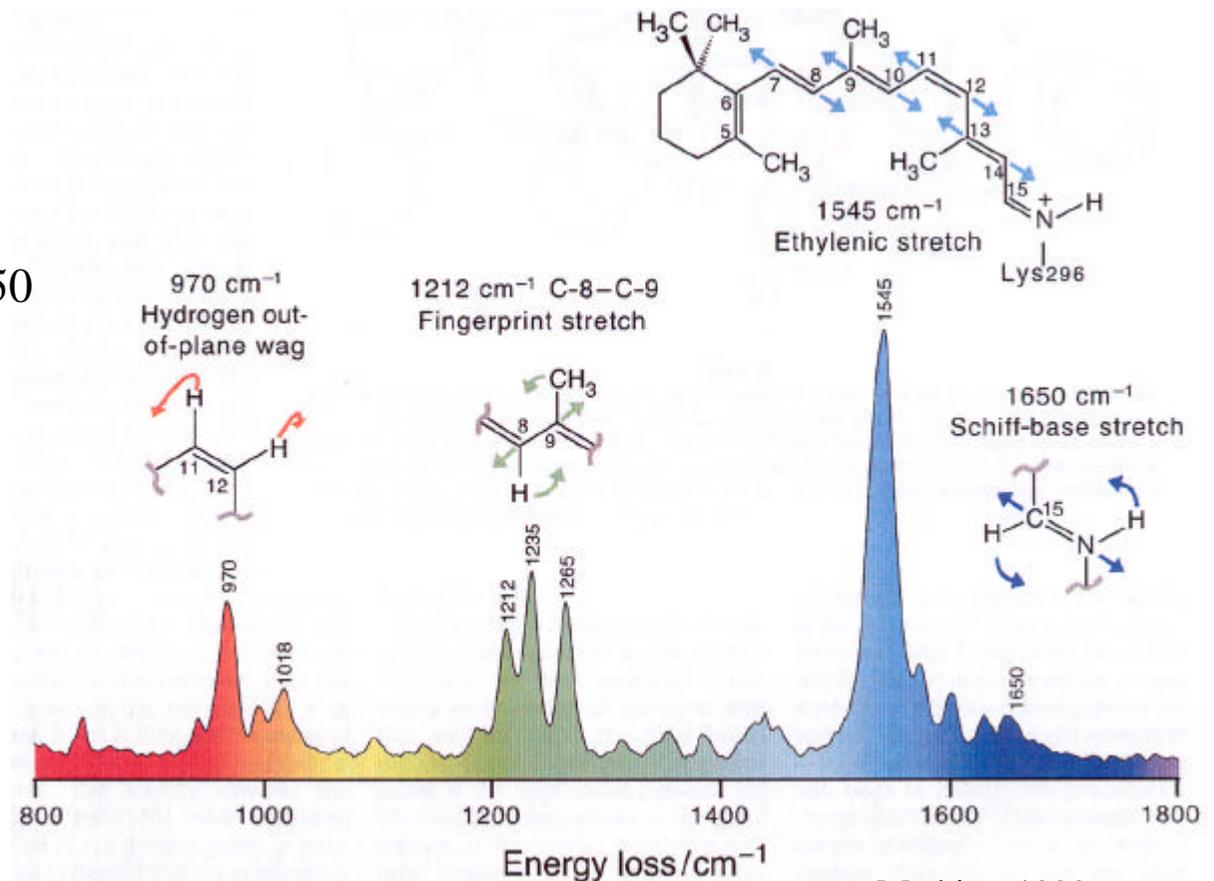
Die Rhodopsine zeigen Absorptionsmaxima bei sehr unterschiedlichen Wellenlängen (360 – 635 nm; „opsin-shift“) im Bereich des sichtbaren Lichts. Sie können daher als Farbrezeptoren dienen (Sehpigmente). Die Retinal – Proteinwechselwirkung bestimmt die Lage des Absorptionsmaximums => genaue Analyse u.a. mit Ramanspektroskopie !

Raman-Resonanzspektroskopie

Charakteristisches Raman-Resonanzspektrum des Retinal-Chromophors (11-cis-retinal)

Die verstärkten Resonanzlinien im Ramanspektrum zeigen eine charakteristische Struktur („Fingerprint-Region“) die über spezielle Molekülschwingungen Auskunft geben. Lokale Schwingungen (970 cm^{-1} und 1650 cm^{-1}) können detaillierte Informationen über Wechselwirkung mit der Umgebung geben.

Vergleich:
Chromophor in Lösung vs.
Chromophor im Protein



Mathies, 1999

Molekulare Ursachen des Opsin-shifts

Absorptionsmaxima der Farbpigmente

blau: $\lambda_{\max} = 438 \text{ nm}$

grün: $\lambda_{\max} = 530 \text{ nm}$

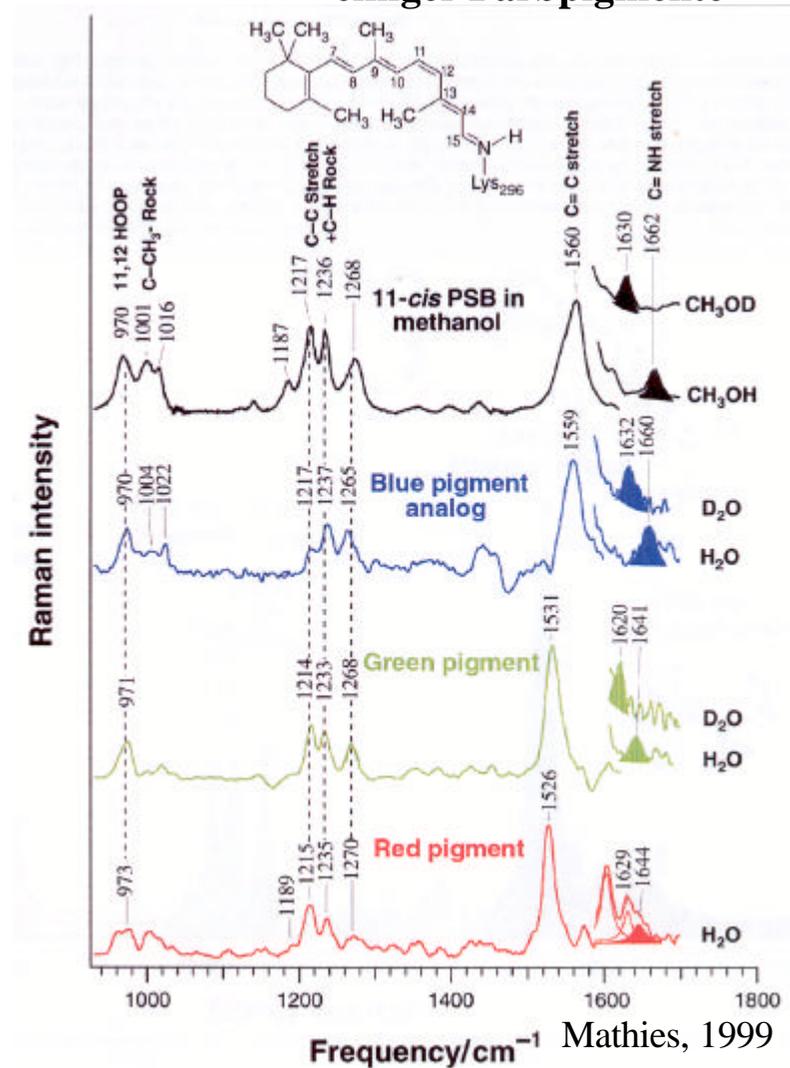
rot: $\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$

Der Hauptunterschied im Absorptionsverhalten bei den 3 Pigmenten entsteht wahrscheinlich durch eine größere Elektronen Delokalisierung in der Ethylenkette. => Verschiebung des „Ethylenic-stretch“ peaks bei $1560 - 1526 \text{ cm}^{-1}$.

Es gibt scheinbar keine starken lokalen Wechselwirkungen des Proteins, die einen Einfluss auf das Absorptionsverhalten haben könnten (z.B. „Schiff-base mode“ bei $1660 - 1641 \text{ cm}^{-1}$).

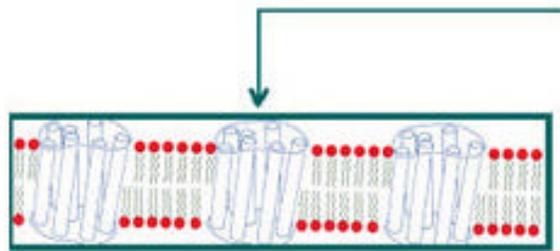
Der Unterschied zwischen dem roten und dem grünen Pigment hat wahrscheinlich seine Ursache in einer lokalen Veränderungen der elektronischen Struktur.

Resonanz-Ramanspektren einiger Farbpigmente

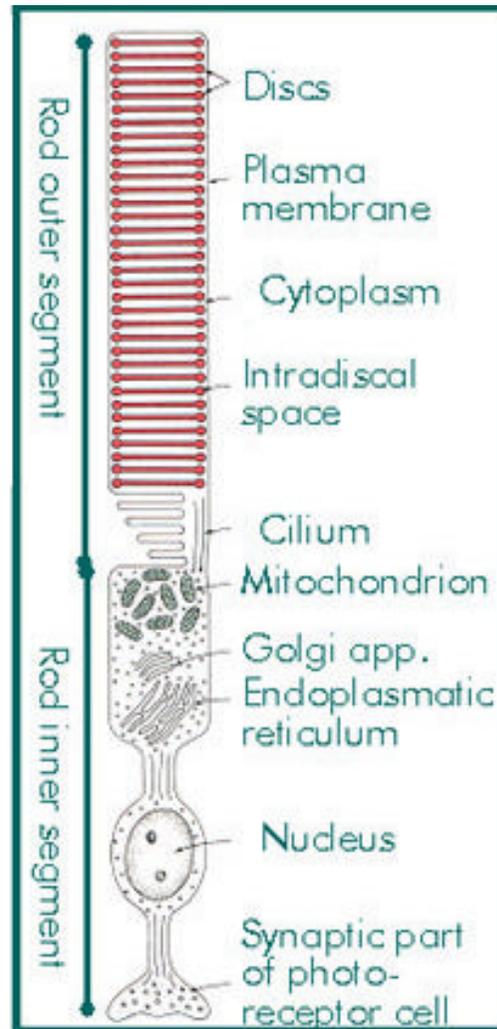
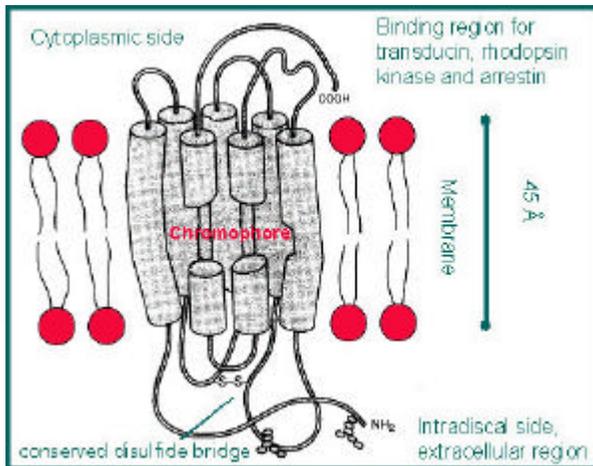


Rhodopsin: Sehpigment in der Retina

Stäbchenzellen für hell/dunkel Sehen



Disc membrane with rhodopsin



Disk Membranen

50 % Lipide

45 % Rhodopsin (40 kDa)

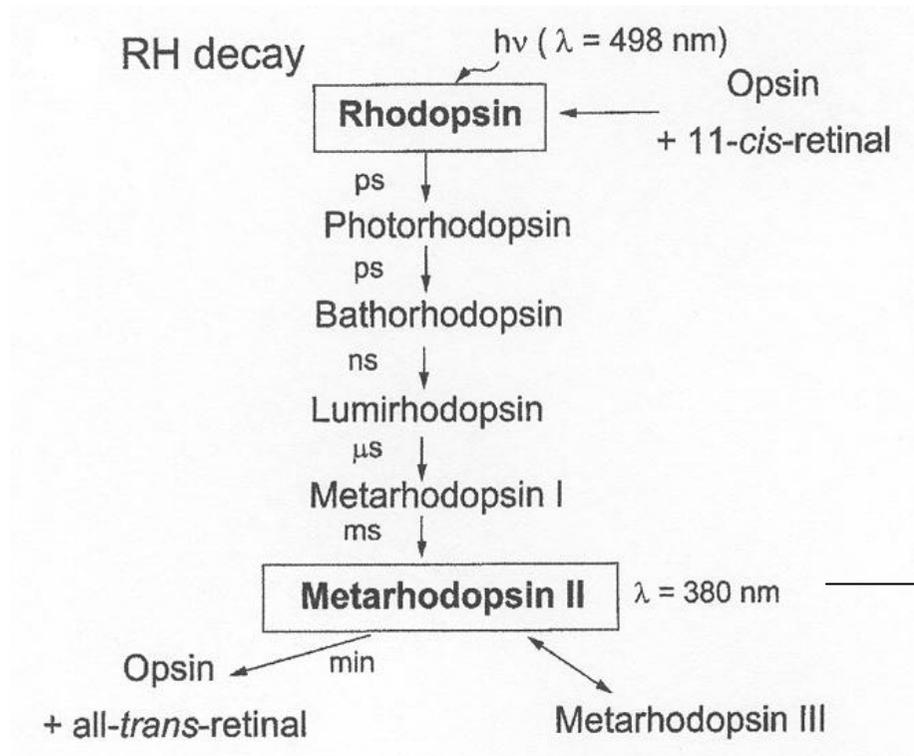
5 % andere Proteine

=> „Membrane Fluidität“

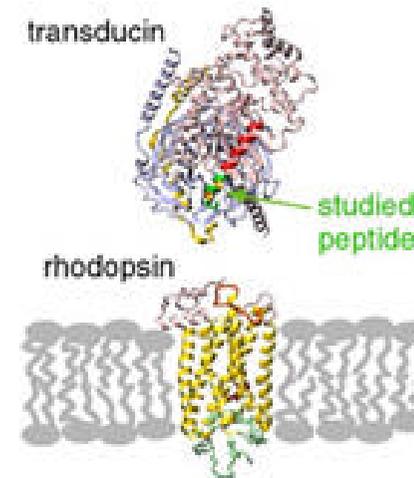
Die Information des Lichtreizes (Primärer Sehprozess: Absorption eines Lichtquants im Retinal) wird über eine Strukturänderung in der Proteinstruktur an andere Proteine (Transducin) **weitergeleitet** und **verstärkt** (=>Seh-Kaskade).

Signalübertragung beim Sehprozess

Photozyklus des Rhodopsin (Rinderaugen)



Signalübertragung

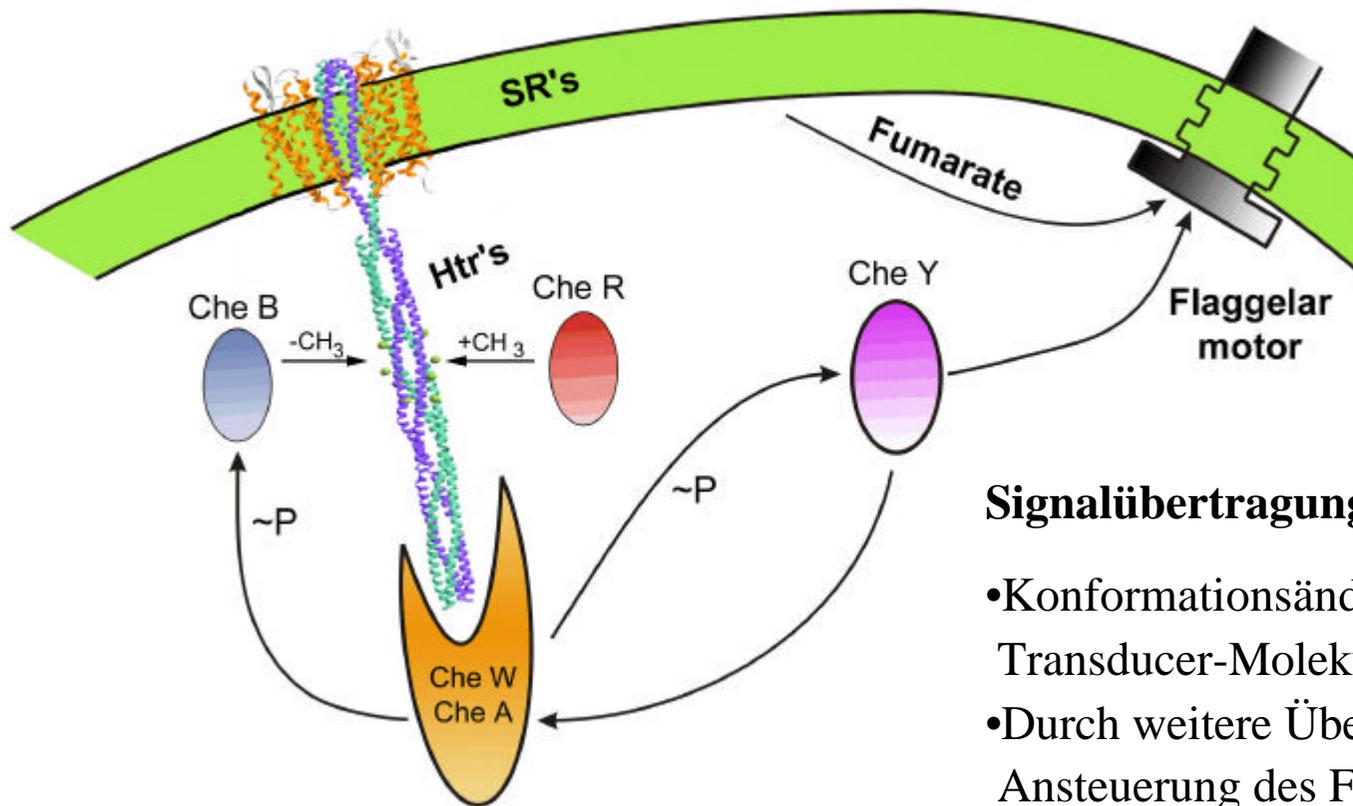


Dieser Zustand kann Transducin binden und überträgt die Information. Während der Lebensdauer von Metha II können viele Transducinmoleküle aktiviert werden.
=> Regelung in der Sehkaskade durch Arrestin/TransducinBalance.

Retinal und Protein sind nach der Reaktion getrennt => keine *in vitro* Wiederholungsmessungen !

Signalübertragung im Halobakterium

Schematische Darstellung des Signaltransfers



Photorezeptor:
Sensory Rhodopsin

SR-I: λ_{abs} : 487 nm

SR-II: λ_{abs} : 587 nm

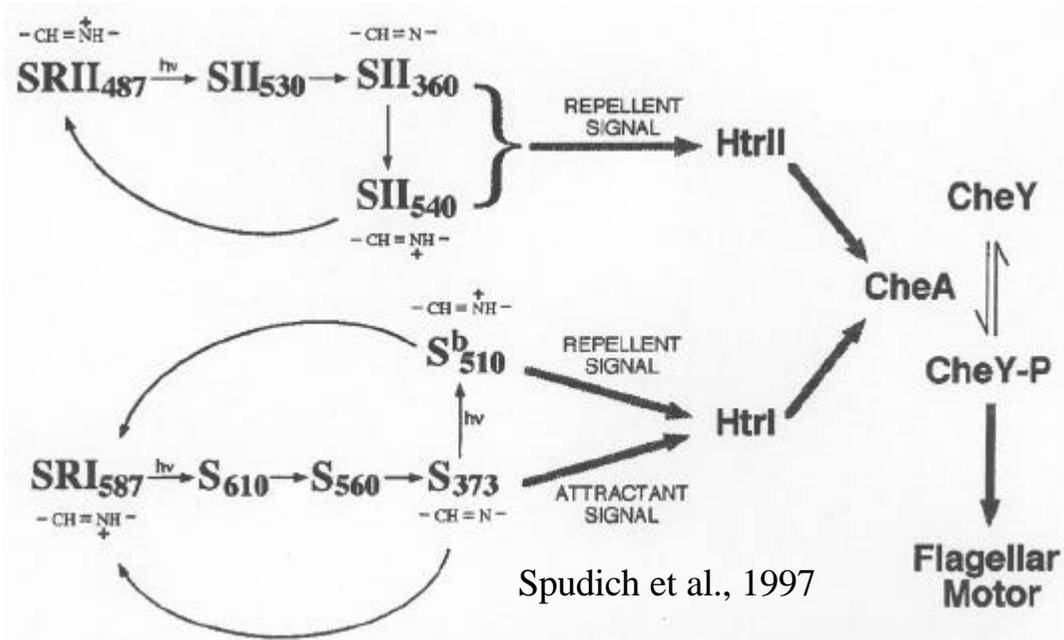
Signalübertragung

- Konformationsänderung wird auf ein Transducer-Molekül (Htr) übertragen
- Durch weitere Überträgermoleküle Ansteuerung des Flagellenmotors (rechts/links Laufrichtung)
=> Richtungsänderungen in der Bewegung des Bakteriums (**Phototaxis**)

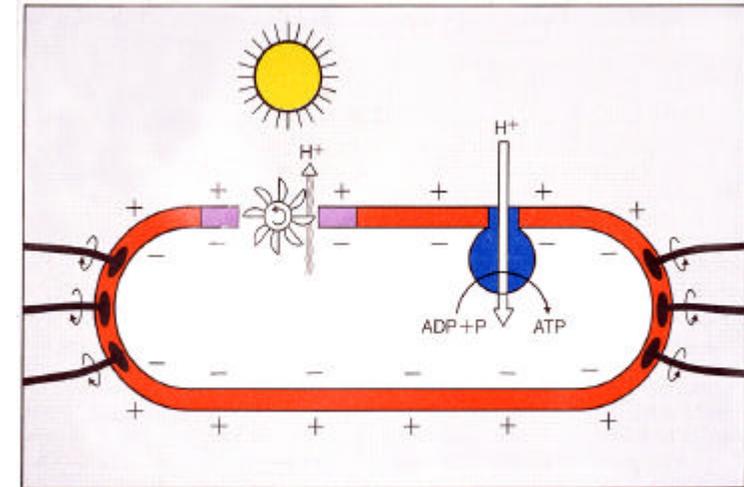
M. Engelhart, MPI Dortmund

Phototaxis im Halobakterium

Photozyklen der Sensory-Rhodopsine



Schematische Darstellung eines Halobakteriums

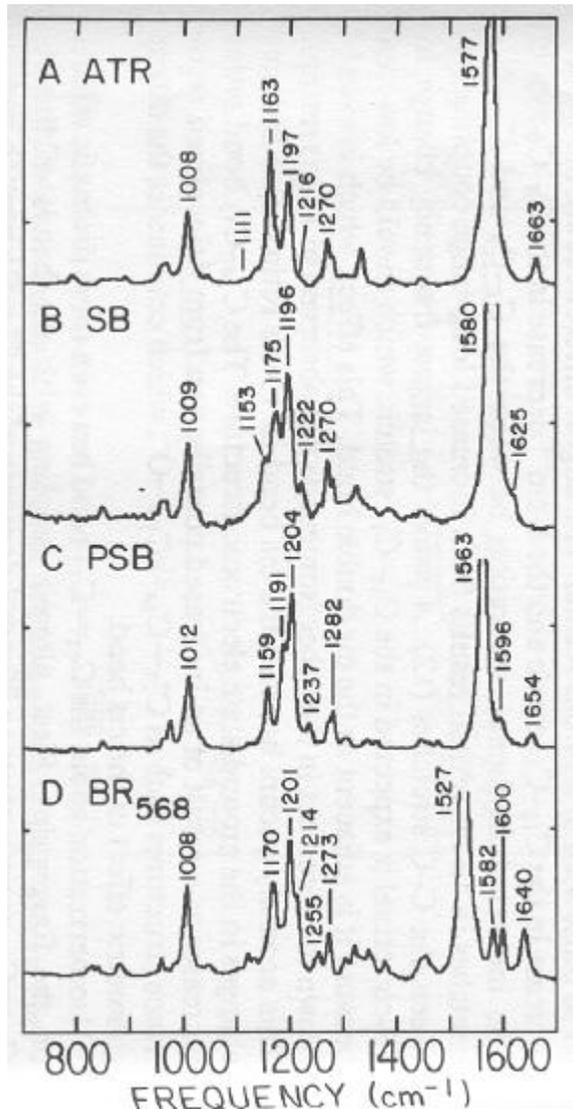


Phototaxis

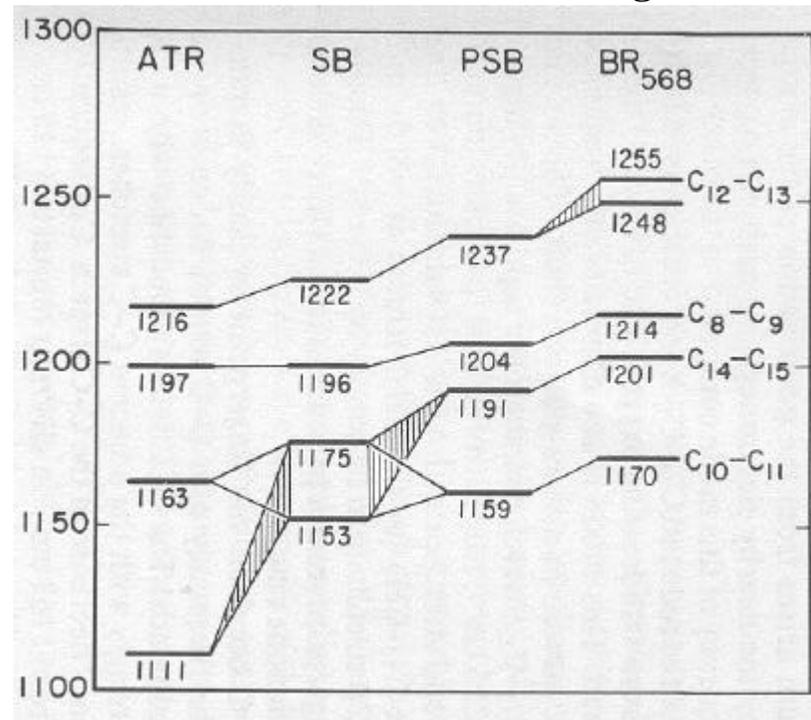
- Schwimmbewegung in Richtung günstiger Lichtbedingungen (Nährstoffe, gute Funktionsfähigkeit der Ionenpumpen, etc.)
- Schwimmbewegungen aus Bereichen kurzwelliger Strahlung (UV) => Vermeidung von Strahlenschädigung des Organismus

Resonanz-Ramanspektroskopie

Schwingungsspektren des All-Trans Retinals unter verschiedenen Bedingungen



Bandenverschiebungen



ATR: All-Trans Retinal

SB: Retinal mit Schiff'scher Base

PSB: Retinal mit protonierter

Schiff'scher Base

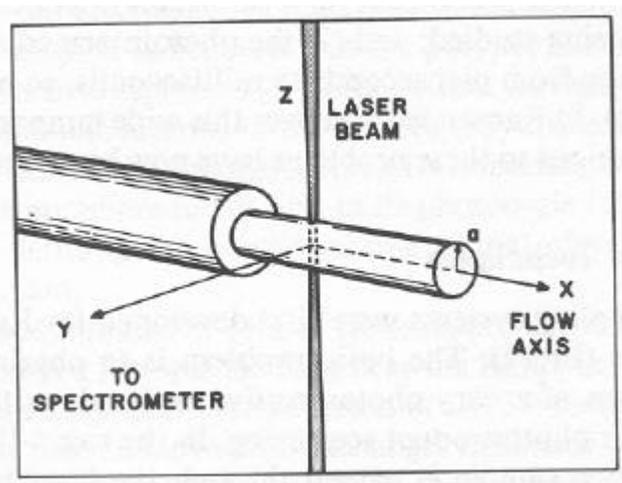
BR568: Retinal in BR

ATR → SB: $\lambda_{\text{abs}} : 360 \rightarrow 440 \text{ nm}$

Messtechnik:Resonanz-Ramanspektroskopie

Ein grundsätzliches Problem bei der Resonanz Ramanspektroskopie ist, dass photosensitive Moleküle ständig mit dem Messlicht (im oder nahe dem Absorptionsmaximum) angeregt werden müssen. Dieses Messlicht muss im allgemeinen anders als bei Absorptionsmessungen eine relativ hohe Intensität haben, da die inelastische Ramanstreuung (auch trotz der Resonanz) verhältnismäßig schwach ist. Dieses intensive Messlicht führt zu veränderten Photozyklen (z.B. Rückschuss in den Grundzustand) und kann massiv in die Kinetik der Zyklen eingreifen.

„rapid-flow“- Molekülstrom um photoempfindliche Moleküle spektroskopisch zu charakterisieren



Um den Einfluss auf die Messergebnisse von solch unerwünschten Photoprodukten zu minimieren, wird im Messlichtstrahl ein schneller Fluss von Molekülen untersucht, so dass am Ort des Messlichts immer eine geringe Konzentration von unerwünschten Photoprodukten vorliegt. Der Anteil der photoaktivierten Moleküle ist F :

$$F = (3.824 \times 10^{-21}) \frac{Pej}{vd}$$

P : Photonen/s

ϵ : Extinktionskoeffizient

ϕ : Quantenausbeute für die photoaktivierung

v : Fließgeschwindigkeit [cm/s]

d : Strahldurchmesser (Laser) [cm]

Zeitaufgelöste Resonanz-Ramanspektroskopie

Ziel der Funktionsstudien an Retinalproteinen ist es, die Schwingungsspektren zeitaufgelöst zu messen (die Sequenz der Intermediate). Eine solche Studie kann in sogenannten „**pump-probe**“-Messungen durchgeführt werden:

„**pump**“-Licht (**Probenbelichtung**): die Probe wird an einer bestimmten Stelle des Molekülstroms belichtet.

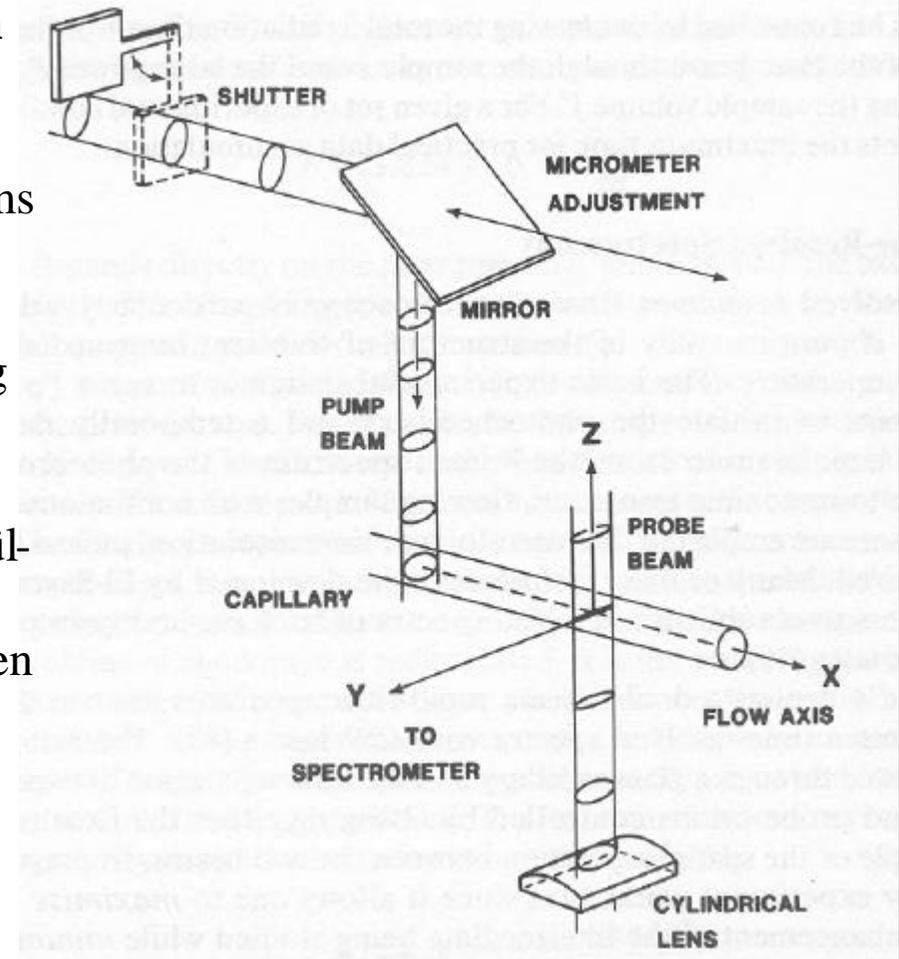
„**probe**“-Licht (**Messlicht**): in einer definierten Entfernung vom Belichtungsort wird die Messung durchgeführt.

Die Zeitauflösung der Messung (hier ca. μs – ms) wird durch die Fließgeschwindigkeit des Molekülstroms, durch den Abstand der Belichtungsorte, sowie durch die Pulsdauer der beiden Belichtungen bestimmt.

Bessere Zeitauflösung

- gepulste Laserquellen (ns-ps)
- Einfang der Photointermediate bei tiefen Temperaturen (50 – 250 K)

Zweistahl „rapid-flow“ Messapparatur für zeitaufgelöste Ramanspektroskopie



Resonanz-Ramanspektren der Bacteriorhodopsin-Intermediate

Einfluss der gemessenen Änderung im Retinal auf die vektorielle Protonentranslokation:

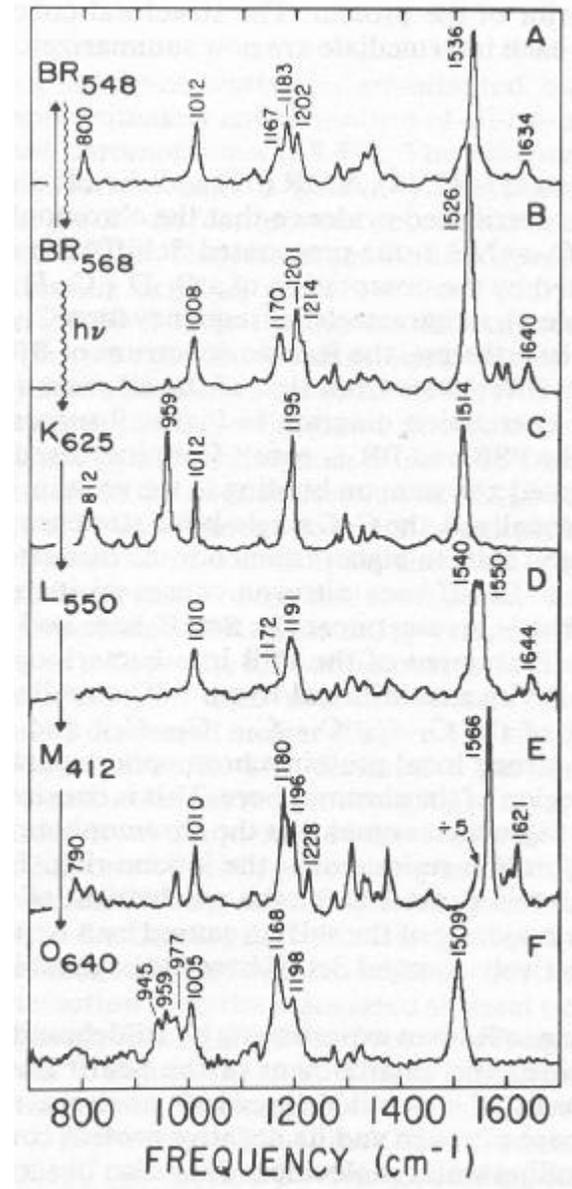
K-Intermediat: Energie Speicherung (out of plane wag: $800-1000\text{cm}^{-1}$); trans \Rightarrow 13-cis, Isomerisierung (fingerprint-Region: $\sim 1200\text{cm}^{-1}$)

L-Intermediat: Strukturelle Entspannung ($800-1000\text{cm}^{-1}$)

M-Intermediat: Deprotonierung der Schiff'schen Base (1650cm^{-1})

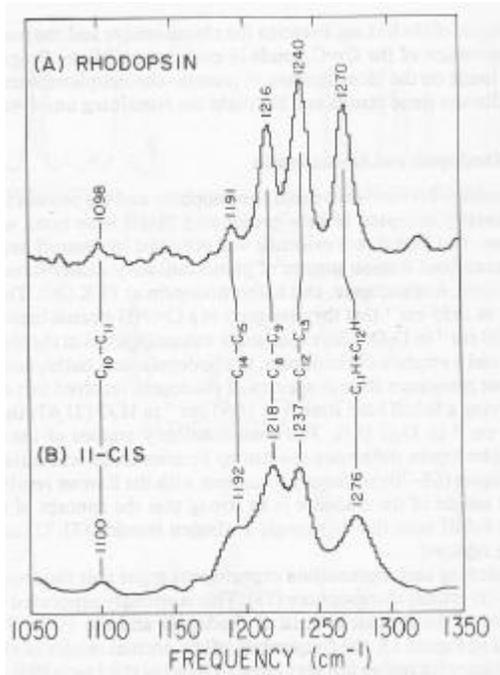
O-Intermediat: Reprotonierung der Schiff'schen Base (1650cm^{-1})

Die jeweiligen Absorptionsmaxima der Intermediate sind gut sichtbar mit der Ethylen-stretch-Bande ($1509 - 1566$) korreliert.



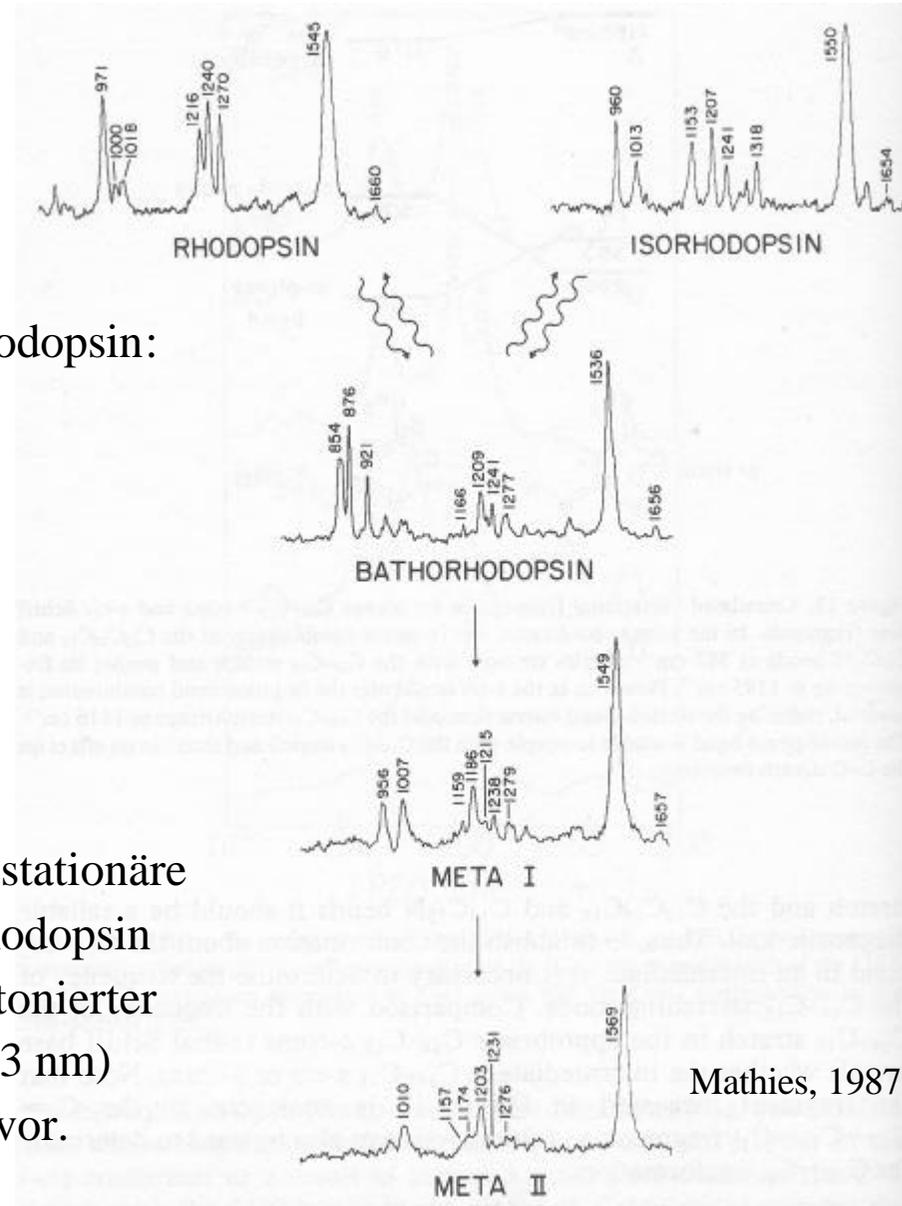
Resonanz-Ramanspektren der Rhodopsin-Intermediate

Rhodopsins enthält das 11-cis Retinal



Opsin-shift in Rhodopsin:
440 → 498 nm

Nach Belichtung (bei 77 K) entsteht eine photostationäre Mixtur aus den Intermediaten Rhodopsin, Isorhodopsin (mit 9-cis retinal) Bathorhodopsin (alle mit protonierter Schiff'scher Base). Im Bathorhodopsin (λ_{abs} :543 nm) liegt das Retinal in der all-trans-Konfiguration vor.

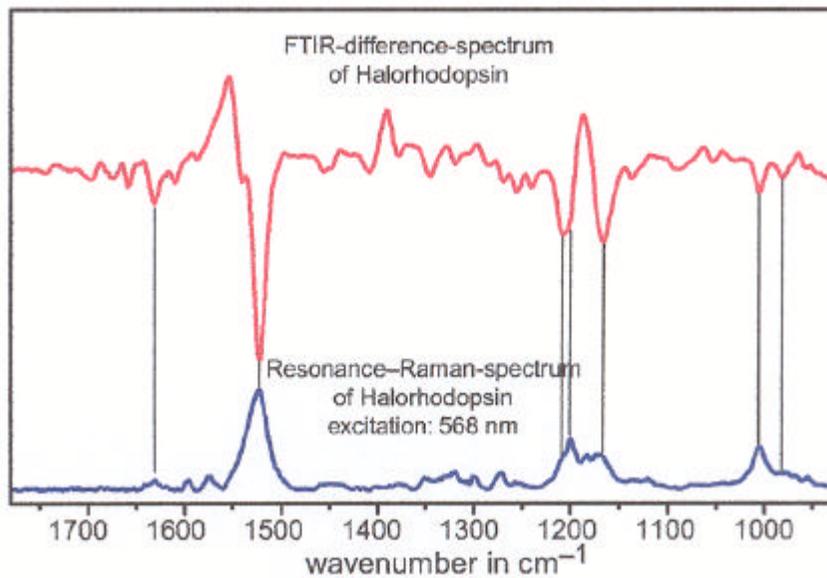


Mathies, 1987

Resonanz-Ramanspektroskopie

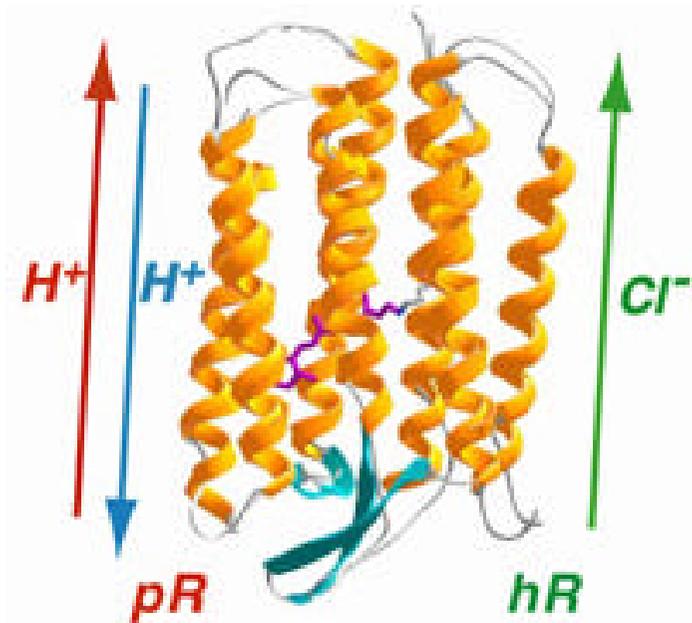
Die Resonanz-Ramanspektren von Retinalproteinen können auch dafür genutzt werden die Bandenzuordnung in Infrarotspektren vorzunehmen.

Bandenzuordnung durch Vergleich von FTIR und Resonanz-Ramanspektren



Heberle, 2002

Molekülstruktur eines sieben-Helix Retinalproteins



Sehr ähnliche Proteinstrukturen ermöglichen das Pumpen von Protonen und/oder Cl-Ionen.