

## Geschwindigkeit der Proteinfaltung

Kleine Proteine (1 Domäne; 50-200 AS) können sich *in vitro* prinzipiell im **Millisekundenbereich** (teilweise auch schneller) falten.

Häufig wird jedoch auch für kleine Proteine eine viel langsamere Faltung beobachtet (Sekunden-Minuten). Gründe hierfür (u.a.):

- Disulfidbrückenbildung (Abhängigkeit vom Redoxpotential)
- Aggregation als Konkurrenz zur Faltung
- „cis-trans“ Isomerisierung bei X-Prolin-Peptidbindungen

=> **führt häufig zu beobachtbaren Intermediaten !**

### **Levinthals Paradoxon**

Protein mit 100 AS hat  $2^{100}$  mögliche Konformationen. Die Suche des nativen Zustands allein nach dem Zufallsprinzip würde unendlich lange dauern.

**Der Faltungsprozeß muß „gerichtet“ sein !**

(=> Hierarchien, Intermediate, spezielle Energielandschaften => Faltungstrichter)

## Komponenten der zeitaufgelösten mehrfarbigen Spektroskopie

### **Lichtquellen:**

große Intensität bei möglichst vielen Wellenlängen in einem engen Wellenlängenband  
gepulste Lichtquellen

- Blitzlicht Lampen (=> Monochromatisierung des Lichts)
- Laser (=> Frequenzverdopplung, Frequenzmischung)

### **Spiegel und Strahlteiler**

hohes selektives Reflexionsvermögen

Aufspaltung des Strahls in Abhängigkeit von der Wellenlänge  
oder der Polarisationsrichtung

- Dielektrische Mehrfachspiegel
- Doppelbrechung (dichroitische Spiegel)

### **Filter, Polarisatoren und Monochromatoren**

gute Wellenlängenauflösung, hohe Intensität  
des Sekundärstrahls

- Interferenzfilter
- Reflexionsgitter (Gittermonochromator)
- Prismen
- Doppelbrechende Polarisatoren

### **Detektoren**

hohe Zeitauflösung,  
sehr empfindlich (z.B.  
„single photon counting“)

- Photomultiplier
- Photodioden, etc.

# Gepulste Lichtquellen

## Gepulste Lichtquellen

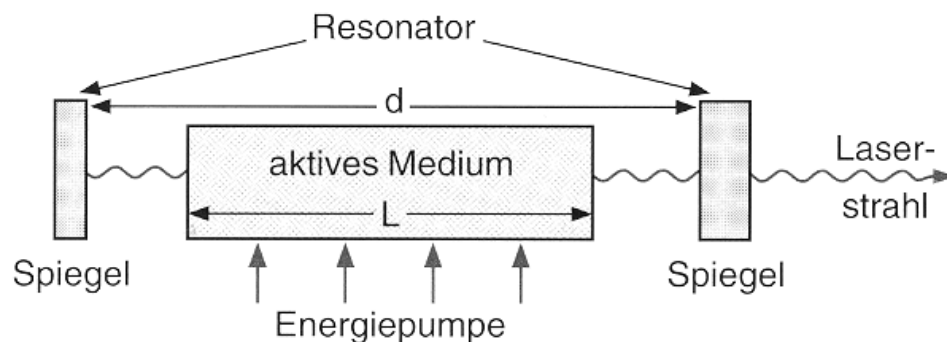
### Blitzlicht Lampen

- breites Wellenlängenband
- kurze Pulsdauer
- geringe Wiederholrate

### Laser

- sehr schmales Wellenlängenband
- (sehr) kurze Pulsdauer
- hohe Wiederholrate

### Prinzip des Lasers



## Komponenten des Lasers

### aktives Medium

durch selektive Energiezufuhr wird in einem oder in mehreren Niveaus eine invertierte Besetzungsverteilung erzeugt

### Energiepumpe

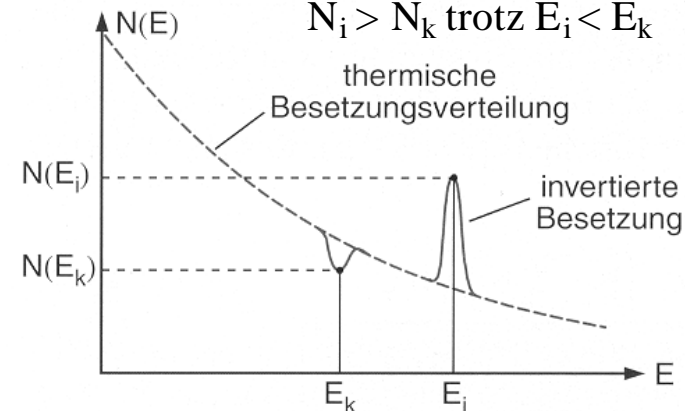
z.B. Blitzlicht Lampe; Gasentladung; anderer Laser: erzeugt Besetzungsinversion

### Resonator

Strahlung wird in wenigen Moden gespeichert (durch Spiegel)

Selektive Besetzungsinversion:

$$N_i > N_k \text{ trotz } E_i < E_k$$



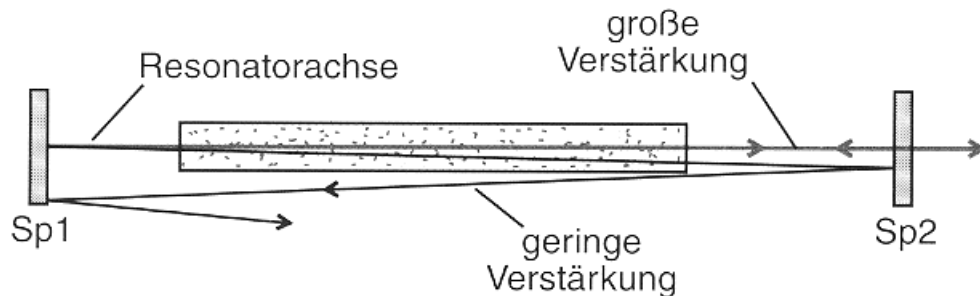
## Prinzip des Lasers

Beim Durchlauf des Lichts durch ein Medium spielt der frequenzabhängige Absorptionskoeffizient die entscheidende Rolle für die Intensität des Lichts:

$$I(\nu, z) = I(\nu, 0) \cdot e^{-a(\nu)z} \quad \text{mit}$$

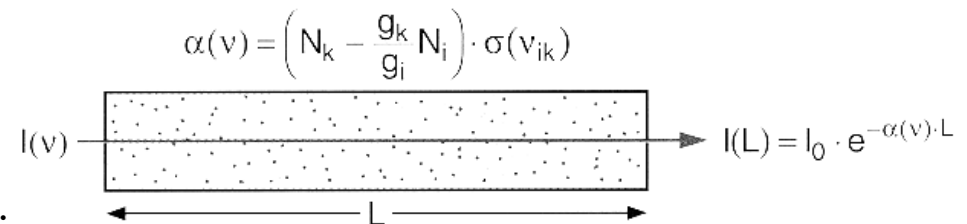
$$a(\mathbf{n}) = \left[ N_k - \frac{g_k}{g_i} N_i \right] \mathbf{s}(\mathbf{n})$$

Man sieht, dass für  $N_i > g_i/g_k N_k$  der Absorptionskoeffizient negativ werden kann. Die laufende Wellen wird dann **nicht geschwächt sondern verstärkt**. Ein Medium, das solche Eigenschaften aufweist (Erzeugung der Inversion) nennt man **aktives Medium**.



### Schwellwertbedingung

$$\begin{aligned} \Delta N &= N_i (g_k / g_i) - N_k \geq \Delta N_{Schw} \\ &= \frac{g(\mathbf{n})}{2s(\mathbf{n}) \cdot L} \end{aligned}$$



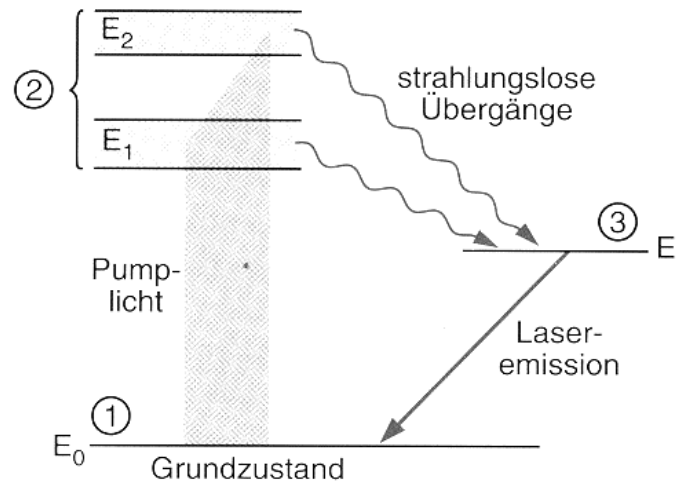
$\sigma(\nu)$ : Absorptionsquerschnitt  
 $a(\nu)$  Absorptionskoeffizient  
 $\gamma$ : Verlustkoeffizienten  
 $\Delta N$ : Inversionsdichte

### Verluste

- Reflexionsvermögen der Spiegel
- Streuung
- Beugungsverluste

# Prinzip des Lasers

## Beispiel eines drei-Niveau-Lasers



Termschema des Rubin-Lasers

### aktives Medium

$\text{Al}_2\text{O}_3$  mit Chrom dotiert

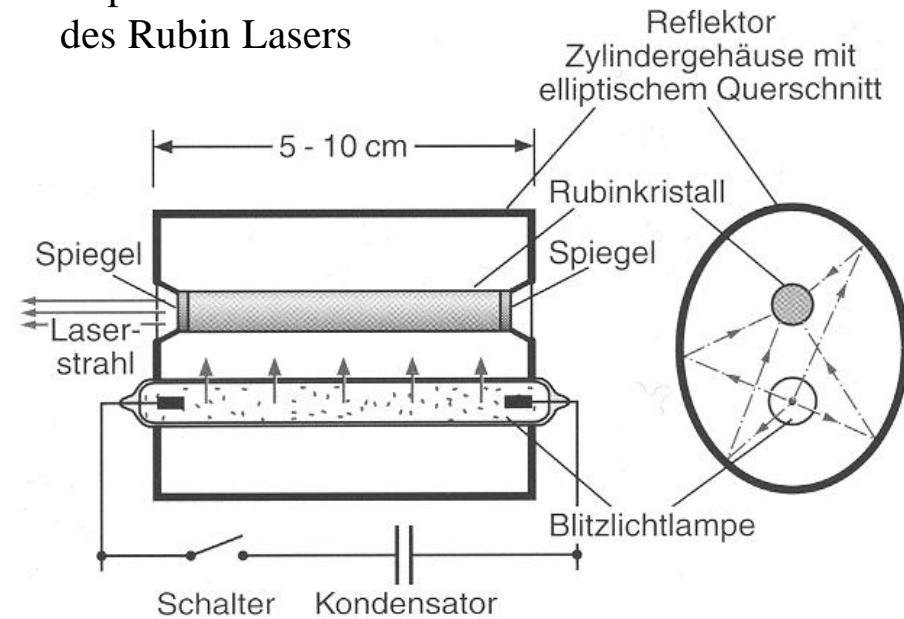
$\text{Cr}^{+++}$  im Grundzustand  $E_0$

Absorption von Licht  $\Rightarrow E_1, E_2$  (kurzlebig)

Strahlungsloser Übergang zu  $E_i$  (langlebig)

$E_i \rightarrow E_0$  : Laseremission

## Experimentelle Realisation des Rubin Lasers



Inversion wird erreicht, weil die Übergangszeiten für  $E_0 \rightarrow E_{1,2} \rightarrow E_i$  viel kürzer sind, als die für  $E_i \rightarrow E_0$  (deshalb i.a. mindestens Drei-Niveaus)

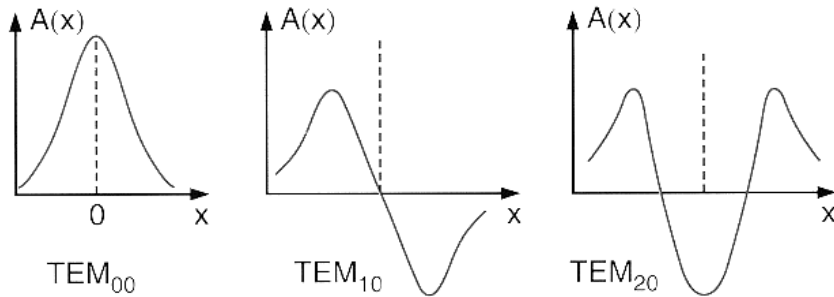
# Moden des Laser

Die für den Laserbetrieb notwendige Inversion kann durch gepulst oder kontinuierliche Pumpenergie hervorgerufen werden. Dementsprechend ist die Laseremission **gepulst oder zeitlich kontinuierlich** („continuous wave“: cw-Laser).

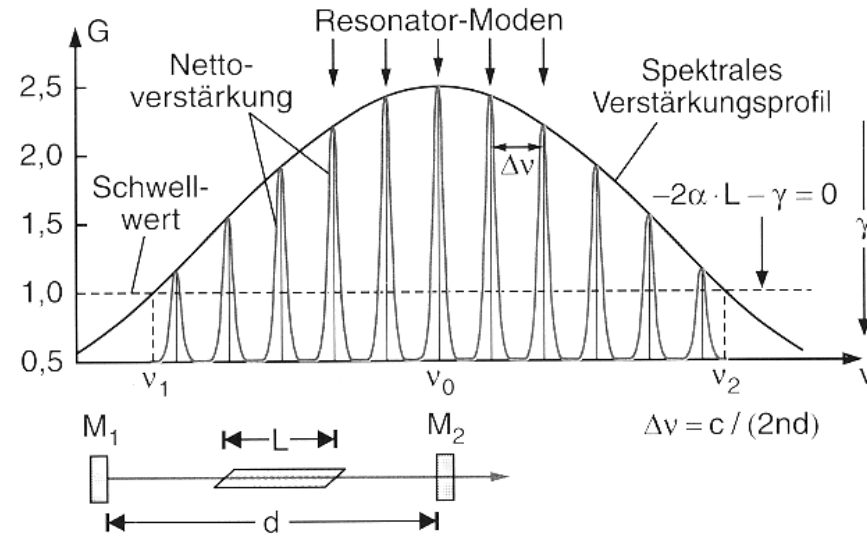
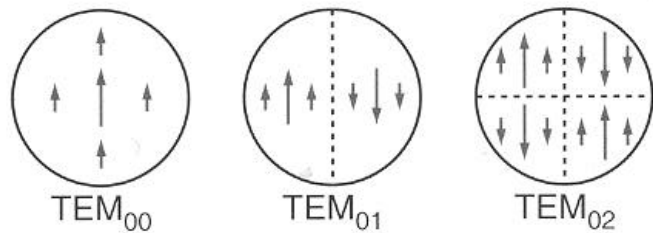
## Moden des offenen Resonators

transversal-elektromagnetische  
Moden: Fundamentalmoden.:  $TEM_{00}$

### Amplitudenverteilung der TEM-Moden



### Elektrische Feldstärke in der Ebene senkrecht zur Resonatorachse



Man kann durch eine geeignete Wahl von  $a$  (Spaltöffnung) und von  $d$  die Nettoverstärkung so klein machen, dass sie die Schwellbedingung nicht erfüllen => **Modenselektion**

## Moden des Lasers

### Einmodenlaser

Um zu erreichen, dass ein Laser nur auf einer Resonanzfrequenz oszilliert müssen zusätzliche frequenzselektierende Elemente (z.B. Etalon) in den Resonator gebracht werden.

Transmission des Etalons:

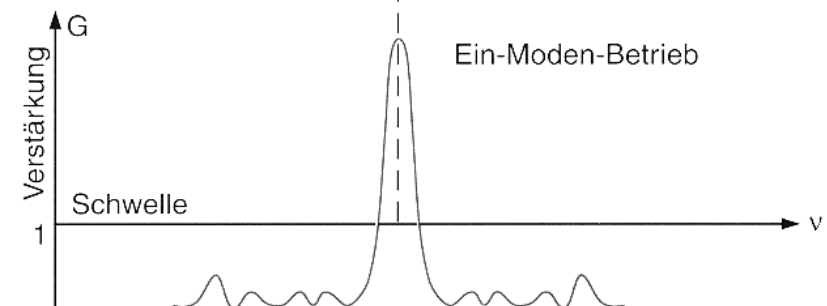
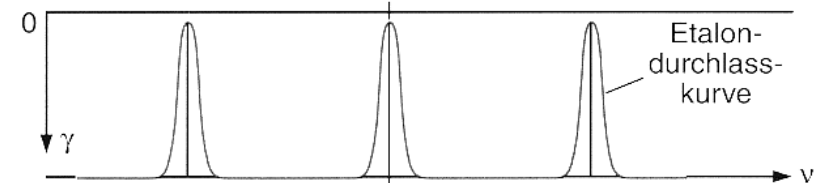
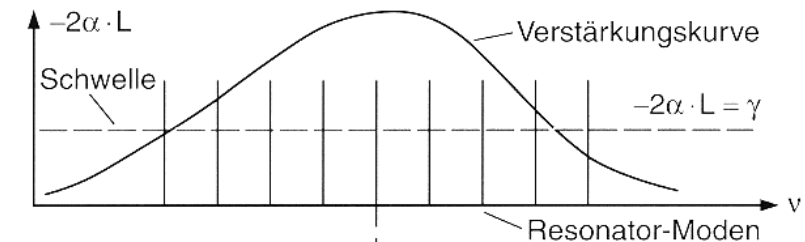
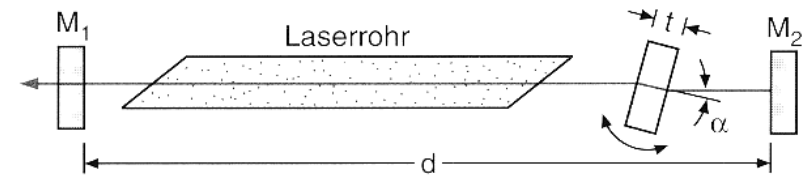
$$T = \frac{1}{1 + (4R / (1 - R)^2) \cdot \sin^2(d / 2)}$$

mit dem Reflexionsvermögen  $R$  und der Phasenverschiebung  $\delta$ :

$$d = 2p / l \Delta s$$

Man sieht, dass  $T = 1$  wird, wenn  $\delta = 2m \cdot \pi$ , d.h für alle Frequenzen  $\nu_m = mc / \mathbf{D}s$ .

Man kann über den Kippwinkel  $\alpha$  des Etalons nun  $\nu_r = \nu_m$  einstellen und damit nur die eine gewünschte Resonanzfrequenz auswählen.



## Verschiedene Lasertypen

Die meisten Lasertypen haben feste Oszillationswellenlängen, die den diskreten Übergängen zwischen definierten Niveaus in Atomen oder Molekülen entsprechen.

### Festkörperlaser

Lasertyp	aktives Atom bzw. Ion	Wirtskristall	Laserwellenlänge (µm)
Rubinlaser	Cr <sup>+++</sup>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Saphir)	0,6943
Neodym-Glas-Laser	Nd <sup>+++</sup>	Glas	1,06
Neodym-YAG-Laser	Nd <sup>+++</sup>	Y <sub>3</sub> Al <sub>5</sub> O <sub>12</sub> , CaF <sub>2</sub> , CaF <sub>3</sub>	1,06 0,9 – 1,1
Titan-Saphir-Laser	Ti <sup>+++</sup>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,65 – 1,1
Alexandrit	Cr <sup>+++</sup>	BeAl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0,7 – 0,83
Kobalt-Laser	Co <sup>++</sup>	MgF <sub>2</sub>	1,5 – 2,1
Holmium-Laser	Ho <sup>+++</sup>	YAG	2,06
Erbium-Laser	Er <sup>+++</sup>	YAG	2,9
Farbzentren-Laser	Fehlstellen von Alkali-Ionen	Alkali-Halogenid-Kristall	0,8 – 3,5 je nach Kristall

### Lasertypen

- Festkörperlaser
- Flüssigkeitslaser
- Gaslaser

### Festkörperlaser

- aktives Medium: Gläser oder Kristalle, die mit anregbaren Atomen bzw. Ionen dotiert sind (Konzentration: 0.1 – 3 %)
- Alle Festkörperlaser werden optisch gepumpt, meist mit Blitzlampen, so dass die meisten gepulst betrieben werden (Pulsdauer ms – µs und mit 1 mJ – 1J Pulsenergien)
- zum Teil breite Durchstimmbereiche (breites Wellenlängenband steht zur Verfügung)



## Verschiedene Lasertypen

### Auswahl einiger Gaslaser

Lasertyp	Lasерwellenlängen	Betriebsart	Leistung
He-Ne-Laser	etwa 10 Wellenlängen von 0,54 – 3,39 $\mu\text{m}$	cw	0,1 – 100 mW
Argonlaser	etwa 20 Wellenlängen zwischen 0,35 – 0,53 $\mu\text{m}$	cw und gepulst	1 – 100 W cw, einige kW gepulst
CO <sub>2</sub> -He,N <sub>2</sub> -Laser	auf etwa 200 Linien 9,5 – 10,3 $\mu\text{m}$	cw und gepulst	1 W – 10 kW cw, gepulst $\leq$ 1 MW
CO-Laser	auf etwa 300 Linien zwischen 4,5 – 6 $\mu\text{m}$	cw und gepulst	einige Watt
Excimer-Laser	XeCl: 308 nm KrF: 248 nm ArF: 193 nm	gepulst, Pulsdauer 2 – 200 ns	Pulsenergien 1 – 300 mJ pro Puls
Chemische Laser	HF, DF: 2 – 3 $\mu\text{m}$ 10 – 20 $\mu\text{m}$	cw und gepulst	einige kW

- aktives Medium: Gasentladung (z.B. durch stufenweise Elektronenstoßanregung)
- Linienreiche Spektren (je nach Atomsorten in Gasmischungen bis zu 300 Linien)
- hohe Strahlleistungen

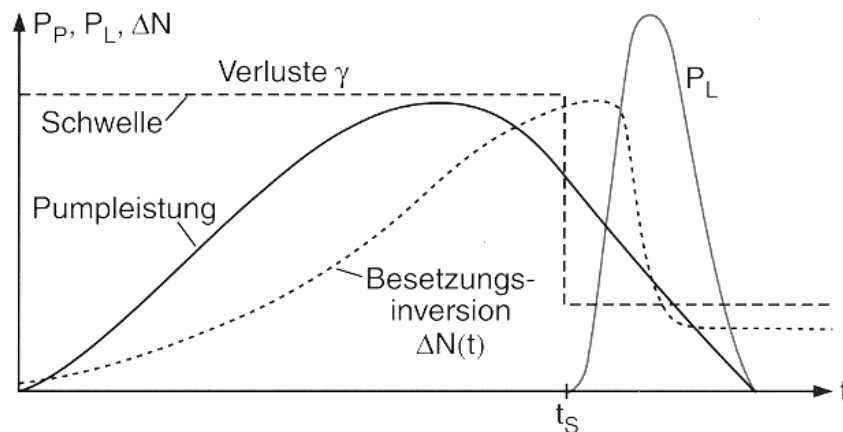
# Erzeugung kurzer Laserpulse

## Güteschaltung von Laserresonatoren

Bei einer Güteschaltung von Laserresonatoren werden während des Pumpvorgangs die Verluste  $\gamma$  künstlich bis zu einem gewählten Zeitpunkt  $t_s$  groß gehalten. Zum Zeitpunkt  $t = t_s$  werden die Verluste plötzlich auf ihren möglichen Minimalwert reduziert. Dadurch wird die Besetzungsinversion für  $t > t_s$  nicht durch induzierte Emission abgebaut und man erreicht wegen andauernder Energiezufuhr sehr hohe Pulsintensitäten.

Pulsdauer: ~Nanosekunden; Pulsenergien  $10^5 - 10^9$  W

Prinzip einer Güteschaltung des Laserresonators



## Modengekoppelte Pulse

Die Lichtwelle der Frequenz  $\nu_0$  wird im Resonator **intensitätsmoduliert** mit der Frequenz  $f$ . Hierbei treten dann Intensitäten nicht nur bei  $\nu_0$ , sondern auch bei  $\nu_0 + f$  (Seitenbänder) auf.

Ist nun der Frequenzabstand  $\delta\nu$  benachbarter Fundamentalmoden gleich der Modulationsfrequenz  $f$ , tragen die Seitenbänder in ihrer Intensität zur induzierten Emission bei (=> **Modenkopplung**).

=> Pulsbreiten im Bereich von Pikosekunden

## Nichtlineare Optik: Optische Frequenzverdopplung und Frequenzmischung

Bei genügend kleinen Feldstärken der einfallenden Welle sind die Auslenkung der Elektronen klein und die Rückstellkräfte sind proportional zur Auslenkung. Die induzierten Dipolmomente sind proportional zur Feldstärke.

$$\mathbf{P} = \epsilon_0 \mathbf{cE}$$

Dies ist der Bereich der **linearen Optik**. Bei **größeren Lichtintensitäten** (z.B. mit Lasern) kann durchaus ein **nichtlinearer Bereich der Auslenkungen** erreicht werden. In diesem Fall spielen die Symmetrieeigenschaften des Mediums (Suszeptibilität muss als Tensor betrachtet werden) eine wesentliche Rolle.

$$P_i = \epsilon_0 (\mathbf{c}_{ij}^{(1)} E_j + \mathbf{c}_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \mathbf{c}_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l + \dots)$$

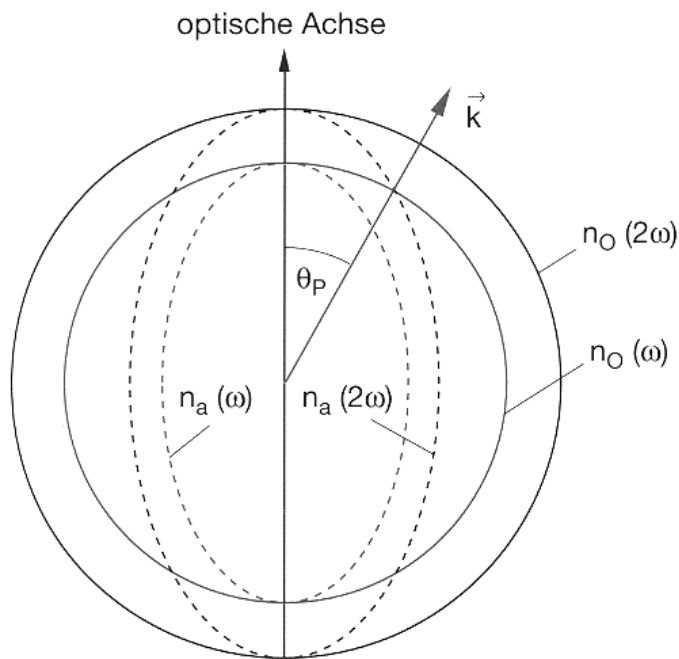
Aus diesem Grund wird eine monochromatisch einlaufende Welle  $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(\omega t - kz)$  im Medium nicht nur Rayleigh-Streuung zeigen, sondern auch Licht höherer harmonischer Frequenzen ( $m \cdot \omega$  mit  $m = 2, 3, 4, \dots$ ).

Beispiel der  $x$ -Komponente  $\longrightarrow P_x = \epsilon_0 \left( \frac{1}{2} \mathbf{c}^{(2)} E_{0x}^2 + \mathbf{c}^{(1)} E_{0x} \cos(\omega t) + \frac{1}{2} \mathbf{c}^{(2)} E_{0x}^2 \cos(2\omega t) \right)$

## Nichtlineare Optik: Optische Frequenzverdopplung und Frequenzmischung

Im Gegensatz zur Grundwelle (Frequenz  $\omega$ ) kann die Oberwelle ( $2\omega$ ) in homogenen isotropen Medien in den einzelnen Schichten des Mediums sich **nicht zu einer makroskopischen Welle aufaddieren**. Sie ist gegenphasig zu den schwingenden Dipolen.

$$v_{\text{ph}}(2\omega) = c/n(2\omega) \neq v_{\text{ph}}(\omega) = c/n(\omega)$$



Phasenanpassung zwischen Grundwelle und Oberwelle in doppelbrechenden Medien.

Mit Hilfe der **Doppelbrechung in anisotropen Medien** ist es möglich, dass z.B. in einer bestimmten Richtung  $\theta_p$  gegen die optische Achse der Brechungsindex  $n_a(2\omega) = n_o(\omega)$  ist. So können sich Erregerwelle und die Sekundärwelle ( $2\omega$ ) in gleiche Richtung mit gleicher Phasengeschwindigkeit ausbreiten und die Oberwellen können sich phasenrichtig zu einer makroskopischen Welle addieren.

Das Resultat ist dann eine **optische Frequenzverdopplung**.

**Beispiel:** Rubin-Laser:  $\lambda = 690 \text{ nm} \rightarrow \lambda = 345 \text{ nm}$

Durch Kombination von zwei Wellen unterschiedlicher Frequenz kann unter bestimmten Umständen nach dem obigen Prinzip auch eine **Frequenzmischung** hergestellt werden. => Strahlungsquellen für Spektralbereiche in denen keine Laserlinien liegen !

# Optische Pulskompression

Der Brechungsindex von Licht in einer optischen Fiber ist gegeben durch:

$$n(\omega, I) = n_0(\omega) + n_2 I(t)$$

$n_0$ : linearer Anteil  
 $n_2$ : nichtlinearer Anteil

Ein Lichtpuls der Dauer  $\Delta T$  wird durch ein Wellenpaket beschrieben:

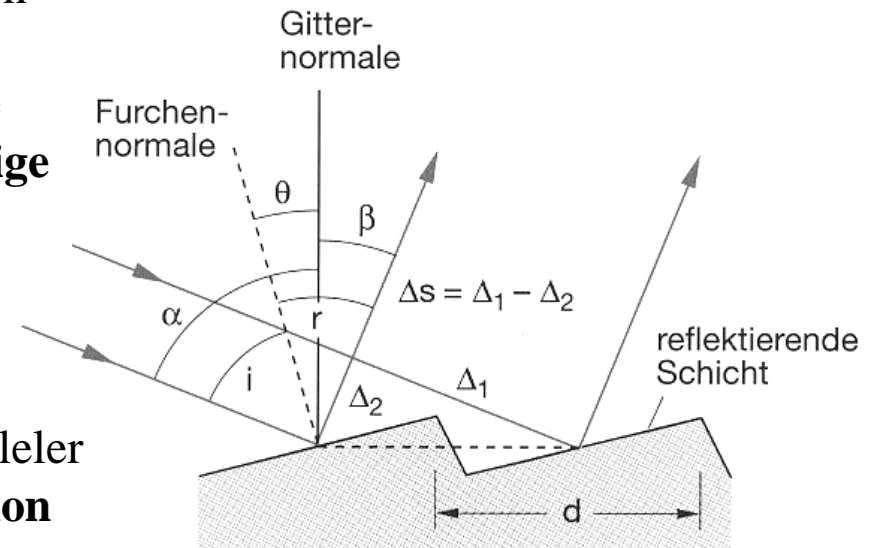
$$I(t) = \int_{-\Delta\omega/2}^{\Delta\omega/2} I(\omega) e^{i(\omega t - kz)} d\omega$$

Der lineare Anteil des Brechungsindex  $n(\omega, I)$  bewirkt bei normaler Dispersion ( $dn_0/d\lambda > 0$ ), dass die roten Spektrallinien eine größere und die blauen eine kleinere Geschwindigkeit haben. Der **nichtlineare Anteil** von  $n(\omega, I)$  bewirkt eine **intensitätsabhängige Frequenzverschiebung** der Wellen im Puls.

Der Puls wird daher spektral breiter (nichtlinearer Anteil) und läuft zeitlich auseinander (linearer Anteil).

Beim Durchlauf dieses Pulses durch ein Paar paralleler **optischer Gitter** kann jedoch eine **Pulskompression** erfolgen !

## Prinzip eines optischen Reflexionsgitters



## Optische Pulskompression

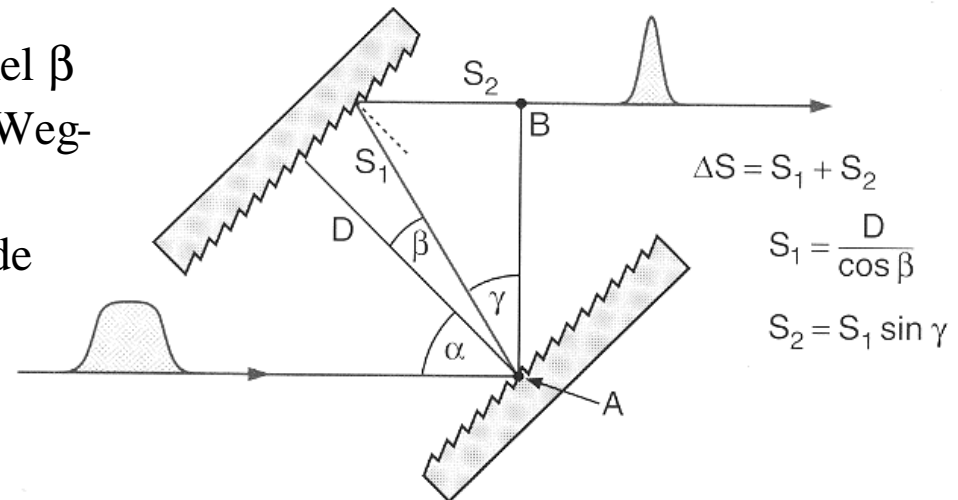
Ein solch spektral verbreiteter Strahl wird in dem Paar optischer Gitter so reflektiert, dass die roten Anteile unter größerem Winkel  $\beta$  reflektiert werden als die blauen. Aus dem Wegunterschied  $\Delta s$  und der Gittergleichung:  $\lambda = D \cdot (\sin \alpha - \sin \beta)$  ergibt sich die folgende Abhängigkeit:

$$\frac{d(\Delta s)}{d\lambda} \approx \frac{1/D}{(1 - \sin^2 \alpha)^{3/2}} \quad \text{für } \lambda \ll D$$

Es zeigt sich also, dass der optische Weg mit steigender Wellenlänge zunimmt. Wählt man der Gitteranstand  $D$  so groß, dass die Verbreiterung des Pulses auf Grund der linearen Dispersion der optischen Fiber überkompensiert wird, erhält man insgesamt eine zeitliche Verkürzung des Pulses (**anormale Dispersion** => **Pulskompression**).

Mit dieser Technik kann man Pulsdauern im Bereich von **Femtosekunden** erreichen (Rekord liegt für  $\lambda = 600 \text{ nm}$  bei  $\Delta\tau = 6 \text{ fs}$  !).

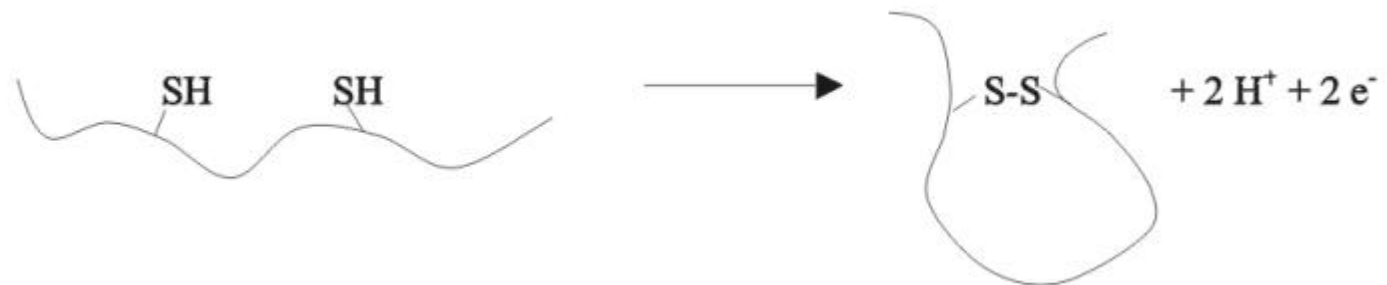
### Prinzip der optischen Pulskompression



## Modellsysteme zur Proteinfaltung / Faltungskinetik

Protein	MW [kDa]	No-AS	No Cys.	No SH-Bond	Folding-Type	time range
alpha-lactalbumin (bovine)	16.2	142	8	4	Intermediate	~0.15 sec (20 sec)
apomyoglobin (sperm whale)	17.2	153	-	-	Intermediate	~100 ms
lysozyme (HEWL)	14.3	129	8	4	Intermediate	~350 ms (20 sec)
cytochrome C (horse)	11.7	104	2	-	two-state	~200 ms
Barstar (RNase Inhibitor)	10.2	89	2	1	two-state	~100 ms
Cold shock Protein (A,B)	7.4	67	-	-	two-state	~1 ms

Disulfidbrücken:



## Zeitaufgelöste Techniken zur Proteinfaltung

Anregung schneller Entfaltungs-/Rückfaltungsprozesse für zeitaufgelöste Messungen

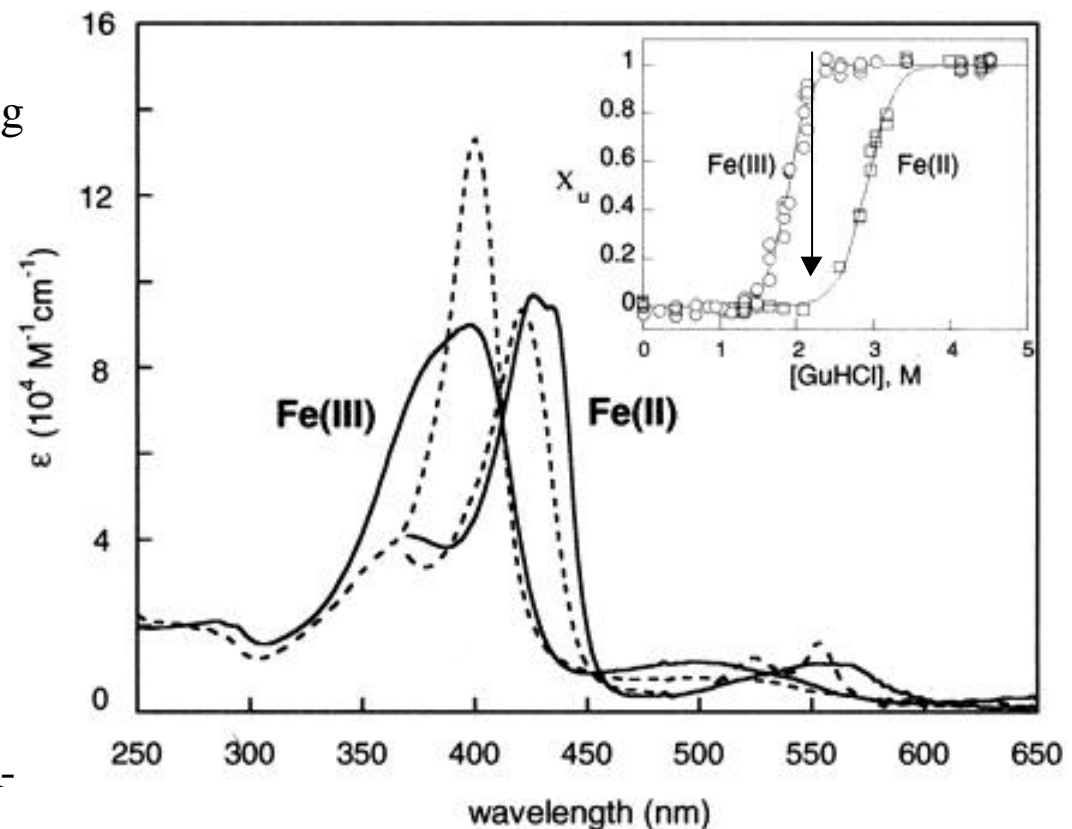
### **schneller trigger**

- „Mixing stopped flow“,  
pH-Sprung (sub-Millisekunde)
- „rapid flow“: „pump-probe“-Messung
- Laser: T-Sprung bei Wellenlänge  
mit starker Absorption des  
Wassers (ns)
- Blitzlichtphotolyse,  
Elektronentransfer (100 fs)

### **Beobachtung des Gleichgewichts**

Schnelle Übergänge ( $F \rightleftharpoons U$ ) in der  
nähe des Gleichgewichts  $[U] = [F]$   
bei kritischen Bedingungen ( $T_m$ ,  
 $GndHCl_{1/2}$ ) => nur mit Einzelmolekül-  
untersuchung möglich !

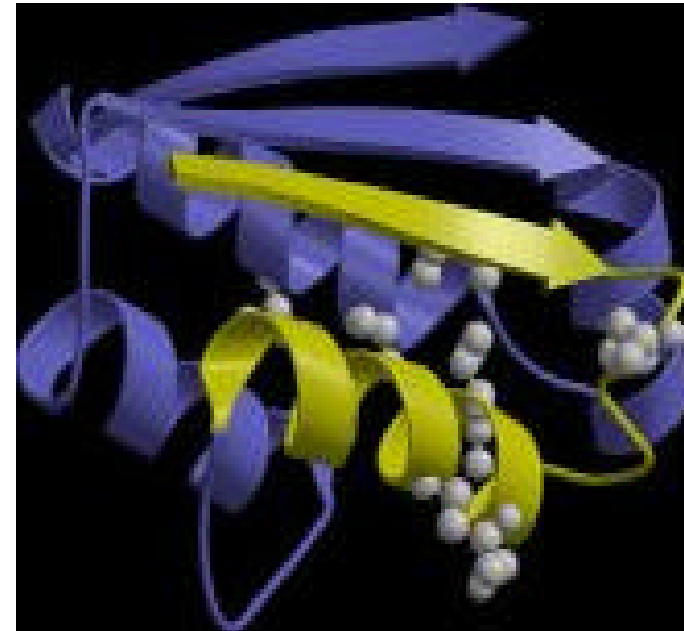
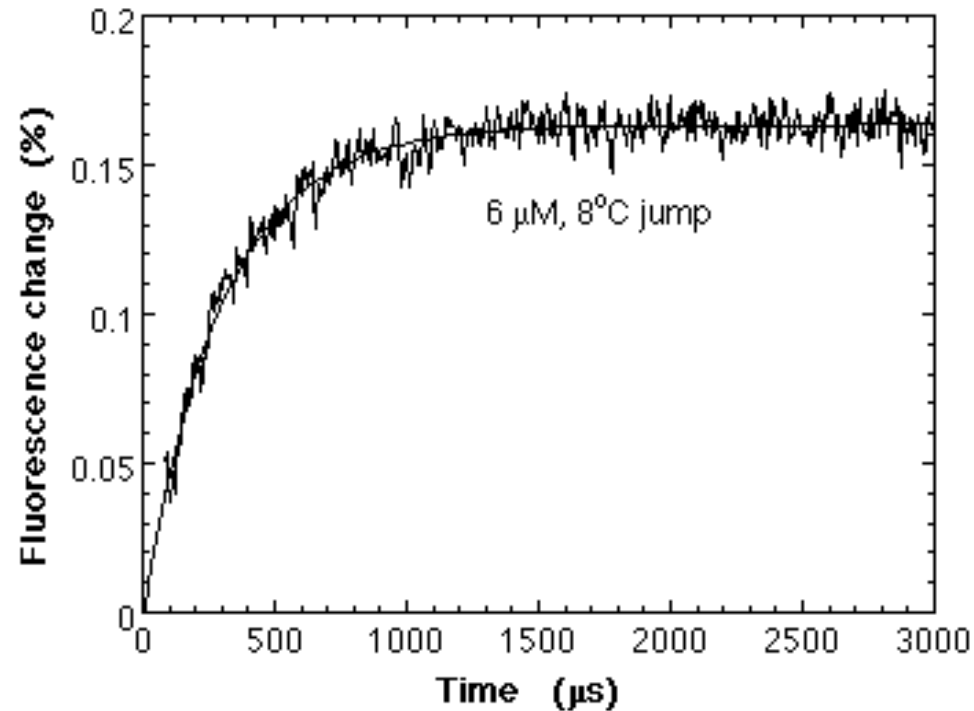
Stabilität des Cytochrom c` in Abhängigkeit des  
elektronischen Zustandes der Eisen-Hämgruppe





## Faltungskinetik

### Beispiel: Ribonukleaseinhibitor (Barstar)



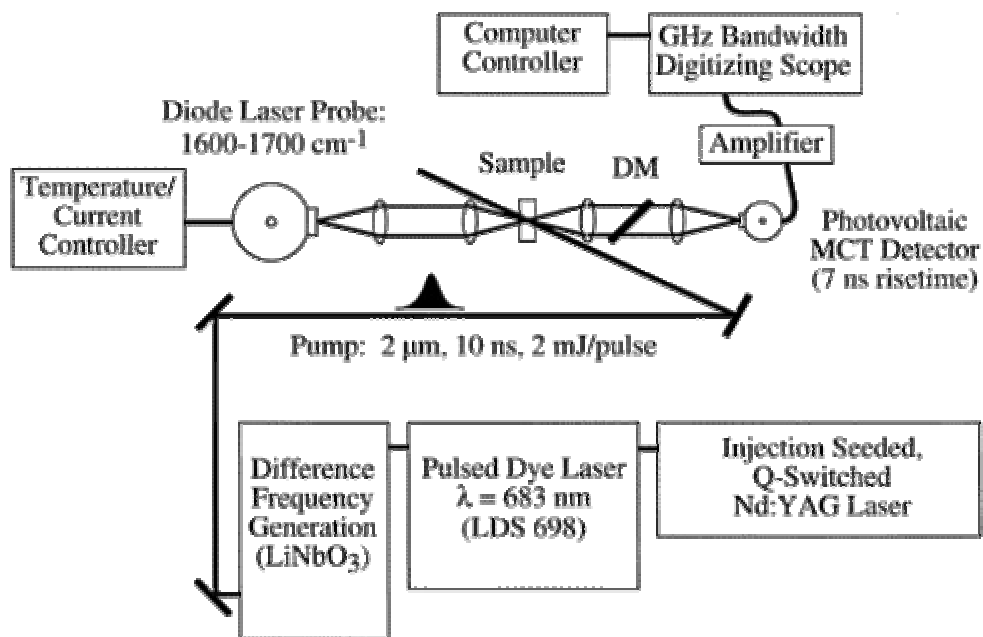
Nölting, 1995

Rückfaltungsmessungen mit Pseudo-Wildtyp Mutante: P27A/C40A/C82A Barstar (enthält keine Cysteine => keine Disulfidbrücken => schnellere Faltung)

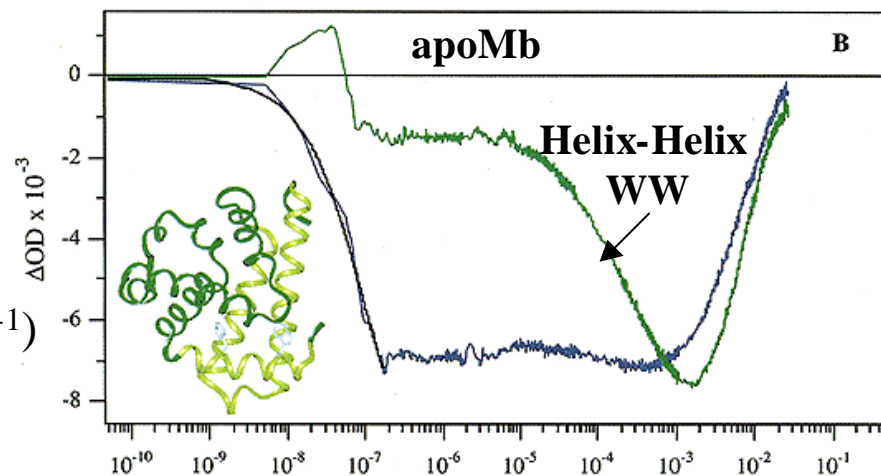
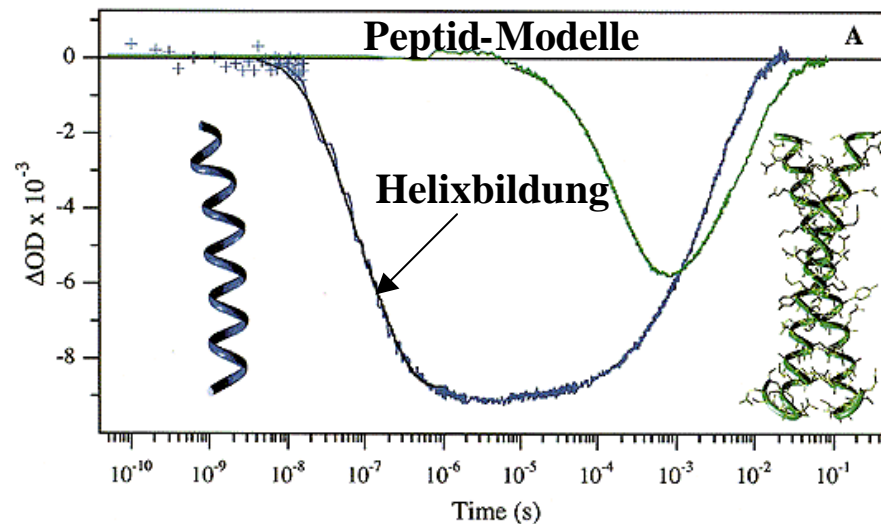
- Ausgangstemperatur: 2  $^{\circ}\text{C}$  (Kälte-denaturiertes Protein)
- T-Sprung mit 200 W Quecksilber-Xenon Lampe => 10  $^{\circ}$  (gefaltetes Protein)

# Faltungskinetik

Ausbildung der Sekundärstrukturelemente beobachtet mit zeitaufgelöster IR Spektroskopie

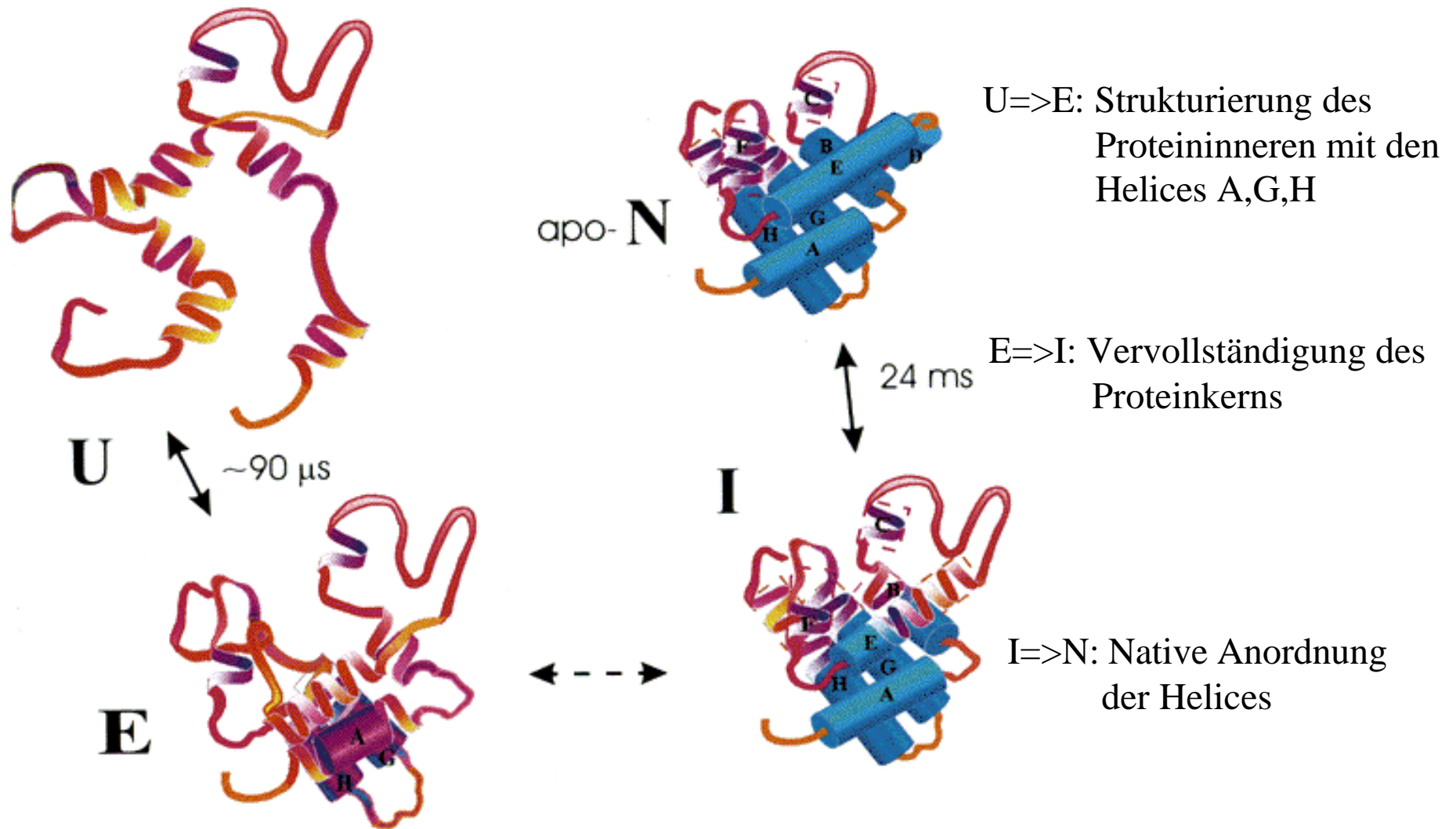


- T-Sprung ca. 20 °C: Absorption in D<sub>2</sub>O –Puffer  
Erhalt der Wärme ca. 1 ms.
- IR-Absorption der Amid I-Bande (1610-1680 cm<sup>-1</sup>)  
=> sensitiv für Sekundärstruktur !



Dyer et al. 1998

# Faltungskinetik des apo-Myoglobin



Dyer et al. 1998