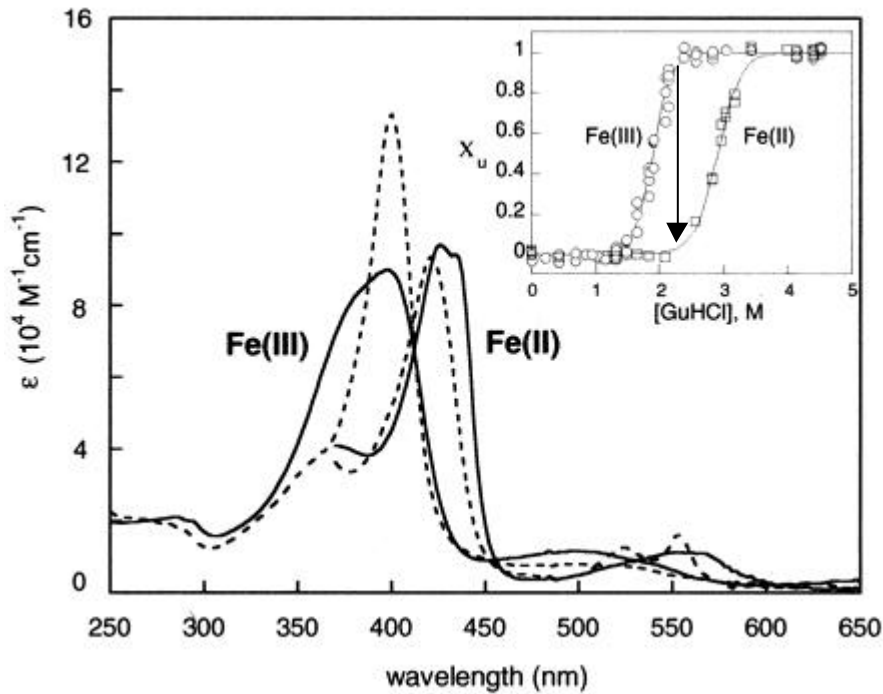


# Zeitaufgelöste Techniken zur Proteinfaltung

## Anregung schneller Entfaltungs-/Rückfaltungsprozesse für zeitaufgelöste Messungen

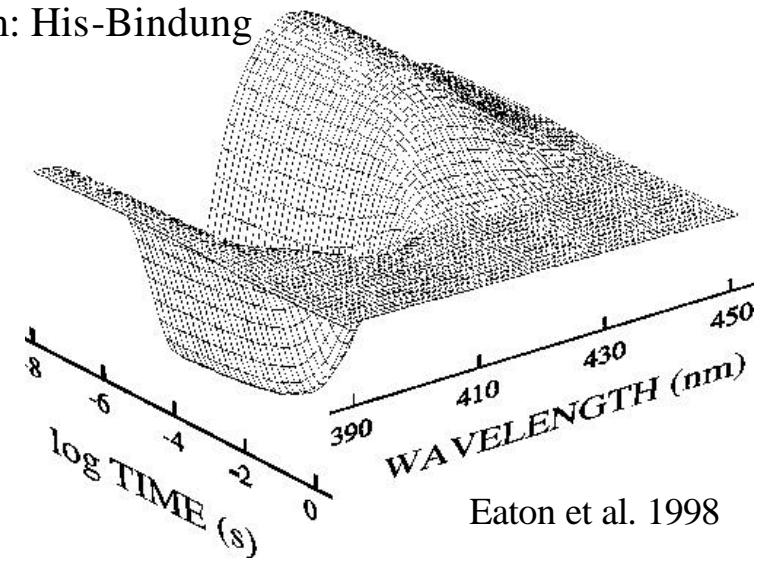
**Photodissoziation** (~ in ps)  
initiiert Rückfaltung des Cytochrom C.



## Zeitaufgelöste Messung von

$\lambda \sim 400 \text{ nm}$ : Met-Bindung  
 $\lambda \sim 430 \text{ nm}$ : His-Bindung

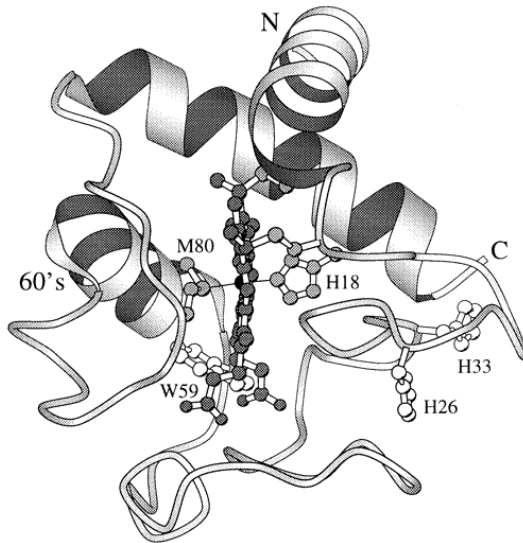
koordinierte Hämgruppe



Eaton et al. 1998

# Zeitaufgelöste Techniken zur Proteinfaltung

Tryptophan-Seitengruppe  
Trp-59 befindet sich in der  
Nähe der Häm-Gruppe und  
dient als „Sonde“ für  
Strukturänderungen.



Der Förster-Energie Transfer verändert  
die Emissionseigenschaften von Trp-59.  
Die entfaltete Struktur zeigt größere  
Fluoreszenzemission.

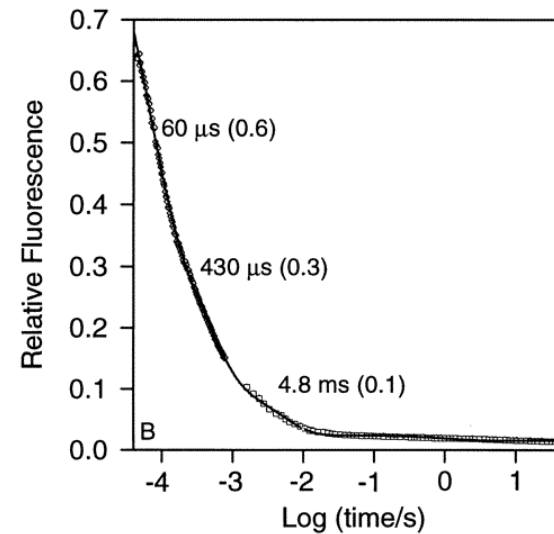
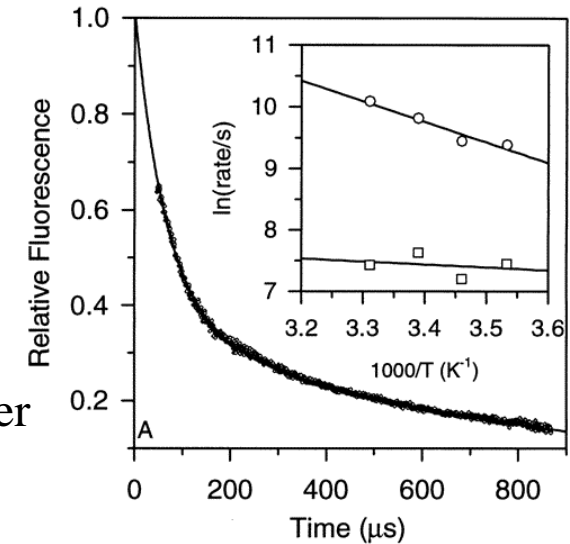
## Rückfaltungskinetik

pH-induzierte Rückfaltung  
gemessen mit „continuous“  
und „stopped flow“ Technik

Kinetische Information über  
sechs Größenordnungen in der  
Zeit.

Die wesentlichen Struktur-  
änderungen in der Nähe der  
Häm-Gruppe finden im  
Submillisekundenbereich  
statt.

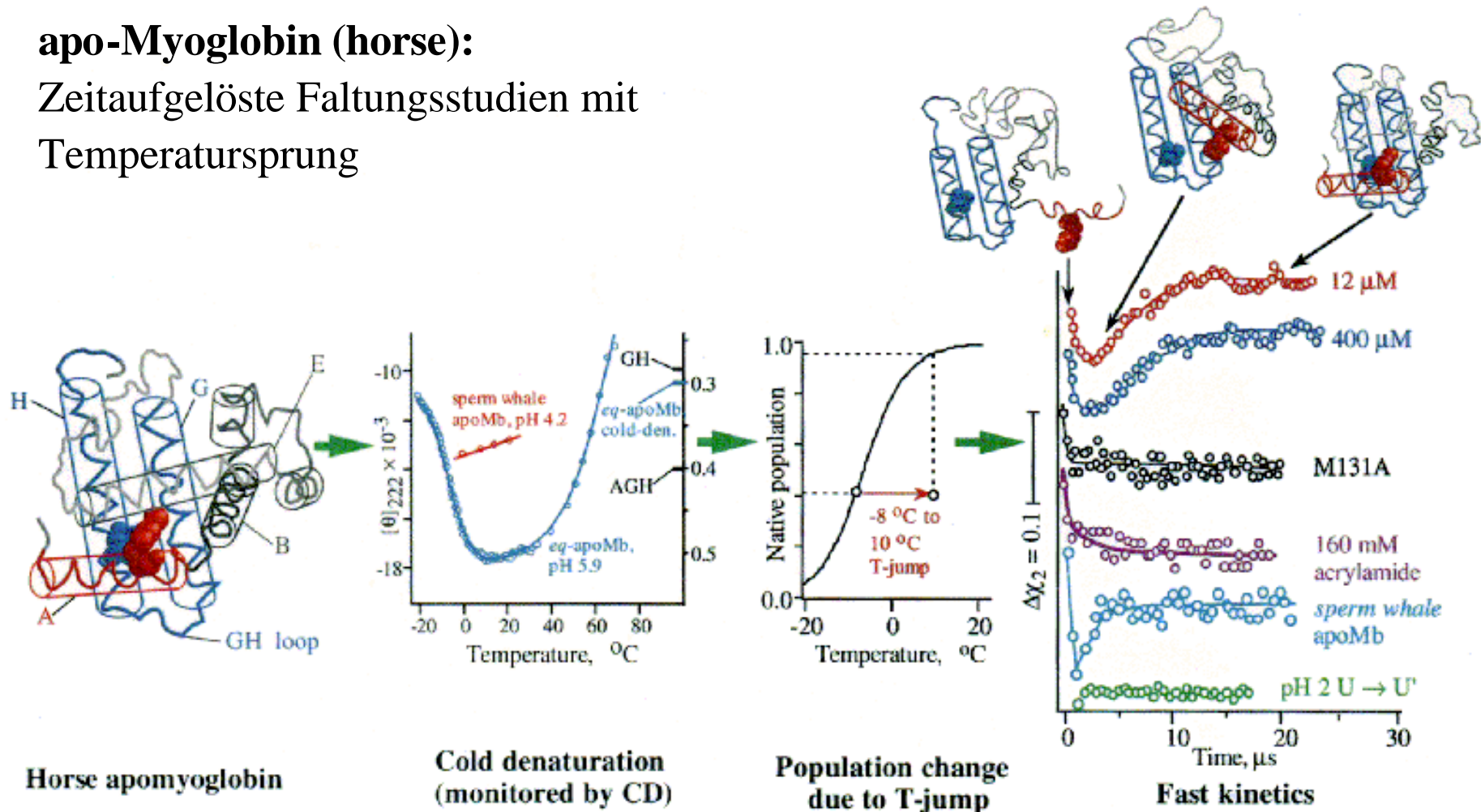
## Tryptophan Fluoreszenz



# Zeitaufgelöste Techniken zur Proteinfaltung

## apo-Myoglobin (horse):

Zeitaufgelöste Faltungsstudien mit  
Temperatursprung



Horse apomyoglobin

Grueble et al. 1998

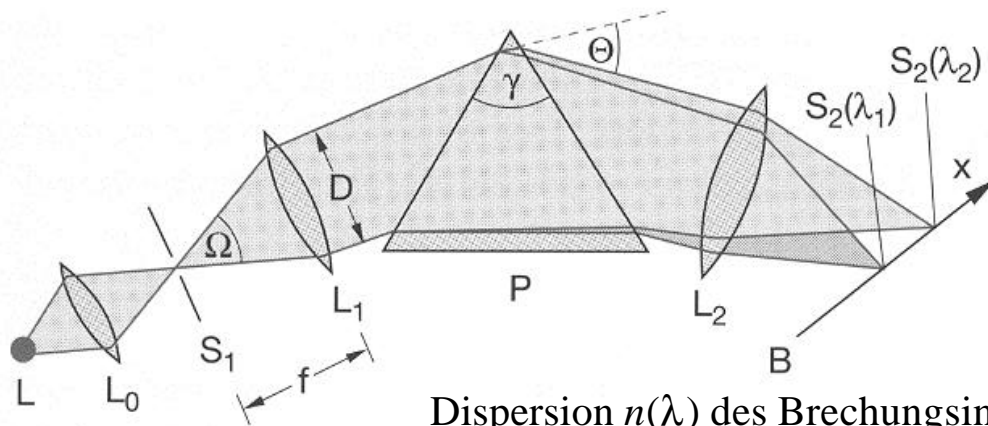
Fluoreszenzmessungen

# Monochromatoren

Die Selektion ausgewählter Wellenlängen spielt für viel Spektroskopische Verfahren eine zentrale Rolle. Dabei spielen die folgenden Faktoren eine Rolle:

- möglichst viele verschiedene wählbare Wellenlängen aus einem breiten Spektrum von Wellenlängen
- hohe Intensität der ausgewählten Wellenlänge
- möglichst kleines  $\Delta\lambda/\lambda$
- gute räumliche Trennung von Strahlen unterschiedlicher Wellenlängen

## Prismenspektrograph

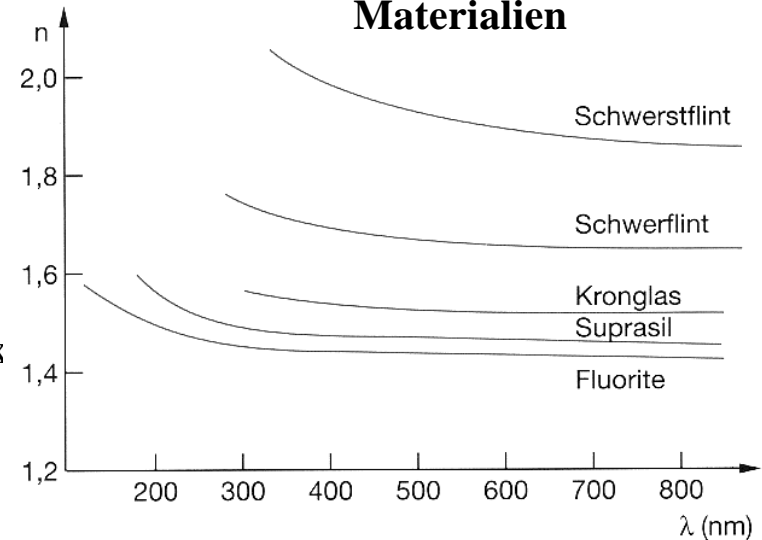


Dispersion  $n(\lambda)$  des Brechungsindex führt zu wellenlängenabhängigen Brechungswinkeln.

$$\rightarrow \frac{dq}{dl} = \frac{2 \sin(g/2)}{\sqrt{1 - n^2 \sin^2(g/2)}} \cdot \frac{dn}{dl}$$

Biospektroskopie

## Dispersionskurven verschiedener Materialien



# Monochromatoren

## Reflexionsgitter

In eine ebene Glasplatte werden Furchen geritzt, die einen bestimmten Neigungswinkel zur planaren Glasoberfläche aufweisen. Diese Fläche wird dann mit einer reflektierenden Schicht bedampft. Bei vorgegebener Einfallsrichtung  $\alpha$  erhält man nur in solchen Richtungen  $\beta$  konstruktive Interferenz für die gilt:

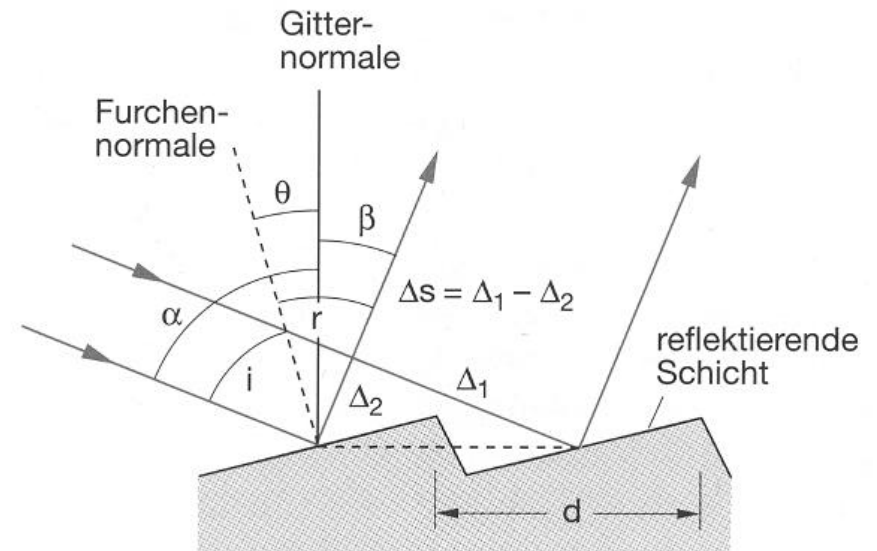
$$\Delta s = d(\sin a + \sin b) = m\lambda$$

$$\text{Blazewinkel: } q = \frac{a + b}{2}$$

Da der Einfallswinkel  $\alpha$  durch die Konstruktion des Gitters fest vorgegeben ist, der Winkel  $\beta$  aber durch  $d$  und die Wellenlänge bestimmt ist, gilt für den Blazewinkel:

$$q = \frac{a}{2} + \frac{1}{2} \arcsin \left[ \frac{m\lambda}{d} - \sin a \right]$$

Er wird so gewählt, dass für  $\lambda_m$  (mittlere Wellenlänge von  $\Delta\lambda$ ) der Winkel  $\beta_m$ , bei dem das Interferenzmaximum  $m$ -ter Ordnung auftritt, gleich dem Reflexionswinkel  $r = \theta - \beta$  ist.



**optisches Reflexions-Beugungsgitter**

## Monochromatoren

### **Beispiel:**

Furchenabstand:  $d = 1\mu\text{m}$

Wellenlänge:  $\lambda = 600\text{ nm}$

Einfallswinkel:  $\alpha = 30^\circ$

Bei Verwendung dieser Größen ergibt sich für  $\beta$ :

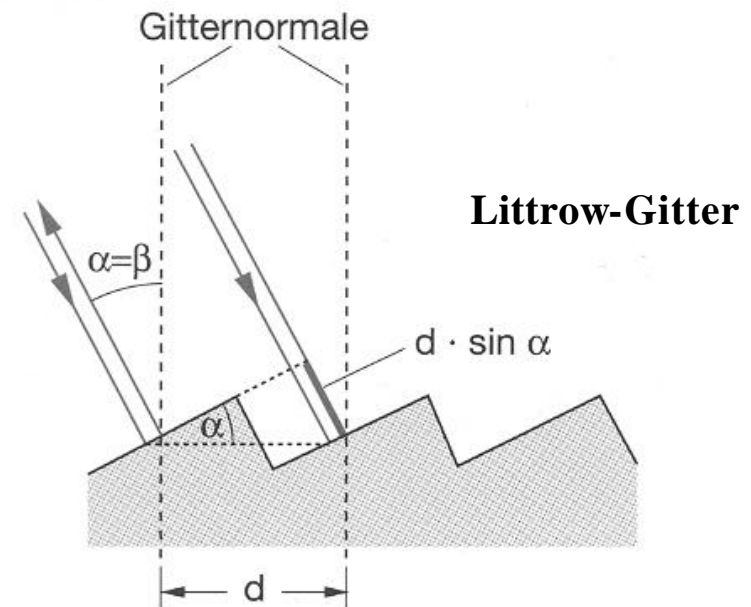
$$\sin \mathbf{b} = \pm(\mathbf{l} - d \cdot \sin \mathbf{a}) / d$$

Es folgt  $\beta \approx \pm 6^\circ$ , d.h. es gibt zwei Richtungen gegen die Gitternormale und zwei Richtungen gegen die Einfallsrichtung ( $36^\circ$  und  $24^\circ$ ) bei denen  $I(\beta)$  maximal für die 1. Ordnung wird.

Optimaler Blazewinkel ist dann bei  $18^\circ$  bzw.  $12^\circ$ .

Für einen Blazewinkel senkrecht zur Furchennormale:

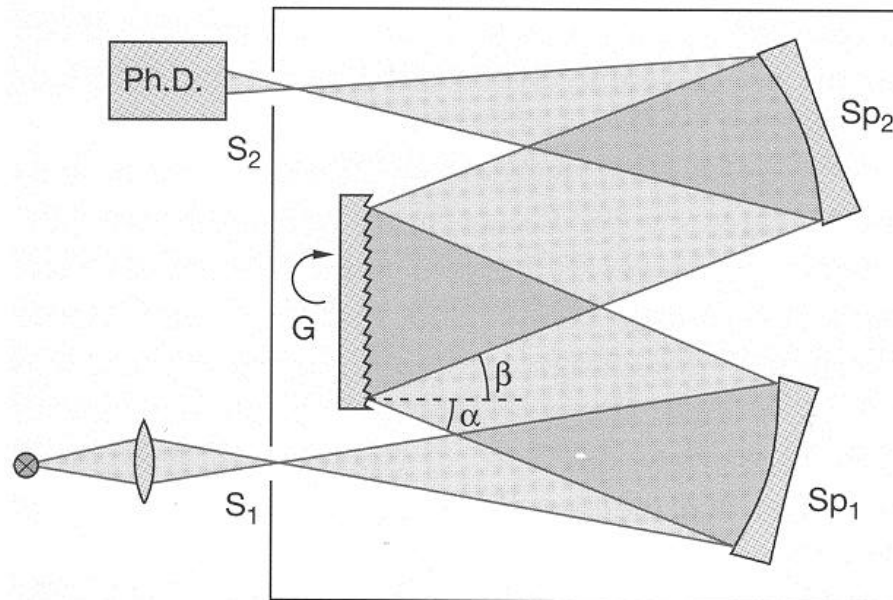
=> **wellenlängen-selektierender Spiegel**



a)  $\Delta s = 2d \sin \alpha = m\lambda$

# Monochromatoren

## Gitterspektrograph



ph.D.: Photodetektor  
Sp<sub>1,2</sub>: sphärische Spiegel zum  
Fokussieren der divergenten  
Strahlen  
S<sub>1,2</sub>: Spaltöffnungen

### Spektrale Auflösung:

$$\frac{I}{\Delta I} = \frac{\Delta s_m}{I}$$

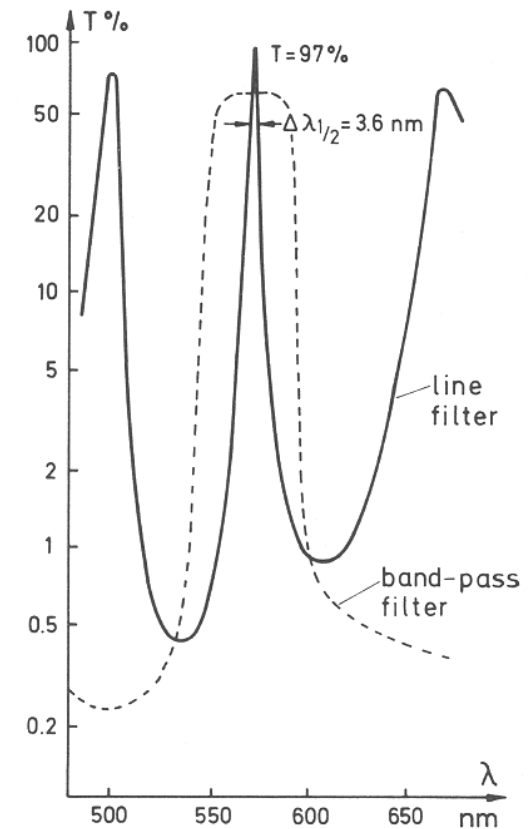
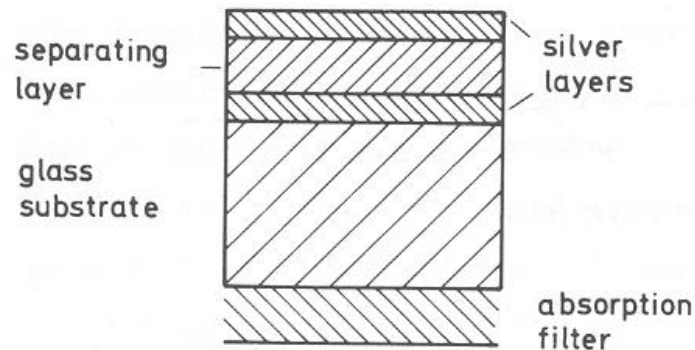
Die spektrale Auflösung ist gleich dem maximalen Wegunterschied  $\Delta s_m$  interferierender Strahlen, gemessen in Einheiten der Wellenlänge.

## Interferenz Filter

Interferenz Filter werden benutzt um selektiv die Transmission von Licht eines schmalen Wellenlängenbandes zu ermöglichen. Die Strahlung außerhalb dieses Wellenlängenbereichs wird entweder absorbiert oder reflektiert. Man unterscheidet zwischen **Linien Filtern** und **Band-pass Filtern**.

Ein Interferenz Linien Filter ist prinzipiell ein Fabry-Perot`sches Etalon mit einer sehr kurzen optischen Weglänge zwischen zwei reflektierenden Oberflächen. Das Material zwischen den reflektierenden Oberflächen weist einen niedrigen Brechungsindex auf und die Dicke dieser Schicht (optische Weglänge) bestimmt die Wellenlänge großer Transmission.

### Interferenz Filter nach dem Fabry-Perot Typ



**Spektrale Transmission einiger Interferenz Filter**



## Spiegel und Strahlteiler

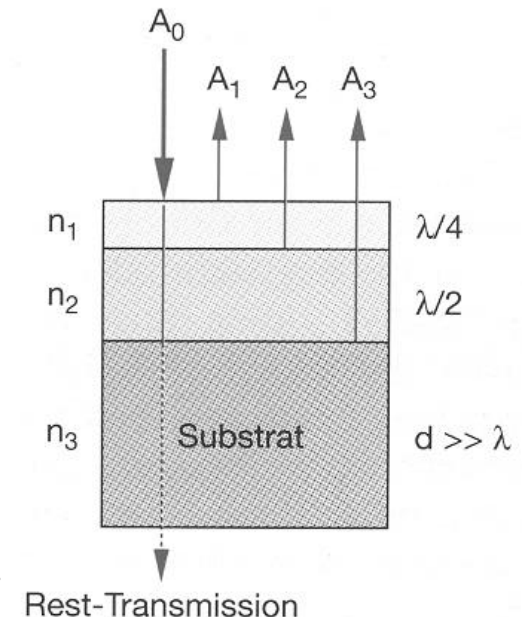
Mit Metallspiegeln (Aluminium, Gold, Silber) erreicht man im sichtbaren Spektralbereich nur Reflexionsbereiche von  $R = 0.9 - 0.95$ . Dieses Reflexionsvermögen ist aber für viele Anwendungen nicht ausreichend (siehe. z.B. Laser). Um höhere Werte für  $R$  zu erreichen, kann man die Interferenz bei der Reflexion an vielen dünnen Schichten mit unterschiedlicher Brechzahl, aber kleiner Absorption ausnutzen (**Dielektrische Spiegel**).

Für eine maximale Reflexion müssen sich die an den einzelnen Grenzflächen reflektierten Teilwellen alle phasenrichtig überlagern:

Der elektrische Feldvektor erfährt bei der Reflexion am optisch dichteren Medium einen Phasensprung  $\pi$ , während bei Reflexion an einem optisch dünneren Medium kein Phasensprung auftritt.

Bei einem Schichtsystem mit den Brechzahlen  $n_{Luft} < n_1 > n_2 > n_3$  erleidet das Licht nur an der oberen Grenzschicht einen Phasensprung. Konstruktive Interferenz der reflektierten Teilwellen erhält man, wenn die Dicken der Schichten gerade  $\lambda/2$  bzw.  $\lambda/4$  sind.

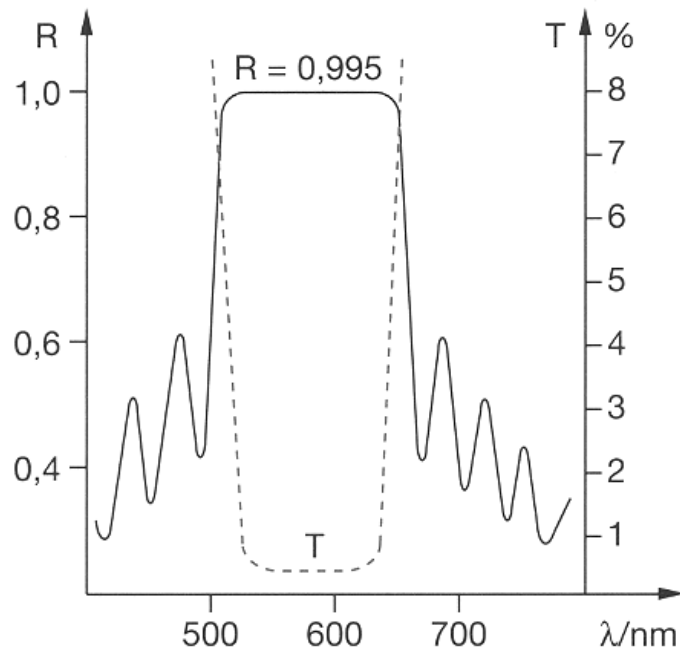
### Dielektrischer Spiegel



# Spiegel und Strahlteiler

Man kann heute bei Verwendung von 15 – 20 Schichten Spiegel mit einem Reflexionsvermögen von bis zu 99.995 % herstellen. Solche Werte sind natürlich nur für einen bestimmten Wellenlängenbereich um eine gewählte Wellenlänge zu erreichen.

## Reflexionsvermögen $R(\lambda)$ eines dielektrischen Mehrschichtenspiegels

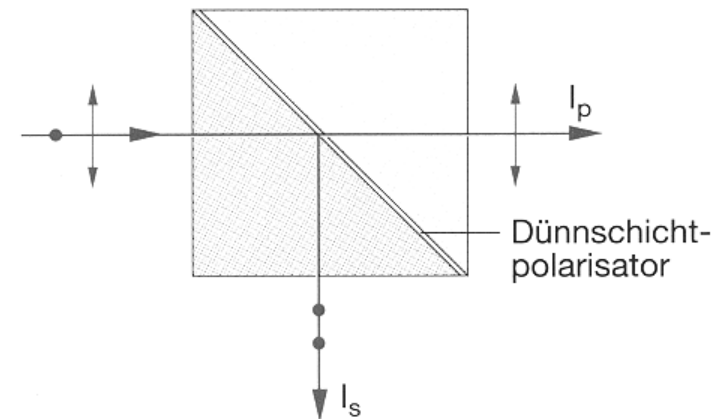


## Strahlteiler

**Dielektrische Materialien** können auch dazu genutzt werden, das Licht wellenlängenabhängig zu reflektieren oder passieren zu lassen.

**Doppelbrechende Substanzen** können genutzt werden, um den Strahl bezüglich seiner Polarisationskomponenten zu teilen.

### Beispiel eines Strahlteilers: Polarisations-Strahlteilerwürfel



Biospektroskopie

# Einzelmolekülstudien

## Einzelmolekülstudien: Motivation

### **Ensemble-Messung:**

- Bestimmung eines Mittelwertes des Ensembles (z.B. gemittelte Struktur von  $10^{13}$  Proteinmolekülen in einem Proteinkristall)
- gute Statistik: verlässlicher Mittelwert

### **Einzelmolekülmessung:**

- Bestimmung eines Messwertes der die Eigenschaft eines individuellen Moleküls widerspiegelt
- Mehrfachmessung geben weitere Information

### **Neue Anwendungen**

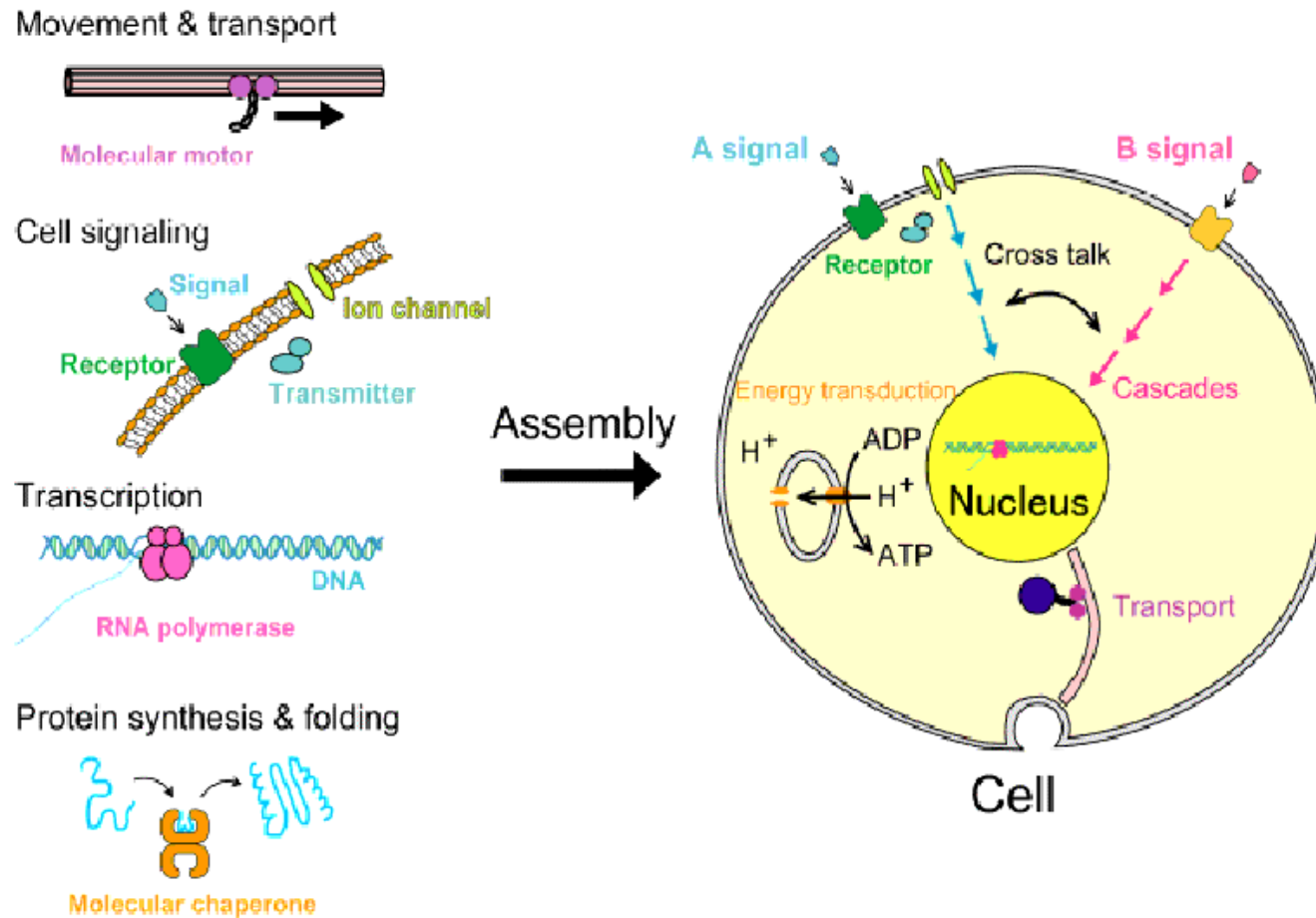
#### **statische Messungen**

- Anwendung auf heterogene Proben,
- Bestimmung von Subpopulationen, Verteilungen

#### **zeitaufgelöste Messungen**

- in Proben ohne Synchronisation oder mehr Information bei „schlechter“ Synchronisation
- Beispiele: Motorproteine, Proteinfaltung, etc.

# Anwendung von Einzelmolekülstudien in der Zelle



## Techniken für Einzelmolekülstudien

### **Allgemeine Probleme**

- Signal-Untergrund Verhältnis
- Wie erlaubt es die makroskopische Probe Moleküle „vereinzelt“ zu messen ?
  - „Patch clamp“ - Technik
  - **Laserpinzette (optical tweezer)**
  - **Fluoreszenzspektroskopie (z.B. FRET, FCS)**
  - Kraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM)

## Das Prinzip der Laserpinzette

Wie werden Partikel „gefangen“ ?

Licht besteht aus Photonen, die einen Impuls haben:

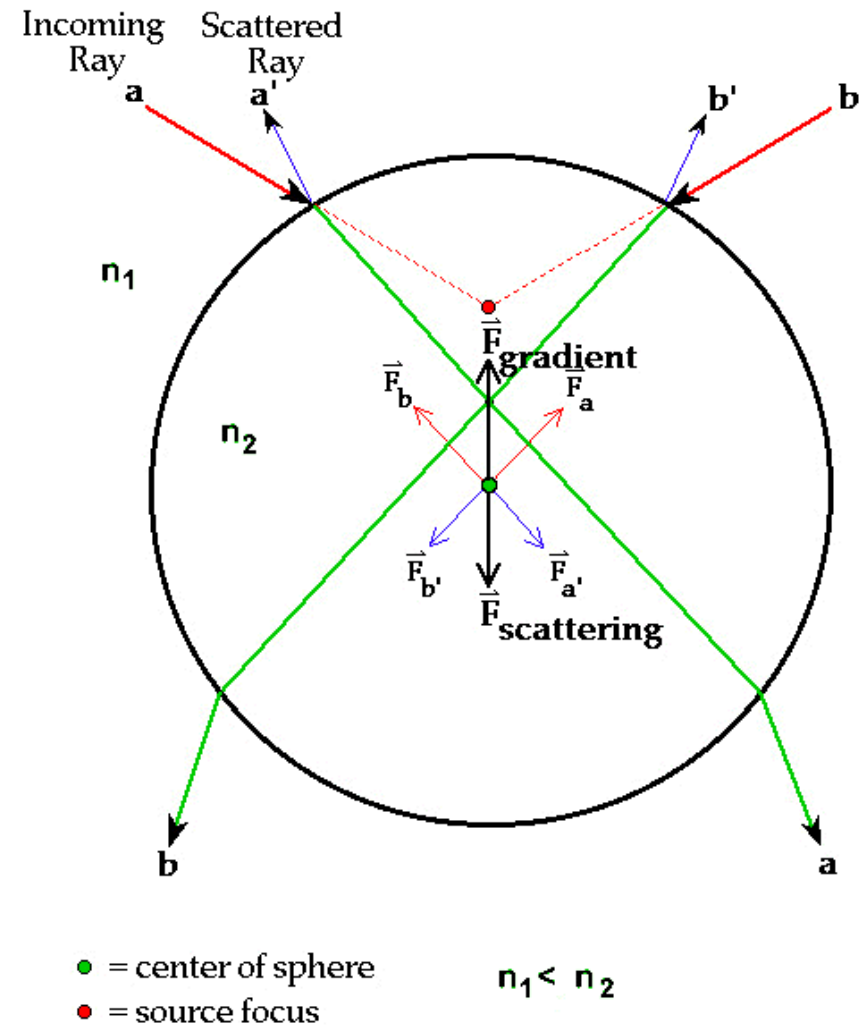
$$|\mathbf{p}| = \frac{h}{\lambda}$$

Die Intensität des Lichts ist durch die Anzahl der Photonen, die auf eine Fläche pro Zeit treffen gegeben.

Im allgemeinen werden zwei Kräfte auf den Partikel wirken:

- Kraft durch Reflexion des Lichts ( $\mathbf{F}_{\text{scatt}}$ )
- Kraft durch Lichtbrechung ( $\mathbf{F}_{\text{grad}}$ )

$$\mathbf{F}_{\text{grad}} = \frac{n}{c} \iint (\mathbf{S}_{\text{in}} - \mathbf{S}_{\text{out}}) dA$$



## Die Optik der Laserpinzette

Wichtig für die Laserpinzette:

große **numerische Apertur** der Linse, weil die Strahlen die von den Seitenbereichen der Linse kommen, am meisten zu  $F_{\text{grad}}$  beitragen.

Numerische Apertur:  $N.A. = n_{\text{Oil}} \cdot \sin(\theta_{\text{max}})$

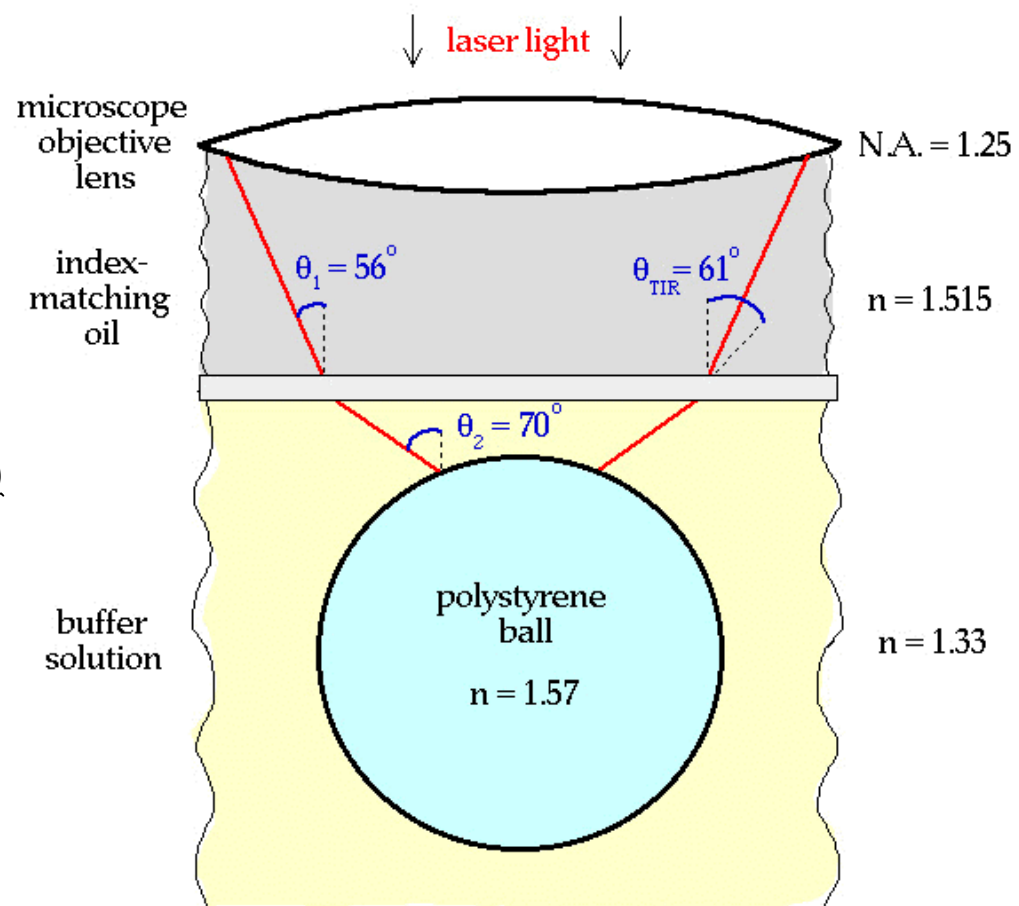
$n_{\text{Oil}}$  : Brechungsindex des Mediums unterhalb der Linse

$\theta_{\text{max}}$ : Winkel zwischen optische Achse und Radstrahlen

hier:  $N.A. = 1.515 \cdot \sin(56^\circ) = 1.25$

Achtung: Totalreflexion bei  $\theta > \theta_{\text{TIR}}$

Grenzwinkel:  $\sin(\theta_{\text{TIR}}) = n_{\text{Glas}}/n_{\text{Oil}}$

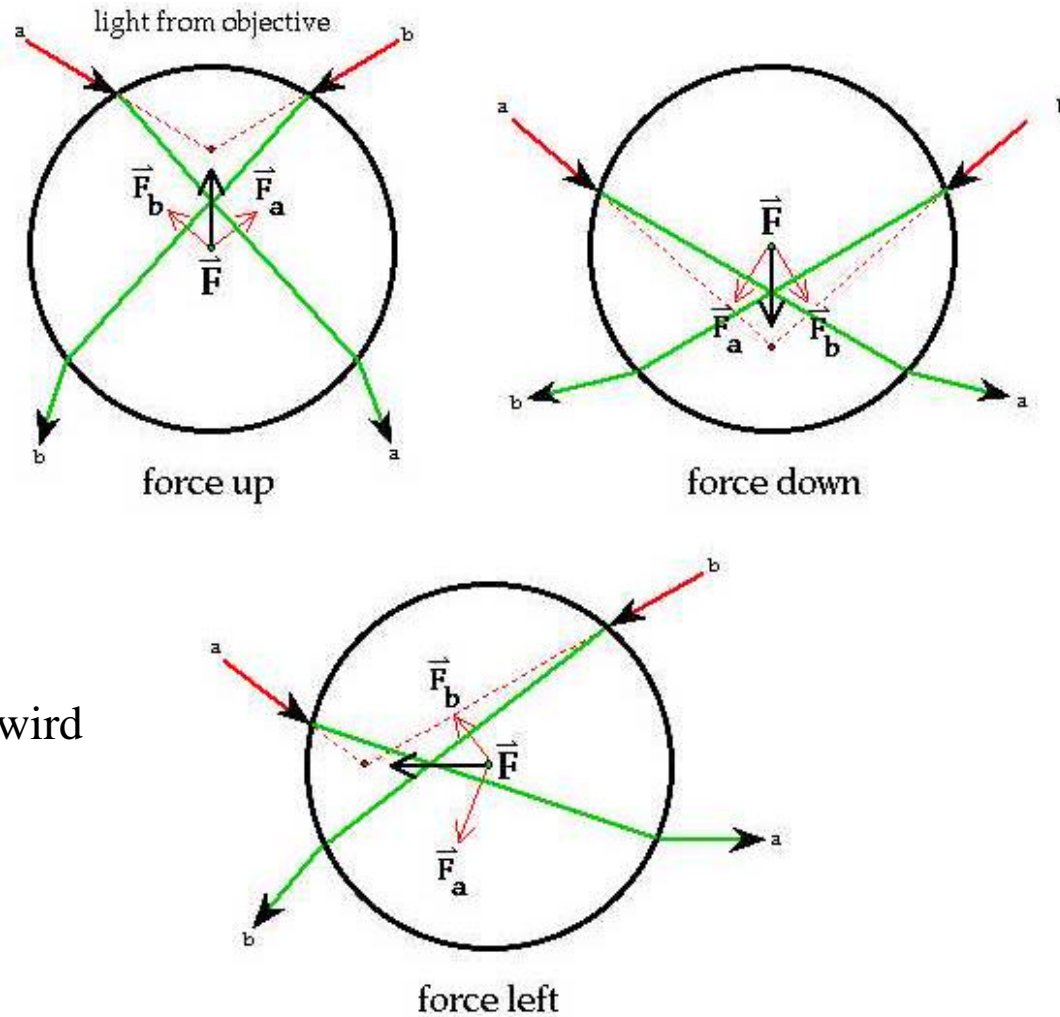


$n$  = index of refraction      Größe der Kugel (Bead): ca.  $1 \mu\text{m}$   
 N.A. = numerical aperture  
 TIR = total internal reflection



## Das Prinzip der Laserpinzette

Wie werden  
Partikel „bewegt“ ?



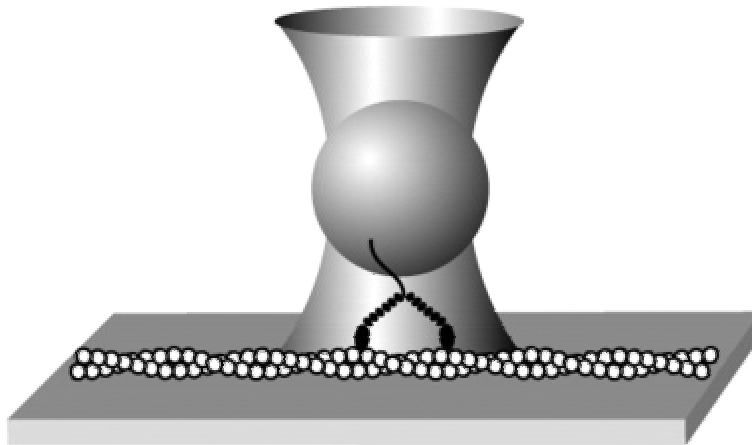
⇒ Der Fokus des Laserlichts wird  
entsprechend verschoben.

## Präparation der Beads

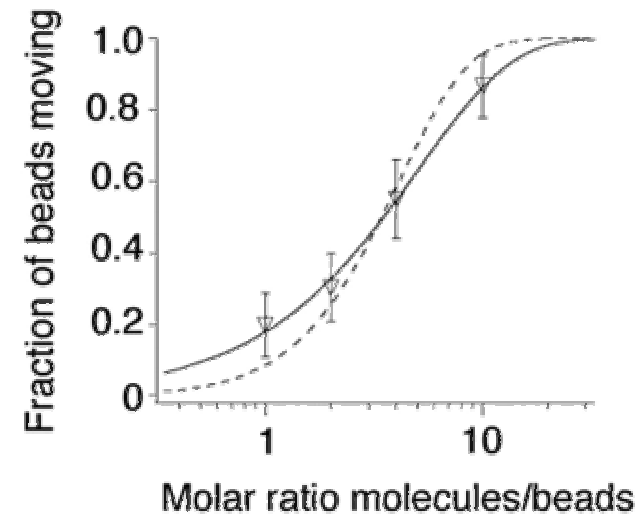
Beispiel: Myosin  
Rief et al. PNAS, 2000

- Bead (Polystyrol):  $\varnothing$  356 nm
- Kugel mit BSA überzogen („Preblocked“)
- Zugabe des zu untersuchenden Moleküls in geringen Konzentrationen

**A**



**B**



**zu B**

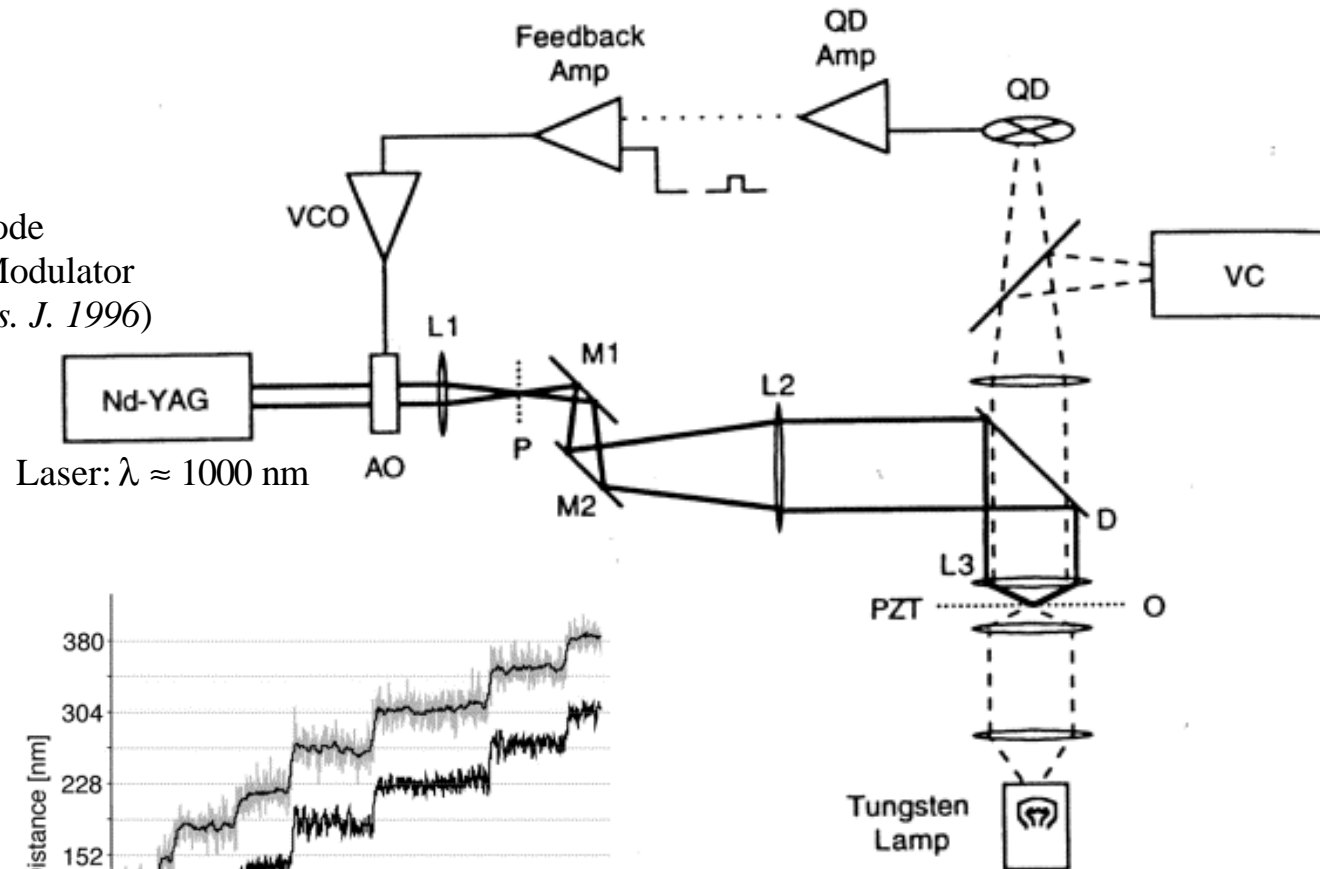
Die Wahrscheinlichkeit (Poisson-Verteilung), dass ein oder mehrere Motormoleküle die Kugel bewegen ist gegeben durch:  $1 - \exp(-I f)$  mit  $f = n$  Motormolek./  $n$  beads;  $I$ : Fitparameter.

Bestes Model (durchgezogene Linie in **B**) mit  $f = 1$  (d.h. eine Motor pro Kugel) und

$\lambda = 0.2$  (eins von 5 Motormolekülen ist funktionsfähig und bindet); gestrichelte Linie:  $f = 2$

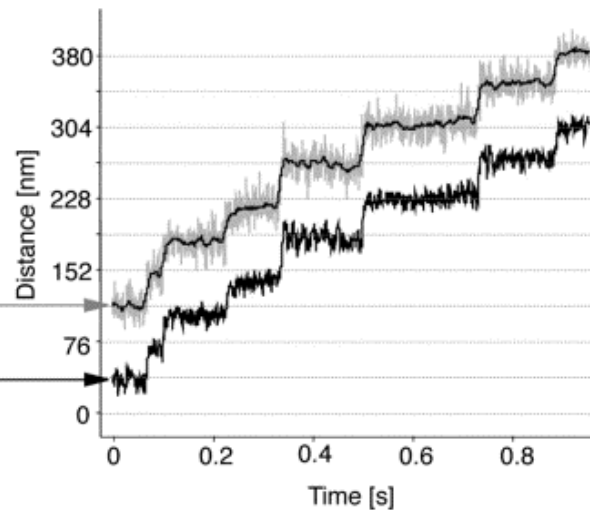
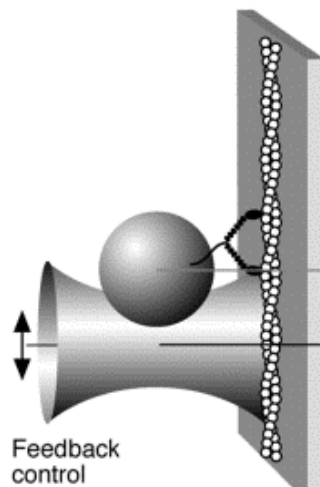
# Der optische Aufbau einer Laserpinzette

- : Licht der Laserpinzette (Laser)
  - : Beobachtungslight (Lampe)
  - M: Spiegel
  - L: Linsen
  - D: dichroitischer Filter
  - O: Probenebene
  - VC: Videokamera
  - QD: Quadrant Photodiode
  - AO: Akustooptischer Modulator
- (Simmons et al, Biophys. J. 1996)



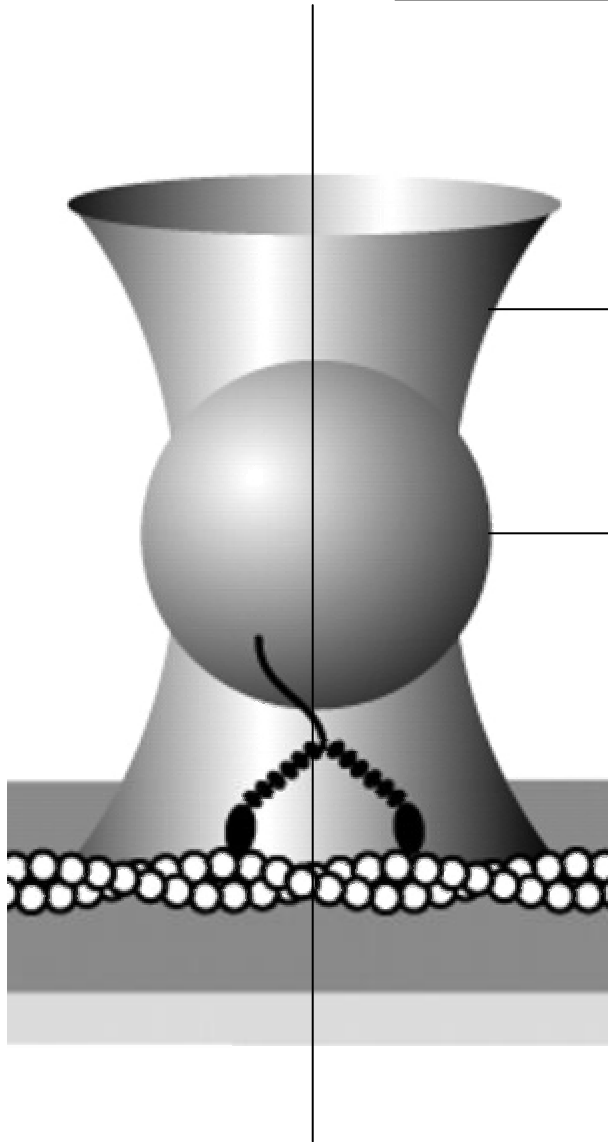
## Beispiel einer Messung

Rief et al. PNAS ,2000



**Ortsauflösung:** Nanometer  
**Kraftmessungen** im Bereich von Piconewton

## Mechanische Messungen mit der Laserpinzette



**Analogie: Laserfalle  $\hat{U}$  mechanische Feder**  
Krümmung gibt die „Federsteifheit“ (Stiffness) der Laserfalle wider.

**Bewegung der Kugel aus dem Zentrum der Laserfalle:**

- Brown'sche Molekularbewegung
- andere Zugkräfte an der Kugel (z.B. Motormolekülbewegung)

**Parameter mit Einfluß auf die Stiffness**

- Leistung des Laserlichts
- Größe der Kugel
- Brechungsindices

→ **Federkraft:**

$$F = -D \cdot x$$

*D: Federkonstante*

**Bestimmung der Stiffness über Energieerhaltung:**

$$\frac{1}{2} D x^2 = \frac{1}{2} k_B T$$

$$D \sim 50 \text{ pN}/\mu\text{m}$$