Biophysik

Einleitung

Was ist Biophysik?

Das Verstehen der Lebensprozesse in Raum und Zeit.

Die Biophysik ist interdisziplinär ausgerichtet. Richard Feynman drückt dies in ´The Feynman Lectures on Physics´ (Vol.I, Chapter 35) so aus: ´... the full appreciation of natural phenomena, as we see them, must go beyond physics in the usual sense. We make no apologies for making these excursions into other fields, because the separation of fields, as we have emphasized, is merely a human convenience, and an unnatural thing. Nature is not interested in our separations, and many of the interesting phenomena bridge the gaps between fields.´

Teildisziplinien der Biophysik sind u.a.:

- Molekulare Biophysik
- Zellbiophysik
- Neurobiophysik
- Biomechanik
- Kybernetik
- Evolution
- Strahlenbiophysik

Im Rahmen dieser Vorlesung steht die Molekulare Biophysik im Vordergrund.
Biomoleküle stellen die Basis lebender Systeme dar. Sie speichern Information und sorgen für ihre Weitergabe. Sie führen viele verschiedene Prozesse durch, z.B. die Katalyse oder den Transport von Energie, Ladung und Materie. Die Kenntnis der Struktur und Funktion von Biomolekülen ist für viele Fachgebiete, z.B. Biologie, Biochemie, Biophysik, Medizin oder Pharmakologie von zentraler Bedeutung.

Nützliche Bücher zur Begleitung der Vorlesung:

- Linus Pauling
  The Chemical Bond
  Cornell University Press, Ithaka, New York 1967

- Lubert Stryer
  Biochemistry
  W.H. Freeman and Co., New York 1988

- Charles R. Cantor, Paul R. Schimmel
  Biophysical Chemistry, Parts I, II and III.
  W.H. Freeman and Co., New York 1988

- Richard E. Dickerson, Irving Geis
  The Structure and Action of Proteins
  Benjamin/Cummings Publishing Co., 1969

- Hoppe, Lohmann, Markl, Ziegler
  Biophysik
  Springer, Berlin, 1982

- Daune, Michel
  Molekulare Biophysik
  Vieweg, 1997

- Philip Nelson
  Biological Physics
  W.H. Freeman and Co., New York, 2004

- Igor N. Serdyuk, Nathan, R. Zaccai, Joseph Zaccai
  Methods in Molecular Biophysics
  Cambridge University Press, Cambridge, 2007

Lehrveranstaltungen der Abteilung Biophysik:

Biophysik I (3 SWS)
Biophysik II (3 SWS)
Hauptseminar (Blockseminar)
Praktikum

Das Biophysikpraktikum wird als Blockpraktikum abgehalten und umfasst unter anderem folgende Versuche:

Biomoleküle: Blitzphotolyse, Photosynthese, Enzymkatalyse, Gentechnologie, DNA-Interkalation, Lipidvesikel

Systeme/Zellen: Pigmentantennen, Ionenpore, Nervenimpuls

Organe/Organismen: Chemotaxis, Kybernetik, Wahrnehmung, Kontrastübertragung

Die Hierarchie lebender Systeme

Abb. 1 zeigt Systeme, deren Komplexität mit der Anzahl der Atome zunimmt, wobei sich die Systeme untereinander klar unterscheiden lassen.

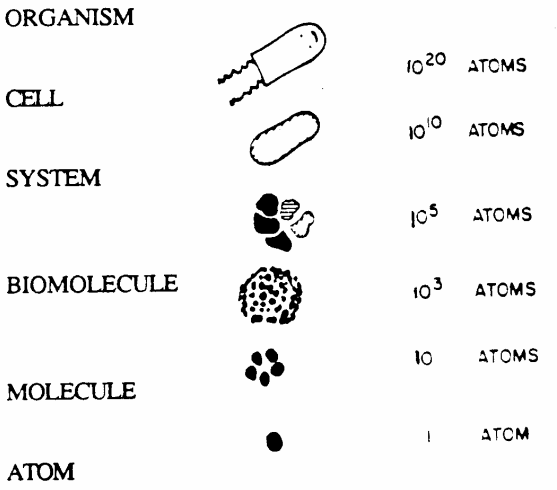


Abb. 1: Verschiedene Systeme mit typischer Atomanzahl.

Lebende Systeme sind hierarchisch aufgebaut (Abb. 2). Mit jeder neuen Organisationsstufe steigt die Komplexität der ablaufenden Prozesse. Es ist momentan nicht möglich, die Lebensvorgänge eines Organismus gänzlich auf der Basis atomarer Wechselwirkungen zu verstehen. Daher wird auf allen Ebenen der Hierarchie geforscht, und es wird schrittweise vorgegangen. Auf jeder neuen Organisationsstufe kommen neue Phänomene hinzu, die bei weniger komplexen Systemen nicht auftreten. Einige Beispiele für typische physikalische Prozesse sind in Abb. 3 aufgelistet.

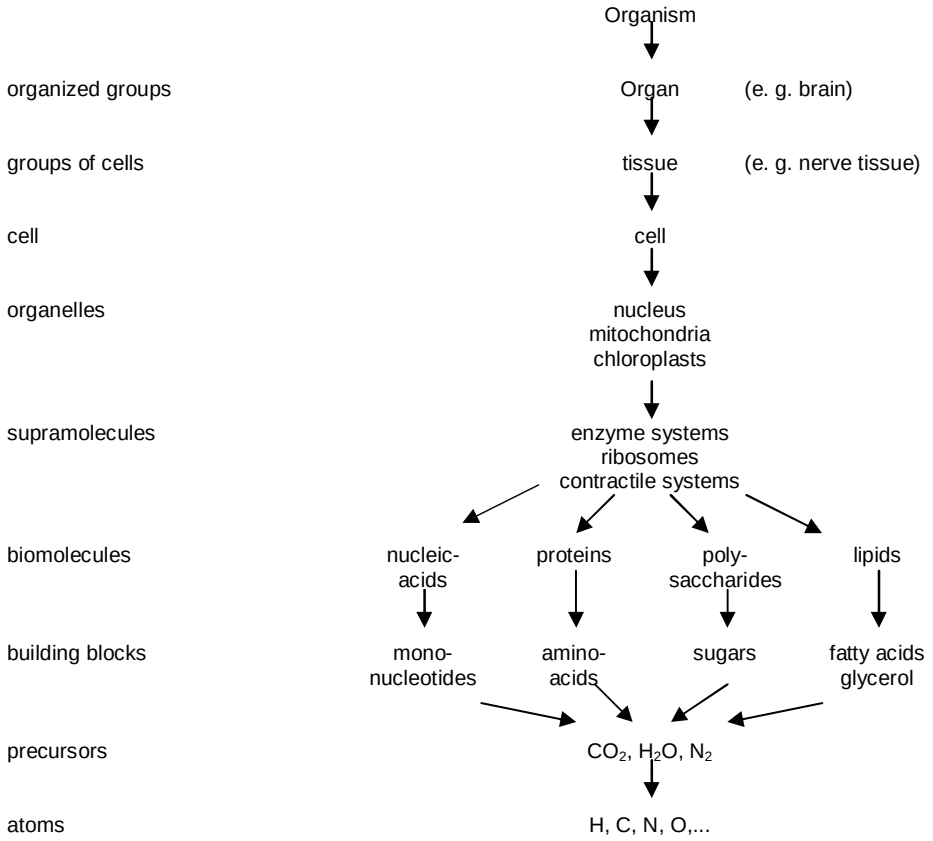


Abb. 2: Die Hierarchie lebender Systeme.

Atom	Quantum mechanics
Diatomic molecule	Vibrations and rotations
Polyatomic molecule	Molecular chirality, radiationless transitions
Macromolecules	Conformations, phase transitions, tunneling, phonons, solitons, catalysis
Macromolecular complexes	Collective modes, cooperative phenomena, multiple excitations.

Abb. 3: Verschiedene Systeme und charakteristische Phänomene.

Information und Konstruktion

In lebenden Systemen ist die Information gespeichert, mit der es möglich ist, neue Teile hervorzubringen. Sie reproduzieren sich selbst. Beim Lesen und Weiterleiten der Information ist eine große Anzahl von Komponenten involviert, und es existieren viele Rückkopplungsmechanismen. Die Informationskapazität $N_{\lambda\nu}$ eines Systems ist

$$N_{\lambda\nu} = \lambda^{\nu}.$$

Hier ist λ die Basis, z.B. die Anzahl der Buchstaben eines Alphabets, und ν die Anzahl der Informationseinheiten, z.B. die Anzahl der Buchstaben eines Wortes.
Die folgende Tabelle zeigt $N_{\lambda\nu}$ für ein Wort mit vier Buchstaben, ein kleines Protein (bestehend aus 100 Aminosäuren) und eine Nukleinsäure (zusammengesetzt aus 10 Millionen Basen). Als Informationsgehalt bezeichnet man $\log_2 N_{\lambda\nu}$ (in Bits). Man beachte die enorme Anzahl von Möglichkeiten für eine relativ kurze Proteinsequenz von 100 Aminosäuren. Es existieren nicht genug Atome im Universum, um alle Kombinationen auch nur mit einem einzigen Exemplar zu realisieren.

Tab. 1: Informationskapazität verschiedener Systeme (Es existieren 20 Aminosäuren; 4 Basen bilden die DNA).

System	λ	ν	$N_{\lambda\nu}$	Bits
4-Buchst.-Wort	26	4	26^4	~ 18.8
Protein	20	100	20^{100}	~ 432
Nukleinsäure	4	10^7	4^{10^7}	~ 2 H 10^7

Abb. 4 zeigt schematisch die wichtigsten Komponenten, die bei der Informationsübertragung und der Konstruktion von Proteinen vorkommen. Der Fluss der Information geht üblicherweise von der DNA über die RNA zum Protein (zentrales Dogma):

$$DNA \xrightarrow{Transkription} RNA \xrightarrow{Translation} Protein$$

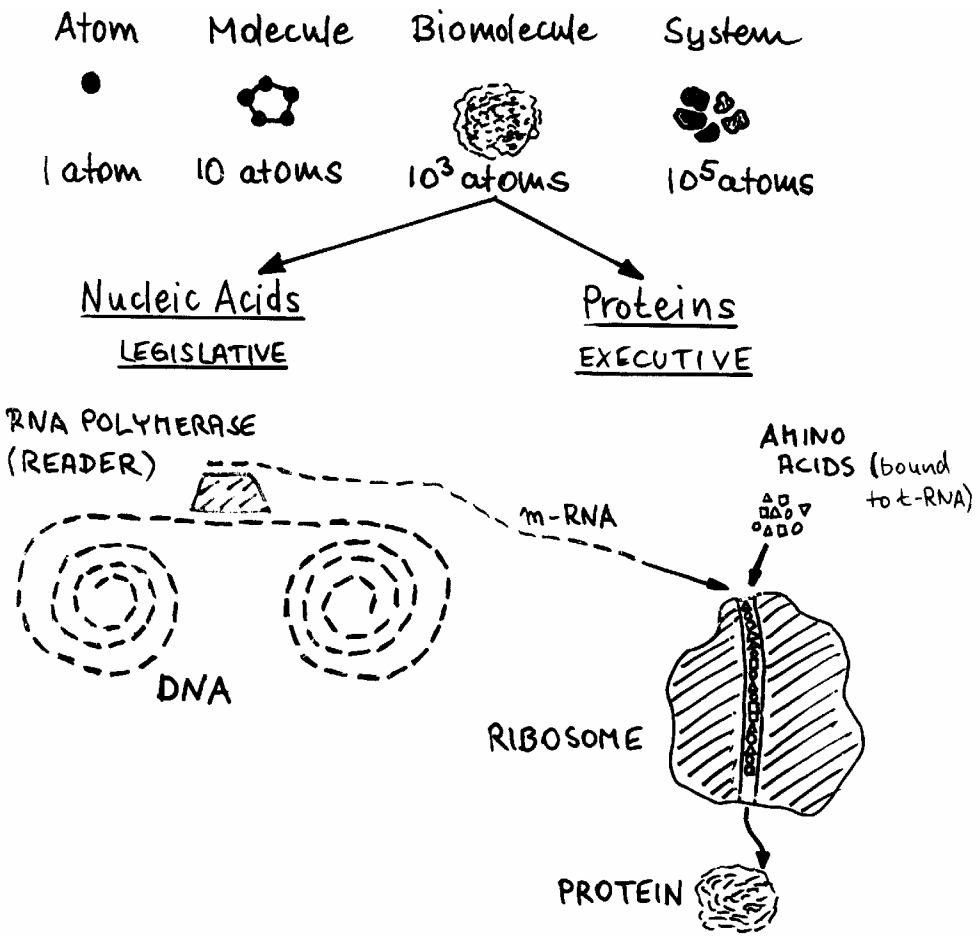


Abb. 4: Biomoleküle: Die Nukleinsäuren speichern und transportieren Information und übernehmen wichtige Funktionen bei der Produktion von Proteinen. Die Information ist in der DNA gespeichert und wird von der RNA transportiert.

Die RNA-Synthese mittels einer DNA-Matrize wird Transkription, die Synthese der Proteine mittels einer RNA-Matrize Translation genannt. Es existieren verschiedene RNA-Moleküle, z.B. die Messenger-RNA (mRNA), die ribosomale RNA (rRNA) oder die Transfer-RNA (tRNA). In den Ribosomen findet die Protein-Biosynthese statt. tRNA-Moleküle bringen die Aminosäuren zum Ribosom, wobei es für jede der 20 Aminosäuren eine spezifische tRNA gibt. Am Ribosom wird die in der mRNA gespeicherte Information abgelesen und eine entsprechende Kette von Aminosäuren synthetisiert.

Proteine

Proteine sind lineare Polymerketten, die aus Aminosäuren aufgebaut sind. Die Aminosäuren bestehen, wie in Abb. 5 dargestellt, aus einem Rückgrat und aus einer Seitenkette. Es existieren 20 verschiedene Seitenketten.

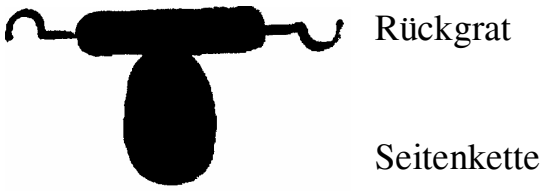


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Aminosäure.

Die Polymerkette enthält typischerweise 100 – 200 Aminosäuren. Diese Sequenz ist in der DNA abgespeichert. Sie stellt die **Primärstruktur** des Proteins dar (Abb. 6). Die Aminosäuren werden durch kovalente Bindungen zusammengehalten; somit ist die Kette bei Zimmertemperatur äußerst stabil.

Abb. 6: Primärstruktur eines Proteins.

Die **Sekundärstruktur** beschreibt die zumeist periodische, räumliche Anordnung der Aminosäuren (Abb. 7). Diese wird durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Beispiele für Sekundärstrukturen sind die α-Helix und das β-Faltblatt.

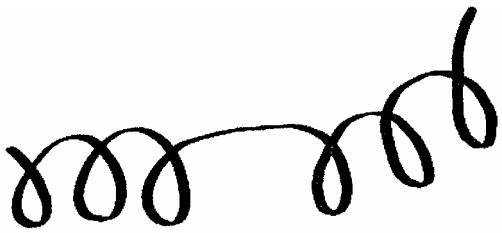


Abb. 7: Sekundärstruktur: Schematische Darstellung von α-Helices.

Unter der **Tertiärstruktur** wird die räumliche Anordnung von Aminosäuren verstanden, die in Bezug auf die lineare Sequenz weit voneinander entfernt liegen können. Abb. 8 zeigt die Tertiärstruktur von Myoglobin. Die 3-dimensionale Struktur wird durch die Sequenz der Aminosäuren bestimmt. Sie bildet sich spontan aus der von den Ribosomen erzeugten linearen Polypeptidkette. Die wichtigsten Kräfte sind dabei elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen und hydrophobe Wechsel-wirkungen. Die hydrophobe Wechselwirkung beschreibt die Neigung von unpolaren Molekülen, sich in Wasser zu größeren Aggregaten zusammenzuschließen. Ursache hierfür ist das Bestreben von Wassermolekülen, möglichst viele Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden (vgl. das Verhalten von Öltropfen in Wasser).

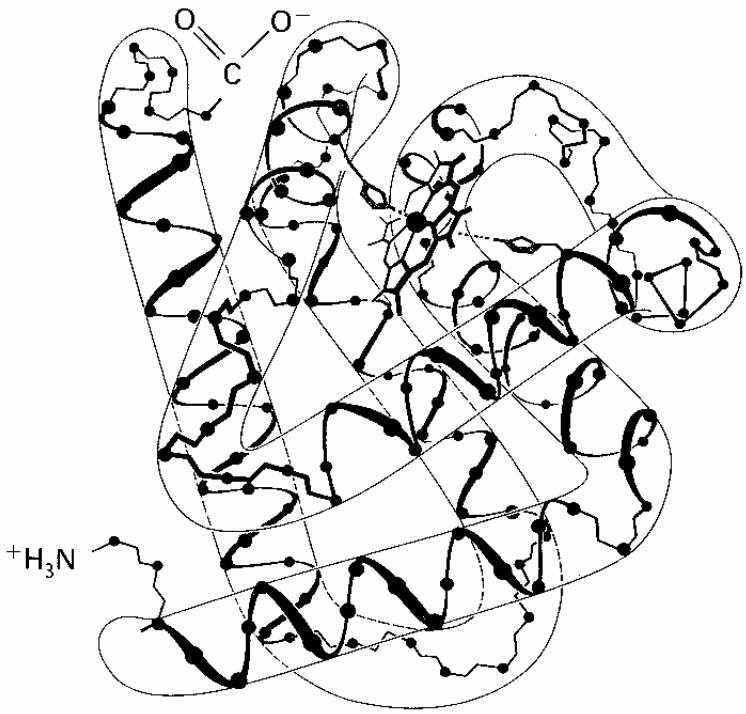


Abb. 8: Modell des Myoglobins. Es sind nur C_α - Atome eingezeichnet.

Die so gefalteten Proteine stellen Strukturen mit sehr dichter Konfiguration dar. Die Packungsdichte von Proteinen ist um 0.75 oder etwas darüber. Zum Vergleich dazu haben die dichteste Kugelpackung, die dichteste Zylinderpackung und ein homogener Festkörper Packungsdichten von 0.74, 0.91 und 1. Abb. 9 zeigt die Packungsdichte der Ribonuclease S der Bauchspeicheldrüse des Rindes.

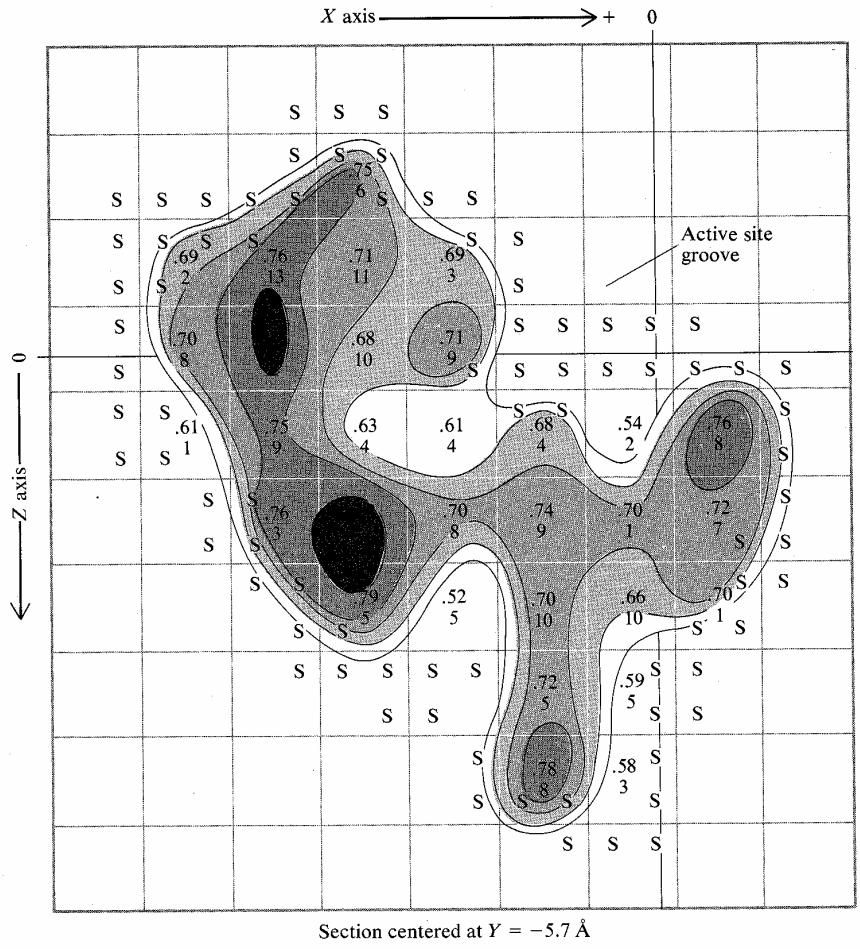


Abb. 9: Ein Schnitt durch das Zentrum der Ribonuclease S der Rinderbauchspeicheldrüse. Ein Gitter mit Kuben der Seitenlänge 5.6 Å ist über die Struktur gelegt. Für jeden Kubus ist die Zahl der Atome, die ihr Zentrum in diesem Kubus haben, sowie deren Packungsdichte aufgeführt. Eine hypothetische Schicht aus Molekülen des Lösungsmittels, die mit S bezeichnet sind, wurde zur Definition der Proteinoberfläche verwendet.

Proteine und Funktionen

Die folgende Liste zeigt und Beispiele von Proteinen mit ihren Funktionen.

Enzyme:	Lysozym
	Ribonuclease
	Alkohol Dehydrogenase
Speicherung:	Ferritin
	Albumin
Transport:	Hämoglobin
	Hämocyanin
Schutz:	Immunoglobuline

	Fibrinogen
Lichtspeicherung:	Rhodopsin Photosynthetisches Reaktionszentrum
Lichtproduktion:	Luciferase
Struktur:	Kollagen α-Keratin
Hormone:	Insulin

Die Peptidbindung

Proteine bestehen aus einer Kette von Aminosäuren, die 20 verschiedene Seitenketten R haben können. Eine Aminosäure ist aus einer Aminogruppe, einer Carboxylgruppe, einem Wasserstoffatom und einer Seitenkette (Rest) aufgebaut (Abb. 10). Sie sind alle an ein zentrales Kohlenstoffatom, das α-Kohlenstoffatom, C_α gebunden.

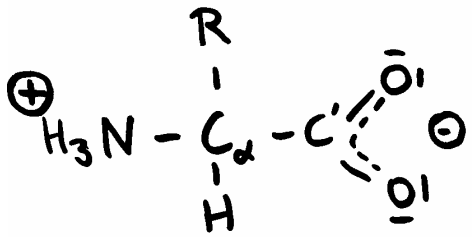


Abb. 10: Allgemeine Struktur einer Aminosäure.

Aminosäuren liegen bei neutralem pH-Wert als dipolare Ionen (Zwitterionen) vor: die Aminogruppe (NH_3^+) ist protoniert und die Carboxylgruppe dissoziiert (COO^-). Der zentrale Kohlenstoff C_α liegt in sp^3-Hybridisierung vor (Tetraeder mit Bindungswinkel $\theta = 109.47°$). Im Prinzip können Aminosäuren in zwei verschiedenen, spiegelbildlichen Konfigurationen (Enantiomere) auftreten: Diese werden als L- und D-Aminosäuren (von lat. laevus und dexter) bezeichnet (Abb. 11). In der Proteinbiosynthese werden aber nur L-Aminosäuren codiert.

Abb. 11: L- und D-Aminosäure.

Aminosäuren werden durch Peptidbindungen zu Polypeptidketten verknüpft. Abb. 12 zeigt die Bildung eines Dipeptids aus zwei Aminosäuren unter Abspaltung eines Wassermoleküls.

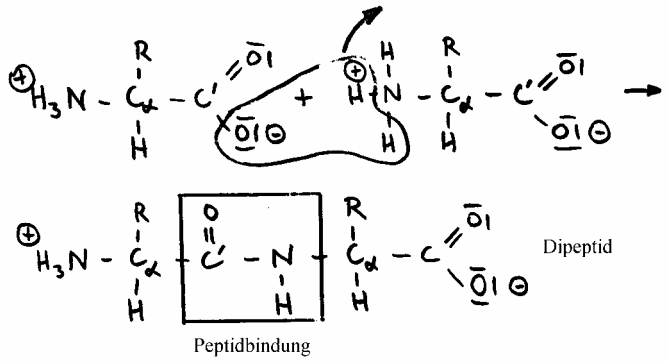


Abb. 12: Bildung einer Peptidbindung.

Die Peptideinheit ist starr und planar, wobei der Wasserstoff fast immer gegenständig – in trans-Position – zum Sauerstoff liegt. Die partielle Doppelbindung zwischen dem Kohlenstoff und dem Stickstoff der Peptidbindung verhindert eine Rotation um diese Bindung. Dieser partielle Doppelbindungscharakter kann aus den in Abb. 13 gezeigten Bindungslängen abgelesen werden.

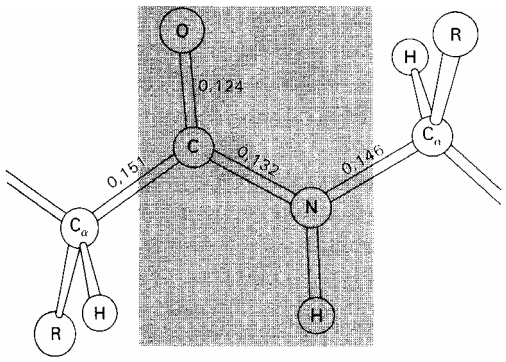


Abb. 13: Peptidgruppe mit Standardbindungslängen in Nanometern.

Die normale Länge einer N–C-Einfachbindung beträgt 0.147 nm, die einer N–C-Doppelbindung 0.127 nm. Die Bindungslänge in der Peptidgruppe (0.132 nm) ist also nicht viel größer als die der Doppelbindung. Die Energie zur Verdrehung der Bindung um den Winkel θ beträgt $E = 88 \sin^2 \theta$ [kJ/mol]. Im Gegensatz dazu sind die Bindungen beiderseits der starren Peptideinheit Einfachbindungen, die eine große Rotationsfreiheit besitzen. Der Winkel zwischen dem α-Kohlenstoffatom und dem Stickstoffatom wird φ, der zwischen dem α-Kohlenstoffatom und dem Carbonyl-C-Atom ψ genannt.

Die Peptidgruppe ist durch ein großes Dipolmoment $\vec{p}$ ausgezeichnet, (Abb. 14). Es beträgt 3.7 D (zum Vergleich dazu: das Dipolmoment von HCl ist 1.03 D).

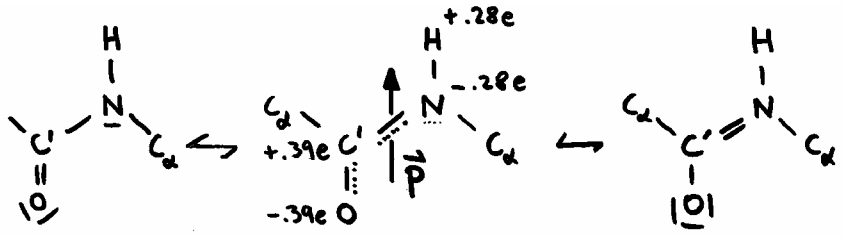


Abb. 14: Das Dipolmoment der Peptidgruppe.

Was kann aus dem Studium der Primärstruktur gelernt werden ?

- Die Position von wichtigen Sequenzgruppen (Sequenzhomologien deuten auf ähnliche Funktionen hin)
- Die Polarität der Proteine
- Die Vorhersage der Sekundärstruktur (werden Helices oder Faltblätter gebildet?)
- Die Vorhersage der Tertiärstruktur ist dagegen wesentlich schwieriger
- Die evolutionäre Entwicklung der Proteine

Die Evolution kann durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von Proteinen in verschiedenen Organismen untersucht werden. Dazu eignet sich das Elektrontransportprotein Cytochrom c, da es in allen aeroben Organismen vorkommt. Abb. 15 zeigt die Unterschiede der Aminosäuresequenzen und den daraus entwickelten Stammbaum für verschiedene Spezies.

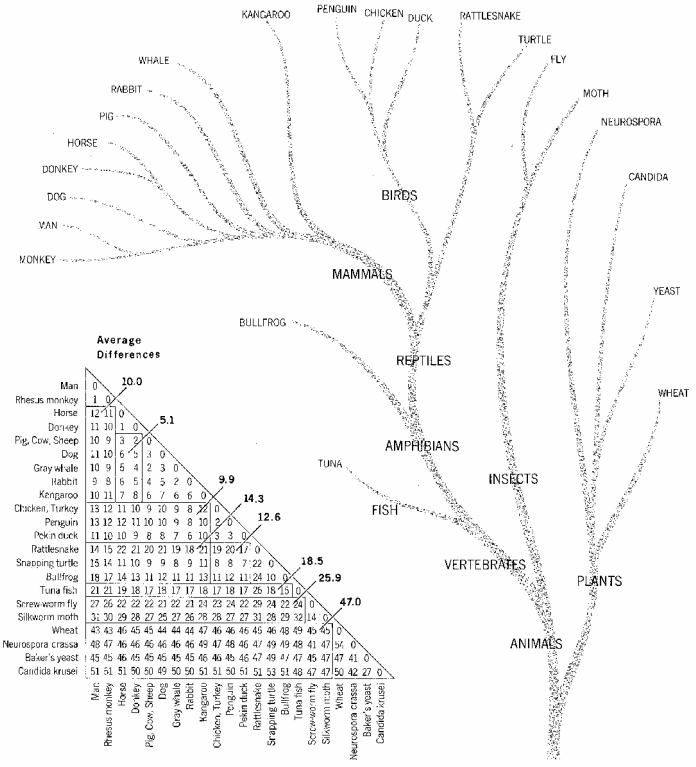


Abb. 15: Der Stammbaum des Cytochrom c. Die Unterschiede der Aminosäuresequenzen für verschiedene Spezies sind in der Tabelle aufgeführt. Daraus kann ein Stammbaum erzeugt werden.

Weitere Untersuchungen dieser Art zeigen, dass die Geschwindigkeit der Mutationen für verschiedene Proteine sehr unterschiedlich sein kann. Abb. 16 stellt die mittlere Zeit einer Mutation für eine von 100 Aminosäuren für Cytochrom c, Globine und Fibrinopeptide dar. Diese Unterschiede werden durch die verschiedenen Funktionen der Proteine verursacht. Cytochrom c dockt an andere Makromoleküle an; daher sind viele Mutationen für sein Funktionieren nicht tolerierbar. Da Globine nur mit kleinen Molekülen in Wechselwirkung treten, ist eine die Funktion nicht zerstörende Mutation wahrscheinlicher. Die Fibrinopeptide spielen bei der Blutgerinnung eine Rolle. Sie bestehen aus etwa 20 Aminosäuren, die aus dem Fibrinogen enzymatisch herausgeschnitten werden, um es in das bei der Blutgerinnung aktive Fibrin zu überführen. Dabei ist die Sequenz der Aminosäuren der Fibrinopeptide relativ unkritisch.

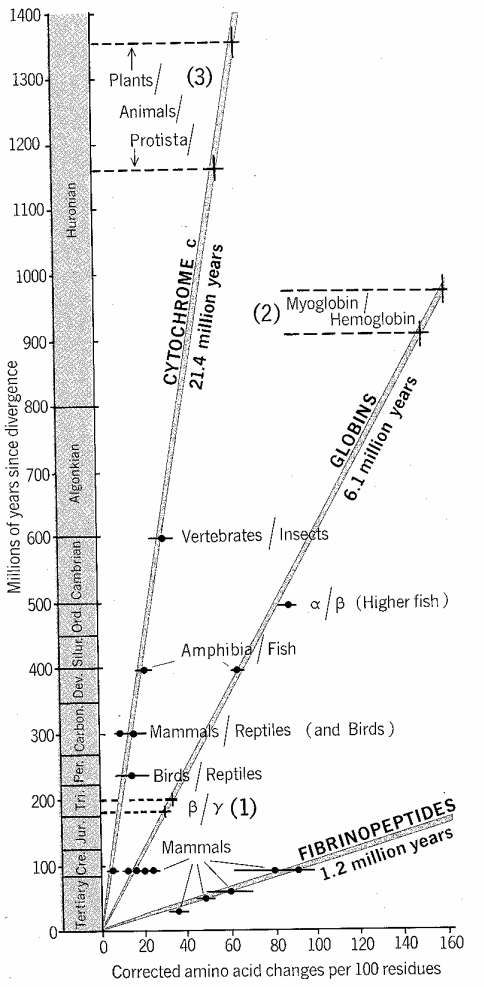


Abb. 16: Durchschnittliche Sequenzveränderung dreier Proteine, die verschiedene Funktionen aufweisen, in Abhängigkeit von der Zeit.

Mutationsraten – Korrektur für Mehrfachmutationen

Wird das Auftreten einer Aminosäuremodifikation beobachtet, so kann diese durch mehrere aufeinander folgende Mutationen zustande gekommen sein. Aufgrund ihres Zufallscharakters kann die tatsächliche Mutationsrate aus der Poissonstatistik abgeleitet werden. Die Wahrscheinlichkeit für keine Mutation in einem Zeitintervall sei *k* und die für eine Mutation

kM. Dann folgt für die Wahrscheinlichkeit für zweifache Mutation $kM^2/2!$ (man beachte, dass zuerst Mutation a und dann Mutation b und umgekehrt auftreten kann). Da die Summe der Wahrscheinlichkeiten eins ergeben muss, folgt:

$$1 = \sum_{n=0}^{\infty} P_n = k(1 + M + \frac{M^2}{2!} + \frac{M^3}{3!}\ldots) = ke^M \qquad \Rightarrow \qquad k = e^{-M}$$

$$P_n = \frac{M^n}{n!} e^{-M} \quad . \qquad \text{(Poisson-Prozess!)}$$

Für die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens eine Mutation stattgefunden hat, gilt $N = 1 - P_0 = 1 - e^{-M}$. Für die tatsächliche Mutationsrate erhält man $M = -\ln(1 - N)$.

Die 20 Aminosäuren

Abb. 17 zeigt die Strukturformeln der 20 Aminosäuren.

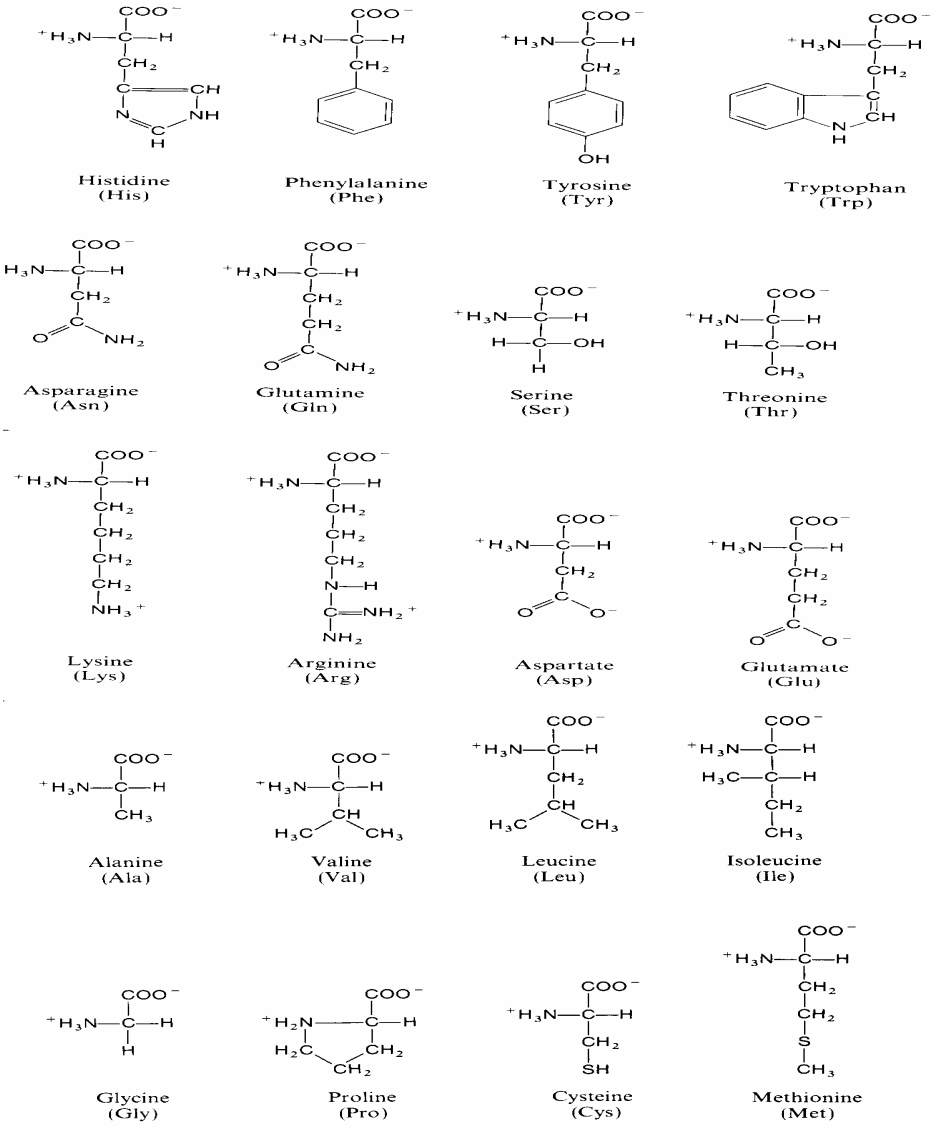


Abb. 17: Die Strukturen der 20 Aminosäuren bei einem pH von 7. Alle sind in Projektion auf eine Ebene, die den α-Kohlenstoff enthält, dargestellt. In natura sind die Aminogruppe bzw. der Wasserstoff oberhalb und die Carboxylgruppe bzw. die Seitenkette unterhalb der Blattebene angeordnet.

Es ist nützlich, die Aminosäuren in Gruppen einzuteilen. Man unterscheidet Aminosäuren mit aromatischen, unpolaren sowie polaren Seitenketten, wobei letztere auch Ladung tragen können. Bei pH 7 sind Asp und Glu negativ, Lys und Arg positiv geladen. Eine Klassifizierung aufgrund der Polarität wird im nächsten Abschnitt besprochen.

Polarität der Seitenketten

Unpolare Seitenketten haben, gemäß dem Prinzip ´Gleiches löst Gleiches´, eine geringe Löslichkeit in Wasser. Hierzu gehören Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Trp und Met. Eine große Löslichkeit haben neben den bereits erwähnten geladenen Seitenketten auch Asn, Gln, Ser und Thr. Bei den anderen Aminosäuren ist die Einteilung schwieriger. Es muss auch berücksichtigt werden, dass bei der Untersuchung von Proteinen die Aminosäuren als Teil eines Polypeptids und nicht als einzelne Aminosäuren (Zwitterionen) vorliegen. Außerdem ist die Löslichkeit eines Festkörpers in Wasser ein Gleichgewichtsprozess. Sie wird sowohl durch die Affinität des zu lösenden Stoffes zu Wasser (die uns interessierende Größe) als auch durch die Anziehung im Kristall des zu lösenden Stoffes gegeben.
Charles Tanford hat eine Methode entwickelt, um die Polarität von Aminosäuren zu bestimmen. Er verglich die Löslichkeit von Aminosäuren in Wasser (polares Lösungsmittel) und in Ethanol (schwach polar). Da die gleiche kristalline Referenz für beide Messungen vorliegt, kann die freie Energie ΔG_t für den Übergang eines Mols des zu lösenden Stoffes von Ethanol zu Wasser berechnet werden. Diese hängt außer von der Seitenkette noch von der geladenen Amino- und Carbonylgruppe ab. Tanford hat Glycin als Standard gewählt, um eine seitenkettenfreie Aminosäure darzustellen. Man erhält für Glycin $\Delta G_t = -19.4$ kJ/mol (d.h. Glycin würde spontan von Ethanol zu Wasser übergehen, falls ein entsprechendes Experiment durchgeführt werden könnte). ΔG_t für die anderen Seitenketten wird nun aus der Differenz von ΔG_t für Glycin und von ΔG_t für die betrachtete Aminosäure berechnet. Für Phenylalanin ergibt sich $\Delta G_t = -8.3$ kJ/mol, da es weniger polar ist. Für die Seitenkette von Phe allein erhält man also $\Delta G_t = 11.1$ kJ/mol. Die freie Energie des Transfers ist positiv. Eine solche Seitenkette wird versuchen, sich im Innern eines gefalteten Proteins aufzuhalten. Dies ist eine Manifestation der bereits erwähnten hydrophoben Kraft. Diese Hydrophobizität kann auch zur Klassifizierung von Aminosäuren verwendet werden:

unpolar	polar	geladen (bei pH 7)		
Trp	Pro	Asp (–)		
Ile	Ser	Glu (–)		
Tyr	Thr	Lys (+)		
Phe	Asn	Arg (+)	⇑	steigende Hydrophobizität
Leu	Gln			
Val				
Met				
Cys				
Ala				
Gly				

Die mittlere Hydrophobizität eines Proteins H_Φ kann aus den freien Energien seiner Aminosäuren wie folgt berechnet werden:

$$H_{\Phi} = \sum_i G_{ti}\chi_i \ .$$

Hier ist G_{ti} die freie Energie für den Transfer der Aminosäure i und χ_i der Molenbruch dieser Aminosäure. Allerdings funktioniert diese Methode nicht gut, um Proteine zu charakterisieren. Die folgende Definition zeigt bessere Ergebnisse,

$$R = \frac{\sum_k \chi_k}{\sum_i \chi_i} \ .$$

Der Zähler entspricht der Summation über die polaren Aminosäuren und der Nenner der Summation über die unpolaren.

Für diese Berechnungen müssen die Sequenzen der Proteine bekannt sein. Abb. 18 zeigt Molenbrüche der Aminosäuren für 5 ausgewählte Proteine. Aus diesen Daten kann man sehen, dass die individuelle Aminosäurenzusammensetzung deutlich unterschiedlich sein kann. Allgemein kann man sagen, dass Met und Trp selten vorkommen, während Ala und Leu eher häufig sind. Die Aminosäurenzusammensetzung hängt mit der Funktion zusammen und erlaubt gewisse Schlüsse. Man sieht zum Beispiel, dass das Histon H3 relativ viel von den positiv geladenen Lys und Arg Aminosäuren enthält. Die Funktion der Histone ist die Komplexierung der DNA in Chromatin. Dazu sind positive Ladungen notwendig, um die negativen Ladungen der Phosphate zu stabilisieren. Collagen, das dritte Beispiel, hat eine Dreifach-Helix-Struktur, zu deren Ausbildung Pro- bzw. Gly-reiche Sequenzen notwendig sind. Das letzte Beispiel ist das Bakteriorhodopsin aus der Purpurmembran eines halophilen Bakteriums. Als typischer Repräsentant eines integralen Membranproteins enthält es relativ wenige polare bzw. geladene Aminosäuren.

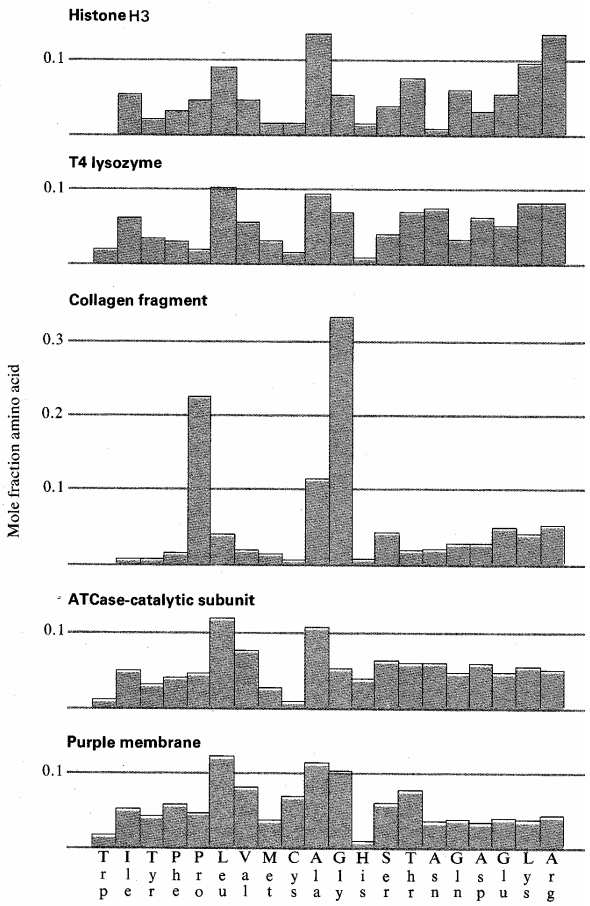


Abb. 18: Der Anteil der verschiedenen Aminosäuren von 5 Proteinen.

Säure- und Baseneigenschaften von Aminosäuren

Für die Stabilität und Funktion von Proteinen sind die Säure- und Baseneigenschaften der Aminosäuren sehr wichtig. Aminosäuren können sowohl als Säuren als auch als Basen fungieren.
Es folgen ein paar grundlegende Definitionen: Die Säure ist ein Protonendonor und die Base ein Protonenakzeptor. Für den Gleichgewichts-Dissoziationskoeffizienten K gilt z.B. bei der Ionisation des Wassers ($H_2O \Leftrightarrow OH^- + H^+$),

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \quad .$$

Der pH-Wert ist über die Konzentration der Wasserstoffionen definiert: pH = $-\log[H^+]$. In reinem Wasser ist der pH-Wert 7. In Säuren ist er kleiner, in Basen größer als 7. Analog wird der Gleichgewichtskoeffizient für Dissoziation bei Säuren definiert ($AH \Leftrightarrow A^- + H^+$),

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[AH]} \quad .$$

Beachte, dass der Bruch die Konzentrationen von Edukten und Produkten im Gleichgewicht enthält. Der pK-Wert einer Säure ist analog zum pH-Wert definiert: pK = $-\log$ K. Wenn eine Säure zur Hälfte dissoziiert ($[AH]=[A^-]$) ist, ist der pH-Wert gleich dem pK-Wert. Der allgemeine Zusammenhang ist durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung gegeben,

$$pH = pK - \log\frac{[AH]}{[A^-]} \quad .$$

Für die Gibbs'sche freie Reaktionsenthalpie der Dissoziation gilt (R: Gaskonstante, T: Temperatur in Kelvin),

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad .$$

Hier bezieht sich die freie Enthalpie auf den Standardzustand (z.B. 1 M). Für beliebige Konzentrationen haben wir

$$\Delta G_{ioniz} = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[H^+][A^-]}{[AH]} \quad .$$

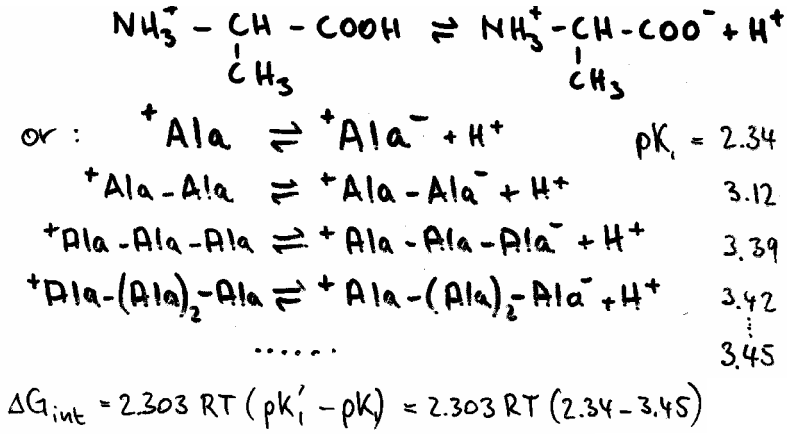
Im Gleichgewicht ist $\Delta G_{ioniz} = 0$. Für eine zusätzliche Wechselwirkung ΔG_{int} (z.B. ist bei Biomolekülen die Ionisation einer Gruppe oft an eine andere Gruppe gekoppelt) folgt:

$$\Delta G_{tot} = \Delta G_{\text{int}} + \Delta G_{ioniz} = \Delta G_{\text{int}} + RT \ln \frac{[H^+][A^-]}{[AH]} + \Delta G^o \quad .$$

Da im Gleichgewicht $\Delta G_{tot} = 0$ ist, gilt

$$pK = \frac{\Delta G^0 + \Delta G_{\text{int}}}{2.303RT} \quad .$$

Dieses Ergebnis wird nun verwendet werden, um die elektrostatischen Wechselwirkungen der COO^- und der NH_3^+ - Gruppen in Alanin zu untersuchen.



Der pK_1 von Alanin ist 2.34. Bei der Deprotonierung entsteht eine negative Ladung in der Nähe der positiv geladenen Aminogruppe. Beide Ladungen stabilisieren sich gegenseitig aufgrund von elektrostatischer Anziehung. Betrachtet man ein Alanin-Dimer oder Trimer, sind diese Ladungen weiter voneinander separiert, und damit ist die Wechselwirkung geringer. Daher ist die deprotonierte Form energetisch weniger günstig, die protonierte Form wird bevorzugt. Dies ist aus dem Ansteigen des pK_1-Wertes mit der Kettenlänge ersichtlich. Aus der Änderung dieses Wertes um 1.11 pH-Einheiten im Vergleich von Alanin mit einer langen Polyalaninkette ergibt sich eine elektrostatische Stabilisierungsenergie im Monomer von 6.4 kJ/mol. Abb. 19 und Abb. 20 zeigen die Titrationskurven verschiedener Aminosäuren.

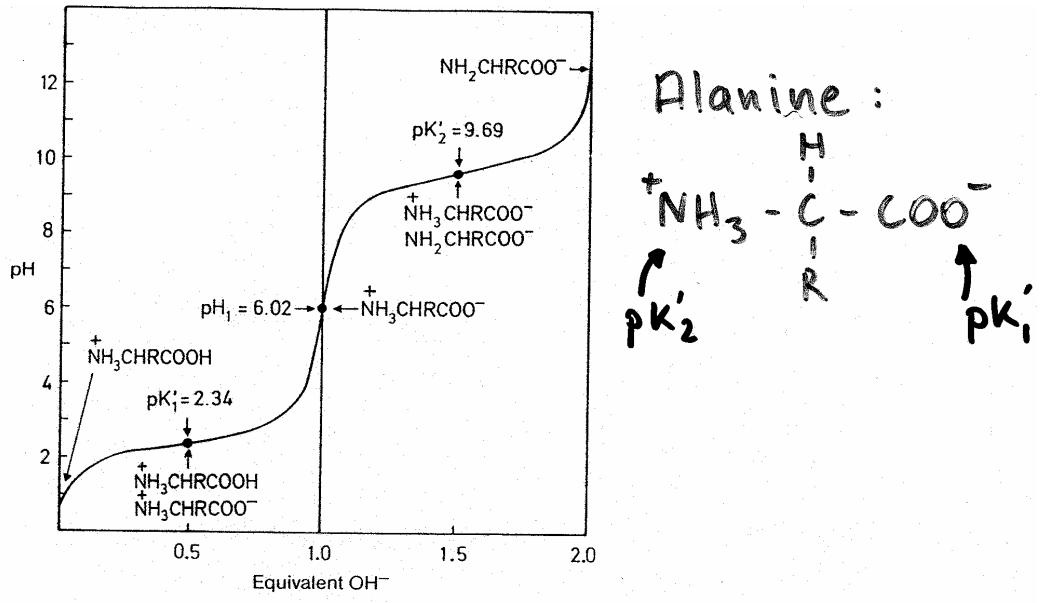


Abb. 19: Titrationskurve für Alanin ($R=CH_3$). An den Wendepunkten ist die vorherrschende ionische Form angegeben.

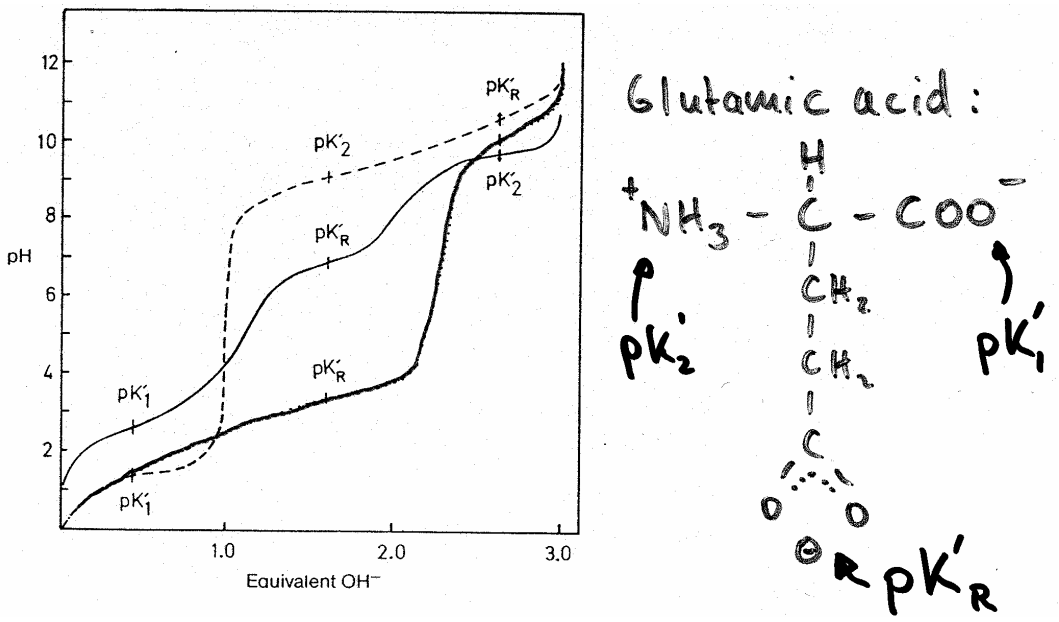
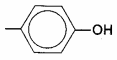


Abb. 20: Titrationskurve von Glutaminsäure (dick durchgezogen), Histidin (durchgezogen) und Lysin (gestrichelt).

Die pK-Werte ionisierbarer Gruppen in Aminosäuren sind in Abb. 21 aufgeführt.

Amino acid	α-COOH	α-NH_3^+	Side chain	pK_a in amino acid	Expected pK_a in a protein
Alanine	2.3	9.9	—	—	—
Arginine	1.8	9.0	—NH—C(=NH_2^+)—NH_2	12.5	⩾12
Asparagine	2.0	8.8	—	—	—
Aspartic acid	2.0	10.0	—COOH	3.9	4.4–4.6
Cysteine	1.8	10.8	—SH	8.3	8.5–8.8
Glutamic acid	2.2	9.7	—COOH	4.3	4.4–4.6
Glutamine	2.2	9.1	—	—	—
Glycine	2.4	9.8	—	—	—
Histidine	1.8	9.2		6.0	6.5–7.0
Isoleucine	2.4	9.7	—	—	—
Leucine	2.4	9.6	—	—	—
Lysine	2.2	9.2	—NH_3^+	10.8	10.0–10.2
Methionine	2.3	9.2	—	—	—
Phenylalanine	1.8	9.1	—	—	—
Proline	2.0	10.6	—	—	—
Serine	2.1	9.2	—	—	—
Threonine	2.6	10.4	—	—	—
Tryptophan	2.4	9.4	—	—	—
Tyrosine	2.2	9.1		10.9	9.6–10.0
Valine	2.3	9.6	—	—	—

NOTE: The pK_a values in most cases are at 25°C. The expected pK_a values in proteins are determined from model compounds in which titration of side chains is decoupled from charge effects of α-substituents.

Abb. 21: pK-Werte der Aminosäuren.

Sekundärstruktur

Die Hauptkette ist, wie bereits erwähnt, um die Peptideinheit über die Winkel φ und ψ frei drehbar. Die Konformation der Hauptkette ist vollständig festgelegt, wenn φ und ψ für den Rest der Kette definiert sind. Sie können aber nicht jeden beliebigen Wert annehmen, wie Abb. 22 zeigt. Es ist zu beachten, dass diese Einschränkung nur lokal ist, es ist keine Kopplung zwischen den φ- und ψ-Winkeln zweier benachbarter Aminosäuren vorhanden. Dies gilt allerdings nicht für Prolin.

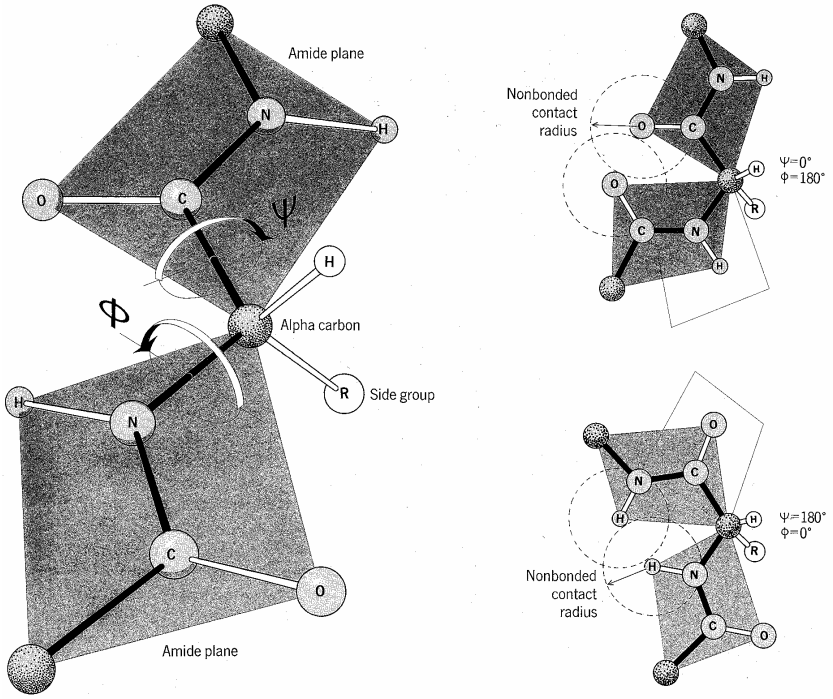


Abb. 22: Zwei Peptideinheiten sind über Tetraederbindungen miteinander verbunden. Rotationen um die Winkel φ und ψ sind möglich. Für $\varphi = \psi = 0$ sind die beiden Peptideinheiten kollinear (linke Abbildung). Es sind aber nicht alle Winkelwerte erlaubt, da die Atome sich zu nahe kommen würden (rechte Abbildungen).

Eine Rotation um $\varphi = 120°$ entfernt den Carbonyl-Sauerstoff so weit wie möglich von der Seitenkette (Abb. 23).

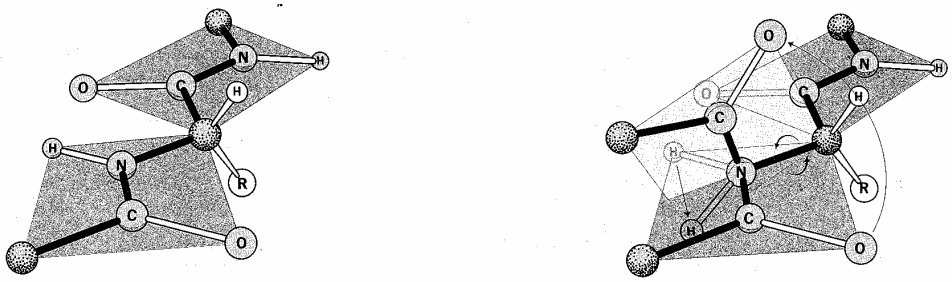


Abb. 23: Rotation von $\varphi = 120°$.

Falls die Drehung bei jedem α-Kohlenstoff dieselbe ist, so erhält man eine Helix. Eine Helix mit sich wiederholenden Einheiten kann durch die Anzahl der Einheiten pro Drehung *n* und durch die Distanz *d*, die pro Einheit in Richtung der Helixachse zurückgelegt wird, beschrieben werden. Das Produkt *n d* ist die Steighöhe *p* der Helix (Abb. 24).

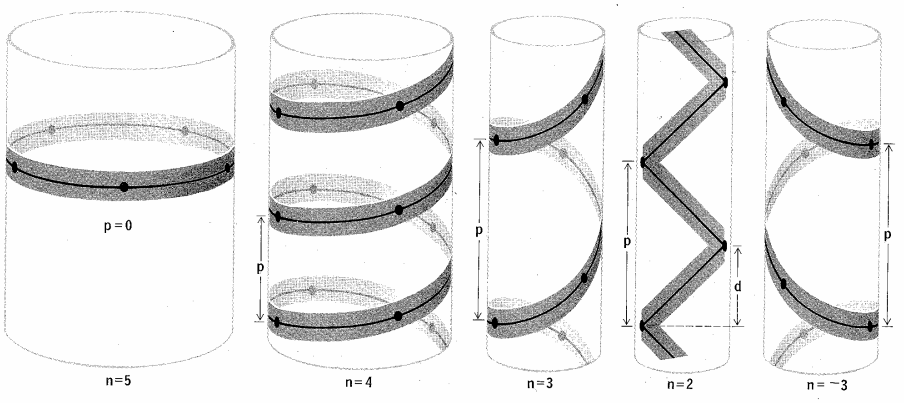


Abb. 24: Helices mit verschiedenen n, d, p.

Abb. 25 zeigt die Änderung der Anzahl der Einheiten pro Drehung (*n*) unter Variation von φ und ψ. In diesem sogenannten **Ramachandran-Plot** sind die erlaubten Werte für φ und ψ eingetragen (weißes Gebiet). Diese werden mit Hilfe von Modell- und Computerrechnungen und den Radien der Atome ermittelt. Werden diese Radien ein wenig kleiner gewählt (entsprechend den kleinsten Radien, die in Kristallen beobachtet werden), so erhält man zusätzlich die hellgrauen Gebiete. Der oben schon erwähnte Winkel $\varphi = 120°$ ist besonders günstig für die Ausbildung stabiler Strukturen.

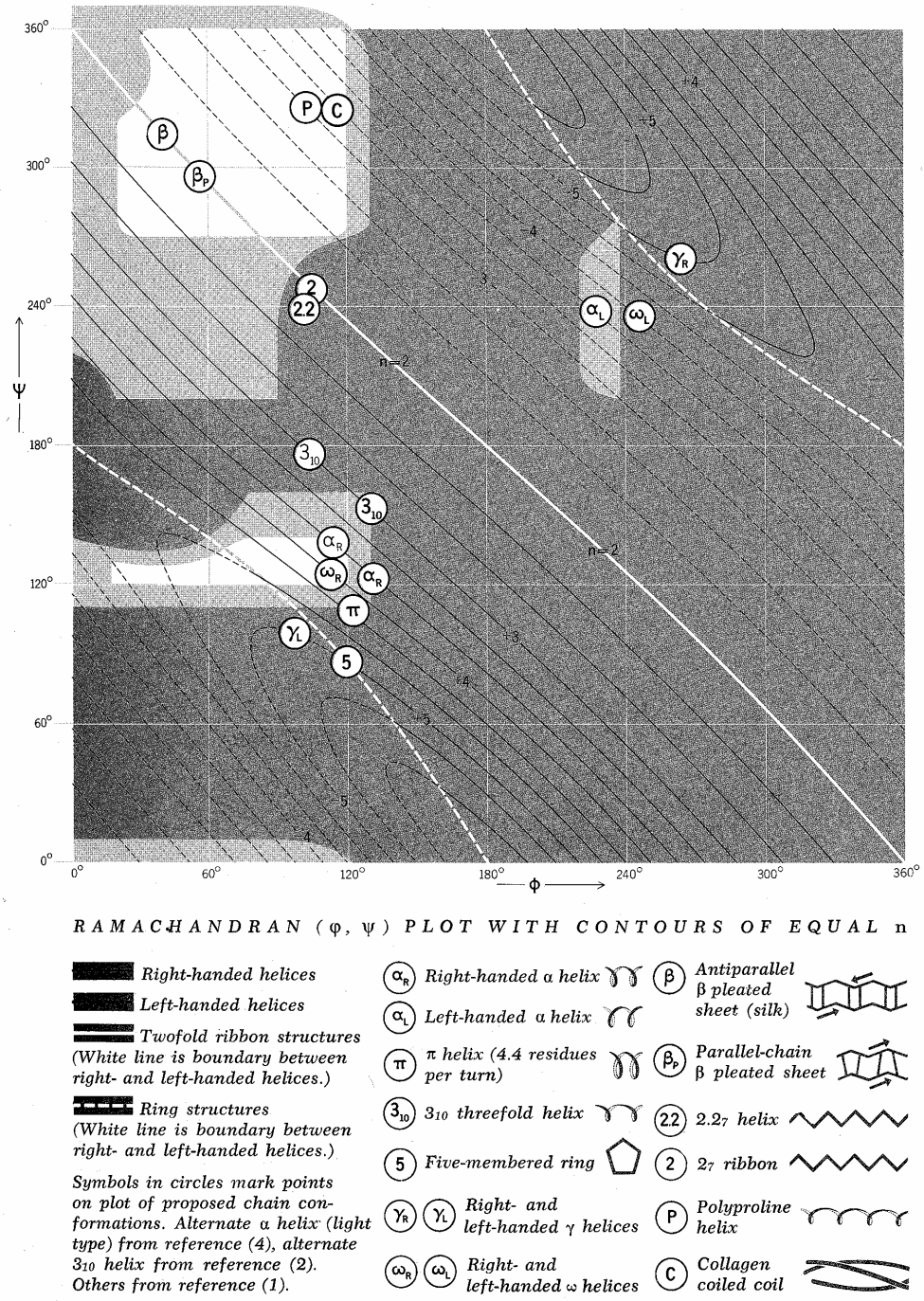


Abb. 25: Ramachandran-Plot.

Es muss beachtet werden, dass bei diesen Diagrammen ´langreichweitige´ Kräfte nicht berücksichtigt sind. Unter diesen versteht man hier die Wechselwirkung zwischen Gruppen, die in der Sequenz der Aminosäuren zwar weiter entfernt sind, die sich aber aufgrund der Faltung räumlich nahe kommen. Die hier betrachteten ´kurzreichweitigen´ Kräfte geben jedoch wichtige Einblicke in die Proteinkonformation. Abb. 26 zeigt den Ramachandran-Plot für Poly-Alanin (graue Bereiche mit durchgezogener Umrandung). Es sind drei getrennte Bereiche erkennbar. In einem befindet sich die rechtsgängige, in einem anderen die linksgängige α-Helix. Im dritten Bereich sind das antiparallele bzw. das parallele Faltblatt

und die Kollagen-Helix zu sehen. (Beachte, dass sich zwischen dieser und den folgenden Abbildungen die Definition von φ und ψ um 180° geändert hat.)

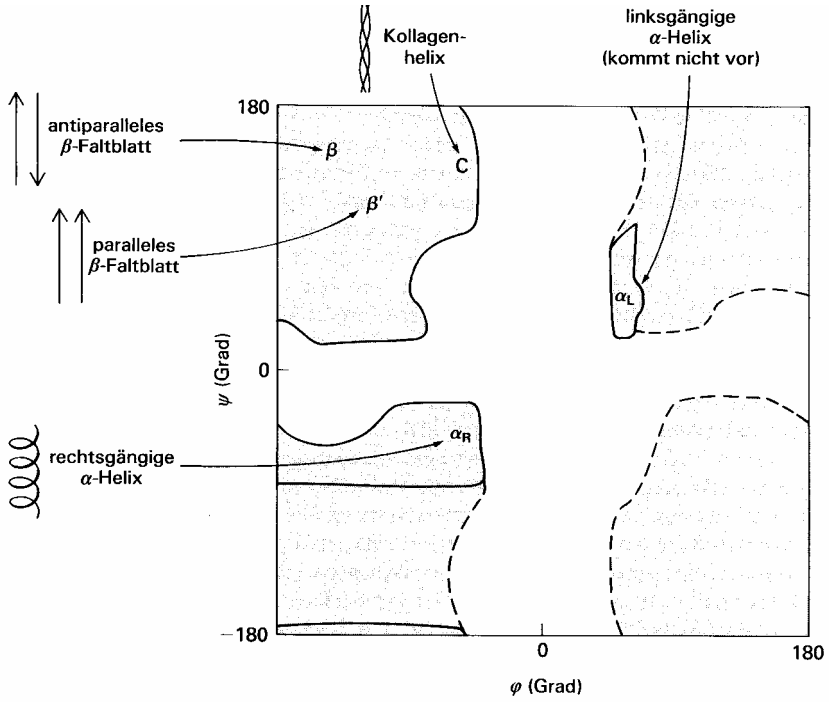


Abb. 26: Ramachandran-Plot mit den erlaubten Werten für Poly-Alanin und Poly-Glycin.

Ebenfalls eingetragen sind die erlaubten Werte für Glycin (schraffierte Bereiche mit durchgezogener und gestrichelter Umrandung). Diese Bereiche sind größer als die von Alanin, da ein Wasserstoffatom sterisch weniger hinderlich ist als eine Methylgruppe.
Abb. 26 gibt näherungsweise Angaben über die erlaubten Konformationen der Aminosäuren. Es kann aber nicht abgelesen werden, welche Zustände tatsächlich bevorzugt werden, da sie keine Angaben über die auftretenden Energien aufweisen. Im Folgenden soll daher die potentielle Energie als Funktion von φ und ψ näherungsweise berechnet werden.

Potentielle Energie

1. Nichtbindende Wechselwirkungen

Durch Variation der Winkel φ und ψ ändern sich die Atomabstände und damit die Wechselwirkungen zwischen den Atomen. Aufgrund von Dispersionskräften gibt es eine anziehende Wechselwirkung, die mit einem r^{-6}-Abstandsgesetz gut beschrieben wird. Bei Annäherung zweier Atome gibt es abstoßende Wechselwirkungen, die ebenfalls mit einem Potenzgesetz beschrieben werden, wobei der Exponent zwischen etwa –9 und –12 liegt. Beide Wechselwirkungen sind im Lennard-Jones-Potential berücksichtigt (Abb. 27). Dabei ist die Energie zwischen den Atomen k und l gegeben durch:

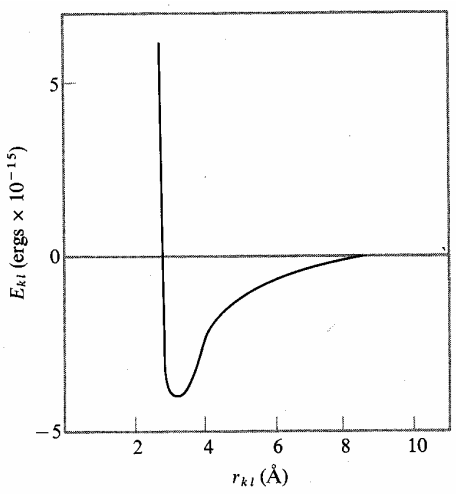


Abb. 27: Lennard-Jones Potential.

$$E_{kl} = \frac{a_{kl}}{r_{kl}^{m}} - \frac{c_{kl}}{r_{kl}^{6}} \ ,$$

wobei die Vorfaktoren charakteristisch für die Atome *k* und *l* sind. Ein typischer Plot dieser Gleichung ist in Abb. 27 zu sehen.

Der zweite Term ist die Londonsche Dispersionsenergie. Ihre Ursache sind induzierte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Der Dipol entsteht durch Verschiebung der Elektronenladung relativ zur Kernladung der Atome. Der Exponent *m* der abstoßenden Kraft wird experimentell im Größenbereich zwischen 9 und 12 gefunden.

2. Dipolwechselwirkung

Bei Proteinen existieren Dipolwechselwirkungen benachbarter Peptideinheiten (siehe Abb. 28).

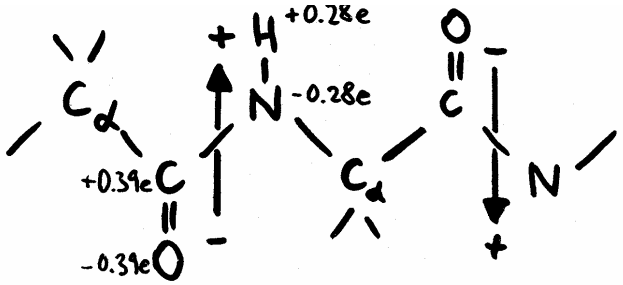


Abb. 28: Das Dipolmoment der Peptidkette alterniert entlang der Polymerkette.

Das Dipolmoment zeigt vom Sauerstoff zum Wasserstoff und hat einen Betrag von 3.7 D. Dieses relativ große Dipolmoment hat wesentlichen Einfluss auf die Polypeptidkonformation. Die antiparallele Ausrichtung der Dipolmomente führt zu einer Energieabsenkung. Die Wechselwirkungsenergie E_d zwischen zwei Dipolmomenten, $\vec{\mu}_a$ und $\vec{\mu}_b$, die durch den Verbindungsvektor $\vec{r}$ separiert sind, ist gegeben durch

$$E_d(\vec{r}) = \frac{1}{\varepsilon}\left(\frac{\vec{\mu}_a \cdot \vec{\mu}_b}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_a \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_b \cdot \vec{r})}{r^5}\right) \ .$$

Diese Gleichung ist aber nur für das Fernfeld gültig. Genauer für unsere Anwendung ist die Berechnung mit Hilfe der Partialladungen und des Coulombgesetzes.

3. Die Wechselwirkungsenergie aufgrund der Torsion

Die Einfachbindungen um φ und ψ stellen ein intrinsisches Potential gegen Drehung dar. Die zu überwindenden Energiebarrieren sind relativ klein, im Bereich von ~4 kJ/mol. Die Energie für die Torsion E_{tor} kann wie folgt dargestellt werden:

$$E_{tor} = \frac{E_{\varphi}^{o}}{2}(1+\cos 3\varphi) + \frac{E_{\psi}^{o}}{2}(1+\cos 3\psi) \ .$$

E_{φ}^{o} und E_{ψ}^{o} sind hierbei die Höhen der Barrieren.

Abb. 29 zeigt den Verlauf der Energie als Funktion des Drehwinkels φ bzw. ψ.

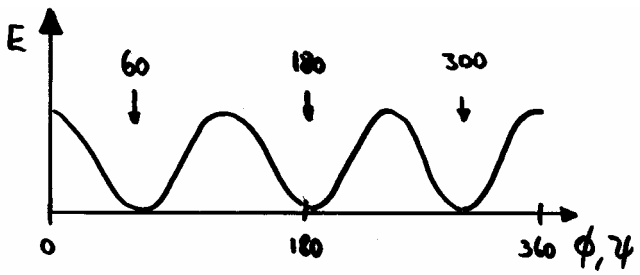


Abb. 29: Torsionspotential bei Drehung um φ und ψ.

Die Gesamtenergie der *i*-ten Aminosäure kann nun aus der Summe der drei Energieterme berechnet werden, wobei die Summe über alle Atompaare gebildet werden muss. Weitere Beiträge, z.B. von den Wasserstoffbrückenbindungen, den Wechselwirkungen der Seitenketten oder Lösungsmitteleffekte, werden nicht berücksichtigt. Abb. 30 zeigt den mit den obigen Gleichungen berechneten Energiekonturplot für Poly-Glycin.

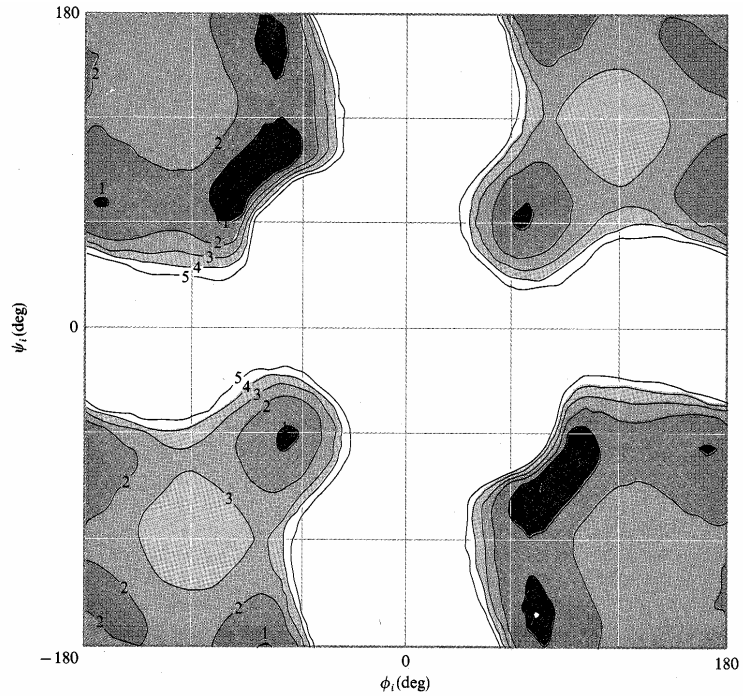


Abb. 30: Berechneter Energiekonturplot für Glycin in einer Polypeptidkette. Die Änderungen der Schattierung geben 1-kcal Intervalle an.

Die Energiekonturlinien sind relativ zum Energieminimum aufgetragen. Die Minima befinden sich in den schwarzen Gebieten. Abb. 31 zeigt die berechneten Energiekonturlinien für Poly-Alanin. Die Energieminima bei $\varphi = \psi = -60°$ und $\varphi = \psi = 60°$ sind nicht weit von den Koordinaten der rechts- und linksgängigen α-Helices entfernt. Die Energie für die rechtsgängige Helix ist aber wesentlich geringer. Dies entspricht der Präferenz für diese Helixart in der Natur. Das absolute Energieminimum ist nahe $\varphi = -180°$ und $\psi = 180°$. Dieser

Bereich enthält das β-Faltblatt. Vergleicht man die beiden Abbildungen, so erkennt man, wie schon in Abb. 26 zu sehen ist, dass die erlaubten Bereiche für Glycin größer sind als die für Alanin. Deshalb sind durch Glycin Schleifen (Zurückfaltungen) der Polypeptidkette leichter möglich.

Aminosäuren, die am β-Kohlenstoff keine verzweigte Seitenkette haben (z.B. Lys), besitzen Energiekonturlinien ähnlich denen von Alanin. Bei verzweigten Aminosäuren (z.B. Val) sind sie zwar qualitativ gleich, jedoch sind die erlaubten Bereiche noch kleiner.

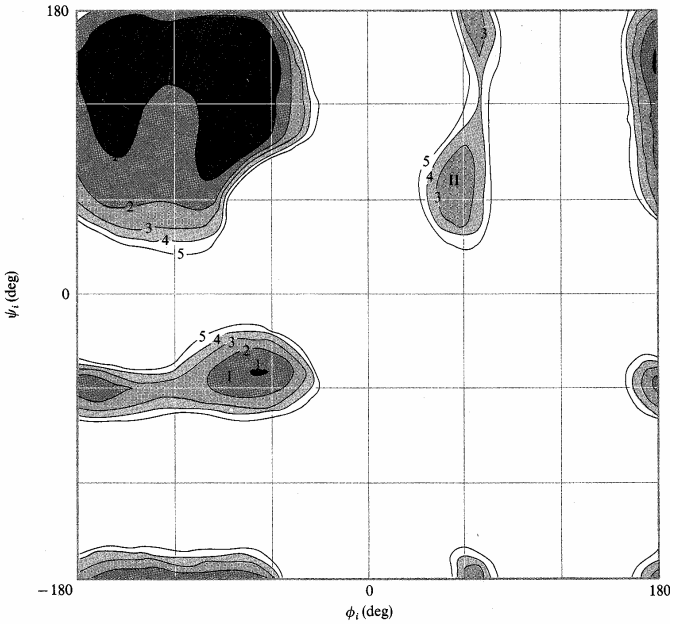


Abb. 31: Berechneter Energiekonturplot für Alanin in einer Polypeptidkette.

Eine Ausnahme bildet das Prolin. Es ist eine Iminosäure und unterscheidet sich von den 19 vorkommenden biogenen Aminosäuren dadurch, dass seine Seitenkette sowohl mit dem Stickstoff als auch mit dem α-Kohlenstoff verbunden ist (Abb. 17). Die dadurch entstehende Ringstruktur übt einen deutlichen Einfluss auf die Architektur von Proteinen aus. Sie verhindert eine Drehung um den φ-Winkel. Die Drehung um den ψ-Winkel kann sich so einstellen, dass Schleifen (Zurückfaltungen) der Polymerkette möglich sind. Dies gilt auch für Glycin.
Die Ringstruktur des Prolins bewirkt auch, dass im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren, die möglichen φ- und ψ-Werte der vor dem Prolin auftretenden Aminosäure beeinflusst werden. Deren Seitenkette (außer bei Gly) interferiert mit der am Stickstoff gebundenen CH_2-Gruppe des Prolin in α-helikaler Konformation. Deshalb ist die Ausbildung einer rechtsgängigen α-Helix nicht mehr möglich. Das Prolin ´bricht´ somit diese Helixform.

Faserproteine

Proteine haben nicht nur die Fähigkeit zu spezifischer Bindung und Katalyse, sie dienen auch als Strukturelemente. Die Struktur dieser Faserproteine kann zwischen der Sekundär- und Tertiärstruktur eingeordnet werden. Drei Hauptstrukturen treten als Sekundärstrukturen auf: die Polyprolin (Polyglycin)-Dreifach-Helix, die α-Helix und das β-Faltblatt. Ein Beipiel für erstere ist das Kollagen, das der wichtigste Faserbestandteil in Haut, Knochen, Sehnen,

Knorpeln, Blutgefäßen und Zähnen ist. Es ist das am häufigsten vorkommende Protein bei Säugetieren (ein Viertel des Gesamtproteingewichts). Das Kollagen bildet unlösliche Fasern hoher Zugfestigkeit. Dies ist bedingt durch die Polyprolin (Polyglycin)-Dreifach-Helix, die aus drei Ketten besteht, welche gegenseitig durch Wasserstoffbrückenbindungen vernetzt sind. Das heißt, dass bei Anwendung von Zug Kräfte gegen kovalente Bindungen ausgeübt werden müssen.
Ein anderes Faserprotein, das Keratin, bildet die Schutzschicht bei den Landwirbeltieren. Es kommt u.a. in der Haut, in den Haaren und den Nägeln vor. Als Sekundärstruktur der Keratine tritt vor allem die α-Helix auf.
Das beste Beispiel für ein Protein mit β-Faltblatt-Struktur ist die Seide. Es wird durch lange Polypeptidketten entlang der Faserachse gebildet. Die benachbarten Ketten sind gegenläufig (antiparalleles Faltblatt) und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten (Abb. 32).

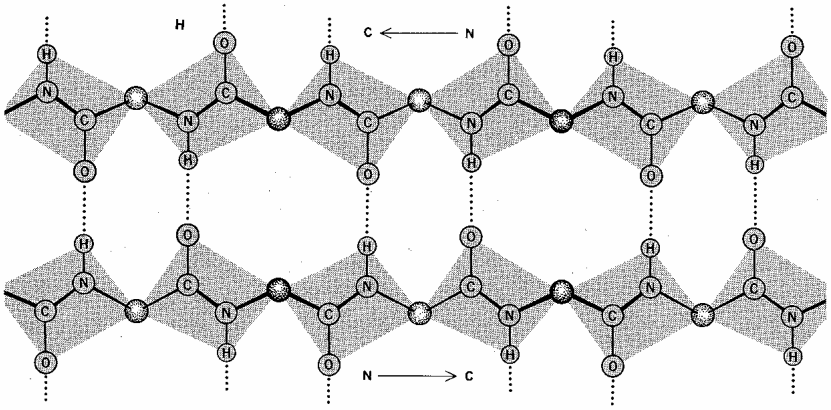


Abb. 32: Wasserstoffbrückenbindungen in einem antiparallelen β-Faltblatt. Die Seitenketten sind nicht eingezeichnet.

Die Wasserstoffbrückenbindungen sorgen dafür, dass die Struktur nicht völlig gestreckt ist. Es wird statt dessen, wie Abb. 33 zeigt, eine gewellte (gefaltete) Struktur ausgebildet. Die Folge dieser Struktur ist, dass die Faser sehr reißfest ist, da zu ihrer Zerstörung kovalente Bindungen aufgebrochen werden müssen.

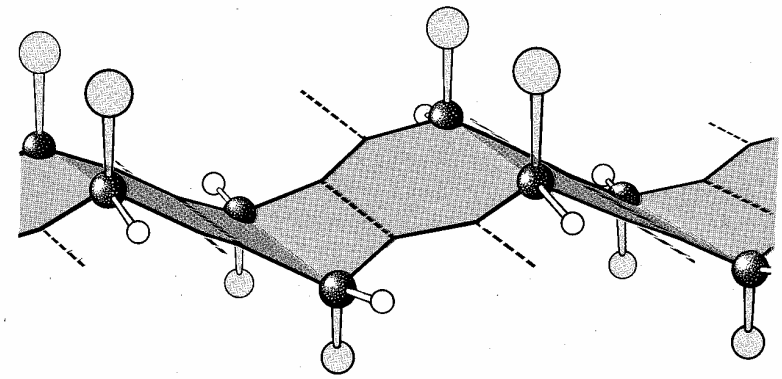


Abb. 33: Das β-Faltblatt weist alternierende Seitenketten auf. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt eingezeichnet.

Tertiärstruktur

Für die Darstellung von Tertiärstrukturen hat man verschiedene Möglichkeiten. Raumfüllende Modelle sind wegen des kompakten Aufbaus der Proteine wenig illustrativ. Deshalb werden oft die Wasserstoffatome weggelassen. Abb. 34 zeigt die Tertiärstruktur von Hexokinase mit diesem Modell.

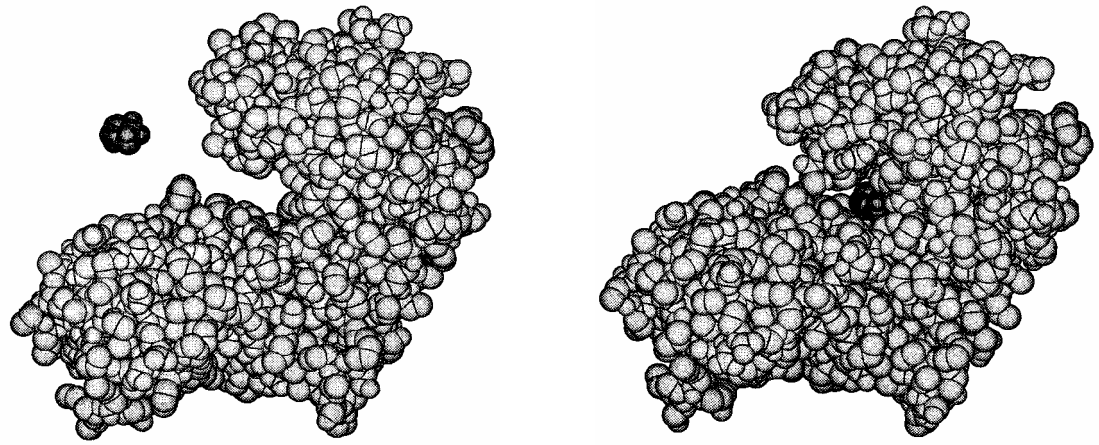


Abb. 34: Tertiärstruktur von Hefe-Hexokinase. Alle Atome mit Ausnahme von Wasserstoff sind dargestellt. Der Radius der Atome, die mit dem Wasserstoff gebunden sind, ist entsprechend größer gezeichnet. In der linken Abbildung ist die Hexokinase mit ihrem Substrat Glucose zu sehen. Bei der Glucosebindung vollführt das Protein eine deutliche Konformationsänderung (Abbildung rechts).

Ein weiteres Modell besteht darin, lediglich die chemischen Bindungen des Rückgrats (und der Seitenketten) eines Proteins darzustellen. Die vierte Stufe der Abstraktion ist, nur die α-Kohlenstoffe zu zeichnen. Letztlich können auch nur besondere Strukturen (übertrieben) dargestellt werden, während andere vereinfacht oder gar nicht gezeichnet werden. Als Beispiel ist die menschliche Kohlensäure-Anhydrase in Abb. 35 zu sehen. Besonders hervorgehoben ist das gedrehte β-Faltblatt.

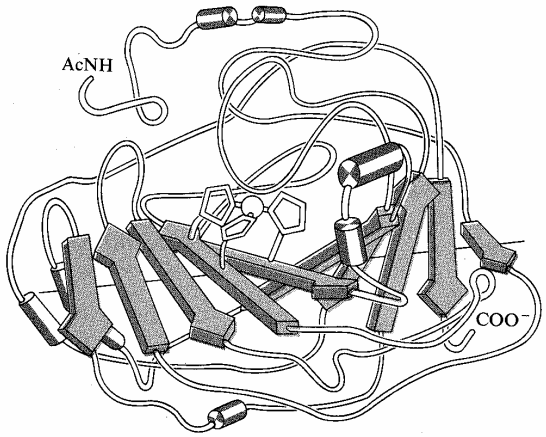


Abb. 35: Idealisierte Darstellung der Tertiärstruktur der menschlichen Kohlensäure-Anhydrase. Helices sind mittels Zylinder, Faltblätter durch Pfeile dargestellt. Die Drehung der Faltblätter kann in dieser Darstellung gut beobachtet werden.

Die Tertiärstrukturen sind mit den Sekundärstrukturen mittels Wasserstoffbrückenbindung, ionischer Bindung (Salzbrücken) und van der Waals-Wechselwirkungen verbunden.

Quartärstruktur

Die Quartärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung von Tertiärstrukturen (Untereinheiten) und die Art ihrer Kontakte. Sie besteht demzufolge aus mehreren Peptidketten, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Die Untereinheiten können identisch oder verschieden sein. Die Berührungsflächen der Untereinheiten sind oft funktionell bedeutsam. Die einfachste Anordnungsmöglichkeit ist ein Protein mit zwei gleichen Untereinheiten (Homodimer, $\alpha\alpha$). Ein Beispiel dafür ist die Alkohol-Dehydrogenase der Leber. Das Hämoglobin hat vier Untereinheiten; jeweils zwei vom gleichen Typ ($\alpha_2\beta_2$). Andere Proteine können beträchtlich mehr Untereinheiten aufweisen, z.B.: 12, 48, 60.
Die Betrachtung von Symmetrieoperationen kann zur Untersuchung der Struktur von Quartärstrukturen herangezogen werden. Da die Untereinheiten aufgrund der Chiralität der Aminosäuren asymmetrisch sind, können keine Spiegel- oder Inversionssymmetrien auftreten, sondern nur Rotationssymmetrien. Beim Hämoglobin z.B. ist ein $\alpha\beta$-Dimer mit dem anderen Dimer über eine C_2-Symmetrie (Rotation um 180°) verbunden. Es werden auch C_3-Symmetrien bei Proteinen beobachtet. Weitere wichtige Symmetrieeigenschaften sind D_n-Operationen (mindestens eine C_2-Achse steht senkrecht zu einer C_n-Achse) und kubische Symmetrien, siehe Abb. 36.

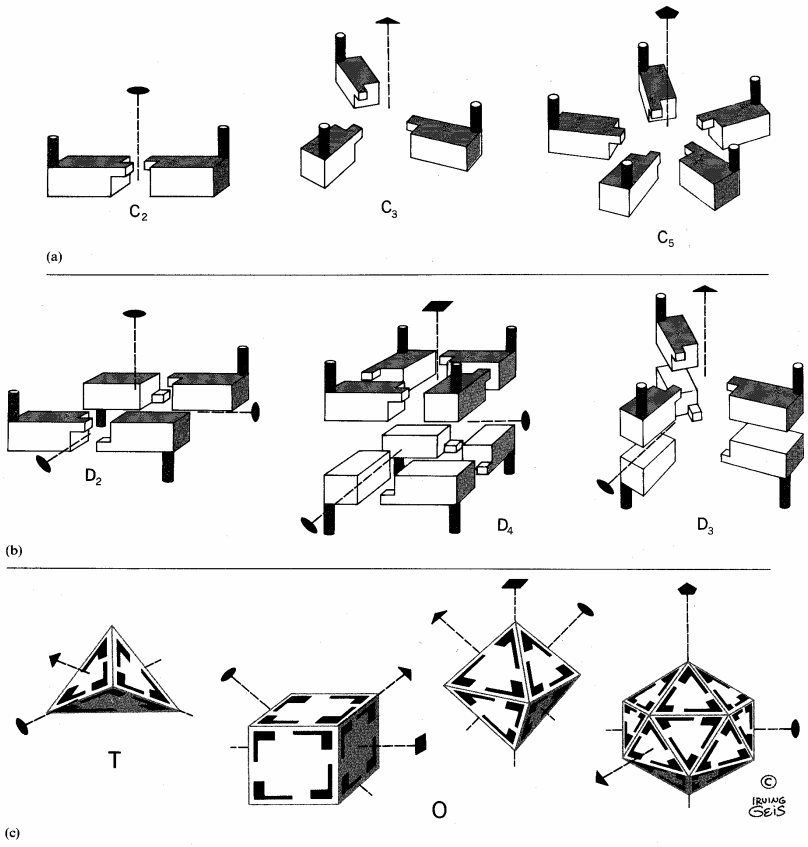


Abb. 36: Einige der für eine Gruppe von identischen Untereinheiten möglichen Symmetrieoperationen.

Konformationsumwandlungen

Biopolymere besitzen im nativen Zustand zumeist wohldefinierte Konformationen, die durch Wechselwirkungen der Molekülgruppen innerhalb des Polymers und mit der Umgebung (Lösungsmittel, Liganden, andere Biopolymere) stabilisiert werden. Die Energie einer Konformation ergibt sich aus einer komplizierten Bilanz stabilisierender und destabilisierender Wechselwirkungen (Van-der-Waals, H-Brücken, Salzbrücken, hydrophobe WW), welche durch externe Parameter (Temperatur, Druck, elektrisches Feld, pH-Wert) verändert werden können.

Charakteristische Merkmale verschiedenartigster Konformationsumwandlungen sind:

- Ausbildung wohldefinierter Strukturen über weite Parameterbereiche.
- Schärfe der Umwandlung in einem engen Bereich der Parameter ('Phasenübergang').

Diese fundamentalen Eigenschaften basieren auf dem Konzept der Kooperativität zwischen Einzelsegmenten der Biopolymere. Methoden der statistischen Physik können auf einfache Modellsysteme (z.B. 1D-Ising) angewandt werden, um die Konformationsumwandlungen thermodynamisch zu beschreiben. Als einfachen Prozess betrachten wir die Helix-Knäuel-Umwandlung einer Polypeptidkette.

Messung der Konformationsstabilität

Proteine sind durch einen sehr großen Konformationsraum charakterisiert. Dennoch nehmen sie *in vivo* meist genau definierte, geordnete Konformationen ein. Sie können aber auch andere geordnete Konformationen oder ungeordnete Formen annehmen, wenn man externe Parameter, z. B. Temperatur, Druck oder chemische Zusammensetzung des Lösungsmittels, variiert. Die neue Konformation kann dabei schon durch eine verhältnismäßig kleine Veränderung der externen Parameter zustande kommen.

Der Helix-Knäuel-Übergang

Poly-L-Glutamat ist ein lineares Polypeptid, das sich für die Untersuchung des Helix-Knäuel-Übergangs sehr gut eignet. Es enthält ionisierbare Carboxylseitenketten, deren Ladung vom pH der Lösung abhängt. Bei niedrigem pH sind die Seitenketten neutral, und das Polypeptid faltet in eine α-Helix. Bei hohem pH sind die Seitenketten negativ geladen und stoßen sich ab. Daher ist die kompakt aufgebaute α-Helix instabil, und die Kette liegt als Knäuel vor. Abb. 1 zeigt den helikalen Anteil θ von Poly-L-Glutamat in Abhängigkeit vom pH-Wert.

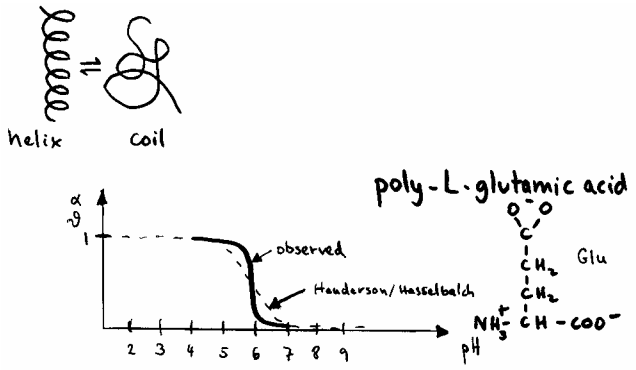


Abb. 1: Helix-Knäuel-Übergang in Poly-L-Glutamat.

Die Abbildung zeigt den relativ abrupten Übergang von der geordneten Helixstruktur zu einem Knäuel. Dieser Übergang verläuft steiler, als von der Henderson-Hasselbalch-Gleichung vorhergesagt wird. Es wird von einem kooperativen Prozess gesprochen, da die beiden Extremzustände (nur Helices oder nur ungeordneter Zustand) bevorzugt werden. Der Helizitätsgrad hängt außerdem stark von der Länge der Polypeptidkette ab.

Der molekulare Mechanismus des Übergangs

Für die genauere Untersuchung des Helix-Knäuel-Übergangs müssen die Struktur der Helix und die beteiligten Kräfte näher betrachtet werden. Da sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der *i*-ten und (*i*+4)-ten Aminosäure ausbildet, werden sechs Rotationswinkel von ihr überbrückt. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für die Bildung der ersten Wasserstoffbrücke relativ klein ist, da alle sechs Winkel einen bestimmten Wert annehmen müssen (d.h. die Entropie nimmt relativ stark ab). Für die weiteren Wasserstoffbrückenbindungen müssen dagegen nur zwei weitere Winkel fixiert werden, falls sie sich an die erste anreihen (Abb. 2).

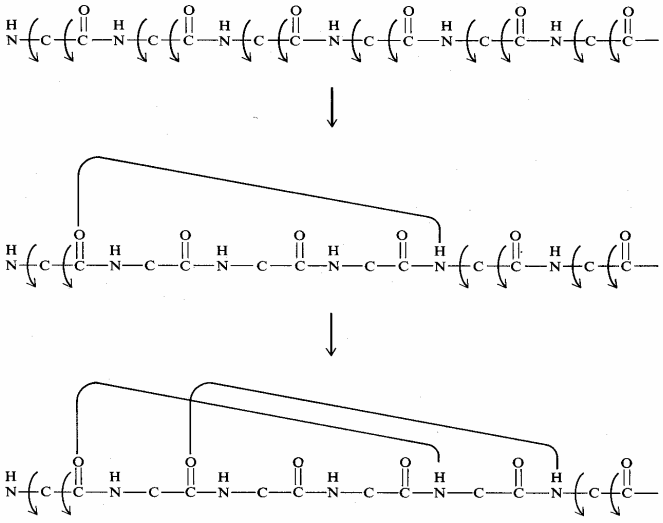


Abb. 2: Bildung einer Helix. Für die Bildung der ersten Wasserstoffbrücke müssen sechs, für die folgenden nur 2 Winkel fixiert werden.

Dieser Effekt führt dazu, dass die Bildung einer einzigen Helix in einer Polypeptidkette wahrscheinlicher ist als das Auftreten vieler Helices. Ein weiterer Grund für die Kooperativität ist die Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Amidgruppen der Helix. Aufeinanderfolgende Peptiddipole sind eher nebeneinander angeordnet, was energetisch ungünstig ist. Dagegen sind die Dipole von Peptiden, die in der Helix weiter auseinander liegen, hintereinander angeordnet. Diese Konfiguration ist mit einer Energieabsenkung verbunden.

Einfache Theorie für ein Polypeptid der Länge *n*

Im Folgenden soll der Helix-Knäuel-Übergang mit einem einfachen Modell untersucht werden. Es wird angenommen, dass die einzelnen Segmente (Monomere) entweder nur in helikaler oder in knäuelartiger Konformation vorkommen, was zu einem Zweizustands-Modell führt. Die freie Reaktionsenthalpie ΔG_r für den Übergang eines Segments von der Knäuel- zu einer Helixkonformation ist

$$\Delta G_r = \Delta H_r - T\Delta S_r ,$$

wobei ΔH_r und ΔS_r die Änderungen der Enthalpie und Entropie für die Umwandlung einer Einheit sind. Die Enthalpieänderung ist durch die Bildung von Wasserstoffbrücken, die Änderung der Entropie durch die größere Konformationsfreiheit eines Knäuels bedingt. Die gesamte freie Enthalpie ΔG_{tot} von n Einheiten ist aber nicht einfach $n\Delta G_r$, da Endeffekte auftreten. Diese bewirken, wie oben aufgezeigt, dass sich vier Wasserstoffbrückenbindungen weniger ausbilden können. Außerdem ist die Konformationsfreiheit der ersten und letzten Aminosäure einer Kette unabhängig davon, ob eine Helix oder ein Knäuel vorliegt. Deshalb folgt

$$\Delta G_{tot} = (n-4)\Delta H_r - (n-2)T\Delta S_r .$$

Für die Gleichgewichtskonstante $K = \frac{[Helix]}{[Knäuel]}$ ergibt sich

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} = e^{\frac{-n(\Delta H_r - T\Delta S_r)+4\Delta H_r - 2T\Delta S_r}{RT}}$$

$$\Rightarrow K = c \cdot k^n \quad \text{mit} \quad k = e^{\frac{-(\Delta H_r - T\Delta S_r)}{RT}}$$

$$c = e^{\frac{4\Delta H_r - 2T\Delta S_r}{RT}} .$$

Die Gleichung zeigt, dass kleine Änderungen von k (verursacht durch Temperatur-, pH- oder Ionenkonzentrationsveränderung) bei großem n eine große Änderung in K bewirken. Für die Temperatur T_m (T bei $K = 1$) erhält man

$$\Delta G_{tot} = 0 = (n-4)\Delta H_r - T_m(n-2)\Delta S_r ,$$

$$\Rightarrow T_m = \frac{n-4}{n-2} \quad \frac{\Delta H_r}{\Delta S_r} , \qquad (n \geq 5) .$$

Aus obiger Gleichung folgt, dass T_m von der Kettenlänge n abhängt. Experimentell beobachtet man allerdings, dass sich T_m in einem viel größeren Bereich von n verändert als diese

Gleichung vorhersagt. Außerdem kann auch die 'Schärfe' des Übergangs, $\frac{d\vartheta}{dT}|_{T_m}$, berechnet werden:

$$K = \frac{\vartheta}{1-\vartheta} = e^{-\frac{(n-4)\Delta H_r - (n-2)T\Delta S_r}{RT}}$$

$$\frac{d\vartheta}{dT}\Big|_{T_m} = \frac{1}{4R}\frac{(n-2)^2 \Delta S_r^2}{(n-4)\Delta H_r} \quad ,$$

wobei ϑ den Anteil der helikalen Einheiten darstellt. Aus dieser Gleichung folgt, dass die Schärfe des Übergangs mit *n* ansteigt, was auch experimentell gefunden wird. Allerdings sollte die Schärfe mit der Anzahl Segmente *n* gegen unendlich gehen. Da dies experimentell nicht gemessen wird, soll im Folgenden das theoretische Modell verfeinert werden.

Statistische Modelle

Modell:
- lineare Kette mit *n* Segmenten.
- zwei Zustände je Segment (helix/coil; *h*/*c*).
- Wahrscheinlichkeiten $p_i^h ; p_i^c \quad (p_i^h + p_i^c = 1)$.
- $h_i \underset{k_2^i}{\overset{k_1^i}{\rightleftharpoons}} c_i$, $\frac{p_i^h}{p_i^c} = \frac{k_2^i}{k_1^i} = K_i = \exp(-\Delta G_i / RT)$.

gefragt: Helizitätsgrad θ eines Ensembles von Molekülen als Funktion äußerer Parameter (T, p, $\vec{E}$, pH ...)

Die Kette kann eine Vielzahl von verschiedenen Zuständen einnehmen. Die Besetzungswahrscheinlichkeit folgt der Boltzmann-Statistik:

$$p'(\varepsilon_i) = p'(0)e^{-\varepsilon_i / kT},$$

normiert:
$$p(\varepsilon_i) = \frac{e^{-\varepsilon_i / kT}}{\sum_i e^{-\varepsilon_i / kT}}.$$

Die Zustandssumme ($\sum_i e^{-\varepsilon_i / kT}$) ist das Bindeglied zwischen der Quantenmechanik und Thermodynamik. Alle thermodynamischen Größen können als Mittelwerte molekularer Eigenschaften über die Zustandssumme berechnet werden.

Molekulare Zustandssumme:

$$q = \sum_i g_i e^{-\varepsilon_i / kT}$$

g_i : Entartung, ε_i : mögliche Energieniveaus (Translation, Rotation, Vibration, elektronisch, Konformation). Betrachtung einer Kette mit definierter Richtung:

Beispiel: 4 Segmente *cccc* → *hccc* → *hhcc* ...
Beachte: *hccc* ≠ *ccch*

Markoff-Kette - unabhängige Segmente

Annahme:	*cccc*	Beitrag q_0	zu q
	hccc, *chcc* ...	q_1	
	hhcc, *hchc* ...	q_2	
	hhhc, *hhch* ...	q_3	
	hhhh	q_4	
allgemein:	$i \times h$	q_i	

Zustandssumme:

$$q = q_0 + 4q_i + 6q_2 + 4q_3 + q_4 = \sum_{i=0}^{4} \binom{4}{i} q_i$$

$$q = q_0(1 + 4K_1 + 6K_2 + 4K_3 + K_4) = q_0 \sum_{i=0}^{4} \binom{4}{i} K_i ; K_0 = 1$$

$$K_i = \frac{q_i}{q_0} = \frac{q_i / q}{q_0 / q} = \frac{\textit{Gewicht einer bestimmten Konfiguration mit } i \textit{ Segmenten}}{\textit{Gewicht von cccc}}$$

Beispiel :

$$K_3 = \frac{[hhhc]}{[cccc]} = \frac{[hhch]}{[cccc]} \ldots . \rightarrow$$ Gleichgewichtskonstante

q_0 fällt bei Berechnung relevanter Größen heraus $\Rightarrow q_0 = 1$ o.B.d.A.

Beispiel:

$$\theta_{2h} = 6\frac{q_2}{q} = \frac{6K_2 q_0}{q_0(1 + 4K_1..)} = \frac{6K_2}{(1 + 4K_1..)}$$ → Anteil von Molekülen mit 2 *'h'*-Segmenten.

Statistische Gewichte:

$K_1 = e^{-\Delta G / RT} = s \qquad c \rightarrow h : \Delta G$

$K_2 = e^{-2\Delta G / RT} = s^2 \qquad 2c \rightarrow 2h : 2\Delta G$

$K_i = e^{-i\Delta G / RT} = s^i$

Beispiel

$$q = \sum_{i=0}^{4} \binom{4}{i} s^i$$

$$= (1 + s)^4$$

allgemein

$$q = \sum_{i=0}^{n} \binom{n}{i} s^i = \sum_{i=0}^{n} \Omega_i s^i$$

$$= (1 + s)^n$$

Helizitätsgrad θ:

$p(i) = \frac{\binom{n}{i} s^i}{q}$ Wahrscheinlichkeit für *i ' h'* Segmente bei *n* Segmenten

$$\theta(s) = \frac{\langle i \rangle}{n} = \frac{\sum_i i p(i)}{n} = \frac{\sum_i i \binom{n}{i} s^i}{nq}$$

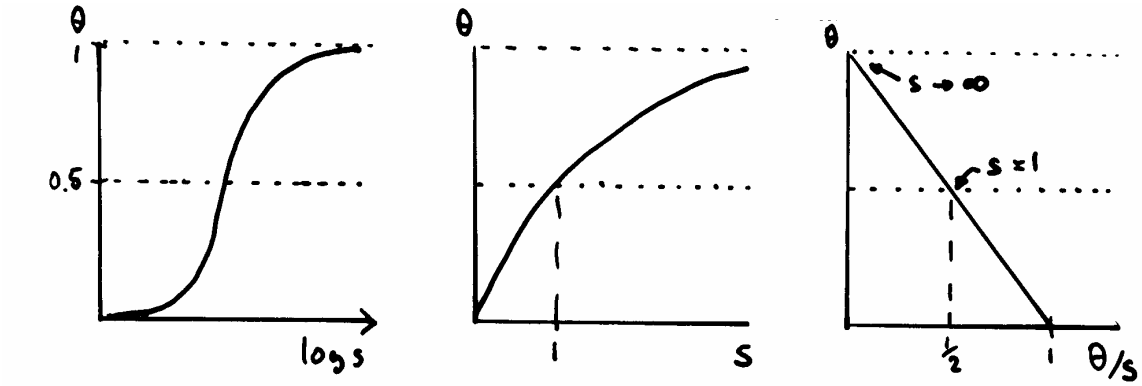
$$= \frac{s \cdot \frac{dq}{ds}}{nq} = \frac{1}{n} \cdot \frac{dq/q}{ds/s} = \underline{\underline{\frac{1}{n} \frac{d \ln q}{d \ln s}}}$$

$$= \frac{s}{nq} \cdot n \cdot (1+s)^{n-1} = \frac{s}{n(1+s)^n} \cdot n(1+s)^{n-1} = \underline{\underline{\frac{s}{1+s}}} \quad .$$

Das Resultat ist trivial. Man hätte auch jedes Element separat betrachten können, da diese nach Voraussetzung unabhängig sein sollten:

$$\theta = \frac{p_i^h}{\underbrace{p_i^h + p_i^c}_{1}} = \frac{p_i^h / p_i^c}{p_i^h / p_i^c + p_i^c / p_i^c} = \frac{K_1}{K_1 + 1} = \frac{s}{1+s} .$$

Graphische Auftragung für Markoff-Kette:



Titrationskurve (semilog)

$\theta = \frac{1}{1 + 10^{-\log s}}$

Michaelis-Menten (linear)

$\theta = \frac{s}{1+s}$

Scatchard plot

$\theta = 1 - \frac{\theta}{s}$

Regeln zur Berechnung der Zustandssumme:

1. Betrachte alle möglichen Zustände des Systems (Moleküls). (*cccc*, *hccc*, *hhcc*, *hhhc* ...)

2. Definiere den Referenzzustand mit Gewicht 1. ($\rightarrow$ *cccc*)

3. Bestimme das statistische Gewicht eines jeden Zustands. ($cccc \leftrightarrow hccc$, $K_i = e^{-i\Delta G/RT}$)

4. Berechne die Zustandssumme durch Addition der Beiträge aller Konfigurationen mit entsprechenden Gewichtsfaktoren ($q = \sum_{i=0}^{n} \binom{n}{i} K_i = (1+s)^n$).

5. Berechne thermodynamische Mittelwerte aus der Zustandssumme.

Zipper-Modell (Kooperative Umwandlung)

Annahme: Wieder jedes Segment mit zwei Zuständen (*c*/*h*), aber nur ein helikaler Bereich!

Statistische Gewichte:

$s = \dfrac{[...ccchhhhccc...]}{[...ccchhhcccc...]}$ Wachstum

$\sigma s = \dfrac{[...cccchccc...]}{[...cccccccc...]}$ Keimbildung

$\sigma << 1$: Initiierung erschwert (Keimbildung). Daher gibt es höchstenfalls einen helikalen Bereich.

Zustandssumme:

$$q = 1 + \sum_{k=1}^{n} \Omega_k \sigma s^k$$

mit $\Omega_k = (n - k + 1)$ Anzahl von Möglichkeiten, einen *k*-langen Bereich in der Kette der Länge *n* unterzubringen: So ergibt sich beispielsweise für $n = 50$ und $k = 1$: $\Omega = 50$, $k = 2$: $\Omega = 49$ und so weiter.

$$q = 1 + \sum_{k=1}^{n} s^k (n+1)\sigma \quad - \quad \sum_{k=1}^{n} k s^k \sigma$$

$$= 1 + \overbrace{\frac{s^{n+1} - s}{s-1}}(n+1)\sigma - \overbrace{s \frac{d}{ds} \sum s^k \sigma}$$

$$= 1 + \frac{s^{n+1} - s}{s-1}(n+1)\sigma - \frac{s}{(s-1)^2}(ns^{n+1} - (n+1)s^n + 1)\sigma$$

$$\underline{\underline{q = 1 + \frac{\sigma \; s^2}{(s-1)^2}\left[s^n + ns^{-1} - (n+1) \right]}} \quad .$$

Helizitätsgrad $\theta(s,\sigma)$:

$$p(k) = \frac{(n-k+1)\sigma s^k}{q} \qquad \textit{Wahrscheinlichkeit für k helikale Segmente}$$

$$\theta(s,\sigma) = \frac{< k >}{n} = \frac{\sum kp(k)}{n} = \frac{\sum k(n-k+1)\sigma s^k}{nq}$$

$$= \frac{s\frac{\partial q}{\partial s}}{qn} = \underline{\underline{\frac{1}{n}\frac{\partial \ln q}{\partial \ln s}}}$$

$$\underline{\underline{\theta(s,\sigma) = \frac{\sigma s}{(s-1)^3}\frac{ns^{n+2} - (n+2)s^{n+1} + (n+2)s - n}{n(1+(\sigma s/(s-1)^2)(s^{n+1}+n-(n+1)s))}}}.$$

Abb. 3 zeigt Beispiele für eine Kette mit 16 Einheiten. Die Verteilungen von *p(k)* für <*k*> = 14.7, 12.0, 5.7 und 1.06 (oder entsprechend: θ = 0.92, 0.75, 0.36 und 0.07) sind dargestellt. Für σ wurde 0.0015 verwendet. Diese Daten zeigen die klare Tendenz, dass entweder lange Helices oder gar keine ausgebildet werden.

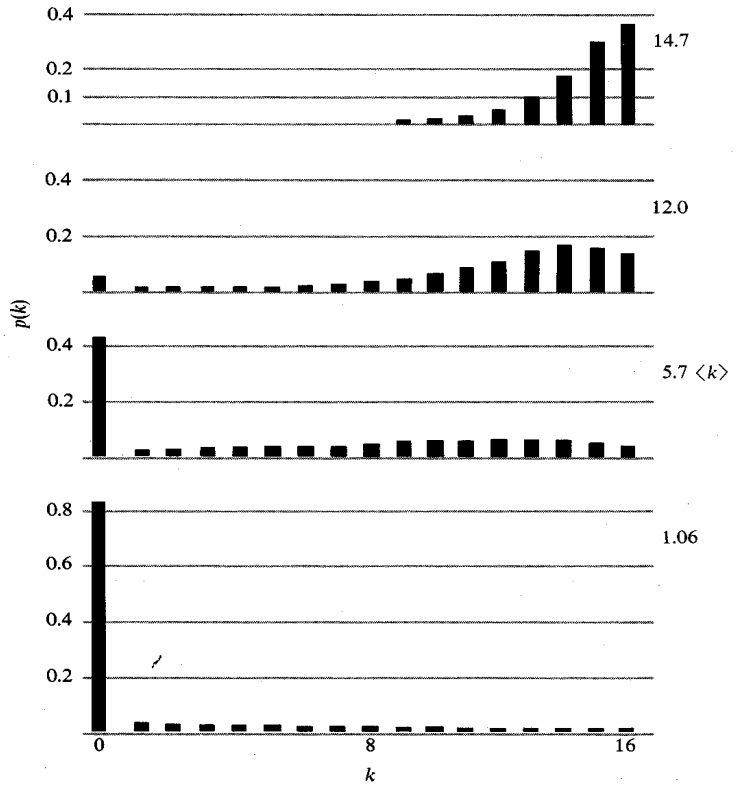
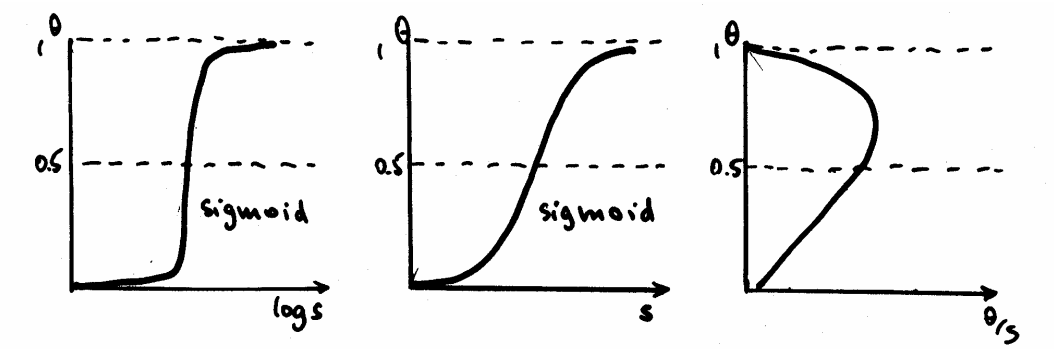


Abb. 3: Verteilung helikaler Länge n für verschiedene Werte der mittleren helikalen Länge.

Graphische Auftragung von $\theta(s,\sigma)$ im Zippermodell:



Titrationskurve (semilog) | Michaelis-Menten (linear) | Scatchard plot

Das Zipper-Modell eignet sich nur gut zur Beschreibung kurzer Ketten. Bei längeren Ketten ist es aus entropischen Gründen wahrscheinlich, dass mehrere helikale Bereiche auftreten. Das Ising-Modell in einer Dimension (Ising, 1925) behandelt den Fall langer Ketten.

1-D Ising Modell

Annahme: Beliebig viele helikale Bereiche:

Beispiel: *cccchhhcchhhhccccchhhccc*

Segment: $n = 24$
h-Segmente: $k = 10$
h-Blöcke: $j = 3$

Statistische Gewichte: hängen ab vom Zustand des vorhergehenden Segments.

$$s = \frac{[..cchhcc..]}{[..cchccc..]} \quad \text{Wachstum}$$

$$\sigma s = \frac{[..ccchcc..]}{[..cccccc..]} \quad \text{Keimbildung: } \sigma < 1 \text{ kooperativ, } \sigma = 1 \text{ unabhängig, } \sigma > 1 \text{ antikoop.}$$

Zustandsumme:

$$q = \sum_{j,k} \Omega_{j,k} \sigma^j s^k$$

Berechnung mit der Matrixmethode:

Betrachte ein Paar - statistisches Gewicht
↓
beliebiges Segment
plus Vorgänger

cc	1
hc	1
ch	σs
hh	s

Matrixschreibweise:

'Statistical weight matrix'

$$M = \begin{matrix} c \\ h \end{matrix} \begin{pmatrix} 1 & \sigma s \\ 1 & s \end{pmatrix} \quad \begin{matrix} \leftarrow \text{Segment } i \\ \\ \uparrow \\ \text{Segment i–1} \end{matrix} \qquad \begin{matrix} c & h \end{matrix}$$

Zustandssumme für $n = 2$:

Annahme:
'Vorgänger' von Segment 1='*c*'!

$$q = \underset{cc}{1 \cdot 1} + \underset{ch}{1 \cdot \sigma s} + \underset{hc}{\sigma s \cdot 1} + \underset{hh}{\sigma s \cdot s}$$

$$\Leftrightarrow q = (1,0) \cdot M \cdot M \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

$$= (1, \sigma s) \cdot M \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} = (1 + \sigma s, \sigma s + \sigma s^2) \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

$$= 1 + 2\sigma s + \sigma s^2$$

Kette mit n Segmenten:

$$\underline{\underline{q = (1,0) M^n \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}}}$$

Die Zustandssumme wird durch Diagonalisierung von M berechnet:
Ähnlichkeitsabbildung: $T^{-1}MT = \Lambda = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix}$:

$$q = (1,0)(TT^{-1}MTT^{-1})^n \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}; \quad TT^{-1} = E = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

$$\underline{\underline{= (1,0) T \Lambda^n T^{-1} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}}}$$

$$\Lambda^n = \begin{pmatrix} \lambda_1^n & 0 \\ 0 & \lambda_2^n \end{pmatrix}$$

Eigenwerte von M: $\quad Det(M - \lambda E) = 0 = Det \begin{pmatrix} 1-\lambda & \sigma s \\ 1 & s-\lambda \end{pmatrix}$

$$\Rightarrow \lambda_{1,2} = \frac{1}{2}\left[1 + s \pm \sqrt{(1-s)^2 + 4\sigma s}\right]$$

$$T = \begin{pmatrix} 1-\lambda_2 & 1-\lambda_1 \\ 1 & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \lambda_1 - s & \lambda_2 - s \\ 1 & 1 \end{pmatrix}$$

$$T^{-1} = \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2}\begin{pmatrix} 1 & \lambda_1 - 1 \\ -1 & 1-\lambda_2 \end{pmatrix} = \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2}\begin{pmatrix} 1 & s-\lambda_2 \\ -1 & \lambda_1 - s \end{pmatrix}$$

(mit $\lambda_1 + \lambda_2 = M_{11} + M_{22} = 1 + s$ und $\lambda_1\lambda_2 = M_{11}M_{22} - M_{12}M_{21} = s - \sigma s$).
Einsetzen von T, Λ, T^{-1} in

$$q = (1,0)T\Lambda^n T^{-1}\begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix}$$

liefert:

$$\underline{\underline{q = \frac{\lambda_1^{n+1}(1-\lambda_2) - \lambda_2^{n+1}(1-\lambda_1)}{\lambda_1 - \lambda_2}}}$$

Näherungen:

$$\lambda_1 > \lambda_2 \Rightarrow \lambda_1^{n+1} >> \lambda_2^{n+1} \quad \textit{für} \quad n \to \infty$$

$$q \approx \lambda_1^{n+1}\frac{1-\lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \approx \lambda_1^n \quad \textit{für } \lambda_2 \approx 0 \qquad \text{Näherungslösung}$$

$$\underline{\underline{q \approx \lambda_1^n = \left(\frac{1 + s + \sqrt{(1-s)^2 + 4\sigma s}}{2}\right)^n}} .$$

<u>Berechnung von Parametern:</u>

$$< k > = \frac{\partial \ln q}{\partial \ln s} = \frac{n\partial \ln \lambda_1}{\partial \ln s} \qquad \text{mit Hilfe der Näherungslösung,}$$

$$\theta = \frac{< k >}{n}$$

$$\underline{\underline{\theta = \frac{1}{2}\frac{s}{\lambda_1}\left[1 + \frac{(s-1) + 2\sigma}{\sqrt{(1-s)^2 + 4\sigma s}}\right]}} \xrightarrow{\sigma = 1} \frac{s}{1+s} .$$

$$< j > = \frac{\partial \ln q}{\partial \ln \sigma} = \frac{n\partial \ln \lambda_1}{\partial \ln \sigma} \qquad \text{mit Hilfe der Näherungslösung}$$

$$\underline{\underline{< j > = \frac{n\sigma s}{\lambda_1} / \sqrt{(1-s)^2 + 4\sigma s}}} \qquad \text{maximal am Umwandlungsmittelpunkt, } \theta = \frac{1}{2}, s = 1$$

$$\frac{< k >}{< j >_{\theta = 0.5}} = \frac{1}{\sqrt{\sigma}} \qquad \textit{Maß für die mittlere Blocklänge, unabhängig von } n \textit{ (} n \textit{ groß!)} \quad \sigma << 1$$

$$\sigma = 10^{-6} \Rightarrow \sigma^{-\frac{1}{2}} = 1000$$

$$\sigma = 10^{-4} \Rightarrow \sigma^{-\frac{1}{2}} = 100$$

Keimbildung ↔ Entropie in 1D Systemen – kein 'Phasenübergang' möglich

Defizite der Zipper / Ising Modelle

Sowohl beim Zipper-Modell als auch bei der Ising-Kette wird nicht berücksichtigt, dass der Nukleationskeim zur Bildung eines helikalen Bereiches aus vier Segmenten, also einer Helixwindung, besteht. Für lange Ketten ist diese Vereinfachung übrigens belanglos. Um dieses Detail zu berücksichtigen, müssen die statistischen Gewichte nicht nur vom vorhergehenden Segment abhängen, sondern von den drei vorhergehenden Segmenten. Beim Zipper-Modell ergibt sich dann das folgende Bild:

Die Wahrscheinlichkeit für k helikale Segmente ist gegeben durch:

$$p(k) = \frac{(n-k+1)g_k}{1+\sum(n-k+1)g_k} \ ,$$

Während im einfachen Modell $g_k = \sigma s^k$, gilt im Falle eines Keims aus vier Segmenten:

$g_1 = \sigma s$, $g_2 = \sigma^2 s^2$, $g_3 = \sigma^3 s^3$, $g_4 = \sigma^3 s^4$, $g_5 = \sigma^3 s^5$, $g_6 = \sigma^3 s^6 ...$

Mit der Boltzmann-Verteilung

$$p(k) = e^{-(E_k - E_0)/k_B T} \Rightarrow$$

erhält man für die Energie in Abhängigkeit von der Kettenlänge

$$\frac{E_k - E_0}{k_B T} = -\ln\left[(n-k+1)\frac{g_k}{g_0}\right] + const.$$

Die Energie steigt bis k = 4 an und fällt danach wieder ab. Es gibt also eine (freie) Enthalpiebarriere bei der Helixbildung, wie schon bei der Diskussion des molekularen Mechanismus beschrieben.

Proteinfunktion

Proteine spielen in praktisch allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. So sind sie für den Transport und die Speicherung lebenswichtiger Substanzen im Körper zuständig. Zum Beispiel ist das Hämoglobin der Träger des Sauerstoffs in den Erythrozyten, während das Myoglobin diese Aufgabe im Muskel wahrnimmt. Als weitere Aufgabe ist die Koordination von Bewegung zu nennen. Proteine sind die Hauptbestandteile von Muskelgewebe. Auch bei der Bewegung im mikroskopischen Bereich, wie z.B. bei der Wanderung der Chromosomen bei der Mitose, sind sie beteiligt. Die mechanische Stützfunktion von Kollagen in Haut und Knochen wurde schon erwähnt. Weitere Funktionen sind die Erzeugung und Übertragung von Nervenimpulsen, die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung oder die Immunabwehr. Antikörper sind hochspezifische Proteine, die Fremdsubstanzen (Viren, Bakterien, Zellen) erkennen und binden können. Eine wichtige Proteinfunktion ist ferner die enzymatische Katalyse.

Enzyme

Enzyme katalysieren fast alle chemischen Reaktionen in biologischen Systemen. Sie können die Reaktionsgeschwindigkeit um viele Größenordnungen beschleunigen. Enzyme haben ein aktives Zentrum, in dem das Substrat während der katalytischen Reaktion gebunden wird (z.B. der Sauerstoff durch Hämoglobin). Bei allosterischen Enzymen wird die katalytische Aktivität durch Regelungsmechanismen beeinflusst, die außerhalb des aktiven Zentrums im Molekül wirken. Fast alle Enzyme sind Proteine. Bevor enzymatische Reaktionen besprochen werden, soll im Folgenden auf einfache chemische Reaktionskinetiken eingegangen werden.

Konzepte der chemischen Kinetik

1. Unimolekulare Reaktion

Die einfachsten reversiblen Reaktionen sind Prozesse, bei denen nur ein Molekül beteiligt ist (z.B. Konformationsumwandlung von Konformation *A* zu *B*),

$$A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} B,$$

wobei k_i mikroskopische Ratenkoeffizienten darstellen. Die Ratengleichungen für die Konzentrationen der beiden Zustände *A* und *B* lauten (es gilt [*A*]+[*B*]=[*N*] = constant)

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] - k_{-1}[B]$$

$$\Rightarrow \quad -\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] + k_{-1}[A] - k_{-1}[N]$$

$$\Rightarrow \quad -\frac{d[A]}{dt} = \lambda[A] - k_{-1}[N],$$

mit $\lambda = k_1 + k_{-1}$, dem apparenten Ratenkoeffizienten. Die Lösung der Differentialgleichung ist

$$[A](t) = \Delta[A]_0 e^{-\lambda t} + [A]_{eq}.$$

Hier ist $[A]_{eq}$ die Gleichgewichtskonzentration und $\Delta[A]_0 = [A] - [A]_{eq}$ zur Zeit $t = 0$.

Abb. 4 zeigt schematisch die Lösung der Differentialgleichung. Die ursprüngliche Konzentration relaxiert exponentiell in den Gleichgewichtszustand.

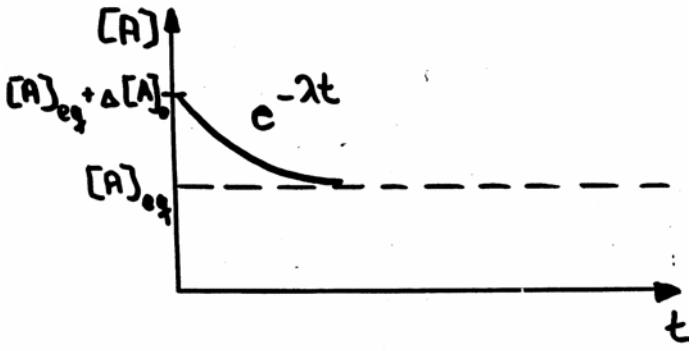


Abb. 4: Lösung der obigen unimolekularen Reaktionsgleichung.

2. Zwei gekoppelte Reaktionen

Nachfolgend wird eine sequenzielle Reaktion betrachtet:

$$A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} B \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} C .$$

Die Ratengleichungen sind dann

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] + k_{-1}[B] \ ,$$
$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] + k_{-2}[C] - (k_{-1} + k_2)[B] \ ,$$
$$\frac{d[C]}{dt} = k_2[B] - k_{-2}[C] .$$

Mit der Randbedingung $[A]+[B]+[C]=[N]$ = *constant* folgt für die Lösung (Variablentausch plus Bestimmen der Eigenwerte $\lambda_{1,2}$ der Derminante)

$$[A](t) = [A]_o + [A]_1 e^{-\lambda_1 t} + [A]_2 e^{-\lambda_2 t} ,$$

$$[B](t) = [B]_o + [B]_1 e^{-\lambda_1 t} + [B]_2 e^{-\lambda_2 t} ,$$

wobei $[A]_{1,2}$ und $[B]_{1,2}$ durch die Anfangsbedingungen gegeben sind.

3. Einfache bimolekulare Reaktion

Die bimolekulare Reaktion zwischen dem Substrat *S* und dem Enzym *E* sei

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} X \ ,$$

wobei *X* der Enzym-Substratkomplex ist. Die zu lösende Differentialgleichung ist dann

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[X] .$$

Die Erhaltungssätze liefern $[E]_0 = [E] + [X]$ und $[S]_0 = [S] + [X]$. Hierbei sind $[E]_0$ und $[S]_0$ die Konzentrationen des gesamten Enzyms bzw. Substrats. Es existiert keine analytische Lösung dieser Gleichung für allgemeine Randbedingungen.
Für den Spezialfall $[E]_0 = [S]_0$, und $[X] = 0$ bei $t = 0$ ergibt sich eine analytische Lösung, die aber komplex und unhandlich ist. Deshalb werden Experimente oft so durchgeführt, dass zeitunabhängige Lösungen oder Lösungen nahe des Gleichgewichts verwendet werden können.

4. Einfache Enzymreaktion

Betrachtet wird folgende enzymatische Reaktion

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} X \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} E + P .$$

Hier stellt *P* das Produkt der Reaktion dar. Die Ratengleichungen sind

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[X] \qquad \textbf{Gleichung 1}$$

$$-\frac{d[X]}{dt} = -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[X] - k_{-2}[E][P] \ .$$

Für diese Gleichungen existieren keine analytischen Lösungen. Selbstverständlich ist es stets möglich, numerische Lösungen zu finden. Für den Sonderfall $k_1 = k_{-2}$ können allerdings analytische Lösungen berechnet werden. Für diesen Fall zeigt Abb. 5 den zeitlichen Verlauf von [*X*] und [*P*] für konkrete *k*-Werte.

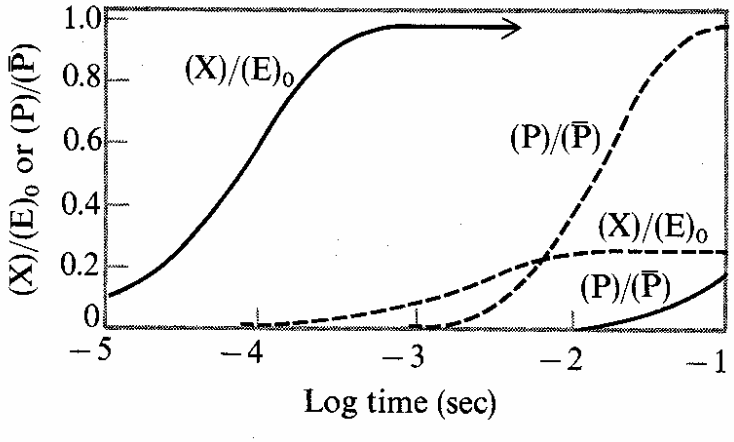


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der normierten Größen *X* und *P*. Für die durchgezogene Kurve gilt $S_0 >> E_0$, für die gestrichelte $S_0 = E_0$.

Die Abbildung zeigt, dass für $[E]_0 << [S]_0$ schon nach relativ kurzer Zeit d[*X*]/dt = 0 ist. Es gilt generell, dass sich schnell ein Gleichgewicht für den Enzymkomplex einstellt, falls die Menge des Substrats sehr viel größer ist als die des Enzyms. Für das Substrat gilt dann näherungsweise $[S] = [S]_0$, und für das Produkt *P* kann für kleine Zeiten [*P*] = 0 angenommen werden. Dann folgt

$$[X] = \frac{k_1[E][S]_0}{k_{-1} + k_2} \quad \Rightarrow \quad [E]_0 = [E] + [X] = [E](1 + \frac{k_1[S]_0}{k_{-1} + k_2})$$

$$[E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_1[S]_0}{k_{-1} + k_2}} \qquad \textbf{Gleichung 2}$$

$$[X] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1[S]_0}} \ . \qquad \textbf{Gleichung 3}$$

Durch Einsetzen der Gleichungen 2 und 3 in **Gleichung 1** folgt daraus für die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit v_i die Michaelis-Menten-Gleichung,

$$v_i = -\frac{d[S]}{dt}\Big|_{t=0} = v_{\max} \frac{[S]_0}{K_m + [S]_0} \ , \qquad \textbf{Gleichung 4}$$

wobei $v_{\max} = k_2[E]_0$ und $K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$ ist.

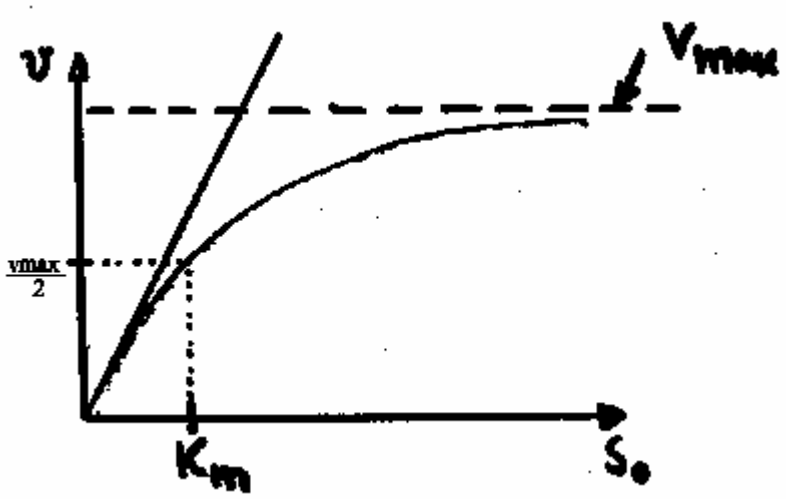


Abb. 6: Reaktionsgeschwindigkeit für kleine Zeiten in Abhängigkeit von $[S]_0$.

Abb. 6 zeigt v_i in Abhängigkeit von $[S]_0$.

Einige Bemerkungen:

- Für die Besetzungswahrscheinlichkeit der aktiven Zentren gilt

$$\frac{[X]}{[E]_0} = \frac{[S]_0}{K_m + [S]_0} = \frac{v}{v_{\max}}.$$

- K_m ist die Konzentration an Substrat, bei der 50% der aktiven Zentren besetzt sind ($K_m \sim 10^{-1}...10^{-6}$ M).
- Für $k_{-1} >> k_2$ ist $K_m = k_{-1} / k_1$ der Dissoziationskoeffizient des Komplexes X. Ist K_m groß (klein), so ist die Bindung des Substrats schwach (stark).
- $v_i = v_{max} = k_2[E]_0$, wenn alle Zentren gefüllt sind. Typischerweise ist $k_2 \sim 10^4\ s^{-1}$.
- Unter physiologischen Bedingungen ist die Besetzungswahrscheinlichkeit oft sehr gering, und k_2 ist nicht charakteristisch für die Effizienz. Für $[S]_0 << [K_m]_0$ gilt gemäß Gleichung 4

$$v_i = \frac{k_2}{K_m}[E]_0[S]_0.$$

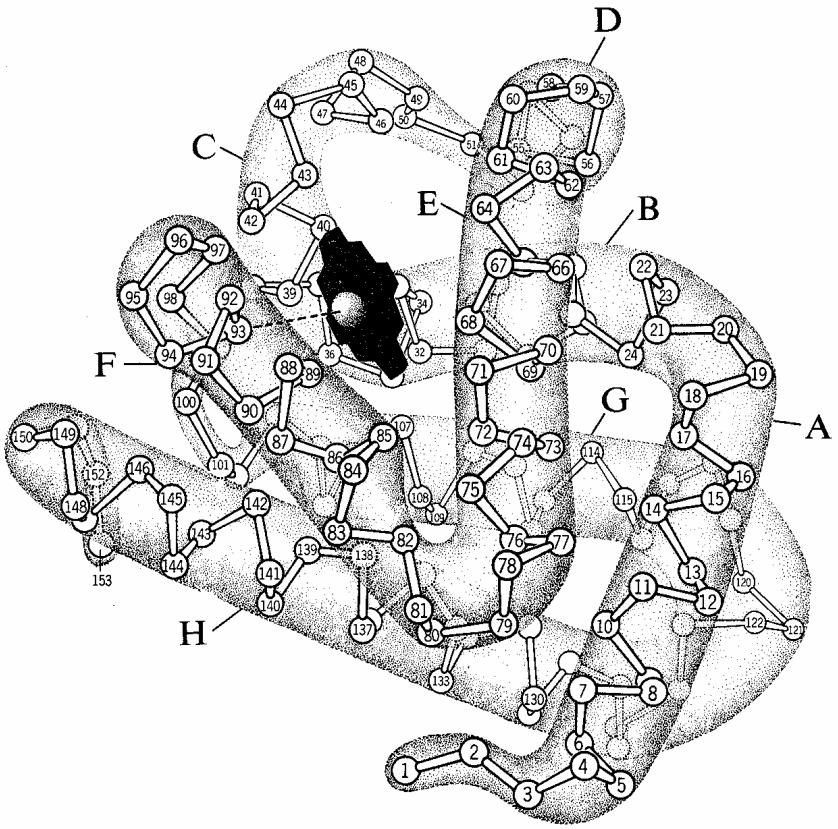
Der Ausdruck $\frac{k_2}{K_m} = \frac{k_1}{k_2 + k_{-1}} k_2$ wird auch 'performance number' genannt. Er ist eine geeignete Größe, die Reaktionsgeschwindigkeit zu beschreiben. Folgende Liste zeigt einige Beispiele für k_2.

Proteine	k_2 [s^{-1}]
Katalase	$4*10^7$
Urease	10^4
Ribonuclease	10^2-10^4
Carboxypeptidase	10^2

Bei hohen Werten von k_2 ist die Effizienz eines Enzyms limitiert, da k_1 durch die Diffusion auf $10^8...10^9\ M^{-1}s^{-1}$ begrenzt ist.

Die Sauerstofftransportmoleküle – Hämoglobin und Myoglobin

Der Übergang von der anaeroben zur aeroben Lebensweise stellt einen sehr wichtigen Schritt in der Evolution dar. Es lässt sich in Anwesenheit von Sauerstoff 18-mal mehr Energie aus Glukose gewinnen. Die Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff erfolgt bei den Wirbeltieren durch aktiven Transport des Sauerstoffs im Kreislaufsystem mit Hilfe von Sauerstoff bindenden Molekülen. Das Hämoglobin transportiert den Sauerstoff in den Erythrozyten des Blutes und spielt auch eine wichtige Rolle beim Kohlendioxid- und Protonentransport. Das Myoglobin speichert den vom Hämoglobin gelieferten Sauerstoff im Muskel. Die Fähigkeit von Hämoglobin und Myoglobin, Sauerstoff zu binden, beruht auf der Anwesenheit des Hämmoleküls. Auch viele andere Proteine benötigen für ihre Funktion solche als ´prosthetische Gruppen´ bezeichnete Einheiten. Sie sind auch für die charakteristische Farbe des Myoglobins und des Hämoglobins verantwortlich. Abb. 7 zeigt das Myoglobinmolekül mit dem Häm. Das Häm besteht aus einem Eisenatom und einem organischen Teil, dem Protoporphyrin IX, das aus 4 Pyrrolringen zusammengesetzt ist (Abb. 8). Das Eisenatom ist mit 4 seiner 6 Koordinationsstellen an die Stickstoffatome der Pyrrolringe gebunden. Die anderen beiden Bindungsmöglichkeiten sind senkrecht (auf beiden Seiten) zur Hämebene



angeordnet.

Abb. 7: Tertiärstruktur des Myoglobins. Schwarz eingezeichnet ist die Hämgruppe. Die α-Helices sind von A bis H gekennzeichnet, die α-Kohlenstoffe sind durchnummeriert.

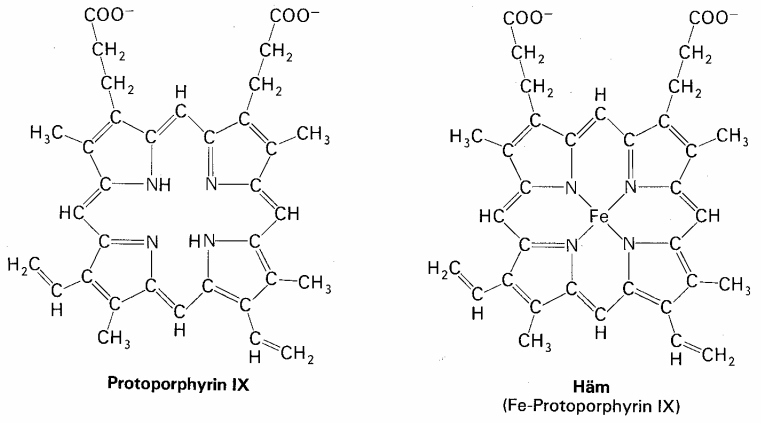


Abb. 8: Das Protoporphyrin IX und das Häm.

Die Hämgruppe liegt in einer Tasche im Myoglobinmolekül. Das Häm ist über das Eisen kovalent an einen Histidinrest (das proximale Histidin oder Histidin F8 (8. Aminosäure der Helix *F*)) gebunden. An einen zweiten Histidinrest (das distale Histidin oder Histidin E7), der auf der anderen Seite der Hämebene liegt, ist das Eisen nicht gebunden. Auf der distalen Seite kann an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens der Sauerstoff binden (Abb. 9). Der Polypeptidteil des Myoglobins sorgt dafür, dass die Affinität für den Sauerstoff (im Vergleich zu Kohlenmonoxid) verbessert wird. Der Grund ist nicht in der sterischen Behinderung, sondern in der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoff und dem distalen Histidin zu suchen.

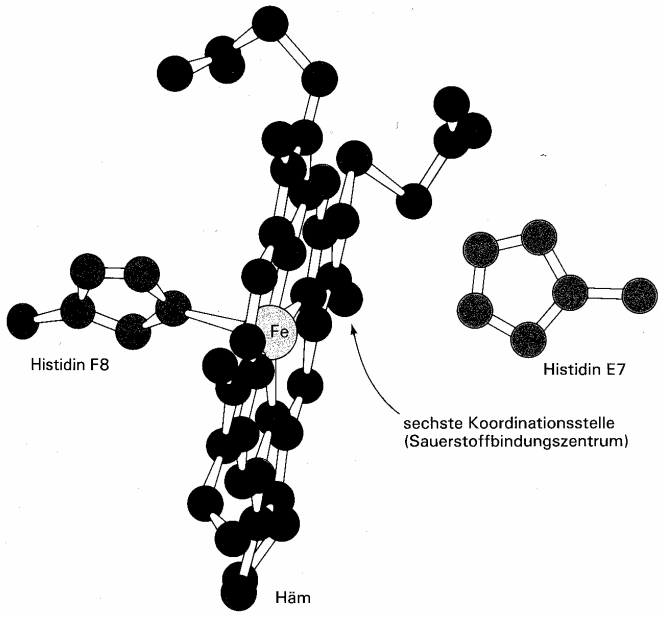


Abb. 9: Modell des Häms mit der Sauerstoffbindungsstelle, dem distalen (E7) und dem proximalen Histidin (F8).

Bindung des Sauerstoffs an Myoglobin und Hämoglobin

Die Bindung von Sauerstoff an Myoglobin kann mit einer einfachen Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden:

$$Mb + O_2 \underset{\lambda_{off}}{\overset{\lambda'_{on}}{\rightleftarrows}} MbO_2 .$$

Der Ratenkoeffizient für die Bindung wird mit λ'_{on} (Einheit: $M^{-1}s^{-1}$) und der für die Dissoziation mit λ_{off} (Einheit: s^{-1}) bezeichnet. Die Ratengleichung lautet dann

$$-\frac{d[Mb]}{dt} = \frac{d[MbO_2]}{dt} = \lambda'_{on}[Mb][O_2] - \lambda_{off}[MbO_2].$$

Für das Gleichgewicht (d[*Mb*]/dt = 0) folgt

$$\Lambda_a = \frac{\lambda'_{on}}{\lambda_{off}} = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]} \qquad \text{Gleichgewichtskonstante für Bindung}$$

$$\Lambda_d = \Lambda_a^{-1} \qquad \text{Gleichgewichtskonstante für Dissoziation}$$

Die Sauerstoffsättigung *Y* des Myoglobins ist dann gegeben durch

$$Y = \frac{[MbO_2]}{[Mb]+[MbO_2]} = \frac{\Lambda_a[Mb][O_2]}{\Lambda_a[Mb][O_2]+[Mb]} ,$$

$$= \frac{\Lambda_a[O_2]}{\Lambda_a[O_2]+1} = \frac{[O_2]}{\Lambda_d+[O_2]} .$$

Aufgrund der Proportionalität der Sauerstoffkonzentration in der Lösung mit dem Partialdruck p_{0_2} des Sauerstoffs über der Lösung gilt

$$Y = \frac{p_{0_2}}{p_{1/2} + p_{0_2}}.$$

$p_{1/2}$ ist der Sauerstoffpartialdruck, bei dem der Sättigungsgrad 50% beträgt. Mit dieser Gleichung lässt sich die experimentelle Sauerstoffdissoziationskurve des Myoglobins beschreiben, (Abb. 10). Allerdings ist dies für Hämoglobin nicht der Fall.

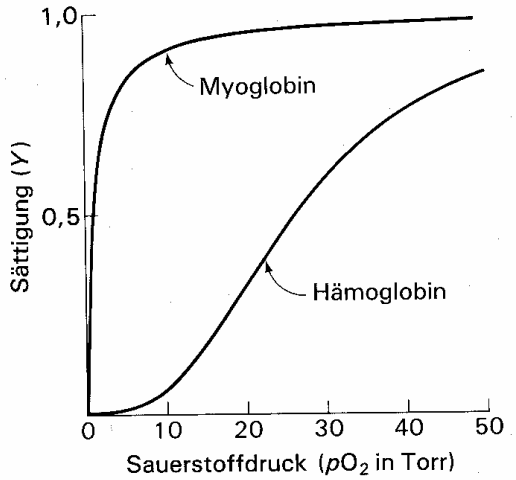


Abb. 10: Sauerstoffdissoziationskurven von Myoglobin und Hämoglobin.

Kooperativität

Im Hämoglobin gibt es vier Untereinheiten, die miteinander wechselwirken und sich in der Affinität gegenseitig beeinflussen. Dieses Phänomen wird als Kooperativität bezeichnet, es ist verantwortlich für den sigmoiden Kurvenverlauf in Abb. 10. Das Anbinden des ersten Liganden ist erschwert, da ein Teil der Energie, die bei der Bindung frei wird, für Konformations-änderungen aufgewendet werden muss. Dies ist auch bei der Bindung des zweiten und dritten Liganden der Fall, allerdings in geringerem Maße. Bei dem vierten Liganden spielt das keine Rolle mehr. Die Affinität einer Bindungsstelle für Sauerstoff hängt also vom Beladungszustand der anderen Bindungsstellen ab.

Im Jahre 1913 setzte Archibald Hill folgendes hypothetische Gleichgewicht an,

$$Hb + nO_2 \rightleftarrows Hb(O_2)_n . \qquad \mathbf{1}$$

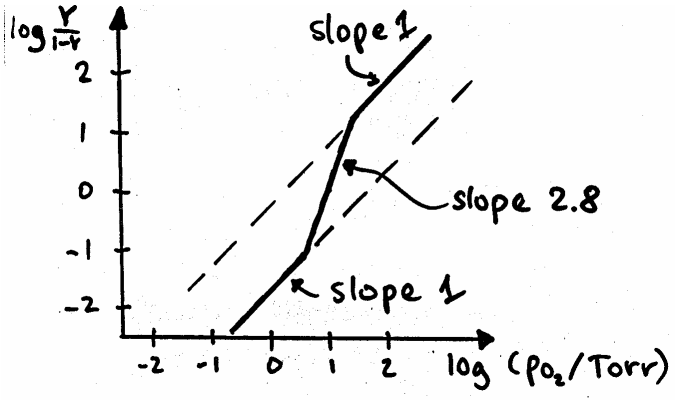
Es ergibt sich für die Sauerstoffsättigung

$$Y = \frac{(p_{0_2})^n}{(p_{1/2})^n + (p_{0_2})^n} , \qquad \mathbf{2}$$

bzw.

$$\frac{Y}{1-Y} = (\frac{p_{0_2}}{p_{1/2}})^n . \qquad \mathbf{3}$$

Wird nun der Logarithmus auf beide Seiten angewandt und log(Y/(1-Y)) gegen den Logarithmus des Sauerstoffpartialdrucks aufgetragen, so erhält man den sogenannten Hill-Plot. Daraus kann die Steigung *n* bei *Y* = 0.5, der Hillkoeffizient, entnommen werden. Dieser Wert gibt das Ausmaß der Kooperativität an, wobei der größtmögliche Wert gleich der Anzahl der Bindungsstellen ist (also 4 für Hämoglobin). Für Myoglobin erhält man *n* = 1 und für Hämo -



globin *n* ≈ 2.8 (Abb. 11).

Abb. 11: Experimentell gemessener Hill-Plot für Hämoglobin.

Beachte, dass der Hill-Ansatz eine Reaktion mit *n* Sauerstoff-Molekülen annimmt, ungeachtet des Beladungszustandes des Hämoglobins. Das Phänomen der Kooperativität ist also gar nicht berücksichtigt. Man erkennt das Vorhandensein von Kooperativität letztlich aus der Abhängigkeit des Kooperativitätsparameters *n* vom Sauerstoff-Partialdruck. Allerdings ist die Parametrisierung mit Hilfe des Kooperativitätsparameters sehr nützlich im Vergleich

verschiedener Hämoglobine (und allgemein kooperativer Enzyme), was die weite Verbreitung dieses Ansatzes erklärt.

Adair-Schema der Kooperativität von Hämoglobin

Adair (1925) stellte 4 Reaktionsgleichungen mit 4 Gleichgewichts-Dissoziationskoeffizienten Λ_d auf:

$$H_0 + O_2 \rightleftarrows H_1 \qquad \Lambda_{d,1} = \frac{[H_0]\cdot pO_2}{[H_1]}$$

$$H_1 + O_2 \rightleftarrows H_2 \qquad \Lambda_{d,2} = \frac{[H_1]\cdot pO_2}{[H_2]}$$

$$H_2 + O_2 \rightleftarrows H_3 \qquad \Lambda_{d,3} = \frac{[H_2]\cdot pO_2}{[H_3]}$$

$$H_3 + O_2 \rightleftarrows H_4 \qquad \Lambda_{d,4} = \frac{[H_3]\cdot pO_2}{[H_4]}$$

Durch wiederholtes Einsetzen von $[H_1] = \frac{[H_0]\cdot pO_2}{\Lambda_1}$ erhält man:

$$[H_2] = \frac{[H_0]\cdot pO_2^2}{\Lambda_1\Lambda_2}$$

$$[H_3] = \frac{[H_0]\cdot pO_2^3}{\Lambda_1\Lambda_2\Lambda_3}$$

$$[H_4] = \frac{[H_0]\cdot pO_2^4}{\Lambda_1\Lambda_2\Lambda_3\Lambda_4}$$

Eine Komplikation ergibt sich dadurch, dass die makroskopischen Gleichgewichtskoeffizienten Λ_i noch in mikroskopische Koeffizienten γ_i überführt werden müssen. So gilt zum Beispiel für die mit einem O_2 - Liganden beladene Form,

$$\Lambda_1 = \frac{[H_0]\cdot pO_2}{[H_{11}]+[H_{12}]+[H_{13}]+[H_{14}]},$$

da es vier Mikrozustände $H_{11}...H_{14}$ mit einem gebunden Liganden gibt. Für den einzelnen Mikrozustand ist der Gleichgewichtskoeffizient $\gamma_{1j} = \frac{H_0 pO_2}{H_{1j}}$.

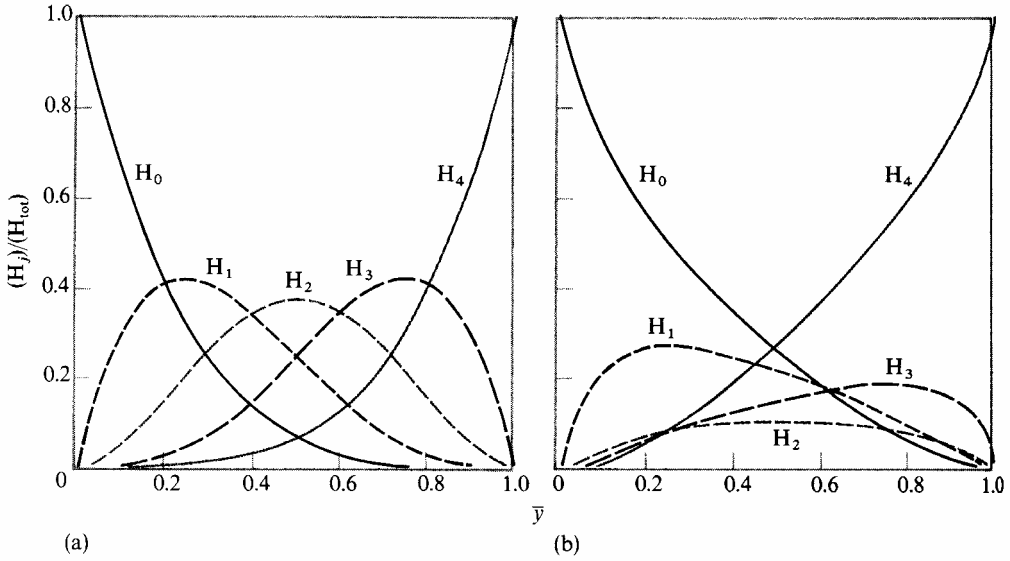
Mit der Annahme gleicher Bindungseigenschaften der Mikrozustände

gilt: $\Lambda_i = \frac{\Omega_{4,i-1}}{\Omega_{4,i}}\gamma_i$, wobei $\Omega_{4,i} = \frac{4!}{(4-i)!i!}$ ist.

Für den Sättigungsgrad Y folgt daher:

$$Y = \frac{[H_1]+2[H_2]+3[H_3]+4[H_4]}{4([H_0]+[H_1]+[H_2]+[H_3]+[H_4])} = \frac{\frac{pO_2}{\gamma_1}+\frac{3pO_2^2}{\gamma_1\gamma_2}+\frac{3pO_2^3}{\gamma_1\gamma_2\gamma_3}+\frac{pO_2^4}{\gamma_1\gamma_2\gamma_3\gamma_4}}{1+\frac{4pO_2}{\gamma_1}+\frac{6pO_2^2}{\gamma_1\gamma_2}+\frac{4pO_2^3}{\gamma_1\gamma_2\gamma_3}+\frac{pO_2^4}{\gamma_1\gamma_2\gamma_3\gamma_4}}$$

Mit diesem Ausdruck können Sättigungskurven angepasst werden. Abb. 12 a zeigt die relativen Anteile der Spezies H_0 bis H_4 für gleiche Koeffizienten γ, während in Abb. 12 b γ_1



= 42 Torr, γ_2 = 13 Torr, γ_3 = 12 Torr, γ_4 = 0.14 gewählt wurde, um eine optimale Anpassung an experimentelle Daten zu erzielen.

Abb. 12: Relative Anteile der Spezies H_0 – H_4 als Funktion des Sättigungsgrades *Y*.

In beiden Fällen sieht man, dass bei niedrigen (hohen) Sättigungen die Spezies H_0 (H_4) dominiert, während insbesondere bei den Daten in Abb. 12 b die Spezies $H_1 - H_3$ nur wenig Gewicht haben. Es zeigt sich die Tendenz zu einem „alles-oder-nichts"-Verhalten.

Bohr-Effekt

Beim Hämoglobin wird die Sauerstofffreisetzung durch ein saures Milieu begünstigt. Eine Erniedrigung des pH-Wertes verschiebt die Sauerstoffdissoziationskurve daher nach rechts (Abb. 13). Diese Beziehungen zwischen der Bindung von Sauerstoff, von Protonen und Kohlendioxid wird Bohr-Effekt genannt.

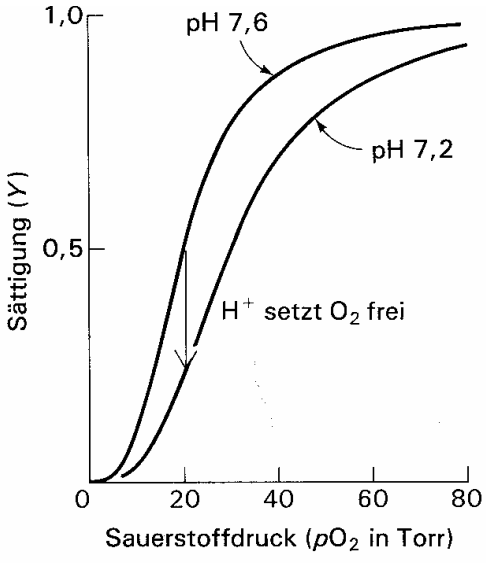


Abb. 13: **Effekt des pH-Wertes auf die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin. Wird der pH-Wert von 7.6 auf 7.2 gesenkt, so wird mehr Sauerstoff im Gewebe freigesetzt.**

Energiekopplung bei der Ligandenbindung

Gregorio Weber hat 1975 die gekoppelte Bindung zweier Liganden (L_1, L_2) an ein Makromolekül (M) durch Betrachtung der freien Enthalpie untersucht. Ein Beispiel dafür ist die Bindung von Sauerstoff und 2,3-Diphosphoglycerat (DPG, auch: BPG) an Hämoglobin. Ein Hämoglobintetramer kann ein DPG-Molekül binden, für das es eine spezifische Bindungsstelle gibt. Die Bindung von DPG hat einen großen Einfluss auf die Sauerstoffbindung des Hb (**DPG-Effekt**). Es vermindert die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins um den Faktor 26. Die möglichen Gleichgewichtsreaktionen sind

$$M + L_1 \rightleftarrows ML_1 \qquad \Delta G_1^0 ,$$

$$M + L_2 \rightleftarrows L_2M \qquad \Delta G_2^0 ,$$

$$L_2M + L_1 \rightleftarrows L_2ML_1 \qquad \Delta G_1^0(2) ,$$

$$ML_1 + L_2 \rightleftarrows L_2ML_1 \qquad \Delta G_2^0(1) ,$$

wobei die freien Reaktionsenthalpien rechts neben den Reaktionsgleichungen stehen. $\Delta G_1^0(2)$ ist z.B. die freie Reaktionsenthalpie für die Bindung von L_1 an M, das schon mit L_2 gesättigt ist. Die freien Enthalpien sind nicht unabhängig, sondern es gilt

$$\Delta G_1^0 + \Delta G_2^0(1) = \Delta G_2^0 + \Delta G_1^0(2) = \Delta G^0(1,2) . \qquad \textbf{Gleichung 5}$$

Hier ist $\Delta G^0(1,2)$ die freie Enthalpie für die Reaktion $L_1 + L_2 + M \rightleftarrows L_2ML_1$. Außerdem gilt

$$\Delta G_1^0(2) - \Delta G_1^0 = \Delta G_2^0(1) - \Delta G_2^0 = \Delta G_{1,2}^0 , \qquad \textbf{Gleichung 6}$$

wobei $\Delta G_{1,2}^0$ den gegenseitigen Effekt der Liganden aufeinander beschreibt. Mit Gleichung 5 und Gleichung 6 ergibt sich ebenso

$$\Delta G_{1,2}^0 = \Delta G^0(1,2) - \Delta G_1^0 - \Delta G_2^0 . \qquad \textbf{Gleichung 7}$$

Das bedeutet, falls $\Delta G_{1,2}^0$ gleich Null ist, besteht keine Wechselwirkung zwischen den Liganden. Für $\Delta G_{1,2}^0 < 0$ erleichtert die Bindung des einen Liganden die Bindung des anderen, und für $\Delta G_{1,2}^0 > 0$ besteht eine antikooperative Wechselwirkung.

Eine andere Möglichkeit, diese kooperative Bindung zu betrachten, geht von folgenden Gleichgewichten aus:

$$L_1 + L_2 + M \rightleftarrows L_2ML_1 \qquad \Delta G^0(1,2) \qquad \textbf{Gleichung 8}$$

$$M + L_1 \rightleftarrows ML_1 \qquad \Delta G_1^0 \qquad \textbf{Gleichung 9}$$

$$M + L_2 \rightleftarrows L_2M \qquad \Delta G_2^0 . \qquad \textbf{Gleichung 10}$$

Die Subtraktion von Gleichung 9 und Gleichung 10 von Gleichung 8 ergibt

$$ML_1 + L_2M \rightleftarrows L_2ML_1 + M ,$$

$$\Delta G^0(1,2) - \Delta G_1^0 - \Delta G_2^0 = \Delta G_{1,2}^0 .$$

Diese Reaktion hat die Gleichgewichtskonstante K_{12},

$$K_{12} = \exp(-\Delta G^0_{1,2} / RT) = \frac{[L_2ML_1][M]}{[ML_1][L_2M]} \ .$$

Daraus folgt, dass, falls $\Delta G^0_{1,2} < 0$ bzw. $K_{12} > 1$, $[L_2ML_1]$ und $[M]$ gegenüber den halbgesättigten Formen bevorzugt werden. Nun ist es interessant zu untersuchen, wie groß $\Delta G^0_{1,2}$ sein muss, um die Verteilungen der Liganden signifikant zu verändern. Dazu werden folgende Teilsättigungen definiert,

$$Y_1 = \frac{[L_2ML_1] + [ML_1]}{[M_{tot}]} \ ,$$

$$Y_2 = \frac{[L_2ML_1] + [L_2M]}{[M_{tot}]} \ ,$$

$$Y_{12} = \frac{[L_2ML_1]}{[M_{tot}]} \ ,$$

und $[M_{tot}] = [M] + [ML_1] + [L_2M] + [L_2ML_1]$. Werden nun $[L_1]$ und $[L_2]$ so eingestellt, dass $Y_1 = Y_2 = 0.5$ gilt, so folgt

$$K_{12} = \frac{Y_{12}^2}{(0.5 - Y_{12})^2} \ ,$$

$$\Delta G^0_{1,2} = -2RT \ln (2Y_{12} / (1 - 2Y_{12})) \ .$$

Abb. 14 zeigt $\Delta G^0_{1,2}$ in Abhängigkeit vom Grad der (doppelten) Sättigung von *M* (Y_{12}).

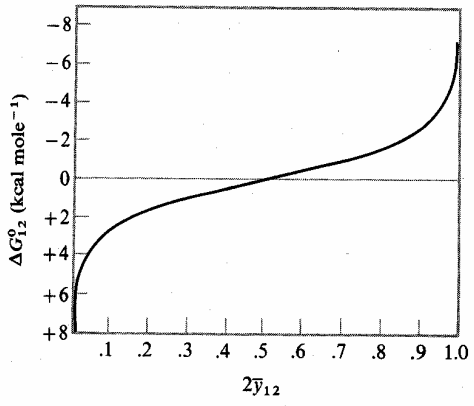


Abb. 14: $\Delta G^0_{1,2}$ in Abhängigkeit von Y_{12}.

Für $2Y_{12}$ = 1(0) liegen alle gebundenen Liganden in der Form L_2ML_1 (ML_1 und L_2M) vor. Ist dieser Wert gleich 0.5, so ist keine Kopplung vorhanden, d.h. alle Formen sind mit der gleichen Wahrscheinlichkeit vertreten. Abb. 14 zeigt außerdem, dass schon kleine Änderungen der freien Enthalpie zu großen Verschiebungen in der Ligandenbindung führen können.

Nucleinsäuren

Nucleinsäuren sind für die Speicherung und den Transport der genetischen Information zuständig. Auch sind sie an der Proteinbiosynthese beteiligt. Man unterscheidet DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure). Die Gene aller Zellen bestehen aus DNA. Sie ist ein sehr langes, fadenförmiges Makromolekül, das aus zahlreichen Desoxyribonukleotiden besteht. Diese wiederum sind aus einer Base, einem Zucker und einer Phosphatgruppe aufgebaut. Die Basen sind die Träger der genetischen Information, während die Zucker und Phosphate strukturelle Aufgaben erfüllen.

Primärstruktur

Die Primärstruktur einer Nucleinsäurekette ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Die Phosphat- und Zuckergruppen bilden das Gerüst, und die verschiedenen Basen sind symbolisch dargestellt. Der Zuckeranteil besteht aus der Desoxyribose, die ein Sauerstoffatom weniger besitzt als die Ribose (Abb. 2). Die stickstoffhaltigen Basen sind Derivate des Purins oder des Pyrimidins. Als Purine kommen in der DNA Adenin (A) und Guanin (G), als Pyrimidine Thymin (T) und Cytosin (C) und in der RNA das Uracil (U) anstelle des Thymins vor (Abb. 2).

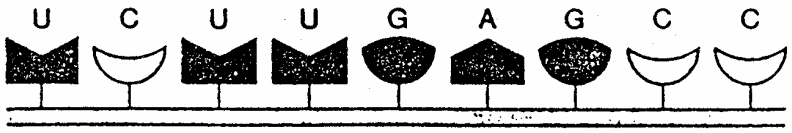


Abb. 1: Die schematische Darstellung der Primärstruktur einer Nukleinsäure.

In einem Desoxyribonukleotid ist das C1'-Atom der Desoxyribose mit dem N1-Atom eines Pyrimidins oder dem N9-Atom eines Purins verbunden. (Mit einem Strich werden die Atome des Zuckers, ohne Strich die des Purin- oder Pyrimidinrings bezeichnet.)
Ein Nukleosid besteht aus einer an einen Zucker gebundenen Purin- oder Pyrimidinbase. Ein Phosphatester eines Nukleosids wird Nukleotid genannt. In natura ist gewöhnlich die OH-Gruppe am C5'-Atom des Zuckers mit einer oder mehreren Phosphatgruppen verestert. Solche Moleküle werden 5'-Nucleotide genannt.

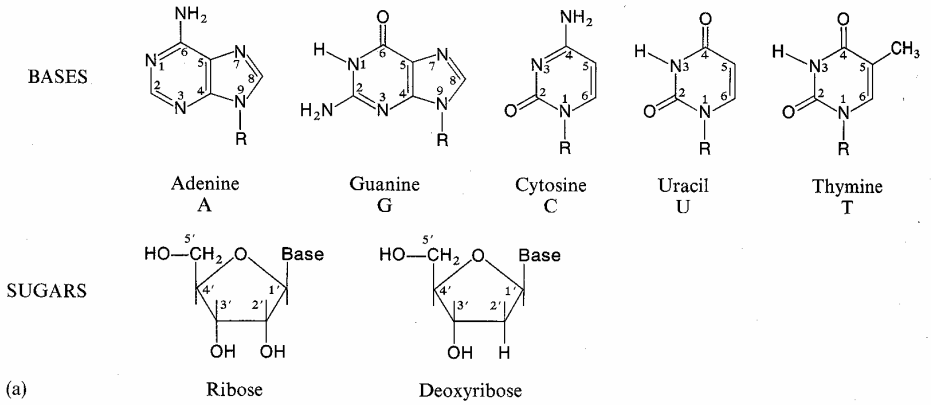
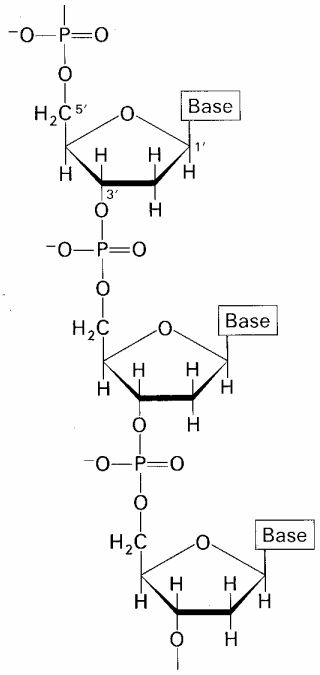


Abb. 2: Struktur der Nukleinsäurenbestandteile: die gewöhnlichen Basen und Zucker.



Das Rückgrat des DNA-Moleküls wird über Desoxyriboseeinheiten, die über Phosphatgruppen verknüpft sind, gebildet. Eine Phosphodiesterbrücke verbindet die 3'-Hydroxylgruppe einer Zuckereinheit mit der 5'-Hydroxylgruppe des nächsten Zuckers. Der variable Anteil der DNA ist die Sequenz der vier verschiedenen Basen. Diese Struktur ist in Abb. 3 zu sehen.

Wie die Polypeptide hat auch die DNA-Kette einen Richtungssinn, da das eine Ende der Kette mit einer 3'-Hydroxylgruppe, das andere Ende mit einer 5'-Hydroxylgruppe enden muss. Nach Übereinkunft schreibt man die Basensequenz in der 5' ⇒ 3'-Richtung. (Vergleiche: die Aminosäuresequenz eines Proteins wird in der Amino ⇒ Carboxylrichtung geschrieben.)

Abb. 3: Primärstruktur einer DNA.

Sekundärstruktur

Die dreidimensionale Struktur der DNA wurde 1953 von James Watson und Francis Crick aufgrund von Röntgenbeugungsbildern aufgeklärt. Sie fanden, dass die DNA aus zwei helikalen Polynucleotidsträngen besteht, die sich um eine gemeinsame Achse winden und in entgegengesetzte Richtungen verlaufen. Das Skelettmodell der DNA ist in Abb. 4 dargestellt.

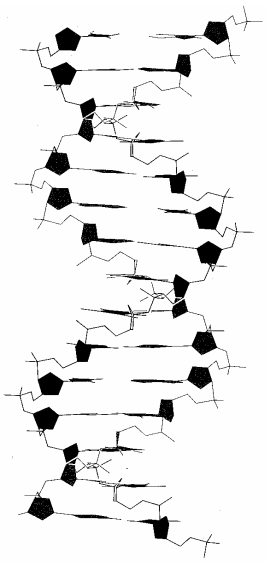


Abb. 4: Skelettmodell der B-DNA-Helix. Die Struktur wiederholt sich mit einer Periodizität von 10 Nukleotiden.

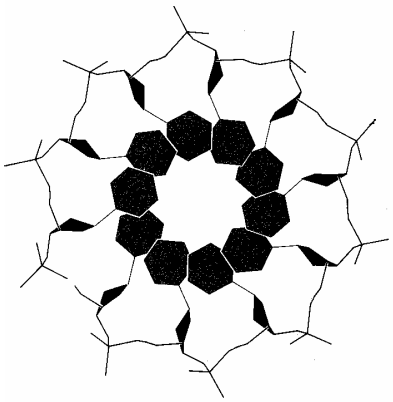


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Stranges einer DNA-Doppelhelix (entlang der Helixachse gesehen). Die Basen zeigen nach innen; das Zucker-Phosphat-Rückgrat liegt außen. Die zehnfache Symmetrie ist leicht zu erkennen.

Im Inneren der Helix befinden sich die Purin- und Pyrimidinbasen, während außen die Desoxyribose- und Phosphatreste zu finden sind (Abb. 5). Die Ringebenen der Basen stehen senkrecht zur Helixachse, und die Zucker stehen fast senkrecht zu den Basen. Die Reihenfolge der Basen, die die genetische Information repräsentiert, ist in keiner Weise eingeschränkt. Der Durchmesser der Helix ist ungefähr 2 nm. Jede Base ist um einen Winkel von 36° Grad gegenüber der benachbarten Base verdreht und 0.34 nm von ihr entfernt (in Bezug auf die Helixachse). Da eine volle Windung der Helix 10 Basen enthält, wiederholt sich die Struktur nach 3.4 nm. Wasserstoffbrücken halten die beiden Ketten der Doppelhelix zusammen (Abb. 6).

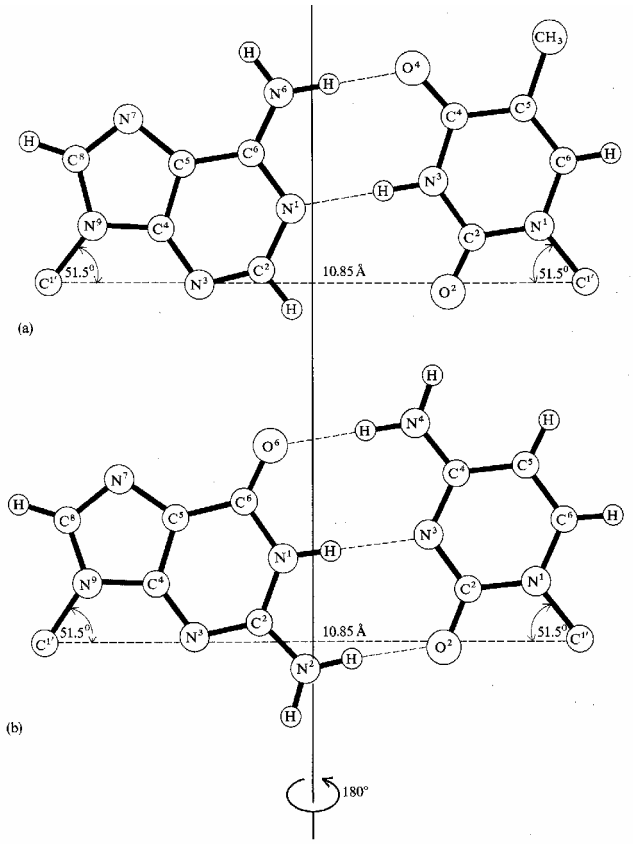


Abb. 6: Die atomaren Strukturen von Watson-Crick A-T (oben) und G-C (unten) Basenpaaren.

Adenin paart mit Thymin, Guanin mit Cytosin. Abb. 6 zeigt, dass die Abstände zwischen den C1'-Atomen der Zucker sowie die eingezeichneten Winkel bei A-T- und C-G-Paaren gleich sind. Somit lassen sich diese Basenpaare ohne Störung in die Doppelhelix integrieren.
Verschiedene helikale Anordnungen können mit Hilfe der Watson-Crick-Basenpaare aufgebaut werden. Außer der oben beschriebenen DNA-B mit 10 Einheiten pro Windung existiert z.B. auch eine DNA-A, die 11 Einheiten pro Windung besitzt. Hier sind die Basenpaare gegen die Helixachse um 20° geneigt. Die beiden Formen können durch Änderung der Hydratisierung ineinander überführt werden.

Tertiärstruktur

Die meisten RNA-Moleküle sind einzelsträngig, doch enthalten viele auch ausgedehnte Regionen mit Doppelhelixstruktur, die durch haarnadelähnliche Faltungen entstehen. Als Beispiel für die Tertiärstruktur einer Nukleinsäure ist in Abb. 7 die Hefe-Phenylalanin-tRNA gezeigt. Die Struktur der Hefe-tRNA ist viel stärker ausgedehnt als die von globulären Proteinen. Es existieren helikale Bereiche, die durch Wasserstoffbrücken verbunden sind sowie Bereiche ohne Wasserstoffbrücken, die für die Schleifenbildung zuständig sind. Die Sekundärstruktur hat eine Kleeblattform. Nur wenige Tertiärstrukturen von Nukleinsäuren sind bisher in atomarem Detail bekannt.

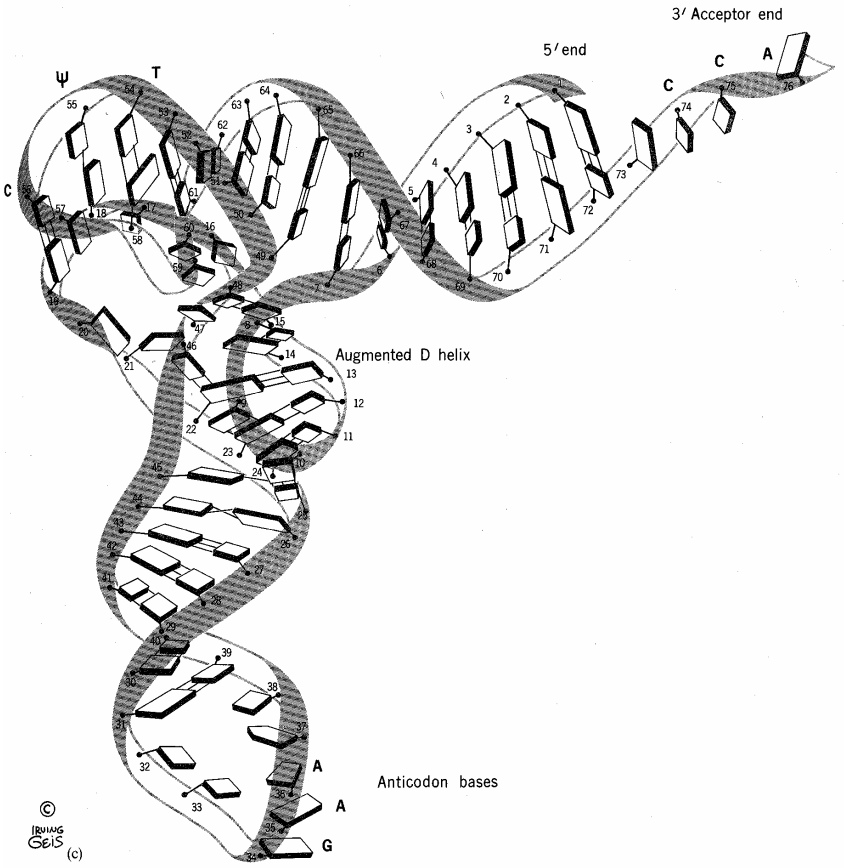


Abb. 7: Tertiärstruktur von Hefe-Phenylalanin-tRNA. Die Purine sind als rechtwinklige, Pyrimidine als quadratische Plättchen dargestellt. Wasserstoffbrücken sind durch Striche zwischen den Plättchen zu sehen.

Proteinbiosynthese

Die in der DNA gespeicherte genetische Information codiert die Abfolge von Aminosäuren in den Proteinen. In der Proteinbiosynthese wird die Reihenfolge der Basen (Basensequenz) in eine bestimmte Aminosäuresequenz übertragen. Allerdings wird die Proteinsynthese nicht direkt von einer DNA-Matrize bestimmt. Vielmehr ist dies ein komplexer, zweistufiger Prozess, an dem sowohl Proteine als auch RNA-Moleküle beteiligt sind.

$$\text{DNA} \xrightarrow[\text{Transkription}]{} \text{RNA} \xrightarrow[\text{Translation}]{} \text{Protein}$$

Im ersten Schritt, der Transkription, wird die Nukleinsäuresequenz eines Gens auf der DNA mit Hilfe einer RNA-Polymerase, einem Proteinkomplex, in eine korrespondierende RNA-Sequenz übertragen. Dieses RNA-Molekül kann selbst strukturelle Funktion haben, wie bei der Transfer-RNA (tRNA), die die Aminosäuren zu den Orten der Proteinbiosynthese, den Ribosomen, bringt. Ribosomen selbst sind Protein-RNA-Komplexe, bestehend aus einer großen Zahl von Proteinen sowie der ribosomalen RNA (rRNA). In der Tat übernimmt die rRNA die enzymatische Funktion der Polypeptidsynthese im Ribosom. RNA-Moleküle mit Enzymfunktion werden als ’Ribozyme’ bezeichnet. Ferner kann die RNA auch als Nachrichtenüberträger wirken. Dann wird sie Messenger-RNA (mRNA) genannt. Diese dient als Matrize zur Polymerisierung von Aminosäuren im Ribosom. Es gibt viele verschiedene tRNA-Moleküle (mindestens eine für jede Aminosäure) mit unterschiedlichen Anticodon-Basen (Abb. 7), die mit den drei Basen auf der mRNA Basenpaarung durchführen können. Jede tRNA wird durch spezifische Enzyme mit der dazugehörenden Aminosäure beladen. Somit kann durch sequentielles Anbinden von tRNAs an die mRNA und damit gekoppelter Polymerisation von Aminosäuren die Translation erfolgen.

Der genetische Code

Die Basensequenz eines Gens ist kollinear mit der Aminosäure des dazugehörigen Polypeptids. Der genetische Code gibt die Beziehung der Basensequenz der DNA und der Aminosäuresequenz der Proteine wieder. Er ist nahezu universell (Ausnahmen gibt es auch, z.B. bei den Mitochondrien in menschlichen Zellen). Gruppen aus jeweils drei Basen (Tripletts) codieren eine Aminosäure (Abb. 8).

Es existieren 3 Kettenterminationssignale, so dass 61 der 64 Codes die 20 verschiedenen Aminosäuren spezifizieren; der Code ist also entartet. Er ist dabei so organisiert, dass Mutationseffekte minimiert werden: Veränderungen der Basenkombination sind möglich, ohne dass die zu codierende Aminosäure verändert wird. So kommt es zum Beispiel bei einigen Aminosäuren überhaupt nicht darauf an, welche Base an der dritten Position im Triplett steht (z.B. Val), während bei anderen eine Purinbase (z.B. Arg) bzw. Pyrimidinbase (z. B. His) an Position 3 stehen muss. Bei Änderungen an Position 1 bleibt der Charakter der Aminosäure (hydrophob, polar, geladen) im Wesentlichen erhalten. Diese Redundanz ermöglicht der DNA nicht nur, eine sinnvolle Peptidsequenz zu codieren, sondern gleichzeitig eine geeignete, thermodynamisch stabile Nukleinsäuresequenz anzunehmen.

erste Position (5′-Ende)	zweite Position				dritte Position (3′-Ende)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Abb. 8: Der genetische Code.

Membranen und Lipide

Biologische Membranen sind hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen aufgebaut. Sie werden durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten. Abb. 9 zeigt eine schematische Darstellung.

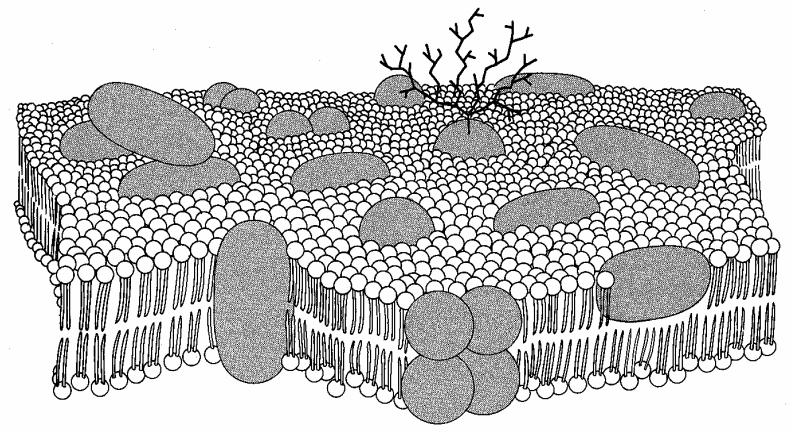


Abb. 9: Modell der Struktur einer biologischen Membran. In der Lipiddoppelschicht sind die Proteine (als Sphäroide dargestellt) integriert.

Jede lebende Zelle ist von einer äußeren Membran (der Plasmamembran) umgeben. Membranen sind für Lebensprozesse unerlässlich, denn sie grenzen die Zellen von ihrer Umgebung ab; sie verleihen ihnen Individualität. Sie sind aber keine unpassierbaren Mauern, sondern für bestimmte Moleküle durchlässig. Membranen umschließen aber nicht nur eine ganze Zelle, sondern sie kommen auch innerhalb der Zelle vor. In Eukaryonten (Zellen mit Zellkern) sind auch der Zellkern und die Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Chloroplasten) von Membranen umgeben.

Tab. 1: Zusammensetzung verschiedener Zellmembranen in Gewichtsprozenten

Membrane	Protein (%)	Lipid (%)	Carbohydrate (%)	Ratio of protein to lipid
Myelin	18	79	3	0.23
Plasma membranes				
blood platelets	33–42	58–51	7.5	0.7
mouse liver cells	46	54	2–4	0.85
human erythrocyte	49	43	8	1.1
amoeba	54	42	4	1.3
rat liver cells	58	42	(5–10)[§]	1.4
L cells	60	40	(5–10)[§]	1.5
HeLa cells	60	40	2.4	1.5
nuclear membrane of rat liver cells	59	35	2.9	1.6
retinal rods, bovine	51	49	4	1.0
mitochondrial outer membrane	52	48	(2–4)[§]	1.1
Sarcoplasmic reticulum	67	33	—	2.0
Chloroplast lamellae, spinach	70	30	(6)[§]	2.3
Mitochondrial inner membrane	76	24	(1–2)[§]	3.2
Gram-positive bacteria	75	25	(10)	3.0
Halobacterium purple membrane	75	25	—	3.0
Mycoplasma	58	37	1.5	1.6

Außerdem wird der Informationsfluss zwischen Zellen und ihrer Umgebung von Membranen kontrolliert. Sie haben spezifische Rezeptoren für äußere Reize. Membransysteme sind auch für den Ablauf der beiden wichtigsten biologischen Energieumwandlungsprozesse essentiell: Die Photosynthese (Umwandlung von Licht in chemische Bindungsenergie) spielt sich in der inneren Membran der Chloroplasten, die oxidative Phosphorylierung (Erzeugung von ATP (Adenosintriphosphat) durch Oxidation von Brennstoffmolekülen) an der inneren Mitochondrienmembran ab.
Membranen sind schichtartige Strukturen, deren Dicke zwischen 6 und 10 nm liegt. Sie bestehen neben den oben erwähnten Lipiden und Proteinen auch aus Kohlenhydraten, die mit den Lipiden und Proteinen verknüpft sind. Das Gewichtsverhältnis von Proteinen und Lipiden liegt für die meisten biologischen Membranen zwischen 4:1 und 1:4 (Tab. 1).
Die Membranlipide sind relativ kleine Moleküle mit einem hydrophoben und einem hydrophilen Ende. In wässriger Lösung bilden die Lipide spontan geschlossene Doppelschichten aus (Abb. 10).

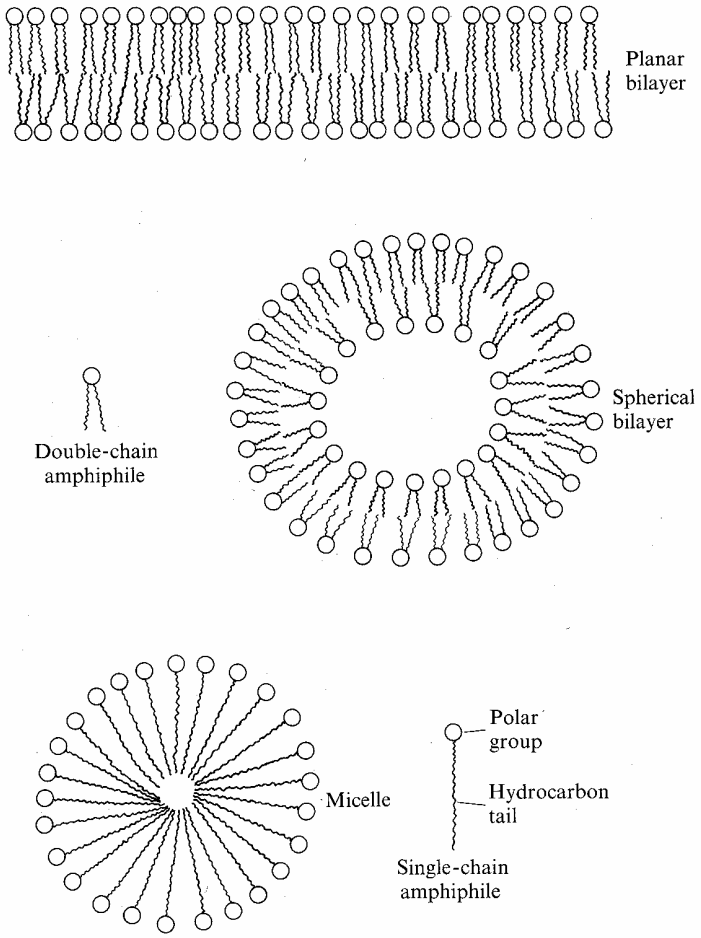


Abb. 10: Schematische Darstellung von Membranlipiden.

Die hydrophoben Kettenenden der zwei Schichten lagern sich so aneinander, dass die hydrophilen Teile die Außenseite der Membran bilden. Lipide mit Doppelketten bilden sowohl planare als auch kugelförmige Doppelschichten (Vesikel). Dagegen bevorzugen einkettige Lipide die Struktur der Mizelle (Abb. 10). Die Membranen stellen für geladene und polare Moleküle Barrieren dar. Metabolite können durch Poren (erleichterter Transport) oder durch Ionenpumpen und andere Transportsysteme (aktiver Transport) die Zellmembran durchqueren. Kleine, unpolare Moleküle vermögen auch durch Diffusion in die Zelle zu gelangen.
Membranen sind flüssige Strukturen. Die Lipidmoleküle können in der Membranebene rasch diffundieren. Die mittlere quadratische Distanz, die ein Lipidmolekül in der Zeit *t* zurücklegt, kann mit

$$\langle x^2 \rangle = 4Dt$$

berechnet werden (der Faktor vier reflektiert die 2-Dimensionalität der Membran). Für den Diffusionskoeffizienten ergeben sich Werte um 10^{-8} cm^2/s. Ebenso sind Rotationen um die eigene Achse leicht möglich. Allerdings sind die beiden Schichten der Membran gut voneinander getrennt. Ein Lipidmolekül wechselt daher relativ selten von der einen Schicht zur anderen (Flip-Flop).

Lipide

Lipide unterscheiden sich deutlich von Proteinen und Nukleinsäuren. Sie sind nicht gut wasserlöslich; in Chloroform und anderen organischen Lösungsmitteln lösen sie sich dagegen sehr gut. Sie dienen als Brennstoffmoleküle, als Energiespeicher, als Signalmoleküle und, wie oben gezeigt, als Membrankomponenten. Von letzteren gibt es drei Hauptgruppen: Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin.
Die Phospholipide kommen in allen biologischen Membranen in großen Mengen vor. Sie leiten sich vom Glycerin oder Sphingosin ab. Abb. 11 zeigt die Komponenten des Phosphoglycerids (das Phospholipid, das sich vom Glycerin ableitet). Es besteht aus einem Glycerinrückgrat, zwei Fettsäureketten und einem phosphorylierten Alkohol.

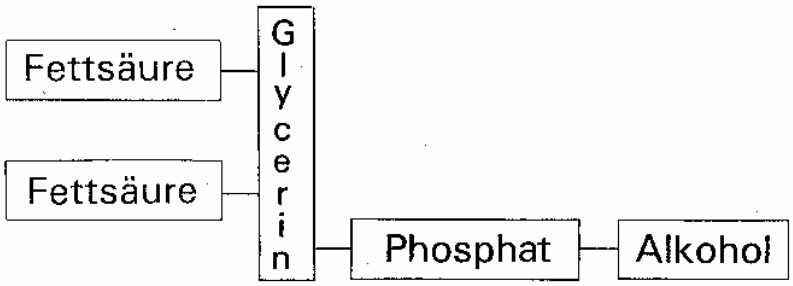


Abb. 11: Komponenten eines Phosphoglycerids.

Lipoproteine

Lipoproteine im Blutplasma sind nicht-kovalent gebundene Moleküle aus Lipiden und Proteinen. An Bakterienoberflächen kommen auch kovalent gebundene Lipoproteine vor. Die vier Hauptgruppen der Plasmalipoproteine sind die Chylomikronen, die Lipoproteine sehr geringer Dichte (very low density lipoproteins, VLDL), die Lipoproteine geringer Dichte (low density lipoproteins, LDL) und die Lipoproteine hoher Dichte (high density lipoproteins, HDL). Die Eigenschaften der letzteren drei sind in Tab. 2 zu sehen. Die erste Zeile enthält die unterschiedlich großen Dichten dieser Lipoproteine, die für die Namensgebung verantwortlich sind. Ein geringerer Lipidanteil geht einher mit einem größeren Proteinanteil (und damit höherer Dichte). In VLDL kommen hauptsächlich Triglyceride, in LDL Cholesterin und in HDL Phosholipide vor.

Tab. 2: Eigenschaften von Plasma-Lipoproteinen

Property	Very low density	Low density	High density
Density (g/cm^3)	0.95–1.006	1.019–1.063	1.063–1.21
Molecular weight	5×10^6	2×10^6	1.7×10^5 to 3.6×10^5
Percentage protein (by weight)	10	25	50
Major protein components	Apo-C-I (57 amino acids) Apo-C-II (78 amino acids) Apo-C-III (79 amino acids) Apo-E (33,000 mol wt) Apo-B	Apo-B (up to 275,000 mol wt)	Apo-A-I (245 amino acids) Apo-A-II (dimer of two 77-amino acid chains)
Protein secondary structure	73% α helix 27% other	25% α helix 37% β sheet 37% disordered	70% α helix 11% β sheet 19% disordered
Apoprotein secondary structure	56% α helix	——	52% α helix 10% β sheet 38% disordered
Lipid content (as percentage of total lipoprotein weight)			
triglycerides	55	6–8	Small
phospholipid	20	21–22	>20
cholesterol	10	7–8	Small
cholesterol esters	5	36–41	15

Die Lipoproteine haben zwei Hauptfunktionen. Sie enthalten Signale zur Regulation des Transports bestimmter Lipide an spezifischen Zellen und sie solubilisieren stark hydrophobe Lipide (z.B. ermöglichen sie den Transport von wasserunlöslichen Lipiden, z.B. Cholesterin). Höhere HDL-Werte scheinen mit einem verringerten Risiko arteriosklerotischer Gefäßerkrankungen einherzugehen, während ein erhöhtes Konzentrationsverhältnis LDL/HDL dieses Risiko erhöht. Arteriosklerotische Plaques enthalten viel Cholesterin.

Nukleoproteine und Glycoproteine

Nukleoproteine sind Komplexe aus Proteinen und Nukleinsäuren. Sie können mehrere Nukleinsäuren und eine große Anzahl von Proteinen enthalten (Tab. 3). Die in Nukleoproteinen vorkommenden Proteine sind meistens klein, mit Molekulargewichten zwischen 10000 und 25000. Viele Proteine sind mit einer einzigen Nukleinsäure assoziiert, manchmal auch nur mit einem bestimmten Teil der Nukleinsäurehelix.

Tab. 3: Eigenschaften einiger Nukleoproteine

Property	Nucleosome (chromatin)	*E. coli* 70S ribosomes	Tobacco mosaic virus	Phage P22	Adenovirus
Molecular weight	2.4×10^5	2.6×10^6	4.0×10^7	$\sim 5.5 \times 10^7$	$\sim 1.6 \times 10^8$
Percentage protein (by weight)	45	33	95	50	87
Number and kind of nucleic acids	1 DNA	3 RNAs	1 RNA	1 DNA	1 DNA
Number of proteins	9	57	2,130	~500	>2,500
Number of different proteins	5	53	1	6	~12

Im Gegensatz zu Pflanzen und Bakterien, die Zellwände für die mechanische Rigidität oder zum Schutz gegen osmotischen Schock haben, haben Tiere (und Menschen), ausschließlich lipidhaltige Zellmembranen. Diese enthalten u.a. **Glycoproteine**, d. h. Proteine mit Oligosacchariden. Der Zuckergehalt kann von ein paar Molekülen bis zu einem substantiellen Gewichtsanteil des Proteins variieren. Ein Beispiel für ein Glycoprotein ist die Ribonuclease *A*, die sich von der Ribonuclease *B* durch ein zusätzliches Oligosaccharid unterscheidet. Manche Glycoproteine sind sehr resistent gegenüber thermischer Denaturierung. Außerdem sind die Zuckeranteile potente Antigene, die quasi einen Stempel darstellen, so dass das Immunsystem sie von fremden Organismen unterscheiden kann. Weitere Funktionen sind wahrscheinlich die Zell-Zell-Erkennung und die Oberflächenrezeption von Proteinen und kleinen Molekülen.

Polysaccharide

Polysaccharide sind Zuckerpolymere. In ihrer einfachsten Form sind sie lineare Homopolymere, bei denen die fundamentale Einheit eine Zuckereinheit ist und alle Verbindungen zwischen den Zuckern gleich sind. Beispiele für Polysaccharide sind die Amylose (eine Komponente der Stärke zur Speicherung von Nährstoffen in Pflanzen), die Cellulose (eine Hauptkomponente in Holz und anderen Pflanzenfasern), das Chitin (das im Skelett der Insekten und anderer Arthropoden vorkommt) und das Glycogen (eine Speicherform der Glukose). Abb. 12 zeigt u.a. die Primärstrukturen der ersten drei Beispiele.

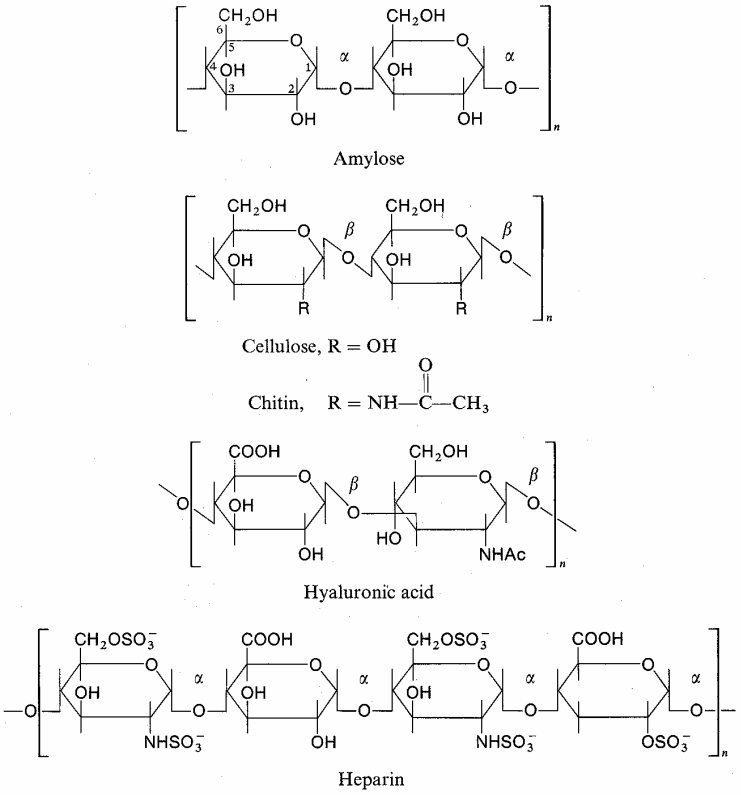


Abb. 12: Primärstruktur einiger typischer Polysaccharidketten. Das Numerierungsschema ist für den Hexose-Zucker in Amylose aufgeführt.

Die Primärstrukturen der Polysaccharide sind sehr regulär. Sie beinhalten große Blöcke einer einzigen Einheit oder vieler Einheiten, die sich wiederholen. Die Sekundärstruktur von Faser-Polysacchariden, wie Chitin oder Cellulose, ist sehr starr. Die sterische Behinderung der großen Zuckereinheiten schränkt die Anzahl der Konformationen stark ein. Die Fasern sind genug geordnet, um detaillierte Röntgenbeugungsaufnahmen zu gewährleisten, aber deren Interpretation ist außerordentlich schwierig. Die Tertiärstrukturen zeigen Faltungen der helikalen Sekundärstrukturen. Viele Fragen zur Struktur der Polysaccharide sind nicht geklärt. Einige sind: Wie verändern Modifikationen der kovalenten Bindungen die Sekundär- und Tertiärstruktur? Wie wechselwirken Polysaccharide mit anderen biologischen Molekülen?

Die Membran als Energiebarriere

In biologischen Systemen stellen Membranen eine chemisch stabile Energiebarriere dar, die Substanzen (insbesondere ionenhaltige) verschiedener Konzentrationen voneinander zu trennen vermag. Abb. 13 zeigt die freie Enthalpie für den Übergang Lösungsmittel-Membran-Lösungsmittel.

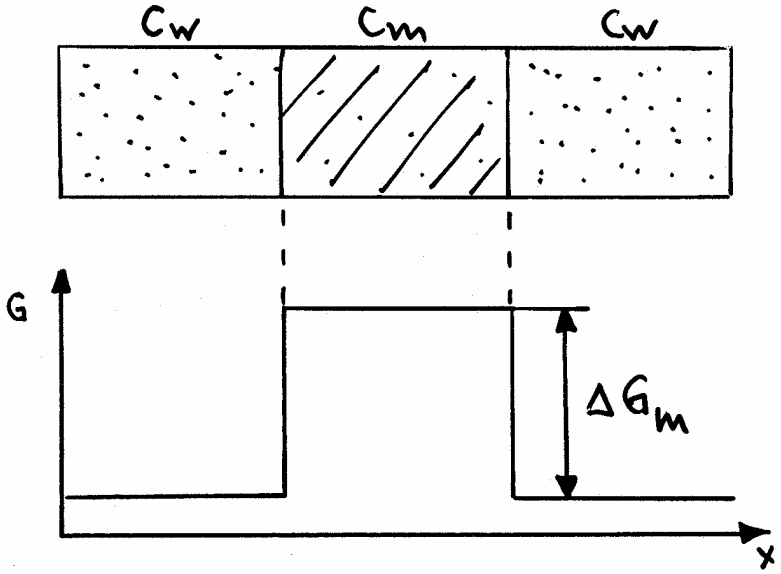


Abb. 13: Verlauf der freien Enthalpie in der Nähe einer Membran.

Die Konzentration der betrachteten Teilchen im Lösungsmittel (Wasser) wird mit c_w, die in der Membran mit c_m bezeichnet. ΔG_m ist die Differenz der freien Enthalpien beider Bereiche. Für die Konzentrationen gilt: $c_m = c_w \exp(-\Delta G_m / RT)$ Die Höhe der Barriere ΔG_m für ein Ion kann mit dem Born-Modell berechnet werden.

Born-Modell

Beim Born-Modell werden folgende Annahmen gemacht:

1. Die Coulomb-Wechselwirkung dominiert, so dass alle anderen Wechselwirkungen vernachlässigt werden können.
2. Das Lösungsmittel und die Membran werden als Kontinua mit Dielektrizitätszahlen von 80 bzw. ~2 – 4 behandelt.
3. Das Ion wird als harte Kugel mit Radius *r* und Ladung *Ze* betrachtet.

Die Berechnung der Energie für einen Übergang des Ions von dem Lösungsmittel in die Membran wird mit Hilfe eines zyklischen Prozesses, des Born-Ladungszyklus, durchgeführt (Abb. 14).

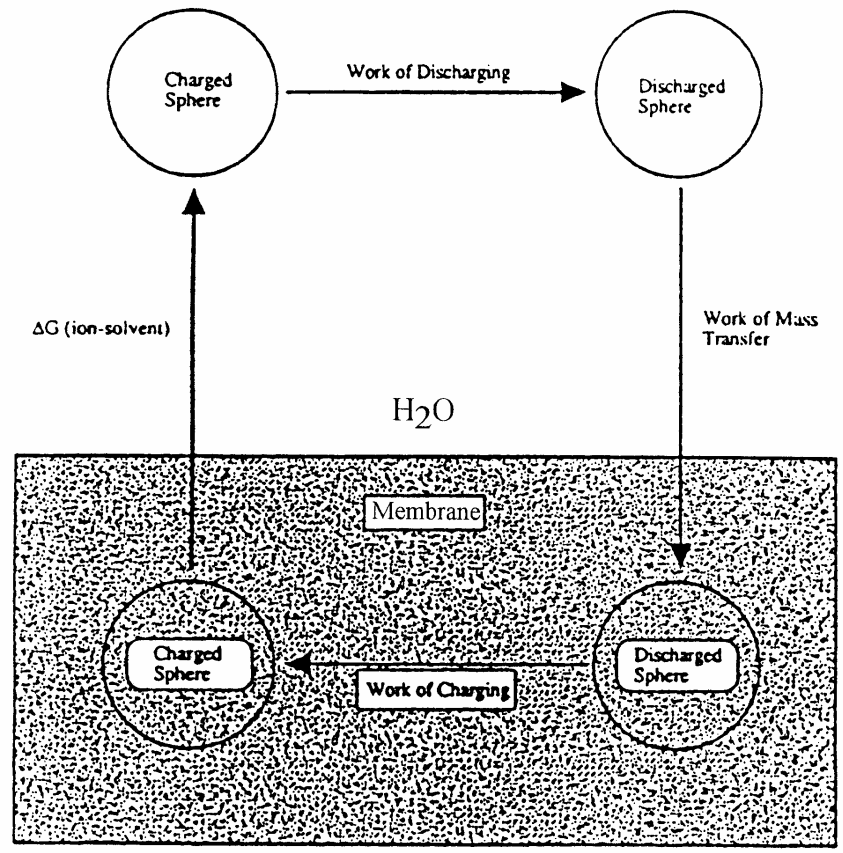


Abb. 14: Schematische Darstellung des Born-Ladungszyklus.

Der Kreisprozess beginnt mit einer geladenen Kugel in Wasser. Folgende Schritte werden durchgeführt:

1. Die Kugel wird im Wasser entladen; die Entladearbeit sei $W_{discharge}$.
2. Die neutrale Kugel wird in die Membran überführt ($W_{transfer}$ = 0, da nur die elektrostatischen Kräfte betrachtet werden).
3. In der Membran wird die Kugel wieder aufgeladen. Die Aufladearbeit sei W_{charge}.
4. Die Kugel wird in das Wasser zurückgebracht. Die freie Enthalpie der Ion-Lösungsmittel-Wechselwirkung sei $-\Delta G_{is}$.

Die Energiebilanz des Kreisprozesses ist: $W_{discharge} + W_{transfer} + W_{charge} - \Delta G_{is} = 0$. Daraus folgt: $\Delta G_{is} = W_{discharge} + W_{charge}$. Die Arbeit für das Aufladen einer Kugel in einem Medium mit der Dielektrizitätskonstanten ε ist $dW_{charge} = UdQ$. Mit

$$U = \frac{Q}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r} = \frac{Q}{C}$$

ergibt sich

$$W_{charge} = \int_0^{Ze} U\, dQ = \frac{(Ze)^2}{8\pi\varepsilon\varepsilon_0 r}.$$

Die gleiche Energie wird frei, wenn die Kugel im gleichen Medium entladen wird. Da sie beim Born-Kreisprozess in einem anderen Medium entladen wird, ergibt sich

$$\Delta G_{is} = \frac{(Ze)^2}{8\pi\varepsilon_0 r}\left[\frac{1}{\varepsilon_m} - \frac{1}{\varepsilon_w}\right].$$

Daraus folgt für eine Kugel mit $r = 0.2$ nm, $Z = 1$, $\varepsilon_m = 2.5$ und $\varepsilon_w = 80$: $\Delta G_{is} = 2.2\times10^{-19}$ J = 54 kT bei Raumtemperatur. Diese Barriere ist sehr hoch; von einem Mol Ionen vermag nur etwa ein Ion in die Membran einzudringen:

$$K = \frac{c_m}{c_w} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{is}}{kT}\right) \approx 10^{-23}\ .$$

Somit kann – trotz der Vereinfachungen, die dem Modell zugrunde liegen – festgestellt werden, dass Lipidmembranen effiziente Barrieren für Ionen sind.

Diffuse elektrische Doppelschicht

In den Membranoberflächen (an den hydrophilen Enden) befinden sich positiv und negativ geladene Gruppen. Daraus resultiert eine Nettoladung (in Phospholipiden ist diese positiv). Da sich die Membran in Kontakt zu einer Elektrolytlösung befindet, werden deren mobile Ladungsträger versuchen, die fixierten Ladungen auf der Membran abzuschirmen. Dadurch entsteht eine elektrische Doppelschicht. Es existieren zwei Modelle, die extreme Beschreibungen der tatsächlichen Situation darstellen: das Helmholtz- und das Gouy-Chapman-Modell (Abb. 15).

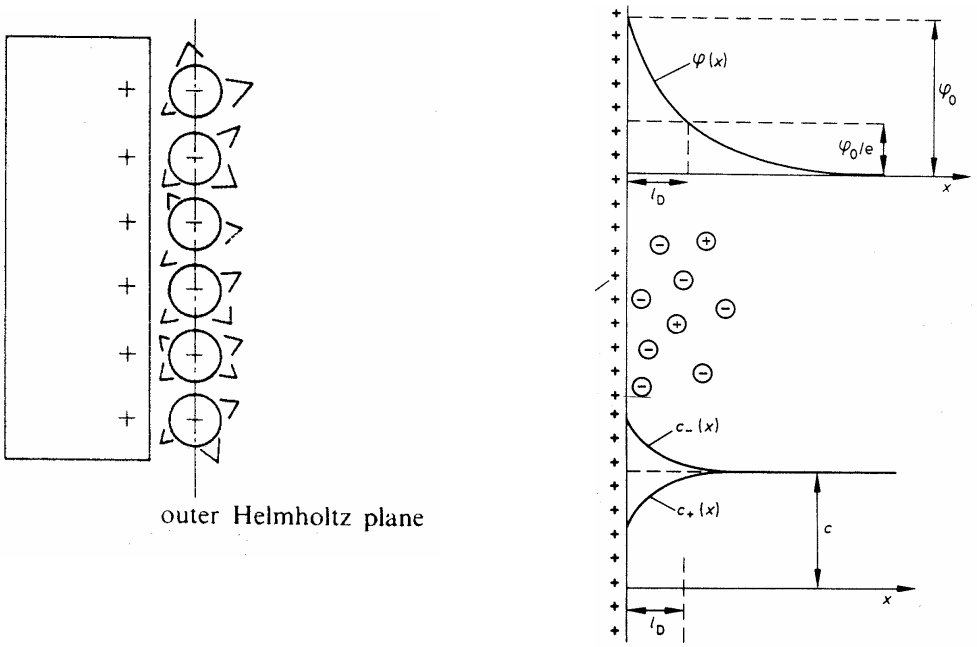


Abb. 15: Das Helmholz-Modell (links) und das Gouy-Chapman-Modell (rechts).

Das Helmholtz-Modell nimmt an, dass die Ladungen in der elektrolytischen Lösung ebenso wie die in der Membran fixiert sind, während das Gouy-Chapman-Modell von mobilen Ionen in der Elektrolytlösung ausgeht.

Gouy-Chapman-Modell

Folgende Annahmen liegen diesem Modell zugrunde:

1. Die Membran wird als kontinuierliches Medium (keine diskrete Ladungen) mit der Oberflächenladungsdichte σ betrachtet.
2. Das Lösungsmittel sei ebenfalls homogen mit $\varepsilon = 80$.
3. Die Ionen werden als Punktladungen angenommen, ihr Eigenvolumen wird also vernachlässigt.
4. Der Elektrolyt sei in der wässrigen Lösung komplett dissoziiert ($MX \Rightarrow M^{Z+}X^{Z-}$).
5. Die Membran wird als unendliche Ebene behandelt; somit ist die Elektrolytkonzentration nur vom Abstand zur Fläche abhängig (1-D Problem).

Die Ladungsverteilung in der Lösung $\rho(x)$ bestimmt über die Poissongleichung (eindimensional für unser Problem) das elektrostatische Potential Φ,

$$\frac{d^2\Phi}{dx^2} = -\frac{1}{\varepsilon_0 \varepsilon}\rho(x)\,.$$

Die Ladungen der Ionen sind $e^+ = Ze$ bzw. $e^- = -Ze$ mit $e = 1.6 \times 10^{-19}$ C. Somit ergibt sich für die Ladungsdichte in der Lösung

$$\rho(x)\big|_{x\to\infty} = n^+e^+ + n^-e^- = Ze(n^+ - n^-)\,.$$

Aus der Forderung der Ladungsneutralität folgt

$$\rho(x)\big|_{x\to\infty} = 0 \quad \Rightarrow \quad n^+ = n^- = n\,.$$

Für die Ladungsverteilung nahe der Grenzfläche gilt die Boltzmann-Verteilung

$$n^+(x) = n_\infty^+ \exp\left[-Ze\Phi / kT\right],$$

$$n^-(x) = n_\infty^- \exp\left[+Ze\Phi / kT\right],$$

wobei gilt: $n_\infty^+ = n_\infty^- = n_\infty$. Die Ladungsdichte in der Elektrolytlösung ist dann

$$\begin{aligned}\rho(x) &= n^+ e^+ + n^- e^- \\ &= Z\,e\,n_\infty \left\{\exp(-Ze\Phi(x)/kT) - \exp(+Ze\Phi(x)/kT)\right\} \\ &= -2\,Zen_\infty \sinh(Ze\Phi(x)/kT), \\ \Rightarrow \frac{d^2\Phi}{dx^2} &= \frac{2Zen_\infty}{\varepsilon_0\varepsilon}\sinh\frac{Ze\Phi(x)}{kT}\ .\end{aligned}$$

Diese Gleichung wird Gouy-Chapman-Gleichung genannt. Für eine dreidimensionale Geometrie heißt sie Poisson-Boltzmann-Gleichung. Letztere wird u.a. zur Berechnung der elektrischen Potentialverteilung in Proteinen verwendet.

Debye-Hückel Näherung

Die Gouy-Chapman-Gleichung lässt sich mit folgender Annahme linearisieren:

$$\frac{Ze\Phi(x)}{kT} << 1 \ \Rightarrow \Phi(x) << \frac{kT}{Ze} \approx 25\,\mathrm{mV}/e \quad \text{(T=298 K, Z=1)}.$$

Mit sinh (y) ≈ y (y << 1) gilt

$$\frac{d^2\Phi}{dx^2} - \kappa^2\,\Phi = 0; \qquad \frac{1}{\kappa} = l_D = \frac{1}{Ze}\sqrt{\frac{\varepsilon_0\varepsilon\,kT}{2n_\infty}}\ .$$

Hier ist l_D die Debyelänge. Folgende Randbedingungen müssen erfüllt werden:

$$\Phi(\infty) = 0,$$

$$\frac{d\Phi}{dx}\Big|_{x=0} = \frac{-\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon}, \qquad \text{(Plattenkondensator: } \sigma = \varepsilon\varepsilon_0 E = -\varepsilon\varepsilon_0 \frac{d\Phi}{dx}\Big|_{x=0}\text{)}.$$

Als Lösung erhält man

$$\Phi(x) = \Phi(0)e^{-\kappa x},$$

wobei sich das Oberflächenpotential zu $\Phi(0) = \Phi_0 = \sigma l_D / (\varepsilon_0\,\varepsilon)$ ergibt. Für eine vorgegebene Oberflächenladung gilt, dass $d\Phi / dx|_{x=0} = -\Phi_0 / l_D$ konstant ist. Somit folgt, dass für großes (kleines) l_D das Oberflächenpotential Φ_0 groß (klein) ist. Die Debyelänge, die ein Maß für die Größe der Konzentrationsveränderung an der Grenzfläche darstellt, nimmt mit höherer Ladungsträgerdichte n_4 ab (siehe Definition). Falls verschiedene Ionen (mit Konzentration c_i und Ladung Z_i) vorliegen, muss n_4 durch die Ionenstärke $J = 1/2\sum_i Z_i^2 c_i$ ersetzt werden.

Abb. 16 zeigt den Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Abstand zur Grenzschicht für verschiedene Oberflächenladungen (links) und für verschiedene Konzentrationen der Ladungsträger (rechts). Die Debye-Hückel-Näherung gilt streng nur für $\Phi << kT/Ze$, sie stellt aber bis $\Phi \approx kT/Ze$ eine gute Näherung dar.

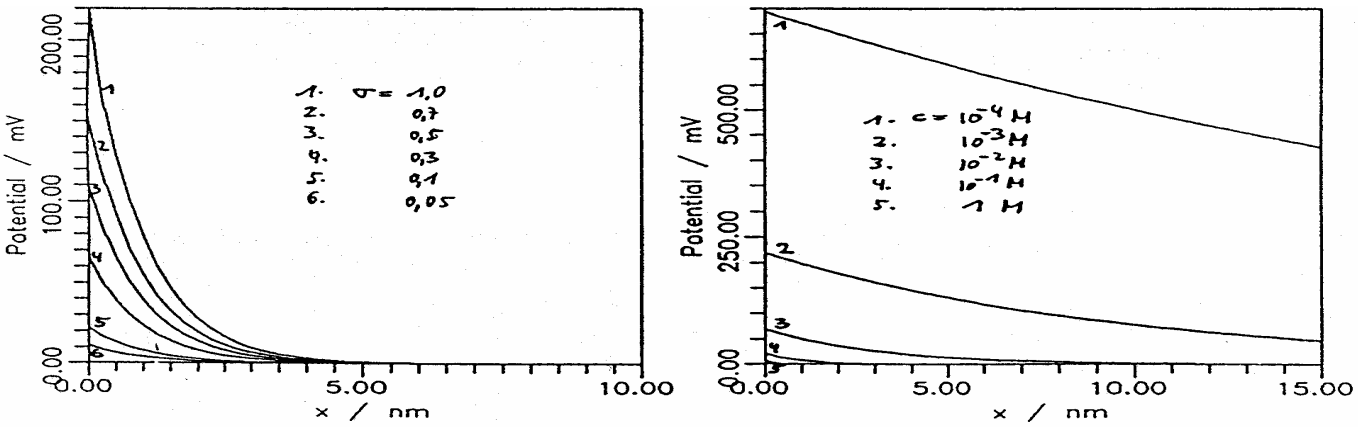


Abb. 16: Potentialverlauf in der Debye-Hückel-Näherung. In der linken Abbildung wird σ (Angaben in e/nm^2; bei einer Konzentration von 0.1 M), in der rechten Abbildung die Ladungsträgerkonzentration in der Lösung (bei einer Oberflächenladung σ = 0.1 e/nm^2) variiert.

Exakte Lösung der Gouy-Chapman Gleichung

Die exakte Lösung der Gouy-Chapman Gleichung ergibt

$$\Gamma = \Gamma_0 e^{-\kappa x},$$

wobei

$$\Gamma = \tanh\frac{Ze\Phi(x)}{4kT},$$

$$\Gamma_0 = \tanh\frac{Ze\Phi(0)}{4kT}.$$

Daraus folgt für das Potential

$$\Phi(x) = \frac{4kT}{Ze}\tanh^{-1}\left[\left(\tanh\frac{Ze\Phi(0)}{4kT}\right)e^{-\kappa x}\right],$$

$$\Phi(0) = \frac{2kT}{Ze}\sinh^{-1}\frac{\sigma}{\sqrt{8\varepsilon\varepsilon_0 kTn_\infty}}.$$

Natürlich stimmen für kleine Argumente die Lösungen wieder mit denen der Debye-Hückel Näherung überein. Abb. 17 zeigt den Potentialverlauf für die gleichen Parameter, die in Abb. 16 verwendet wurden.

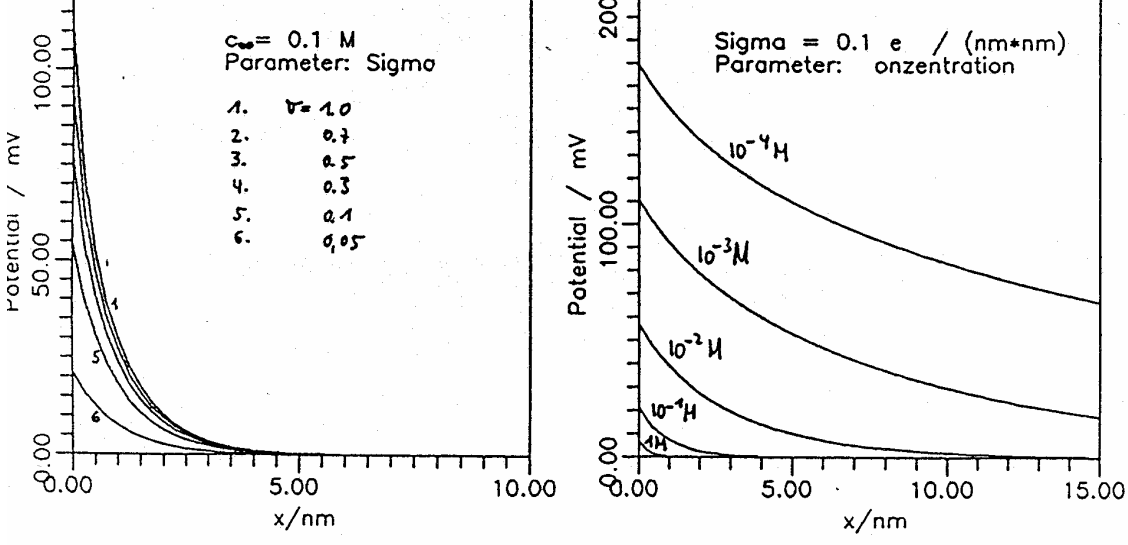


Abb. 17: Potentialverlauf berechnet mit der exakten Lösung der Gouy-Chapman Gleichung. Parameter wie in Abb. 16.

Der Potentialverlauf nahe der Membran fällt bei exakter Lösung schneller ab als in der Debye-Hückel-Näherung, die für längere Distanzen gültig ist. Für die Konzentrationsverteilung der Gegenionen gilt

$$c^-(x) = c_\infty \exp\left[+ Ze\Phi(x) / kT\right]$$

$$\Rightarrow \quad \log c^-(x) = \log c_\infty + u(x)\,.$$

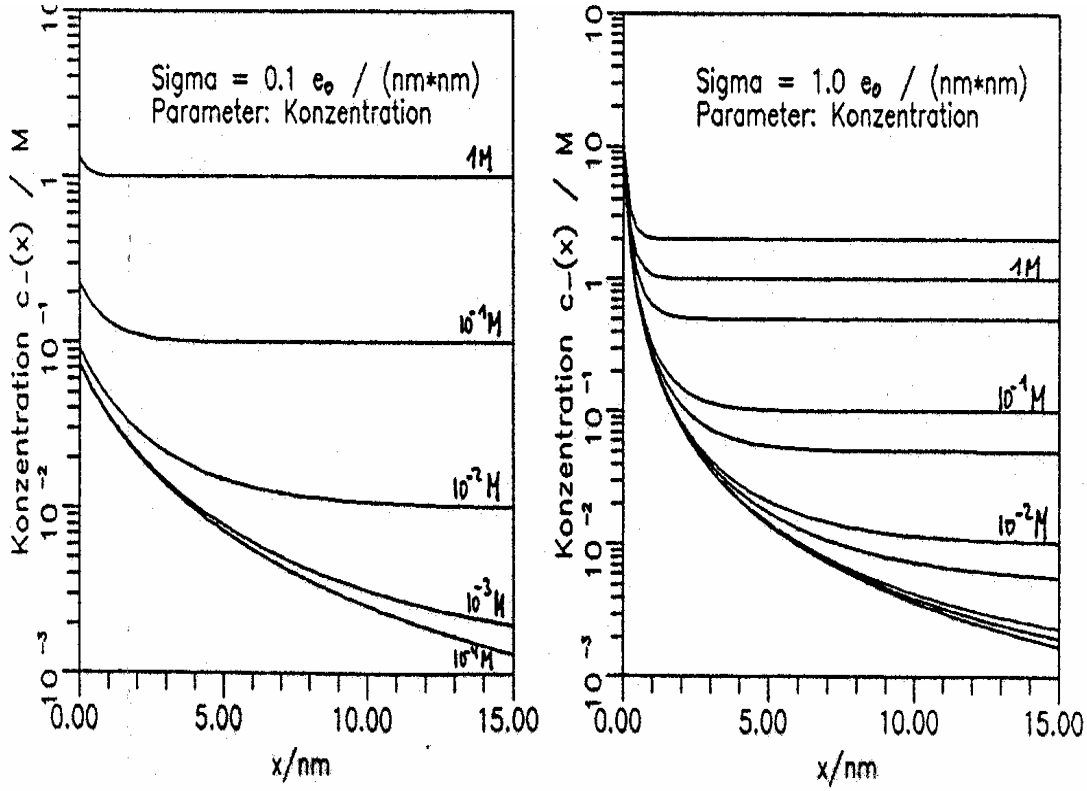


Abb. 18: Ladungsträgerkonzentration im Elektrolyten berechnet mit der Gouy-Chapman Gleichung. In der rechten Abbildung ist die Oberflächenladung zehnmal größer als in der linken.

Abb. 18 zeigt den Konzentrationsverlauf für zwei verschiedene Oberflächenladungen der Membran. Man sieht, dass für große Oberflächenladungen in der Membran die Konzentration der Ladungsträger in der Lösung nahe der Membran unabhängig von der Konzentration in der Lösung weit weg von der Membran ist.

Experimentelle Bestimmung des Oberflächenpotentials

Das Oberflächenpotential kann über die Ionenkonzentration an der Oberfläche und in der Lösung bestimmt werden. Die Protonenkonzentration im Wasser sei $[H^+]_W$, für die Protonenkonzentration an der Oberfläche $[H^+]_S$ gilt

$$\left[H^+\right]_S = \left[H^+\right]_W \exp\left[-e\Phi / kT\right] ,$$

$$\Rightarrow -\log\left[H^+\right]_S = -\log\left[H^+\right]_W + \frac{e\Phi}{2.3kT},$$

$$\Rightarrow \Phi_0 = 59\,\mathrm{mV}(\mathrm{pH}_S - \mathrm{pH}_W) \ .$$

Der pH-Wert kann in Wasser mit einer Glaselektrode ermittelt werden. Sie ist aber für die Messung an der Oberfläche der Membran nicht geeignet. Deshalb wird auf die Messung mit Hilfe eines membrangebundenen pH-sensitiven Farbstoffs, z.B. Cumarin zurückgegriffen (siehe Abb. 19).

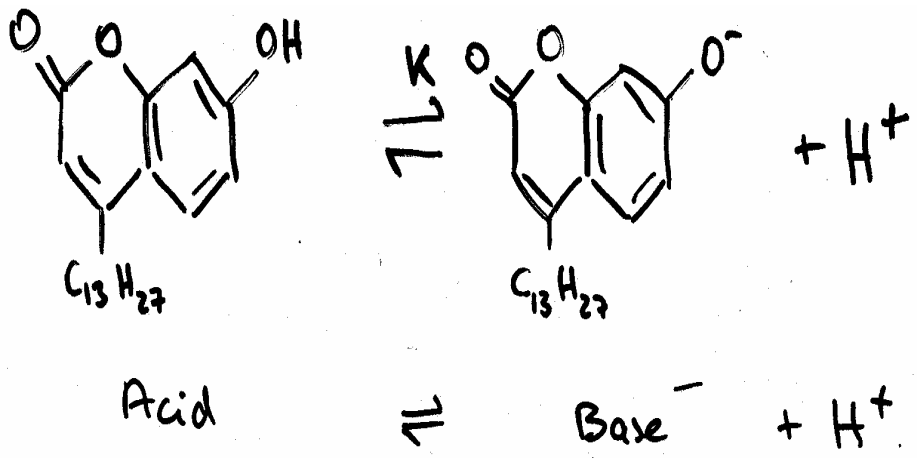


Abb. 19: Strukturformel eines Cumarinmoleküls mit Alkylrest.

Das membrangebundene Cumarin zeigt eine vom pH-Wert abhängige Fluoreszenz, da nur die Base fluoresziert. Folglich steigt die Fluoreszenz, wie in Abb. 20 zu sehen, mit dem pH-Wert an.

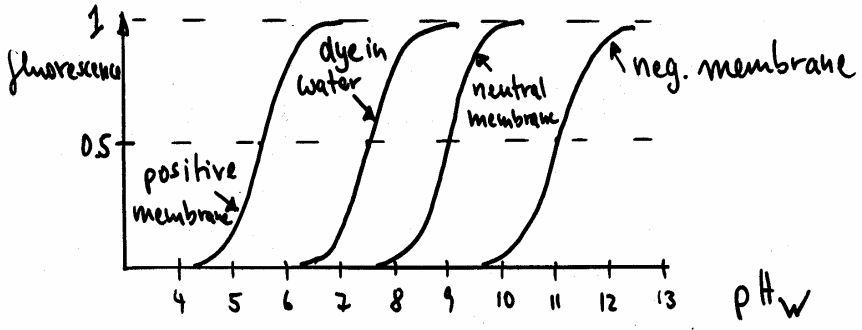


Abb. 20: Abhängigkeit der Fluoreszenz vom pH-Wert der Lösung.

Die Abbildung zeigt außerdem die Abhängigkeit des Fluoreszenzverlaufs von der Ladung der Membran. Das Problem bei diesen Messungen ist, dass sich der Farbstoff in der Membran und nicht an der Oberfläche befindet. Folglich sind Differenzen zur Gouy-Chapman-Gleichung zu erwarten.

Die obigen Rechnungen wurden für eine eindimensionale Geometrie durchgeführt. Für eine sphärische Geometrie (z.B. für ein globuläres, geladenes Protein) muss die Poisson-Boltzmann-Gleichung gelöst werden,

$$\nabla^2 \Phi(r) = \frac{1}{\varepsilon_0 \varepsilon} \sum_i Z_i n_i e \exp\left[-\frac{Z_i e \Phi(r)}{kT} \right].$$

Wird wiederum die Debye-Hückel-Näherung eingeführt, so erhält man

$$\Phi(r) = \frac{Z_i e}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon} \frac{\exp(-r/l_D)}{r}.$$

Zusätzlich zu dem Coulombpotential der Ionenladungen tritt ein exponentiell abfallender Term auf, der die Anwesenheit einer Wolke aus Gegenionen um die betrachteten Ionen beschreibt. Als Folge werden die Ladungen abgeschirmt; das abgeschirmte Coulombpotential fällt schneller auf 0 ab (Abb. 21).

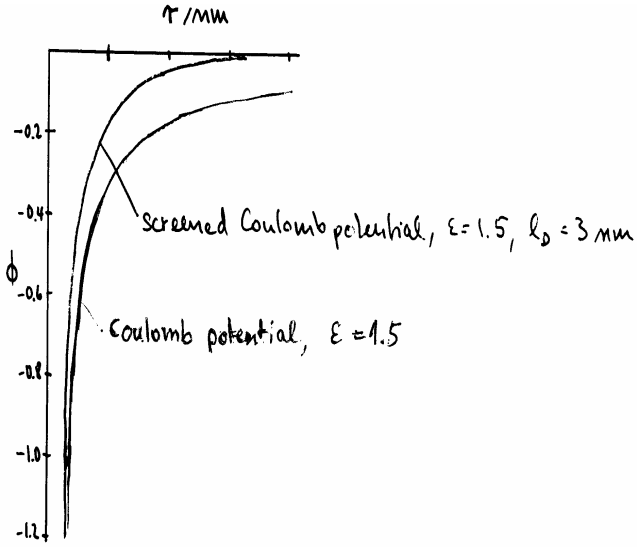


Abb. 21: Abgeschirmtes Coulombpotential.

Mikroskope für die Bestimmung der biomolekularen Struktur

Zur Bestimmung der Struktur von Biomolekülen werden verschiedene Methoden eingesetzt. Besonders wichtig sind Techniken, die auf der Streuung von Teilchen (Photonen, Elektronen, Neutronen) an den Biomolekülen beruhen. Seit einigen Jahren gewinnt außerdem die Kernresonanzspektroskopie (NMR) als strukturbestimmende Methode immer mehr an Bedeutung.
Bei den Streumethoden kann zwischen der direkten Abbildung eines Objekts und Beugungsmethoden unterschieden werden (Abb. 1). Bei der Beugung werden Strahlen mit gleichen Ablenkungswinkeln (das reziproke Bild) betrachtet, während bei der konventionellen Mikroskopie Strahlen abgebildet werden, die an gleichen Orten gestreut werden. Die Auflösungsgrenze ist jeweils ungefähr die halbe Wellenlänge der verwendeten Strahlung. Bei konventionellen Lichtmikroskopen ist somit das Auflösungsvermögen auf ~200 nm begrenzt.

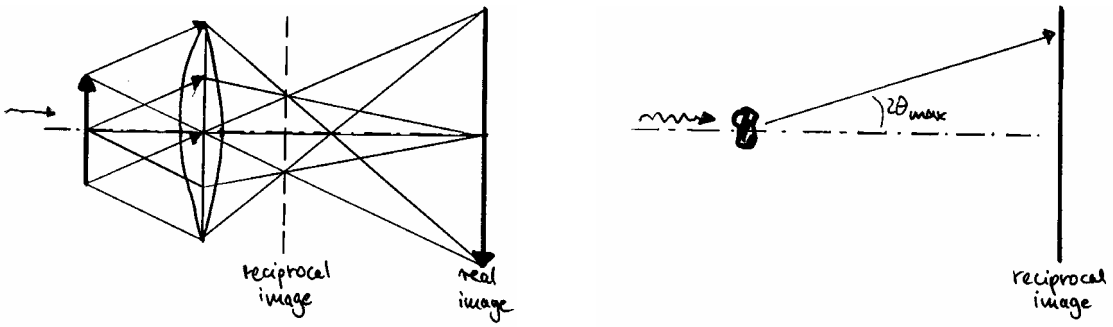


Abb. 1: Prinzipieller Unterschied des Strahlengangs bei der abbildenden Mikroskopie (links) und der Beugung (rechts).

Elektronenmikroskopie

Bei der Abbildung im Elektronenmikroskop sind die verwendeten Wellenlängen λ der Elektronen aufgrund der hohen Beschleunigungsspannungen U ($\lambda \propto 1/\sqrt{U}$) bedeutend kleiner als die des sichtbaren Lichts. Bei U = 200 kV erhält man beispielsweise λ = 0.025 Å. Allerdings lässt sich das prinzipiell extrem hohe Auflösungsvermögen der Elektronenwellen nicht ausnutzen, da die im Elektronenmikroskop verwendeten elektromagnetischen Linsen große Abbildungsfehler aufweisen. Diese können nicht, wie im optischen Mikroskop, einfach durch Aplanate (Kombinationen aus Sammel- und Zerstreuungslinsen) kompensiert werden, da es nicht möglich ist, runde, zerstreuende Einzellinsen für Elektronen anzufertigen. Aufgrund der Linsenfehler kann nur Strahlung mit kleinen Streuwinkeln abgebildet werden, so dass man üblicherweise Auflösungen von 2 − 3 Å erhält. Neueste Entwicklungen von magnetischen Sextupolen zur Korrektur der Linsenfehler ermöglichen Auflösungen bis zu 1.3 Å.
Für eine Abbildung muss aber auch der nötige Kontrast vorhanden sein. Die Streuintensität der Elektronen ist proportional zum Quadrat der Ordnungszahl der betrachteten Atome; somit ist es schwierig, organische Moleküle darzustellen, da sie überwiegend aus leichten Atomen bestehen. Deshalb sind Anfärbemethoden mit Schwermetallatomen wichtig. Angefärbte Präparate zeigen nicht nur einen deutlich stärkeren Kontrast, sondern erleiden auch weniger Strahlenschäden. Diese Prozeduren bewirken allerdings auch eine geringere Auflösung.
Bei der positiven Anfärbemethode werden schwere Atome auf die Probe gebracht. Ein Beispiel ist die Bindung von Uranyl-Ionen an DNA. Eine weitere Methode ist das

Aufdampfen von Schweratomen aus einer bestimmten Richtung. Dadurch lagern sich diese an den Seiten an, die ungefähr senkrecht zur Einstrahlrichtung ausgerichtet sind (Abb. 2a).

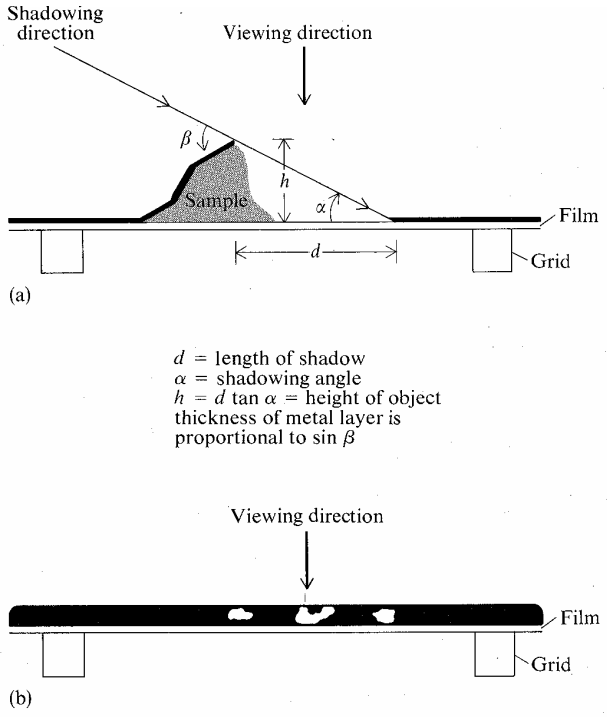


Abb. 2: Schematische Darstellung von für die Elektronenmikroskopie angefärbten Proben. a) eine abgeschattete Probe, b) eine negativ angefärbte Probe.

Ein Teil des Films, auf dem die Probe sitzt, wird also abgeschattet und damit nicht angefärbt. Aus der Länge des Schattens können Rückschlüsse auf die Probenhöhe gezogen werden. Eine weitere Möglichkeit ist das negative Anfärben. Hier wird die Probe mit einer Anfärbelösung geflutet. Die darin enthaltenen Schweratome füllen den Raum um das Biomolekül. Es kann im Elektronenmikroskop als wenig streuendes Objekt erkannt werden (Abb. 2b).
Neben der verminderten Auflösung hat die Anfärbetechnik noch weitere Nachteile. Die Struktur der Biomoleküle kann durch diese chemische Methode in Mitleidenschaft gezogen werden. Da Proteine und Nukleinsäuren unter physiologischen Bedingungen eine beträchtliche Menge an gebundenem Wasser besitzen, verändert das für die Elektronenmikroskopie notwendige Vakuum ebenfalls deren Struktur (die hydrophoben Kräfte sind stark verändert).
Elektronenmikroskopische Aufnahmen können durch den Einsatz von Filtertechniken verbessert werden, die gewisse Symmetrieeigenschaften des Objekts ausnützen. Dies soll am Beispiel der sechszähligen Rotationssymmetrie der Basisplatte des Bakteriophagen T 4 illustriert werden (Abb. 3). Da diese Symmetrie vorab bekannt ist, kann man *a priori* davon ausgehen, dass alle 60°-Segmente identisch sein sollten. Durch Mittelung der Bildinformation über 6 Kopien des Bildes, die sukzessiv um 60° gegenüber dem vorhergehenden gedreht wurden, erhält man ein deutlich rauschärmeres Bild. Elegant und präzise wird dies durch eine mathematische Filtertechnik erreicht, bei der eine Fouriertransformation in Polarkoordinaten verwendet wird. Das Elektronenmikroskopiebild wird digitalisiert, in Polarkoordinaten, $\rho(r,\phi)$ dargestellt und in Zylinderwellen entwickelt,

$$\rho(r,\phi) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} g_n(r) e^{in\phi},$$

$$g_n(r) = \int_0^{2\pi} \rho(r,\phi) e^{-in\phi} d\phi.$$

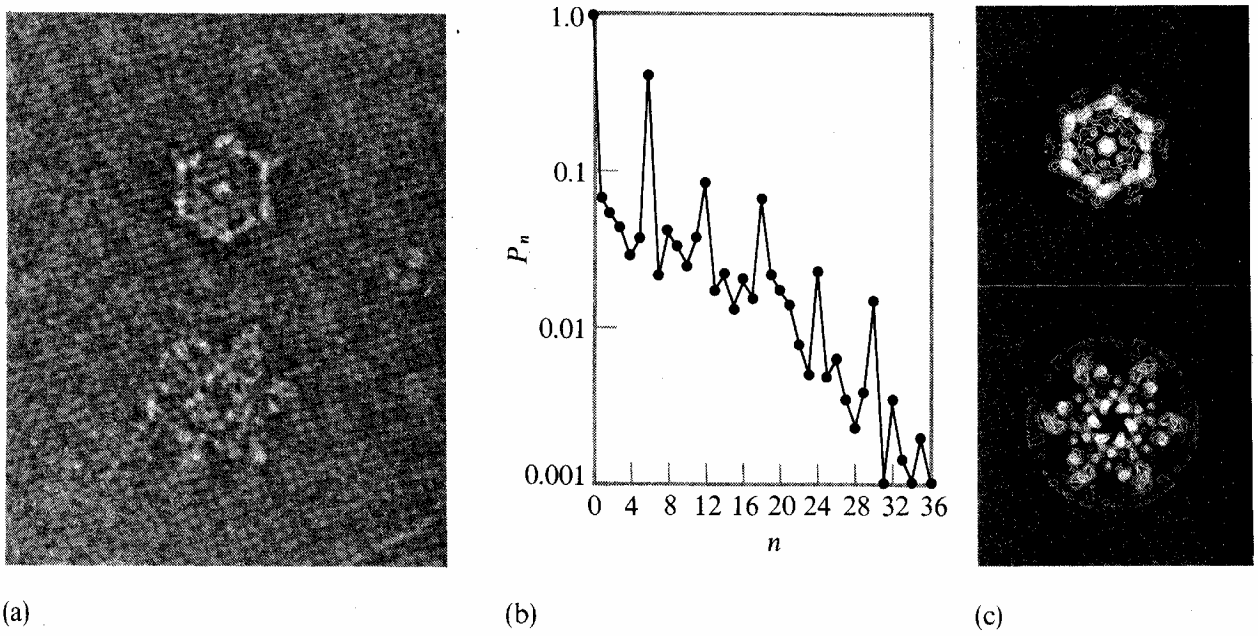


Abb. 3: Elektronenmikroskopie der 'baseplate' des Bakteriophagen T4. Es ist eine ausgedehnte (oben, 50 nm Durchmesser) und eine zusammengezogene 'baseplate' (unten, 55 nm Durchmesser) aufgeführt. a) Ursprüngliches Bild, b) Fourierkomponenten des Bildes, c) gefiltertes Bild.

Die gesamten Rotationskomponenten der Struktur erhält man durch Integration von $\rho(r,\phi)$ von dem Zentrum des Bildes (r = 0) bis zum äußeren Radius (r = a). Für das Rotationsleistungsspektrum ergibt sich

$$P_n = \varepsilon_n \int_0^a |g_n(r)|^2 \, r dr \,, \qquad n = 0, 1, ..., \infty.$$

Hier ist $\varepsilon_0 = 1$; ansonsten gilt $\varepsilon_n = 2$, da $g_{-n} = g_n$. Das Rotationsleistungsspektrum in Abb. 3b zeigt deutliche Peaks bei Werten, die ein Vielfaches von sechs sind. Aus dieser Analyse erhält man also direkt die Art der Rotationssymmetrie. Wird das gefilterte Bild $\rho'(r,\phi)$ nur mit diesen Komponenten berechnet,

$$\rho'(r,\phi) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} g_{6n}(r) e^{i6n\phi} \,,$$

so wird die Qualität des Bildes deutlich besser (Abb. 3c).

Rastermikroskopie

Bei den abbildenden Mikroskopen ist die Auflösung durch die Beugung an der Aperturblende bestimmt, die letztlich den maximalen Streuwinkel begrenzt. Dies ist nicht der Fall für Rastermikroskope, die nicht auf wellenoptischen Abbildungen basieren. Abb. 4 zeigt das Rastertunnelmikroskop (scanning tunneling microscope, STM).

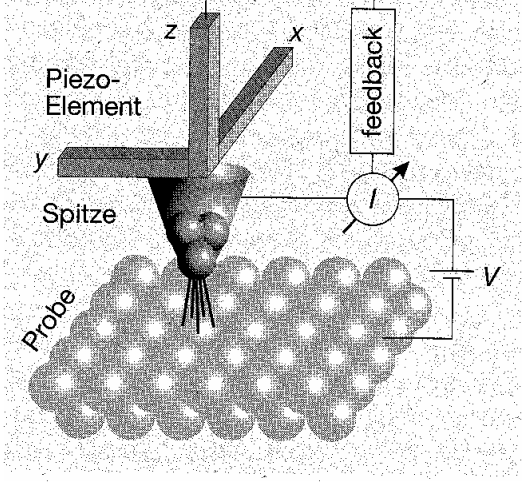


Abb. 4: Prinzip des Rastertunnelmikroskops.

Die metallische Spitze des Mikroskops wird bis auf einige Angström an die Probe herangebracht. Zwischen der Spitze und der Probe wird eine Spannung angelegt, die einen Tunnelstrom zur Folge hat. Dieser hängt sehr stark vom Abstand der Spitze zur Probe ab. Die Spitze kann piezoelektrisch entlang der xy-Ebene bewegt werden. Die Feedback-Elektronik variiert die z-Position der Spitze derart, dass ein konstanter Tunnelstrom fließt. Damit ist es möglich, die Oberfläche atomar abzubilden.
Das Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope, AFM) ist eine Abwandlung der obigen Technik. Hier reflektiert der Cantilever einen Laserstrahl auf eine 2- oder 4-Segment-Photodiode (Abb. 5), wodurch die Auslenkung des Cantilevers genau gemessen werden kann. Mit Hilfe einer Feedback-Einrichtung kann die Auslenkung des Spiegels und damit die Kraft, mit der auf die Probe gedrückt wird, kontrolliert werden.

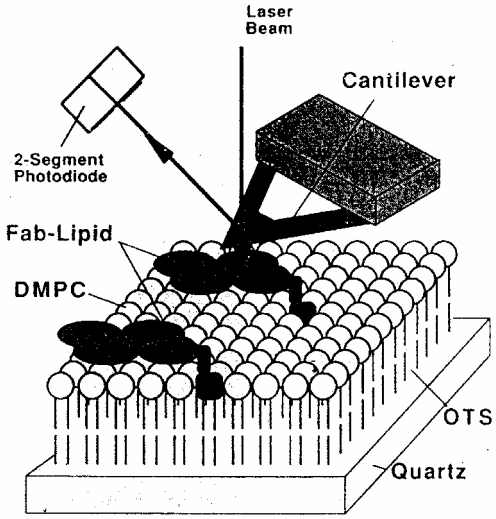


Abb. 5: Schematische Darstellung des Prinzips des Rasterkraftmikroskops.

Ein weiteres Rastermikroskop ist das optische Nahfeldrastermikroskop (near field scanning optical microscope, NSOM), bei dem die Probe mit einer optischen Faser abgerastert wird. Die Faser ist an einem Ende mit Metall so bedampft, dass eine Austrittsöffnung für das Licht mit einem Durchmesser von typischerweise 20 – 100 nm entsteht. Da die Auflösungsbegrenzung nur im Fernfeld gilt, können mit einer Nahfeldsonde deutlich bessere Auflösungen erzielt werden.

Röntgenkristallographie

Zur Bestimmung von Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung werden die magnetische Kernresonanzspektroskopie und kristallographische Techniken (unter Verwendung von Elektronen-, Neutronen- oder Röntgenstrahlen) eingesetzt. Die bislang wichtigste dieser Methoden ist die Röntgenkristallographie. Bei ihr werden Beugungsbilder von Proteinkristallen gemessen und anschließend die dreidimensionale Position der Elektronen mathematisch bestimmt. Abb. 6 zeigt schematisch die Methode der Röntgenstrukturanalyse. Röntgenstrahlen, die durch Aufprall von beschleunigten Elektronen auf Metallflächen erzeugt werden können, werden auf einen Proteinkristall gerichtet. Ein Teil der Röntgenstrahlen wird am Kristall gestreut und vom Detektor als Beugungsbild detektiert. Aus dem Beugungsbild kann mittels Fouriertransformation die Elektronendichteverteilung $\rho(\vec{r})$ berechnet werden.

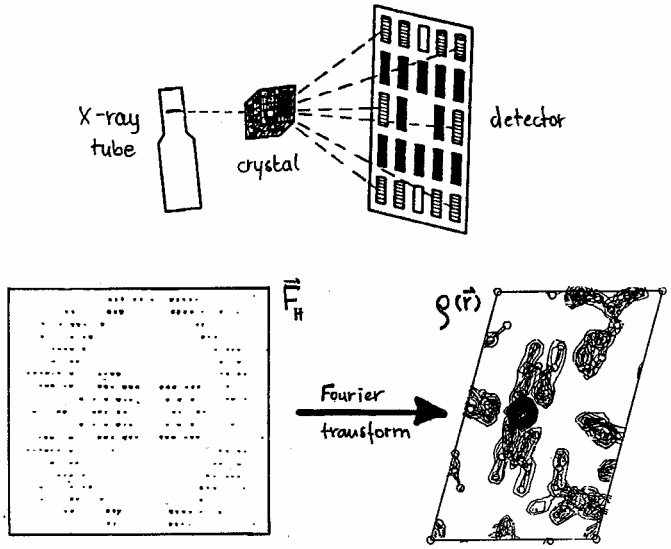


Abb. 6: Schematische Darstellung der Strukturanalyse von Proteinkristallen.

Bei der Thomsonstreuung werden die Röntgenstrahlen elastisch gestreut, d.h., die Energie der einfallenden Photonen, $E_0 = \hbar\omega = h\nu = hc/\lambda$, ist gleich der Energie der gestreuten Teilchen, $E_1 = E_0$. Dasselbe gilt für den Betrag des Impulses ($\vec{p}_0 = \hbar\vec{k}_0 = h\vec{s}_0$ ($|\vec{s}_0| = 1/\lambda$), $|\vec{p}_1| = |\vec{p}_0|$).
Die Herleitung der Thomsonstreuung kann mit einer klassischen Betrachtung erfolgen. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes führt ein freies Elektron erzwungene Schwingungen aus. Bei Einfall einer unpolarisierten Röntgenwelle ist die Abhängigkeit des differentiellen Streuquerschnitts vom Ablenkwinkel φ der gestreuten Strahlung gegeben durch

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \left(\frac{e^2}{mc^2}\right)^2 \left(\frac{1+\cos^2\varphi}{2}\right).$$

Der Faktor $e^2/(mc^2)$ (cgs-System) ist der klassische Elektronenradius, $2.8 \times 10^{!15}$ m, der winkelabhängige Term ist der Polarisationsfaktor. Solange die Röntgenquantenenergie sehr viel kleiner als die Ruheenergie des Elektrons (mc^2) ist, wird die klassische Formel von der Quantenelektrodynamik bestätigt.
Neben der elastischen Streuung von Photonen (Thomsonstreuung) existieren noch der Photoeffekt (Emission von Elektronen durch Photonenbestrahlung) und der Comptoneffekt (inelastische Streuung der Röntgenphotonen an Elektronen) als Wechselwirkung von Röntgenstrahlen mit Atomen.

Streuung an zwei Elektronen

In Abb. 7a ist die Geometrie eines typischen Röntgenstreuexperiments aufgeführt. Sowohl die Quelle als auch der Detektor sollen sehr weit von der Probe (im Vergleich mit Abständen innerhalb der Probe) aufgestellt sein (Fraunhofer-Geometrie). Es trifft ein kollimierter Röntgenstrahl (aus der Richtung $\hat{s}_0$) auf ein einzelnes Elektron. Die mit (^) markierten Vektoren sind Einheitsvektoren, also Vektoren mit Betrag 1. Ein Teil der Röntgenquanten wird durch Streuung in alle Richtungen gelenkt. Ein Detektor misst die Intensität der in Richtung $\hat{s}_1$ gestreuten Welle. Der Streuwinkel θ ist als halber Winkel zwischen $\hat{s}_0$ und $\hat{s}_1$ definiert; die Richtungsänderung wird also durch den Winkel 2θ beschrieben.

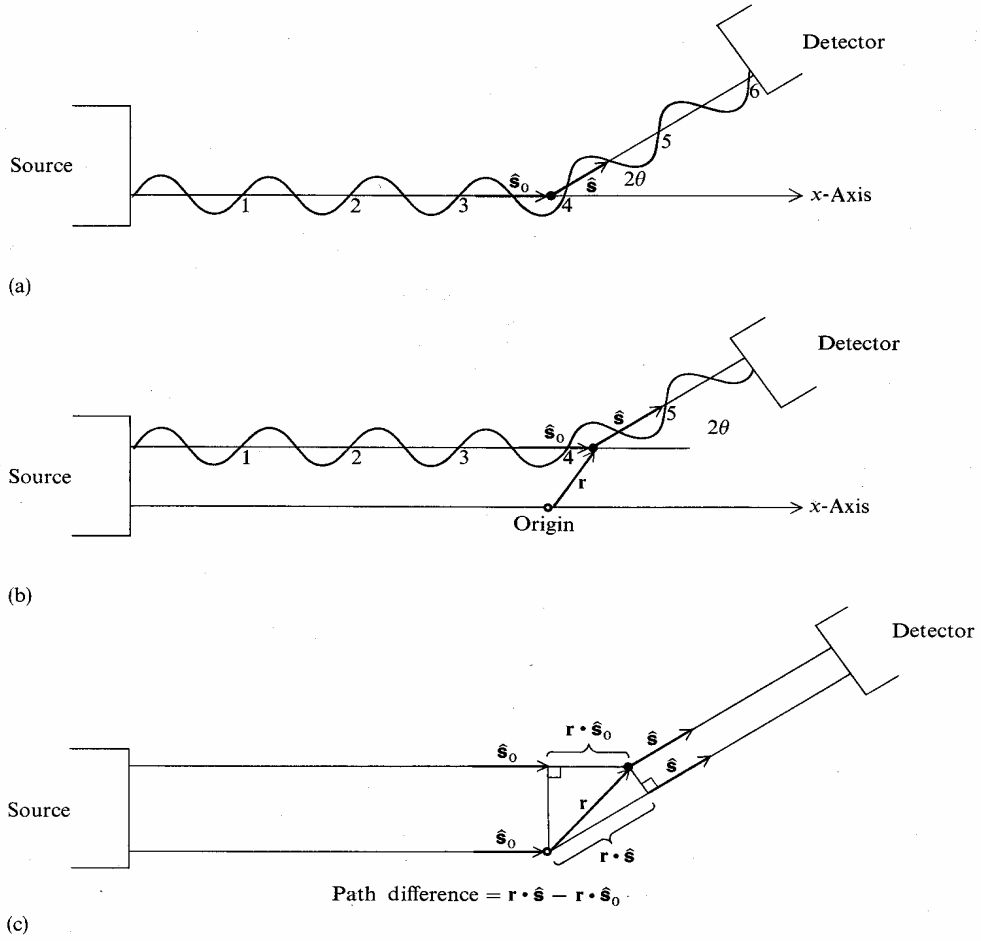


Abb. 7: Röntgenstreuung an einzelnen Elektronen. a) Ein Elektron im Ursprung. b) Ein Elektron am Ort $\vec{r}$ vom Ursprung. c) Wegunterschied zwischen einer an einem Elektron bei $\vec{r}$ und einer an einem Elektron am Ursprung gestreuten Welle.

Für die Behandlung der Röntgenstreuung ist es vorteilhaft, den Streuvektor $\vec{S}$ wie folgt zu definieren (Abb. 8a):

$$\vec{S} = (\hat{s}_1 - \hat{s}_0)/\lambda = \vec{S}_1 - \vec{S}_0 .$$

Für den Betrag des Streuvektors ergibt sich nach Abb. 8b

$$\left|\vec{S}\right| = 2\left|\sin\theta\right|/\lambda .$$

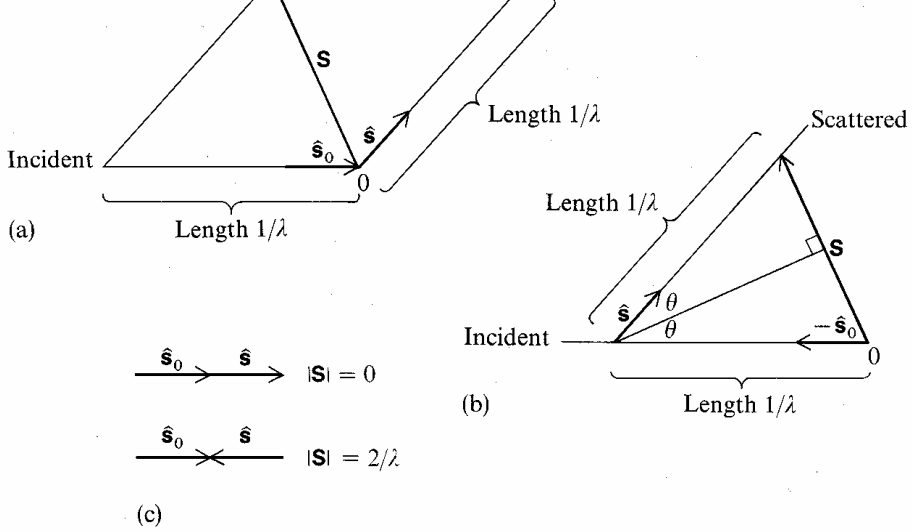


Abb. 8: Geometrie eines Röntgenstreuexperiments. a) Definition des Streuvektors. b) Verschiebung des Vektors des gestreuten Lichts um $1/\lambda$ entgegen der Einfallsrichtung. c) Maximaler und minimaler Streuvektor.

Der Streuvektor ist also in einem Koordinatensystem definiert, dessen Achsen die Dimension einer reziproken Länge haben. Dieses Koordinatensystem spannt den reziproken Raum auf. Die Wegdifferenz zwischen den an zwei Elektronen in die gleiche Richtung gestreuten Photonen ergibt sich unter der Annahme, dass der Detektor weit entfernt ist (Abb. 7c), zu

$$\vec{r} \cdot (\hat{s}_1 - \hat{s}_0) = \Delta r(\vec{S}) .$$

Aus dem Wegunterschied resultiert ein Unterschied im Phasenfaktor der an den Elektronen e_0 und e_1 gestreuten Wellen,

$$e_0 : f_0 ,$$
$$e_1 : f_0 \cdot e^{i\phi} = f_0 e^{i2\pi\Delta r/\lambda} = f_0 e^{i2\pi\vec{S}\cdot\vec{r}} .$$

Für den **Strukturfaktor** (Streuamplitude), der als das Verhältnis der Streuamplitude des betrachteten Objekts zu der eines einzelnen Elektrons am Ursprung definiert ist, erhält man dann (für das System aus beiden Elektronen)

$$F(\vec{S}) = |F| e^{i\varphi} = \frac{f_0 + f_0 e^{i\phi}}{f_0} = 1 + e^{i\phi} .$$

Da Elektronen in einem Atom nicht lokalisiert sind, wird zur Beschreibung der Elektronenverteilung eines Atoms oder Moleküls die Elektronendichte $\rho(\vec{r})$ eingeführt. Somit ergibt sich für den Strukturfaktor

$$F(\vec{S}) = \int d\vec{r}\, \rho(\vec{r}) e^{\,2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}} ,$$

wobei das Integral über das gesamte Volumen V des Streuobjekts ausgeführt werden muss. Die Integralgrenzen können ins Unendliche ausgedehnt werden, da die Elektronendichte außerhalb der Streuprobe Null ist. Somit stellt obige Gleichung eine Fouriertransformation dar. Ihre Inversion lautet

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \int d\vec{S}\, e^{-2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}} F(\vec{S}) .$$

Das Integral verläuft über den gesamten reziproken Raum. Es lässt sich also bei Kenntnis des Strukturfaktors im gesamten reziproken Raum die Elektronendichteverteilung des betrachteten Objekts ermitteln. Allerdings kann $F(\vec{S})$ nicht direkt gemessen werden.

Experimentell wird die Intensität $I(\vec{S})$, das Betragsquadrat des Strukturfaktors, in Abhängigkeit vom Streuwinkel bestimmt,

$$I(\vec{S}) = F(\vec{S}) \cdot F^*(\vec{S}) = \left|F(\vec{S})\right|^2 .$$

Es kann also nur die Amplitude, nicht aber die Phase des im Allgemeinen komplexen Strukturfaktors gemessen werden, da die Phase im Betragsquadrat herausfällt. Für die Phasenbestimmung gibt es verschiedene experimentelle und theoretische Methoden, von denen das Verfahren des multiplen isomorphen Ersatzes später diskutiert wird.

Streuung an einem Atom

Bei Atomen kann man die Elektronenverteilung in guter Näherung als sphärisch ansehen. Dann folgt für den Strukturfaktor

$$F(\vec{S}) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} \sin\theta d\theta \int_0^{\infty} dr \rho(r) r^2 e^{2\pi i S r \cos\theta} ,$$

$$= 4\pi \int_0^{\infty} dr \rho(r) r^2 \frac{\sin(2\pi S r)}{2\pi S r} \equiv f(\vec{S}) \quad ,$$

wobei *f*(*S*) Atomstreufaktor (Atomformamplitude) genannt wird. Diese Größe ist in diesem einfachen Modell reell, da $\rho(\vec{r}) = \rho(-\vec{r})$. Für Atome kann die Elektronendichteverteilung näherungsweise mit einer Gaußverteilung,

$$\rho(r) = zNe^{-kr^2} ,$$

beschrieben werden, wobei *N* die Normierung und *k* die Breite der Gaußverteilung beschreibt. Somit kann *f*(*S*) zu

$$f(S) = ze^{-(\pi^2/k)S^2}$$

berechnet werden. Aus obiger Gleichung folgt, dass der Streufaktor in Vorwärtsrichtung, *f(0)*, maximal und gleich der Anzahl der Elektronen, *z*, ist (Abb. 9).

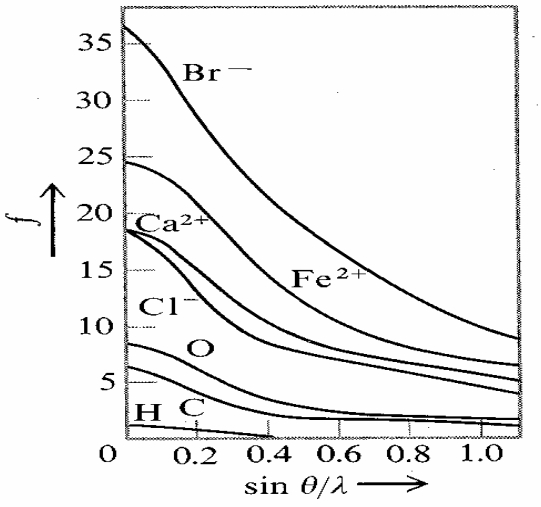


Abb. 9: Der Atomstreufaktor für verschiedene Atome als Funktion des Streuwinkels.

Streuung an mehreren Atomen

Für die Streuung an *N* Atomen, die sich an den Orten $\vec{r}_n$ befinden und den Atomstreufaktor f_n haben, kann der Strukturfaktor als Summe über die Beiträge aller Atome formuliert werden,

$$F(\vec{S}) = \sum_n f_n(\vec{S}) e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_n} .$$

Als Sonderfall der Streuung an mehreren Atomen sollen *2N+1* identische Atome, die sich in einer Reihe befinden, betrachtet werden (Abb. 10a). Das zentrale Atom befinde sich im Origo; der Abstand zwischen den Atomen sei *a*. Der gesamte Strukturfaktor ist dann

$$F(\vec{S}) = f(S) \sum_{n=-N}^{N} e^{2\pi i n \vec{S}\cdot\vec{a}} .$$

Mit Hilfe der geometrischen Reihe folgt

$$F(\vec{S}) = f(S)\cdot e^{-2\pi i N \vec{S}\cdot\vec{a}} \cdot \frac{1 - e^{2\pi i (2N+1)\vec{S}\cdot\vec{a}}}{1 - e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{a}}},$$

$$= f(S)\cdot \frac{\sin([2N+1]\pi\vec{S}\cdot\vec{a})}{\sin(\pi\vec{S}\cdot\vec{a})} .$$

Die Intensität der Streuung kann dann wie immer als Betragsquadrat des Strukturfaktors berechnet werden. Abb. 10b zeigt die Streuintensitäten eindimensionaler Anordnungen von Atomen.

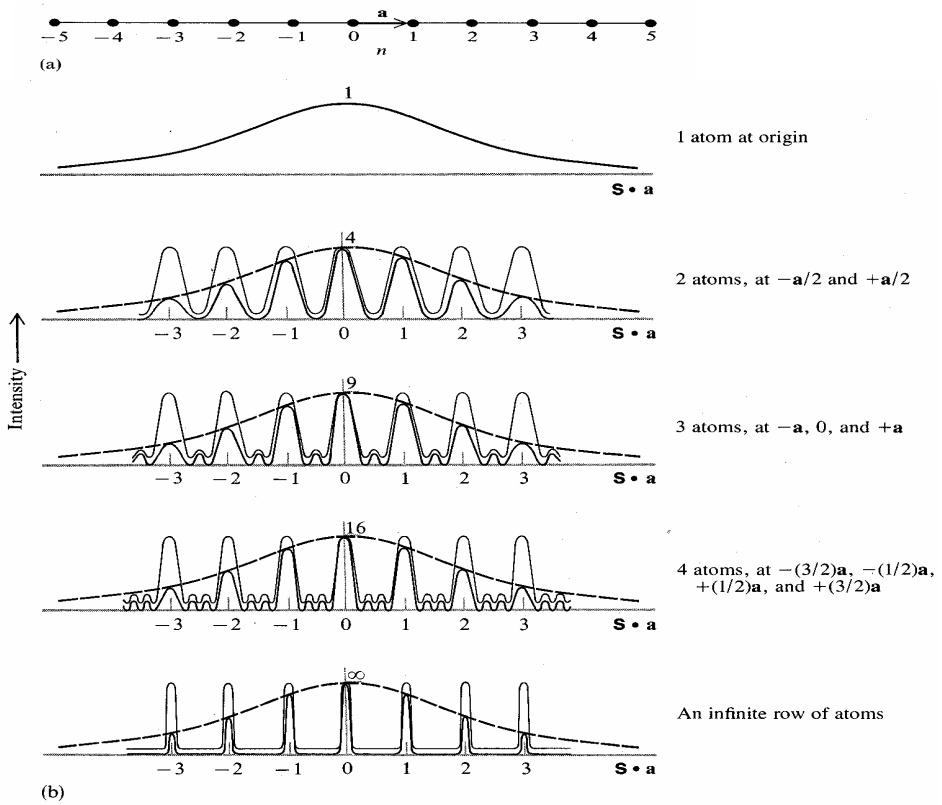


Abb. 10: Röntgenstreuung an einer eindimensionalen Anordnung von Atomen. a) Skizze der Anordnung der Atome. b) Streuintensität für verschiedene Atomanzahlen. Eingezeichnet sind die beobachtbare Intensität (durchgezogene Kurve), die Intensität für ein einzelnes Atom (gestrichelte Kurve) und die Gitterfunktion (dünn durchgezogene Kurve). Beachte die quadratische Zunahme der Intensität mit der Atomanzahl bei $\vec{S}\cdot\vec{a} = 0$.

Für eine große Anzahl von Streuvektoren ist die Streuintensität überall fast Null, außer dort, wo die Bedingung $\vec{S} \cdot \vec{a} = h$ erfüllt ist (von Laue-Bedingung), wobei h eine ganze Zahl darstellt. Abb. 11 veranschaulicht die von Laue-Bedingung.

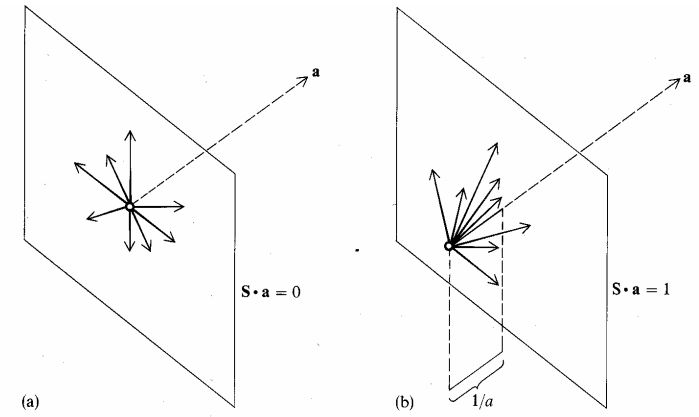


Abb. 11: Die von Laue-Bedingungen für eine eindimensionale Anordnung von Atomen für h = 0 und h =1.

Beispielsweise bedeutet die Bedingung h = 0, dass der Streuvektor jeder beliebige Ursprungsvektor in der Ebene senkrecht zu $\vec{a}$ sein kann. Weiterhin folgt, dass alle möglichen h-Werte einen Satz von parallelen Ebenen im reziproken Raum definieren (Abb. 12a).

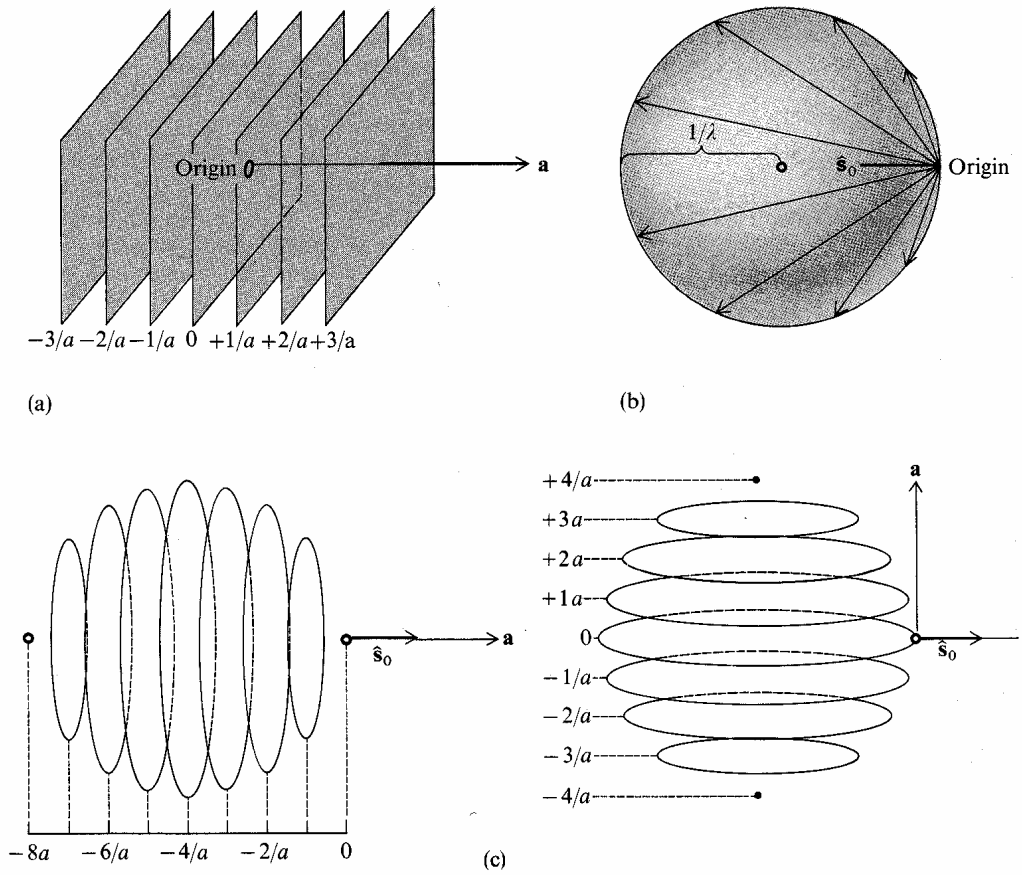


Abb. 12: Experimentelle Bedingungen für die Beobachtung von Streuung an einer linearen Anordnung von Atomen. a) Satz von Ebenen aufgrund der von Laue-Bedingung. b) Für eine vorgegebene Einstrahlrichtung müssen die Streuvektoren auf einer Kugel (Ewaldkugel) liegen. c) Schnitte beider Bedingungen für zwei verschiedene Anordnungen von $\vec{s}_0$ und $\vec{a}$.

Da die Einstrahlrichtung der Röntgenquanten in einem Streuexperiment vorgegeben ist, folgt aus Abb. 12b, dass der Streuvektor auf einer Kugel (Ewaldkugel) liegen muss. Die Schnitte dieser zwei Bedingungen ergeben parallele Kreise (Abb. 12c). Abb. 13 und Abb. 14 zeigen die Streuung an einer linearen Anordnung von Streuern, wie sie im Experiment gesehen wird.

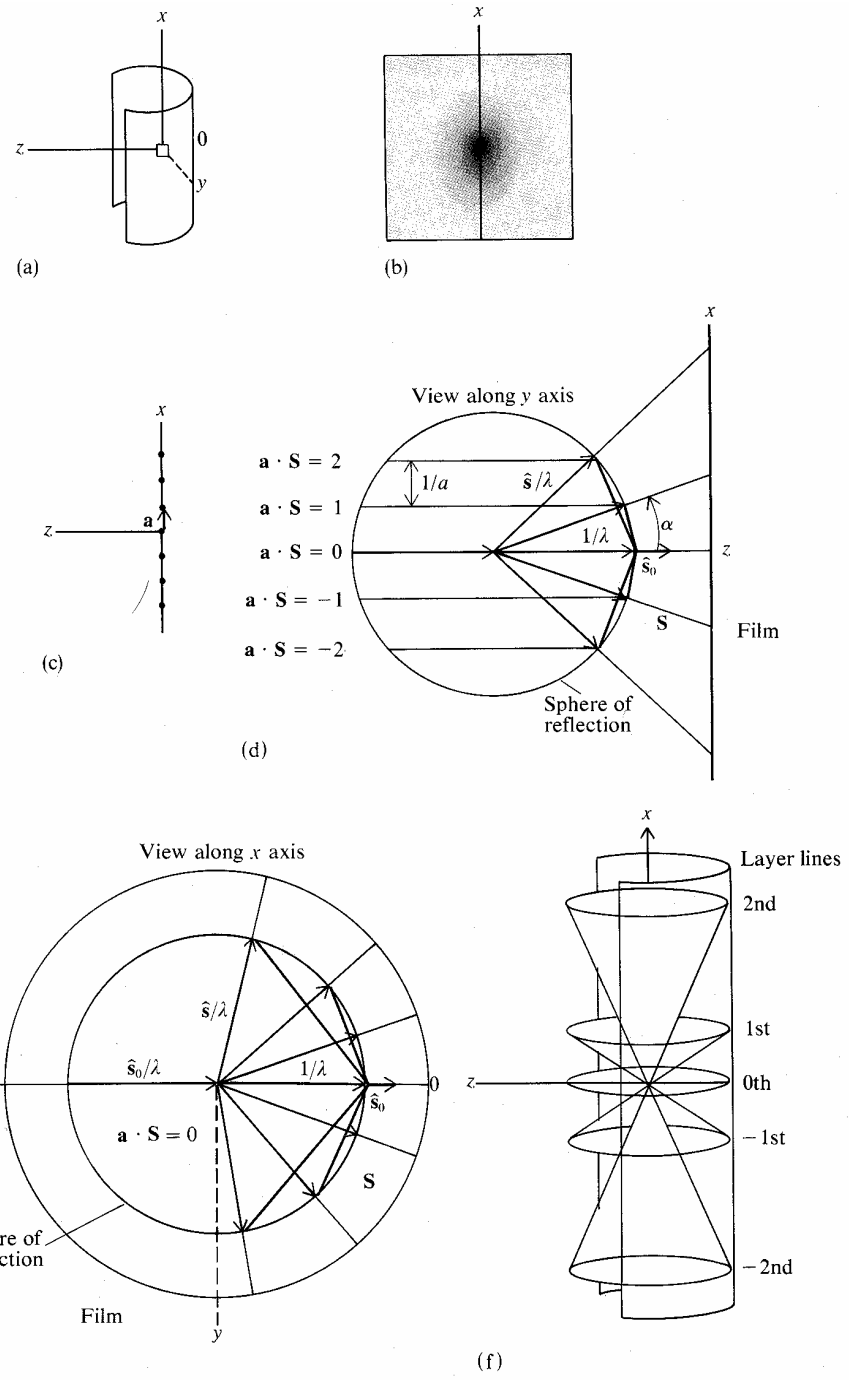


Abb. 13: a) Röntgenstrahlen werden entlang der z-Richtung auf die Probe, die sich im Origo befindet, eingestrahlt. Mit dem zylindrischen Film werden die gestreuten Photonen detektiert. b) Streubild eines einzelnen Atoms. Das Pattern ist wegen des zylindrischen Filmes elliptisch. Bei einem ebenen Film ist es zirkular. c) Lineare Anordnung der Streuzentren. d) Erlaubte Streurichtungen (x-y-Ebene). e) Erlaubte Streurichtungen (y-z-Ebene). f) Kegel der gestreuten Strahlung.

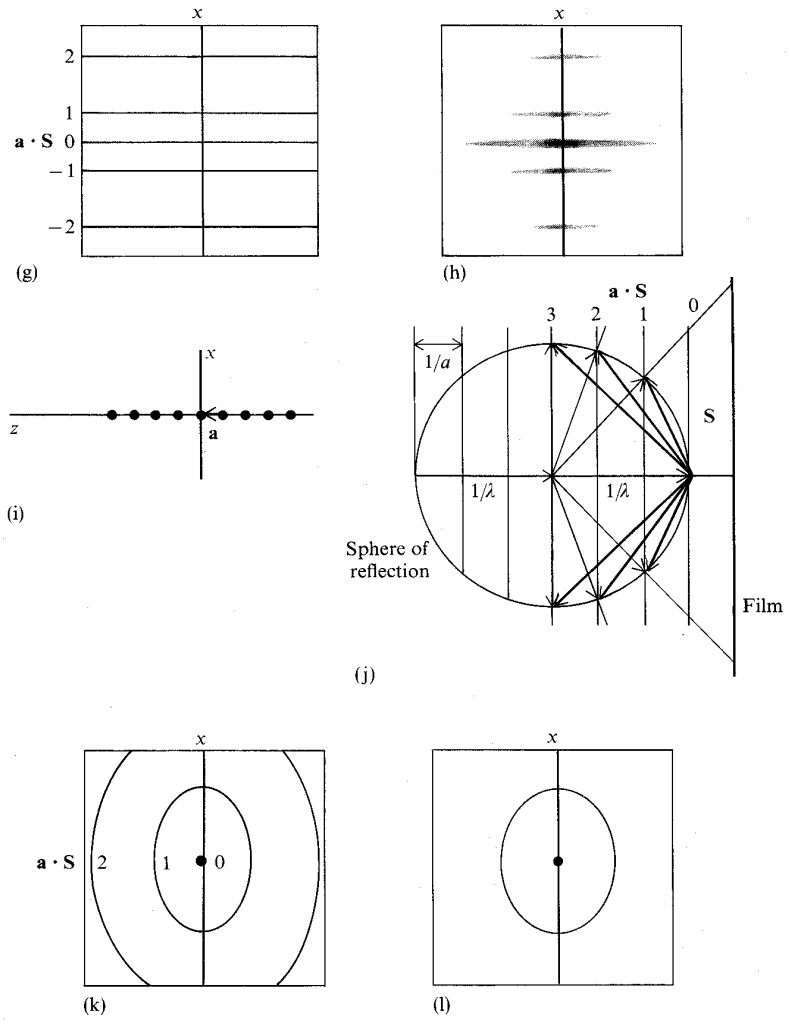


Abb. 14 (Fortsetzung von Abb. 13): g) Beugungsbild der linearen Anordnung, das durch die Schnitte der Streukegel mit dem zylindrischen Film entsteht. h) Das tatsächliche Bild ist das Produkt aus den Bildern in b) und g). i) Alternative Anordnung der Streuzentren (entlang der Einfallsrichtung der Röntgenquanten). j) Die erlaubten Streurichtungen der Anordnung in i). k) Beugungsbild der Anordnung von i). l) Das Produkt der Bilder in b) und k).

Beugung an dreidimensionalen Atomanordnungen

In diesem Abschnitt wird die Beugung von einer Dimension auf drei Dimensionen erweitert. Die von Laue-Bedingung für ein eindimensionales Objekt mit Periode *a* ergab, dass die erlaubten Streuvektoren im reziproken Raum auf parallelen Ebenen mit dem Abstand 1/*a* liegen. In einer zweidimensionalen, regelmäßigen Anordnung von Streuern erzeugt die von Laue-Bedingung simultan parallele Ebenen in zwei Richtungen, so dass sich die Streuvektoren auf Linien befinden, die als Schnitte dieser Ebenenscharen entstehen. Liegt ein dreidimensionaler Kristall vor, so werden diese Linien von parallelen Ebenen in einer dritten Richtung geschnitten. Die möglichen Streuvektoren befinden sich nun auf Punkten, die ein Gitter darstellen, das so genannte reziproke Gitter (Abb. 15). Zu einem Beugungsreflex kommt es nur, falls der Streuvektor auf einen dieser Punkte des reziproken Gitters fällt.

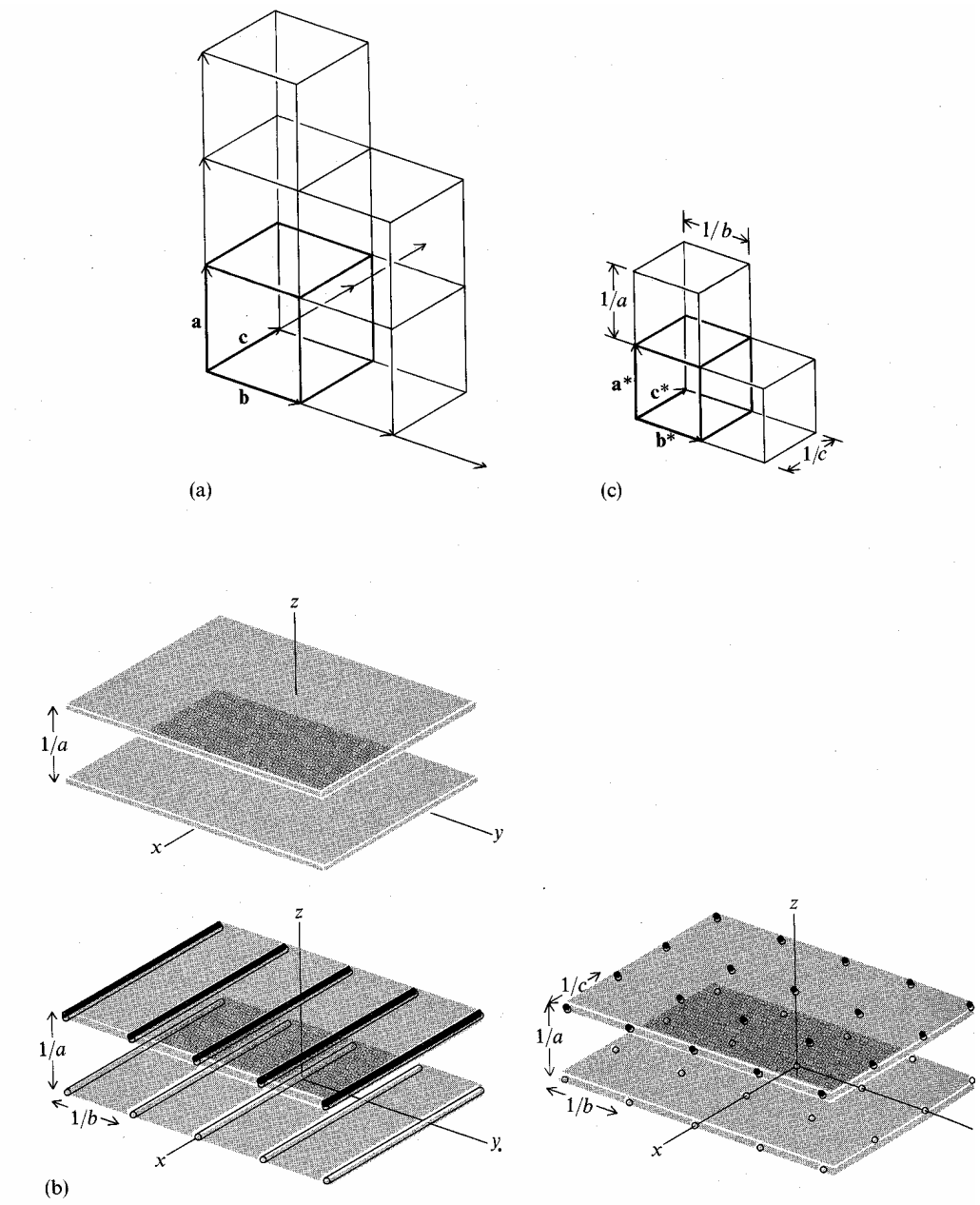


Abb. 15: Dreidimensionale periodische Streuanordnung (Kristall): a) Die Vektoren $\vec{a}, \vec{b}$ und $\vec{c}$ definieren die Streuzentren im Ortsraum. b) Streuebenen im reziproken Raum, die von jeder eindimensionalen Periodizität herrühren, ergeben als Schnitte Linien im zweidimensionalen und Punkte im dreidimensionalen Raum. Die entstehenden Punkte stellen das reziproke Gitter dar. c) Das reziproke Gitter kann durch die Vektoren $\vec{a}^*, \vec{b}^*$ und $\vec{c}^*$ erzeugt werden. Streuvektoren, die vom Ursprung bis zu diesen Punkten reichen, erzeugen Reflexe.

In einem Molekülkristall befinden sich mehrere Atome in einer der von den Vektoren $\vec{a}, \vec{b}$ und $\vec{c}$ aufgespannten Zellen. Die Ortsvektoren $\vec{r}_j$ der Atome können durch einen Gittervektor $\vec{r}_L$ und einen weiteren Vektor $\vec{r}_n$ dargestellt werden (Abb. 16).

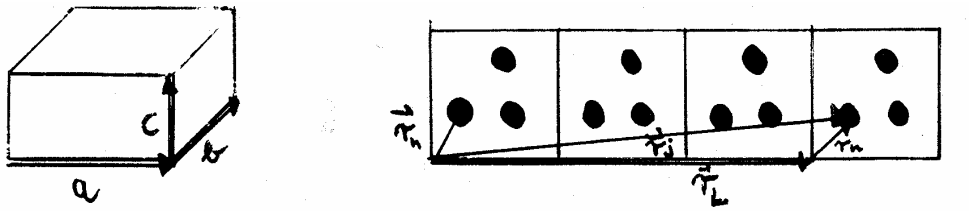


Abb. 16: Darstellung der Ortsvektoren.

Es folgt demnach

$$\vec{r}_j = \vec{r}_L + \vec{r}_n ,$$
$$\vec{r}_L = u\vec{a} + v\vec{b} + w\vec{c} ,$$
$$\vec{r}_n = x_n\vec{a} + y_n\vec{b} + z_n\vec{c} ,$$

wobei *u*, *v* und *w* ganze Zahlen und x_n , y_n und z_n reelle Zahlen zwischen 0 und 1 sind. Daraus ergibt sich für den Strukturfaktor

$$F(\vec{S}) = \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_j} ,$$
$$= \sum_u \sum_v \sum_w e^{2\pi i \vec{S}\cdot(u\vec{a}+v\vec{b}+w\vec{c})} \sum_n f_n e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_n} .$$

Die Summe über *n* wird molekularer Strukturfaktor $F_m(h,k,l)$ genannt, die dreifache Summe stellt die Gitterfunktion dar. Durch Einsetzen der von Laue-Bedingungen

$$\vec{S}\cdot\vec{a} = h ,$$
$$\vec{S}\cdot\vec{b} = k ,$$
$$\vec{S}\cdot\vec{c} = l ,$$

folgt für den Exponenten der Gitterfunktion:

$$2\pi i\vec{S}\cdot(u\vec{a} + v\vec{b} + w\vec{c}) = 2\pi i(uh + vk + wl) = 2\pi i \cdot \text{ganze Zahl},$$

da *h*, *k* und *l* ganze Zahlen sind. Somit ist die Gitterfunktion gleich *N*, der Anzahl der Einheitszellen. Wird ein beliebiges Koordinatensystem im reziproken Raum gewählt, so hat obiges Produkt neun Summanden,

$$\vec{S}\cdot\vec{r}_L = (h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*)(u\vec{a} + v\vec{b} + w\vec{c}) .$$

Wählt man die reziproken Gittervektoren durch die Vorschrift (Abb. 17)

$$\vec{a}^* = \frac{\vec{b}\times\vec{c}}{\vec{a}\cdot(\vec{b}\times\vec{c})} ,$$
$$\vec{b}^* = \frac{\vec{c}\times\vec{a}}{\vec{a}\cdot(\vec{b}\times\vec{c})} ,$$
$$\vec{c}^* = \frac{\vec{a}\times\vec{b}}{\vec{a}\cdot(\vec{b}\times\vec{c})} ,$$

so gilt $\vec{a}\cdot\vec{a}^* = \vec{b}\cdot\vec{b}^* = \vec{c}\cdot\vec{c}^* = 1,$ und alle gemischten Produkte ergeben 0. Es bleiben also nur drei Terme übrig. Die Vektoren $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$ spannen den reziproken Raum auf.

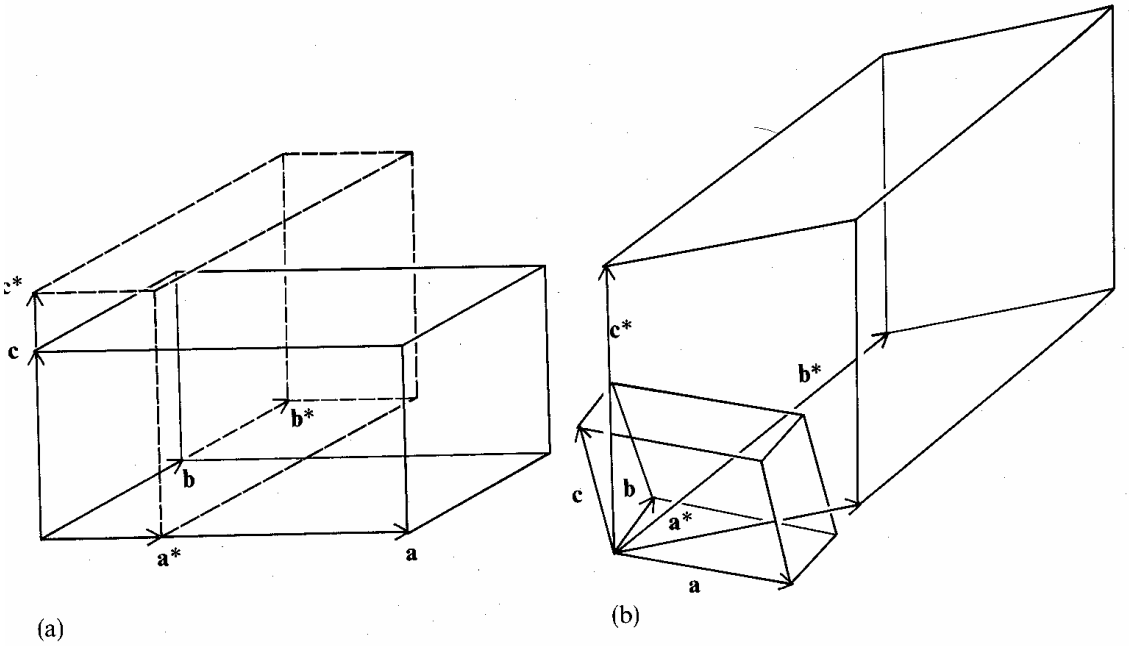


Abb. 17: Vergleich des reziproken und direkten Gitters, a) orthorhombischer Kristall, b) trikliner Kristall.

Die von Laue-Bedingungen werden nur erfüllt für

$$\vec{S} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*,$$

falls *h*, *k* und *l* ganze Zahlen sind. Für den Strukturfaktor folgt

$$F(h,k,l) = N\sum_n f_n e^{2\pi i(hx_n+ky_n+lz_n)},$$

wobei die Summe gleich dem molekularen Strukturfaktor $F_m(h,k,l)$ ist. Die Elektronendichteverteilung erhält man wieder durch Fouriertransformation,

$$\rho_m(\vec{r}) = \frac{1}{V}\sum_{h,k,l} F_m(h,k,l)e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}.$$

Die Ewaldkugel

Ein Beugungsreflex wird erzeugt, falls der Streuvektor auf einen reziproken Gitterpunkt fällt. Für eine gegebene Röntgenwellenlänge, Kristallorientierung und Einstrahlrichtung gehen alle Streuvektoren vom Ursprung zu der Oberfläche einer Kugel im reziproken Raum, der Ewaldkugel (vergleiche mit dem eindimensionalen Fall), welche einen Durchmesser von $2/\lambda$ hat. Das ist der größte Wert, den der Streuvektor – bei einem Streuwinkel von 90° (Rückstreuung) − annehmen kann. Die Oberfläche der Kugel geht durch den Ursprung des reziproken Gitters, (Abb. 18a).

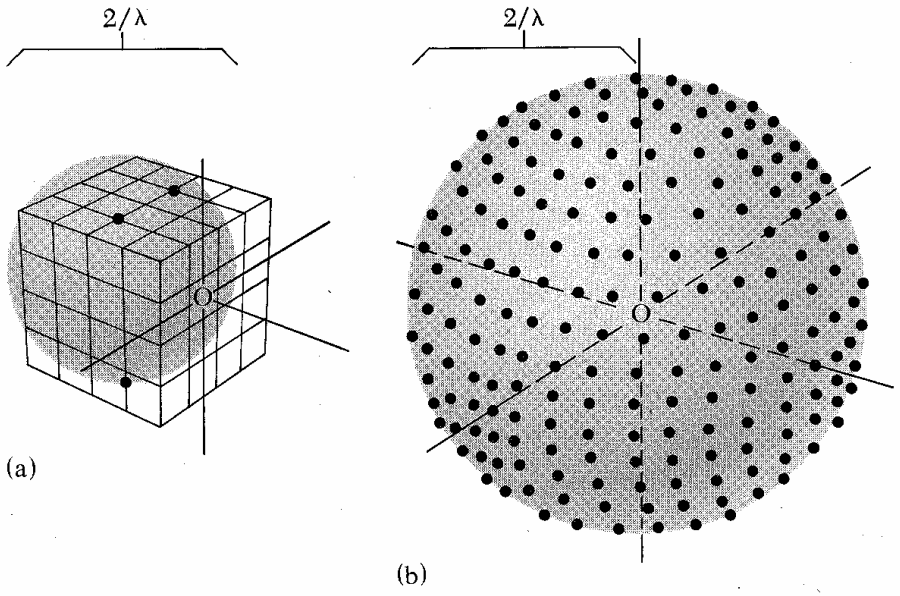


Abb. 18: Experimentelle Einschränkungen bei der Röntgenbeugung. a) Für eine vorgegebene Geometrie und Röntgenwellenlänge wird nur bei einem Schnitt der Ewaldkugel mit einem reziproken Gitterpunkt Streuintensität erzeugt. b) Nur der Teil des reziproken Gitters, der innerhalb einer Kugel mit Radius *2 / λ* liegt, kann gemessen werden.

Beugung entsteht nur, falls die Oberfläche der Ewaldkugel einen reziproken Gitterpunkt schneidet. Da die verwendete Röntgenstrahlung nicht völlig monochromatisch und kollimiert und das Kristallgitter nicht perfekt ist, sind die Oberfläche der Kugel und die reziproken Gitterpunkte aber tatsächlich ausgedehnte Objekte. Trotzdem wird es jedoch bei fester Geometrie nur eine begrenzte Anzahl von Schnittpunkten geben. Für die Analyse einer Molekülstruktur müssen möglichst viele Beugungsreflexe gemessen werden. Deshalb wird in der Regel der Kristall gedreht. Da damit auch das reziproke Gitter des Kristalls gedreht wird, schneiden die reziproken Gitterpunkte die Kugeloberfläche. Immer wenn die reziproken Gitterpunkte die Oberfläche der Kugel durchdringen, entsteht ein Beugungsreflex. Allerdings kann nur von den reziproken Gitterpunkten, die innerhalb einer Kugel mit Radius $2/\lambda$ liegen, ein Beugungsreflex gemessen werden (Abb. 18). Beachte, dass der Radius dieser Kugel gerade doppelt so groß ist wie der Radius der Ewaldkugel. Sie wird auflösungslimitierende Kugel genannt. Ihre Größe kann durch Änderung der Wellenlänge der Röntgenstrahlung verändert werden.

Größere Abstände im reziproken Raum korrespondieren mit kleineren Abständen im realen Kristall. Das bedeutet, dass durch die Begrenzung der messbaren Röntgenreflexe innerhalb der limitierenden Kugel die Auflösung der Elektronendichteverteilung des Kristalls begrenzt wird. Zur Illustration des Zusammenhangs zwischen dem Auflösungsvermögen und der limitierenden Kugel soll ein zweidimensionales Beispiel betrachtet werden. Abb. 19 a zeigt einen Ausschnitt eines antiparallelen β-Faltblattes von Poly-L-Alanin. Zur Vereinfachung wird nur eine zweidimensionale Projektion betrachtet. Der molekulare Strukturfaktor für eine zweidimensionale Anordnung ist

$$F_m(h,k) = \sum_j f_j(S) e^{2\pi i(hx_j + ky_j)} .$$

Abb. 18b zeigt einen Teil der Strukturfaktordaten. Da die betrachtete Streuanordnung punktsymmetrisch ist, reduziert sich der Phasenterm zu 1 oder –1. (Dies ist durch die leeren und gefüllten Kreise angedeutet.)

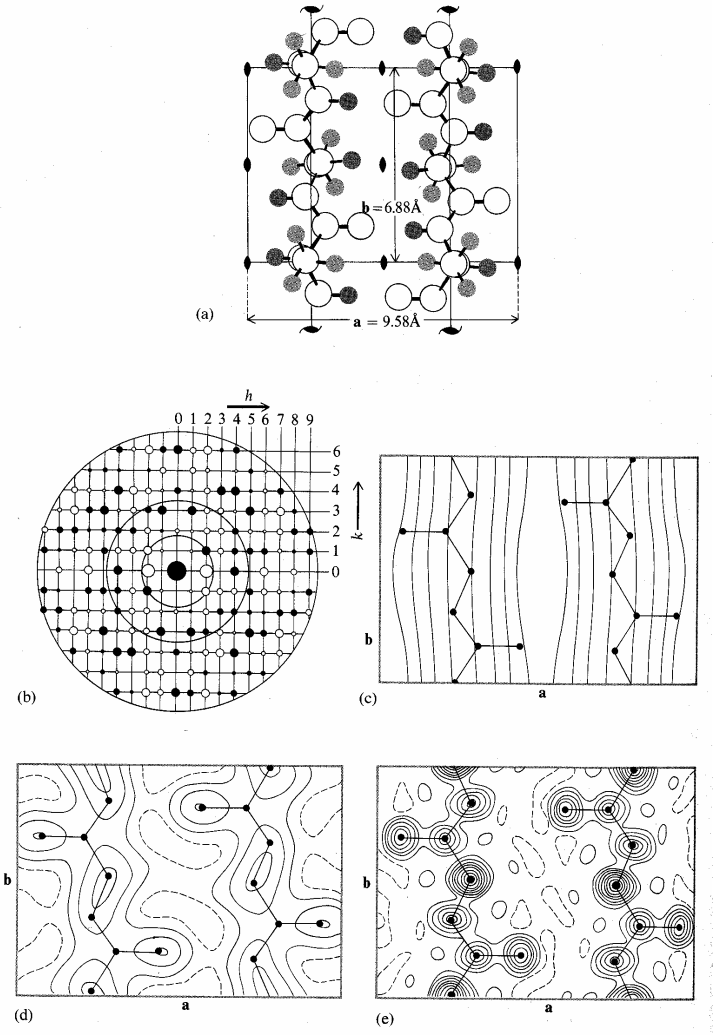


Abb. 19: Auflösung der Elektronendichteverteilung. a) Zwei Stränge eines antiparallelen Faltblatts aus Poly-L-Alanin in einer zweidimensionalen Einheitszelle. b) Berechneter Strukturfaktor für einen zweidimensionalen Kristall, der durch die zweidimensionale Projektion der Struktur in a) gewonnen wurde. Innerhalb der Kreise befinden sich die Reflexe, die für die Auflösungen 4, 2 und 1 Angström (von innen nach außen) gemessen werden können. c) d) e) Elektrondichteverteilungen, die daraus für die Auflösungen von 4, 2 und 1 Å berechnet wurden.

Aus den Daten der Röntgenbeugung kann mit

$$\rho(x,y) = \frac{1}{A}\sum_h \sum_k F_m(h,k) \cdot e^{-2\pi i(hx+ky)}$$

die Elektronendichteverteilung berechnet werden. Abb. 19 zeigt, wie die Auflösung der Elektronendichteverteilung mit der Größe der limitierenden Kugel und damit der Wellenlänge der Röntgenstrahlung zusammenhängt. Es ist deutlich zu sehen, wie die größere Anzahl der gemessenen Beugungsreflexe (bei größeren Abständen im reziproken Raum) die Auflösung im Ortsraum erhöht.

Allerdings kann nicht einfach durch Verkleinerung der Röntgenwellenlänge die Auflösung unbegrenzt erhöht werden, da die Kristalle nicht perfekt aufgebaut sind. Dies hat zur Konsequenz, dass Beugungsreflexe bei großen Streuwinkeln 2θ, die für die hohe Auflösung zuständig sind, sehr schwach werden.

Das Phasenproblem

Der Strukturfaktor ist eine komplexe Größe, von der nur der Betrag aus dem Beugungsbild ermittelt werden kann. Die Phase ist aber eher wichtiger als der Betrag für die Berechnung von Elektronendichten (Abb. 20).

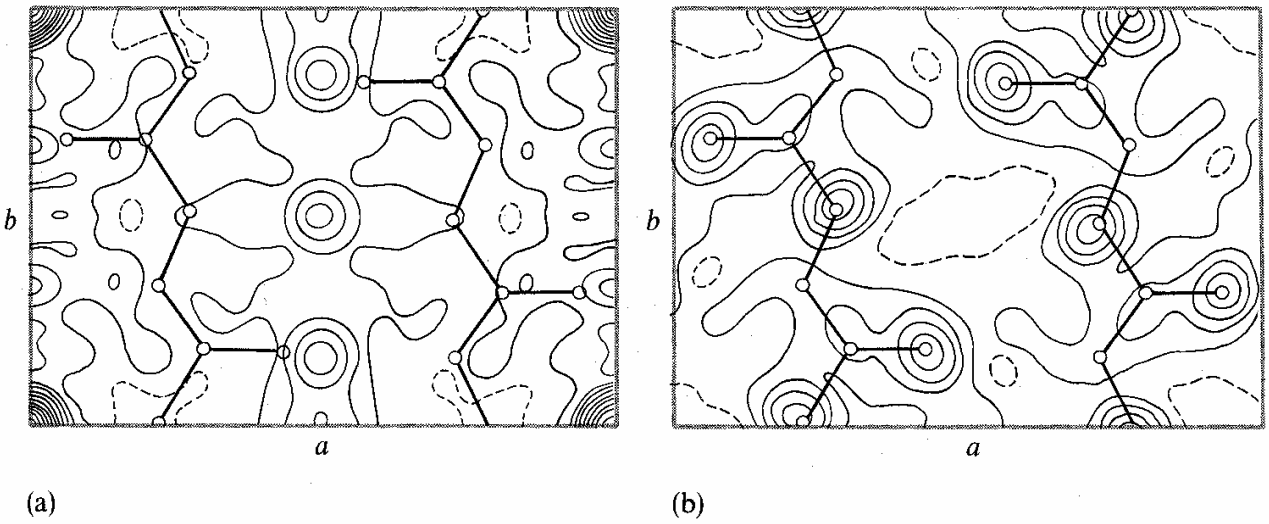


Abb. 20: Relative Bedeutung von Phase und Amplitude für die Berechnung der Elektronendichte von Beugungsbildern (gleiche Probe wie in Abb. 19). a) Die korrekten Amplituden wurden in der Fouriertransformation verwendet; die Phasen wurden auf Null gesetzt. b) Die korrekten Phasen wurden verwendet; die Amplituden wurden auf denselben Durchschnittswert gesetzt.

Die Abb. 20a (links) zeigt die mit der Fouriertransformation berechnete Elektronendichte bei Verwendung der korrekten Amplituden, aber konstanter Phase 0 aller Strukturfaktoren. Auf der rechten Seite (Abb. 20b) wurden die korrekten Phasen, aber eine durchschnittliche Amplitude der Strukturfaktoren verwendet. Es ist bei Vergleich der Elektronendichten mit dem Modell in Abb. 19 offensichtlich, dass ohne korrekte Phasen keine Ähnlichkeit mit dem Modell erzielt wird. Trotz fehlerhafter Amplituden ist hingegen die Elektronendichte auf der rechten Seite vergleichsweise realistisch.

Die Phase kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden (Direkte Methode, Methode des molekularen Ersatzes, Methode der multiplen anomalen Dispersion). Im Folgenden soll die Methode des **multiplen isomorphen Ersatzes** (multiple isomorphous replacement, MIR) behandelt werden. Dabei werden schwere Atome (z.B. Xenon, Quecksilber, Platin, Uran) an definierte Orte der Einheitszelle gebracht. Dies geschieht durch Diffusion im Kristallwasser des Proteinkristalls. Anschließend wird eine Beugungsaufnahme von dieser Probe aufgenommen und mit dem Beugungsbild der unveränderten Probe verglichen (Abb. 21).

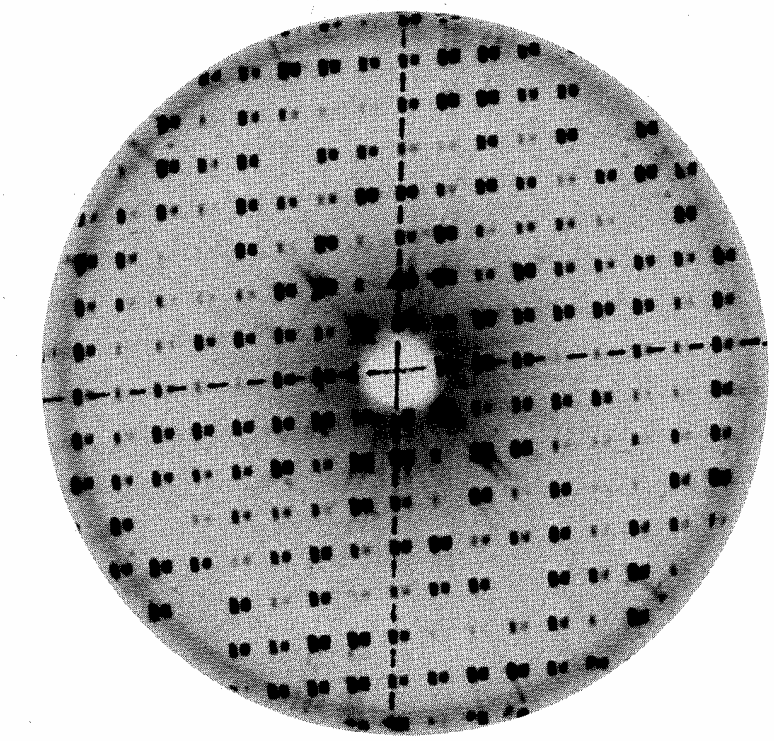


Abb. 21: Isomorpher Ersatz bei einem Lysozymkristall: Zwei Aufnahmen sind leicht versetzt übereinandergelegt. Die linken Reflexe jedes Paares stammen vom nativen Lysozymkristall, die rechten wurden gemessen, nachdem $HgBr_2$ in den Kristall eindiffundiert wurde.

Aus den Änderungen der Intensitäten kann die Phase berechnet werden. Die Elektronendichte des mit schweren Atomen versehenen Kristalls ist die Summe aus der Elektronendichte des unbehandelten Kristalls und der Schweratome. Deshalb folgt für die Strukturfaktoren

$$\vec{F}_{PH} = \vec{F}_P + \vec{F}_H ,$$

wobei die Indizes *PH* für das Derivat, *P* für den unveränderten Proteinkristall und *H* für die schweren (heavy) Atome steht. Beachte, dass diese Größen komplex sind und dass nur die Beträge von $\vec{F}_{PH}$ und $\vec{F}_P$ gemessen werden können.

Für die Berechnung der Phasen aus den Veränderungen der Reflexintensitäten ist die **Pattersonfunktion** wichtig. Sie stellt die Fouriertransformation der Intensitäten der Reflexe dar,

$$P(\vec{r}) = \int I(\vec{S}) e^{-2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}} d\vec{S} = \rho(\vec{r}) \otimes \rho(-\vec{r}) .$$

Dies ist die Fouriertransformation des Produktes von $F(\vec{S})$ und $F^*(\vec{S})$, d.h., sie ist gleich der Faltung der Fouriertransformationen von $F(\vec{S})$ $(\rho(\vec{r}))$ und $F^*(\vec{S})$ $(\rho(-\vec{r}))$. Abb. 22 zeigt ein einfaches Beispiel für diese Faltung.

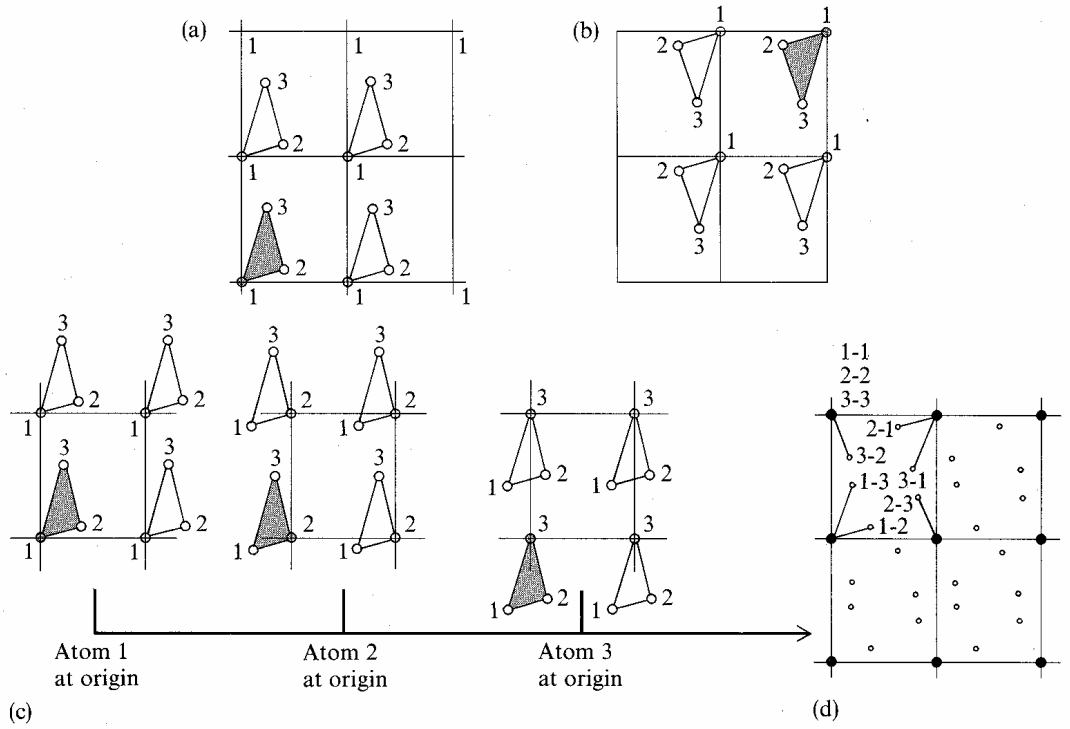


Abb. 22: Die Pattersonfunktion für eine dreiatomige Struktur. a) Vier Einheitszellen des Gitters sind dargestellt. Die Moleküle am Ursprung sind schattiert eingezeichnet. b) Dieselben vier Einheitszellen, am Ursprung invertiert. c) Konstruktion der Faltung der Anordnungen in a) und b). Die Position jedes Atoms in b) wird als Ursprung verwendet, um ein Bild der Struktur in a) zu erzeugen. Falls z.B. Atom 2 in b) der Ursprung ist, so wird Atom 1 in a) vom Ursprung entfernt und Atom 2 in a) gelangt an den Ursprung. d) Die gesamte Faltung, die durch die verschiedenen Anteile (siehe c)) zustande kommt. Die Zahlen an jedem Punkt zeigen, wie dieser Punkt entstand. 1-2 bedeutet z.B., dass ein Bild von Atom 2 mit Atom 1 am Ursprung hervorging.

Es folgt, dass die Pattersonfunktion für ein Molekül mit N Atomen N^2 Peaks in der Einheitszelle hat, von denen aber N am Ursprung lokalisiert sind. Es bleiben $N(N-1)$ Peaks, die sich innerhalb der Einheitszelle befinden.
Die Pattersonfunktion wiederholt sich, ebenso wie die Elektronendichte, periodisch im Kristall. Das obige Integral kann wieder durch eine Summe ersetzt werden,

$$P(x,y,z) = \sum_h \sum_k \sum_l \left|\vec{F}(h,k,l)\right|^2 e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \ .$$

Die Pattersonfunktion soll nun auf die Methode des multiplen isomorphen Ersatzes angewandt werden. Für die schweren Atome lautet die Pattersonfunktion

$$P_H(\vec{r}) = \sum_h \sum_k \sum_l \left|\vec{F}_H\right|^2 e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \ .$$

Diese Funktion kann nicht direkt berechnet werden, da der Betrag des Strukturfaktors der schweren Atome nicht gemessen werden kann. Aber man kann oft folgende Näherung durchführen,

$$\left|\vec{F}_H\right| \approx \left\| \left|\vec{F}_{PH}\right| - \left|\vec{F}_P\right| \right| \ .$$

Diese Näherung ist gut erfüllt, falls nur Reflexe berücksichtigt werden, deren Intensität sich nach Einbringen der schweren Atome stark ändert, da dann die Strukturfaktor-Vektoren

näherungsweise parallel zueinander angeordnet sind. Mit Hilfe dieser Näherung können die Positionen der Schweratome in der Einheitszelle bestimmt werden, wodurch wiederum die Amplitude **und** Phase der Strukturfaktoren der Schweratome berechnet werden können. Somit folgt für einen Reflex des reziproken Gitters

$$I_P \sim \left|\vec{F}_P\right|^2,$$

$$I_H \sim \left|\vec{F}_H\right|^2,$$

$$I_{PH} \sim \left|\vec{F}_P + \vec{F}_H\right|^2 = \left|\vec{F}_P\right|^2 + 2\left|\vec{F}_P\right|\left|\vec{F}_H\right|\cos(\varphi_P - \varphi_H) + \left|\vec{F}_H\right|^2.$$

Von diesen Größen sind alle bis auf φ_p bekannt. Diese kann also berechnet werden, wobei allerdings eine Zweideutigkeit aufgrund des Kosinus bleibt. Abb. 23 stellt die Situation graphisch dar.

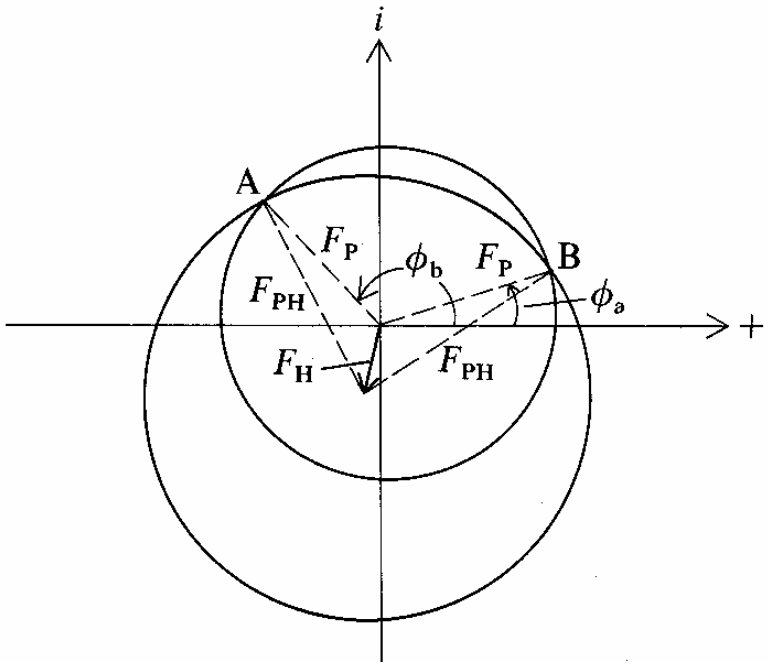


Abb. 23: Die Bestimmung der Phase mit Hilfe des isomorphen Ersatzes. Die Strukturfaktoren sind in der komplexen Ebene gezeichnet. Der Kreis mit Radius F_P stellt den ursprünglichen Kristall dar, von dem nur der Betrag des Strukturfaktors bekannt ist. Der Kreis mit Radius F_{PH} repräsentiert den mit dem Schweratomen dotierten Kristall, von dessen Strukturfaktor ebenfalls nur die Intensität bekannt ist. Von F_H *ist* dagegen sowohl die Phase als auch der Betrag bekannt. Die beiden Schnittpunkte der Kreise bestimmen die möglichen Werte für die Phase φ_P (im Diagramm mit φ_a und φ_b bezeichnet).

Wird die gleiche Methode mit einem anderen Schweratomderivat durchgeführt, so kann diese Zweideutigkeit der Phase beseitigt werden. Da die Winkel zwischen den Kreisen an den Schnittpunkten (siehe Abb. 23) sehr flach sein können, werden oft Messungen mit weiteren Schweratomderivaten durchgeführt, um die Phase genauer zu bestimmen.
Sind nun Betrag und Phase des komplexen Strukturfaktors aller Kristallreflexe bestimmt, so kann mittels Fouriertransformation die Elektronendichte berechnet werden. Daraus wird ein Modell der Struktur der Probe aufgebaut. Da die Bestimmung der Amplituden und insbesondere der Phasen ungenau ist, wird dieses Modell noch erhebliche Fehler enthalten. Nun wird die relative Differenz des Betrages des berechneten Strukturfaktors mit dem des gemessenen bestimmt. In einem iterativen Prozess wird dann versucht, diese Differenz aufgrund von zusätzlichen stereochemischen Informationen, die man aus der Strukturuntersuchung kleinerer Moleküle bestimmt, zu verkleinern.

Erzeugung von Röntgenstrahlung

Röntgenstrahlung (Photonen mit Wellenlängen zwischen 0.1 und 100 Å) werden im Labor dadurch erzeugt, dass in einer Röntgenröhre Elektronen auf Energien von einigen 10^4 eV beschleunigt werden, die anschließend von einem Target abrupt gestoppt werden (Abb. 24). Bei der Kollision der energiereichen Elektronen mit den Atomen des Targets werden Elektronen aus den inneren Schalen herausgeschlagen. Diese Schalen werden anschließend von Elektronen der höheren Schalen aufgefüllt. Wenn zum Beispiel ein Elektron aus der untersten Schale (K) entfernt wird, so kann ein Elektron der nächsten Schale (L) nachrücken, wobei die so genannte K_α-Röntgenstrahlung emittiert wird. Rückt hingegen ein Elektron der nächsthöheren Schale (M) nach, so spricht man von K_β-Strahlung. Da die Wellenlänge der Röntgenstrahlung von der Energiedifferenz der K, L, M-Schalen abhängt, ist sie charakteristisch für die Atome des Targets. Abb. 24a zeigt die charakteristische Strahlung einer Röntgenröhre mit Molybdänanode auf dem kontinuierlichen Bremsstrahluntergrund.

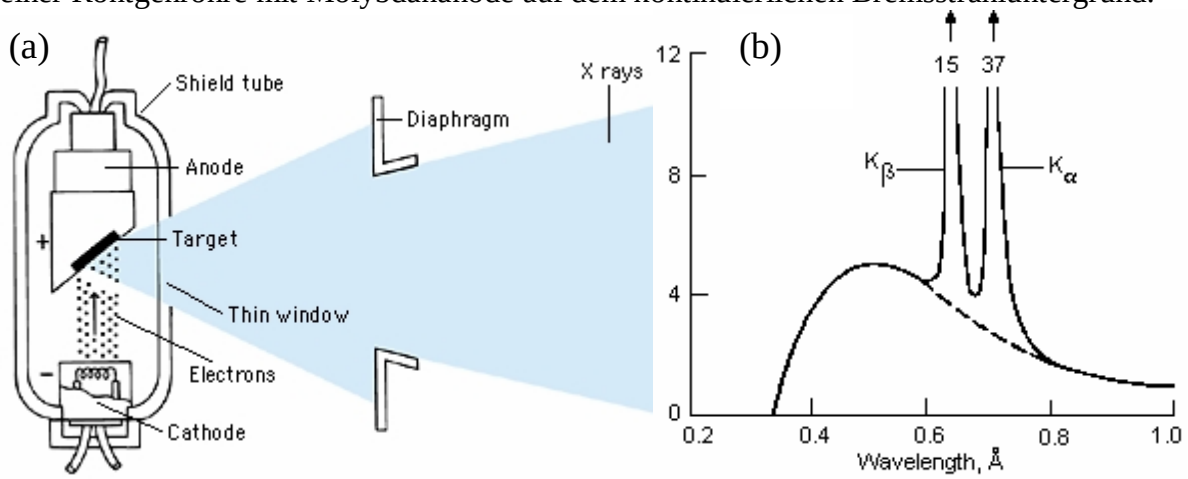


Abb. 24: (a) Schematisches Bild einer Röntgenröhre mit feststehendem Target. (b) Spektrale Verteilung der Röntgenintensität einer Röhre mit Molybdän-Anode. Die Zahlen 15 und 37 geben den Faktor an, um den die charakteristischen Linien höher sind als dargestellt.

In der Proteinkristallographie wird vorzugsweise mit Kupfer-Anoden (λ = 1.54 Å) gearbeitet. Das Elektronenbombardement der Anode produziert erhebliche Mengen an Wärme, die durch Wasserkühlung entsorgt werden. Durch den limitierten Wärmetransport sind Röhren mit feststehendem Target auf eine Leistung von 2 – 3 kW begrenzt. Um höhere Leistungen (~10 kW) zu generieren, wird das Target in einem Drehanodengenerator als rotierender Zylinder ausgeführt.

Um viele Größenordnungen höhere Photonenflüsse werden in Synchrotrons (z.B. ESRF in Grenoble, Desy in Hamburg) erzeugt, die eigens für Zwecke der Strukturaufklärung von Materie mit Röntgenlicht betrieben werden. Abb. 25 zeigt das Prinzip einer solchen Röntgenquelle. Elektronen werden im Vakuum mit Hilfe von Magnetfeldern auf kreisförmigen Bahnen geführt, wobei die ständige Beschleunigung zur Emission von Röntgenstrahlung führt. Durch Einfügen von Wigglern und Undulatoren wird die Emission weiter gesteigert, so dass man mit Beschleunigern heutzutage mehr als 10 Größenordnungen höhere Intensität erzeugen kann als mit Drehanoden. Für Proteinkristallographie sind Synchrotronstrahlungsquellen besonders attraktiv, da sie einen Röntgenstrahl mit extrem hoher Intensität und geringer Strahldivergenz liefern. Dies verringert die Messzeit, und bei Messungen an sehr kleinen Kristallen sind die Strahleigenschaften essentiell. Ein weiterer Vorteil ist, dass – im Gegensatz zur Röntgenröhre – die Wellenlänge der Röngtenstrahlung durch Monochromatisierung aus dem breiten Synchrotron-Strahlungsspektrum gewählt werden kann. So kann die Strahlungswellenlänge auf Absorptionskanten von schwereren Atomen (Se, Fe, Cu) eingestellt werden, wodurch der Formfaktor variiert werden kann. Im

Gegensatz zu der chemischen Methode des multiplen isomorphen Ersatzes kann mit dieser Methode (MAD – multiple anomalous dispersion) das Phasenproblem gänzlich auf physikalischem Wege gelöst werden.

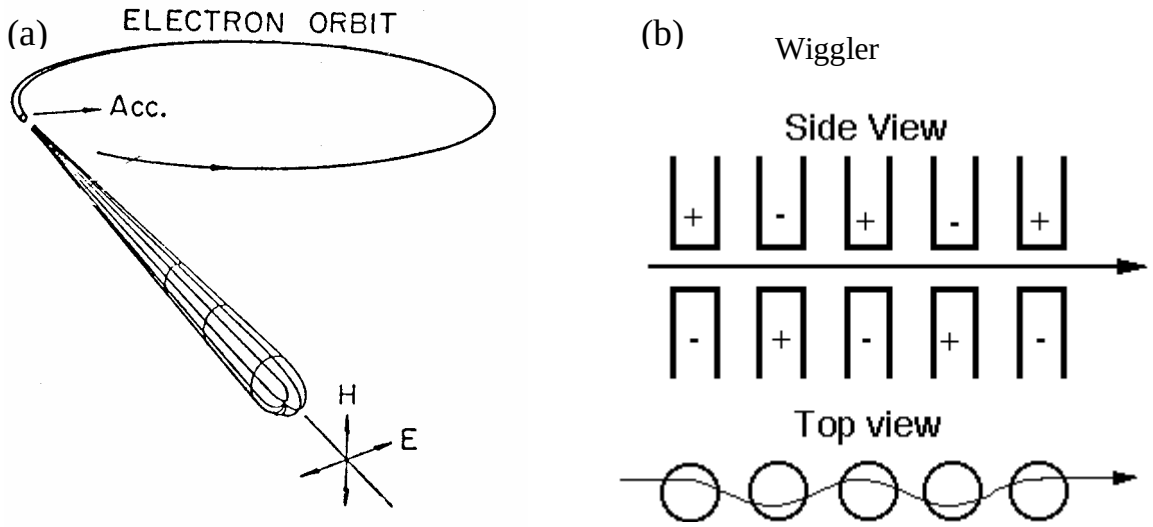


Abb. 25 : (a) Prinzip des Synchrotrons. (b) In einem Wiggler bzw. Undulator im Speicherring werden die Elektronen mit Magneten auf eine Schlangenlinie gezwungen, wodurch sich die Röntgenemission steigern lässt.

Prinzipieller Aufbau der Apparatur

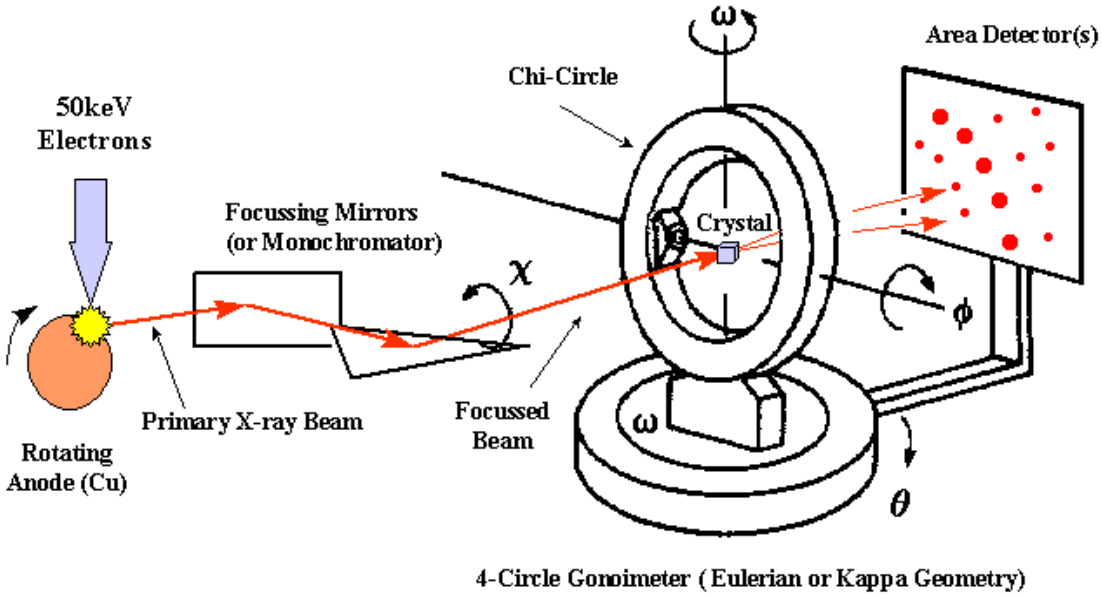


Abb. 26: Schematischer Aufbau einer Apparatur für Proteinkristallographie.

Neben der Röntgenquelle sowie Einrichtungen zur Strahlführung wird üblicherweise ein Monochromator zur Selektion der gewünschten Wellenlänge (Energie) eingesetzt. Der Proteinkristall sitzt im einfachsten Fall auf einer drehbaren Spindel, die von einem Schrittmotor präzise gedreht werden kann. Zur Detektion der Strahlung werden heutzutage vielfach Flächendetektoren eingesetzt, um möglichst viele Röntgenquanten parallel zu erfassen.

Detektion von Röntgenstrahlung

Röntgenstrahlen wurden früher hauptsächlich durch photographische Filme detektiert. Neben ihren Vorteilen (relativ einfache Herstellung, viele Reflexe können auf einmal aufgenommen werden) haben photographische Filme allerdings auch eklatante Nachteile. So besitzen sie ein starkes Rauschen, daher braucht man lange Expositionszeiten, damit die zu messenden Signale vom Untergrund unterscheidbar werden. Außerdem haben sie einen eingeschränkten dynamischen Bereich. Um die für eine gute Aufnahme notwendige Präzision zu erreichen, muss ein Stapel von Filmen verwendet werden, zwischen denen sich kalibrierte Abschwächerfolien befinden. Des Weiteren sind Filme nichtlinear, sie bedürfen daher einer Eichung, und schließlich ist ihre Empfindlichkeit zeitabhängig. Immer wichtiger werden deshalb die Alternativen zu den photographischen Filmen, Bildplatten und elektronische Detektoren.
Bildplatten werden außer für die Strukturaufklärung auch für die Materialprüfung und die Röntgendiagnostik verwendet. Bildplatten detektieren die Röntgenstrahlung mittels Speicherleuchtstoffen. Diese geben die nach dem Auftreffen der Röntgenstrahlen gespeicherte Energie durch Lichteinwirkung wieder frei. Beim Auftreffen der Röntgenstrahlung auf den Speicherleuchtstoff (dotierte (Erd-)Alkalihalogenidverbindungen) werden Elektron-Loch-Paare erzeugt. Die Ladungsträger werden getrennt in Zentren metastabil gespeichert. Bei der optischen Anregung werden die Elektronen in einen höheren Zustand angeregt. Sie können dann über verschiedene Mechanismen mit den gespeicherten Löchern rekombinieren. Die hierbei freigesetzte Energie wird auf den Dotierstoff übertragen und von diesem als Licht wieder abgestrahlt (photostimulierte Lumineszenz).

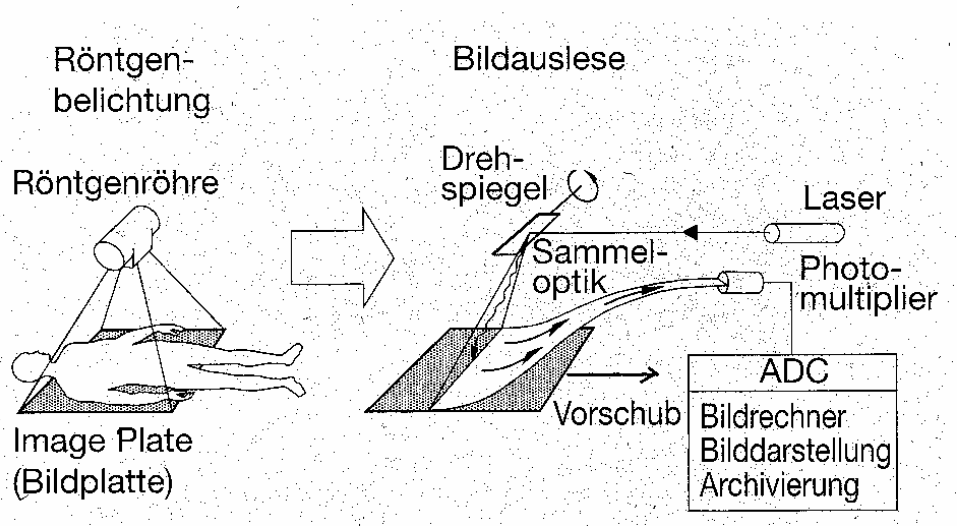


Abb. 27: Belichtungs- (links) und Ausleseprozeß (rechts) einer Bildplatte.

Die Bildplatte besteht im Prinzip aus einer ausgedehnten Leuchtstoffschicht, die bei der Aufnahme mit Röntgenstrahlen belichtet wird (Abb. 27). Die Anzahl der hierbei in dem Speicherleuchtstoff gespeicherten Elektron- und Lochspeicherzentren ist proportional zur Strahlendosis. Mit Hilfe eines Laserstrahls wird die Bildplatte nach der Belichtung Punkt für Punkt abgetastet und das aufgrund der photostimulierten Lumineszenz emittierte Licht gemessen und digitalisiert. Somit lässt sich das gesamte Strahlungsbild zurückgewinnen. Nach dem Auslesen kann die Bildplatte mit einer intensiven Lichtquelle vollständig gelöscht und für die nächste Aufnahme verwendet werden. Bei den elektronischen Detektoren

kommen CCD-Kameras und auf Proportionalzählern basierenden Apparate zum Einsatz. Da die Quanteneffizienz der CCD-Chips für Röntgenstrahlung sehr gering ist, wird das Röntgenlicht mittels eines Phosphorschirms in sichtbares Licht umgewandelt. Dieses trifft auf die Photokathode einer Vielkanalplatte, die im Prinzip aus vielen kleinen Photomultipliern besteht. Die durch den äußeren Photoeffekt erzeugten Elektronen werden in der Vielkanalplatte vervielfacht, und die von den Elektronen über eine Phosphorschicht erzeugten Photonen von der CCD-Kamera detektiert (Abb. 28).

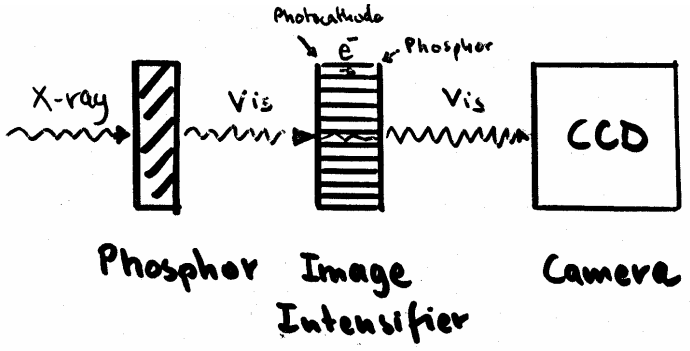


Abb. 28: Detektion von Röntgenstrahlung mit einer bildverstärkten CCD-Kamera.

Bei den Vieldraht-Proportionalzählern (multiwire proportional counter) handelt es sich im Prinzip um einen Flächendetektor, dessen Funktionsweise der eines Proportionalzählrohrs vergleichbar ist. Die von der Probe gestreute Röntgenstrahlung tritt zuerst in die mit He gefüllte Eingangskammer und daraufhin in die Driftkammer, die mit Xe gefüllt ist (Abb. 29). Dort erzeugt das Röntgenquant Elektron-Ion-Paare, die zwischen der Kathode und Anode von einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Die durch Stoßionisation erzeugte Elektronenlawine trifft dann auf die Anode. Der Auftreffpunkt wird elektronisch registriert. Der in Abb. 29 skizzierte Vieldrahtproportionalzähler zeichnet sich durch eine hohe Detektionseffizienz (90% für 14.4 keV), einen großen sensitiven Bereich (700 x 700 mm^2), eine örtliche Auflösung von 1 mm, einen sehr kleinen Untergrund und gute Langzeitstabilität aus.

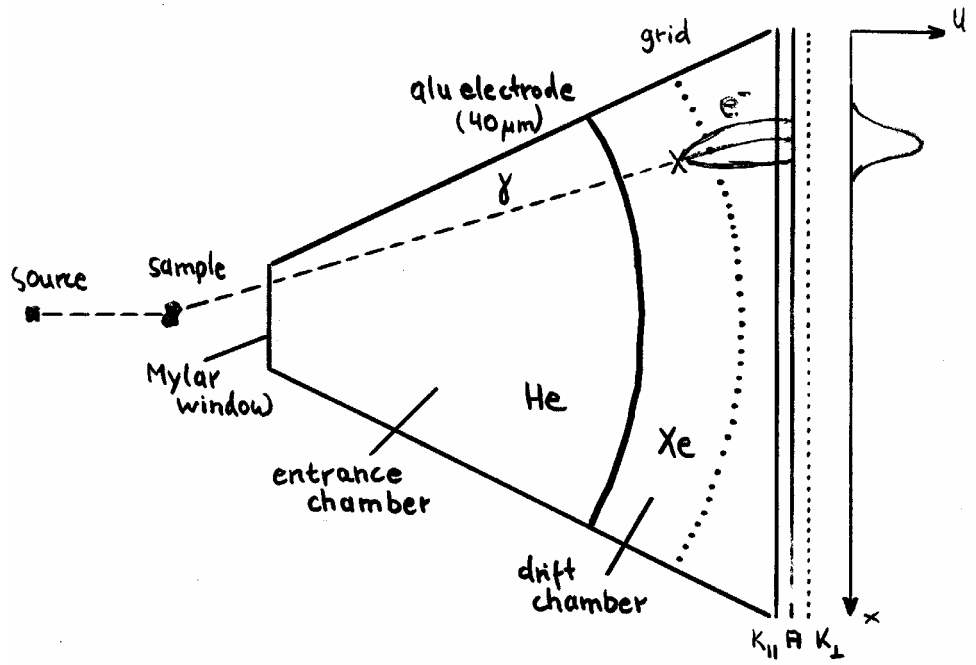


Abb. 29: Skizze eines Vieldrahtproportionalzählers.

Röntgenbeugung an Fasern zur Strukturbestimmung der DNA

Es lassen sich nicht von allen Makromolekülen Kristalle für die Röntgenbeugung herstellen. Längere DNA-Fäden lassen sich beispielsweise nicht kristallisieren. Es ist aber möglich, sie in parallelen Fasern anzuordnen. Abb. 30 zeigt das Beugungsbild der DNA. Im Folgenden wird gezeigt, wie man die Doppelhelix-Struktur aus dieser Aufnahme herleitet.

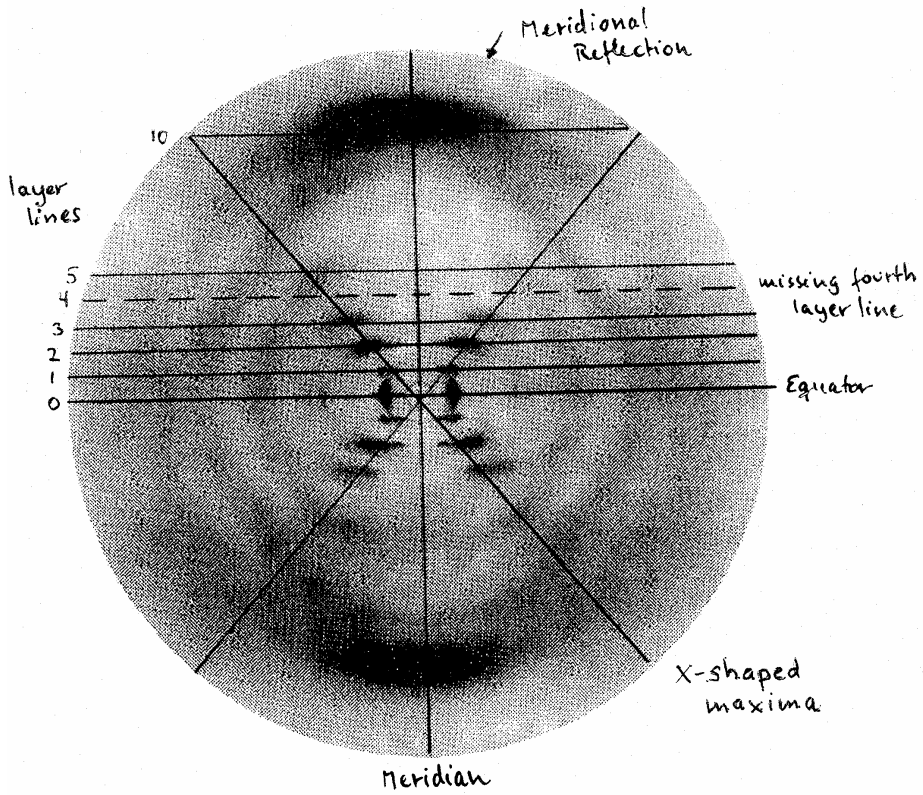


Abb. 30: Beugungsbild der DNA.

Um die Röntgenbeugung der DNA zu beschreiben, soll zuerst die Streuung einer kontinuierlichen Elektronenverteilung auf der Helix betrachtet werden. Diese Näherung ist für die DNA darin begründet, dass sich die Phosphatgruppen, in denen die Mehrzahl der Elektronen lokalisiert sind, radial gesehen am Rande der DNA befinden. Dazu wird das zylindrische Koordinatensystem im Ortsraum und im reziproken Raum eingeführt (Abb. 31), wobei die Helixachse entlang der z-Achse des reellen Raumes angeordnet ist.

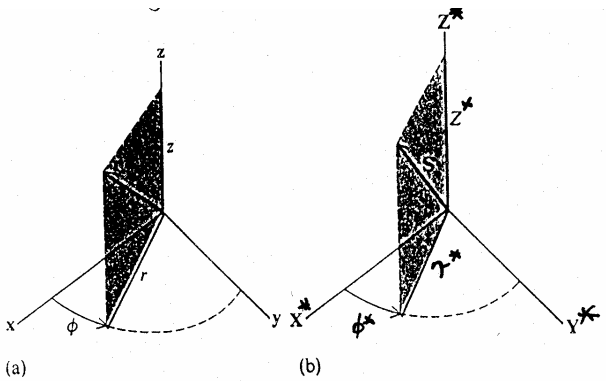


Abb. 31: Zylindrisches Koordinatensystem für (a) den Ortsraum und (b) den reziproken Raum.

Der Strukturfaktor in kartesischen Koordinaten ist

$$F(\vec{S}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\vec{r}\rho(\vec{r})e^{2\pi i\vec{S}\cdot\vec{r}} .$$

In zylindrischen Koordinaten folgt dann

$$F_c(r^*,\phi^*,z^*) = \int_0^{\infty} r dr \int_0^{2\pi} d\phi \int_{-\infty}^{\infty} dz\rho(r,\phi,z)e^{2\pi i[rr^*(\cos\phi\cos\phi^*+\sin\phi\sin\phi^*)+zz^*]} .$$

Bei einer idealen Helix befinden sich alle Elektronen auf der Zylinderoberfläche mit Radius r_h. Somit gilt für den radialen Anteil der Elektronendichte

$$\rho(r,\phi,z) = C\delta(r-r_h) .$$

Wird zusätzlich das Additionstheorem des Kosinus angewendet, so erhält man für den Strukturfaktor

$$F_c(r^*,\phi^*,z^*) = const.\int_0^{2\pi} d\phi \int_{-\infty}^{\infty} dz\ e^{2\pi i[r_h r^*\cos(\phi-\phi^*)+zz^*]} .$$

Die Helix ist eine periodische Anordnung in *z*-Richtung mit der Periodenlänge *p* (Abstand in *z*-Richtung für eine Umdrehung der Helix; $z = p\phi/2\pi$). Wie oben aufgeführt, erzeugt die Röntgenbeugung Reflexe nur in den Ebenen senkrecht zur *z*-Achse mit Abständen von *n/p* (*n* ganzzahlig). Dann folgt

$$z\cdot z^* = \left(p\frac{\phi}{2\pi}\right)\frac{n}{p} = \frac{n\phi}{2\pi} .$$

Für den Strukturfaktor erhält man (unter Vernachlässigung der Konstanten)

$$F_c(r^*,\phi^*,z^*) = \int_0^{2\pi} e^{2\pi i r_h r^*\cos(\phi-\phi^*)+in\phi} d\phi \ ,$$

$$= J_n(2\pi r_h r^*)e^{in\left(\phi^*+\frac{\pi}{2}\right)},$$

wobei J_n die Besselfunktion erster Gattung und *n*-ter Ordnung ist die konstanten Faktoren wurden wiederum vernachlässigt. Sie ist wie folgt definiert:

$$J_n(x) = \frac{1}{2\pi i^n}\int_0^{2\pi} e^{ix\cos y+iny} dy .$$

Zum Vergleich mit dem Röntgenbeugungsbild muss die Intensität berechnet werden,

$$I = F_c^* F_c = J_n^2(2\pi r_h r^*),$$

wobei $J_{-n}^2 = J_n^2$ und $J_n^2(r^*) = J_n^2(-r^*)$. Das Beugungsbild einer kontinuierlichen Helix mit der Periode *p* besteht demnach aus Reflexen in Ebenen (mit Abstand senkrecht 1/*p* zueinander) zur Helixrichtung, deren Intensität in der Ebene senkrecht zur *z*-Richtung proportional zu J_n^2 ist. Dies ist in Abb. 32 dargestellt. Aus dem Abstand der Ebenen ergibt sich $p \approx 34$ Å.

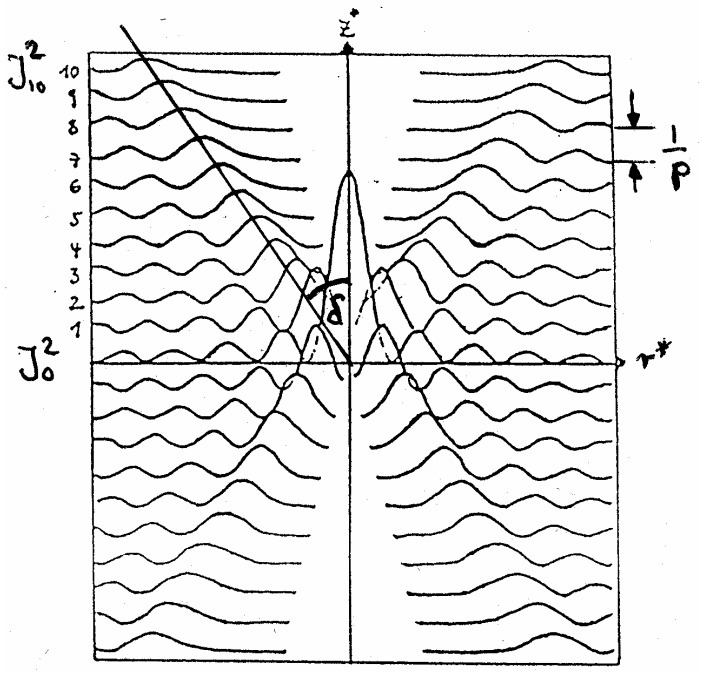


Abb. 32: Intensitätsverteilung des Beugungsbildes einer kontinuierlichen Helix in Abhängigkeit von r^* und z^*.

Das erste Maximum von $J_n^2(2\pi r_h r^*)$ befindet sich bei $2\pi r_h r^* \approx n$ (für große n), d.h., es befindet sich bei größeren r^* für zunehmendes n. Das bedeutet, dass die Hauptfigur des Beugungsbild dem Buchstaben X ähnelt. Für δ folgt (Abb. 32)

$$\tan\delta = \left.\frac{r^*}{z^*}\right|_{am\,1.\,Maximum} = \frac{n/2\pi r_h}{n/p} = \frac{p}{2\pi r_h}.$$

Mit $\delta \approx$ 30° und p = 34 Å ergibt sich der Radius der Helix zu ~10 Å. Bislang wurde das Beugungsbild einer Helix mit kontinuierlicher Elektronendichte berechnet. Tatsächlich sind die Elektronen aber um Atome herum konzentriert. Bei der DNA-Helix ist zu erwarten, dass aufgrund der regelmäßigen Anordnung der Nukleotide eine periodische Elektronenverteilung vorliegt. Die Elektronendichte dieser nicht-kontinuierlichen Helix (discontinuous helix, *dh*) kann als Produkt aus der der kontinuierlichen Helix (continuous helix, *ch*) und der von diskreten Ebenen (mit Abstand h) berechnet werden,

$$\rho_{dh} = \rho_{ch}\rho_{plane}.$$

Aufgrund des Faltungssatzes folgt für die Strukturfaktoren

$$F_{dh} = F_{ch} \otimes F_{plane},$$

$$F_{dh} = F_{ch} \otimes \sum_{-\infty}^{\infty} \delta(z - \frac{m}{h}),$$

wobei m und h ganze Zahlen sind. Die Ebenen mit Periodizität h in z-Richtung erzeugen im reziproken Raum Strukturen mit Abstand $1/h$ in z^*-Richtung. Da der gesamte Strukturfaktor aus einer Faltung besteht, ergibt sich das Beugungsbild in Abb. 33 entsprechend den Regeln, die im Zusammenhang mit der Pattersonfunktion diskutiert wurden. Das Beugungsbild der kontinuierlichen Helix wiederholt sich bei jedem Wert $z^* = m / h$.

Somit treten Reflexlinien für

$$z^* = \frac{n}{p} + \frac{m}{h}$$

auf. Es kann daher die Anzahl der Einheiten pro Umdrehung bzw. der Abstand der Einheiten in *z*-Richtung 1/*h* bestimmt werden (Abb. 33). Aus dem Abstand des Meridionalreflexes vom Ursprung (Abb. 30) ergibt sich *h* = 3.4 Å.

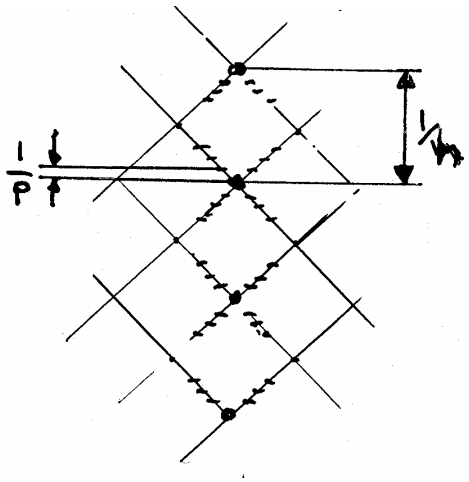


Abb. 33: Beugungsbild einer nicht-kontinuierlichen Helix.

Bei dem Beugungsbild der DNA fehlt die vierte Ebene (Abb. 30). Dies wird durch zwei leicht gegeneinander verschobene Strukturen ($\rho = \rho_1 + \rho_2$) (die zwei Helices der Doppelhelix) bewirkt,

$$\rho_1 = \sum_n \delta(z - np),$$

$$\rho_2 = \sum_n \delta(z - d - np),$$

wobei ρ_1 und ρ_2 die Elektronendichten der beiden Strukturen sind. Dann folgt für die Strukturfaktoren

$$F_1 = \sum_n \delta(z^* - \frac{n}{p}),$$

$$F_2 = \sum_n \delta(z^* - \frac{n}{p}) e^{2\pi i d z^*},$$

$$F(z^* = \frac{n}{p}) = 1 + e^{2\pi i d n/p},$$

$$|F|^2 = 2\left[1 + \cos\frac{2\pi n d}{p}\right].$$

Die Intensität der Reflexebenen weist eine Kosinusmodulation auf. Wird nun $|F|^2$ gleich Null gesetzt für *n* = 4, so folgt *d* = *p*/8. Die Verschiebung der Helices untereinander beträgt 4.3 (34/8) Å.

Schließlich wird beobachtet, dass die Maxima höherer Ordnungen im DNA-Beugungsbild fehlen. Die Ursache dafür ist, dass die DNA keine ideale Helix mit einem definierten Radius ist, sondern es existieren auch streuende Atome innerhalb der Helix. Dies führt zu destruktiven Interferenzen bei hohen Winkeln.

Ein Nachteil der Röntgenstrukturanalyse von biologischen Makromolekülen ist, dass es nur bei extrem hoher Auflösung gelingt, Wasserstoffatome – die eine wichtige Rolle in Biomolekülen haben – zu lokalisieren, da die Streuintensität proportional zum Quadrat der Ordnungszahl *Z* ist. Außerdem können Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffatome nicht voneinander unterschieden werden, da sie ein ähnliches *Z* aufweisen. Neutronen wechselwirken hauptsächlich mit dem Kern der Atome über die starke Kernwechselwirkung bzw. über die magnetische Wechselwirkung. Damit können sowohl Wasserstoffatome dargestellt als auch C, N und O-Atome unterschieden werden. Tab. 1 zeigt die kohärente Streulänge *b*, den kohärenten Streuquerschnitt $\sigma^{coh} = 4\pi b^2$ und den totalen Streuquerschnitt σ^{tot}einiger wichtiger Atome.

Tab. 1: Streulänge, kohärenter und totaler Streuquerschnitt einiger Atome (zum Vergleich ist der Strukturfaktor für Vorwärtsstreuung von Röntgenstrahlen aufgeführt) (1 barn = 10^{-28} m^2).

	X-rays	Neutrons		
	$f(\vec{q}=0)\equiv Z$	b (fm)	σ^{coh} (barns)	σ^{tot} (barns)
hydrogen	1	-3.8	1.8	81
deuterium	1	6.5	5.4	7.6
carbon	6	6.6	5.5	5.5
nitrogen	7	9.4	11	11.4
oxygen	8	5.8	4.2	4.24
sulphur	16	3.1	1.2	1.2
iron	26	9.6	11.4	11.8

Die Streulänge von Wasserstoff ist ähnlich groß wie die von schwereren Atomen. Außerdem ist sie negativ, während die der anderen Atome positiv ist. Dies bedeutet, dass die Streuung an einem H-Atom im Vergleich zu den anderen Atomen um 180° phasenverschoben ist. Ein Nachteil des Wasserstoffs ist, dass der kohärente Streuquerschnitt sehr viel kleiner ist als der inkohärente, der einen unerwünschten Untergrund liefert. Der kohärente Streuquerschnitt des Deuteriums ist wesentlich größer und der inkohärente Streuquerschnitt wesentlich kleiner als der des Wasserstoffs. Deshalb werden die zu untersuchenden Kristalle gewöhnlich deuteriert. Für den Impuls der Neutronen gilt

$$\vec{p} = \hbar\vec{k}, \qquad |\vec{p}| = \hbar\frac{2\pi}{\lambda}.$$

Die Energie erhält man mit

$$E_{kin} = \frac{p^2}{2m_n} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m_n}.$$

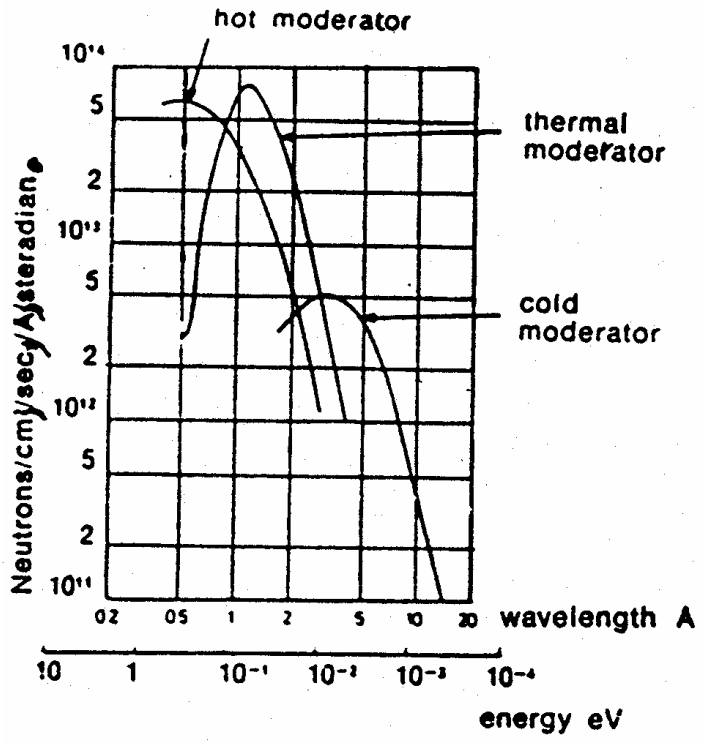
Dies ergibt bei Raumtemperatur eine Wellenlänge von

$$\lambda_n = \frac{2\pi\hbar}{\sqrt{2m_n E_{kin}}} = \frac{2\pi\hbar c}{\sqrt{2E_n E_{kin}}},$$

$$\lambda_n = \frac{2\pi\, 197\ \text{MeV fm}}{\sqrt{2\cdot 940\ \text{MeV}\, 25\cdot 10^{-9}\ \text{MeV}}} = 1.8\ \text{Å},$$

Die Geschwindigkeiten der Neutronen folgen einer Maxwell-Verteilung mit einem Maximum bei 2200 m/s.

Als Neutronenquellen dienen Neutronenreaktoren bzw. Spallationsquellen. Die Wellenlänge wird durch die Temperatur der Moderatoren bestimmt, mit denen sich die Neutronen im Gleichgewicht befinden (Abb. 1). Einen monochromatischen Strahl erzeugt man durch Reflexion an einem Kristall. Der Aufbau typischer Neutronenspektrometer ist in Abb. 2 zu



sehen.

Abb. 1: Neutronenwellenlängen (-energien) von einem heißen (2200 K), einem thermischen (300 K) und einem kalten (25 K) Moderator.

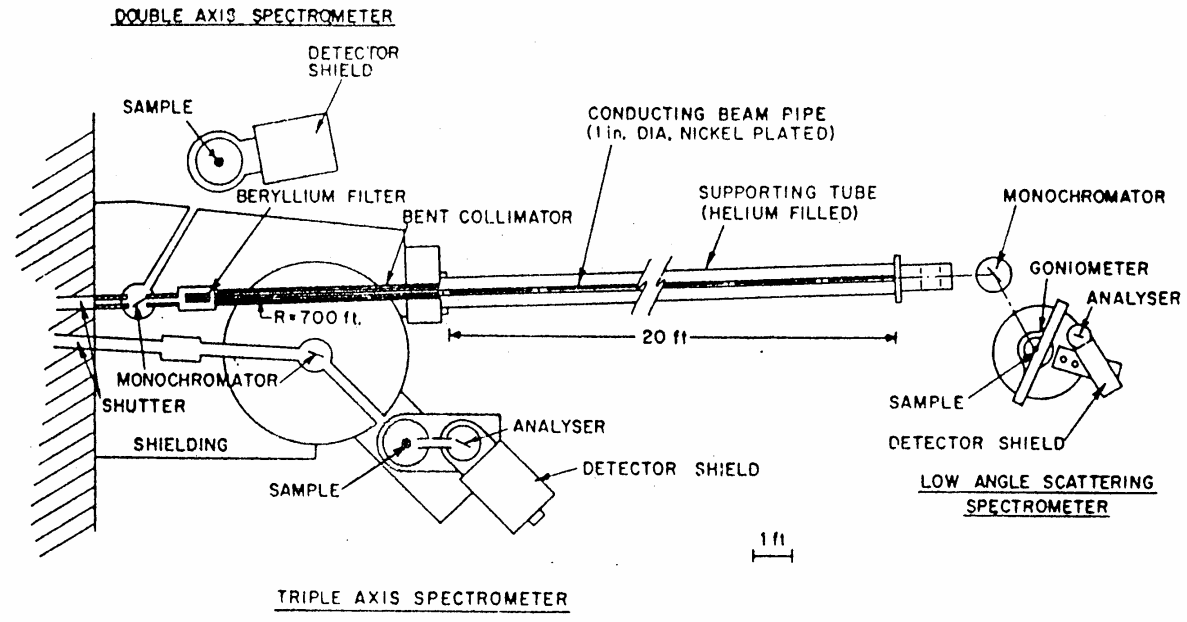


Abb. 2: Neutronenspektrometer: Das Kleinwinkel- und das Doppelachsen-Spektrometer verwenden denselben Neutronenstrahl des Hochflussreaktors. Für das Doppelachsen-Spektrometer wird mittels eines Germanium-Monochromators die Neutronenwellenlänge auf 1.2 Å eingestellt, während die 'beam pipe'-Neutronen eine Wellenlänge von 4 Å haben.

Für die Wechselwirkung der Neutronen mit dem Kern wird das Kernpotential durch ein Fermi-Pseudopotential angenähert,

$$V(\vec{r}) = \frac{2\pi\hbar^2}{m} b\,\delta(\vec{r}) .$$

Die Streulänge *b* ist - im Unterschied zur Thomsonstreuung - unabhängig vom Streuwinkel, da die Neutronenwellenlängen sehr viel größer als die Kerndurchmesser sind. Sowohl die einfallenden Neutronen werden als ebene Welle beschrieben,

$$\psi_o^{free} = \frac{1}{\sqrt{V}} e^{i\vec{k}_o\vec{r}} ,$$

als auch die gestreuten Neutronen,

$$\psi_1^{free} = \frac{1}{\sqrt{V}} e^{i\vec{k}_1\vec{r}} .$$

Der Streufaktor ist durch das Übergangsmatrixelement gegeben,

$$f(\theta) = \frac{-m}{2\pi\hbar^2} \int e^{-i\vec{k}_1\cdot\vec{r}} V(\vec{r}) \psi \, d\vec{r} .$$

In der ersten Bornschen Näherung wird angenommen, dass der einfallende Neutronenstrahl durch das Kernpotential nicht verändert wird

$$\psi \approx \psi_o^{free} .$$

Daraus folgt

$$f(\theta) = \frac{-m}{2\pi\hbar^2} \int e^{-i\vec{k}_1\cdot\vec{r}} V(\vec{r}) \psi_0^{\,free} d\vec{r} ,$$

$$= \frac{-m}{2\pi\hbar^2} \int e^{i(\vec{k}_0-\vec{k}_1)\vec{r}} V(\vec{r}) d\vec{r} .$$

Mit dem Fermi-Pseudopotential erhält man

$$f(\theta) = -b.$$

Der differentielle Streuquerschnitt ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Streuung in ein Raumwinkelelement *dΩ;* er ergibt sich zu

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = f^2 = |b|^2 .$$

Da die geometrischen Aspekte für den molekularen Strukturfaktor der Neutronenstreuung gleich denen der Röntgen- oder Elektronenstreuung sind, folgt

$$F_m(\vec{S}) = \sum_j b_j e^{2\pi i\vec{S}\cdot\vec{r}_j} .$$

Der gesamte Streuquerschnitt ergibt sich zu

$$\frac{d\sigma^{tot}}{d\Omega}(h,k,l) = N^2 \cdot \left|F_m(h,k,l)\right|^2 + \frac{d\sigma^{inc}}{d\Omega} .$$

Der zweite Term beschreibt den Beitrag der inkohärenten Streuung. Inkohärente Streukomponenten gibt es auch bei der Röntgenstreuung, beispielsweise durch den Compton-Effekt.
Bei der Neutronenkristallographie muss im Prinzip wiederum das Phasenproblem gelöst werden. Die Methode des multiplen isomorphen Ersatzes ist nicht anwendbar, da sich die Streulängen der Atome nicht sehr unterscheiden. Daher wird die Neutronenstreuung an Proteinkristallen durchgeführt, deren Strukturen schon gut bekannt sind. Somit können die Phasen aus den Positionen der mit den anderen Methoden 'sichtbaren' Atome berechnet werden. Zusammen mit den Intensitäten aus der Neutronenstreuung können dann zusätzlich die Positionen der Wasserstoffatome ermittelt werden. Die Neutronenstreuung ist also keine primäre Methode zur Strukturbestimmung. Vielmehr werden bekannte Strukturen untersucht, um die H- und N-Atome usw. zu lokalisieren.
Abb. 3 zeigt die Neutronenstreudichte eines Teils des Vitamins B12, das vor allem in der Leber vorkommt und am Fett-, Kohlenhydrat- und Nukleinsäurestoffwechsel wesentlich beteiligt ist. Die Wasserstoffatome sind leicht zu erkennen (gestrichelte Linien stellen negative Streulängen dar). Die Streudichtepeaks sind bei der Neutronenstreuung schärfer als bei der Röntgenbeugung, da sie einer Faltung der Auflösung mit der Delta-Funktion der Kernpotentiale (und nicht mit der Elektronendichteverteilung der Atome) entsprechen.

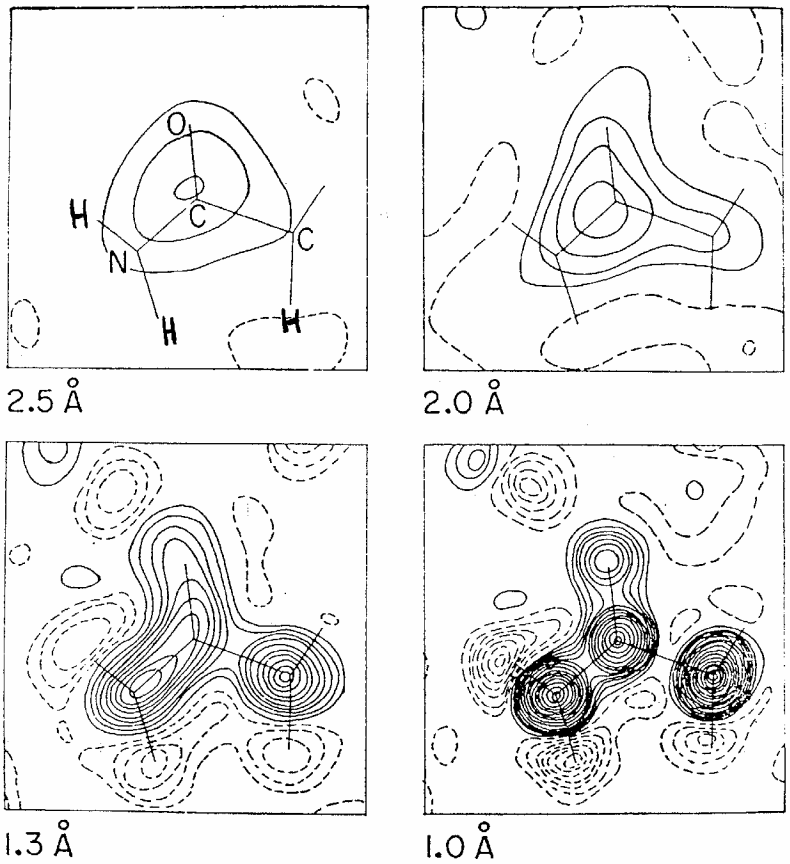


Abb. 3: Neutronenstreudichte eines Details von Vitamin B12. Der Einfluss der Auflösung ist dargestellt.

Eine andere Möglichkeit, die Neutronenstreuung zur Strukturoptimierung zu nutzen, ist die Berechnung von 'difference Fourier maps'. Diese Methode ist für die Untersuchung von kleinen Veränderungen der Struktur wichtig, wie sie z.B. bei der Bindung von Liganden vorkommen. Der Strukturfaktor des ligandierten Proteins setzt sich aus dem des unligandierten Proteins (Index *P*) und dem des Liganden (Index *L*) zusammen,

$$\vec{F}_{PL} = \vec{F}_P + \vec{F}_L \,.$$

Da $\left|\vec{F}_L\right| << \left|\vec{F}_P\right|$, wird angenommen, dass die Phasen für das ligandierte und unligandierte Protein näherungsweise gleich sind (Abb. 4),

$$\phi_{PL} \approx \phi_P \,.$$

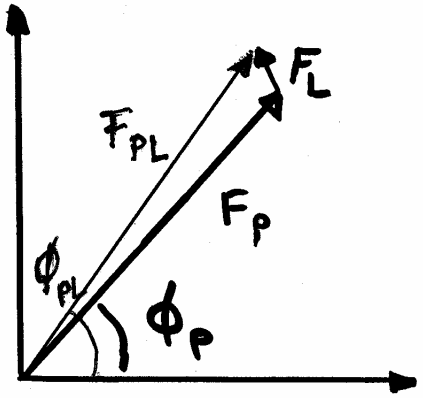


Abb. 4: Darstellung der Strukturfaktoren in der komplexen Ebene.

Für den Unterschied des Betrags der Amplituden folgt

$$\Delta\rho = \frac{1}{V}\sum_{h,k,l}\left(\left|F_{PL}(h,k,l)\right| - \left|F_P(h,k,l)\right|\right)e^{i\phi_P(h,k,l)}e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \,.$$

Mit diesem Verfahren lassen sich somit ohne Kenntnis der Phasen die Änderungen durch die Bindung eines Liganden ermitteln. Abb. 5 zeigt als Beispiel das mit Sauerstoff ligandierte Myoglobin. Hier ist aber nicht die Differenz mit einer Messung ohne Ligand dargestellt, sondern die Differenz zu einer Berechnung für das mit Sauerstoff ligandierte Myoglobin ohne die Wasserstoffbrücke zwischen dem Häm und dem Histidin.

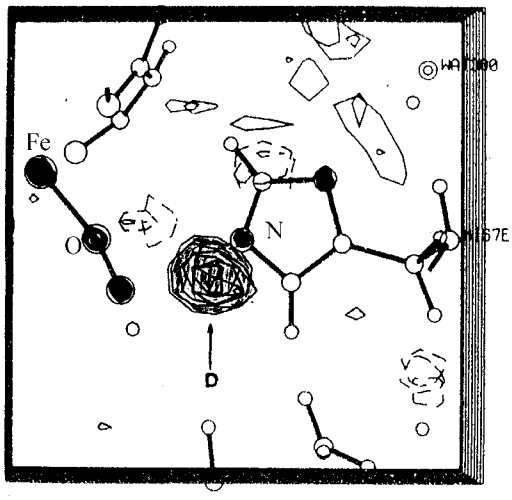


Abb. 5: Neutronen-Differenzdichtekarte einer 4 Å dicken Schicht aus einer MbO_2-Struktur. Der Imidazolring des distalen Histidins ist in der Mitte zu sehen. Links davon sind die zwei Sauerstoffliganden, die an dem Eisen des Häms gebunden sind, eingezeichnet. Die Aufnahme zeigt den Ort des Deuteriums der Wasserstoffbrückenbindung.

Die Wasserstoffbrückenbindung, die die Affinität für die Bindung des Sauerstoffs erheblich erhöht, ist deutlich zu sehen. Hier wurde das Proton der Wasserstoffbrückenbindung durch ein Deuteron ersetzt. Für diesen Zweck wird der Myoglobin-Kristall über längere Zeit in D_2O-haltiger Mutterlauge aufbewahrt ('gesoakt'). Damit kann auch untersucht werden, welche Wasserstoffe im Myoglobin überhaupt durch Deuteronen ersetzt werden können. Eine solche Analyse ermöglicht es, Aussagen über großräumige Konformationsänderungen zu machen.

Elektronenmikroskopie und Elektronenbeugung

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturbestimmung von Biomolekülen ist die Elektronenmikroskopie unter Verwendung der Elektronenbeugung. Wie bereits im Abschnitt über die abbildende Elektronenmikroskopie erwähnt, lassen sich mit Beschleunigungsspannungen von typischerweise 100 kV Elektronenwellenlängen weit unter einem Å (~0.04 Å für 100 kV) erzielen. Die Auflösung ist bei der abbildenden Elektronenmikroskopie allerdings durch die Linsenfehler auf 2 – 3 Å begrenzt. Interessanterweise machen die Linsenfehler bei der hochauflösenden Hellfeldelektronenmikroskopie die Strukturanalyse erst möglich. Diese Methode wird im Folgenden diskutiert.

Elektronen wechselwirken viel stärker mit Materie als Röntgenstrahlen. Die atomaren Streuamplituden sind etwa um einen Faktor 10,000 größer. Außerdem variieren die elektronischen Streuamplituden für leichte und schwere Atome weniger. Die mittlere freie Weglänge von 100 keV-Elektronen in biologischem Material ist 2,400 Å. Um hochauflösende Elektronenmikroskopie zu betreiben, muss die Probendicke unter 10 % dieses Wertes liegen. Daher haben elektronenmikroskopische Proben um Größenordnungen weniger Masse als solche für Röntgenbeugung. Obwohl Elektronenstrahlen weniger schädigend sind als Röntgenstrahlen, wie man durch Vergleich der inelastischen und elastischen Streuquerschnitte sieht, kann man bei der hochauflösenden Elektronenmikroskopie aufgrund des geringen Probenmaterials nur Strahlendosen von ~0.5 e/Å^2 bei 300 K und 5 e/Å^2 bei 4.2 K tolerieren.

Es ist zu beachten, dass eine einzelne elektronenmikroskopische Aufnahme eine Projektion der Probe darstellt. Man bekommt ein zweidimensionales Bild, das erst durch viele Aufnahmen bei gedrehter Probe zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden kann. Abb. 6 zeigt das Zustandekommen des Bildes im Elektronenmikroskop.

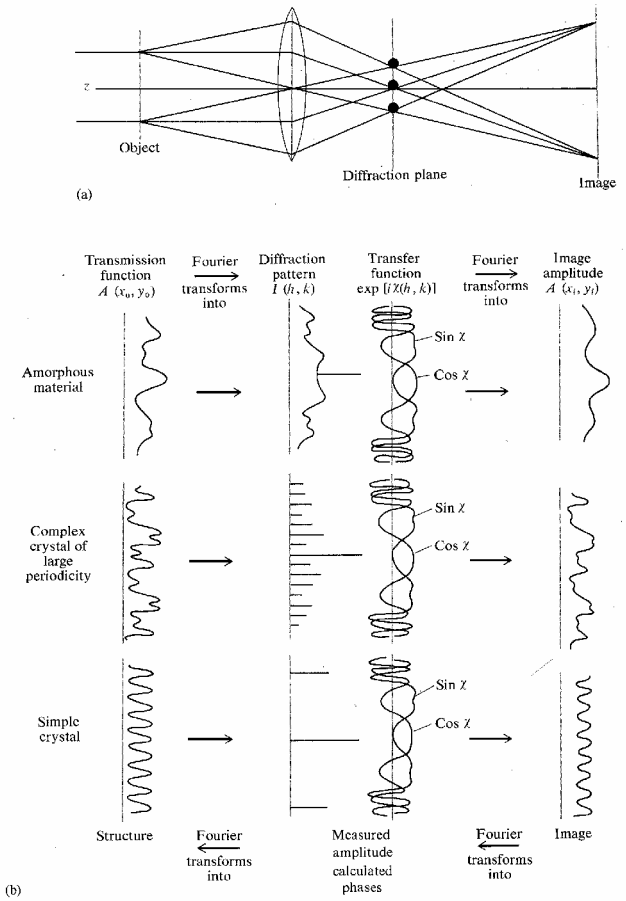


Abb. 6: Elektronenbeugung und Bildentstehung im Elektronenmikroskop. a) Geometrische Optik, b) Wellenoptik.

In der Brennpunktsebene entsteht das Beugungsbild der dünnen, zweidimensionalen Probe. Das Abbild der Probe entsteht durch Interferenz des Primärstrahls mit den gebeugten Strahlen. Die Abbildung ist aber durch die Fehler der Elektronenlinsen, die mittels einer Transferfunktion beschrieben werden, verfälscht (siehe Abb. 6b). Zusätzlich ist der Kontrast der Abbildung schlecht, während der des Beugungsbildes wesentlich besser ist, da über viele Einheitszellen gemittelt wird. Um allein aus dem Beugungsbild die Struktur berechnen zu können, müssen neben den Intensitäten auch die Phasen bekannt sein. Bei der Elektronenmikroskopie unter Verwendung der Beugung werden die Amplituden der Strukturfaktoren aus dem Beugungsbild bestimmt, die Phasen jedoch durch die Fouriertransformation des Abbildes erhalten. Letztlich bekommt man die Struktur wiederum durch Fouriertransformation dieser Phasen und der gemessen Intensitäten. Es wird also ausgenutzt, dass das Beugungsbild die Fouriertransformation des Objekts und das Abbild die Fouriertransformation des Beugungsbilds darstellt.
Für die mathematische Berechnung befindet sich die dünne Probe in der *x*-*y*-Ebene; der Elektronenstrahl wird entlang der *z*-Achse eingestrahlt. Beim Erreichen der Probe werden die Elektronen als Wellen mit Einheitsamplitude und Phase Null beschrieben. In der Probe erfahren sie ein elektrisches Potential, das durch die Kerne und Elektronen erzeugt wird. Dies führt zu einer Phasenverschiebung der eingestrahlten Welle. Da die Probe kollimiert (in *z*-Richtung) bestrahlt wird, erhält man nur die Projektion des Potentials in die *x*-*y*-Ebene,

$$\phi_o(x,y) = \int \phi_0'(x,y,z)dz = \phi_o(\vec{r}_o).$$

Somit ist die Wellenfunktion gleich hinter dem Objekt aufgrund der Veränderung der Phase durch das Potential gegeben durch

$$\begin{aligned}\psi_o(x,y) &= \exp i\sigma\phi_o(\vec{r}_o),\\ &\approx 1 + i\sigma\phi_o(\vec{r}_o),\end{aligned}$$

wobei für die Wechselwirkungskonstante $\sigma = \pi/(\lambda U)$ gilt. Hierbei ist U die Beschleunigungsspannung. Die Entwicklung der Exponentialfunktion kann nach dem linearen Glied abgebrochen werden, da das Potential die Wellenfunktion nur schwach beeinflusst. Der erste Term stellt den Primärstrahl dar. Dem zweiten Term, der die gestreute Strahlung beschreibt, kann entnommen werden, dass dieser relativ zum Primärstrahl um 90° phasenverschoben ist. Das Beugungsbild erhält man wiederum durch Fouriertransformation. Falls der Primärstrahl nicht berücksichtigt wird, erhält man für den Strukturfaktor

$$\begin{aligned}F(\vec{S}) &\sim \int \phi_o e^{2\pi i\vec{S}\cdot\vec{r}_o} d\vec{r}_o\\ &= c\int \phi_i e^{2\pi i\vec{S}\cdot\vec{r}_i} d\vec{r}_i.\end{aligned}$$

Abb. 7 zeigt die Beugung im Elektronenmikroskop im Orts- und im reziproken Raum. Aufgrund der kleinen Wellenlänge der verwendeten Elektronen kann die Ewaldkugel durch eine Ebene angenähert werden, die den reziproken Raum schneidet. Werden Beugungsaufnahmen bei verschiedenen Drehwinkeln des Kristalls durchgeführt, so kann auf diese Weise der Strukturfaktor in allen drei Dimensionen des reziproken Raums ermittelt werden. Technisch sind allerdings nur Winkel bis maximal 60° möglich. Der reziproke Raum hat also Bereiche (Kegel), die nicht erfasst werden können. Dadurch wird die Auflösung in dieser Richtung deutlich schlechter.
Die oben erwähnten Abbildungsfehler setzten sich aus der sphärischen Aberration der Elektronenlinsen und der Defokussierung zusammen. Letztere beschreibt die Auslenkung der Probe von der Brennebene. In Abb. 8 ist die sphärische Aberration dargestellt.

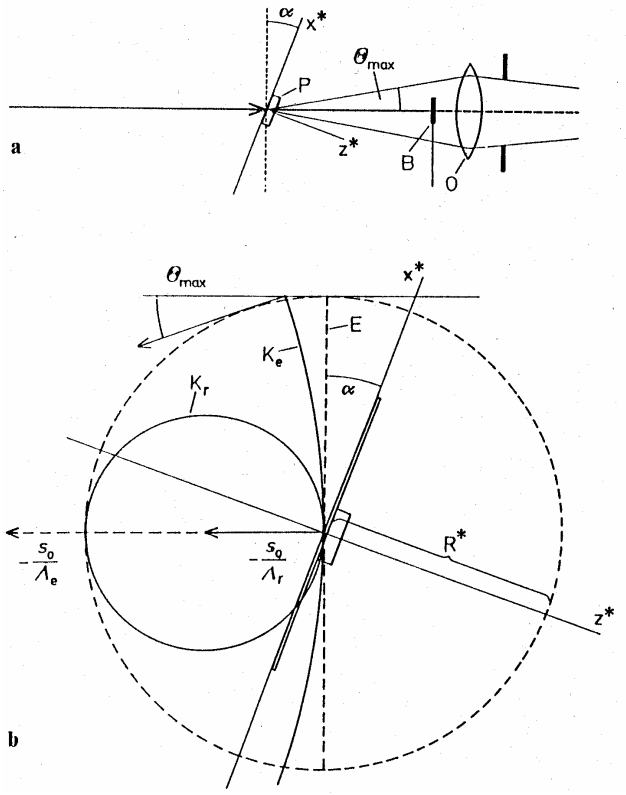


Abb. 7: Das Elektronenmikroskop als Diffraktometer. a) Eine ebene Welle trifft auf die um den Winkel α gedrehte Probe. Die gestreuten Elektronen und der Primärstrahl interferieren in der Bildebene (Hellfeldaufnahme). Bei einer Dunkelfeldaufnahme wird hingegen der Primärstrahl mit der Blende B abgeschattet. b) reziproker Raum: Vergleich der Ewaldkugel von Röntgenstrahlen *(K_r)* mit der von Elektronen *(K_e)*. Letztere ist sehr viel größer und kann durch eine Ebene angenähert werden.

.

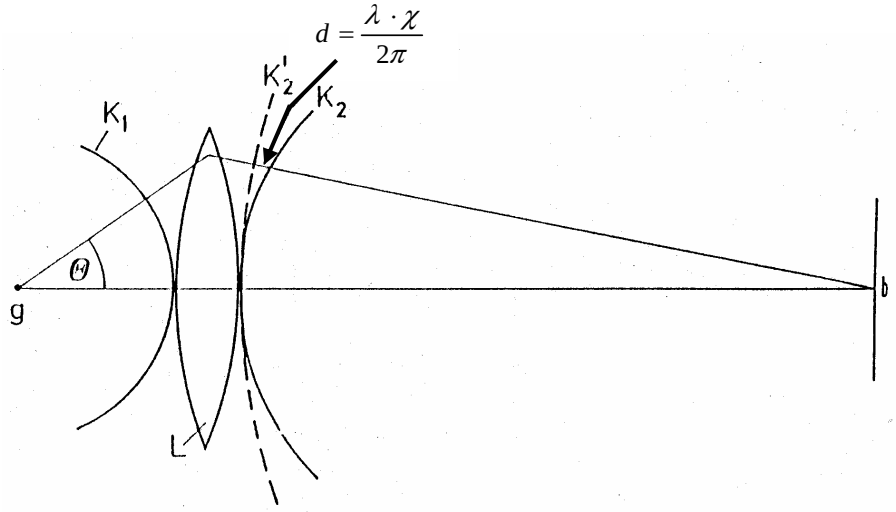


Abb. 8: Die sphärische Aberration bei Elektronenlinsen. Eine ideale Linse verwandelt eine Objektkugelwelle *(K_1)* in eine Bildkugelwelle *(K_2)*, die ihren Ursprung in der Bildebene hat. Dies wird durch die veränderte Ausbreitungsgeschwindigkeit in der Linse bewirkt, so dass die Phasen im Bildpunkt für alle Strahlen gleich sind. Eine reale Bildwelle ist dagegen wegen der Linsenfehler nicht sphärisch *(K_2')*, und es ergibt sich in Abhängigkeit des Winkels θ ein Phasenfehler $\chi(\theta)$.

Bei der Hellfeldmikroskopie interferieren die gestreuten Wellen mit dem Primärstrahl. Für die Intensität erhält man dann

$$I_i \sim (\phi_p + \phi_i)(\phi_p + \phi_i^*),$$

wobei der Index *p* den Primärstrahl und der Index *i* die gestreuten Wellen kennzeichnet. Beachte, dass die Amplitude von ϕ_p reell und die von ϕ_i im Allgemeinen komplex ist. Daraus folgt

$$I_i \sim \phi_p^2 + \phi_p(\phi_i + \phi_i^*) + \phi_i \phi_i^*.$$

Der Term $\phi_i \phi_i^*$ kann vernachlässigt werden, da $\phi_p >> |\phi_i|$. ϕ_p ist eine Konstante; deshalb wird nur $\phi_i + \phi_i^*$ betrachtet:

$$\phi_i + \phi_i^* \sim \int F'(\vec{S}) e^{-2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i} d\vec{S} + \int F'^*(\vec{S}) e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i} d\vec{S},$$

mit

$$F'(\vec{S}) = F(\vec{S}) e^{i\left(\chi - \frac{\pi}{2}\right)}.$$

Der $\pi/2$-Term im Exponenten trägt der Phasenverschiebung zwischen Streustrahl und Primärstrahl Rechnung. Außerdem wurde der Phasenfehler χ eingeführt, für den

$$\chi = \frac{2\pi}{\lambda}\left(\Delta F \frac{\theta^2}{2} - C_s \frac{\theta^4}{4}\right)$$

gilt. Der erste Term in der Klammer beschreibt die Defokussierung um die axiale Distanz ΔF, der zweite die sphärische Aberration mit dem Öffnungsfehlerkoeffizienten C_s, der für das Mikroskop charakteristisch ist. Es folgt

$$\phi_i + \phi_i^* \sim \int F(\vec{S}) e^{i\left(\chi - \frac{\pi}{2}\right)} e^{-2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i} d\vec{S} + \int F^*(\vec{S}) e^{-i\left(\chi - \frac{\pi}{2}\right)} e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i} d\vec{S}.$$

Es wird nun das Friedelsche Gesetz angewandt,

$$F^*(\vec{S}) = F(-\vec{S}).$$

Dieses folgt für <u>reelle</u> Streuamplituden *f* aus

$$F(\vec{S}) = \sum f_i e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i},$$

$$F^*(\vec{S}) = \sum f_i e^{-2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i} = F(-\vec{S}).$$

Damit erhält man

$$\phi_i + \phi_i^* \sim \int F(\vec{S}) e^{i\left(\chi - \frac{\pi}{2}\right)} e^{-2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i} d\vec{S} + \int F(\vec{S}) e^{-i\left(\chi - \frac{\pi}{2}\right)} e^{-2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i} d\vec{S},$$

$$\phi_i + \phi_i^* \sim \int 2F(\vec{S}) \sin\chi \, e^{-2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_i} d\vec{S}. \qquad \textbf{Gleichung 1}$$

Das Messsignal oszilliert mit dem Sinus des Phasenfehlers. Wäre kein Phasenfehler vorhanden, so wäre das Messsignal auf den konstanten Beitrag des Primärstrahls begrenzt, da der gestreute Strahl relativ zum Primärstrahl um 90° phasenverschoben ist und somit keine Interferenzen auftreten. Der Phasenfehler ermöglicht also erst die Strukturanalyse. Für die Strukturanalyse werden nun die komplexen Strukturfaktoren $F(\vec{S})$ durch die (inverse) Fouriertransformation aus den Bildamplituden ermittelt,

$$F(\vec{S}) = \frac{1}{2\sin\chi}\int(\phi_i + \phi_i^*)e^{2\pi i\vec{S}\cdot\vec{r}_i}\,dr_i\,.$$

Die Phasenkontrast-Transferfunktion 2 sin χ ist durch die Parameter ΔF und C_s bekannt. Aufgrund der geringen Belichtung des Bildes sind die Fehler der Amplituden- und Phasenbestimmung verhältnismäßig hoch. Daher nimmt man nur die Phasen aus der Auswertung der Abbildung. Die Amplitude dagegen wird aus den Reflexintensitäten der Beugungsaufnahmen gewonnen, da diese aufgrund der Mittelung über viele Einheitszellen genauer bestimmt werden können. Beide Größen werden herangezogen, um wiederum mittels Fouriertransformation (Gleichung 1) die Elektronendichteverteilung zu berechnen. Abb. 9 zeigt Beugungsaufnahmen von der Purpurmembran.

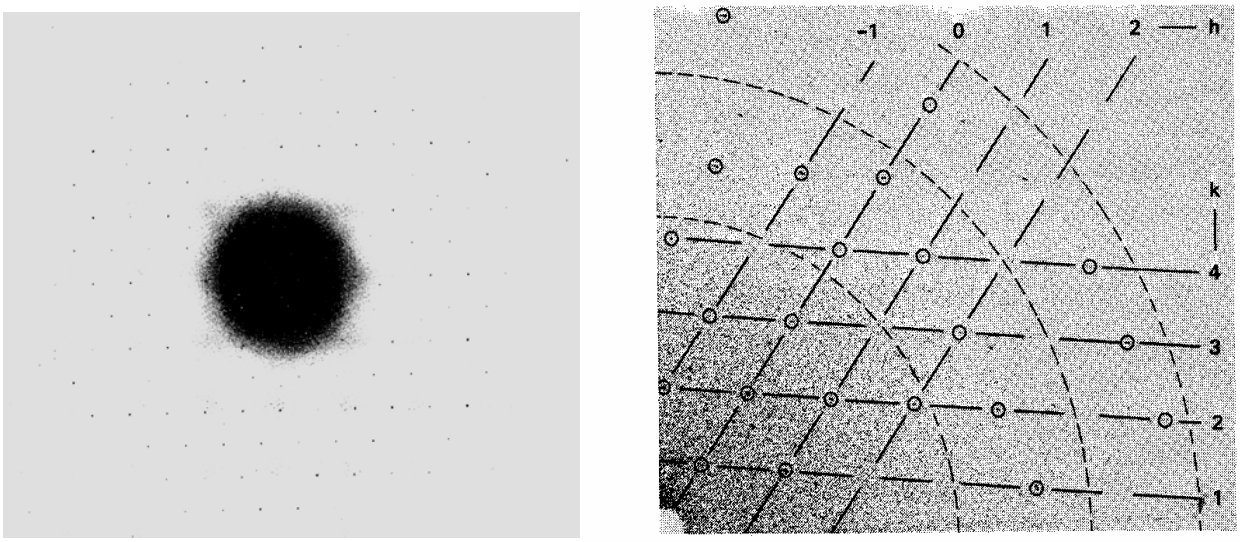


Abb. 9: Strukturanalyse der Purpurmembran mittels Elektronenbeugung im Elektronenmikroskop: Experimentelles Beugungsbild (linkes Bild) und Teil des Beugungsbildes, das mittels Fouriertransformation aus der mit geringer Strahlintensität aufgenommenen Abbildung berechnet wurde (rechtes Bild). Einige der Reflexe sind indiziert.

Die linke Aufnahme zeigt die experimentelle Beugungsaufnahme, die rechte die aus dem Elektronenmikroskopiebild errechnete. Im Beugungsbild sind die Reflexe wesentlich deutlicher zu sehen. Der Phasenfehler kann mit einem Elektronenmikroskopiebild bei langer Belichtung ermittelt werden (Abb. 10 links). Mit dieser Messung und mit den Ergebnissen aus Abb. 9 kann die Elektrondichteverteilung berechnet werden (Abb. 10 rechts).

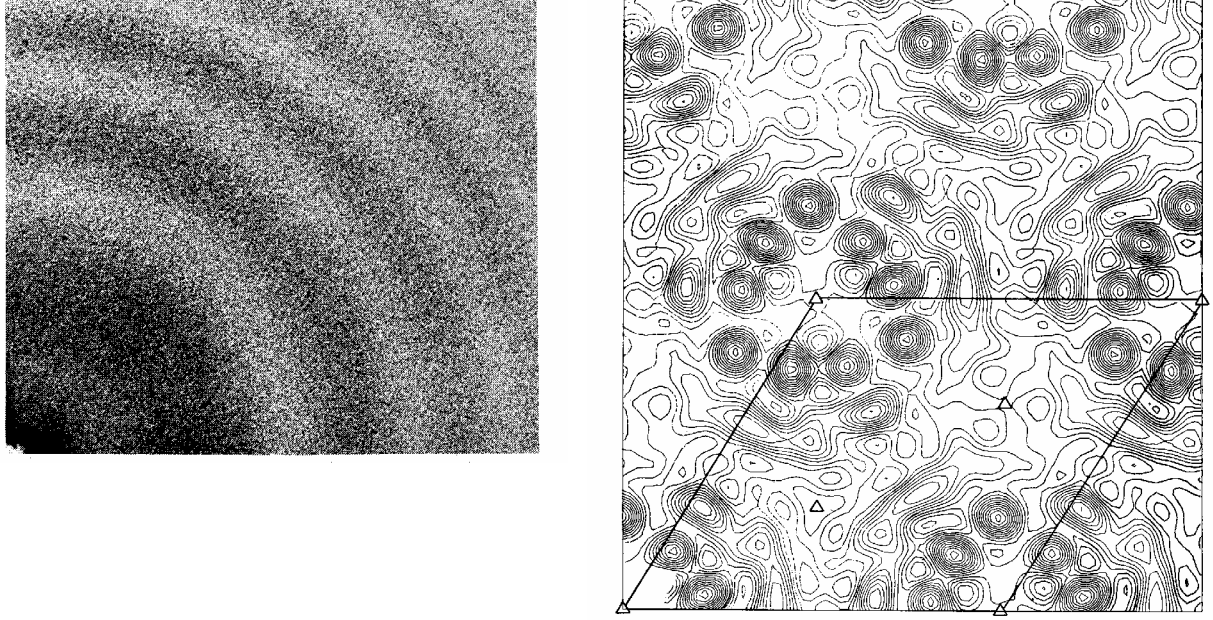


Abb. 10: Strukturanalyse der Purpurmembran (Fortsetzung). Hochdosis-Elektronenmikroskopie-Aufnahme, die im Wesentlichen den Phasenfehler darstellt (linkes Bild). Elektronendichte-Karte mit 7 Å Auflösung, das durch die Fouriertransformation berechnet wurde. Es wurden dafür die gemessenen Intensitäten aus Abb. 9 (linkes Bild) und die berechneteten Phasen aus Abb. 9 (rechtes Bild) bzw. Abb. 10 (linkes Bild) verwendet.

Während viele tausend Proteinstrukturen mit Hilfe der Röntgenbeugung aufgeklärt wurden, sind bislang nur wenige durch Elektronenmikroskopie (mit atomarer Auslösung) bestimmt worden. Trotzdem ist diese Methode wichtig, da mit ihr die Struktur von Membranproteinen gefunden werden kann, die zweidimensionale Kristalle in der Membranebene bilden. Das erste Protein, dessen Struktur auf diese Weise gelöst wurde, war das Bakteriorhodopsin, das sich in der Purpurmembran eines Halobakteriums (ein Archaebakterium, das in extrem salzhaltigen Medien vorkommt) befindet. Das Bakteriorhodopsin wandelt Lichtenergie in einen transmembranen Protonengradienten um, der zur ATP-Synthese verwendet wird. Es lassen sich kristalline Membranfragmente mit einem Durchmesser von ~1 μm isolieren. Wie oben erwähnt, wird die Struktur mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen berechnet, die bei vielen verschiedenen Neigungswinkeln der Probe aufgenommen werden. R. Henderson und N. Unwin gelang 1975 die Darstellung der dreidimensionalen Struktur (Abb. 11).

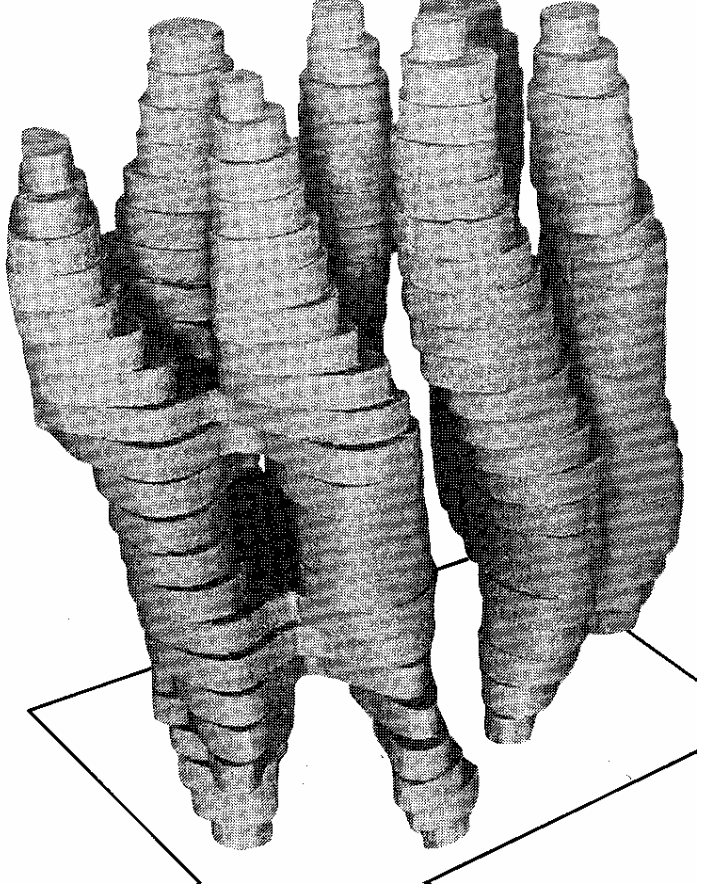


Abb. 11: Modell von Bacteriorhodopsin.

Die Auflösung in den Richtungen parallel zum eingezeichneten Rechteck ist 7 Å, senkrecht dazu 14 Å. Diese Auflösung ist schlechter, da die Beugungsreflexe ab einem bestimmten Drehwinkel der Probe (missing cone) nicht gemessen werden können. Das Bakteriorhodopsin besteht aus 7 α-Helices, die sich durch die ganze Membrandicke erstrecken (Abb. 12). Im Jahre 1990 wurde eine elektronenmikroskopische Struktur mit weitaus besserer Auflösung erzielt. Seit einigen Jahren gibt es auch eine Möglichkeit, dreidimensionale Kristalle von Bakteriorhodopsin zu erzeugen, die sich für die hochauflösende Röngtenstrukturanalyse eignen.

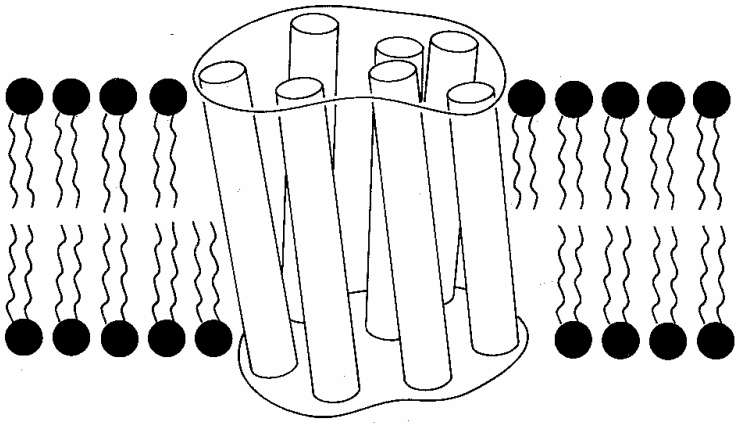


Abb. 12: Anordnung der helikalen Segmente in der Lipiddoppelschicht.

EXAFS

Eine weitere (Interferenz-) Methode zur Strukturbestimmung von Biomolekülen ist die Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS)-Methode. Bei dieser Methode wird die Röntgenabsorption einer Probe als Funktion der Röntgenwellenlänge in der Nähe eines Absorptionsübergangs gemessen. Ist die Energie des Röntgenquants $\hbar\omega$ größer als die des Übergangs E_k, so entsteht ein Photoelektron mit der Differenzenergie (Abb. 13a).

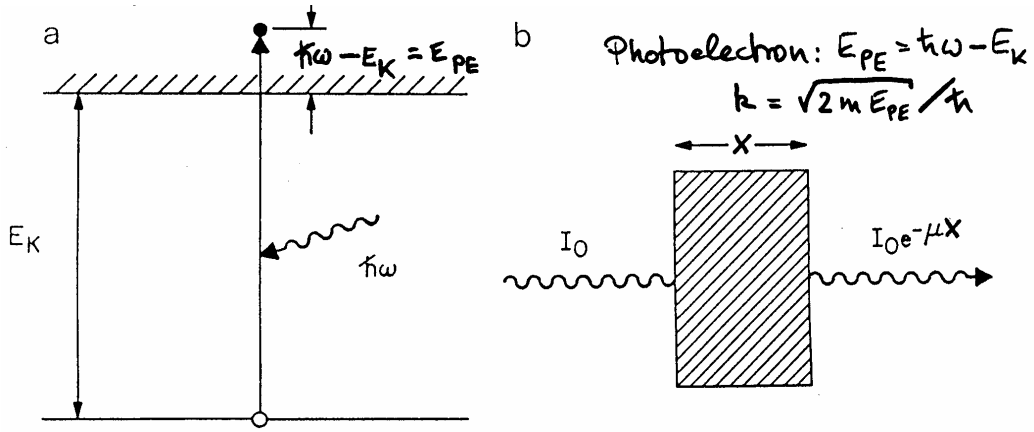


Abb. 13: a) Energieschema für die Emission eines Photoelektrons. b) Lambert-Beersches Gesetz.

In Abb. 13b zeigt das Lambert-Beersche Gesetz die exponentielle Abnahme der Röntgenintensität mit der Dicke der Probe x und dem Absorptionskoeffizienten μ. Bei EXAFS treten charakteristische Oszillationen des Absorptionskoeffizienten auf, wie in Abb. 14 für Br_2 zu sehen ist. Diese Oszillationen treten im Falle des einatomigen Edelgases Krypton nicht auf. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass es sich bei den Oszillationen um Interferenzeffekte des emittierten Photoelektrons mit den Nachbaratomen handelt (Abb. 15).

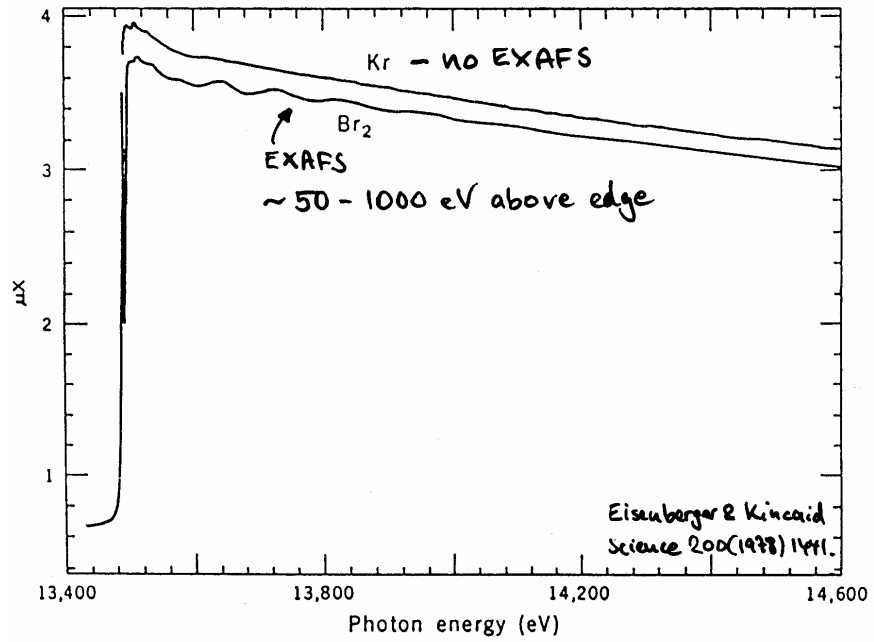


Abb. 14: Röntgenabsorption als Funktion der Röntgenenergie für Kr und Br_2.

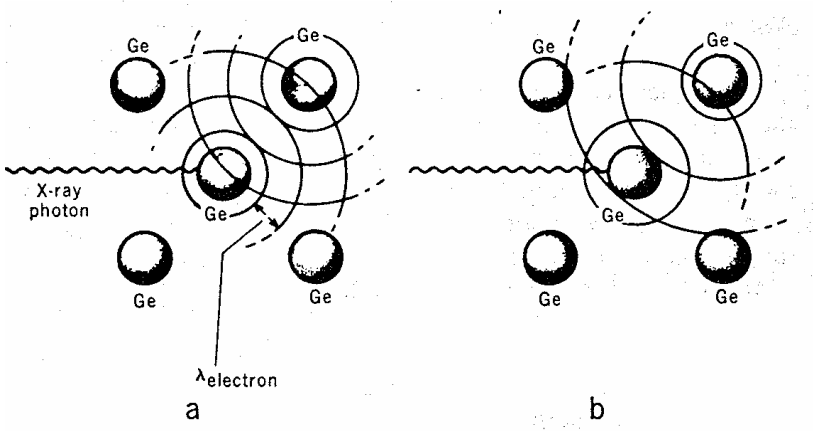


Abb. 15: Interferenz der gestreuten Elektronenwelle mit den zurückgestreuten Wellen. Durch Veränderung der Röntgenwellenlänge wird die Elektronenwellenlänge verändert, so dass es zu sich verändernden Interferenzen am emittierenden Atom kommt. a) konstruktive, b) destruktive Interferenz.

Das Photoelektron wird von einem Atom emittiert und von seinen Nachbaratomen zurückgestreut. Dadurch kommt es am absorbierenden Atom zur Interferenz, die mit der verwendeten Röntgenwellenlänge variiert, da sich damit auch die Energie bzw. die Wellenlänge des Elektrons ändert. Das Elektron interferiert also mit sich selbst. Die Abbildung stellt die Extremfälle der konstruktiven und destruktiven Interferenz dar. Diese Interferenz am Zentralatom bewirkt die Änderung der transmittierten Röntgenintensität. Ein typischer experimenteller Aufbau ist in Abb. 16 zu sehen.

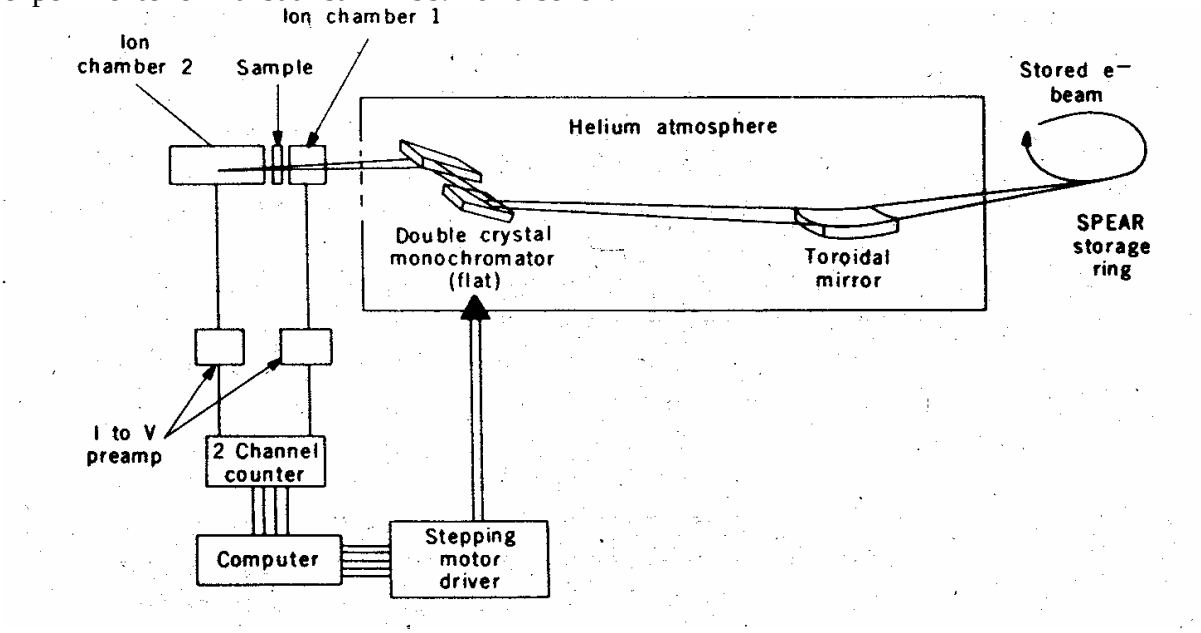


Abb. 16: EXAFS: Experimenteller Aufbau.

Als Röntgenquelle dient ein Synchrotron, das um Größenordnungen höhere Photonendichten erzeugt als Röntgenröhren. Die gewünschte Wellenlänge wird durch zwei Kristall-Monochromatoren (Drehen der Bragg-Reflexionsebenen) erzeugt. Zur Bestimmung des Absorptionskoeffizienten wird die Intensität vor und nach der Probe mit Ionenkammern gemessen. Alternative Detektionsverfahren sind die Messung der Röntgenfluoreszenz mit Festkörperdetektoren oder die Messung von Auger-Elektronen.

Die Absorption kann mit dem Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben werden,

$$I = I_o e^{-\mu x} \ .$$

Zur Auswertung wird eine glatte Funktion μ_0 so durch die Messdaten gelegt, dass die Oszillationen symmetrisch um die Nulllinie verlaufen. Es wird nun folgende Funktion definiert,

$$\chi(k) = \frac{\mu - \mu_o}{\mu_o} = \frac{\Delta\mu}{\mu_o}.$$

Es wird also vom Absorptionskoeffizienten der nicht oszillierende Anteil abgezogen und normiert. Der so erhaltene oszillatorische Teil des Absorptionskoeffizienten ergibt sich zu

$$\chi(k) = -\sum_j \frac{N_j}{kr_j^2} \left| f_j(k,\pi) \right| \sin\left(2kr_j + \alpha_j(k)\right) e^{-2\sigma_j^2 k^2} e^{\frac{-2r_j}{\lambda_j(k)}} \ , \qquad \textbf{Gleichung 2}$$

wobei N_j die Anzahl der Atome in der Schale j mit Radius r_j um das emittierende Atom herum ist. Die Größe im Betrag stellt die Rückstreuamplitude dar. Der Debye-Waller-Faktor $e^{-2\sigma_j^2 k^2}$ berücksichtigt die Tatsache, dass sich die Nachbaratome in verschiedenen Biomolekülen nicht exakt am gleichen Ort befinden, sondern um eine Mittellage herum verteilt sind. Dieser Beitrag wird später noch im Detail diskutiert. Der Term $e^{-2r_j/\lambda_j(k)}$ berücksichtigt den Verlust an Photoelektronen aufgrund von inelastischer Streuung. Diese haben nicht mehr die geeignete Wellenlänge für die Interferenz mit der ausgesandten Welle. Die Phase setzt sich zum einen aus einem Term ($2kr_j$), der durch den Weg des Elektrons zum Streuort und zurück entsteht, und zum anderen aus der Phasenverschiebung aufgrund der Wechselwirkung der Elektronenwelle mit den Atompotentialen zusammen,

$$\alpha_j(k) = \phi_j + 2\delta_1'(k) \, .$$

Der erste Term beschreibt die Phasenverschiebung aufgrund des Potentials des Rückstreuatoms, der zweite die Phasenänderung, die durch das Potential des emittierenden Atoms zustande kommt. Der Faktor 2 folgt daraus, dass die Welle sowohl beim Aussenden als auch nach der Reflexion mit dem Zentralatom in Wechselwirkung tritt. Der Strich deutet darauf hin, dass das Atom in einem angeregten Zustand ist. Falls α_j für die betrachteten Atome bekannt ist, kann der Abstand zwischen den Atomen mit Gleichung 2 berechnet werden. α_j kann man aus EXAFS-Daten von Strukturen mit den gleichen Atompaaren wie die zu untersuchende Probe, für welche die Abstände schon bekannt sind, erhalten (chemische Transferierbarkeit).

Das Röntgenabsorptionsspektrum von kristallinem Germanium bei 100 K ist in Abb. 17 zu sehen. Die Daten in der Nähe der Kante, die auch Informationen über die chemische Umgebung enthalten, werden im Folgenden nicht betrachtet. Wird nun die Absorption nicht gegen die Photonenenergie, sondern gegen die Wellenzahl der Elektronen aufgetragen und zusätzlich, wie oben beschrieben, der nicht-oszillierende Untergrund entfernt, so erhält man die Kurve in Abb. 18 a.

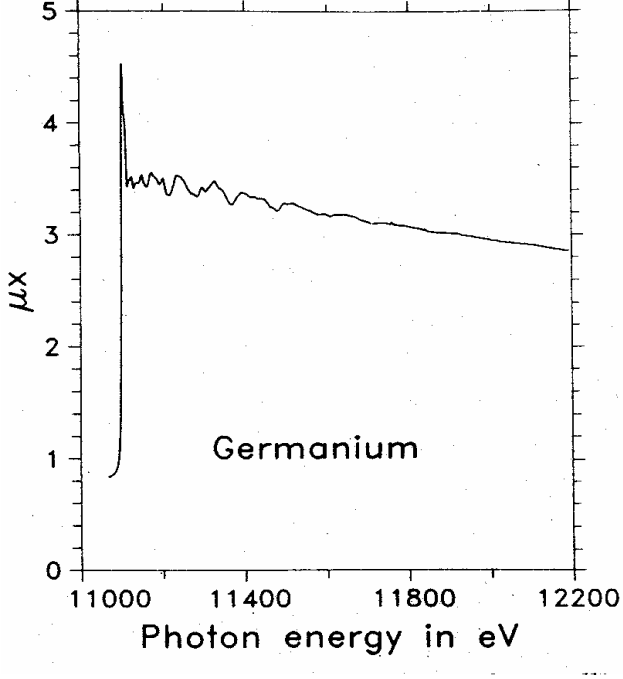


Abb. 17: Röntgenabsorptionsspektrum von kristallinem Germanium bei einer Temperatur von 100 K. Der steile Anstieg in der Nähe von 11000 eV ist die K-Kante, die Modulationen oberhalb der Absorptionskante sind die EXAFS-Oszillationen.

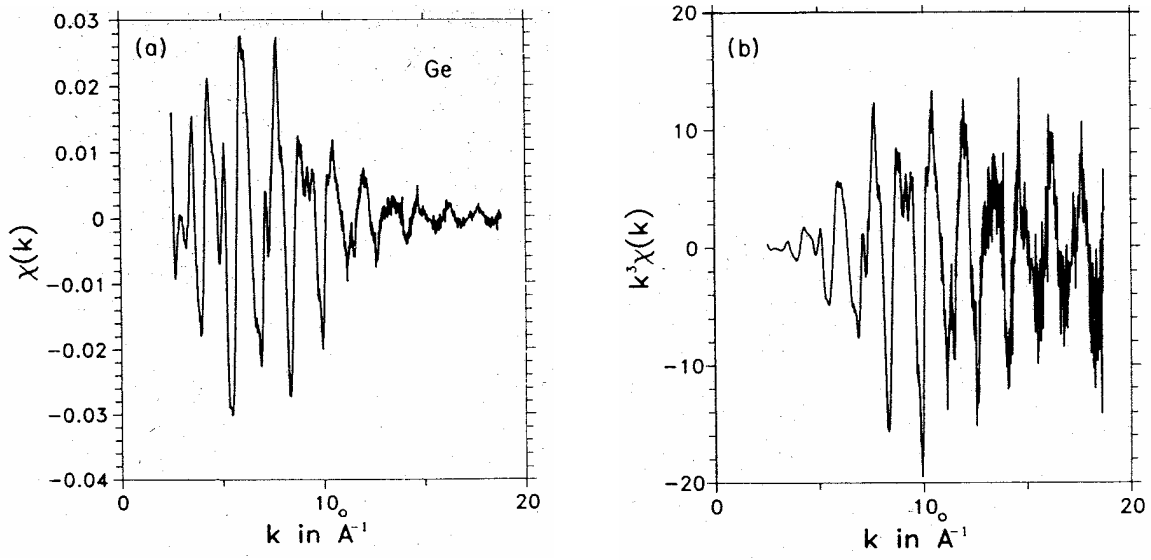


Abb. 18: a) $\chi(k)$ für Germanium, berechnet aus den Daten in Abb. 17; b) Daten von a) mit k^3 multipliziert.

Abb. 18 b zeigt die gleiche Kurve mit k^3 multipliziert. Dieser Faktor gleicht den Faktor *1/k* in Gleichung 2 und die $1/k^2$-Abhängigkeit der Rückstreuamplitude aus. Dadurch werden die Oszillationen gleichmäßiger gewichtet. Für die weitere Auswertung werden die Daten aus Abb. 18 b Fourier-transformiert (Abb. 19 a).

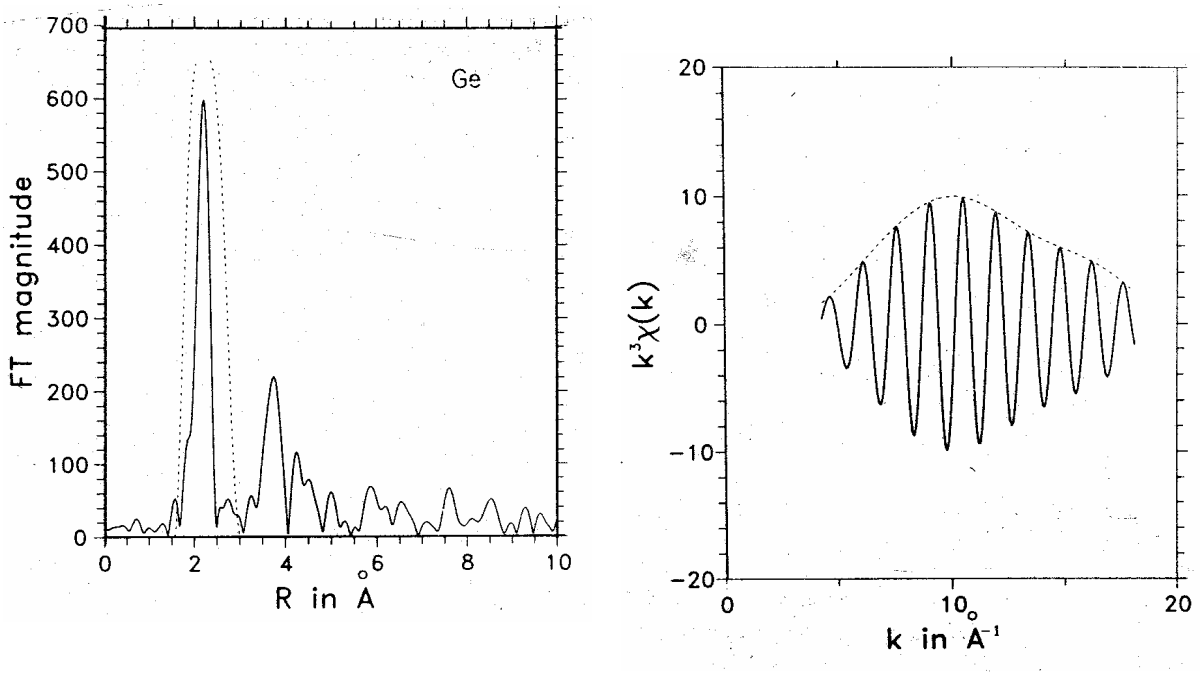


Abb. 19: a) Betrag der Fouriertransformation der Daten aus Abb. 18 b. Ebenfalls eingezeichnet ist die Fensterfunktion, die die EXAFS-Oszillationen der nächsten Nachbarn herausfiltert (gestrichelte Linie). b) Zurücktransformation der Daten in Abb. 19 a nach Multiplikation mit der Filterfunktion.

Der erste Peak bei einem Abstand von 2.2 Å stammt von den vier nächsten Nachbaratomen des betrachteten Germaniumatoms. Dieser Wert ist geringer als der tatsächliche Abstand von 2.45 Å, da die Phase noch durch α_j beeinflusst wird. Ist α_j bekannt, so können die exakten Abstände bestimmt werden. Die anderen Peaks über dem Rauschen rühren von den weiter entfernt liegenden Atomen her. Werden alle Peaks bis auf den Hauptpeak mittels einer Filterfunktion herausgeschnitten und die erhaltenen Daten zurücktransformiert, so erhält man die Kurve in Abb. 19 b. Alle hochfrequenten Signale und das Rauschen sind entfernt worden.
Das nächste biophysikalische Beispiel zeigt die Bestimmung des Eisen-Schwefel-Abstands im Elektrontransfer-Protein Rubredoxin. Wie oben ausgeführt, ist für die Bestimmung des Abstands der betrachteten Atome die Kenntnis von α_j nötig. Experimentell kann α_j durch Vergleich der EXAFS-Aufnahmen der zu untersuchenden Struktur mit einer Probe ermittelt werden, die aus denselben Zentral- und Nachbaratomen besteht und deren Abstände gleich und bekannt sind. Die Verbindung FESSC, in der ein Fe^{3+}-Ion oktaedrisch von Schwefelatomen umgeben ist, stellt für Rubredoxin ein geeignetes Referenzsystem dar. Abb. 20 zeigt die Röntgenabsorption für Rubredoxin und FESSC.

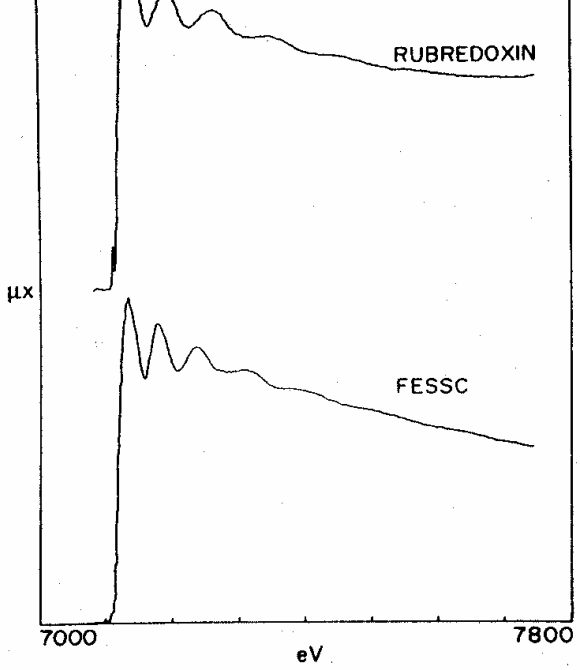


Abb. 20: Röntgenabsorptionsspektren von Rubredoxin und FESSC.

Wird nun wieder der nicht-oszillierende 'Untergrund' abgezogen und die Absorption gegen den Betrag des Wellenvektors der Elektronen aufgetragen, so erhält man Abb. 21. Die Daten wurden hier mit *k* multipliziert.

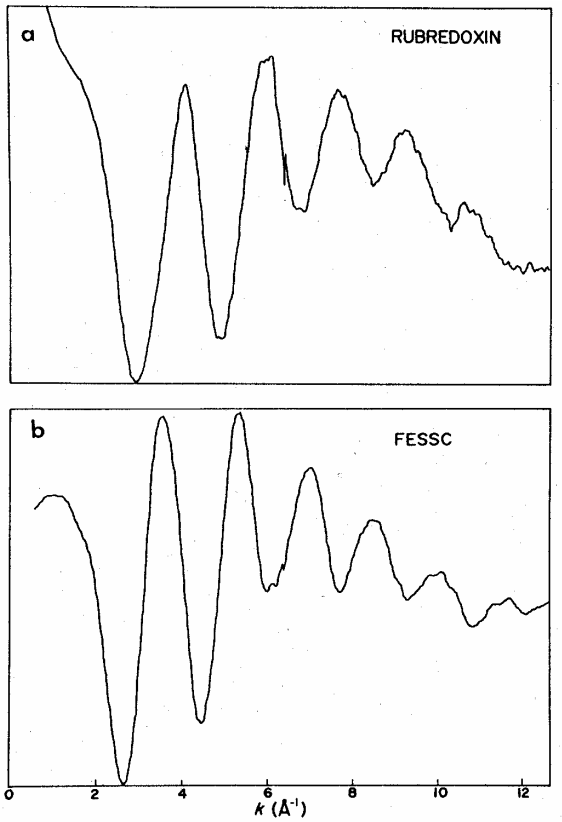


Abb. 21: Röntgenabsorption als Funktion von *k*. Die Daten aus Abb. 20 wurden geglättet, ein angefittetes Polynom dritten Grades abgezogen und mit *k* multipliziert. *($k\chi(k)$* ist als Ordinate aufgetragen).

Vergleicht man die Ergebnisse für Rubredoxin und FESSC bei k = 10 Å^{-1}, so sieht man, dass dort die Oszillationen 180° außer Phase sind. Mit der Annahme, dass α_j für beide Proben gleich ist, erhält man für den Unterschied des Eisen-Schwefel-Abstands im Rubredoxin im Vergleich zu FESSC Δr = 0.16 Å, da $2k\Delta r = \pi$ ergeben muss. Hier wurde angenommen, dass alle Schwefelatome den gleichen Abstand zum Eisen haben. Wird nun α_j von FESSC mittels nichtlinearer Regression an Gleichung 2 bestimmt (hierzu wird für α_j ein Polynom zweiten Grades verwendet) und für die Messungen an Rubredoxin verwendet, so kann man die Abstände der vier Schwefelatome variieren, so dass die Absorptionsspektren am besten gefittet werden. Werden dagegen die Abstände, die mittels der Röntgenstrukturanalyse gewonnen wurden, in Gleichung 2 eingesetzt und mit den experimentellen EXAFS-Aufnahmen verglichen, so stellt man vielfach signifikante Abweichungen fest. Die Röntgenstrukturanalyse hat zwar den Vorteil, dass sie die gesamte Struktur liefert. Hingegen können die Atomabstände mit EXAFS zwar nur lokal, dafür aber sehr präzise gemessen werden.

Konformationssubzustände

Die Strukturmodelle der Proteine, die aus der Röntgenstrukturanalyse erhalten werden, wurden lange Zeit vielfach so interpretiert, dass sich Proteine in einer einzigen gefalteten Struktur im Minimum der freien Enthalpie befinden. Die Röntgenbeugung vermag aber nur die gemittelte Struktur darzustellen. Experimente und theoretische Ansätze zeigen, dass Proteine tatsächlich sehr viele Konformationen besitzen, die ein wenig voneinander abweichen und ähnliche freie Enthalpien haben (Konformationssubzustände). Experimentell wurde dies durch Röntgenkristallographie, Mößbaereffekt, NMR, Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie und Wasserstoffaustausch bestätigt. Einige theoretische Argumente werden im Folgenden betrachtet.
Proteine sind mesoskopische Systeme mit großen Fluktuationen der inneren Energie,

$$\left\langle \Delta E^2 \right\rangle_V = k_B T^2 m c_v ,$$

des Volumens,

$$\left\langle \Delta V^2 \right\rangle_T = k_B T V \beta_T ,$$

und der Entropie,

$$\left\langle \Delta S^2 \right\rangle_P = k_B m c_P .$$

Dies impliziert die Existenz vieler thermisch anregbarer Zustände.

Für ein Protein mit der Masse m = 25 kD = $4 \cdot 10^{-20}$ g, dem Volumen $V = 3 \cdot 10^{-20}$ cm^3, den spezifischen Wärmekapazitäten $c_v \approx c_p$ = 1.3 J/gK, der adibiatischen Kompressibilität β_T = 10^{-10} m^2/N und $k_B = 1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K erhält man $\sqrt{\langle \Delta E^2 \rangle} = 150$ kJ/mol, $\sqrt{\left\langle \Delta V^2 \right\rangle}/V = 0.01$ und $\sqrt{\left\langle \Delta S^2 \right\rangle}/k_B = 60$. Die Energiefluktuationen sind somit im Bereich der Stabilisierungsenergie.
Eine weitere Betrachtungsweise ist die, Konformationssubzustände mit Störungen der Periodizität im Kristall zu vergleichen. Um die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, Loch-Zwischengitteratom-Paare zu erzeugen, wird die Enthalpie, die sich aus der Enthalpie des Kristalls H_0 und der zusätzlichen Beiträge von n Defekten (Index p) zusammensetzt,

$$H = H_0 + n H_p ,$$

und die Entropie

$$S = S_{th} + S_{con}$$

betrachtet. Die Entropie setzt sich aus zwei Termen zusammen. Der erste Term ist durch den Logarithmus der Anzahl der möglichen Phononenanregungen in allen Moden gegeben. Die Erzeugung eines Defektes erhöht die Entropie. Der zweite Term (Konfigurationsentropie) beschreibt die Anzahl der Möglichkeiten, wie n Defekte auf alle möglichen Orte verteilt werden können,

$$S_{con} = k_B \ln \frac{(N+n)!}{N!\,n!},$$

wobei N die Anzahl der Atome und n die Anzahl der Defekte ist. Die freie Enthalpie ist dann

$$G(n) = G(0) + n H_p - n T \Delta S_{th} - T S_{con} .$$

Zur Bestimmung von der relativen Anzahl an Defekten im Gleichgewicht, n/N, wird das Minimum von G berechnet,

$$\left.\frac{\partial G}{\partial n}\right|_T = 0.$$

Mit der Näherung $n << N$ und $\ln x! = x \ln x$ folgt

$$\frac{n}{N} = \exp\left[-\frac{H_p}{kT}\right]\exp\left[\frac{\Delta S_{th}}{k}\right].$$

Abb. 22 zeigt schematisch den Verlauf dieser Funktionen. Bei Festkörpern ist $H_p \approx 100$ kJ/mol; daraus folgt $n/N \approx 10^{-18}$. Für Proteine hingegen ist $H_p \approx 1 - 10$ kJ/mol; daraus folgt $n/N \approx 0.01 - 1$.

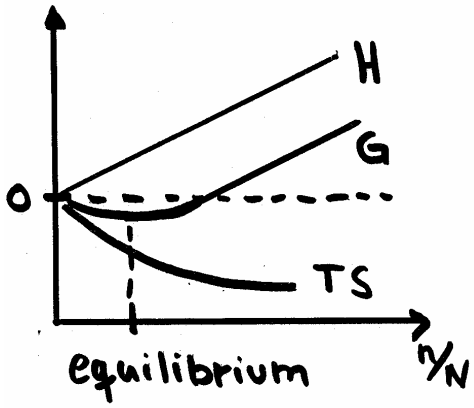


Abb. 22: Schematischer Verlauf von H, G und TS.

Die Boltzmanngleichung,

$$W = \exp(S / k_B),$$

beschreibt den Zusammenhang der Anzahl der Zustände W eines Objekts mit der Entropie S. Falls für eine Aminosäure eines Proteins $W = 2 - 3$ angenommen wird und das Protein N Aminosäuren besitzt, so folgt

$$W = (2-3)^N \approx 10^{100}.$$

Die Biomoleküle sind mesoskopische Systeme, die entlang ihrer Ketten starke und zwischen den Seitenketten schwache Kräfte aufweisen. Dies führt dazu, dass sie einen hoch entarteten Grundzustand besitzen (Konformationssubzustände). Im Folgenden sollen einige Beispiele für Konformationssubzustände besprochen werden. Die Fähigkeit von Myoglobin und Hämoglobin, Eisen zu binden, beruht auf der Anwesenheit des Häms (Abb. 23).

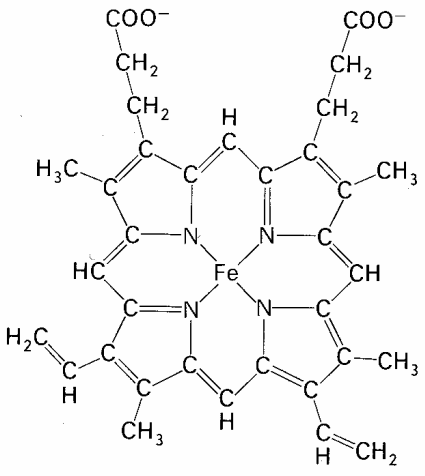


Abb. 23: Die Strukturformel von Häm.

Der zentrale Teil besteht aus einem planaren Ring, dem Porphyrin. An diesem sind acht Gruppen mittels Einfachbindungen gebunden. Während der Porphyrinring relativ starr ist, können die Seitengruppen leicht um die Einfachbindungen rotieren. Das Rotationspotential ist dem des Ethans (Abb. 24) ähnlich.

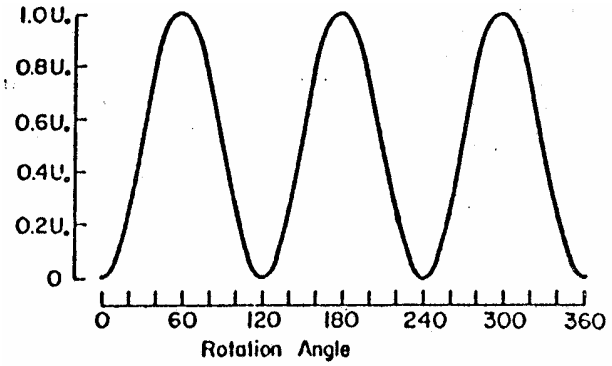


Abb. 24: Rotationspotential des Ethans ($U = \frac{1}{2} U_0 (1 - \cos(3\phi))$).

Diese Barrieren können bei Zimmertemperatur überwunden werden, da sie nur einige kJ/mol betragen (vergleiche Tab. 2). Durch die vielen möglichen Rotationspositionen der Seitengruppen (die Propionatketten haben 3 verschiedene frei drehbare Einfachbindungen) hat das Häm eine große Anzahl von Konformationssubzuständen. Bei einem Protein ist sie noch um ein Vielfaches größer als beim Häm. Die potentielle Energieoberfläche für ein bestimmtes Atom hängt von der gesamten Konformation (und Länge) des Rückgrats ab (Abb. 25).

Formula	Name	$U^{(3)}$ (kcal/mole)[b]	State
CH_3-CH_3	Ethane	2.875 ± 0.125	Gas
CH_3-CH_2F	Ethyl fluoride	3.33 ± 0.05	Gas
CH_3-CH_2Cl	Ethyl chloride	3.68	Gas
CH_3-CH_2Br	Ethyl bromide	3.68	Gas
CH_3-CH_2I	Ethyl iodide	3.22 ± 0.5	Gas
CF_3-CF_3	Hexafluoroethane	3.92	Gas
CCl_3-CCl_3	Hexachloroethane	10.8	Gas
$CH_3-C\equiv C-CH_3$	Dimethylacetylene	≤0.03	Gas
CH_3-CH_2OH	Ethanol	0.77 ± 0.1	Gas
C_2H_5-OH	Ethanol[c]	0.8	Gas
CH_3-SiH_3	Methylsilane	1.70 ± 0.1	Gas
CH_3-SiF_3	Methyltrifluorosilane	1.4 ± 0.2	Gas
$(CH_3-)_4Si$	Tetramethylsilane	1.4 ± 0.1	Gas
CH_3-GeH_3	Methylgermane	1.24 ± 0.025	Gas
$(CH_3-)_4Ge$	Tetramethylgermane	0.65	Solid
$(CH_3-)_4Sn$	Tetramethylstannane	0.46	Solid
$(CH_3-)_4Pb$	Tetramethyllead	0.18	Solid
CH_3-NH_2	Methylamine	1.98 ± 0.01	Gas
$(CH_3-)_2NH$	Dimethylamine	3.62 ± 0.05	Gas
$(CH_3-)_3N$	Trimethylamine	4.41 ± 0.03	Gas
CH_3-OH	Methanol	1.07 ± 0.02	Gas
CH_3-O-CH_3	Dimethyl ether	2.7 ± 0.15	Gas
$(CH_3-)_2SO$	Dimethyl sulfoxide	2.94	Gas
CH_3-SCN	Methyl thiocyanate	1.59 ± 0.08	Gas
CH_3-SeH	Methyl selenol	1.01 ± 0.05	Gas
$(CH_3-)_3B$	Trimethylborane	0	Gas
$(CH_3-)_2Zn$	Dimethylzinc	0	Gas
CH_3-NO_2	Nitromethane[d]	0.00603	Gas
$CH_3-C_6H_5$	Methylbenzene[d]	0.0139	Gas
$C_6H_5CH_2-CH_3$	Ethylbenzene[e]	2.7	Gas
$C_6H_5-C_2H_5$	Ethylbenzene[e]	1.3	Gas
$OHC-NH_2$	Formamide	18 ± 3	Solid

Tab. 2: Einige Barrierenamplituden der internen Rotation (1kcal/mol = 0.043 eV = 4.18 kJ/mol).

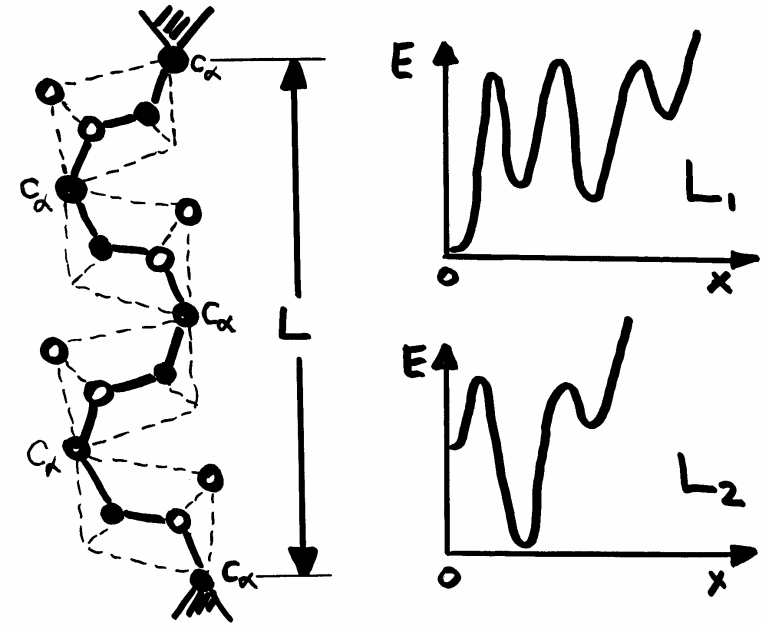


Abb. 25: Teil eines Polypeptidrückgrats, dessen festgehaltene Enden einen Abstand L haben. Zwei mögliche Potentiale eines bestimmten Atoms sind rechts zu sehen.

Da die elektrostatische Wechselwirkung eine große Rolle für die möglichen Konformationen von Proteinen spielt, ist auch die Protonierung der geladenen Einheiten (insbesondere das Histidin) für die Konformationsvielfalt wichtig. Somit lässt sich die Konformationsenergieoberfläche für eine Konfigurationskoordinate (ein Protein hat tatsächlich viele tausend Koordinaten) schematisch wie in Abb. 26 darstellen.

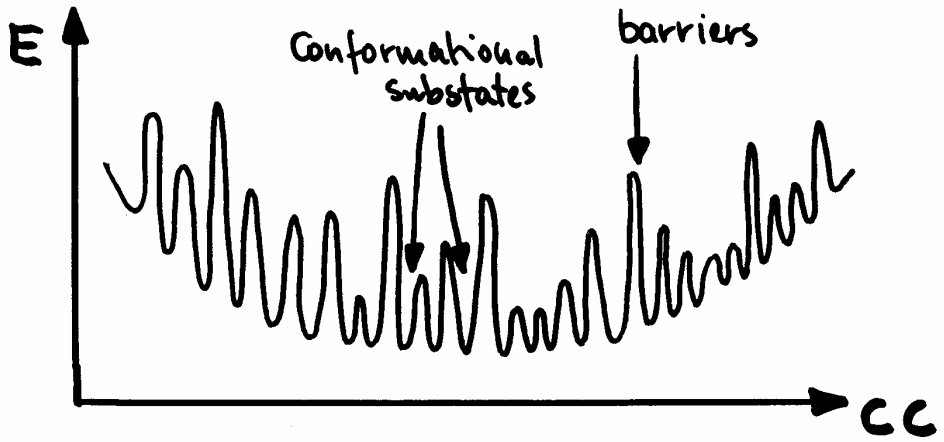


Abb. 26: Schematische Darstellung der Konformationsenergieoberfläche als Funktion einer Konfigurationskoordinate.

Die Energieoberfläche weist viele Konformationssubzustände auf, die ähnliche Energien besitzen. Die Barrierenhöhen liegen zwischen 0 und ungefähr 100 kJ/mol. Es können zwei Extremfälle unterschieden werden. Bei tiefen Temperaturen (Energiebarriere $E >> k_B T$) friert jedes Protein in einem bestimmten Subzustand ein. Dieser hängt von der Art und Weise der Kühlung ab. Bei einer schnellen Abkühlung ist eine größere Verteilung der Zustände zu finden als bei einer langsamen Abkühlung. Bei hohen Temperaturen ($E << k_B T$) fluktuiert das Molekül schnell zwischen den verschiedenen Konformationszuständen. Experimentelle

Methoden mit einer geringen zeitlichen Auflösung (typische Fluktuationszeiten sind im Bereich von Pikosekunden oder schneller) messen somit Mittelwerte. Im Gleichgewichtszustand führen die Proteine Fluktuationen zwischen den Konformationen aus. Proteinreaktionen (z.B. aufgrund der Absorption eines Photons) sind dagegen Nicht-Gleichgewichtsrelaxationen (Abb. 27).

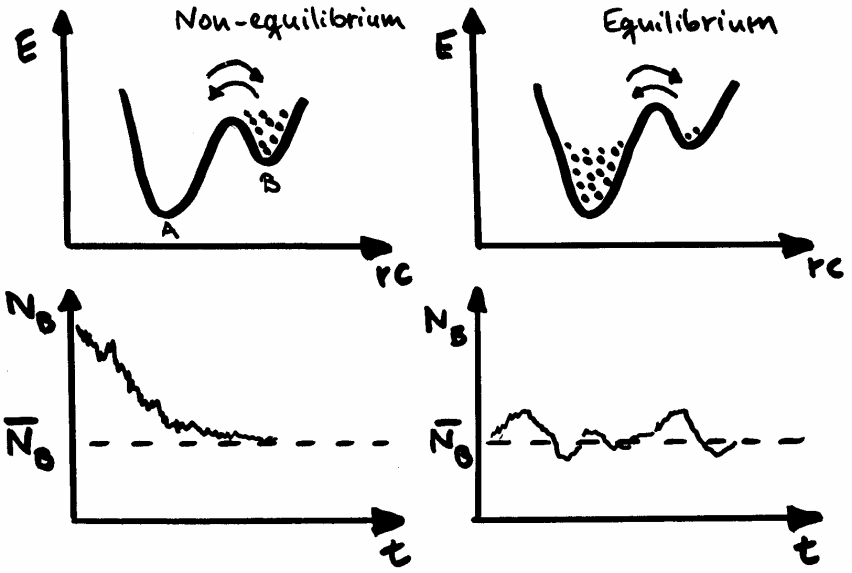


Abb. 27: Fluktuation und Dissipation in einem Modell von 2 Zuständen. N_B ist die Anzahl der Moleküle in Zustand *B*.

Den Zusammenhang von Gleichgewichts- und Nicht-Gleichgewichtseigenschaften ist durch das Fluktuations-Dissipations-Theorem gegeben. Einstein leitete 1905 den Zusammenhang zwischen dem Diffusionskoeffizienten D und dem Reibungskoeffizienten f her,

$$D = kT / f .$$

Aufgrund der Brownschen Bewegung legt das Teilchen in einer Dimension die Distanz x zurück, wobei in einer Raumdimension gilt

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt .$$

Die Einstein-Relation verbindet die (räumlichen) Fluktuationen im thermodynamischen Gleichgewicht mit der Dissipation von kinetischer Energie, repräsentiert durch den Reibungskoeffizienten. In ähnlicher Weise beschrieb Nyquist den Zusammenhang der Spannungsfluktuationen an einem dissipativen Element R, dem Ohmschen Widerstand (Nyquist Theorem):

$$\langle V^2 \rangle = 4kTR\Delta f ,$$

wobei Δf das betrachtete Frequenzintervall ist.

Debye-Waller-Faktor

Bei der Behandlung der Röntgenstreuung wurde davon ausgegangen, dass die betrachtete Probe ein perfekter Kristall ist. Ein Beispiel für die Störung der perfekten Periodizität sind die oben beschriebenen Fluktuationen der Moleküle zwischen den Konformationssubzuständen. Ein Ensemble von Biomolekülen liegt in verschiedenen Subzuständen vor. Die Röntgenbeugung gibt aber nur Auskunft über Verteilungen, d.h., sie ist eine statische Methode. Abb. 28 stellt schematisch die damit verbundene Fehlordnung des Kristalls dar.

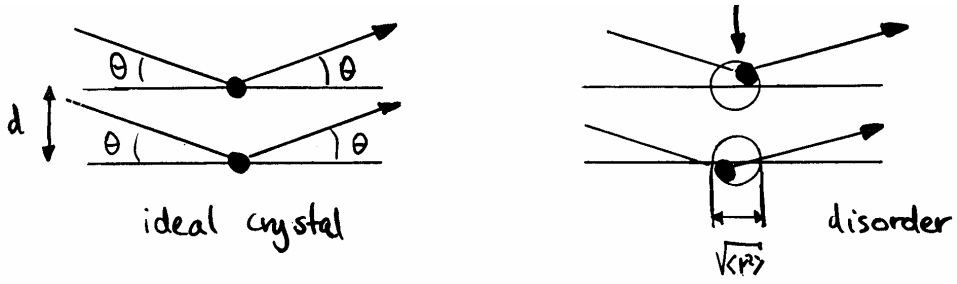


Abb. 28: Störung der perfekten Kristallstruktur aufgrund von Konformationsverteilungen.

Die Ladungsverteilung $\rho(\vec{r})$ der Atome wird aufgrund der Fluktuationen im Kristall, die mit der Verteilungsfunktion $g(\vec{r})$ dargestellt werden, verschmiert. Dies wird durch die Faltung beschrieben,

$$\rho(\vec{r}) \rightarrow \int g(\vec{r}')\rho(\vec{r}-\vec{r}')d\vec{r}' .$$

Daraus folgt für die Fouriertransformierten mit Hilfe des Faltungssatzes,

$$f(\vec{S}) \rightarrow f(\vec{S}) \cdot T(\vec{S}) .$$

Werden isotrope harmonische Schwingungen angenommen, so folgt für die Verteilungsfunktion der Atome,

$$g(\vec{r}) = \left(2\pi\sigma^2\right)^{\frac{-3}{2}} e^{\frac{-r^2}{2\sigma^2}} .$$

Für die Fouriertransformierte, die Debye-Waller-Faktor genannt wird, erhält man

$$T(\vec{S}) = e^{-2\pi^2 S^2 \langle x^2 \rangle} = e^{-8\pi^2 \langle x^2 \rangle \left(\frac{\sin\theta}{\lambda}\right)^2} = e^{-\frac{k^2 \langle x^2 \rangle}{2}} ,$$

wobei $8\pi^2 \langle x^2 \rangle$ in der Kristallographie als (isotroper) B-Faktor bezeichnet wird. Dieser kann bei Vorliegen von Anisotropie bzw. bei Berücksichtigung von Mehrfachlagen erweitert werden. Die Unordnung im Kristall führt somit zur Abnahme der Beugungsintensitäten bei großen Streuwinkeln. Für eine alternative Herleitung ist die im Abschnitt über Röntgenbeugung für den molekularen Strukturfaktor verwendete Formel der Ausgangspunkt

$$F(h,k,l) = \sum_j f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} = \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_j} .$$

Aufgrund der Störungen des idealen Kristalls folgt

$$F(h,k,l) = \sum_j f_j \left\langle e^{2\pi i \vec{S}\cdot(\vec{r}_j + \Delta\vec{r}_j)} \right\rangle = \sum_j f_j e^{2\pi i \vec{S}\cdot\vec{r}_j} \left\langle e^{2\pi i \vec{S}\cdot\Delta\vec{r}_j} \right\rangle ,$$

wobei $\langle\ \rangle$ den Ensemblemittelwert darstellt. Für $\vec{S}\cdot\Delta\vec{r}_j \ll l$ kann die Exponentialfunktion entwickelt werden,

$$\left\langle e^{2\pi i\vec{S}\cdot\Delta\vec{r}_j}\right\rangle = \left\langle 1+2\pi i\vec{S}\cdot\Delta\vec{r}_j - 2\pi^2\left(\vec{S}\cdot\Delta\vec{r}_j\right)^2 ...\right\rangle .$$

Hier verschwindet der zweite Term, da die Auslenkungen symmetrisch zur Mittellage sind. Mit $\left\langle(\vec{S}\cdot\Delta\vec{r}_j)^2\right\rangle = S^2\left\langle x^2\right\rangle$ folgt

$$\left\langle e^{2\pi i\vec{S}\cdot\Delta\vec{r}_j}\right\rangle = e^{-2\pi^2\left\langle(\vec{S}\cdot\Delta\vec{r}_j)^2\right\rangle}$$

$$= e^{-8\pi^2\left\langle x^2\right\rangle\left(\frac{\sin\theta}{\lambda}\right)^2} .$$

Somit gilt für den Strukturfaktor

$$F(h,k,l) = \sum_j f_j e^{2\pi i\vec{S}\cdot\vec{r}_j} e^{-8\pi^2\left\langle x^2\right\rangle\left(\frac{\sin\theta}{\lambda}\right)^2} ,$$

und die Intensität ist

$$I(h,k,l) = FF^* = \sum_i\sum_j f_i f_j e^{2\pi i\vec{S}(\vec{r}_i-\vec{r}_j)} e^{-2\pi^2S^2\left\langle x_i^2\right\rangle} e^{-2\pi^2S^2\left\langle x_j^2\right\rangle} .$$

Beachte, dass für Proteine die oben durchgeführte harmonische Näherung der Atomauslenkungen nur eine Näherung darstellt. Röntgenstrukturanalysen liefern heutzutage neben den Positionen der Atome auch ihre Verteilung um die Mittellage. Es werden darüber hinaus auch anisotrope B-Faktoren verwendet.
In Proteinen setzt sich der Debye-Waller-Faktor aus verschiedenen Beiträgen zusammen. Neben den beschriebenen Konformationssubzuständen ($\langle x^2\rangle_c$, statisch oder dynamisch je nach Barrierenhöhe) sind es die Gitterfehler ($\langle x^2\rangle_{ld}$, statisch) und die Vibrationen ($\langle x^2\rangle_v$, dynamisch). Diese Beiträge können als statistisch unabhängig voneinander angesehen werden,

$$\langle x^2\rangle = \langle x^2\rangle_c + \langle x^2\rangle_{ld} + \langle x^2\rangle_v .$$

Die Strukturanalyse mit Röntgenstrahlung kann nicht zwischen den dynamischen und statischen Beiträgen unterscheiden. Ursprünglich glaubte man, dass die großen Werte für $\langle x^2\rangle$ bei Proteinen von den Gitterfehlern kommen ('schlechter Kristall'). Temperaturabhängige Messungen von $\langle x^2\rangle$ zeigten aber, dass die Beiträge aufgrund der Konformationsvariabilität vielfach dominieren. Abb. 29 zeigt als Beispiel die Struktur von Myoglobin inklusive der möglichen Bereiche, die durch die verschiedenen Konformationssubzustände zugänglich sind. Aus Abb. 30 geht hervor, dass die mittleren quadratischen Auslenkungen bei höheren Temperaturen zunehmen. Unterhalb der Abszisse sind die α-Helices des Myoglobins eingezeichnet. Man beobachtet größere Auslenkungen für die Schleifen zwischen den Helices. Der Mittelwert der mittleren quadratischen Auslenkungen aller Atome ist als Funktion der Temperatur in Abb. 31 dargestellt. Die Abbildung zeigt, wie die Konformationszustände des Myoglobin bei Temperaturen unterhalb von 200 K einfrieren. Ein weiteres Absenken der Temperatur führt zu keiner großen Verringerung der mittleren Auslenkung der Atome. Die statische Methode der Röntgenbeugung liefert somit über die Temperaturabhängigkeit einen Einblick in dynamische Prozesse. Als weiteres Beispiel zeigt Abb. 32 die Temperaturabhängigkeit des Debye-Waller-Faktors der Ribonuklease des Rinderpankreas.

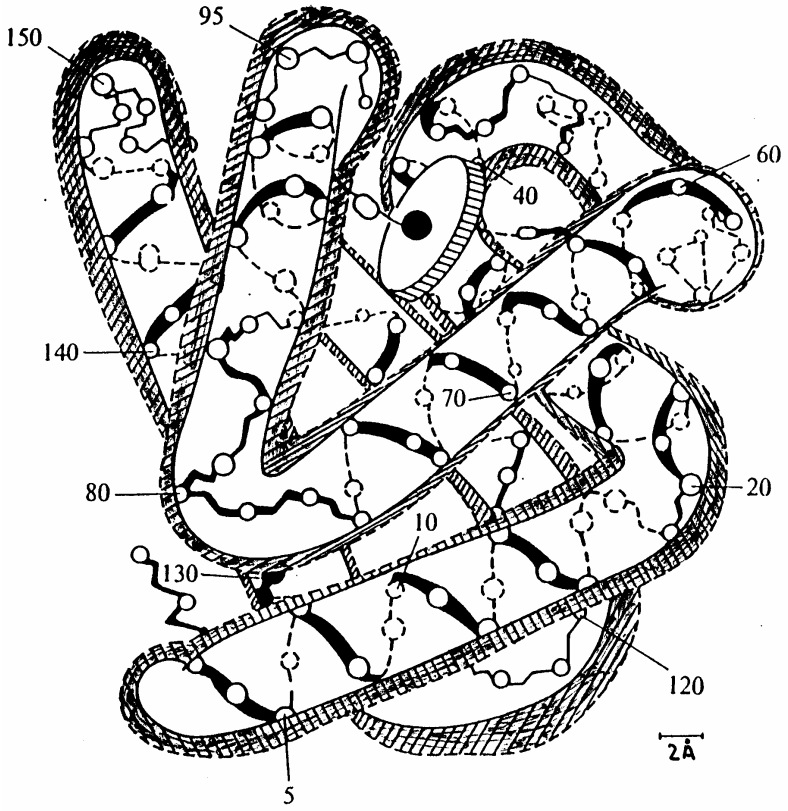


Abb. 29: Die Struktur von Myoglobin. Neben der statischen Struktur sind auch die Bereiche eingezeichnet, die durch die Konformationssubzustände erreicht werden können (schattierte Flächen).

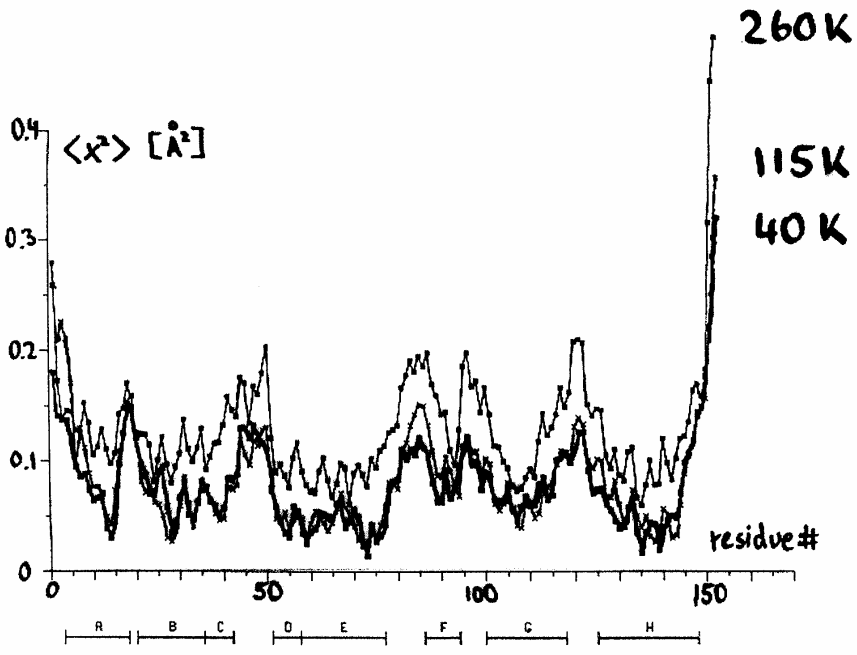


Abb. 30: Mittlere quadratische Auslenkungen der 4 Rückgratatome der Myoglobineinheiten bei 40, 115 und 260 K.

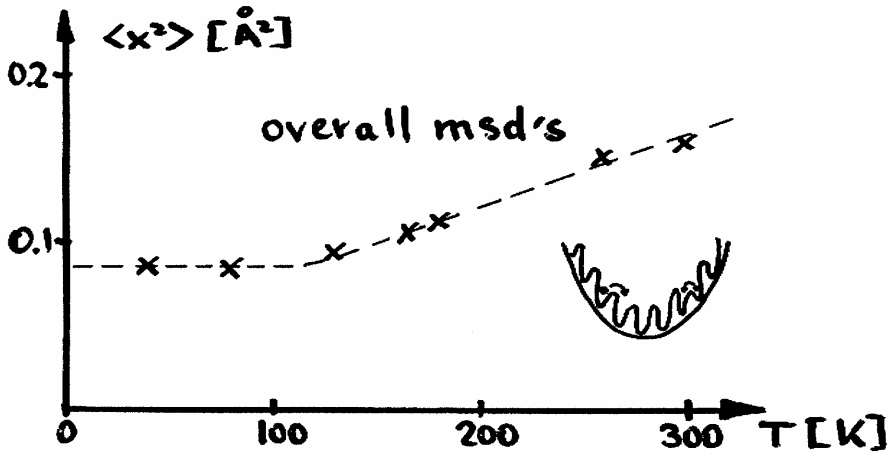


Abb. 31: Mittlere quadratische Auslenkung der Myoglobinrückgratatome in Abhängigkeit von der Temperatur.

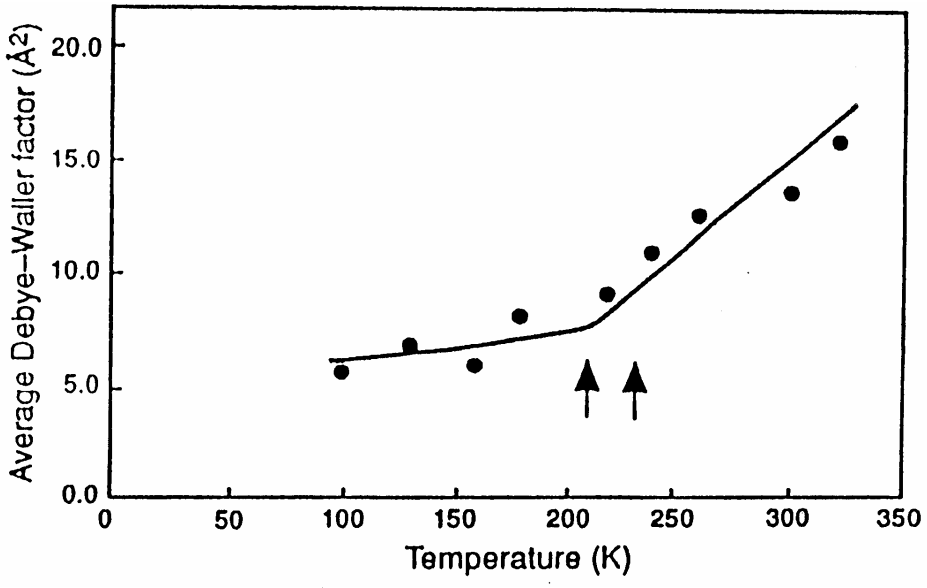


Abb. 32: Gemittelter Temperaturfaktor $(8\pi^2 <x^2>)$ **aller Nicht-Wasserstoffatome der Ribonuklease der Rinderpankreas in Abhängigkeit von der Temperatur.**

Die durchgezogene Kurve deutet darauf hin, dass zwei Gebiete existieren. Bei tiefen Temperaturen hat man temperaturunabhängige Auslenkungen. Oberhalb einer Übergangstemperatur steigen die Auslenkungen mit der Temperatur an. Aus den Daten in Abb. 31 und Abb. 32 ist diese Temperatur nicht genau zu ermitteln. Sie liegt, wie man aus neueren Arbeiten weiß, bei etwa 180 K.

Mößbauerspektroskopie

R. L. Mößbauer entdeckte 1957 den nach ihm benannten Mößbauereffekt. Dieser Effekt beruht auf der rückstoßfreien Emission und Resonanzabsorption von γ-Quanten. Befindet sich das betrachtete Atom in einem Atomverband kondensierter Materie, so kann der Rückstoß des γ-Quants von dem gesamten Atomverband aufgenommen werden. Aufgrund dessen großer Masse ist damit praktisch keine Energieübertragung verbunden. Der Mößbauereffekt ist aber nicht auf Atome in einem Festkörperkristall beschränkt. Er kann auch an Proteinproben und sogar an viskosen Lösungen beobachtet werden. Aus Mößbauerspektren können Informationen über die elektronische Struktur in der Nähe der Kerne und die mittlere quadratische Auslenkung der Kerne gewonnen werden.

^{57}Fe γ-Strahlung

Die am häufigsten verwendete Mößbauerquelle ist das ^{57}Fe, das aus dem radioaktiven Nuklid ^{57}Co ensteht. Da einige wichtige Biomoleküle (Myoglobin, Hämoglobin) Eisen enthalten, können diese mit der Mößbauerspektroskopie gut untersucht werden. Das Zerfallsschema ist in Abb. 1 aufgezeigt.

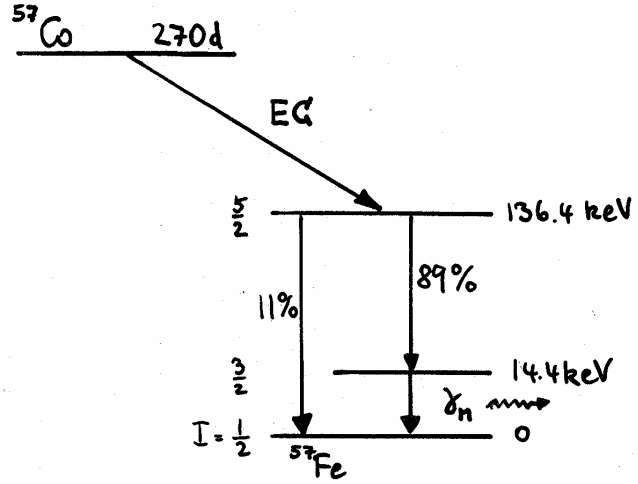


Abb. 1: Zerfallsschema von ^{57}Co in ^{57}Fe.

Der ^{57}Co-Kern verwandelt sich mit einer Halbwertszeit von 270 Tagen durch Elektroneneinfang in den 136.4 keV-Zustand des ^{57}Fe, der nach einer Halbwertszeit von 8.5 ns zu 89% unter Aussendung eines 122 keV-Quants in das 14.4 keV-Mößbauerniveau übergeht. In den anderen 11% der Fälle sendet er ein 136.4 keV-Quant aus und geht direkt in den Grundzustand. Der Übergang vom Mößbauerniveau in den Grundzustand erfolgt zu ungefähr 90% strahlungslos, d.h. bei 10% der Kerne wird ein 14.4 keV Photon emittiert, das für die Mößbauerexperimente verwendet werden kann. Aus dessen Energie kann die Wellenlänge zu λ = 0.86 Å ermittelt werden. Mit der mittleren Lebensdauer des Mößbauerübergangs von τ_N = 141 ns erhält man für die Linienbreite der emittierten Photonen Γ

$$\Gamma = \Delta E_\gamma = \hbar / \tau_N = \hbar \ln 2 / t_{1/2} = 5 \cdot 10^{-9}\,\mathrm{eV}\,.$$

Hier ist $t_{1/2} = \tau_N = \ln 2$ die Halbwertszeit des Übergangs. Dies bedeutet, dass eine extrem monochromatische Strahlung vorliegt ($\Delta E / E = 3 \cdot 10^{-13}$).

Klassisches Bild der Mößbauerstrahlung

Die Aussendung der Mößbauerstrahlung kann klassisch als eine in der Zeit gedämpfte Welle betrachtet werden (Abb. 2).

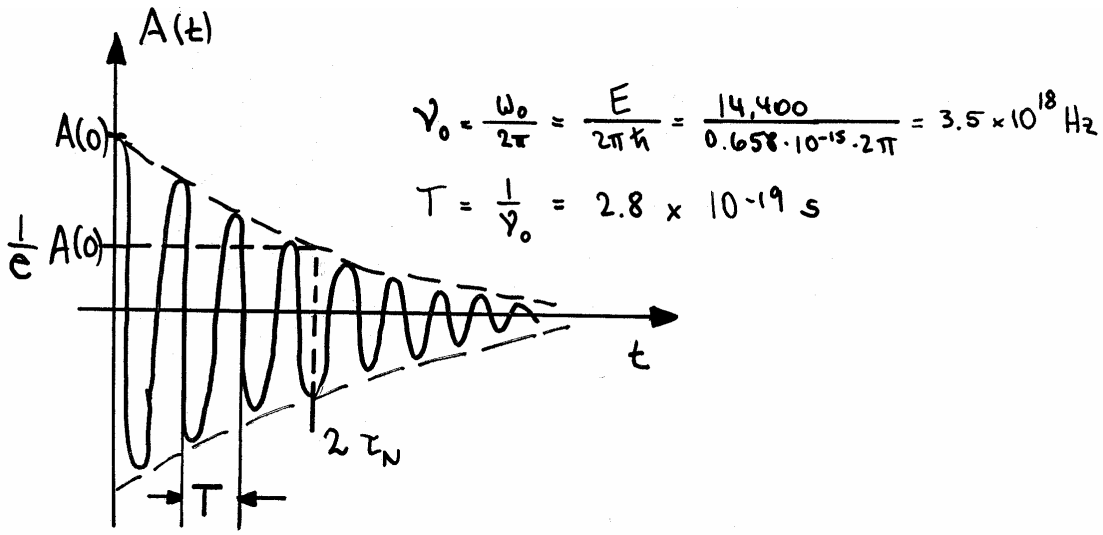


Abb. 2: Gedämpfte Welle als klassisches Bild der Photonemission.

Man beachte, dass die 1/e-Abnahme des elektromagnetischen Feldes *A(t)* bei einer Zeit von $t = 2\tau_N$ auftritt, da τ_N die mittlere Zerfallszeit der Teilchen ($\sim|A|^2$) beschreibt. Bei der Position x_0 ergibt sich

$$A(t, x_0) = A_0 e^{-i\omega_0 t} e^{-t/2\tau_N} .$$

Abb. 3 stellt die gedämpfte Welle für einen festen Zeitpunkt als Funktion des Ortes dar.

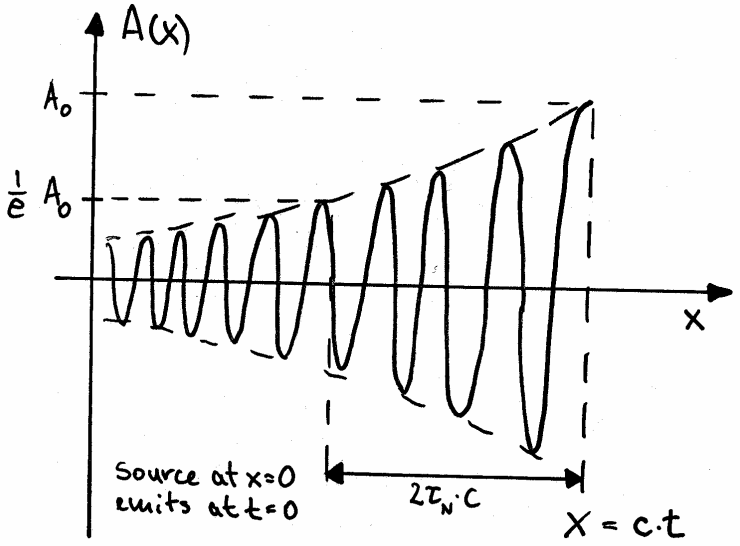


Abb. 3: Ortsabhängige Darstellung der gedämpften Welle.

Die 1/e-Abnahme des elektromagnetischen Feldes,

$$A(t,x) = A_0 e^{-i\omega_0 t} e^{ikx} e^{-t/2\tau_N},$$

erfolgt nach einer Strecke von $2\tau_N c = 2 \cdot 141\,\text{ns} \cdot 3 \cdot 10^8\,\text{m/s} = 84.6\,\text{m}$. Mittels Fouriertransformation erhält man daraus eine Lorentzlinie (Abb. 4) in der Energiedomäne.

Abb. 4: Eine Exponentialfunktion in der Zeit entspricht einer Lorentzkurve in der Energie.

Der Mößbauereffekt

Der prinzipielle Messaufbau zur Messung des Mößbauereffekts ist in Abb. 5 dargestellt.

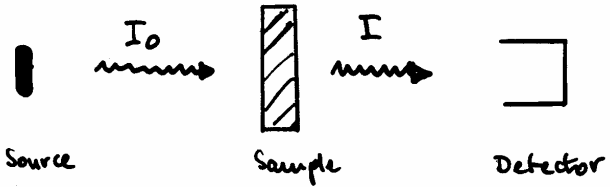


Abb. 5: Mößbauereffekt: Prinzipieller Messaufbau.

Damit Resonanzabsorption auftritt, müssen die Energiedifferenzen zwischen dem γ-Quant, das von der radioaktiven Quelle ausgesandt wird, und dem Mößbauerübergang im Absorber (Probe) kleiner als die Linienbreite des Photons sein. Aufgrund des Rückstoßes bei der Emission des γ-Quants wird die Energie des γ-Quants um

$$E_r = \frac{p_\gamma^2}{2M_n} = \frac{E_\gamma^2}{2M_n c^2} \approx 2\,\text{meV} \quad (\text{für } {}^{57}\text{Fe})$$

erniedrigt, wobei p_γ der Impuls und M_n die Kernmasse ist. Ein entsprechender Effekt tritt bei der Absorption auf, da aus Impulserhaltungsgründen ein Teil der Energie in kinetische Energie des absorbierenden Kerns verwandelt wird (Abb. 6).

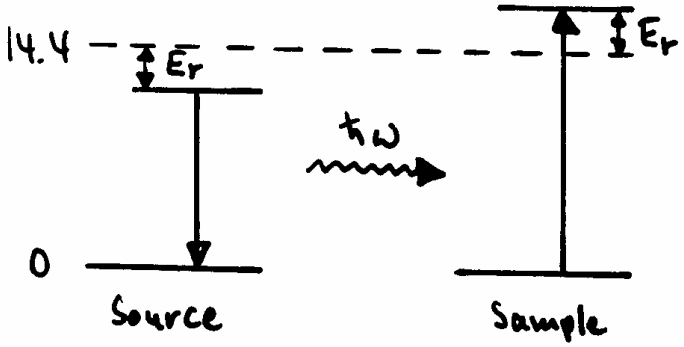


Abb. 6: Energieniveaus unter Berücksichtigung des Rückstoßes.

Da die Rückstoßenergie sehr viel größer als die Linienbreite ist, $2E_r >> \Gamma$, wurde zunächst keine Resonanzabsorption erwartet. Man versuchte anfangs, die Emissions- und Absorptionslinien bei Gasen künstlich durch Erwärmung zu verbreitern und somit einen Überlapp der Linien zu erreichen. Eine andere Möglichkeit, die Rückstoßenergie zu kompensieren, stellte die Verwendung einer Ultrazentrifuge dar, bei der die radioaktive Quelle am Rand einer schnell rotierenden Scheibe befestigt wurde. Hierdurch konnte eine gezielte Dopplergeschwindigkeit der Emissionslinie erreicht werden. Mit dieser Methode konnten maximale Umfangsgeschwindigkeiten von bis zu 1000 m/s erzielt werden. Die Größe des Resonanzeffekts blieb aber unter 1%.
R. L. Mößbauer entdeckte bei seinen Arbeiten mit einer Festkörperquelle, dass die Resonanzabsorption bei Abkühlen der Quelle auf Stickstofftemperatur zunahm. Der Grund für diese Zunahme ist folgender: Wenn ein fester Körper als Ganzes seinen Quantenzustand bei der Emission nicht ändert, also keine Phononen erzeugt oder vernichtet werden, erfolgt die Emission rückstoßfrei (ohne Energieverschiebung); $M \rightarrow \infty$, $p_\gamma^2/2M \rightarrow 0$. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Prozess ist umgekehrt proportional zur mittleren Besetzungszahl der Phononen und nimmt somit mit fallender Temperatur zu. Das bedeutet, dass die Kerne in der Quelle und im Absorber nicht frei, sondern an viele andere Atome gekoppelt sind. Für eine unendlich große Masse ist die Rückstoßenergie Null, und daher ist Resonanzabsorption möglich.

Lamb-Mößbauer Faktor

In kondensierter Materie sind, wie oben dargestellt, die Kerne mit vielen anderen Kernen gekoppelt. Deshalb wird ein Teil *f* der γ-Quanten ohne Rückstoß emittiert (absorbiert). Der durchschnittliche Energieverlust, gemittelt über alle Emissions- und Absorptionsprozesse, ist aber derselbe wie für freie Kerne. Dazu soll folgendes einfache, klassische Modell betrachtet werden, wobei das elektromagnetische Feld des betrachteten γ-Quants mit

$$A(t) = A_0 e^{i\omega_0 t}$$

beschrieben wird. Die thermischen Schwingungen des Absorbers führen zu einer Dopplermodulation der Welle im Ruhesystem des Absorbers,

$$\omega(t) = \omega_0\left(1 + v(t)/c\right).$$

Somit folgt für *A*

$$A(t) = A_0 e^{i\int_0^t \omega(t')dt'} = A_0 e^{i\omega_0 t} e^{i\omega_0 x(t)/c}$$

wobei *x(t)* die Auslenkung des Kerns von der Mittellage beschreibt. Im Einsteinmodell des Festkörpers ist nur eine Mode mit der Schwingungsfrequenz Ω vorhanden,

$$x(t) = x_0 \sin\Omega t .$$

Somit folgt

$$A(t) = A_0 e^{i\omega_0 t} e^{ik(x_0 \sin\Omega t)}.$$

Mit Hilfe der Entwicklung nach Besselfunktionen J_n (Jakobi-Anger Formel) erhält man

$$A(t) = A_0 e^{i\omega_0 t} \sum_{-\infty}^{\infty} J_n\left(kx_0\right) e^{in\Omega t}.$$

Es treten neben dem Peak der rückstoßfrei absorbierten γ-Quanten noch Seitenbänder bei Energieabständen von $\Delta E = h\Omega$ auf (Abb.7) (1,2,3...-Phononenanregung). Diese Energieabstände sind im Bereich von 1 meV, d.h., sie sind sehr viel größer als die natürliche Linienbreite (~5 neV).

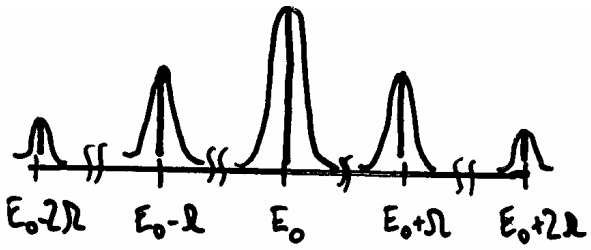


Abb. 7: Schematische Dartellung der rückstoßfreien Linie bei E_0 und der Seitenbänder.

Der rückstoßfreie Anteil beträgt dann

$$f = \left|A_{n=0}\right|^2 = J_0{}^2(kx_0).$$

Bei einem realistischeren Modell des Festkörpers liegen viele Schwingungsmoden vor,

$$x(t) = \sum_i x_i \sin\Omega_i t\,.$$

Daraus folgt

$$A(t) = A_0 e^{iw_0 t} e^{ik\sum x_i \sin\Omega_i t}$$

$$= A_0 e^{iw_0 t} \prod_i \sum_{n=-\infty}^{\infty} J_n(k x_i) e^{in\Omega_i t}.$$

Der rückstoßfreie Anteil beträgt dann

$$f = \prod_i J_0^2(kx_i) \approx \prod_i \left[1 - \frac{1}{4}(kx_i)^2\right]^2,$$

da $k x_i << 1$. Weiterhin folgt

$$\ln f = \sum_i \ln\left[1 - \frac{1}{4}(kx_i)^2\right]^2$$

$$= 2\sum_i -\frac{1}{4}(kx_i)^2\,.$$

Mit Einführung der mittleren quadratischen Auslenkung $< x^2 > = < x(t)^2 > = \frac{1}{2}\sum x_i^2$ erhält man schließlich den Lamb-Mößbauerfaktor,

$$f = e^{-k^2 < x^2 >}.$$

Man kann somit die mittlere quadratische Auslenkung aus dem Lamb-Mößbauerfaktor berechnen. Da die Zerfallszeit des Mößbauerübergangs ungefähr 100 ns beträgt, tragen nur schnelle Bewegungen der Kerne (<100 ns) zur Minderung des rückstoßfreien Anteils bei.

Mößbauerabsorptionsspektroskopie

Der prinzipielle Aufbau zur Messung von Mößbauerabsorptionsspektren ist in Abb. 8 zu sehen.

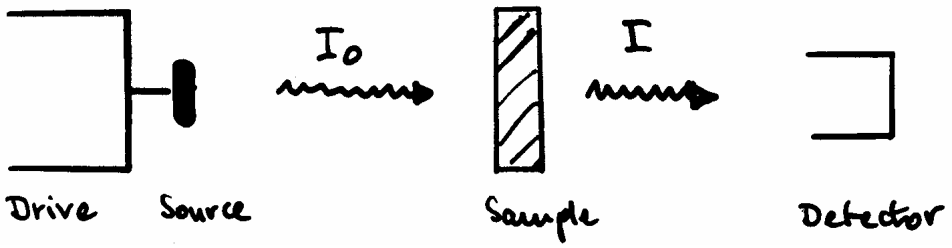


Abb. 8: Schematischer Aufbau zur Messung von Mößbauerspektren.

Die radioaktive Quelle (oder der Absorber) wird meist mit einem elektromagnetischen Antrieb (Lautsprecherprinzip) relativ zum Absorber (Quelle) mit der Geschwindigkeit *v* bewegt. Wegen des linearen Dopplereffekts wird dadurch die Energie der γ-Quanten verändert,

$$E \rightarrow E_0\left(1+\frac{v}{c}\right).$$

Die Geschwindigkeit wird dabei in der Regel periodisch moduliert (z.B. Dreiecksform, Sägezahnform oder Sinusform). Der Detektor registriert die transmittierte Intensität *I*. Für eine spektral δ-förmige Intensität ergibt sich

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\mu x} = e^{-\sigma_a(E) n_{Fe}}.$$

Man erhält ein Mößbauerspektrum (Abb. 9) indem man die transmittierten Photonen als Funktion der Geschwindigkeit der Quelle relativ zum Absorber detektiert, wobei die Normierung auf die transmittierte Intensität bei sehr hohen Geschwindigkeiten, *I* (∞), erfolgt,

$$T(v) = \frac{I(\infty) - I(v)}{I(\infty)}.$$

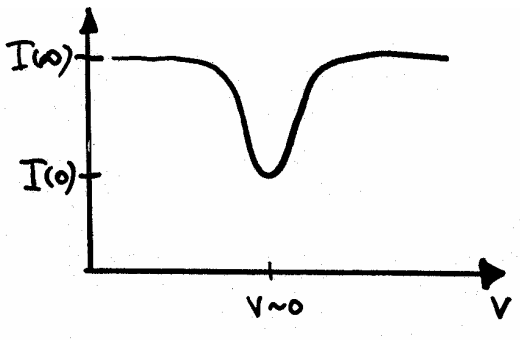


Abb. 9: Schema eines Mößbauerspektrums.

Die transmittierte Intensität kann mit Hilfe des folgenden Transmissionsintegrals als Faltung des Emissionsspektrums der Quelle *Q(E)* mit dem Absorptionsspektrum der Probe berechnet werden,

$$T(v) = const. \int Q(E,v) e^{-\sigma_a(E) n_{Fe}} dE ,$$

wobei $Q(E,v)$ die von der Quelle emittierte Lorentzlinie mit geschwindigkeitsabhängiger Peakposition $E = E_s(1+v/c)$ und Breite Γ_s, normiert auf die Fläche f_s ist.

$$Q(E,v) = \frac{\Gamma_s / 2\pi}{\left[E - E_s\left(1+\frac{v}{c}\right)\right]^2 + \left(\frac{\Gamma_s}{2}\right)^2} f_s ,$$

$$\sigma_a(E) = \frac{\Gamma_a / 2\pi}{\left[E - E_a\right]^2 + \left(\frac{\Gamma_a}{2}\right)^2} f_a\left(\frac{\pi \Gamma_0}{2}\right)\sigma_0 .$$

Hier ist σ_a der Streuquerschnitt des Absorbers, Γ_0 die natürliche Linienbreite eines ^{57}Fe-Kerns, und Γ_s und Γ_a sind die Linienbreiten der Quelle und des Absorbers. Diese sind verbreitert aufgrund der verschiedenen chemischen Umgebungen. E_a ist die chemische Verschiebung des Absorbers aufgrund der Hyperfeinwechselwirkung und E_s die künstlich erzeugte Verschiebung aufgrund des Dopplereffektes. Außerdem sind

$$f_s = e^{-k^2 \langle x_s^2 \rangle} \qquad f_a = e^{-k^2 \langle x_a^2 \rangle}$$

die Lamb-Mößbauer-Faktoren von Quelle und Absorber. Das Mößbauerexperiment wird üblicherweise mit einer gering absorbierenden Probe durchgeführt, so dass näherungsweise

$$e^{-x} \approx 1 - x .$$

Dann ergibt sich

$$T(v) = 1 - f_s f_a n_{Fe} \sigma_0 \left(\frac{\pi \Gamma_0}{2}\right) \frac{\Gamma / 2\pi}{\left[E_a - E_s\left(1+\frac{v}{c}\right)\right]^2 + \left(\Gamma / 2\right)^2} ,$$

mit

$$\Gamma = \Gamma_a + \Gamma_s .$$

Dieses Ergebnis ist graphisch in Abb. 10 dargestellt.

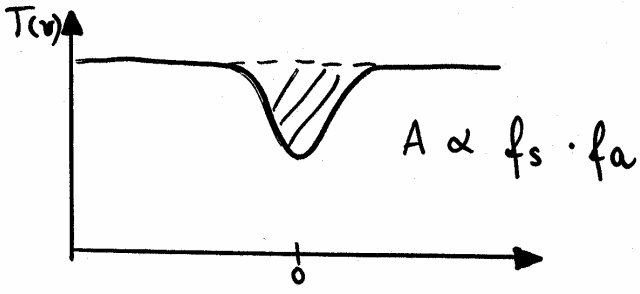


Abb. 10: Schematische Darstellung des Transmissionsintegrals.

Die gemessene Linienbreite setzt sich in der Näherung für dünne Absorber als Summe der Linienbreiten der Quelle und des Absorbers zusammen. Die Fläche des Mößbauerspektrums (siehe Abb. 10) ist proportional zu $f_s\, f_a$. Zur Bestimmung der mittleren quadratischen Auslenkung der Absorberkerne in Abhängigkeit von der Zeit wird die Temperatur der Quelle

konstant gehalten und die des Absorbers variiert. Zur Normierung der Fläche werden die Messungen zur Temperatur 0 K extrapoliert ($f_a = 1$).

Proteindynamik

Die Mößbauerspektren erlauben es, die Auslenkung der Kerne in Proteinen zu bestimmen, und damit die Dynamik von Proteinen zu untersuchen. Abb. 11 zeigt Messungen an einem Deoxymyoglobinkristall bei $T = 269$ K und $T = 150$ K.

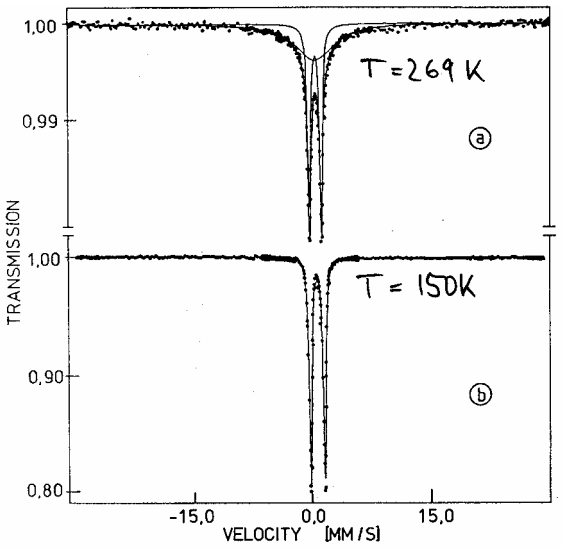


Abb. 11: Mößbauerspektren an einem Deoxymyoglobinkristall bei zwei verschiedenen Temperaturen.

Der Doppelpeak im Spektrum des Myoglobins wird durch die Wechselwirkung des elektrischen Feldgradienten mit dem nuklearen Quadrupolmoment verursacht (siehe unten). Die Abbildung zeigt, dass die Fläche A bei höherer Temperatur aufgrund der größeren Auslenkungen der Kerne stark abnimmt. Außerdem ist eine Verbreiterung des Spektrums bei der höheren Temperatur zu beobachten, die aufgrund langsamer, diffusiver Bewegungen im Zeitbereich $t \leq 1 - 100$ ns zustande kommt (Quasielastische Linien, überdämpfte Moden). Die aus der Fläche der schmalen Linien – sie beinhaltet wiederum nur Bewegungen schneller als ungefähr 100 ns – erhaltene mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle^{\gamma}_{Fe}$ der Eisenkerne ist in Abb. 12 als Funktion der Temperatur aufgetragen.

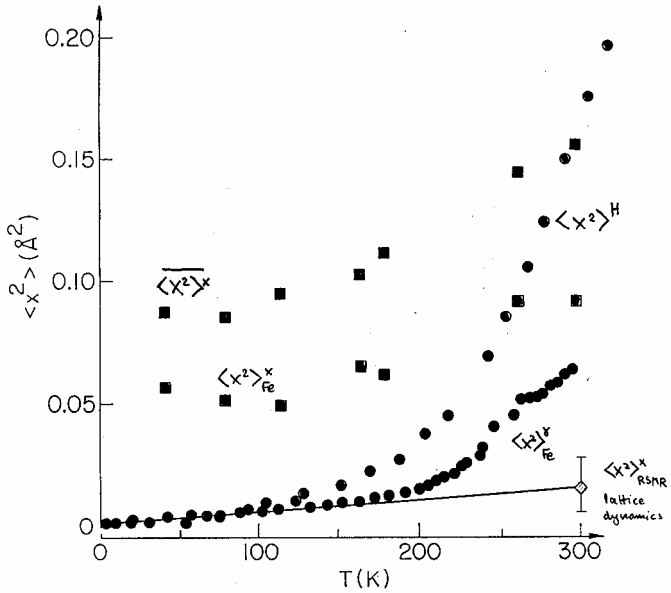


Abb. 12: Mittlere quadratische Auslenkung der Atome des Myoglobins ins Abhängigkeit von der Temperatur.

Bei niedrigen Temperaturen sind die Konformationssubzustände eingefroren. Die mittlere quadratische Auslenkung nimmt linear mit der Temperatur zu, wie es für ein harmonisches Potential zu erwarten ist. Für höhere Temperaturen als etwa 200 K ist die Zunahme sehr viel stärker, da schnelle Fluktuationen (t < 100 ns) zwischen den Konformationssubzuständen thermisch angeregt werden. Die Messung mit inkohärenter Neutronenstreuung $\langle x^2 \rangle^H$ liefert hauptsächlich Aussagen über die Dynamik der Wasserstoffatome. Diese Methode erlaubt Messungen von Bewegungen im Pikosekundenbereich. Die Auslenkung für hohe Temperaturen ist größer als bei den Mößbauermessungen am Eisen, da Wasserstoff leichter als Eisen ist, und da sich viele Wasserstoffatome an der Oberfläche der Proteine befinden. Sie sind dort weniger stark durch Nachbarn in ihrer Bewegung behindert als das Eisen im Inneren des Myoglobins. Ebenfalls eingezeichnet sind Daten, die aus Röntgenstrukturmessungen erhalten wurden. Zu sehen ist die mittlere quadratische Auslenkung für alle Nicht-Wasserstoffatome, $\langle x^2 \rangle^x$, und das Hämeisen, $\langle x^2 \rangle^x_{Fe}$. Beide Datenreihen zeigen für alle Temperaturen zum Teil beträchtlich größere Werte für die mittlere quadratische Auslenkung im Vergleich zu den Mößbauermessungen aufgrund der Konformationsheterogenität. Bei Zimmertemperatur fluktuieren die Proteine schnell zwischen den Konformationssubzuständen. Wird die Temperatur erniedrigt, so sind diese Fluktuationen mehr und mehr auf die Subzustände beschränkt, die sich nahe des Energieminimums befinden. Daher wird die örtliche Verteilung der besetzten Zustände verringert. Da aber viele Zustände mit ähnlichen Energien vorhanden sind, bleibt auch bei tiefen Temperaturen eine relativ große Verteilung übrig.

Rayleighstreuung von Mößbauerstrahlung (RSMR)

Der Mößbaueffekt kann auch in Streuexperimenten verwendet werden. Die RSMR-Methode stellt im Wesentlichen ein Röntgenstreuexperiment unter Verwendung einer Mößbauer γ-Quelle dar. Mit diesem Verfahren lässt sich der Anteil der elastisch bzw. inelastisch gestreuten γ-Quanten bestimmen. Die inelastische Streuung wird durch die thermische Bewegung der Atome verursacht. Abb. 13 zeigt den prinzipiellen Aufbau.

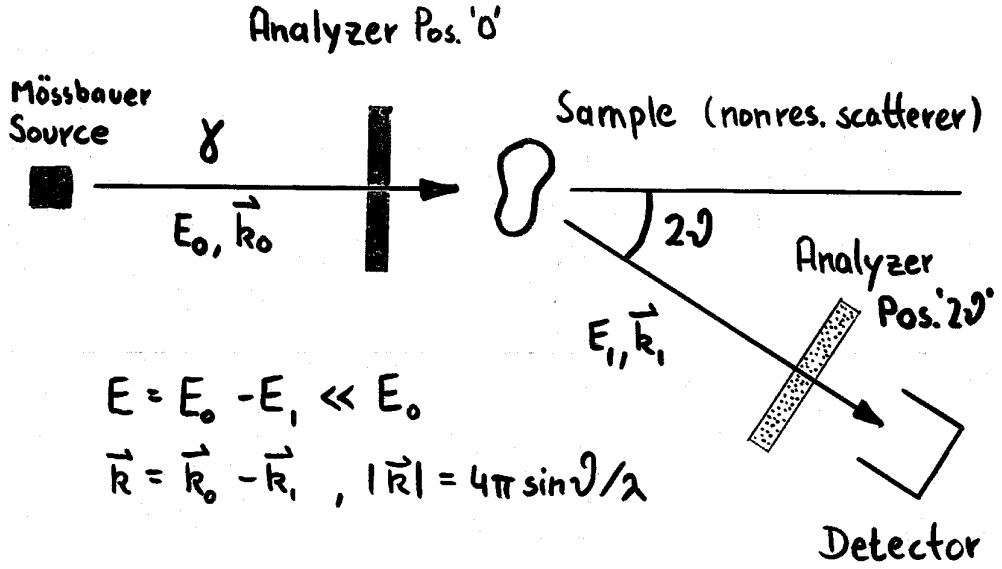


Abb. 13: Experimenteller Aufbau zur Messung der Rayleighstreuung von Mößbauerstrahlung.

Eine Mößbauerquelle, deren Energie aufgrund des Dopplereffekts verändert werden kann, dient als Photonenquelle. Die γ-Quanten werden an einer Probe, die keine Mößbaueratome enthält, gestreut und unter dem Streuwinkel 2ϑ detektiert. Nun wird ein Analysator, der Mößbaueratome enthält, in einem Experiment vor der Probe (Analysatorposition '0') und im anderen Experiment hinter der Probe (Analysatorposition '2ϑ') eingebracht. In beiden Analysatorpositionen wird ein Mößbauerspektrum durch Veränderung der Geschwindigkeit des Quellenantriebs durchgeführt. Befindet sich der Analysator in Position '0', so erhält man die Gesamtintensität der gestreuten Photonen; es wird im Prinzip ein normales Mößbauerspektrum aufgenommen. Die Mößbauerphotonen werden dabei vor der Detektion an der Probe gestreut, um eine Referenzmessung zu erhalten. Wird die Analysatorposition '2ϑ' verwendet, so werden aufgrund der geringen Linienbreite der Mößbauerquanten nur die elastisch gestreuten Photonen gemessen. Der Energieaustausch bei der Streuung kann also durch das Einbringen eines resonanten Absorbers in den gestreuten Strahl untersucht werden, da nur die Photonen, die keinen (oder nur einen sehr kleinen) Energieaustausch bei der Streuung erfahren haben, im Analysator resonant absorbiert werden können. Somit kann aus dem Verhältnis beider Messungen der Anteil der inelastisch gestreuten Photonen ermittelt werden.
Die RSMR-Methode erfordert lange Messzeiten, da selbst extrem starke Quellen bedeutend weniger Quanten in einem kollimierten Anregungsstrahl liefern als Röntgenröhren. Die Messzeit kann verringert werden, falls nicht das gesamte Mößbauerspektrum, sondern nur jeweils zwei Messpunkte pro Spektrum aufgenommen werden. Die eine Messung wird bei einer sehr hohen Quellenantriebsgeschwindigkeit (Index '∞') und die andere in Resonanz (Index 'res') aufgenommen (Zweigeschwindigkeitsmessung, Abb. 14).

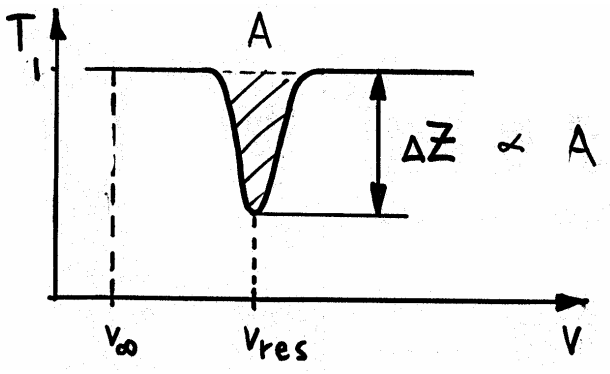


Abb. 14: Schematische Darstellung der Zweigeschwindigkeitsmessung.

Für die Gesamtstreuung gilt dann (Analysatorstellung ´0´)

$$\sigma_{total} \propto \Delta Z(0) = Z_{\infty}(0) - Z_{res}(0)\,.$$

Entsprechend ergibt sich für die elastische Streuung

$$\sigma_{elast} \propto \Delta Z(2\vartheta) = Z_{\infty}(2\vartheta) - Z_{res}(2\vartheta)$$

und schließlich für die inelastische Streuung

$$\sigma_{inelast} \propto \Delta Z(0) - \Delta Z(2\vartheta).$$

Abb.15 zeigt das Ergebnis einer Messung der Streuintensität in Abhängigkeit vom Streuwinkel an einem Kristallreflex von Myoglobin. Die gesamte Streuintensität (durchgezogene Linie) und die inelastisch gestreute Intensität (schraffierter Bereich) ist für den Braggreflex (16,2,1) zu sehen.

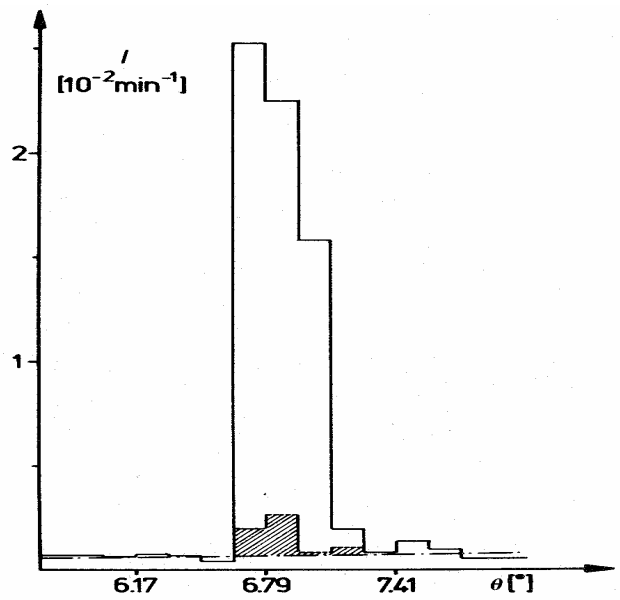


Abb.15: (16,2,1)-Braggreflex von Myoglobin: Gesamte Streuintensität (durchgezogene Linie) und inelastisch gestreute Intensität (schraffierte Fläche).

Aus diesen Messungen erhält man mittels

$$f^R = \frac{I_{elast.}}{I_{total}} = e^{-k^2\langle x_{lc}^2\rangle}$$

die mittlere quadratische Auslenkung der langwelligen Gitterschwingungen $\langle x_{lc}{}^2\rangle$, die die proteinspezifischen Moden nicht enthält. Dies kann auch in Abb. 12 gesehen werden. Die mit der RSMR-Methode bestimmte mittlere quadratische Auslenkung stimmt mit der Extrapolation des linearen Verhaltens bei kleinen Temperaturen überein. Der Unterschied zwischen der Mößbauerabsorption und -streuung zeigt, dass die dominierenden thermischen Bewegungen molekularen und nicht gitterdynamischen Ursprungs sind.

Hyperfeinwechselwirkung

Die Wechselwirkung des Kerns mit elektrischen oder magnetischen Feldern wird Hyperfeinwechselwirkung genannt. Die in Frage kommenden Felder werden im Festkörper von den Elektronen und Atomrümpfen in der Umgebung des Kerns hervorgerufen. Es sind aber auch externe Felder, wie das Magnetfeld eines Elektromagneten, zu betrachten. Die Kerneigenschaften werden wie folgt beschrieben:

Größe	$< r^2 > = \int dV r^2 \rho(r)$
Magnetisches Moment	$\vec{\mu} = g\mu_0 \vec{I} / \hbar$
Elektrisches Quadrupolmoment	$Q = \int dV\, Z\rho(\vec{r})(3z^2 - r^2)$,

wobei $\rho(r)$ die Kernladungsverteilung, g der sogenannte dimensionslose g-Faktor, μ_0 das Kernmagneton, I der Kernspin und Z die Kernladungszahl ist. Folgende Größen der Umgebung beeinflussen den Kern: die Elektronendichte am Kernort

$$q\rho_e(0) = -e|\psi(0)|^2,$$

das magnetische Feld $\vec{B}$ und der elektrische Feldgradient

$$V_{ij} = \frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial x_j}.$$

Dies führt zu den unten aufgeführten Wechselwirkungen: der elektrische Monopolterm beschreibt die elektrostatische Wechselwirkung des Kerns mit den Elektronen am Kernort

$$H_M = \frac{2\pi}{5} Ze^2 < r^2 > |\psi(0)|^2.$$

Aus der Tatsache, dass der Kern nicht punktförmig ist, sondern eine gewisse Ausdehnung hat, resultiert eine Verschiebung des Energieniveaus von der Energie, die man für eine reine Coulomb-Wechselwirkung berechnet (Abb. 16).

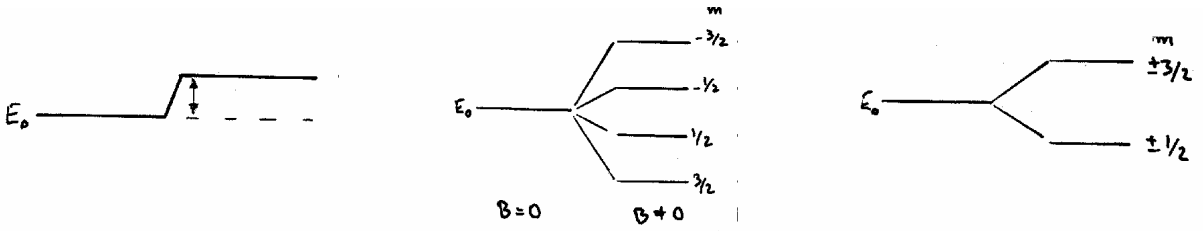


Abb. 16: Energieniveauverschiebung bzw. –aufspaltung aufgrund der elektrischen Monopol- (links), magnetischen Dipol- (Mitte) und elektrischen Quadrupolwechselwirkung (rechts).

Die magnetische Dipolwechselwirkung verursacht eine äquidistante Aufspaltung des Kernniveaus (Kern-Zeeman-Effekt). Sie führt daher zu unterschiedlichen Energien der emittierten γ-Quanten (siehe Abb. 16). Da magnetische Monopole nicht existieren, und die elektrische Dipolwechselwirkung aufgrund des Verschwindens des quantenmechanischen Erwartungswerts des elektrischen Kerndipolmoments ebenfalls Null ist, muss nur noch die elektrische Quadrupolwechselwirkung berücksichtigt werden. Diese tritt in Erscheinung, wenn ein nicht-sphärischer Kern (I > 0.5) mit einem elektrischen Feldgradienten wechselwirkt. Er führt zur Aufhebung der Energieentartung bezüglich der m-Unterzustände (Abb. 16). Die Wechselwirkungsenergien sind

$$H_Q = \frac{1}{4} eV_{ZZ} Q \frac{3m^2 - I(I+1)}{I(2I-1)}.$$

Die von diesen Wechselwirkungen verursachten Auswirkungen auf Mößbauerspektren sind in Abb. 17 zusammengefaßt.

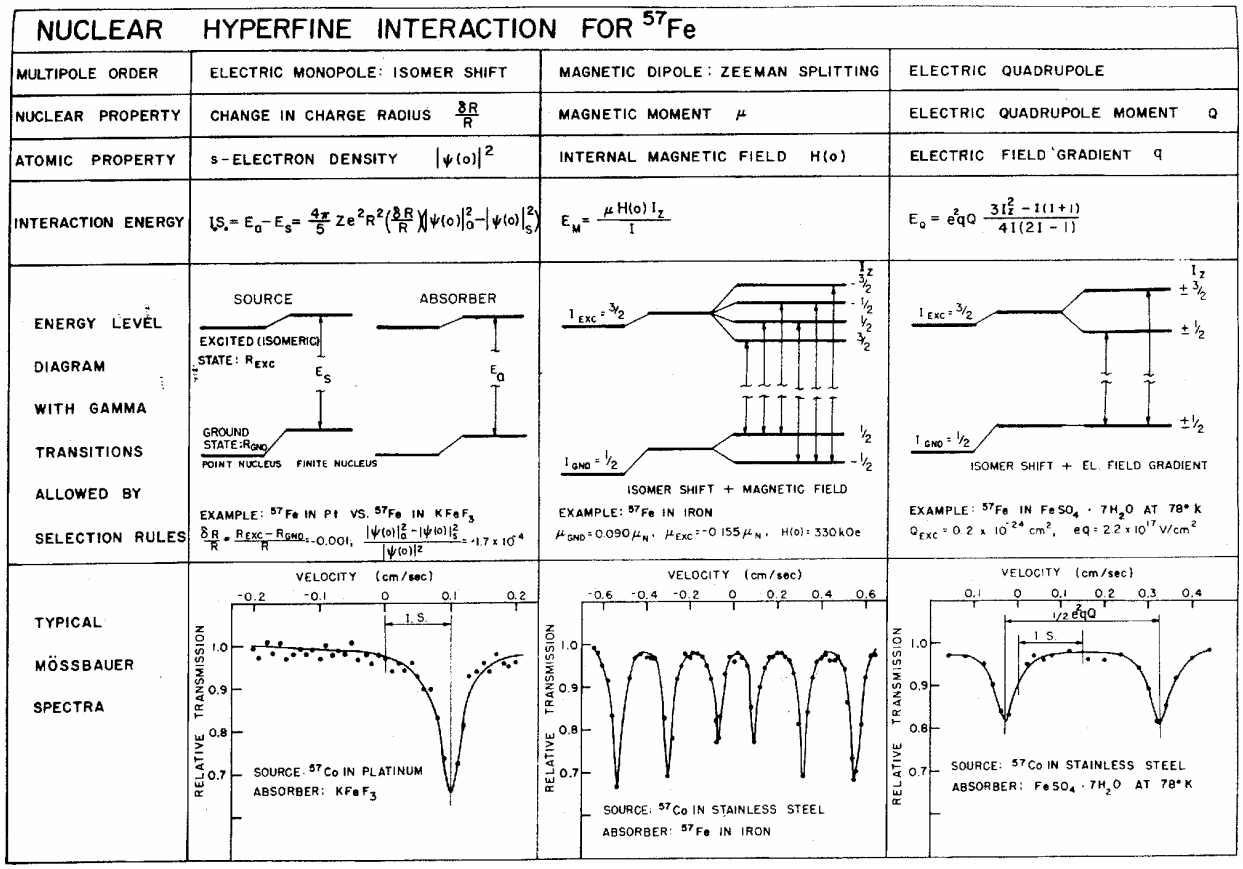


Abb. 17: Hyperfeinwechselwirkung für ^{57}Fe.

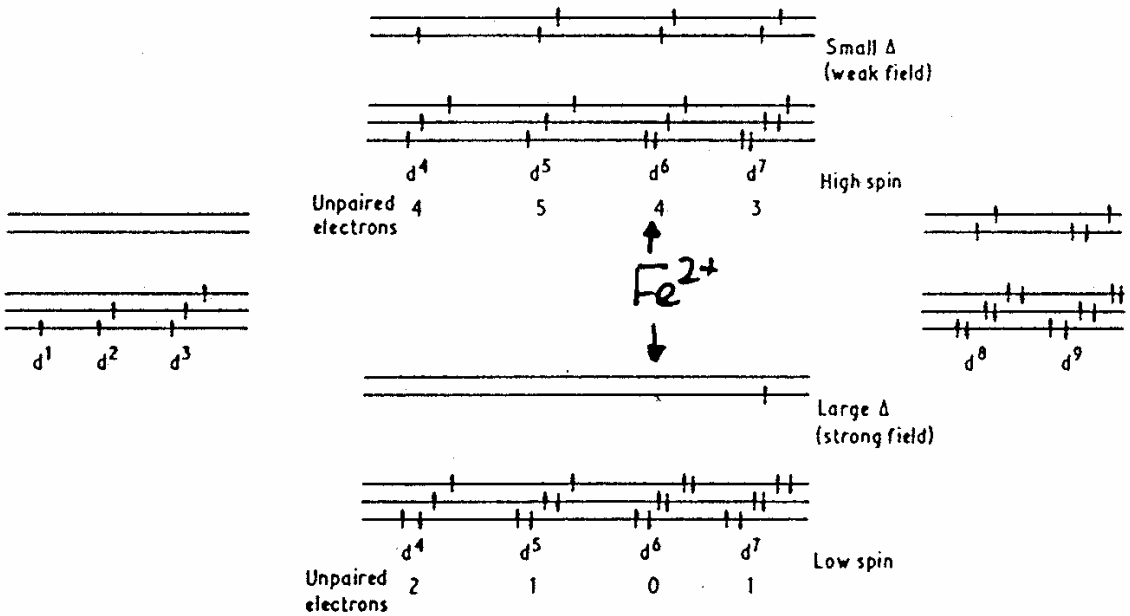
Der elektrische Monopol bewirkt, wie oben dargestellt, eine Verschiebung des Energieniveaus des Kernzustands. Bei einem Mößbauerexperiment muss sowohl die Quelle als auch der Absorber beachtet werden. Haben sie unterschiedliche Kernradien und unterschiedliche Elektronendichten am Kernort, so hat dies die sogenannte **Isomerieverschiebung** δ zur Folge (in Abb. 17 mit I.S. bezeichnet). Es gilt

$$\delta = C\frac{\delta R}{R}\left(|\psi_A(0)|^2 - |\psi_s(0)|^2\right).$$

Hier ist $\delta R = R_e - R_g$ (R_e,R_g) sind die Kernradien des angeregten Zustands bzw. des Grundzustands). Die äquidistante Aufspaltung des Kernniveaus für ^{57}Fe aufgrund der magnetischen Dipolwechselwirkung ist ebenfalls in Abb. 17 zu sehen. Die erlaubten sechs Übergänge (Auswahlregeln m = 0, ± 1) können mit dem Mößbauerexperiment gemessen werden. Die elektrische Quadrupolwechselwirkung schließlich führt durch die Aufspaltung des angeregten Niveaus des ^{57}Fe zu zwei Übergängen (Abb. 17), die schon in den oben gezeigten Mößbauerspektren von Myoglobin gesehen werden konnten (Abb. 11). Zu beachten ist, dass die besprochenen Effekte zusammen auftreten können.

Die Verwendung des Mößbauereffekts zur Untersuchung elektronischer Eigenschaften von Metallionen in Biomolekülen wird im Folgenden am Beispiel des Hämoglobins illustriert. Im Eisenporphyrinkomplex ist das Hämeisen von vier Pyrrolstickstoffen des Porphyrins in einer Ebene komplexiert, ein fünfter Stickstoffligand wird vom 'proximalen' Histidin bereitgestellt. Die sechste Koordination steht zur Bindung des Sauerstoffs bereit. In dieser oktaedrischen Geometrie sind die d-Orbitale nicht wie beim Wasserstoffatom entartet, sondern spalten in drei niedrig liegende (entartete) Niveaus d_{xy}, d_{xz}, d_{yz}, und zwei höher liegende entartete Niveaus $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} auf.

Im Rahmen der Kristallfeldtheorie kann man diesen Befund mit der verstärkten Abstoßung der entlang der Oktaederachsen liegenden Orbitale $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} durch die Ligandenelektronen verstehen. Die Kristallfeldaufspaltung Δ hängt von den Liganden ab. Ist sie klein, bevorzugen die d-Elektronen des Eisens den Zustand mit höchstem Spin (Hund'sche Regel), da dieser die Elektron-Elektron-Abstoßung minimiert. Sie besetzen dann jedes Orbital wenigstens einfach. Ist Δ aber groß, werden die tiefliegenden Orbitale d_{xy}, d_{xz}, d_{yz} bevorzugt doppelt besetzt. Das Fe^{2+}-Ion des Hämoglobins hat sechs d-Elektronen. Abb. 18 zeigt die Besetzung der Orbitale im 'high-spin' und 'low-spin' Zustand.
Betrachten wir das Mößbauerspektrum von HbO_2 bei 4.2 K in Abb. 19, so sehen wir ein Dublett aufgrund einer vorhandenen Quadrupolaufspaltung. Es liegt also ein elektrischer Feldgradient vor. Bei Anlegen eines starken magnetischen Feldes sehen wir eine schwache Linienverbreiterung aufgrund der Wechselwirkung des Kernmomentes mit dem äußeren Feld. Wenn es in HbO_2 elektronische Bahnmomente und Spinmomente gäbe, würden diese ans Feld koppeln. Damit würde das lokale B-Feld am Kernort verändert und es sollten stärkere Veränderungen im Spektrum bei Anlegen eines Feldes auftreten. Es ist also aus der B-Feldabhängigkeit zu schließen, dass die elektronische Konfiguration d_6 low-spin ist, die S = 0 und L = 0 hat. Das tiefliegende Triplet hat bei Halb- oder Vollbesetzung kein Bahnmoment, ebenso wie das hochliegende Dublett.
Im Falle des deoxy-Hb ist die Magnetfeldabhängigkeit enorm (Abb. 19). Aus einem schmalen Dublett entsteht ein extrem verbreitertes Spektrum. Hier kann man zeigen, dass die Elektronenkonfiguration d_6 high-spin (S = 2) ist. Das schmale Spektrum ohne Feld ist zunächst bemerkenswert, da das Elektronensystem ja einen Drehimpuls hat, der je nach Einstellung ein verschiedenes B-Feld am Kernort erzeugt und damit zu unterschiedlichen Energieverschiebungen führt. Allerdings fluktuieren die Elektronen selbst bei 4.2 K so schnell durch die verschiedenen Einstellungen, dass es während der Kohärenzzeit der Strahlung (100 ns) zu einer Ausmittelung kommt. Dieser Vorgang wird Relaxation genannt. Bei Anlegen des Feldes kommt es zu verschiedensten Kopplungen des elektronischen Drehimpulses mit dem äußeren Feld, da die Probe ungeordnet ist. Das Resultat ist eine starke Variation des B-Feldes am



Kernort, woraus sich die starke Verbreiterung des Spektrums erklärt.

Abb. 18: Besetzung der d-Orbitale unter Einwirkung eines oktahedralen Feldes. Für das Fe^{2+} gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten (high spin; low spin) je nach Stärke des Feldes.

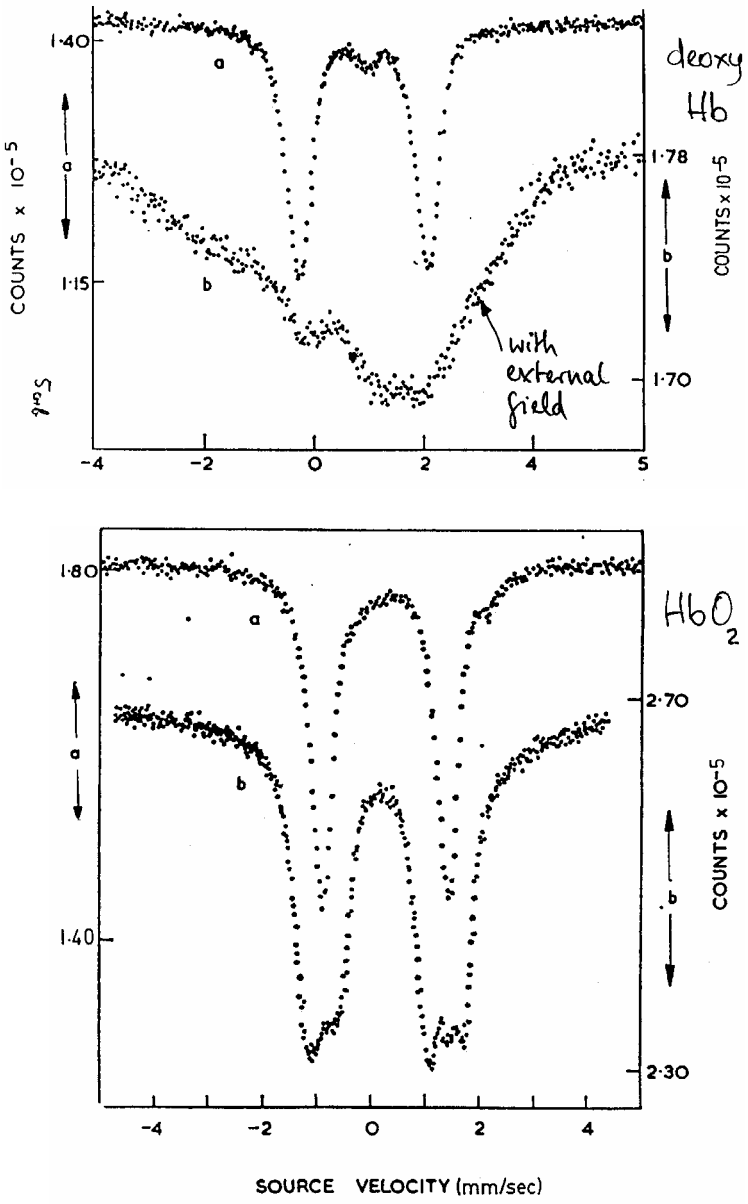


Abb. 19: Mößbauerspektren von Deoxy- (obere Abb.) und Oxyhämoglobin (untere Abb.) bei 4.2 K ohne (oberes Spektrum) und mit (unteres Spektrum) magnetischem Feld.

Neben der experimentellen Bestimmung der Proteindynamik wird selbstverständlich auch versucht, sie theoretisch im Computer zu modellieren. Zur Beschreibung der Dynamik wird eine einfache Potentialfunktion angenommen, die z.B. wie folgt gewählt wird:

$$V = \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} k_\phi \left(1 + \cos(n\phi + \delta)\right)$$

$$+ \sum_{i,j} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{6} \right] + \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r_{ij}} .$$

Der erste Term beschreibt den Einfluss der Bindungslänge *b*, der zweite und dritte Term das Potential, das durch Änderung der Bindungswinkel θ und ϕ zustande kommt. Die van-der-Waals-Wechselwirkung wird in obiger Gleichung mit einem 12-6-Lennard-Jones-Potential ausgedrückt, und schließlich wird die langreichweitige Coulombwechselwirkung berücksichtigt (Abb. 20).

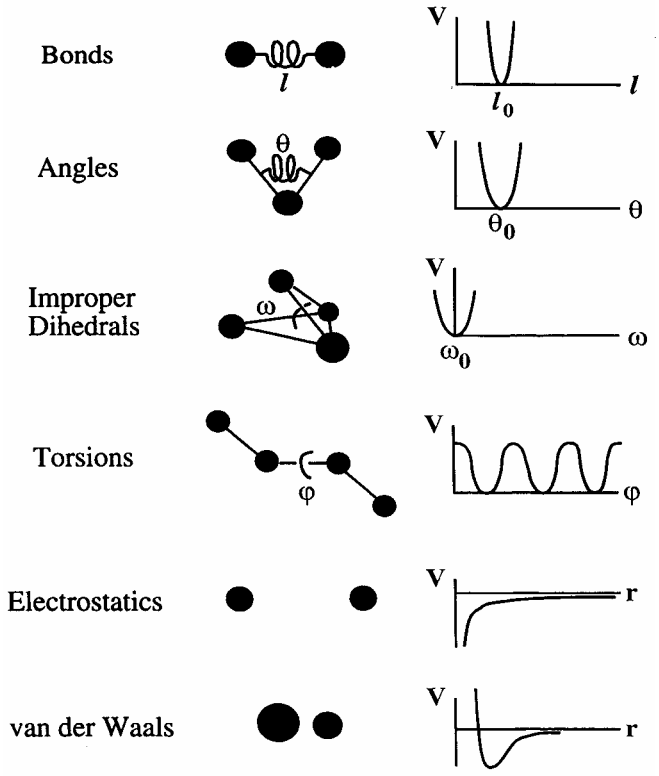


Abb. 20: Empirische potentielle Energien.

Die bei den einzelnen Termen auftretenden Parameter werden aus Messungen an kleinen Molekülen bestimmt. Die ersten beiden Terme beschreiben stark bindende Wechselwirkungen; sie sind stärker als die anderen Wechselwirkungen.
Zur Berechnung der Trajektorien $\vec{r}(t)$ der Atome können molekulardynamische Simulationen oder die Normalmodenanalyse verwendet werden. Generell muss beachtet werden, dass es aufgrund der vielen lokalen Minima der Energielandschaft nicht möglich ist, das globale Minimum zu finden.

Molekulardynamische Simulationen

Bei dieser Methode wird die klassische Trajektorie eines Systems aus *N* Atomen in einem 3*N*-dimensionalen Konfigurationsraum berechnet. Es wird ein mikrokanonisches Ensemble angenommen (*E, V* konstant, kein Austausch von Energie und Materie mit der Umgebung). Die Entropie *S* berechnet sich mit

$$S = k \ln W ,$$

wobei *k* die Boltzmannkonstante und *W* die thermodynamische Wahrscheinlichkeit des betrachteten Zustandes ist. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Atome v_i werden mit

$$\frac{3}{2} N\, kT = \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{2} m_i v_i^2$$

unter Annahme einer Maxwellschen Geschwindigkeitsverteilung bei der Temperatur *T* zufällig ausgewählt. Die Trajektorien der Atome erhält man dann mit

$$\dot{\vec{r}}_i = \frac{\vec{p}_i}{m} ,$$

$$\dot{\vec{p}}_i = \vec{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i} .$$

Abb. 21 zeigt ein Schema des für die Simulationen verwendeten Algorithmus.

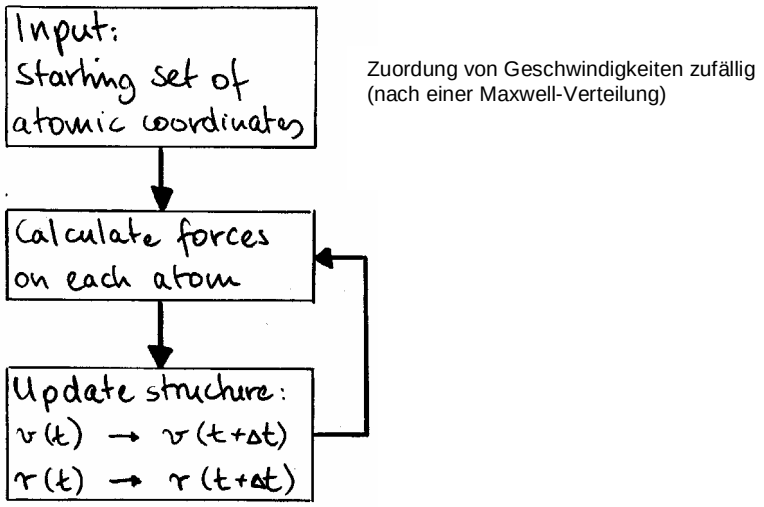


Abb. 21: Schema zur Berechnung der Trajektorien mit Hilfe der molekulardynamischen Simulationen.

Die Zeitentwicklung kann z.B. mit einer Taylorentwicklung

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \dot{\vec{r}}(t)\Delta t + \ddot{\vec{r}}(t)\frac{\Delta t^2}{2} .....$$

oder mit dem Verlet-Algorithmus berechnet werden,

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \dot{\vec{r}}(t)\Delta t + \ddot{\vec{r}}(t)\frac{\Delta t^2}{2} + ...$$

$$\vec{r}(t - \Delta t) = \vec{r}(t) - \dot{\vec{r}}(t)\Delta t + \ddot{\vec{r}}(t)\frac{\Delta t^2}{2} - .....$$

Addition der beiden Gleichungen ergibt:

$$\vec{r}(t+\Delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t-\Delta t) + \ddot{\vec{r}}(t)\Delta t^2 \,.$$

Der zweite Algorithmus ist genauer, da er die Beschleunigung in der Mitte des betrachteten Intervalls berechnet. Um die höheren Terme der Entwicklungen vernachlässigen zu können, ist eine genügend kleine Zeitschrittweite nötig ($\Delta t \leq 10^{-15}$ s). Die Qualität des Algorithmus kann durch die Berechnung der Gesamtenergie abgeschätzt werden.
Problematisch bei den molekulardynamischen Simulationen ist, dass sie sehr rechenintensiv sind. Es lassen sich für mittelgroße Proteine nur Zeiten bis ungefähr 1 ns berechnen. Langsame Konformationsumwandlungen können also nicht berechnet werden. Besonders zeitaufwendig ist die Berücksichtigung der langreichweitigen Coulombwechselwirkungen. Außerdem ist es schwierig, die Lösungsmittelumgebung des betrachteten Moleküls zu behandeln.

Normalmodenanalyse

Bei der Normalmodenanalyse wird ein harmonisches Potential für die Berechnung der Atombewegungen angenommen, d.h., die betrachteten Atome befinden sich in der Nähe eines Energieminimums. Sowohl die Anharmonizität dieser Energiesenke als auch alle anderen Energieminima der komplexen Energielandschaft werden vernachlässigt. Trotz dieser Näherung liefert diese Methode wichtige Informationen zur Dynamik von Biomolekülen. Sie kann z. B. für die Interpretation von Spektren der inelastischen Neutronenstreuung eingesetzt werden. Diese misst Bewegungen in einem Zeitbereich von Pikosekunden. Während dieser Zeit ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich die Atome innerhalb eines einzelnen Energieminimums aufhalten. Für einen eindimensionalen harmonischen Oszillator gilt für die potentielle und kinetische Energie (Abb. 22),

$$E_p = \frac{k\,x^2}{2}, \quad E_k = \frac{m\,\dot{x}^2}{2}.$$

Die Schwingungsdifferentialgleichung ist

$$m\ddot{x} + kx = 0 \text{ mit } \omega^2 = \frac{k}{m}.$$

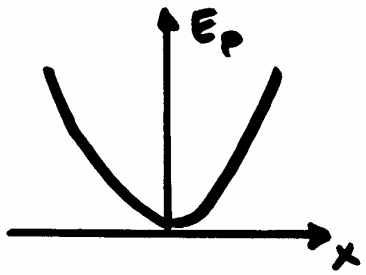


Abb. 22: Harmonisches Potential.

Für die Beschreibung von gekoppelten Oszillationen mit *n* Freiheitsgraden erhält man in harmonischer Näherung

$$E_p = \frac{1}{2}\sum_{i,j}^{n} f_{ij}\,\Delta q_i\,\Delta q_j = \frac{1}{2}\boldsymbol{\Delta q}^{\boldsymbol{T}}\,\boldsymbol{F}\,\boldsymbol{\Delta q}\ ,$$

$$E_k = \frac{1}{2}\sum_{i,j}^{n} h_{ij}\,\Delta\dot{q}_i\,\Delta\dot{q}_j = \frac{1}{2}\Delta\dot{\boldsymbol{q}}^{\boldsymbol{T}}\,\boldsymbol{H}\,\Delta\dot{\boldsymbol{q}}\ ,$$

wobei q_i, $\dot{q}$ die verallgemeinerten Orts- und Geschwindigkeitskoordinaten und f_{ij}, h_{ij} die verallgemeinerten Kräfte und Massen darstellen. Mit Hilfe des Lagrange-Formalismus

$$L = E_k - E_p; \qquad \frac{d}{dt}\left(\frac{\partial L}{\partial \Delta\dot{q}_i}\right) = \frac{\partial L}{\partial \Delta q_i}$$

folgt

$$\sum_{j=1}^{n} h_{ij}\,\Delta\ddot{q}_j + \sum_{j=1}^{n} f_{ij}\,\Delta q_j = 0\,.$$

Dies kann mit Hilfe von Matrizen und Vektoren wie folgt dargestellt werden:

$$\boldsymbol{H}\,\Delta\ddot{\boldsymbol{q}} + \boldsymbol{F}\,\Delta\boldsymbol{q} = 0.$$

Zur Lösung dieser Differentialgleichung wird $\boldsymbol{\Delta q}$ als Linearkombination der kollektiven Variablen $\boldsymbol{\Delta Q}$ ausgedrückt

$$\Delta\boldsymbol{q} = \boldsymbol{V}\cdot\Delta\boldsymbol{Q},$$

wobei $\boldsymbol{V}$ eine symmetrische Matrix ist. Mit der folgenden Transformation,

$$\boldsymbol{H} \rightarrow \boldsymbol{V}^{\boldsymbol{T}}\,\boldsymbol{H}\boldsymbol{V} = \boldsymbol{I},$$

$$\boldsymbol{F} \rightarrow \boldsymbol{V}^{\boldsymbol{T}}\,\boldsymbol{F}\boldsymbol{V} = \boldsymbol{\Omega}.$$

Hier ist $\boldsymbol{I}$ eine Einheitsmatrix und $\boldsymbol{\Omega}$ eine positiv definite Matrix, die auf der Diagonale die Quadrate der Frequenzen ω_i^2 enthält.

$$\Delta\ddot{Q}_i + \omega_i^2\,\Delta Q_i = 0\,,$$

d.h., das System kann nun mittels Normalmoden beschrieben werden. Jede Normalmode beinhaltet die kollektive Beschreibung aller Atome (globale Mode). Diese schwingen mit der entsprechenden Normalmodenfrequenz. Die potentielle und kinetische Energie berechnen sich dann mit

$$E_k = \frac{1}{2}\sum_i \Delta\dot{Q}_i^2\,,$$

$$E_p = \frac{1}{2}\sum_i \omega_i^2\,\Delta Q_i^2\ .$$

Verschiedene Biomoleküle wurden mit der Normalmodenanalyse beschrieben. Beispiele sind Lysozym, Crambin, Ribonuclease, Myoglobin und BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor). Abb. 23 zeigt die Ergebnisse, die für BPTI berechnet wurden. In der oberen Darstellung sind die Auslenkungen einer (niedrigfrequenten) Mode, in der unteren die gemittelten Auslenkungen der Atome zu sehen.

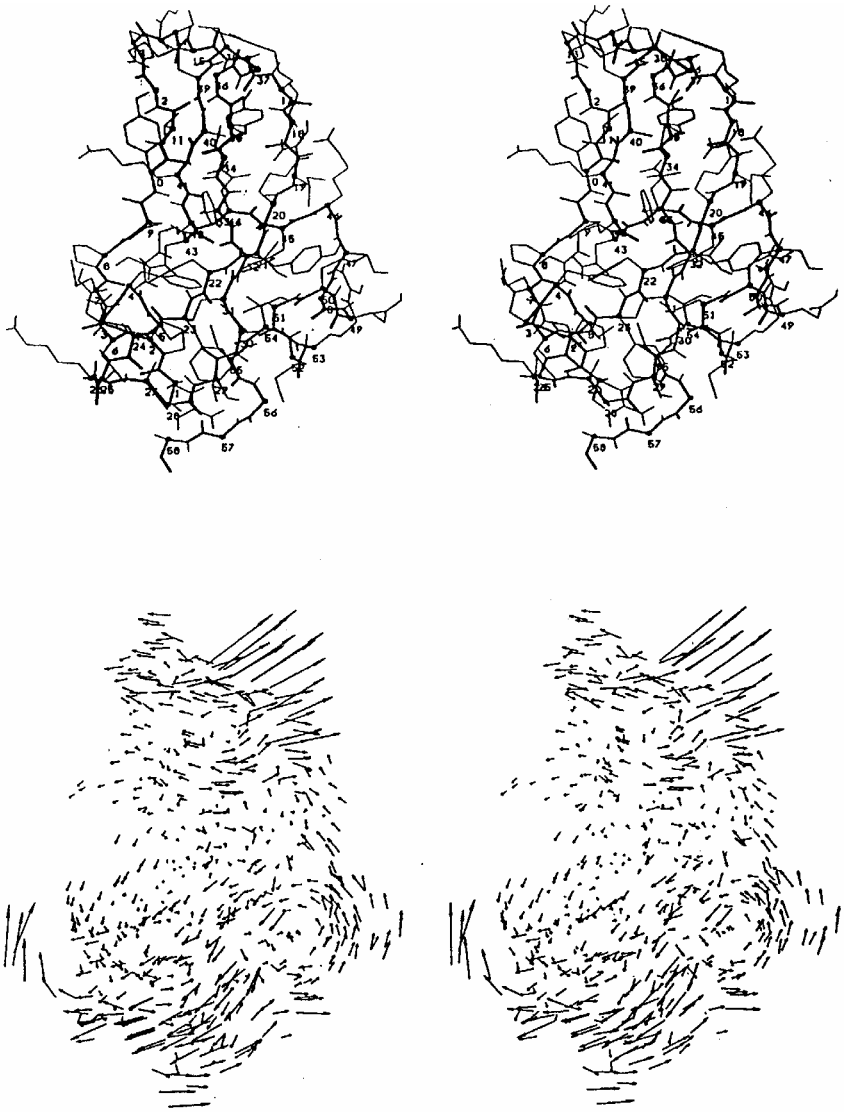


Abb. 23: Stereoskopische Darstellung der Atomauslenkungen einer niedrigfrequenten Normalschwingung (6.9 cm^{-1}) von BPTI, berechnet mit der Normalmodenanalyse. Oben: Struktur für die Analyse. Unten: Die Wurzel der mittleren quadratischen Auslenkung der Atome ist durch Vektoren (mit Faktor 20 multipliziert) dargestellt (berechnet bei Zimmertemperatur).

Allgemein gilt klassisch (für $\hbar\omega << kT$)

$$m\omega^2\langle x^2\rangle = kT \ ,$$

so dass niederfrequente (hochfrequente) Normalschwingungen große (kleine) Auslenkungen haben. Aus der Normalmodenanalyse von Lysozym folgt, dass ein Anteil von 80 % der mittleren quadratischen Auslenkung von einer relativ kleinen Anzahl von Moden mit Frequenzen kleiner als 30 cm^{-1} herrühren. Es handelt sich dabei um delokalisierte globale Moden (vgl. Abb. 23). Weitere Berechnungen ergaben, dass β-Faltblätter Schwingungen mit Frequenzen im Bereich von 60 cm^{-1} und α-Helices im Bereich von 100–180 cm^{-1} haben. Lokalisierte Moden (O–H, C=O etc.) haben höhere Frequenzen (typischerweise 1000–3500 cm^{-1}). Aus dieser Analyse ergibt sich somit, dass Proteine aus relativ rigiden Sekundärstrukturen bestehen, die von weicheren Teilen zusammengehalten werden.

Inelastische Neutronenstreuung und Normalmodenanalyse

Dynamische Prozesse in Biomolekülen laufen über viele Größenordnungen in der Zeit ab, von Femtosekunden bis über die Sekunde hinaus. Um diesen großen Zeitbereich experimentell erfassen zu können, müssen verschiedene komplementäre Methoden angewandt werden. Bewegungen im Bereich einer Pikosekunde machen einen besonders wichtigen Beitrag zu den internen Fluktuationen der Atome um deren mittlere Position aus. Die Frequenzen, die bei diesen Bewegungen auftreten (1 – 100 cm^{-1}), können theoretisch mit der Normalmodenanalyse und experimentell mit inelastischer Neutronenstreuung untersucht werden. Es zeigt sich, dass Bewegungen mit kleinen Frequenzen (< 30 cm^{-1}) die Atomfluktuationen dominieren. Es können Schwingungsmoden auftreten, die große Amplituden haben und sich oft über das ganze Molekül erstrecken. Die inelastische Neutronenstreuung an Proteinen wird von der Streuung an Wasserstoffkernen dominiert, da der inkohärente Streuquerschnitt des Wasserstoffkerns 40 mal größer ist als der aller anderen Kerne und 50 % der Atome Wasserstoffatome sind.
In den vorhergehenden Kapiteln wurden die experimentellen Methoden der Röntgenbeugung und der Mößbauerspektroskopie behandelt. Die Verschiebungen der Atome von der Ideallage im Kristall werden bei der Röntgenbeugung durch den Debye-Waller-Faktor charakterisiert

$$T(\theta) = e^{\frac{-k^2 < x^2 >}{2}},$$

der statische und dynamische Abweichungen (Fehlordnungen, Fluktuationen, Vibrationen) umfasst. Bei der Mößbauerspektroskopie wird der Lamb-Mößbauer-Faktor verwendet, welcher nur dynamische Prozesse beschreibt

$$f = e^{-k_0^2 < x^2 >}.$$

Auf die Neutronenkristallographie zur Aufklärung der Struktur von Biomolekülen wurde schon in einem früheren Kapitel eingegangen. Bei der inelastischen Streuung kommt es zu einem Energieübertrag auf die Probe. Die Messung dieser Energieüberträge erlaubt via Fouriertransformation Rückschlüsse auf die Dynamik der Biomoleküle. Abb. 1 zeigt den Wellenvektor des Impulsübertrags $\vec{q}$ auf die Probe, der durch das einfallende und gestreute Neutron (mit Wellenvektoren $\vec{k}_i$ und $\vec{k}_f$) und dem Streuwinkel θ gegeben ist.

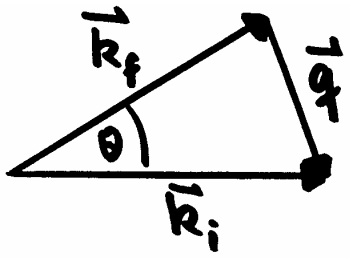


Abb. 1: Vektordiagramm für die Neutronenstreuung.

Für den Impuls $\vec{p}$ und die Energie *E* des Neutrons gilt

$$\vec{p} = \hbar \vec{k} \qquad |\vec{p}| = \frac{2\pi \hbar}{\lambda_n},$$

$$E = \hbar^2 k^2 / 2m_n .$$

Hier ist λ_n die Wellenlänge und m_n die Masse des Neutrons. Bei der inelastischen Streuung ergibt sich ein Impulstransfer

$$\hbar\vec{q} = \hbar\vec{k}_i - \hbar\vec{k}_f$$

und ein Energietransfer zur Streuprobe

$$\hbar\omega = \frac{\hbar^2}{2m_n}\left|\left(|k_i|^2 - |k_f|^2\right)\right| \quad .$$

Daraus folgt für das Betragsquadrat von q

$$|q|^2 = 2|k_i|^2 - \frac{2m_n\omega}{\hbar} - 2|k_i|\sqrt{|k_i|^2 - \frac{2m_n\omega}{\hbar}}\cos\theta \quad . \qquad \textbf{Gleichung 1}$$

Die Gleichung für $|q(\theta)|$ ist komplizierter als bei der elastischen Streuung. Abb. 2 stellt die Abhängigkeit von |q| von ω für bestimmte Streuwinkel für ein einfallendes Neutron mit einer Wellenlänge von 5.1 Å dar.

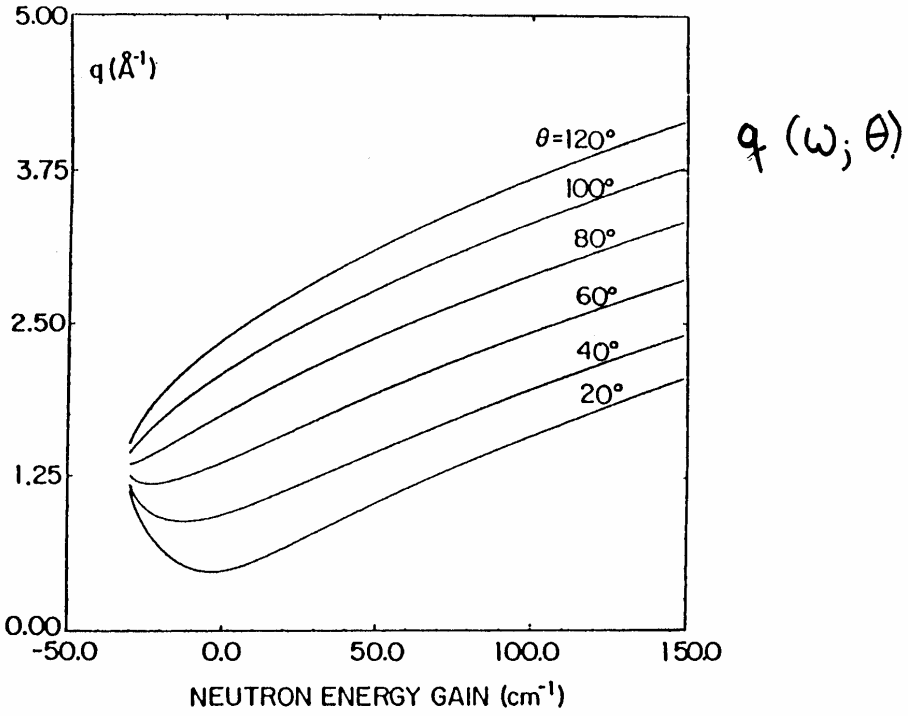


Abb. 2: Abhängigkeit von |*q*| von ω für verschiedene Streuwinkel und für ein einfallendes Neutron mit 5.1 Å Wellenlänge.

Aus dem Diagramm kann entnommen werden, dass nur q-Werte bis zu einem maximalen Energieverlust des Neutrons von ungefähr 30 cm^{-1} auftreten, da dies der Energie des einfallenden Neutrons ($\lambda = 5.1$ Å) entspricht.

Abb. 3 zeigt in doppelt logarithmischer Auftragung die *q*,ω-Bereiche, die mit den verschiedenen Spektrometern am Institut Laue-Langevin in Grenoble verfügbar sind. Ein spektraler Bereich von ungefähr sieben Größenordnungen kann untersucht werden.

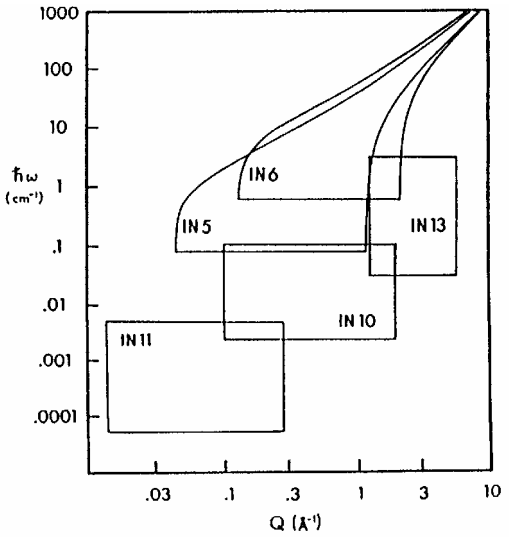


Abb. 3: q,ω-Bereiche, die von inelastischen Streuexperimenten an Biomolekülen am Institut Laue-Langevin abgedeckt werden (IN5 und IN6: Flugzeitmessungen, IN10 und IN13 (Rückstreuexperimente), IN11 (Spinechoexperimente).

Zur Messung der inelastischen Neutronenstreuung muss zum einen ein Neutronenstrahl mit wohldefinierten Werten von Impuls und Energie präpariert werden. Zum anderen muss die Intensität der gestreuten Neutronen in Abhängigkeit von dem Streuwinkel (Impulstransfer) und der Energie der gestreuten Neutronen gemessen werden. Der Betrag des Streuvektors kann dann mit Gleichung 1 berechnet werden. Diese Messungen können beispielsweise mit dem Dreiachsenspektrometer durchgeführt werden, bei dem nicht nur die Probe, sondern auch der Monochromatorkristall, der Impuls und Energie der einfallenden Neutronen bestimmt, und der Analysatorkristall, der Impuls und Energie der gestreuten Neutronen misst, gedreht werden.
Eine andere Methode basiert auf der Messung der Flugzeit der gestreuten Neutronen (**Flugzeitspektroskopie**). Über die Flugzeit kann die Geschwindigkeit und die Energie der Neutronen bestimmt werden (siehe Abb. 4).

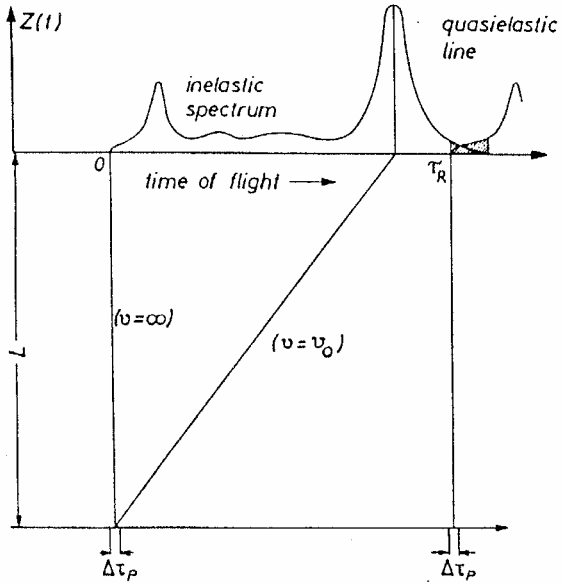


Abb. 4: Schema zur Entstehung eines Flugzeit-Spektrums Z(t). ($\Delta\tau_P$ ist die Pulslänge, τ_R das Pulswiederholungsintervall, $\upsilon = \upsilon_0$ entspricht der elastischen Streuung.) Die schraffierte Fläche stellt den Bereich des Überlapps der Spektren durch zwei aufeinanderfolgende Pulse dar.

Zur Bestimmung der Flugzeit wird der Neutronenstrahl 'gechoppt'; man erzeugt Neutronenstrahlpulse mit Zeitdauern von typischerweise 0.01 – 0.1 ms und Wiederholfrequenzen von 100 Hz. Die Neutronen, die den größten Energieübertrag erfahren haben und somit am schnellsten sind, werden zuerst detektiert (siehe Abb. 4). Entspricht die gemessene Geschwindigkeit der der eingestrahlten Neutronen, so liegt elastische Streuung vor. In der Nähe der elastischen Linien sind quasielastisch gestreute Neutronen zu sehen. Ein typisches Flugzeitspektrum ist in Abb. 5 dargestellt.

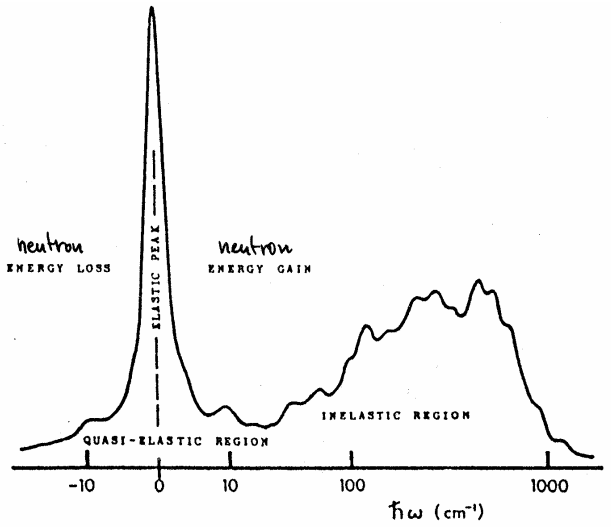


Abb. 5: Typisches Streuspektrum kalter Neutronen, das mit einem hochauflösenden Flugzeitspektrometer bei konstantem Streuwinkel gemessen wurde. (Die Intensität des elastischen Peaks wurde bei dieser Darstellung reduziert.)

Der elastische Peak ist verbreitert aufgrund quasi-elastischer Streuung, für die der Energieübertrag im Mittel Null ist ($\langle \Delta E \rangle = 0$, keine Phononen). Die Ursache dafür sind diffusive (stochastische) Bewegungen der Atome, die über den Dopplereffekt negative und positive Energieverschiebungen bewirken. Es treten z.B. intramolekulare Übergänge über Barrieren auf. Des weiteren können überdämpfte Schwingungen vorkommen. Links von der elastischen Streuung ist (im Gegensatz zu Abb. 4) der inelastische Streubereich zu sehen, bei dem das Neutron Energie abgegeben hat (Phononenemission); rechts davon hat das Neutron von der Probe Energie aufgenommen (Phononenabsorption). Die inelastische Streuung wird durch den Energieaustausch mit Schwingungsmoden der untersuchten Moleküle verursacht ($\langle \Delta E \rangle = E_{Phonon}$). Das Spektrum bricht bei ungefähr 5 kT (~1100 cm^{-1} bei Raumtemperatur) ab, da die Wahrscheinlichkeit, dass in der Probe höhere Moden angeregt sind, aufgrund des Boltzmanngesetzes gering ist.

Energie- und Zeitskalen

Mit der IR-Spektroskopie bzw. der Ramanstreuung werden energiereiche Schwingungszustände von lokalisierten Moden bestimmt. Beispiele sind OH, NH (~3500 cm^{-1}), CH (~3000 cm^{-1}) und C=0 (1700 cm^{-1}) Schwingungen. Mit der inelastischen Neutronenstreuung werden bevorzugt die niederfrequenten Moden im Bereich 1 – 100 cm^{-1} untersucht. Dies entspricht 0.03 – 3 THz bzw. 33 – 0.3 ps (Umrechnung: 1 THz = 1 ps^{-1} = 4.13 meV = 33.4 cm^{-1} = 48 K).
Die Untersuchung dieser Energiebereiche mit der IR-Spektroskopie ist aus apparativen Gründen erschwert.
Bei der Aufnahme der Schwingungsspektren stellen sich die Fragen: Welche Bewegungstypen werden angeregt, und wie sieht es mit ihrer funktionellen Relevanz aus?

Tab. 1 zeigt typische Merkmale einiger Translationen/Schwingungen in Proteinen oder Nucleinsäuren.

Tab. 1: Typische Merkmale einiger interner Bewegungen bei Proteinen oder Nukleinsäuren

Motion	Spatial extent (nm)	Amplitude (nm)	Log_{10} of characteristic time (s)
Relative vibration of bonded atoms	0.2 to 0.5	0.001 to 0.01	−14 to −13
Longitudinal motions of bases in double helices (nucleic acids)	0.5	0.01	−14 to −13
Lateral motions of bases in double helices (nucleic acids)	0.5	0.1	−13 to −12
Global stretching (nucleic acids)	1 to 30	0.03 to 0.3	−13 to −11
Global twisting (nucleic acids)	1 to 30	0.1 to 1.0	−13 to −11
Elastic vibration of globular region	1 to 2	0.005 to 0.05	−12 to −11
Sugar repuckering (nucleic acids)	0.5	0.2	−12 to −9
Rotation of sidechains at surface (protein)	0.5 to 1	0.5 to 1	−11 to −10
Torsional libration of buried groups	0.5 to 1	0.05	−11 to −9
Relative motion of different globular regions (hinge bending)	1 to 2	0.1 to 0.5	−11 to −7
Global bending (nucleic acids)	10 to 100	5 to 20	−10 to −7
Rotation of medium-sized sidechains in interior (protein)	0.5	0.5	−4 to 0
Allosteric transitions	0.5 to 4	0.1 to 0.5	−5 to 0
Local denaturation	0.5 to 1	0.5 to 1	−5 to +1

Streutheorie

Neutronen werden, falls keine magnetischen Wechselwirkungen vorliegen, nur von den Kernen der Probe gestreut. Da die Kernkräfte im Vergleich zur Wellenlänge der betrachteten Neutronen sehr kurzreichweitig sind, ist die gestreute Welle isotrop und kann mit einem Parameter, der Streulänge b, beschrieben werden. Außerdem folgt aus der Kurzreichweitigkeit der Kernkräfte, dass das Kernpotential als Deltafunktion betrachtet werden kann (Fermi-Pseudopotential). Somit erhält man für den differentiellen Streuquerschnitt

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \left\langle \sum_{i,j} b_i^{coh} b_j^{coh} e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}_i} e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}_j} + \sum_i \left(b_i^{inc}\right)^2 \right\rangle$$

$$= S_{coh}(\vec{q}) + S_{inc}(\vec{q}) \ .$$

Die kohärenten bzw inkohärenten Kernstreulängen werden mit b_i^{coh} und b_i^{inc} bezeichnet. Auch wird zwischen zwischen kohärenten und inkohärenten statischen Strukturfaktoren unterschieden. Der kohärente Anteil, der von der durchschnittlichen Streulänge der Kerne herrührt, verursacht ein Interferenzmuster, das aufgrund der Superposition der an den Kernen gestreuten Wellen zustande kommt. Der inkohärente Teil wird von der zufälligen Verteilung des nuklearen Spins (die Streulänge ist vom Spin abhängig) und von der Isotopenunordnung in der Probe verursacht. Obige Gleichung beschreibt statische Prozesse. Dynamische Prozesse können mit dem doppelt-differentiellen Streuquerschnitt beschrieben werden,

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega\, d\omega} = \frac{\left|\vec{k}_f\right|}{\left|\vec{k}_i\right|}\left(S_{coh}(\vec{q},\omega) + S_{inc}(\vec{q},\omega)\right).$$

Die dynamischen Strukturfaktoren $S_{coh}(\vec{q},\omega)$ und $S_{inc}(\vec{q},\omega)$ stellen Erweiterungen der statischen Strukturfaktoren dar, da sie neben der Impulsübertragung auch die Energieübertragung an die Probe beschreiben. Das bedeutet, dass die Messung von $S_{coh}(\vec{q},\omega)$ und $S_{inc}(\vec{q},\omega)$auch Informationen über zeitliche Aspekte des Biomoleküls beinhaltet. Die inelastische Neutronenstreuung wird, wie oben erwähnt, von der inkohärenten Streuung des Wasserstoffs dominiert. Dessen inkohärenter Streuquerschnitt beträgt 82 barn, während der kohärente Streuquerschnitt nur 1.8 barn (1 barn = 10^{-24} cm^2) beträgt.
Der quantitative Zusammenhang zwischen den dynamischen Strukturfaktoren und der molekularen Dynamik wird durch die Zeitkorrelationsfunktionen hergestellt. Dazu werden zeitabhängige Positionsvektoren eingeführt, so dass im Produkt der Streuamplituden ein Ortsvektor bei der Zeit Null und der andere bei der Zeit t betrachtet wird. Werden nun diese Produkte über das Ensemble der Trajektorien $r_i(t)$ im thermischen Gleichgewicht gemittelt, so erhält man die intermediäre, inkohärente Streufunktion

$$F_{inc}(\vec{q},t) = \sum_{n=1}^{N}\left\langle e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}_n(0)}\cdot e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}_n(t)}\right\rangle .$$

Bei der inkohärenten Streuung müssen im Gegensatz zur kohärenten Streuung nur die Selbstterme berücksichtigt werden, da die Streuung nur durch die Selbst-Interferenz entlang von $r_i(t)$ zustande kommt. Die intermediäre Streufunktion hängt mit dem dynamischen (inkohärenten) Strukturfaktor über die Fouriertransformation zusammen

$$S_{inc}(\vec{q},\omega) = \frac{1}{2\pi}\int e^{-i\omega t} F_{inc}(\vec{q},t)dt .$$

Wird nun die intermediäre Streufunktion in Bezug auf $\vec{q}$ fouriertransformiert, so erhält man die van-Hove Ort-Zeit-Korrelationsfunktion *G*, die nur noch von der Zeit und dem Ort abhängt

$$G_s(\vec{r},t) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \int e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} F_{inc}(\vec{q},t)d\vec{q} ,$$

$$G_s^{cl}(\vec{r},t) = \left\langle \frac{1}{N}\sum_{n=1}^{N}\delta\left((\vec{r}+\vec{r}_n(0)-\vec{r}_n(t)\right)\right\rangle .$$

Die van-Hove Ort-Zeit-Korrelationsfunktion stellt die Wahrscheinlichkeit dar, ein Teilchen, das sich zur Zeit *t = 0* am Ursprung befunden hat, zur Zeit *t* am Ort $\vec{r}$ zu finden. Im Falle der kohärenten Streuung stellt *G* die Paarkorrelation von zwei verschiedenen Teilchen dar. Somit ergibt sich folgender Zusammenhang der betrachteten Funktionen:

$$S_{coh}(\vec{q},\omega) \xleftarrow{FT(t,\omega)} F_{coh}(\vec{q},t) \xleftarrow{FT(\vec{q},\vec{r})} G(\vec{r},t) ,$$

$$S_{inc}(\vec{q},\omega) \xleftarrow{FT(t,\omega)} F_{inc}(\vec{q},t) \xleftarrow{FT(\vec{q},\vec{r})} G_s(\vec{r},t) .$$

Da $S_{inc}(\vec{q},\omega)$ nur für begrenzte Bereiche von $\vec{q}$ und ω gemessen werden kann, ist die direkte Berechnung von G_s via Fouriertransformation nicht möglich. Deswegen werden Modelle der Dyamik $(\vec{r}(t))$ der Biomolelüle aufgestellt und mit den Messungen verglichen. Es werden analytische Modelle (harmonischer Oszillator, freie Diffusion, Sprungdiffusion) und Computermodelle (Molekulardynamik-Simulationen, Normalmodenanalyse) verwendet. Diese Rechnungen sind üblicherweise klassisch. Für die quantenmechanische Rechnung müssen die entsprechenden Operatoren für den Ort, den Impuls usw. verwendet werden.

Inkohärenter Strukturfaktor für harmonische Dynamik

Aus der Normalmodenanalyse bekommt man für jede Mode λ eine Frequenz ω_λ und einen Satz von Verschiebungsvektoren C_l^λ (einen für jedes Atom l). Wird ein System betrachtet, das aus verschiedenen Atomsorten besteht und einer quantenmechanischen harmonischen Dynamik unterliegt, so folgt für den inkohärenten Strukturfaktor

$$S_{inc}(\vec{q},\omega)=\sum_{L=1}^{N} b_L^2 \exp\left[-2W_L(\vec{q})\right]\prod_{\lambda}\left\{\sum_{n_\lambda}\exp\left[-\frac{n_\lambda\hbar\omega_\lambda}{2kT}\right] I_{n_\lambda}\left(\frac{\hbar\left|\vec{q}\cdot C_L^\lambda\right|^2}{2\omega_\lambda \sinh\left(\hbar\omega/2kT\right)}\right)\right\}\delta\left(\omega-\sum_\lambda n_\lambda\omega_\lambda\right)$$

Gleichung 2

mit

$$W_L(\vec{q}) = \sum_{\lambda=1}^{3N-6} \frac{\hbar\left|q\cdot C_L^\lambda\right|^2}{4\omega_\lambda} coth\left(\frac{\hbar\omega_\lambda}{2kT}\right) .$$

Die Summationsindex L geht über alle N Atome des Moleküls; jedes Atom L besitzt eine inkohärente Streulänge b_L. Der Debye-Wallerfaktor ist durch $\exp\left[-2W_L(\vec{q})\right]$ gegeben. Das darauffolgende Produkt berücksichtigt alle Moden λ und die Summe in der geschweiften Klammer alle Multiphononenprozesse. $I_{n\lambda}$ die modifizierte Besselfunktion n_λ-ter Ordnung (n_λ ist die Anzahl der Quanten mit Energie $\hbar\omega_\lambda$ die zwischen dem Neutron und der Mode λ ausgetauscht wurden), und die Exponentialfunktion davor beschreibt die Besetzungswahrscheinlichkeit der Phononenzustände (Boltzmannfaktor, detailed balance factor). Schließlich sorgt die Deltafunktion für die Energieerhaltung: alle beteiligten Moden zusammen ergeben den Energieübertrag.
Für die Berechnung der Neutronenstreuung an niederfrequenten Proteinschwingungen können einige vereinfachende Näherungen durchgeführt werden. 1) Die Bewegungen können klassisch beschrieben werden $(\omega << kT)$ 2). Die experimentellen q-Werte sind genügend klein, um die modifizierten Besselfunktionen zu entwickeln ($I_0(x) = 1$, $I_1(x) = x/2$, sonst Null), d.h. Multiphononprozesse werden vernachlässigt. 3) Die Streuung jedes Moleküls ist isotrop. 4) Nur Wasserstoffkerne tragen zur Streuung bei. 5) Jede Mode hat eine ähnliche Verteilung der Verschiebungsvektoren C_L^λ. Die letzte Näherung ist vernünftig, da bei den endlichen experimentellen Auflösungen die Moden nicht einzeln detektiert werden können. Bei Mittelung über mehrere Moden wird die Annahme gut erfüllt.
Mit diesen Approximationen erhält man für den inkohärenten Strukturfaktor

$$S_{inc}(\vec{q},\omega) = \frac{q^2 kT}{\omega^2} .$$

Diese $1/\omega^2$ - Abhängigkeit bedeutet, dass die niederfrequenten Schwingungen die Neutronenstreuung dominieren, d.h. Gewichtung mit $\langle x^2\rangle$.

Eine wichtige Größe zur Beschreibung von schwingenden Molekülen ist die Verteilung der Schwingungsfrequenzen (Zustandsdichte)

$$g(\omega) = \sum_{\lambda} \delta(\omega - \omega_{\lambda}) \ .$$

Im Limes $q \rightarrow 0$ erhält man aus Gleichung 2 die Funktion *G*, die *g(ω)* gewichtet mit den Streuquerschnitten, den Massen und dem Quadrat der Auslenkungen darstellt,

$$G(\omega) = \lim_{q \to 0} \frac{6\omega}{\hbar q^2} \left(e^{\hbar\omega/kT} - 1 \right) S_{inc}(\bar{q}, \omega) \ . \qquad \textbf{Gleichung 3}$$

Abb. 6 zeigt den inkohärenten Streuquerschnitt für ein kleines Protein BPTI, der mit Gleichung 2 berechnet wurde, wobei nur die Einphononprozesse betrachtet wurden. Das Streuspektrum besteht aus einer Serie von Strichen, die die niederfrequenten Schwingungsmoden darstellen. Die Durchschnittsintensität nimmt dabei ungefähr mit $1/\omega^2$ ab. Darin spiegelt sich die globale Natur dieser niederfrequenten Moden wieder (siehe unten). Aufgrund der endlichen Größe des Proteins bricht $S_{inc}(\bar{q}, \omega)$ zu kleinen Energien hin zusammen (nur wenige langwellige Moden !).

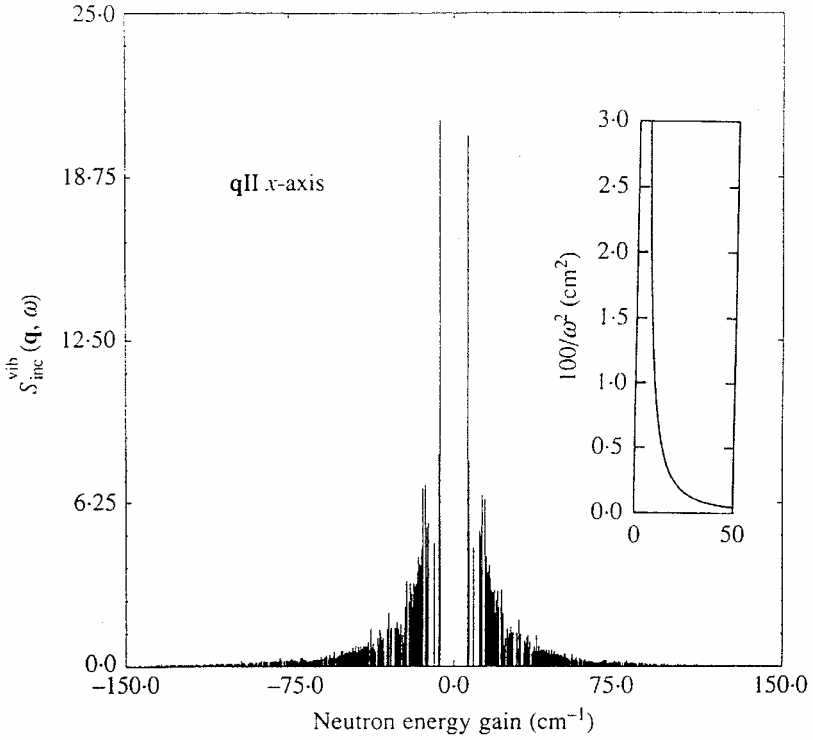


Abb. 6: Einphononen-Streufunktion, die mit der Normalmodenanalyse für BPTI berechnet wurde (q ist parallel zu der molekularen x-Achse). Zum Vergleich zeigt die innere Grafik den $1/\omega^2$ - Abfall.

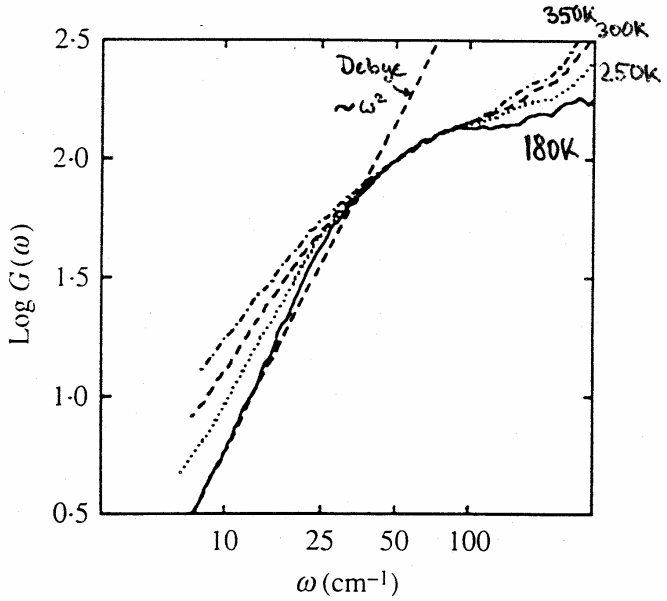


Abb. 7: Doppelt logarithmische Auftragung der Frequenzverteilung G für Myoglobinpulver, die mit Neutronenstreuung bestimmt wurde. Daten bei 180, 250, 300 und 350 K sind zu sehen. Die gestrichelte Linie zeigt das Verhalten gemäß dem Debyemodell.

Abb. 7 zeigt die experimentell bestimmte Zustandsdichtefunktion $G(\omega)$ für Myoglobin in einer doppelt logarithmischen Auftragung. Für Frequenzen kleiner als etwa 20 cm^{-1} und für niedrige Temperaturen (bis ~180 K) wird das Debyemodell bestätigt, das einen quadratischen Zusammenhang bis zu einer maximalen Frequenz vorhersagt

$$g(\omega) = \frac{3\,\omega^2}{2\pi^2\, v_0^3} \propto \omega^2,$$

da diese Moden global (delokalisiert) sind. (Das Debyemodell geht von einem homogenen elastischen Festkörper aus). Bei höheren Frequenzen wird eine schwächere Abhängigkeit von ω gemessen. Für noch höhere Frequenzen, die in obiger Abbildung nicht gemessen wurden, sind noch größere Abweichungen vom Debyemodell aufgrund der dort auftretenden lokalen Moden zu erwarten. Experimentelle (Kreise) und theoretische Zustandsdichten von BPTI-(amorphes) Pulver sind in Abb. 8 gezeigt.

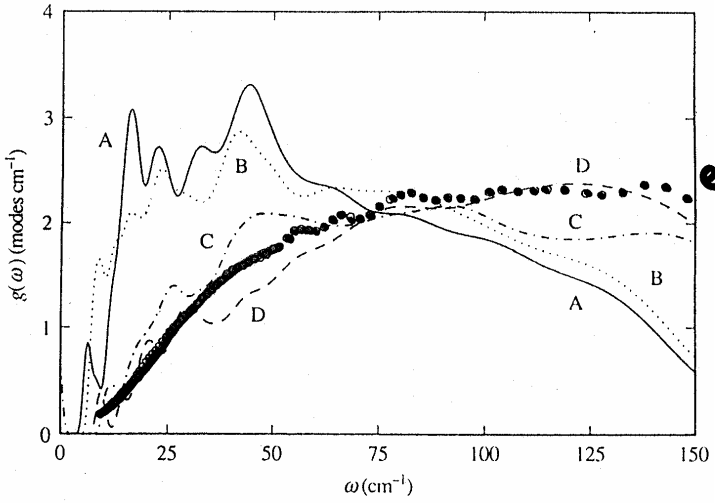


Abb. 8: Aus Neutronenstreuexperimenten gewonnene Frequenzverteilung von BPTI-Pulver (Kreise). Ebenfalls zu sehen sind vier Spektren, die mit der Normalmodenanalyse berechnet wurden.

Ferner sind vier Spektren, die mit der Normalmodenanalyse berechnet wurden, aufgeführt. Sie unterscheiden sich nur durch die Behandlung des Coulombterms. Dessen Berechnung ist zeitaufwendig, da die Coulombkräfte langreichweitig sind. Sie müssen daher über alle Atome berechnet werden. Für die vier Spektren wurden verschiedene Modelle verwendet, um die Berechnung des Coulombterms zu beschleunigen. Die Abbildung zeigt, dass dies große Auswirkungen auf die Spektren hat. Die Modelle C und D kommen dem experimentellen Spektrum relativ nahe. Allerdings haben alle theoretischen Daten mehr Struktur als die experimentellen.

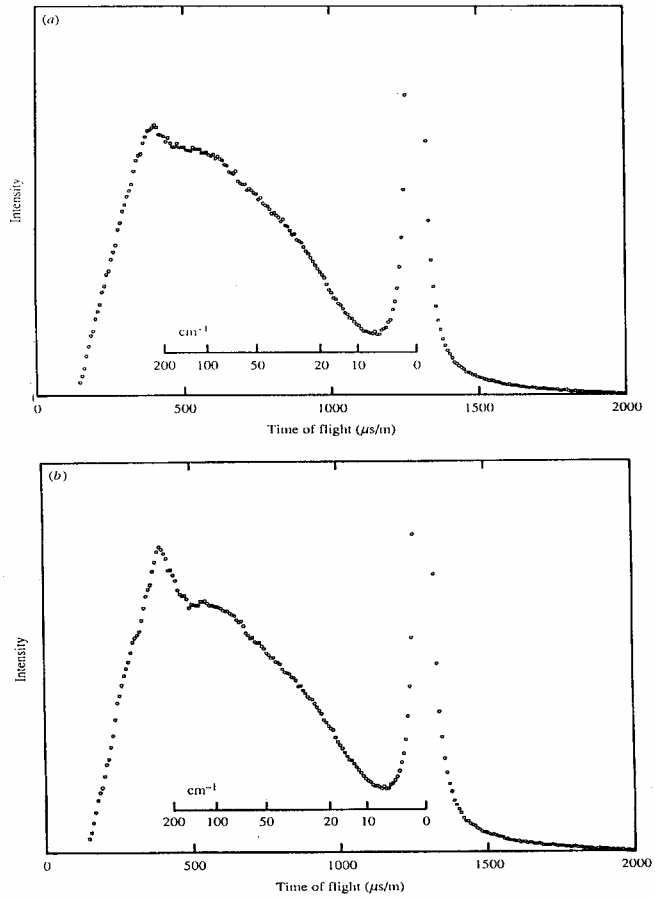


Abb. 9: Flugzeitspektren von lyophilisiertem BPTI- (a) und Lysozympulvern (b) bei einem Streuwinkel von 66.6°. Die einfallende Wellenlänge war 5.14 Å.

In Abb. 9 sind Flugzeitspektren von lyophilisiertem BPTI- (a) und Lysozympulvern (b) zu sehen. Obwohl es sich um zwei völlig unterschiedliche Proteine handelt, sind beide Spektren sehr ähnlich, da die Pikosekundendynamik nicht sehr von der speziellen Struktur abhängt. Um die Flugzeitspektren (mit Flugzeit τ) mit den gegen ω aufgetragenen Spektren zu vergleichen, muss die Ordinate mit Hilfe von

$$\omega = \frac{m_n}{2\hbar}\left(\frac{1}{\tau_0^2} - \frac{1}{\tau^2}\right),$$

$$I(\tau;\theta) = \frac{|k_f|}{|k_i|}\left|\frac{\partial\omega}{\partial\tau}\right| S_{inc}(\vec{q},\omega)$$

umgerechnet werden. Abb. 10 zeigt die so erhaltenen Spektren von BPTI für verschiedene Streuwinkel.

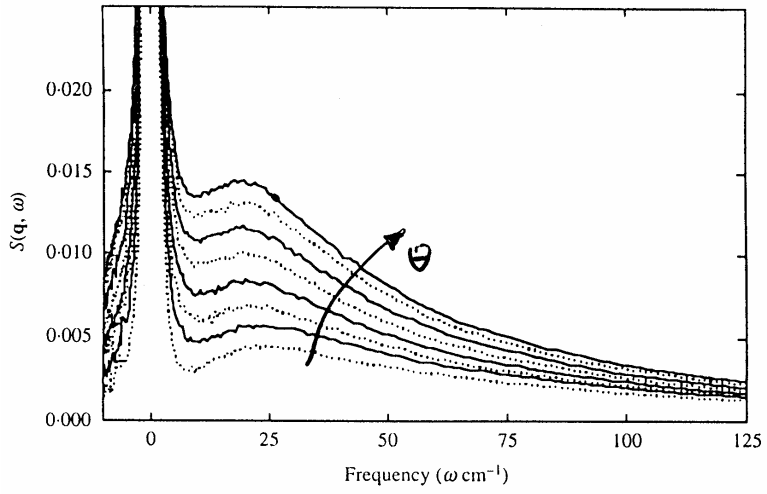


Abb. 10: Dynamischer Strukturfaktor in Abhängigkeit von ω für verschiedene Streuwinkel θ für lyophilisiertes BPTI-Pulver.

Die Spektren sind wenig strukturiert. Man beobachtet für alle Streuwinkel einen breiten Peak bei ungefähr 25 cm^{-1}, der für hohe Frequenzen langsam abfällt. Der Vergleich mit theoretischen Daten zeigt, dass es sich bei dem breiten Peak um niederfrequente, globale Schwingungsmoden des Proteins handelt. Die Streuprofile ändern sich wenig für die verschiedenen Streuwinkel. Dies ermöglicht die Extrapolation zu kleineren q und damit die Bestimmung der Zustandsdichte (siehe Gleichung 3). Im Gegensatz zu Spektren von Biomolekülen ist das Spektrum von kristallinem L-Alanin stärker strukturiert (siehe Abb. 11).

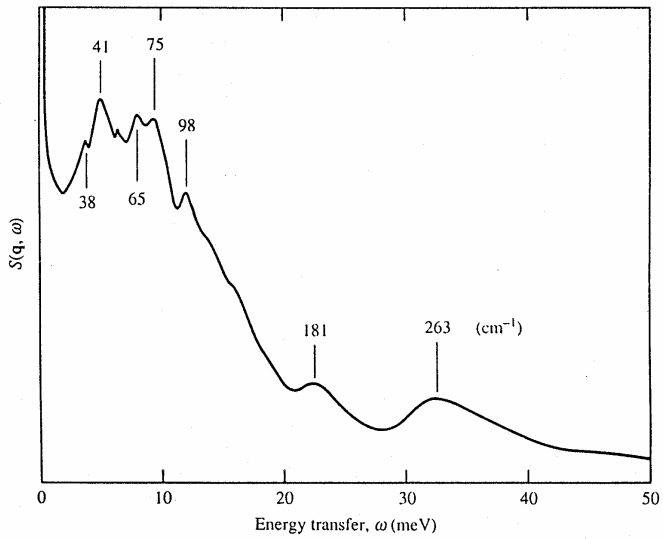


Abb. 11: Dynamischer Strukturfaktor in Abhängigkeit vom Energietransfer für polykristallines L-Alanin. Die Daten wurden mit dem IN6 Flugzeitspektrometer am ILL in Grenoble bei einer einfallenden Neutronenwellenlänge von 5.14 Å aufgenommen. Das Spektrum stellt die Summe aus den Messungen bei Streuwinkeln zwischen 10° - 110° dar.

Die relativ scharfen Peaks für Frequenzen kleiner als 100 cm^{-1} stellen intermolekulare Gitterschwinkungen im Kristall dar. Allgemein gilt, dass das Auftreten von Strukturen im niederfrequenten Spektrum ein Indiz für eine relativ einfache bzw. periodische Struktur ist.
Der Vergleich der theoretischen und experimentellen Spektren (siehe z.B. Abb. 8) zeigt, dass die gemessenen Spektren weniger Struktur aufweisen als die mit der Normalmodenanalyse berechneten. Es gibt mehrere Gründe für diese Glättung. Neben der endlichen Auflösung der Messapparatur und den Näherungen in der Normalmodenanalyse ist die Reibungsdämpfung zu nennen. Letztere kann durch intramolekulare Anharmonizitäten, Protein-Protein

Wechselwirkungen in den Pulverproben und durch die Lösungsumgebung hervorgerufen werden. Um die Reibung zu beschreiben, wird ein gedämpfter harmonischer Oszillator betrachtet

$$\ddot{Q}_\lambda + 2p_\lambda \dot{Q}_\lambda + \omega^2 Q_\lambda = F(t),$$

wobei p_λ der Reibungskoeffizient der Mode λ und F(t) eine stochastische Kraft ist. Die Einführung der Dämpfung bewirkt, dass die Peaks verbreitert und zu kleineren Frequenzen verschoben werden. Für sehr große Dämpfung (Überdämpfung) führt dies zu quasielastischer Streuung. Abb. 12 zeigt, wie die Berücksichtigung der Dämpfung das Streuspektrum und das Flugzeitspektrum verändert.

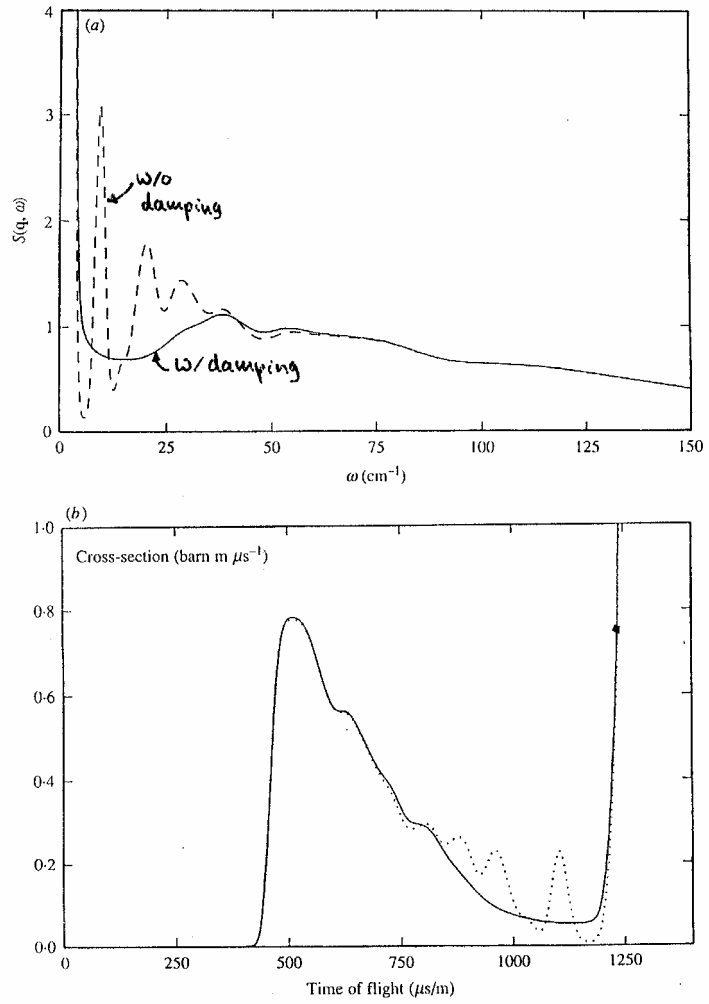


Abb. 12: *S(q,ω)* (a) und Flugzeitspektrum (b) berechnet mit dem gedämpften Oszillatormodell. Für die Verteilung der Reibungskoeffizienten wurde eine Gaußkurve angenommen. Die ungedämpfte Streuung ist gepunktet eingezeichnet.

Durch die Reibungsdämpfung wird das Spektrum geglättet. Es stimmt dadurch besser mit dem experimentellen Spektrum überein. Durch die entsprechende Wahl der Verteilung (Gaußkurve) der Reibungskoeffizienten

$$p_\lambda = Ae^{\frac{-\omega_\lambda^2}{2\sigma^2}}$$

(A = 30 cm^{-1}, σ^2 = 225 cm^{-2}) werden die niederfrequenten Anteile stärker gedämpft. Man erhält ähnlich wie im Experiment nur einen breiten Peak bei 30 cm^{-1}.

Die experimentelle Veränderung der quasielastischen Streuung mit der Temperatur ist in Abb. 13 für Myoglobin zu sehen. Unter 180 K erkennt man ein breites Maximum des Strukturfaktors bei ungefähr 25 cm^{-1} (3 meV) und keine quasielastische Streuung. Der Peak bei 0 eV entspricht der experimentellen Auflösung. Für höhere Temperaturen verschwindet das Maximum immer mehr aufgrund der größer werdenden quasielastischen Streuung.

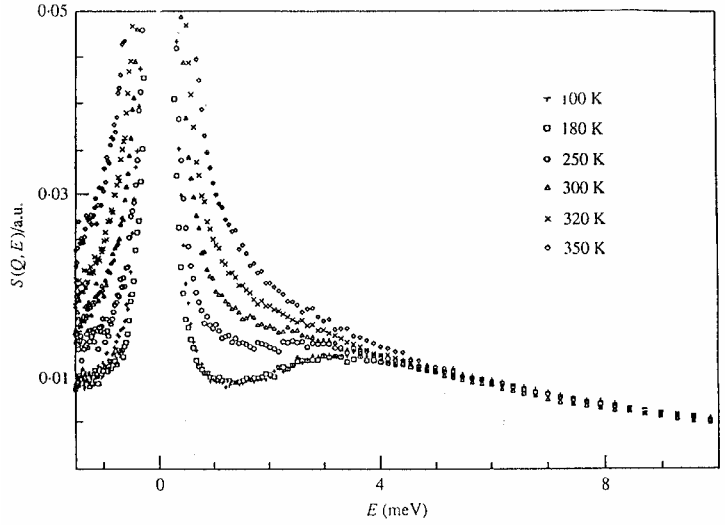


Abb. 13: Temperaturabhängigkeit des dynamischen Strukturfaktors für D_2O-hydratisiertes Myoglobin für einen Streuwinkel von 1.5 $Å^{-1}$.

Unter der Annahme, dass die Schwingungsmoden, die die Streuung bei 100 K und 180 K verursachen, ihre Form nicht signifikant bei den anderen Temperaturen ändern, wurden die Spektren bei den tiefen Temperaturen (T < 180 K) mit dem Bosefaktor $(e^{\hbar\omega/kT} - 1)^{-1}$ auf höhere Temperaturen skaliert und von den Spektren bei den höheren Temperaturen abgezogen. Abb. 14 zeigt in einer doppelt logarithmischen Auftragung die daraus erhaltenen Spektren.

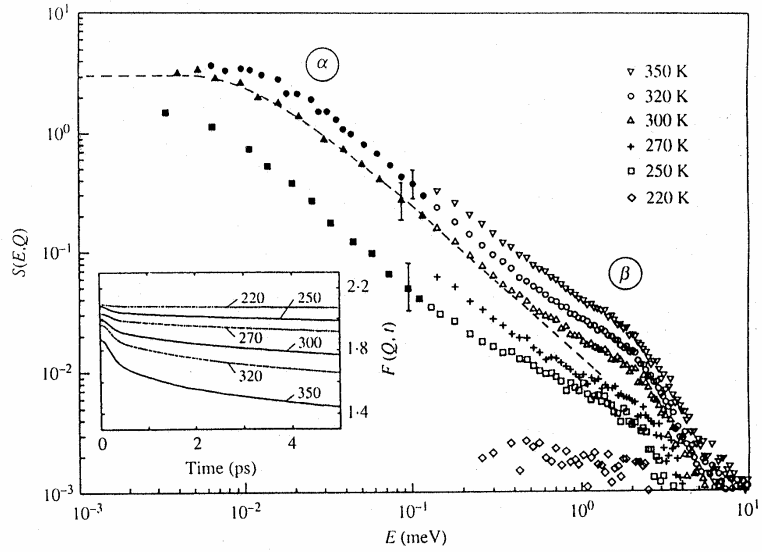


Abb. 14: Doppelt logarithmische Auftragung der experimentellen quasielastischen Neutronenstreuung von Myoglobin bei verschiedenen Temperaturen. Das innere Diagramm zeigt die daraus mittels Fouriertansformation berechnete intermediäre Streufunktion.

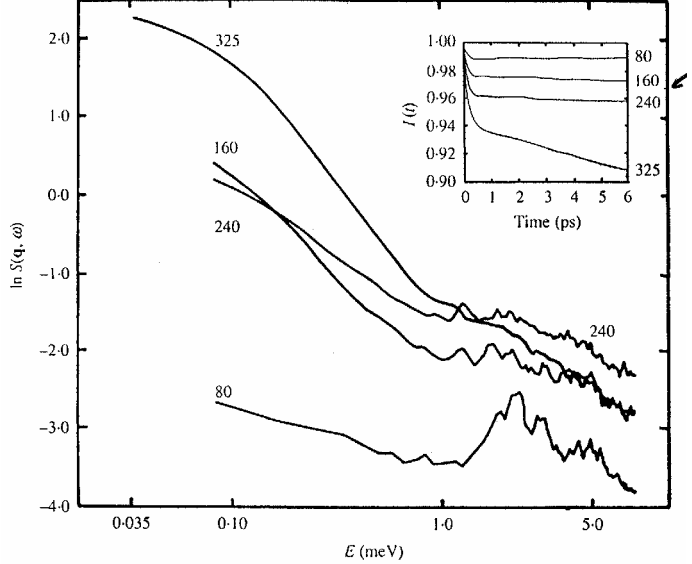


Abb. 15: Doppelt logarithmische Auftragung der quasielastischen und inelastischen Neutronenspektren, die mit molekulardynamischen Simulationen berechnet wurden. Der Streuvektor betrug 1 Å^{-1}.

Man beobachtet eine signifikante quasielastische Streuung bei Temperaturen oberhalb 180 K. Es wurden auch Rechnungen der quasielastischen Streuung von Myoglobin durchgeführt, siehe Abb. 15. Die elastische Streuung ist in der Grafik nicht aufgeführt. In Gegensatz zu Abb. 14 wurde die Streuung bei tiefen Temperaturen nicht abgezogen. Man beobachtet ähnlich wie im Experiment ein Verschwinden des Streumaximums bei 3 meV mit ansteigender Temperatur. Die Simulationen zeigen wiederum mehr Strukturen als das Experiment, da die endliche Auflösung der Apparatur und die Auswirkung etwaiger Reibungsdämpfungen nicht berücksichtigt wurden.
Die mittleren quadratischen Auslenkungen der Wasserstoffkerne für verschiedene Temperaturen sind in Abb. 16 zu sehen. Experimentelle Daten von Neutronenstreuexperimenten und Daten von molekulardynamischen Simulationen sind aufgetragen. Eine relativ gute Übereinstimmung ist zu sehen. Wie schon bei der Behandlung der Mößbauerspektroskopie aufgeführt, erhält man für Temperaturen bis ungefähr 180 K einen linearen Anstieg, der in Einklang mit dem harmonischen Modell ist. Für höhere Temperaturen erhält man einen stärkeren Anstieg, der Nichtharmonizitäten der Potentialenergiefläche impliziert.

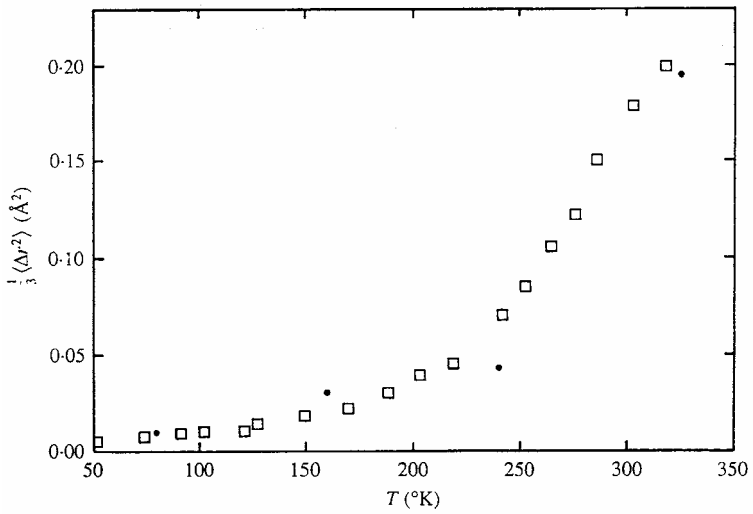


Abb. 16: Temperaturabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung der austauschbaren Wasserstoffkerne. Experimentelle Daten (Quadrate) und Molekulardynamische Simulationen (Punkte) sind dargestellt.

Magnetische Kernresonanzspektroskopie

Mit Hilfe der magnetischen Kernresonanz (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) kann die Energieabsorption, die mit dem Übergang von benachbarten magnetischen Kernniveaus verbunden ist, gemessen werden. Da diese Übergangsenergien von der Umgebung der Kerne abhängen, kann die NMR spezifische Informationen über die Kerne und deren Umgebung liefern. Die Methode wird in vielen Gebieten der Wissenschaft und Medizin eingesetzt. Sie ist insbesondere wichtig für die Bestimmung des Zusammenhangs von Struktur, Dynamik und Funktion von Biomolekülen. So können mit ihr Proteinstruktur- oder biomolekulare Dynamik-Bestimmungen durchgeführt werden. Es können die Kinetik der Ligandenbindung (im Bereich von Nanosekunden bis Sekunden) oder Protonierungen untersucht werden. Weitere Punkte sind die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes oder die Messung der Konzentration und der Isotopenzusammensetzung von Molekülen in Gewebe. Schließlich ist die NMR-Tomographie als Methode der 3 D-Bildgebung zu nennen. Ein Vorteil der NMR ist, dass die verwendeten Wellen im Radiofrequenzbereich liegen und nur schwach mit der Probe wechselwirken. Daher werden sie als nicht-invasiv betrachtet.

Die Wechselwirkungsenergie eines elektrischen Feldes $\vec{E}$ mit einem elektrischen Dipolmoment $\vec{\mu}_{el}$ ist

$$E = -\vec{\mu}_{el} \cdot \vec{E} \ .$$

Für die entsprechende magnetische Wechselwirkung gilt

$$E = -\vec{\mu}_{mag} \cdot \vec{B} \ ,$$

wobei $\vec{B}$ die magnetische Induktion und $\vec{\mu}_{mag}$ das magnetische Dipolmoment ist. Dieses ist bei den Kernen mit einem inneren Drehimpuls, dem Kernspin $\vec{I}$, verknüpft, dessen Betrag nur diskrete Werte annehmen kann,

$$\left|\vec{I}\right| = \hbar\sqrt{I(I+1)} \ ,$$

mit der Spinquantenzahl I = 0, 1/2, 1, 3/2, 2 ... Es ist nur eine Komponente beobachtbar, z.B. I_z, wobei I_z $2I + 1$ Werte annehmen kann ($I\hbar$, $(I-1)\hbar$,…,$-I\hbar$). Gewöhnlich wird der Spin als maximaler Wert von I_z in Einheiten von $\hbar$ angegeben. Der Kernspin ist mit dem magnetischen Kernmoment $\vec{\mu}$ verknüpft,

$$\vec{\mu} = g_N \mu_N \vec{I}/\hbar \ ,$$

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \ , \qquad \gamma = \frac{g_N \mu_N}{\hbar} \ ,$$

wobei γ das magnetogyrische Verhältnis ist, das die Proportionalität zwischen dem magnetischen Dipolmoment, $\vec{\mu}$, und der mechanischen Größe Spin, $\vec{I}$, quantifiziert. Sie kann durch die Größen Kern g-Faktor, g_N, und dem Kernmagneton, $\mu_N = e\hbar/2m_p$ ausgedrückt werden, wobei e die Elementarladung und m_p die Masse des Protrons repräsentiert. Befindet sich ein Kern mit Kernspin ungleich Null in einem magnetischen Feld $\vec{B}_0 = B_0\hat{z}$, so erhält man für die Wechselwirkungsenergie (Kern-Zeeman-Effekt)

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad = -\gamma \, m_I \hbar B_0$$

mit der magnetischen Quantenzahl m_I. Die Ergebnisse für den Fall I = 1/2 sind in Abb. 1 zu sehen.

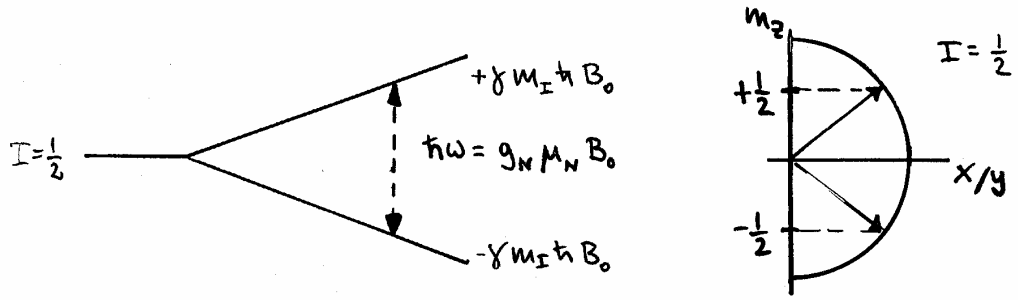


Abb. 1: Kern-Zeeman-Effekt und Orientierung des magnetischen Kernspins für I = 1/2.

Es kommt aber nicht nur zu einer Energieaufspaltung, sondern auch zu einer Drehung des magnetischen Moments, da es im homogenen B-Feld ein Drehmoment $\vec{\tau}$ erfährt,

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B}$$

$$= \frac{d\vec{I}}{dt} = \gamma^{-1} \frac{d\vec{\mu}}{dt}.$$

Dann folgt

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \vec{\mu} \times \gamma \vec{B} \ .$$

Ebenfalls ergibt sich (vgl. Abb. 2)

$$d\varphi = \frac{d\mu}{\mu \sin\theta} \quad = \frac{\mu \gamma B_0 \sin\theta \, dt}{\mu \sin\theta} = \omega_L dt \, .$$

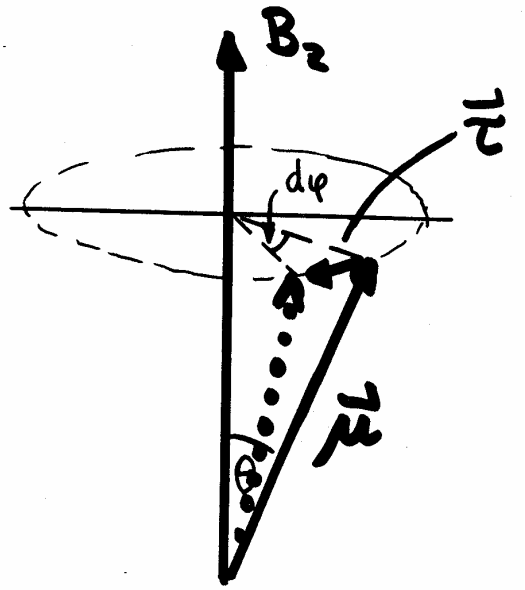


Abb. 2: Präzession des magnetischen Kernmoments nach Anlegen eines B-Feldes.

Das magnetische Moment präzediert um das B-Feld mit der Larmorfrequenz $\omega_L = \gamma B_0$.
Einige Eigenschaften verschiedener Kerne sind in
Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Verschiedene Eigenschaften einiger Kerne

Nucleus	Z	I	μ_m / μ_N	γ (rad gauss^{-1} sec^{-1})	$\omega_0/2\pi$ (MHz/10^4 gauss)	Natural abundance (%)	Relative sensitivity[§]
^{1}H	1	1/2	4.84	26,753	42.6	99.98	1.000
^{2}H	1	1	1.21	4,107	6.5	0.016	0.0096
^{12}C	6	0	——	——	——	98.89	——
^{13}C	6	1/2	1.22	6,728	10.7	1.11	0.016
^{14}N	7	1	0.57	1,934	3.1	99.64	0.0010
^{16}O	8	0	——	——	——	99.76	——
^{19}F	9	1/2	4.55	25,179	40.1	100	0.834
^{31}P	15	1/2	1.96	10,840	17.2	100	0.066
^{32}S	16	0	——	——	——	95.06	——

Die Kerne mit Spin $I = 0$ kommen für NMR-Messungen nicht in Frage, da sie keinen Kern-Zeeman-Effekt zeigen. Darunter fallen die für organische Moleküle wichtigen ^{12}C- und ^{16}O-Kerne. Wichtige NMR-Kerne sind vor allem ^{1}H, aber auch ^{13}C, ^{14}N, ^{19}F, ^{31}P.
Liegt kein *B*-Feld an der Probe an, so ist die makroskopische Magnetisierung

$$\vec{M} = \frac{1}{V}\sum_i \vec{\mu}_i\,, \quad \left[\vec{M}\right] = \frac{A}{m}, \quad \left[\vec{\mu}_i\right] = Am^2,$$

gleich Null. Nach Anlegen eines Magnetfeldes richten sich die Kernmomente aus, und man erhält eine Magnetisierung parallel zum *B*-Feld (Abb. 3).

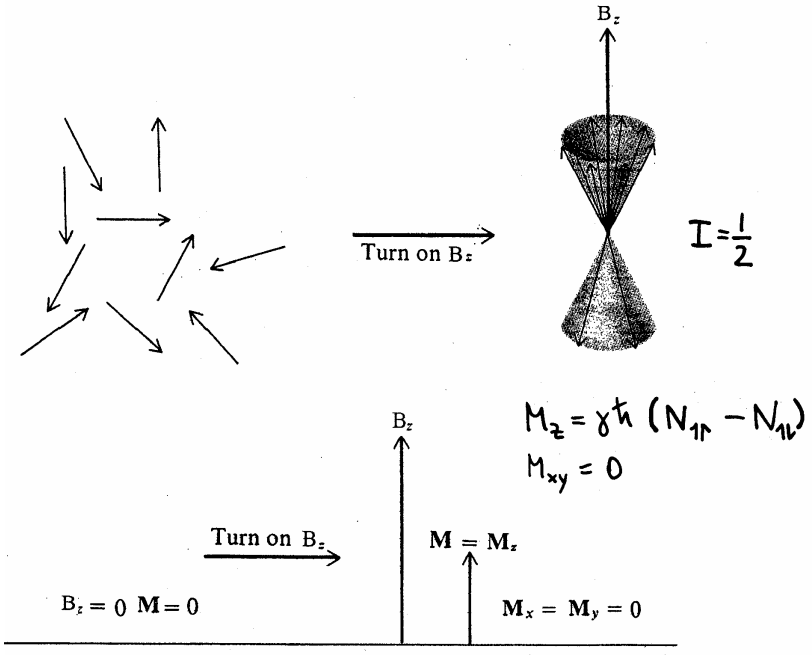


Abb. 3: Ausrichtung der ursprünglich zufällig verteilten magnetischen Momente in einem externen magnetischen Feld. Das B-Feld erzeugt eine Orientierung, die eine Magnetisierung parallel zum B-Feld zur Folge hat.

Die verschiedenen Energieniveaus sind aufgrund des Boltzmanngesetzes nicht gleich besetzt. Es gilt für das Verhältnis der Besetzungswahrscheinlichkeit für $I = ½$ Kerne,

$$\frac{N_{\uparrow\downarrow}}{N_{\uparrow\uparrow}} = e^{-\Delta E/kT} = e^{-\gamma\hbar B_0/kT}\,.$$

Für den ^{1}H Kern ist dieses Verhältnis gleich 0.999993 bei einem Magnetfeld von 1 Tesla und einer Temperatur von 300 K. Nur 7 von einer Million Kerne verursachen in diesem Fall die resultierende Magnetisierung. Wird nun eine Radiowelle mit der Larmorfrequenz eingestrahlt, so tritt Resonanzabsorption auf, da wegen der ungleichen Besetzung des unteren und oberen Niveaus etwas mehr Quanten absorbiert als emittiert werden. Es tritt eine Konkurrenzsituation ein: Die eingestrahlte Hochfrequenz versucht Gleichverteilung herzustellen, während die thermischen Schwingungen eine Boltzmann-Verteilung aufrecht zu erhalten versuchen.
Als Methode zur Untersuchung kondensierter Materie eignet sich die NMR aus verschiedenen Gründen. Zum einen ist die Resonanzfrequenz nicht genau gleich der dem äußeren Feld entsprechenden Larmorfrequenz, sondern sie ist geringfügig verschoben. Die Ursache für diese Verschiebung liegt in der Verstärkung bzw. Schwächung des äußeren Feldes durch die Elektronen, die den Kern umgeben. Die genaue Messung dieser Verschiebung erlaubt Rückschlüsse auf die Umgebung des Atomkerns. Zum anderen besitzt die Resonanzlinie eine gewisse Breite, die von Relaxationsprozessen abhängt. Über die Messung der Linienbreiten bzw. der Relaxationszeiten erhält man ebenfalls Zugang zu mikroskopischen Eigenschaften.

Resonanzabsorption

Der Prozess der Resonanzabsorption soll nun näher betrachtet werden. Ein in *z*-Richtung angelegtes *B*-Feld erzeugt also eine Magnetisierung in z-Richtung M_z ($M_x = M_y = 0$). Es wird ein oszillierendes *B*-Feld in *x*-Richtung als periodische Störung angelegt. Das oszillierende *B*-Feld kann nun Übergänge zwischen den Spinniveaus induzieren. Dadurch wird eine Komponente der Magnetisierung in der *xy*-Ebene erzeugt, die durch Induktion einer Spannung in einer Detektionsspule gemessen werden kann. Sind die Niveaus gleichbesetzt, so ist die gesamte Magnetisierung transversal.
Zur mathematischen Beschreibung wird das (in *x*-Richtung) oszillierende Magnetfeld mit zwei Feldern dargestellt, die in gegenläufigen Richtungen rotieren,

$$\vec{B}_1 = b\hat{x}\cos\omega t$$

$$= \frac{b}{2}(\hat{x}\cos\omega t + \hat{y}\sin\omega t)$$

$$+ \frac{b}{2}(\hat{x}\cos\omega t - \hat{y}\sin\omega t)\,.$$

Für das gesamte *B*-Feld $\vec{B}_{tot}$ gilt dann

$$\vec{B}_{tot} = \vec{B}_0 + \vec{B}_1\ .$$

$\vec{B}_{tot}$ oszilliert in der *xz*-Ebene um die *z*-Achse (Abb. 4).

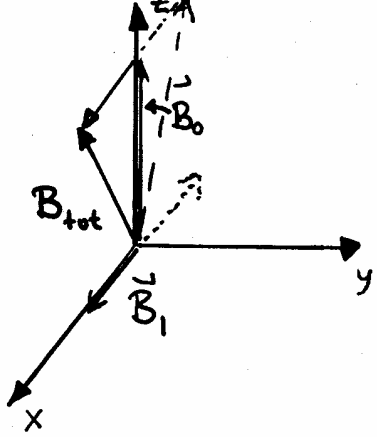


Abb. 4: Das resultierende *B*-Feld, $\vec{B}_{tot}$, oszilliert in der *xz*-Ebene um die *z*-Achse.

Um die Diskussion der ablaufenden Prozesse zu vereinfachen, wird ein rotierendes Koordinatensystem eingeführt. In kartesischen Koordinaten ist die Magnetisierung

$$\vec{M} = \hat{x} M_x + \hat{y} M_y + \hat{z} M_z \ .$$

Das Koordinatensystem $\hat{x}, \hat{y}, \hat{z}$ rotiere nun um $\vec{\Omega}$ (
Abb. 5).

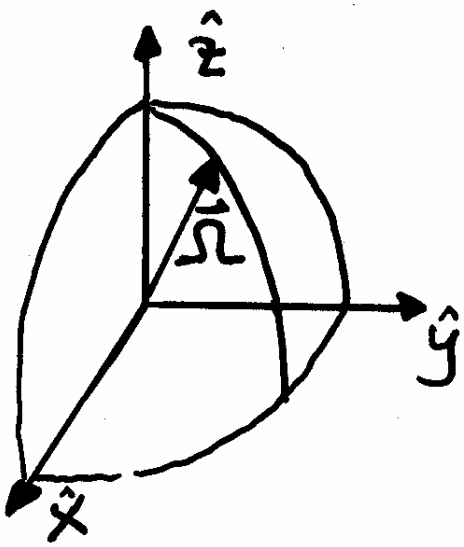


Abb. 5: Darstellung des Vektors $\vec{\Omega}$, um den das Koordinatensystem rotiert.

Es folgt damit

$$\frac{d\hat{x}}{dt} = \vec{\Omega} \times \hat{x} \ ,$$

Der Zusammenhang zwischen dem ortsfesten und dem rotierenden System ist

$$\left.\frac{d\vec{M}}{dt}\right|_{lab} = \hat{x} \left.\frac{dM_x}{dt}\right|_{rot} + M_x \frac{d\hat{x}}{dt} + \hat{y} \left.\frac{dM_y}{dt}\right|_{rot} + M_y \frac{d\hat{y}}{dt} + \hat{z} \left.\frac{dM_z}{dt}\right|_{rot} + M_z \frac{d\hat{z}}{dt} \ ,$$

$$\Rightarrow \left.\frac{d\vec{M}}{dt}\right|_{lab} = \left.\frac{d\vec{M}}{dt}\right|_{rot} + \vec{\Omega} \times \vec{M} = \vec{M} \times \gamma \vec{B}_0 \ .$$

Für die Bewegungsgleichung im rotierenden System folgt

$$\left.\frac{d\vec{M}}{dt}\right|_{rot} = \vec{M} \times (\gamma \vec{B}_0 + \vec{\Omega}) ,$$

$$\left.\frac{d\vec{M}}{dt}\right|_{rot} = \vec{M} \times \gamma \vec{B}_{eff} .$$

Man erhält also die gleiche Differentialgleichung wie beim Anlegen eines statischen *B*-Felds im ortsfesten Koordinatensystem. Allerdings muss das statische *B*-Feld durch ein effektives *B*-Feld ersetzt werden,

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 + \gamma^{-1} \vec{\Omega} .$$

Das führt z.B. dazu, dass für

$$\vec{\Omega} = -\omega_L \cdot \hat{z}$$

das effektive *B*-Feld verschwindet, wobei sich das rotierende Koordinatensystem um die *z*-Achse mit der Larmorfrequenz dreht. Der Beobachter im rotierenden Koordinatensystem sieht ja auch keine rotierenden Spins.

Wird das oszillierende *B*-Feld $\vec{B}_1$ angelegt und $\vec{\Omega} = -\omega_1 \hat{z}$ gewählt, wobei ω_1 die Frequenz des oszillierenden Feldes ist, so ist die eine Komponente

$$\frac{b}{2}(\hat{x}\cos\omega_1 t - \hat{y}\sin\omega_1 t)$$

für den Beobachter im rotierenden Koordinatensystem stationär, die andere Komponente des oszillierenden Feldes

$$\frac{b}{2}(\hat{x}\cos\omega_1 t + \hat{y}\sin\omega_1 t)$$

rotiert mit $2\omega_1$. Sie kann vernachlässigt werden, da sie die Resonanzbedingung nicht erfüllt. Obwohl das stationäre B-Feld sehr viel stärker als das oszillierende B-Feld ist ($\vec{B}_0 >> \vec{B}_1$), kann $\vec{B}_{eff}$, wie oben gezeigt, sehr klein und somit auch kleiner als $\vec{B}_1$ werden (Abb. 6).

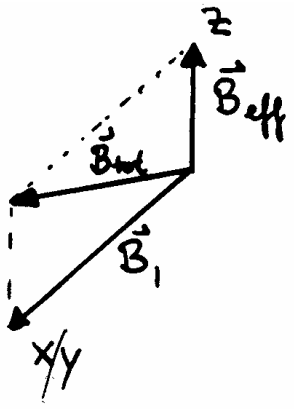


Abb. 6: Zusammensetzung des gesamten B-Feldes $\vec{B}_{tot}$ aus $\vec{B}_{eff}$ und $\vec{B}_1$.

Dies bedeutet, dass die Magnetisierung im rotierenden Koordinatensystem eine Larmorpräzession um $\vec{B}_{tot}$ mit der Frequenz $\omega_L = \gamma B_{tot}$ durchführt. Das hat zur Folge, dass sich die Magnetisierung in *z*-Richtung und somit die Energie des Systems ändert, es tritt Resonanz auf.

Absorption von Energie und Spin-Gitter-Relaxationen

Die Resonanzabsorption führt zu Änderungen in der Besetzung der Kernniveaus. Sind beide Niveaus gleich besetzt (gleiche Anzahl Spin up und Spin down), so folgt, dass die *z*-Komponente der Magnetisierung Null ist. Die Wahrscheinlichkeit für den Übergang eines Spin up $\rightarrow$ Spin down (W_{down}) ist gleich groß wie der umgekehrte Vorgang (W_{up}),

$$W_{up} = W_{down} = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \langle f \left| \mathrm{H} \right| i \rangle \right|^2 \delta(\Delta E - \hbar\omega) \ .$$

Die absorbierte Leistung ist

$$P = W_{up} n_{\uparrow\uparrow} \hbar\omega - W_{down} n_{\uparrow\downarrow} \hbar\omega$$

$$= W \Delta n \Delta E \ ,$$

mit $W = W_{up} = W_{down}$. Für das thermische Gleichgewicht gilt ($\langle \Delta n \rangle = n_{\uparrow\uparrow} - n_{\uparrow\downarrow}$)

$$\langle \Delta n \rangle = \frac{N}{2} e^{\Delta E / 2kT} - \frac{N}{2} e^{-\Delta E / 2kT} \ ,$$

wobei $N = n_{\uparrow\uparrow} + n_{\uparrow\downarrow}$ ist. Da $\Delta E << kT$ gilt, folgt

$$\langle \Delta n \rangle = N \Delta E / 2kT \ .$$

Wird nun ein oszillierendes B-Feld $\vec{B}_1$ eingestrahlt, so führt dies zu einem Nichtgleichgewichtszustand,

$$\Delta n \neq \langle \Delta n \rangle \ .$$

Der Gleichgewichtszustand kann über Relaxationsvorgänge wieder hergestellt werden. Dazu sind fluktuierende *B*-Felder, die von den Nachbaratomen verursacht werden können, notwendig. Diese Fluktuationen müssen Frequenzkomponenten in der Nähe um ω_1 haben, die z.B. durch Rotation oder Vibration der Atome zustande kommen. Das einfachste Modell geht von einem Ratenprozess aus,

$$\frac{d\Delta n}{dt} = -\frac{\Delta n - \langle \Delta n \rangle}{T_1} \ ,$$

wobei T_1 die sogenannte longitudinale Relaxationszeit ist. Daraus folgt

$$W \Delta n = \frac{1}{2} \frac{d\Delta n}{dt} = -\frac{\Delta n - \langle \Delta n \rangle}{2T_1} \ ,$$

da sich Δn für jede Umklappung eines Spins um 2 ändert. Somit ergibt sich für die absorbierte Leistung

$$P = \Delta E \, W \Delta n = \frac{N \left(\Delta E^2 \right) W}{2kT(1 + 2WT_1)} \ .$$

Hier kann ΔE (durch das B-Feld) und die Temperatur verändert werden. Für $T_1 \rightarrow \infty$ folgt, dass die absorbierte Leistung Null ist, da beide Niveaus gleich besetzt sind.

Longitudinale Relaxation

Damit longitudinale Relaxationen zustande kommen, muss ein Energieaustausch mit der Umgebung stattfinden,

$$E = -\vec{M} \cdot \vec{B} \ .$$

(Bei den kleinen Energieunterschieden, die bei der NMR auftreten, sind spontane Übergänge vernachlässigbar ($\sim\omega^3$).) Für den Energieaustausch mit der Umgebung sind Mechanismen nötig, bei denen der Spin mit Rotations- und Schwingungsfreiheitsgraden koppelt. Beispiele dafür sind:

1) Sind in einem Molekül zwei (oder mehrere) magnetische Momente vorhanden, so ändert sich bei Rotation das magnetische Feld, das das eine Moment am Ort des anderen bewirkt (und umgekehrt).
2) Verändert sich der Abstand zweier Moleküle (z.B. Schwingungen), so ändert sich auch die dipolare Kopplung zwischen den Molekülen.
3) Änderung von Quadrupolwechselwirkungen.
4) Die Resonanzfrequenz ändert sich durch anisotrope Abschirmung des externen Feldes.

Das einfachste Modell zur Beschreibung der longitudinalen Relaxation ist durch folgende Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{dM_z}{dt} = -(M_z - M_0)/T_1 \ .$$

Als Lösung ergibt sich

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \ .$$

Transversale Relaxation

Das oszillierende B-Feld bewirkt, dass sich einerseits die M_z-Komponente der Magnetisierung ändert und andererseits die *x*- bzw. *y*-Komponenten ungleich Null werden. Anfänglich sind die Spins phasenkohärent. Durch Relaxationsvorgänge geht diese Phasenkohärenz jedoch verloren. Anders ausgedrückt, wenn zu einem bestimmten Zeitpunkt eine Anzahl von Kernmomenten in die gleiche Richtung zeigen, dann werden diese aufgrund geringfügig verschiedener Präzessionsfrequenzen mit der Zeit außer Phase geraten. Ursachen dieser transversalen Relaxation (sie bezieht sich auf die transversalen Komponenten von *M*) sind: 1) Durch verschiedene Umgebungen der Kerne ist das lokale *B*-Feld ungleich dem externen *B*-Feld. 2) Dies ist ebenfalls für ein inhomogenes äußeres *B*-Feld der Fall. 3) Spin-Spin-Wechselwirkungen beeinflussen ebenfalls die Präzessionsfrequenzen, wobei diese Einflüsse im Gegensatz zu 1) und 2) stochastischer Natur sind.
Ähnlich wie bei der longitudinalen Relaxation wird für die mathematische Beschreibung das einfachste Modell verwendet,

$$\frac{dM_{x/y}}{dt} = -\frac{M_{x/y}}{T_2'} \Rightarrow \quad M_{x/y} = M_{x/y}(0) \cdot e^{-t/T_2'} \ ,$$

wobei T_2' die transversale Relaxionszeit ist. Sie wird auch Spin-Spin-Relaxationszeit genannt, da die für T_2' bestimmenden Präzessionsfrequenzen häufig durch die Spin-Spin-Wechselwirkung des beobachteten Spins mit seinen Nachbaratomen zustande kommen. Abb. 7 stellt die longitudinale und transversale Relaxation dar.

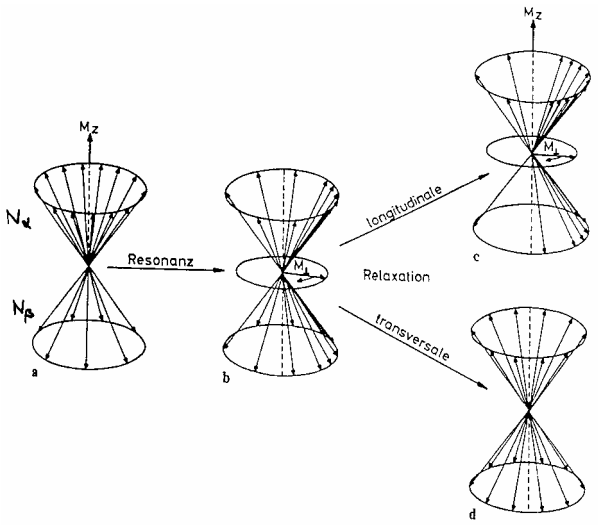


Abb. 7: Longitudinale und transversale Relaxation: a: Im Gleichgewicht sind mehr Spin up-Kerne als Spin down-Kerne vorhanden, sie sind Boltzmann-verteilt. Es resultiert eine Magnetisierung in *z*-Richtung. b: Nach Resonanzabsorption sind einerseits die Spins gleichverteilt (die *z*-Komponente der Magnetisierung ist Null), andererseits resultiert eine rotierende Magnetisierung in der *xy*-Ebene. c: Durch longitudinale Relaxation sind die Niveaus wieder Boltzmann-verteilt. D: Durch transversale Relaxation verschwindet die Komponente der Magnetisierung in der *xy*-Ebene.

T_1 kann nicht kleiner als $T_2^{'}$ sein, da bei Erreichen der Gleichgewichtsverteilung der *z*-Komponente der Magnetisierung keine *x*- oder *y*-Komponenten von *M* vorhanden sind. Die beobachtbare transversale Relaxationszeit setzt sich aus zwei Termen zusammen,

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_2'} + \frac{1}{2T_1} \ .$$

Außer der oben beschriebenen eigentlich transversalen Relaxationszeit $T_2^{'}$, wird diese auch von der longitudinalen Relaxationszeit T_1 beeinflusst, da jede Änderung in der Besetzung der Kernspinenergieniveaus (zur Wiederherstellung der Boltzmannverteilung) einen Verlust der Phasenbeziehung bedeutet. Der Faktor zwei kommt daher, dass sich die Besetzungszahl der Spinzustände bei einem Zustandswechsel des Kerns um zwei verändert.

Bloch-Gleichungen

Werden die Bewegungsgleichungen für die Magnetisierung mit Termen erweitert, die die Relaxationen beschreiben, so erhält man die Blochgleichungen

$$\dot{M}_x(t) = \gamma\{M_y B_z - M_z B_y\} - M_x / T_2$$

$$\dot{M}_y(t) = \gamma\{M_z B_x - M_x B_z\} - M_y / T_2$$

$$\dot{M}_z(t) = \gamma\{M_x B_y - M_y B_x\} - (M_z - M_0)/T_1 \ .$$

In Vektornotation ergibt sich

$$\dot{\vec{M}}(t) = \gamma \ \vec{M}(t) \times \vec{B}(t) - R\,(\vec{M} - \vec{M}_0)$$

mit der Relaxationsmatrix

$$R = \begin{bmatrix} 1/T_2 & 0 & 0 \\ 0 & 1/T_2 & 0 \\ 0 & 0 & 1/T_1 \end{bmatrix}.$$

Die Änderung der Magnetisierung aufgrund der Relaxationsprozesse nach Resonanzabsorption ist in Abb. 8 für ein konstantes *B*-Feld in *z*-Richtung dargestellt.

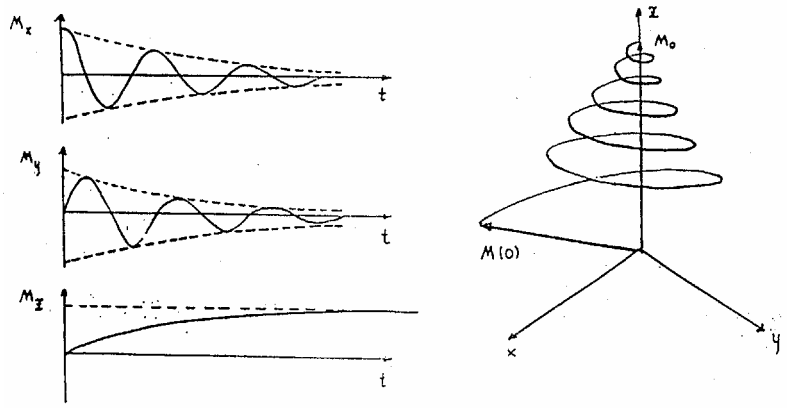


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Magnetisierung nach Resonanzabsorption.

Die gleichzeitig auftretende longitudinale und transversale Relaxation bewirken, dass die Magnetisierung spiralförmig von der Auslenkung in der *xy*-Ebene in die *z*-Richtung übergeht.

NMR-Messapparatur

Die Messapparaturen beruhen auf zwei verschiedenen Verfahren: die Sweepmethode (stationäre Methode) und die gepulste Methode. Ein typischer Aufbau der Sweepmethode ist in Abb. 9 zu sehen.

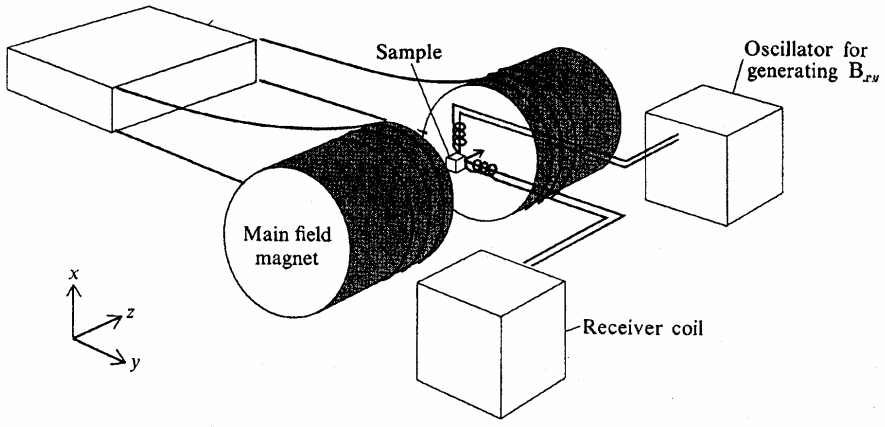


Abb. 9: Experimentelle Anordnung für die Sweep-Methode.

Das $\vec{B}_0$-Feld (in *z*-Richtung) wird durch einen starken Magneten geliefert. Das oszillierende Magnetfeld wird von einer Spule in *x*-Richtung erzeugt. Meistens wird nicht die Frequenz des oszillierenden Felds, sondern das $\vec{B}_0$-Feld variiert („gesweept“). Wird nun durch diese Variation des $\vec{B}_0$-Feldes die Larmorfrequenz der magnetischen Momente in der Probe gleich der Frequenz des oszillierenden *B*-Felds, so kommt es zur Resonanzabsorption. Diese wird mit

einer Detektionsspule gemessen, da die in der *xy*-Ebene präzedierende Magnetisierung des Kernspin-Systems in der Spule eine Spannung induziert. Ein typisches Signal ist in Abb. 10 dargestellt.

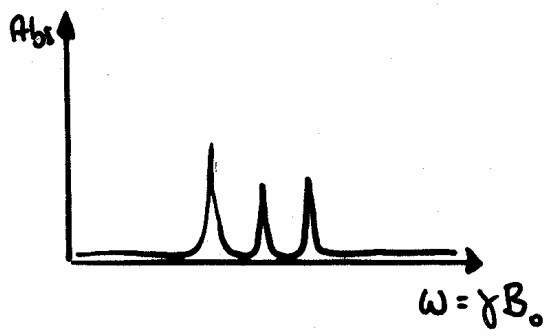


Abb. 10: Typisches NMR-Signal der Sweepmethode.

Bei der **gepulsten Kernresonanz** wird durch einen kurzen, starken Hochfrequenzimpuls die Magnetisierung aus der *z*-Richtung um den Winkel $\theta = \gamma B_1 \Delta t$ herausgedreht. Nach Abschalten des Hochfrequenzfeldes wird freie Präzession und Relaxation in einer Empfängerspule beobachtet (siehe Abb. 11).

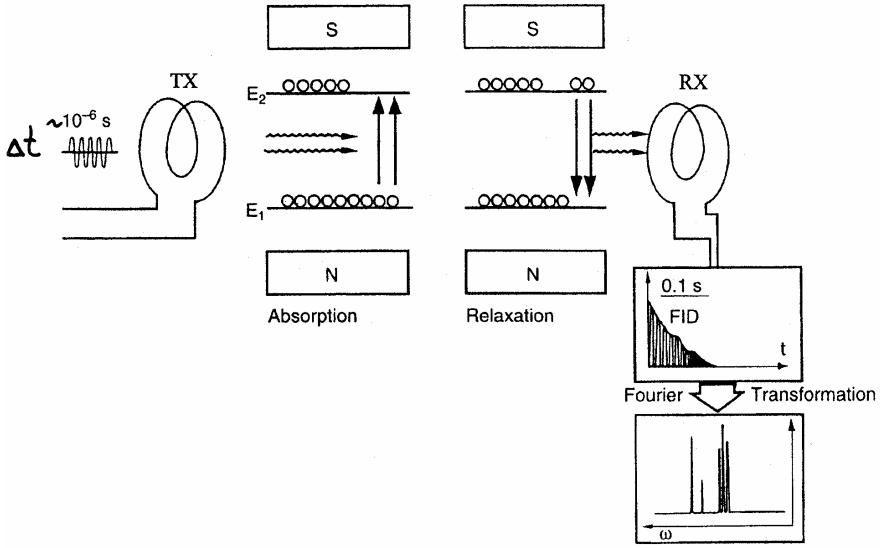


Abb. 11: Die gepulste Kernresonanz.

Die Abbildung zeigt, wie der kurze Puls (mit einer typischen Pulslänge im Bereich von Mikrosekunden und einer Feldstärke im Bereich von Millitesla) resonant absorbiert wird, und wie die Kerne danach relaxieren. Das Messsignal der Detektionsspule (Free Induction Decay, FID) wird Fourier-transformiert, um das Absorptionsspektrum zu erhalten. Es werden typische Frequenzen von

$$\nu = 500 \text{ MHz} = \omega_L/2\pi$$

verwendet. Dazu ist ein *B*-Feld von $\left|\vec{B}_0\right| = 11.74\ T$ für Protonen nötig. Abb. 12 zeigt eine gepulste Kernresonanzmessung an CH_3J.

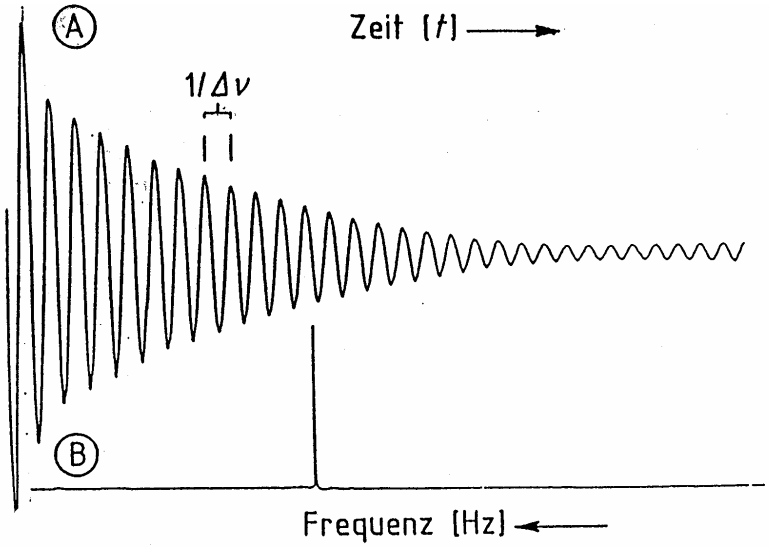


Abb. 12: Gepulste NMR-Messung an den Protonen von CH_3J. Ebenfalls gezeigt ist das daraus folgende Spektrum.

Es ist eine exponentiell abfallende Schwingung einer Frequenz zu sehen, da die 3 Wasserstoffkerne die gleiche Resonanzfrequenz haben. Es wurde ein einzelner Anregepuls verwendet. Das nächste Beispiel zeigt Methanol (CH_3OH , Abb. 13).

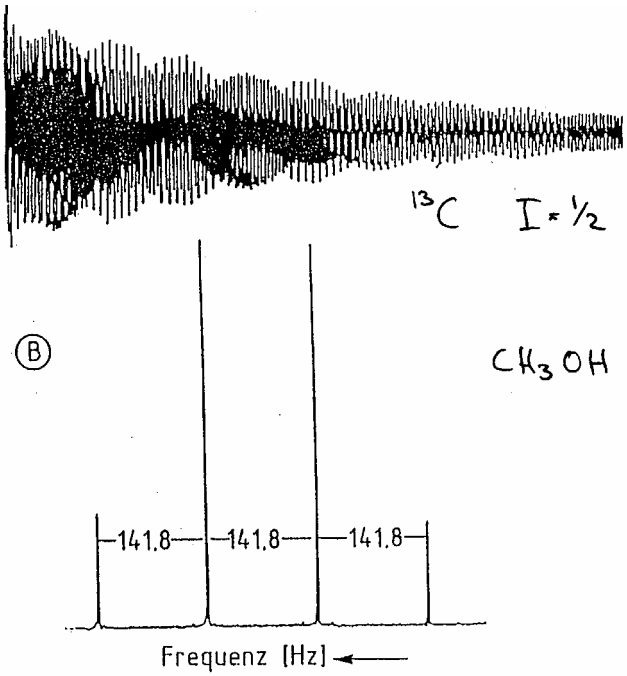


Abb. 13: Gepulste Kernresonanzmessung an CH_3OH mit dem daraus berechneten Spektrum.

Die Kernspins des Kohlenstoffs (^{13}C) wurden gemessen. Dessen Kernniveau-Aufspaltung ändert sich je nach Spineinstellung der umliegenden drei Wasserstoffatome. Das gemessene Spektrum enthält vier Linien, da vier Möglichkeiten für die Spins der Wasserstoffelektronen existieren: 3 up-Spins, 2 up-Spins und 1 down-Spin, 1 up-Spin und 2 down-Spins, 3 down-Spins. Durch die verschiedenen Resonanzfrequenzen treten bei der Pulsmethode Schwebungen auf (Abb. 13).

Inversion-Recovery-Methode

Zur Bestimmung der transversalen und longitudinalen Relaxationszeit kann die Inversion-Recovery-Methode verwendet werden. Zuerst wird ein 180° Puls auf die Probe gegeben (Abb. 14).

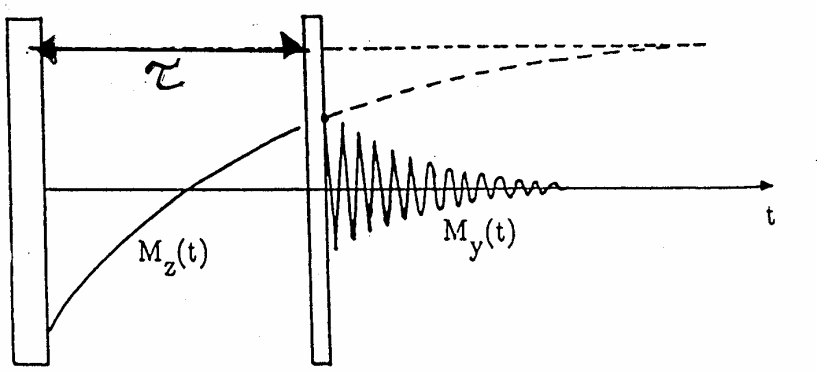


Abb. 14: Schema der Inversion-Recovery-Methode.

Dadurch wird der Magnetisierungs-Vektor in die negative *z*-Richtung ausgelenkt. Aufgrund der longitudinalen Relaxation relaxiert $\vec{M}$ in positive *z*-Richtung

$$M_Z(t) = M_0\left(1 - 2e^{-t/T_1}\right) .$$

Nach einer Zeit τ wird ein 90°-Puls auf die Probe gegeben. Dadurch wird $\vec{M}$ in die *xy*-Ebene gedreht, wodurch in der Detektionsspule Spannungen induziert werden. Aus dem Abfall dieses Signals kann die transversale Relaxation ermittelt werden. Die longitudinale Relaxation erhält man aus der Anfangsamplitude des transversalen Signals durch Veränderung von τ (siehe Abb. 14).

Spin-Echo-Methode

Der zeitliche Zerfall der transversalen Magnetisierung nach einem 90°-Puls wird in vielen Fällen durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes bewirkt, d.h. durch die Tatsache, dass das lokale Magnetfeld für verschiedene Atomkerne etwas variiert. Die Ursache können Inhomogenitäten des von außen angelegten Feldes sein, aber auch intern verursachte Inhomogenitäten sind denkbar, z.B. durch Dipolfelder der umgebenden Atomkerne. Diese Effekte kann man, solange sie zeitlich konstant sind, mit der Spin-Echo-Methode eliminieren. Der Grundgedanke der Spin-Echo-Methode ist in Abb. 15 dargestellt.

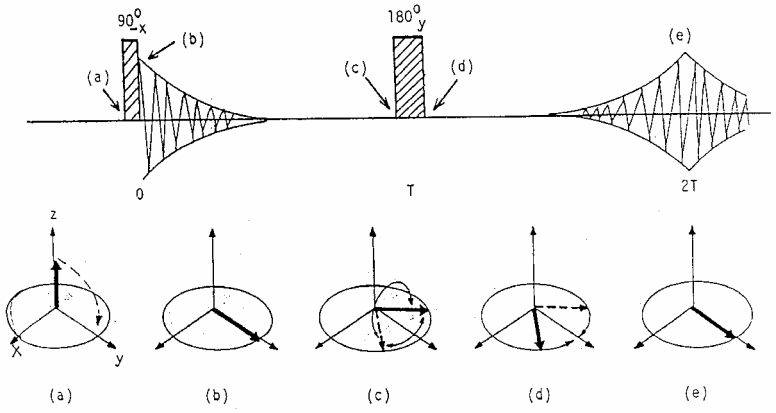


Abb. 15: Spin-Echo-Methode.

Nach einem 90°-Puls präzedieren die Spins im leicht inhomogenen Magnetfeld mit etwas verschiedenen Frequenzen und kommen dadurch mit der Zeit außer Phase. Die makroskopische Magnetisierung geht damit verloren. Wendet man aber nach einer bestimmten Zeit *T* einen 180° Puls an, dann werden alle Spinorientierungen umgedreht und die Spins laufen jetzt wieder aufeinander zu. Nach der Zeit 2*T* sind die Spins wieder in Phase, d.h. man erhält ein Echo. Wenn sich aber in der Zeit 2*T* Spin-Spin-Wechselwirkungen ereignet haben, so laufen die Spins nicht vollständig nach 2*T* zusammen, das Echo ist verkleinert oder gar nicht mehr vorhanden. Durch die Spin-Echo-Methode ist es also möglich, diese interessanten Effekte von den Effekten der Feldinhomogenitäten abzutrennen.

Viskositätsabhängigkeit von T_1 und T_2

Die longitudinale Relaxation der Magnetisierung zum Gleichgewichtszustand wird, wie oben beschrieben, durch Fluktuationen des lokalen *B*-Felds verursacht. Diese Felder haben eine gewisse Frequenzverteilung. Stimmt eine dieser Frequenzkomponenten mit der Larmorfrequenz des betrachteten Kerns überein, so kann die *z*-Komponente der Magnetisierung verändert werden. Da in Festkörpern die molekularen Bewegungen stark eingeschränkt sind, haben die meisten Fluktuationen des magnetischen Momentes Frequenzen unterhalb der Larmorfrequenz der Kerne. Deshalb ist T_1 sehr groß (bis zu Stunden). In Flüssigkeiten und Gasen sind die Bewegungen weniger eingeschränkt. Entsprechend ist T_1 viel kleiner (~ Sekunden). In Flüssigkeiten hängt T_1 von der Viskosität η ab (siehe Abb. 16).

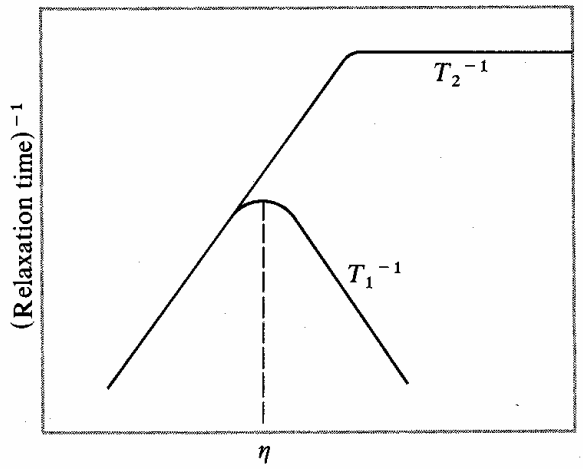


Abb. 16: Viskositätsabhängigkeit von T_1 und T_2 (doppelt logarithmisch aufgetragen).

Es ist ein Maximum von T_1^{-1} bei einer bestimmten Viskosität und ein Abfall für größere und kleinere Viskositäten zu sehen. Dies kann mit der Rotationskorrelationszeit τ_c erklärt werden. Für eine Kugel mit Radius *r* gilt

$$\tau_c = 4\pi\eta r^3 / kT$$

Die Korrelationszeit gibt an, wie lange ein Ensemble von orientierten magnetischen Momenten braucht, um in den statistischen Gleichgewichtszustand zu zerfallen (1/e-Abfall). Das Frequenzspektrum der transversalen Komponente des magnetischen Momentes hat daher im Bereich von τ_c^{-1} ein Maximum. Ist also eine Viskosität gegeben, so dass τ_c^{-1} der Larmorfrequenz der präzedierenden Kerne entspricht, so kommt es zu einer effektiven Wechselwirkung zwischen der transversalen Komponente der fluktuierenden Felder und der magnetischen Momente des Kerns.

Der Einfluss der Viskosität auf die transversale Relaxationszeit ist folgendermaßen: Ist η klein, so ist τ_c klein, so dass die Fluktuationen des lokalen B-Felds effektiv zu Null gemittelt werden. Die Kerne halten sich zu kurz in der Nähe der benachbarten Kerne auf, um deren Spin beeinflussen zu können. Deshalb folgt

$$1/T_2' \approx 0 \ .$$

Und damit

$$\frac{1}{T_2} \approx \frac{1}{2T_1} .$$

In diesem Fall ist die Halbwertsbreite des Übergangs gering (natural linewidth, extreme motional narrowing),

$$\Delta\omega_{1/2} \approx \frac{2}{T_2} \approx \frac{1}{T_1} \ .$$

Für hohe Viskositäten (d.h. langsame Bewegungen) beeinflussen die lokalen Felder immer mehr die transversale Relaxation, bis ein Plateau erreicht wird. (Die Halbwertsbreiten werden entsprechend größer)

Chemische Verschiebung

Die Larmorfrequenzen sind, wie oben beschrieben, abhängig von dem lokalen Feld am Kernort. Das von außen angelegte *B*-Feld $\vec{B}_0$ induziert ein schwaches Magnetfeld in der elektronischen Umgebung der Kerne, das proportional zu B_0 ist,

$$\vec{B}_0 \rightarrow \vec{B}_0 - \sigma\vec{B}_0$$

$$= \vec{B}_0(1-\sigma),$$

wobei σ der Abschirmkoeffizient ist (10^{-6}... 10^{-4}). Somit folgt für die Larmorfrequenz

$$\omega_L = \gamma\,(1-\sigma)\,B_0 \ .$$

Der Abschirmkoeffizient beschreibt also, wie sehr die lokale Umgebung des Kerns das von außen angelegte Feld beeinflusst. Da $\sigma \propto B_0$, wird die chemische Verschiebung wie folgt definiert,

$$\delta = \frac{B_{ref} - B_{sample}}{B_{ref}}$$

$$= \frac{\nu_{ref} - \nu_{sample}}{\nu_{ref}} \ .$$

Hier ist B_{ref} das beobachtbare Resonanz-*B*-Feld des betrachteten Kerns in einem Referenzmolekül und B_{sample} das *B*-Feld für den gleichen Kern in der zu untersuchenden Probe. Eine analoge Definition gilt für die Resonanzfrequenzen. Die chemische Verschiebung wird in 'parts per million' [ppm] angegeben. Als Referenzmoleküle werden meistens TMS und DSS verwendet.
Die chemische Verschiebung setzt sich aus drei Anteilen zusammen,

$$\delta = \delta_1 + \delta_2 + \delta_3 \ .$$

Der erste Term wird durch lokale diamagnetische Effekte bewirkt. Nach der Lenzschen Regel wirken die induzierten Ströme in den Elektronenschalen dem äußeren Feld entgegen. Der zweite Term setzt sich aus lokalen paramagnetischen Effekten zusammen, die durch die Anordnung von magnetischen Momenten (z.B. von paramagnetischen Ionen) in der Nachbarschaft des betrachteten Kerns hervorgerufen werden. Der dritte Term schließlich beschreibt den Einfluss von aromatischen Ringströmen. Abb. 17 zeigt diesen Effekt für Benzol.

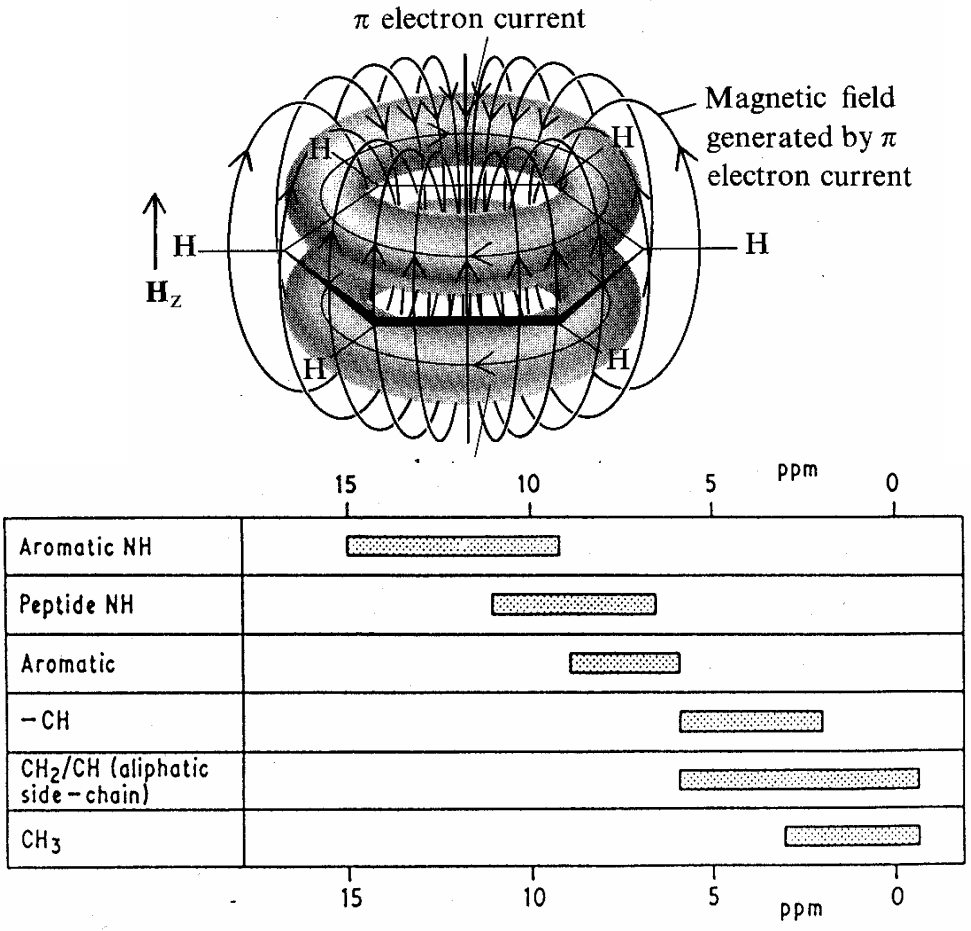


Abb. 17: Der Einfluss der Ringströme auf das lokale magnetische Feld, das von den aromatischen Protonen erfahren wird.

Die Protonen außerhalb des Benzolrings haben eine Resonanzfrequenz, die bei kleinen äußeren B-Feldern auftritt. Dies wird durch die Ringströme der sechs π-Elektronen verursacht. Die relativ großen Elektronenströme, die von dem externen B-Feld induziert werden, bewirken ein Magnetfeld, das außerhalb des Rings das externe Feld verstärkt. Somit erfahren die außerhalb der Ringströme liegenden Protonen ein stärkeres lokales Feld. Die Resonanzfrequenz wird daher bei einem schwächeren externen Feld erreicht (chemische Verschiebung: 1.48 ppm relativ zu den Protonen von Cyclohexadien). Einige weitere chemische Verschiebungen sind in Abb. 18 zu sehen. H-Brückenbildung verursacht ebenfalls eine chemische Verschiebung.

Abb. 18: Einige chemische Verschiebungen relativ zu $R-Si-(CH_3)_3$.

(Indirekte) Spin-Spin-Kopplung

Durch die Wechselwirkung von benachbarten Kernen mit dem betrachteten Kern kommt es zur Aufpaltung der Resonanzabsorptionslinie. Dieser Mechanismus wird von den Bindungselektronen der Kerne vermittelt. Die Spins der Bindungselektronen wechselwirken mit den Spins der eigenen Kerne. Dadurch wird wiederum der Kern des benachbarten Atoms beeinflusst. Dieser Effekt, der auch '*J*-Kopplung' genannt wird, ist unabhängig vom äußeren B-Feld. Die relative Aufspaltung der Resonanzlinien wird mit *J* angeben. Die Analyse ist einfach, falls die chemische Verschiebung zwischen den betrachteten Kernen sehr viel größer als *J* ist ($\Delta\delta >> J$); sie ist schwierig für $\Delta\delta \approx J$. Ist keine chemische Verschiebung vorhanden, so ist kein Effekt zu beobachten. Abb. 19 skizziert die Kernspins zweier Kerne *A* und *X*.

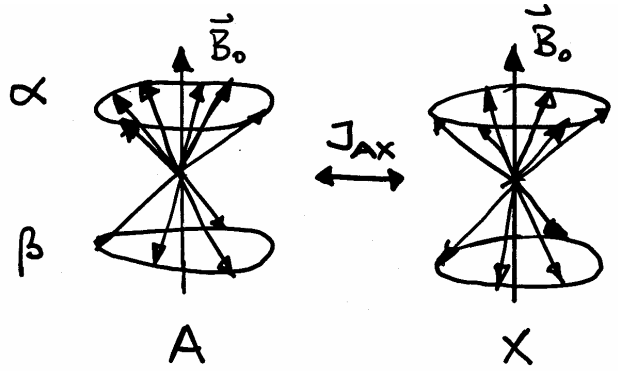


Abb. 19: Darstellung der Kernspins von Kern A und Kern X.

Ist keine Spin-Spin-Kopplung zwischen *A* und *X* vorhanden ($J_{AX} = 0$), so ergeben sich die Resonanzfrequenzen aus den chemischen Verschiebungen der beiden Atome zu

$$\omega_A = \gamma(1-\sigma_A)B_0 \ ,$$

$$\omega_X = \gamma(1-\sigma_X)B_0 \ .$$

Tritt Spin-Spin-Kopplung auf ($J_{AX} \neq 0$), so folgt

$$\omega_A(X_\alpha) = \omega_A + J_{AX} \ , \qquad \omega_X(A_\alpha) = \omega_X + J_{AX} \ ,$$

$$\omega_A(X_\beta) = \omega_A - J_{AX} \ , \qquad \omega_X(A_\beta) = \omega_X - J_{AX} \ .$$

Es kommt zu der unten dargestellten Aufspaltung (Abb. 20).

Abb. 20: Schema der Spin-Spin-Aufspaltung.

Die Aufspaltung beträgt zwischen 0 bis 20 Hz für Protonen. Abb. 21 zeigt die Aufspaltung bei der Ethoxy-Essigsäure.

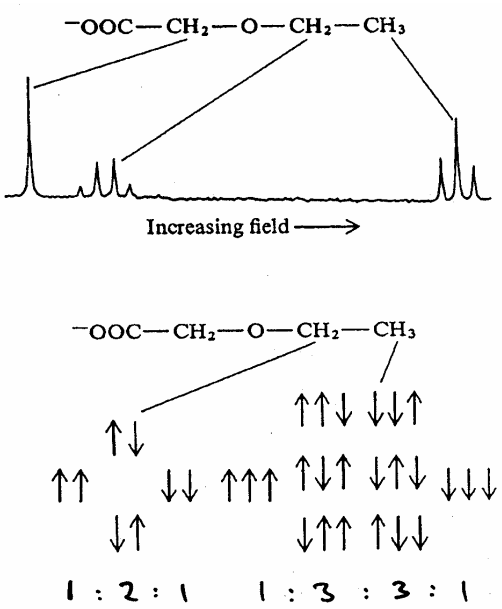


Abb. 21: NMR-Spektrum der Ethoxy-Essigsäure in wässriger Lösung. Das Spektrum mit den Linien der spezifischen Protonen ist oben, die Orientierung der Protonenspins in der Ethylgruppe ist unten gezeigt.

Die Methylgruppe zeigt eine dreifache, die Methylengruppe eine vierfache Aufspaltung. Die Abstände zwischen den verschiedenen Linien innerhalb des Tripletts und Quartetts sind gleich groß. Die Zahl der Multipletts und ihrer relativen Intensität kann durch die mögliche Orientierung der Protonenspins erklärt werden. Abb. 21 zeigt die drei verschiedenen Konfigurationen der Protonenspins für die Methylengruppe (Häufigkeitsverhältnis 1:2:1). Dadurch existieren drei verschiedene Kernspinumgebungen für die Methylgruppe, so dass deren Resonanzlinie in drei Linien mit dem Intensitätsverhältnis 1:2:1 aufspaltet. Entsprechend hat die Methylgruppe vier verschiedene Kernspinanordnungen. Deshalb zeigt die Methylengruppe vier Linien mit dem Intensitätsverhältnis 1:3:3:1.
Die Kopplungskonstante *J* enthält nützliche Information von der molekularen Struktur. Karplus zeigte 1959, dass für ein Ethan-ähnliches Molekül der Wert von *J* für die Wasserstoffkerne, die sich in der Nähe von Kohlenstoffen befinden, vom dihedralen Winkel ϕ abhängt, (Abb. 22).

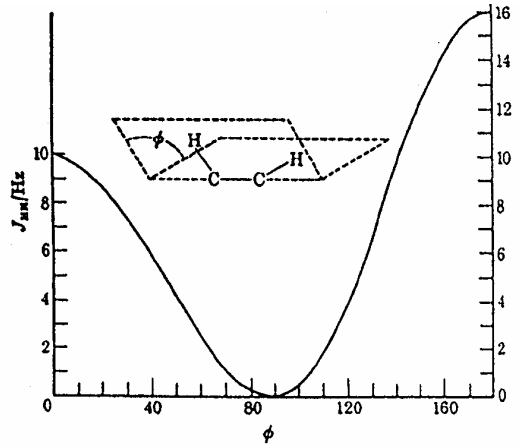


Abb. 22: Abhängigkeit der Kopplungskonstante vom dihedralen Winkel (Karplusgleichung).

$$J = A + B\cos\phi + C\cos 2\phi ,$$

wobei A, B und C Konstanten sind. Somit kann durch die Messung von *J* auf den dihedralen Winkel zurückgeschlossen werden.

Chemischer Austausch

Mit NMR-Messungen können auch Ratenprozesse untersucht werden. Es wird ein Molekül mit zwei verschiedenen Konformationen (A und B), bzw. ein Kern (Proton), der sich zwischen zwei Orten (A und B) bewegen kann, betrachtet,

$$A \underset{k_B}{\overset{k_A}{\rightleftharpoons}} B ,$$

mit $k_{A,B} = 1/\tau_{A,B}$ ($\tau_{A,B}$ ist gleich der Aufenthaltsdauer im Zustand A bzw. B). Falls die Aufenthaltszeiten in Zustand A und B groß sind gegenüber der Differenz der beiden Resonanzfrequenzen in Zustand A und B ($\Delta\omega$)

$$\tau_A >> (\Delta\omega)^{-1} \qquad \tau_B >> (\Delta\omega)^{-1},$$

so sind zwei getrennte Linien im Spektrum zu sehen (Abb. 23).

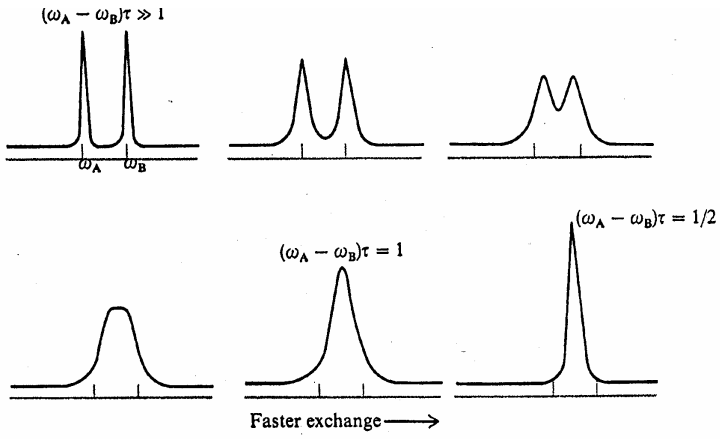


Abb. 23: Die Auswirkung des chemischen Austauschs auf die NMR-Spektren. Der Austausch eines Kerns zwischen den Orten A und B mit den Resonanzfrequenzen ω_A und ω_B wird betrachtet. Gleiche Population und gleiche Aufenthaltsdauern sind für beide Zustände angenommen.

Die transversale Relaxationszeit des Zustands A ergibt sich dann zu

$$T_2^{-1}(A)_\tau = T_2^{-1}(A)_\infty + \tau_A^{-1} ,$$

wobei $T_2^{-1}(A)_\infty$ die Relaxationszeit ohne chemischen Austausch ist. Der chemische Austausch verringert also T_2 und bewirkt daher eine Linienverbreiterung des Übergangs. Für den anderen Limes ('fast exchange limit'; $\tau_A << (\Delta\omega)^{-1}$, $\tau_B << (\Delta\omega)^{-1}$) wird nur eine Linie gemessen (Abb. 23). Unter diesen Bedingungen folgt für die transversale Relaxationszeit

$$T_2^{-1} = \chi_A T_2^{-1}(A)_\infty + \chi_B T_2^{-1}(B)_\infty + \chi_A^2 \chi_B^2 \Delta\omega^2 (\tau_A + \tau_B) .$$

Hier sind χ_A und χ_B die Anteile der Kerne in Zustand A und B. Durch die schnellen Fluktuationen verlieren die zwei Zustände ihre Identität. Es wird nur noch eine gemittelte (verbreiterte) Linie beobachtet.

Das Zuweisungsproblem

Ein kleines Protein hat um die 1000 oder mehr Protonen. Die NMR-Spektrallinien dieser Protonen fallen alle in einen Bereich von wenigen ppm. Es ist somit schwierig, die Linien eines Proteinspektrums den einzelnen Protonen zuzuweisen. Man kann eine grobe Abschätzung eines Spektrums eines Proteins bekommen, indem man die Beiträge der verschiedenen Seitenketten der auftretenden Aminosäuren aufsummiert. Das so erhaltene Spektrum stimmt relativ gut mit dem Spektrum des denaturierten Proteins überein. Abb. 24 zeigt dies für Lysozym.

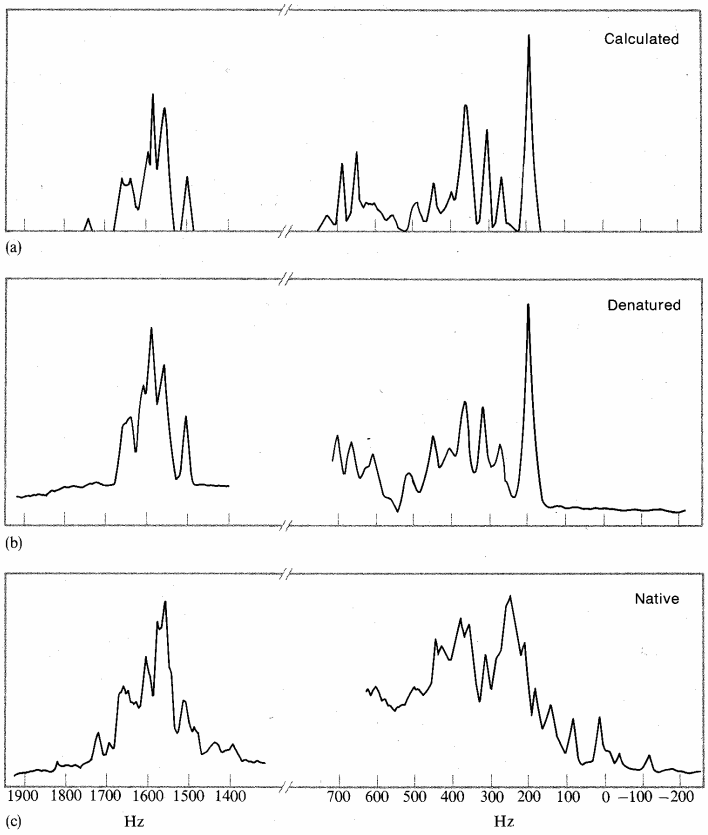


Abb. 24: Spektrum von Lysozym in D_2O relativ zu der DSS-Referenz. a) Aus der Aminosäurenzusammensetung berechnetes Spektrum. b) Gemessenes 220 MHz-Spektrum für denaturiertes Lysozym. c) Gemessenes 220 MHz-Spektrum für natives Lysozym.

Das native Lysozym-Spektrum zeigt dagegen ein komplizierteres Spektrum. Dieser Unterschied folgt aus den Veränderungen der magnetischen Umgebung vieler Kerne im nativen Zustand aufgrund der Faltung des Proteins. Das Spektrum enthält somit viel Information zur Struktur des Proteins, welche aber nicht leicht zu erhalten ist.
Zur Zuweisung der einzelnen Linien können folgende Strategien angewandt werden: Da die chemische Verschiebung durch Ringströme, wie oben gezeigt, besonders groß ist, können die dabei involvierten Protonen relativ leicht identifiziert werden (z.B.: p in Histidin). Paramagnetische Ionen (z.B. Eisen, Mangan) erzeugen charakteristische Verschiebungen. Weitere Punkte sind: die chemische Modifikation und die Ligandenbindung, Austauschkinetiken von labilen Protonen, Isotopenaustausch und die Doppelresonanzmethode (siehe unten).
Ein weiteres Beispiel für den Einfluss des lokalen Feldes auf die NMR-Spektren ist in Abb. 25 skizziert. In der Lösung sind die Umgebungen der Protonen bei 2 und 6 und die der Protonen bei 3 und 5 gleich. Somit ergeben sich 3 verschiedene Linien. (Die Flächen sind

entsprechend der Anzahl der Protonen 2:1:2.) Da in einem globulären Protein auf die Protonen verschiedene lokale Felder wirken, verursachen alle Protonen eine andere Linie im Spektrum. Dies kann experimentell bestimmt werden, indem NMR-Spektren eines globulären Proteins bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen werden. Bei niedrigen Temperaturen sind fünf Peaks zu sehen. Bei höheren Temperaturen (z.B. 72° Celsius) werden aufgrund der Denaturierung des Proteins drei Peaks gemessen.

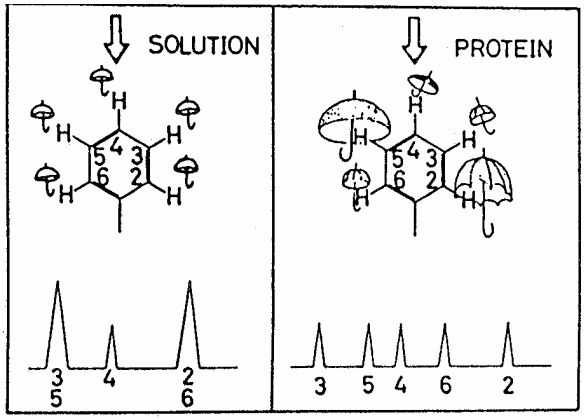


Abb. 25: Skizze der NMR-Spektren eines Phenylalanin-Rings in Lösung (links) und in einem globulären Protein (rechts). Die Schirme skizzieren die Abschirmeffekte des äußeren B-Feldes.

Doppelresonanz

Die Spin-Spin-Kopplung verursacht, wie oben dargestellt, eine Aufspaltung der Linien des NMR-Spektrums. Um diese Aufspaltung den beteiligten Kernen zuordnen zu können, kann die Doppelresonanzmethode verwendet werden. Dazu wird bei einer Resonanzfrequenz ein zusätzliches B-Feld eingestrahlt und die Veränderungen der anderen Resonanzen beobachtet. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die räumliche Nachbarschaft der Kerne gewinnen. Betrachtet werden zwei *J*-gekoppelte Spins, siehe Abb. 26 .

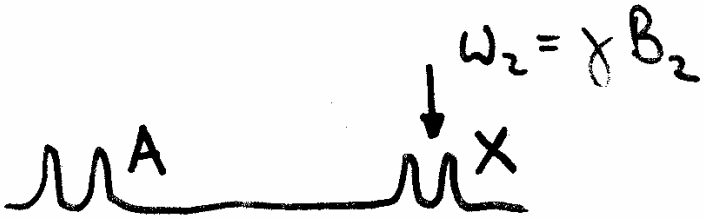


Abb. 26: J-gekoppelte Kerne A und X.

Wird nun selektiv mit einem zusätzlichen *B*-Feld der Frequenz $\omega_2 = \gamma B_2$ eingestrahlt, so führt dies zu einem Kollaps des Dubletts des Kern *A*, da der Kernspin des Kerns *X* sehr schnell aufgrund des zusätzlichen Feldes zwischen dem up- und down-Zustand wechselt. Dadurch wird die *J*-Aufspaltung zu Null gemittelt.
Ein weiterer Effekt ist der **Kern-Overhauser Effekt (NOE)**: Sind zwei Kernspins, die sich in enger Nachbarschaft (d < 5 Å) befinden, durch die magnetische Wechselwirkung stark gekoppelt, so führt die Veränderung der Population der Niveaus eines Spins zu einem Magnetisierungstransfer zu dem anderen Spin. Dies führt zu einer Veränderung der Fläche des Peaks. Die Wechselwirkung ist proportional zu $1/r^6$. Im Unterschied zur *J*-Kopplung wird

die Wechselwirkung nicht von den Bindungselektronen vermittelt, sondern sie geht 'über den Raum'.

Zweidimensionale NMR

Zur systematischen Bestimmung der Anordnungen der Kerne wurde eine große Zahl ausgeklügelter Pulstechniken entwickelt. Bei diesen Methoden kann zwischen vier verschiedenen Phasen unterschieden werden: Präparation, Evolution, Mischung, Detektion. Dies ist in Abb. 27 dargestellt. Die FID-Messungen werden während der Zeit t_2 durchgeführt. t_1 wird zwischen 0 und t_{max} variiert. Im Folgenden sollen zwei dieser Methoden näher erläutert werden.

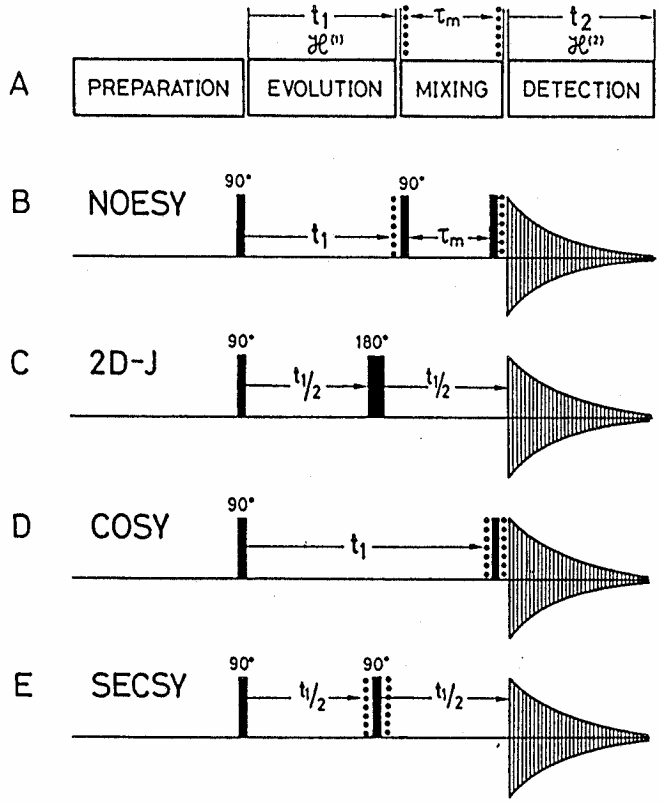


Abb. 27: A: Allgemeines experimentelles Schema für die 2D-NMR. B-E: Vier verschiedene Proton-2D-NMR-Experimente. Die gepunktete Linie kennzeichnet den Mischungsbereich. Die 2D-J-Spektroskopie hat keine Mischungsperiode.

Correlated Spectroscopy (COSY)

Bei dieser Methode, mit der die *J*-Kopplung bestimmt werden kann, sieht die Pulssequenz wie in Abb. 28 dargestellt aus.

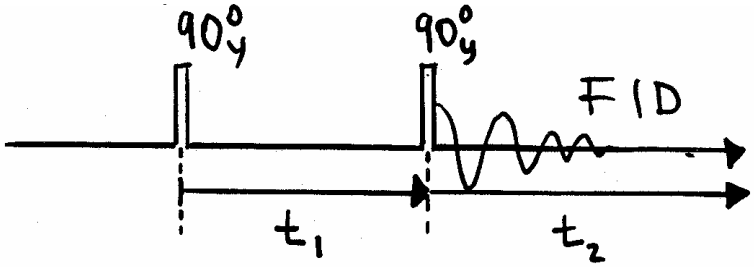


Abb. 28: Pulsfolge bei der COSY-Methode.

Der erste Puls ist ein 90°-Puls um die y-Achse. Nach einer Zeit t_1 folgt ein weiterer 90°-Puls um die y-Achse. Während der Zeit t_2 wird die FID aufgenommen. Da viele FID-Messungen bei verschiedenen t_1 -Zeiten aufgenommen werden, erhält man eine zweidimensionale Funktion S in Abhängigkeit von t_1 und t_2. Daraus bekommt man mittels zweimaliger Fouriertransformation ein zweidimensionales Spektrum

$$S(t_1;t_2) \underset{t_2}{\overset{FT}{\rightarrow}} S(t_1;\omega_2) \underset{t_1}{\overset{FT}{\rightarrow}} S(\omega_1;\omega_2) \ .$$

Im Folgenden soll dies für einen einzelnen Spin ohne *J*-Kopplung dargestellt werden. Das externe *B*-Feld sei in *z*-Richtung, das pulsierende *B*-Feld in *y*-Richtung ausgerichtet. Vor dem ersten Puls befindet sich die Magnetisierung also in *z*-Richtung. Der erste Puls dreht *M* in die *x*-Richtung (Abb. 29).

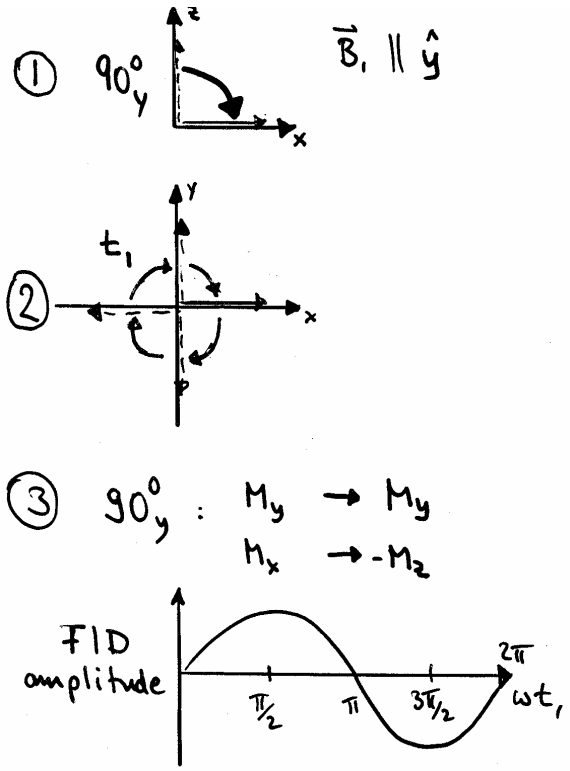


Abb. 29: Schema von COSY.

Während der Zeit t_1 präzediert die Magnetisierung um die *z*-Achse. Der zweite Puls bewirkt nun, dass die *y*-Komponente der Magnetisierung gleich bleibt, die *x*-Komponente aber in die (negative) *z*-Komponente übergeht (Abb. 29). Das hat zur Folge, dass die Amplitude der FID-Messungen mit der Zeit t_1 oszilliert: Für $t_1 = 0$ ist die Magnetisierung vollständig in der *x*-Richtung. Da der zweite Puls die Magnetisierung in die *z*-Richtung dreht und keine transversale Komponente vorhanden ist, wird kein Signal gemessen. Wird der zweite Puls nach einer Phasenverschiebung von 90° eingeschaltet ($\vec{M}$ zeigt zum Einschaltzeitpunkt in negativer *y*-Richtung), so bleibt die Magnetisierung vollständig in der *xy*-Ebene. Dies bedeutet, dass die Amplitude des FID maximal ist. Werden diese Messungen zweidimensional Fourier-transformiert, so erhält man für ungekoppelte Kerne nur Werte auf der 1.Winkelhalbierenden (Abb. 30).

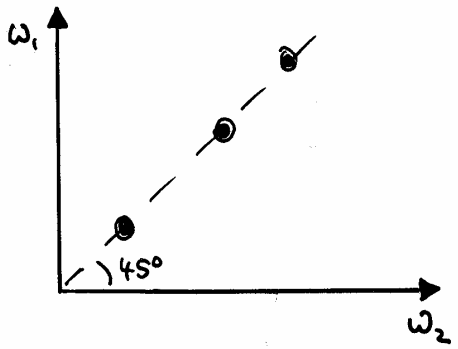


Abb. 30: Zwei-dimensionales NMR-Spektrum ohne J-Kopplung.

Im Folgenden wird ein *J*-gekoppeltes Kernspinsystem betrachtet. Das Spektrum der Kerne *A* und *X* bestehe jeweils aus zwei Linien (Abb. 31).

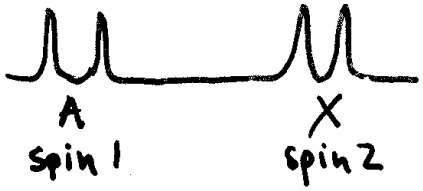


Abb. 31: Schema des NMR-Spektrums der zwei J-gekoppelten Kerne.

Der erste Puls dreht die Magnetisierung von Spin 1 aus der *z*-Richtung in die *x*-Richtung (Abb. 32).

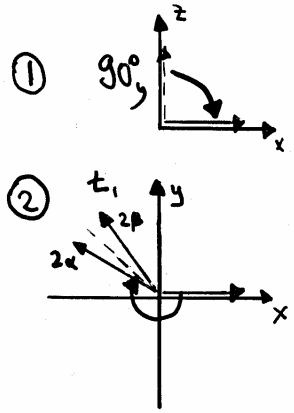


Abb. 32: Schema von COSY für J-gekoppelte Kerne

Während der Zeit t_1 rotiert die Magnetisierung um die *z*-Achse. Sie wird dabei in zwei gleich große Komponenten aufgespalten, da der Puls auch den Spin 2 (wegen der endlichen Frequenzbreite des Pulses) in die transversale Ebene gedreht hat (Abb. 32). Der zweite 90°-Puls hat nun zwei Effekte zur Folge. Erstens werden wieder die Komponenten der Magnetisierung gedreht

$$M_y \rightarrow M_y ,$$

$$M_x \rightarrow -M_z .$$

Dies bewirkt eine FID-Modulation mit

$$\sin \omega_1 t_1 \cdot \sin \pi J_{12} t_1 \ .$$

Außerdem verursacht der zweite Puls eine *z*-Komponente mit einer $-\cos\omega_1 t_1 \cos\pi J_{12} t_1$-Abhängigkeit für Spin 1 und eine $-\cos\omega_2 t_1 \cos\pi J_{12} t_1$-Modulation für Spin 2. Der entscheidende Punkt dabei ist, dass die Aufspaltung in eine langsame und schnelle Komponente durch die *z*-Magnetisierung des anderen Kerns bestimmt wird. Die ω_1 und ω_2-Terme werden also gemischt. Abb. 33 zeigt ein typisches Spektrum. Mit der COSY-Methode lassen sich Kopplungen von Kernen bis zu einem Abstand von 4 Å ermitteln.

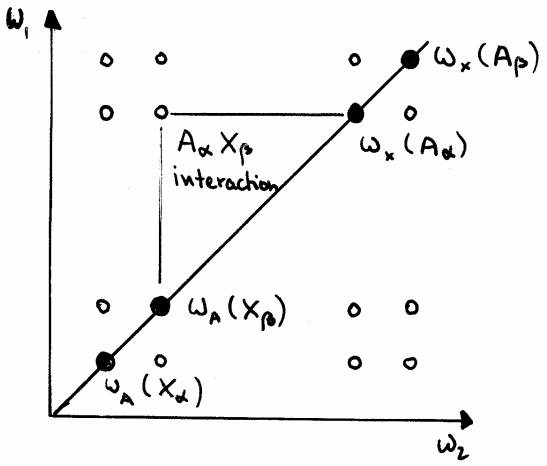


Abb. 33: Zweidimensionales Spektrum für J-gekoppelte Kerne.

Nuklearer Overhauser-Effekt-Spektroskopie (NOESY)

Mit der NOESY ist es ebenfalls möglich, räumliche Anordnungen von Proteinen zu untersuchen. Da der Kern-Overhauser-Effekt auf eine Wechselwirkung durch den Raum beruht und nicht durch die Bindungselektronen vermittelt wird, können mit NOESY komplementäre Informationen zu COSY gewonnen werden. Die Pulsfolge von NOESY ist in Abb. 34 aufgeführt.

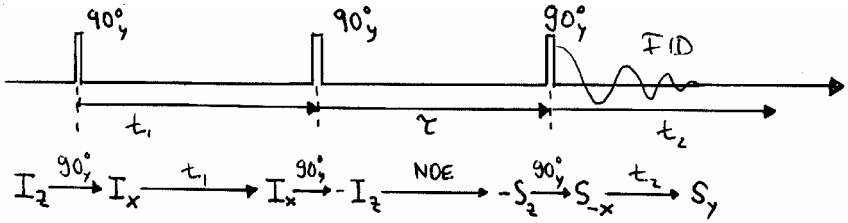


Abb. 34: Pulsfolge und Drehimpulsskizze bei der NOESY-Methode.

Die Pulsfolge besteht aus drei 90°-Drehungen um die *y*-Achse. Die Auswirkungen auf die Magnetisierung von Kern *I* und Kern *S* ist ebenfalls in Abb. 34 skizziert. Vor dem ersten Puls zeigt der Magnetisierungsvektor in *z*-Richtung. Der erste Puls dreht die Magnetisierung in die *x*-Richtung. Nach der Zeit t_1 hat der betrachtete Kern *I* eine gewisse *x*-Komponente, die mittels des zweiten Pulses in die negative *z*-Richtung gedreht wird. Nun wird mittels des Nuklearen Overhauser Effekts während der Zeit τ die Magnetisierung von Kern I auf den Kern S transferiert. Der dritte Puls dreht schließlich die *z*-Komponente von S in die *x*-Komponente. Während der Zeit t_2 wird die FID aufgenommen. Ähnlich wie bei den Spektren von COSY treten Peaks außerhalb der Winkelhalbierenden auf. Diese können bis zu Kernabständen von ungefähr 5 Å gemessen werden. Eine COSY-Messung an Inhibitor K ist in Abb. 35 zu sehen.

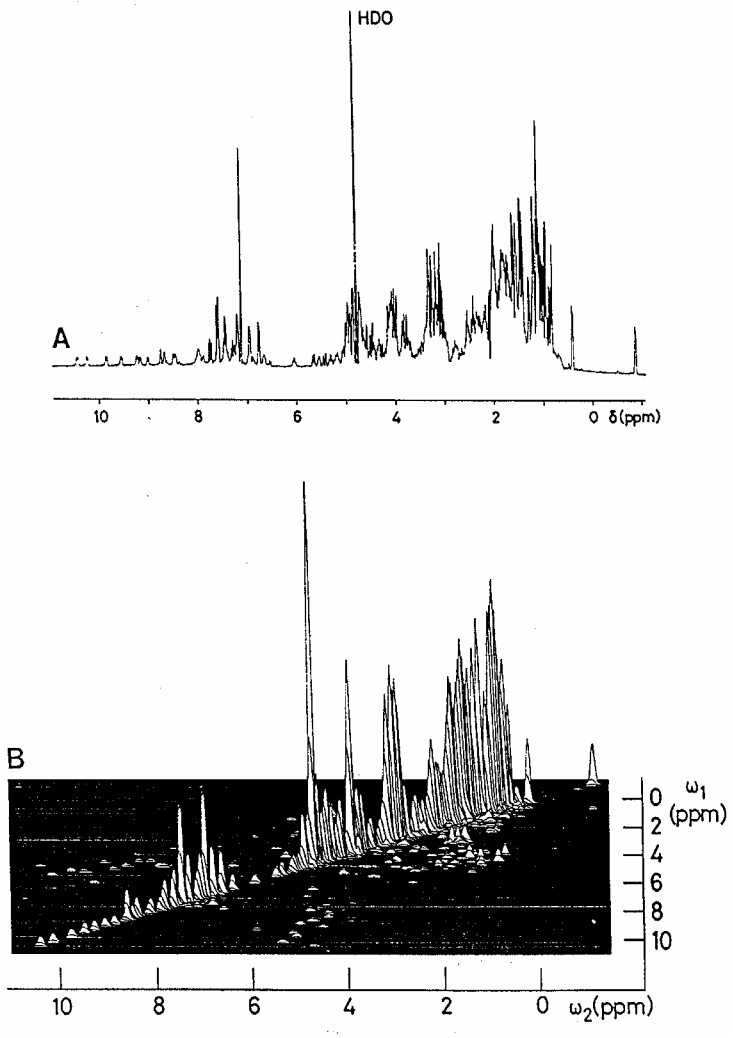


Abb. 35: ^{1}H COSY-Messung an einer D_2O Lösung von Inhibitor K. A: 1D-NMR B: 2D-NMR.

Man sieht, dass die Peaks auf der Diagonalen in der Regel viel stärker sind als die außerhalb der Diagonalen. Das nächste Beispiel (Abb. 36) zeigt eine NOESY-Aufnahme der Protonen von BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor), siehe. Hiermit lässt sich die Strukturbestimmung mittels der NMR-Methode illustrieren.

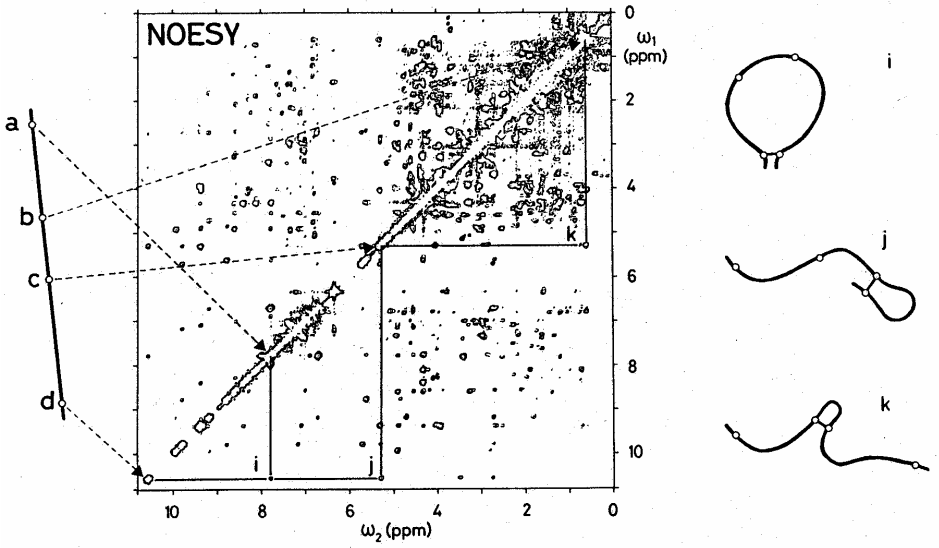


Abb. 36: ^{1}H NOESY-Spektrum für BPTI. Vier Protonen sind markiert (links). Mögliche Anordnungen der Protonen aufgrund der ´cross peaks´ sind rechts zu sehen.

Drei Peaks (i, j, k) außerhalb der Diagonale sind markiert. Diese Peaks ('cross peaks') sind mit horizontalen und vertikalen Linien mit den Positionen der Protonen (a - d), die die 'cross peaks' aufgrund des NOE verursachen, verbunden. Links davon ist die Polypeptidkette mit einer geraden Linie dargestellt, worin die betrachteten Protonen eingezeichnet sind. Die gestrichelten Linien geben ihre Position in der Diagonale des Spektrums an. Auf der rechten Seite sind drei Strukturen der Polypeptidkette zu sehen, die mit den 'cross peaks' i, j, k im Einklang sind. Zum Beispiel zeigt das Auftreten des Peaks i, dass die Kerne a und d sich räumlich sehr nah sind. Dies kann durch die gezeigte Ringstruktur (Abb. 36, oben rechts) erfüllt werden.

Da die COSY- und die NOESY-Methode komplementäre Aussagen über die Anordnung der Kerne (Protonen) liefern, ist es sinnvoll, beide Methoden gleichzeitig zu verwenden. Dies ist in Abb. 37 dargestellt. Mit dem COSY-Experiment werden 'cross peaks' von Protonen identifiziert, die durch kovalente Bindungen verbunden sind. In der Regel können die Peaks nur gemessen werden, falls die Protonen nicht mehr als 3 chemische Bindungen von einander entfernt sind. Somit können mit COSY die verschiedenen Aminosäuren gefunden werden. In Abb. 37 sind die mit der COSY-Methode identifizierten Spinsysteme eingerahmt eingezeichnet. Mit der NOESY-Methode können die Anordnungen der verschiedenen Aminosäuren zueinander aufgeklärt werden. Die damit gefundenen Informationen sind in Abb. 37 mit Pfeilen eingezeichnet. Diese Zuordnungen können durch eine gemeinsame Darstellung einer COSY- und einer NOESY-Messung gefunden werden (Abb. 38).

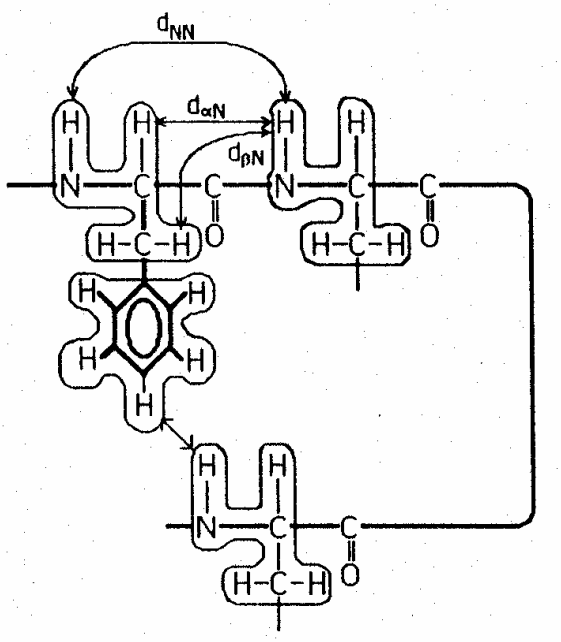


Abb. 37: Strukturbestimmung mittels COSY und NOESY.

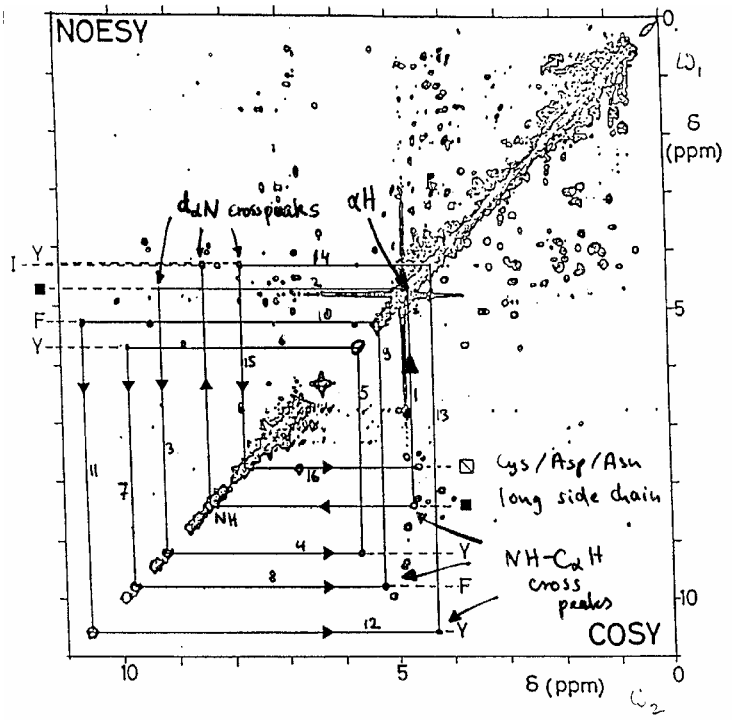


Abb. 38: Gleichzeitige Darstellung von COSY- und NOESY-Spektren von ^{1}H NMR-Messungen an BPTI.

In der Abbildung ist der Weg zur Zuordnung einiger Protonen eingezeichnet: Das Proton des Wasserstoffatoms, das mit dem Stickstoffatom verbunden ist (siehe auch Abb. 37), ist mit NH markiert. Verfolgt man die horizontale Linie nach rechts, so trifft man auf einen ´cross peak´ im COSY-Spektrum. Geht man von dort vertikal entlang der mit 1 bezeichneten Linie, so trifft man auf den mit dem C_α verbundenen Wasserstoff . Entlang der mit 2 gekennzeichneten Linie triff man dann auf den mit der NOESY-Methode gemessen ´cross peak´, der durch die Wechselwirkung mit dem Proton der nächsten Peptideinheit verursacht ist (in Abb. 37 mit $d_{\alpha N}$ bezeichnet). Auf diese Art und Weise lassen sich auch die Lagen der anderen Protonen bestimmen.

Wechselwirkung zwischen Licht und Materie

In den folgenden Kapiteln wird auf einige optische Spektroskopien eingegangen. Dazu sollen zuerst verschiedene Aspekte der Wechselwirkung von Licht und Materie betrachtet werden. Licht wird klassisch als elektromagnetische Welle beschrieben. Abb. 1 zeigt eine ebene elektromagnetische Welle der Frequenz ω, bei der das elektrische Feld in *x*- und das magnetische Feld in *y*-Richtung schwingt. Die Welle breitet sich in z-Richtung aus.

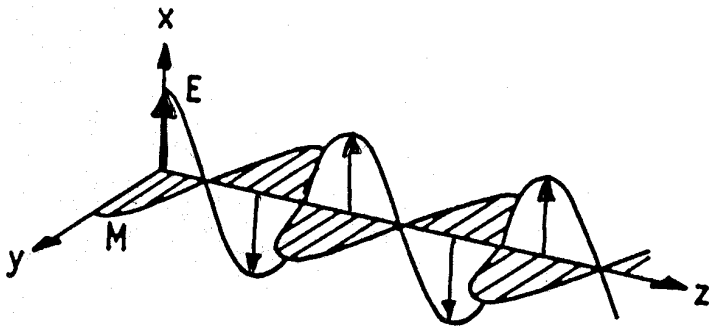


Abb. 1: Darstellung einer elektromagnetischen Welle.

Für das elektrische Feld gilt

$$\vec{E}_x(z,t) = \hat{x}\, E_0 \cdot \cos(k\, z - \omega\, t) \ ,$$

mit der Wellenzahl $k = 2\pi/\lambda$, der Frequenz $\omega = 2\pi/T$ und der Amplitude des elektrischen Feldes E_0. Elektromagnetische Wellen sind transversale Wellen; sie lassen sich polarisieren. In Abb. 2 sind die Projektionen der *E*-Vektoren einer unpolarisierten, einer in *x*-(*y*-)Richtung polarisierten und einer partiell polarisierten elektromagnetischen Welle auf die Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung zu sehen.

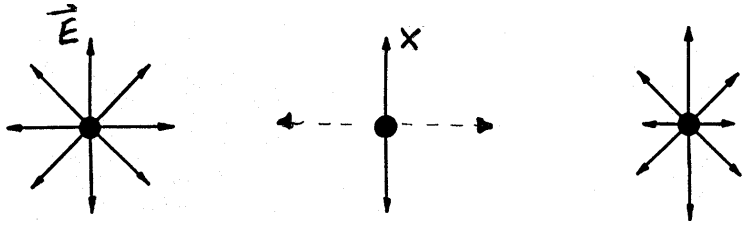


Abb. 2: Polarisation einer ebenen elektromagnetischen Welle. Links: unpolarisiert; Mitte: linear in *x*-(*y*-)Richtung polarisiert, rechts: partiell polarisiert.

Des Weiteren kann auch zirkulare Polarisation auftreten. Hier beschreibt der elektrische Feldvektor eine spiralförmige Bewegung im Raum. Diese Situation kann als Überlagerung von zwei linear polarisierten ebenen Wellen beschrieben werden, deren Polarisationsrichtungen senkrecht zueinander stehen und zwischen denen ein Phasenunterschied von 90° besteht (Abb. 3). Mathematisch kann die rechtszirkulare Welle also mit

$$\vec{E}_R(z_0,t) = \frac{1}{2}(\hat{x}E_0 \cos\omega t - \hat{y}E_0 \sin\omega t)$$

und die linkszirkulare Welle mit

$$\vec{E}_L(z_0,t) = \frac{1}{2}(\hat{x}E_0 \cos\omega t + \hat{y}E_0 \sin\omega t)$$

dargestellt werden.

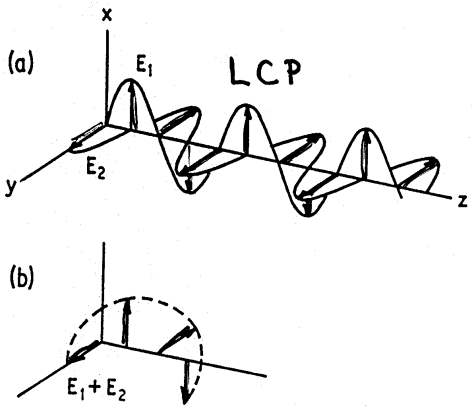


Abb. 3: Darstellung einer zirkular polarisierten Welle (b) mit zwei senkrecht zu einander linear polarisierten Wellen mit 90° Phasenunterschied (a).

Aus der Quantenmechanik folgt, dass Licht als aus Teilchen (Photonen) bestehend beschrieben werden kann. Die Energie E und der Betrag des Impulses p des Photons sind gegeben durch

$$E = h\nu = \hbar\omega \qquad \text{und} \qquad p = \frac{E}{c} = \frac{h}{\lambda} \ .$$

Das Spektrum der elektromagnetischen Wellen erstreckt sich über viele Größenordnungen (Tab. 1).

Tab. 1: Elektromagnetische Strahlung verschiedener Energien.

Name and (Approx.) Range of Radiation	Energy per Photon (J)	Frequency ν (Hz)	Wavelength λ (m)	Common Units of Length for Comparison
(Electrons)	10^{-11}	10^{22}	10^{-13}	
	10^{-12}	10^{21}	10^{-12}	picometer (pm)
γ-rays	10^{-13}	10^{20}	10^{-11}	
	10^{-14}	10^{19}	10^{-10}	
X-rays	10^{-15}	10^{18}	10^{-9}	nanometer (nm)
(Neutrons)	10^{-16}	10^{17}	10^{-8}	
	10^{-17}	10^{16}	10^{-7}	
u.v.	10^{-18}	10^{15}	10^{-6}	micrometer (μm)
Visible light	10^{-19}	10^{14}	10^{-5}	
i.r.	10^{-20}	10^{13}	10^{-4}	
	10^{-21}	10^{12}	10^{-3}	millimeter (mm)
	10^{-22}	10^{11}	10^{-2}	
Microwaves	10^{-23}	10^{10}	10^{-1}	
	10^{-24}	10^{9}	1	meter (m)
	10^{-25}	10^{8}	10^{1}	
	10^{-26}	10^{7}	10^{2}	
Radio frequencies	10^{-27}	10^{6}	10^{3}	kilometer (km)
	10^{-28}	10^{5}	10^{4}	
	10^{-29}	10^{4}	10^{5}	
	10^{-30}	10^{3}		

In früheren Kapiteln wurde schon auf elektromagnetische Strahlung mit verschiedenen Energien eingegangen (z.B. γ-Strahlen (Mößbaureffekt), Röntgenstrahlen (Röntgenbeugung), Radiostrahlen (NMR)). Im Folgenden wird insbesondere das infrarote bzw. sichtbare Spektrum betrachtet. In der Regel wird dabei die Energie der Photonen in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ angegeben $\left(E \sim p \sim \tilde{\nu}\right)$. Es gilt

$$\tilde{\nu} = \frac{k}{2\pi} = \lambda^{-1} \qquad [\mathrm{cm}^{-1}].$$

Zum Beispiel entspricht $\lambda = 10^{-6}\,\mathrm{m}$ der Wellenzahl $\tilde{\nu} = 10^{4}\,\mathrm{cm}^{-1}$.

Wechselwirkungsprozesse

Betrachtet werden Moleküle mit den Zuständen *i* und *j* (Abb. 4).

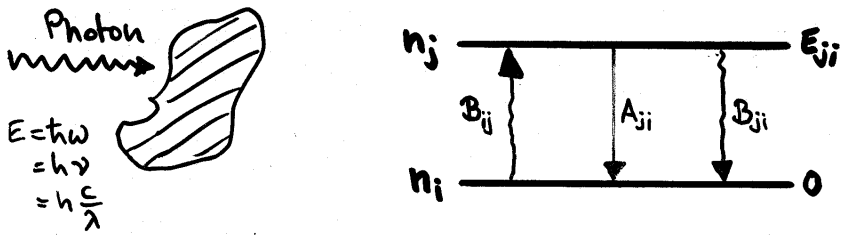


Abb. 4: Ein Photon trifft auf Materie, die die Zustände *i* und *j* besitzt.

Die Besetzungszahlen für die beiden Zustände mit Energieunterschied $E_{ji} = E_j - E_i$ sind n_i und n_j. Treten nun Photonen in Wechselwirkung mit dem Zweizustands-System, so können drei Prozesse beobachtet werden: Zum einen kann ein Photon, dessen Energie gleich E_{ji} ist, absorbiert werden und ein Elektron des betrachteten Moleküls in den höheren Zustand *j* anregen (induzierte Absorption). Dieser Prozess wird mit dem Einsteinkoeffizienten B_{ij} beschrieben. Analog kann das Photon Moleküle im angeregten Zustand *j* veranlassen, unter Emission eines Photons mit gleicher Frequenz und Ausstrahlrichtung in den tieferen Zustand *i* überzugehen (induzierte Emission, B_{ji}). Schließlich kann ein angeregtes Molekül seine Anregungsenergie auch spontan, d.h. ohne äußeres Feld, durch Lichtemission abgeben (spontane Emission, A_{ji}). Die Einsteinkoeffizienten hängen miteinander zusammen. Für die Koeffizienten der induzierten Emission bzw. Absorption gilt

$$B_{ij} = B_{ji} \ .$$

Im thermischen Gleichgewicht sind die Zustände gemäß dem Boltzmann-Gesetz verteilt,

$$\frac{n_j}{n_i} = \exp\left(-E_{ji}/kT\right) \ .$$

Das Plancksche Strahlungsgesetz lautet für die spektrale Energiedichte

$$I(\omega_{ij}) = \frac{\omega_{ij}^2}{\pi^2 c^3} \ \frac{1}{e^{\hbar\omega_{ij}/kT} - 1} \hbar\omega_{ij} \ ,$$

wobei der erste Term die Zustandsdichte, der zweite den Bosefaktor und der letzte die Energie der Photonen beschreibt. Im thermischen Gleichgewicht gilt

$$I(\omega_{ij}) B_{ij} n_i = I(\omega_{ij}) B_{ji} n_j + A_{ji} n_j \ .$$

Daraus folgt

$$A_{ji} = \frac{\hbar\omega_{ij}^3}{\pi^2 c^3} B_{ij} \ .$$

Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von spontaner Emission im Vergleich zur induzierten Emission mit größer werdender Übergangsfrequenz zwischen den Zuständen stark zunimmt.
Ein angeregtes Atom kann also seine Anregungsenergie in Form von elektromagnetischer Strahlung wieder abgeben (spontane Emission). Dies kann klassisch mit einem gedämpften harmonischen Oszillator beschrieben werden. Daraus folgt, dass die Amplitude der Schwingung exponentiell abnimmt. Für die Besetzungszahl im Niveau *j* bedeutet dies

$$n_j(t) = n_j(0)\, e^{-A_{ji}t} \quad ,$$

wobei die Lebensdauer $\tau = A_{ji}^{-1}$ ist. Die Linienbreite Γ folgt aus der Heisenbergschen Unschärferelation $\Gamma\tau = \hbar$ zu

$$\Gamma = \hbar A_{ji} .$$

Als Linienform des Übergangs erhält man aus der Fouriertransformation der gedämpften Schwingung eine Lorentzfunktion,

$$\mathrm{I}(\omega) = \frac{1}{\left(\omega - \omega_{ij}\right)^2 + \left(\frac{\Gamma}{2}\right)^2} .$$

Im Experiment können weitere Linienverbreiterungseffekte auftreten durch molekulare Bewegungen (Dopplereffekt), Strukturheterogenität, Effekte von der Umgebung (Lösungsmittel).
Im Folgenden soll die induzierte Absorption näher betrachtet werden. Das elektromagnetische Feld wird als kleine Störung (erster Ordnung) der gegebenen Ladungsverteilung behandelt. Es wird ein Zweiniveausystem betrachtet (Abb. 5).

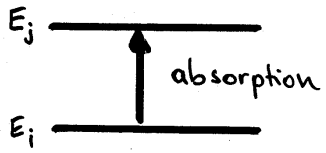


Abb. 5: Induzierte Absorption bei einem Zweiniveausystem.

Ohne äußeres Feld erhält man aus der zeitunabhängigen Schrödingergleichung die Eigenwerte E und Wellenfunktionen ψ der Zustände *i* und *j*,

$$H\,\psi_i = E_i\psi_i \ , \qquad H\,\psi_j = E_j\psi_j \ ,$$

wobei *H* der Hamiltonoperator ist. Wird nun das elektromagnetische Feld eingeschaltet, so kann dessen Einfluss mit dem zeitabhängigen Operator *V(t)* beschrieben werden. Wird nur die elektrische Dipolwechselwirkung betrachtet, so folgt

$$V(t) = -\vec{\mu}\cdot\vec{E}_0 \ \cos\omega t = -\frac{1}{2}\vec{\mu}\cdot\vec{E}_0\left(e^{i\omega t} + e^{-i\omega t}\right)$$

mit dem Dipoloperator $\vec{\mu}$. Der Term mit positivem Exponenten beschreibt die stimulierte Emission, der mit negativem Exponenten die Absorption. Für den neuen Hamiltonoperator gilt

$$H' = H + V(t) .$$

Nach den Regeln der quantenmechanischen Störungsrechnung stellt sich die Lösung als Linearkombination der Lösungen für die beiden Zustände ohne Einwirkung des elektromagnetischen Feldes dar,

$$\Psi(t) = C_i(t)\psi_i(t) + C_j(t)\psi_j(t) \ ,$$

wobei die Koeffizienten *C* zeitabhängig sind. Wird dieser Ansatz in die zeitabhängige Schrödingergleichung eingesetzt, so ergibt sich

$$\left[H + V(t)\right]\psi(t) = i\hbar\,\frac{\partial}{\partial t}\psi(t) = i\hbar\frac{\partial}{\partial t}\left[C_i(t)\psi_i e^{-iE_it/\hbar} + C_j(t)\psi_j e^{-iE_jt/\hbar}\right] .$$

Daraus folgt nach Ausführung der Differentiation und Verwendung der zeitunabhängigen Schrödingergleichung

$$V(t)\Psi(t) = i\hbar\,\dot{C}_i\psi_i e^{-iE_i t/\hbar} + i\hbar\,\dot{C}_j\psi_j e^{-iE_j t/\hbar} \quad .$$

Durch Multiplikation von der linken Seite mit ψ_j^* und Integration über die Ortskoordinaten folgt (unter Verwendung der bracket-Notation)

$$i\hbar\frac{\partial C_j}{\partial t} = \langle\psi_j|V|\psi_i\rangle C_i e^{i(E_j-E_i)t/\hbar} + \langle\psi_j|V|\psi_j\rangle C_j \,.$$

Mit den Anfangsbedingungen $C_i = 1$ und $C_j = 0$ folgt ($\Delta E = E_j - E_i$)

$$i\hbar\frac{\partial C_j}{\partial t} = \langle\psi_j|V|\psi_i\rangle e^{i\Delta E t/\hbar} \quad .$$

Durch Integration von $t' = 0 \to t$ erhält man

$$C_j(t) = \frac{-i}{2\hbar}\langle\psi_j|\vec{\mu}|\psi_i\rangle\vec{E}_0\int_0^t e^{i(\Delta E-\hbar\omega)t'/\hbar}dt'$$

$$= \frac{1}{2}\langle\psi_j|\vec{\mu}|\psi_i\rangle\,\vec{E}_0\,\frac{1-e^{i(\Delta E-\hbar\omega)t/\hbar}}{(\Delta E-\hbar\omega)} \quad .$$

Für das Betragsquadrat von C_j folgt

$$|C_j|^2 = \left|\langle\psi_j|\vec{\mu}|\psi_i\rangle\vec{E}_0\right|^2\cdot\frac{\sin^2\left[(\Delta E-\hbar\omega)t/2\hbar\right]}{(\Delta E-\hbar\omega)^2} \quad .$$

Der Ausdruck innerhalb der ´brackets´ stellt das sogenannte Übergangsmatrixelement dar, der rechte Ausdruck gleicht einer Spaltfunktion. Er ist groß, falls $\hbar\omega$ ungefähr gleich ΔE ist. Dies bedeutet, dass Absorption induziert wird, wenn diese Bedingung erfüllt ist. Für die Wahrscheinlichkeit für Absorption ergibt sich dann

$$\frac{dP_j}{dt} = \frac{d}{dt}\int_{-\infty}^{\infty}|C_j|^2\,d\omega = \left|\langle\psi_j|\vec{\mu}|\psi_i\rangle\cdot\vec{E}_0\right|^2\cdot\frac{\pi}{2\hbar^2} \quad .$$

Wird wieder der Einsteinkoeffizient für induzierte Absorption eingeführt,

$$\frac{dP_j}{dt} = B_{ij}I(\omega),$$

mit

$$I(\omega) = \frac{|E_0|^2}{8\pi},$$

so ergibt sich

$$B_{ij} = \left|\langle\psi_j|\vec{\mu}|\psi_i\rangle\cdot\vec{E}_0\right|^2\cdot\frac{4\pi^2}{\hbar^2}\frac{1}{|E_0|^2} \quad .$$

Wird über alle Orientierungen des dreidimensionalen Raumes gemittelt, so erhält man

$$B_{ij} = \frac{4}{3}\frac{\pi^2}{\hbar^2}\cdot\left|\langle\psi_j|\vec{\mu}|\psi_i\rangle\right|^2 \quad .$$

Somit hängt die Lichtabsorption von der Energiedichte $I(\omega)$ und Dipolstärke

$$D_{ij} = \left| \langle \psi_j | \vec{\mu} | \psi_i \rangle \right|^2$$

ab. Letztere ist mit dem Extinktionskoeffizienten ε_{ij} wie folgt verknüpft:

$$D_{ij} = 9.18 \cdot 10^{-3} \int \frac{\varepsilon_{ij}(\nu)}{\nu} d\nu \text{ , mit der Einheit Debye}^2 \text{ [D}^2\text{] (1 eÅ = 4.8 D) .}$$

Für das Zustandekommen der verschiedenen Energiezustände gibt es mehrere Ursachen (Abb. 6). Im Gegensatz zu den elektronischen Zuständen sind die Energieabstände der Schwingungszustände in etwa äquidistant, da das Potential oft annähernd harmonisch ist. Rotationszustände sind ebenfalls äquidistant, spielen bei Biomolekülen in Lösung aber keine Rolle. Für freie Translationen ist das Energiespektrum kontinuierlich. Im thermischen Gleichgewicht sind die Energieniveaus nach Boltzmann besetzt,

$$\frac{n_j}{n_i} = e^{-\Delta E / kT} .$$

Elektronisch angeregte Zustände existieren bei Raumtemperatur nicht, da $\Delta E >> kT \approx 200$ cm^{-1} ist. Lokale Atomschwingungen haben $\Delta E > 200$ cm^{-1} und sind bei 300 K im Grundzustand. Langwellige, kollektive Schwingungszustände sind dagegen thermisch angeregt.

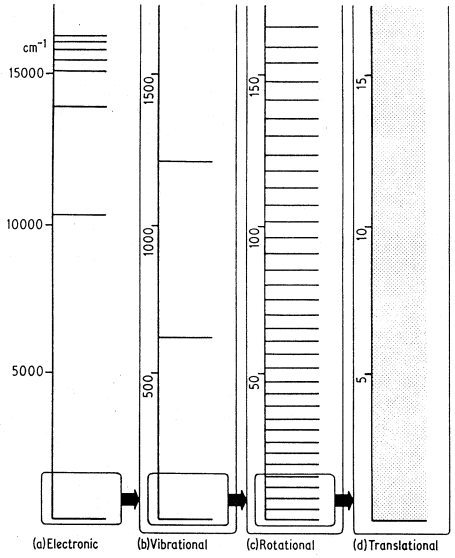


Abb. 6: Skizze der elektronischen, Vibrations-, Rotations-, und translatorischen Energiezustände.

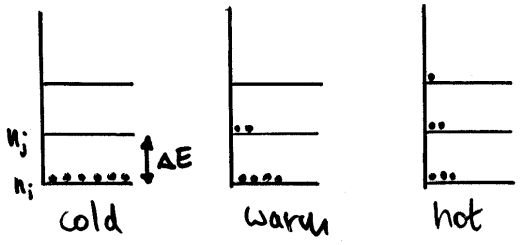


Abb. 7: Schema der Energieniveaubesetzung bei verschiedenen Temperaturen.

Elektronische Übergänge

Die meisten elektronischen Übergänge erfolgen aufgrund von elektrischer Dipolwechselwirkung. Wir haben gesehen, dass die Übergangswahrscheinlichkeit proportional zu

$$I \propto \left| \langle j|\vec{r}|i\rangle \cdot \vec{E} \right|^2$$

ist ($\vec{\mu} = e\,\vec{r}$). Das Übergangsmatrixelement in den eckigen Klammern beschreibt die Fähigkeit des Lichts, den Zustand *i* so zu verändern, dass er dem Zustand *j* gleicht.

Für Dipolübergänge gelten die Auswahlregeln

$$\Delta E = h\nu,$$

$$\Delta l = \pm 1.$$

Die zwei Regeln ergeben sich aus der Energie- und Drehimpulserhaltung bei der Photon-Molekülwechselwirkung. Das Photon ist ein Teilchen mit Spin 1. Sind die Auswahlregeln nicht erfüllt, so spricht man von 'verbotenen Übergängen', die vergleichsweise geringe Oszillatorenstärke aufweisen (Abb. 8).

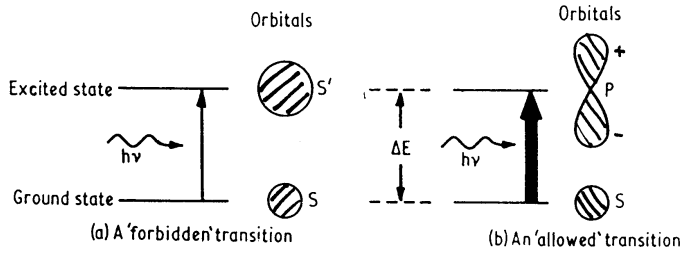


Abb. 8: Erlaubte und verbotene Übergänge.

Das freie Elektronenmodell

In Molekülen mit konjugierten Doppelbindungen können sich die Bindungselektronen quasifrei über einen großen Bereich bewegen. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 9 zu sehen.

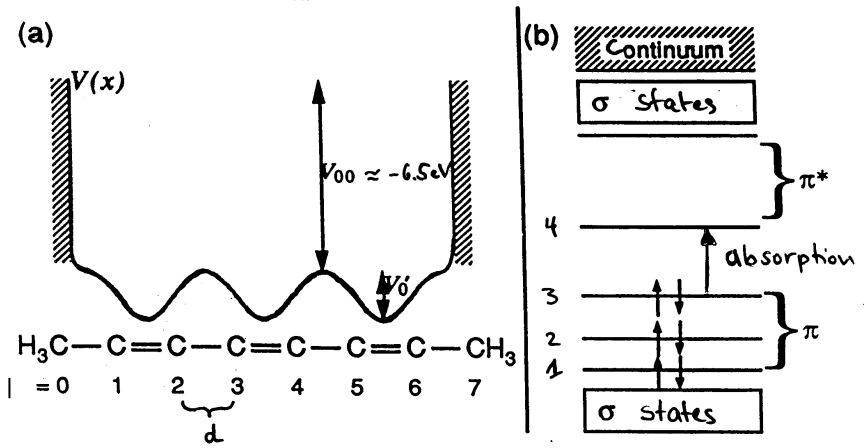


Abb. 9: Potential (a) und Termschema (b) einer Kette aus Kohlenstoffatomen.

Zur Berechnung des Energiespektrums des Moleküls kann näherungsweise ein Kastenpotential angenommen werden. Die Länge des Kastens ist $L = (2n+1)d$, wobei d der Abstand zwischen den Kohlenstoffatomen und n die Anzahl der Doppelbindungen ist. Man erhält aus der Schrödingergleichung mit den entsprechenden Randbedingungen folgende Wellenfunktion,

$$\psi_r(x) = \sqrt{\frac{2}{(2n-1)d}} \sin\frac{\pi r x}{(2n+1)d} .$$

Hier ist x die Ortskoordinate und r die Quantenzahl des Zustandes. Für die Energie der Zustände erhält man

$$E_r = \frac{h^2 r^2}{8md^2(2n+1)^2} .$$

Wird ein realistischeres Modell verwendet, das die verschiedenen Abstände zwischen Doppel- und Einfachbindung der C-Atome (d (C=C) = 1.35 Å, d (C–C) = 1.46 Å) und statt des konstanten Potentials am Boden des Kastenpotentials ein wellenförmiges Potential berücksichtigt, so erhält man aus Störungsrechnungen einen Korrekturterm für die Berechnung der Energie. Für das erste Absorptionsband (Übergang von Niveau 3 zu 4 im obigen Fall; allgemein: $r \to r+1$, $r = n$, da eine Doppelbindung einem gefüllten Niveau entspricht) erhält man

$$\Delta E = E_{n+1} - E_n = \frac{h^2}{8md^2}\frac{1}{2n+1} + 0.83\left(1-\frac{1}{2n}\right)V_0^{'},$$

mit dem Korrekturpotential $V_0^{'} = 2.45\,\mathrm{eV}$ (der zweite Term beschreibt die Korrektur durch das wellenförmige Potential). Für größere n (längere Kohlenstoffkette) nimmt also die Übergangsenergie ab und damit die Absorptionswellenlänge zu. Abb. 10 zeigt dies für konjugierte Kohlenwasserstoff-Ketten.

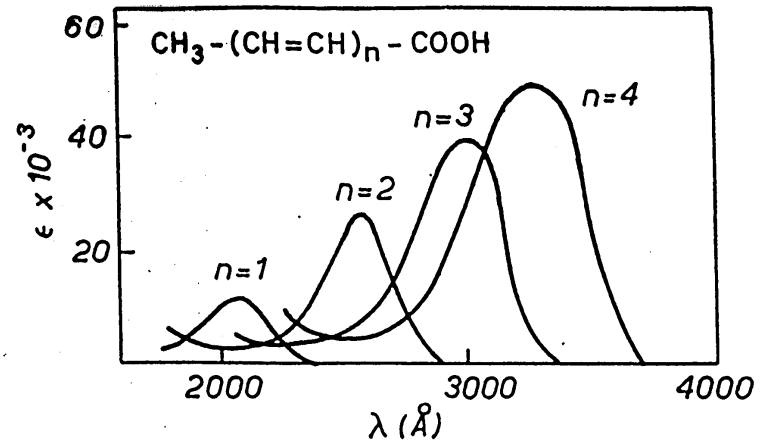


Abb. 10: Absorption von konjugierten Kohlenwasserstoff-Ketten.

In Abb. 11 sind die experimentellen Absorptionsmaxima in Abhängigkeit von n zu sehen. Ebenfalls eingetragen sind die theoretischen Werte, die mit dem wellenförmigen Potential und dem Hückelmodell berechnet wurden.

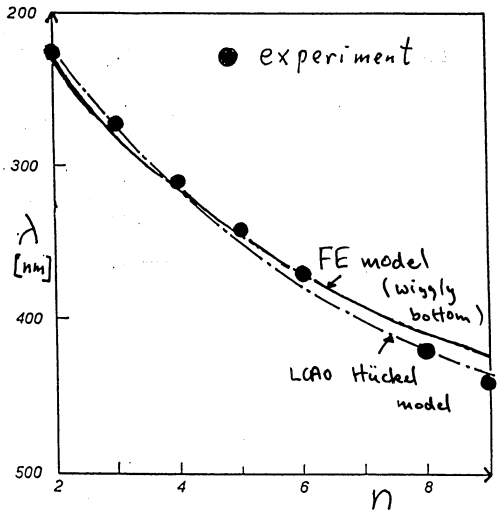


Abb. 11: Absorptionsmaximum in Abhängigkeit von *n* (Punkte). Ebenfalls eingezeichnet sind die theoretischen Werte unter Annahme eines Kastenpotentials mit wellenförmigem Potential des Bodens und unter Annahme der LCAO-Methode (Hückelmodell).

Elektronische Übergänge zwischen Molekülorbitalen

Die Lichtabsorption der Proteine bzw. Nukleinsäuren kann relativ komplex sein. Allgemein gilt, je delokalisierter ein Elektronensystem ist, desto größer ist die Wellenlänge des Übergangs. So verursachen die delokalisierten π-Orbitale im Häm das Soretband, das bei (Oxy)Hämoglobin sein Maximum zwischen 410 und 440 nm hat. Im nahen ultravioletten Bereich (< 400 nm) absorbieren kleine konjungierte Systeme wie Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Pyrrole. Im fernen ultravioletten Bereich (< 200 nm) treten die Absorptionen der Aminosäurenseitenketten und des Peptidrückgrats auf. Im sichtbaren Bereich gibt es auch d-d Übergänge von Nebengruppenmetallionen, die verboten und daher verhältnismäßig schwach sind. Außerdem gibt es Ladungstransferübergänge. Sie treten z. B. beim Häm zwischen den Orbitalen auf, die in einem Zustand am Zentralatom (Metall) und im anderen Zustand im Porphyrin konzentriert sind. Diese treten beim Oxyhämoglobin im nahen Infrarot auf.
Im Folgenden soll die Lichtabsorption eines kleineren Moleküls (Formaldehyd) näher betrachtet werden. Im Prinzip können die elektronischen Zustände mit der Schrödingergleichung berechnet werden. Da dies sehr schwierig ist, werden Näherungsmethoden verwendet. Es sind viele Elektronen relativ lokalisiert bei einem Kern, so dass sich deren Orbitale nicht sehr von denen des isolierten Atoms unterscheiden. Abb. 12 zeigt ein Modell des Formaldehydmoleküls.

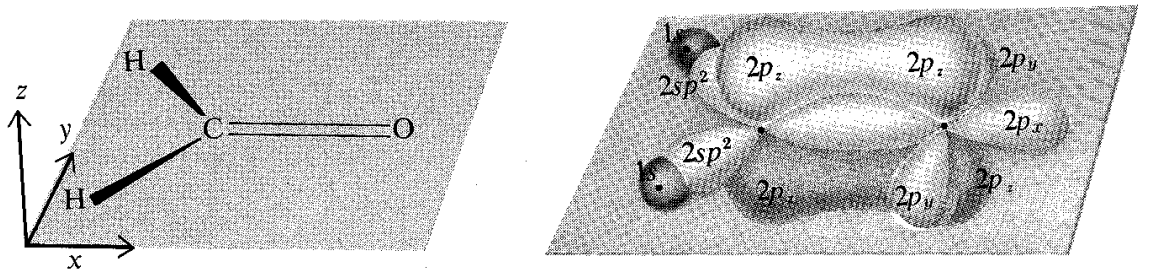


Abb. 12: Das Formaldehydmolekül und ein Schema der auftretenden Bindungen.

Die vier Atome des Formaldehydmoleküls haben insgesamt 16 Elektronen. Jedes Wasserstoffatom hat ein Elektron im *1s* Atomorbital. Die sechs Elektronen des Kohlenstoffs und die 8 Elektronen des Sauerstoffs können wie folgt beschrieben werden,

$$C \rightarrow 1s^2\ 2s^2\ 2p_x\ 2p_y,$$
$$O \rightarrow 1s^2\ 2s^2\ 2p_x\ 2p_y^2\ 2p_z\ .$$

Verbinden sich diese Atome zu Formaldehyd, so werden die Atomorbitale verändert. Da Formaldehyd einen Winkel von 120° zwischen den Kohlenstoffatomen aufweist, muss der Kohlenstoff folgendermaßen beschrieben werden

$$C \rightarrow 1s^2\ 2(sp^2)^3\ 2p_z\ .$$

Das *2s*-Orbital und zwei der *2p*-Orbitale bilden zusammen ein $2sp^2$-Hybridorbital. Zwei dieser Orbitale binden mit den *1s*-Orbitalen der Wasserstoffatome. Das dritte geht eine Bindung mit dem $2p_x$-Orbital des Sauerstoffs ein. Es handelt sich um eine σ-Bindung, da die Achse zwischen den Kernen in keiner Knotenebene des Orbitals enthalten ist. Ist sie in einer Knotenebene enthalten, wird von einer π-Bindung gesprochen. Des Weiteren wird eine π-Bindung von den p_z-Orbitalen des Sauerstoffs und des Kohlenstoffs gebildet. Die zwei verbleibenden Elektronen des Sauerstoffs befinden sich in dem p_y-Orbital. Dieses nicht-bindende Orbital (n-Orbital, 'lone pair') und das π-Orbital sind im elektronischen Grundzustand voll besetzt (Abb. 13).

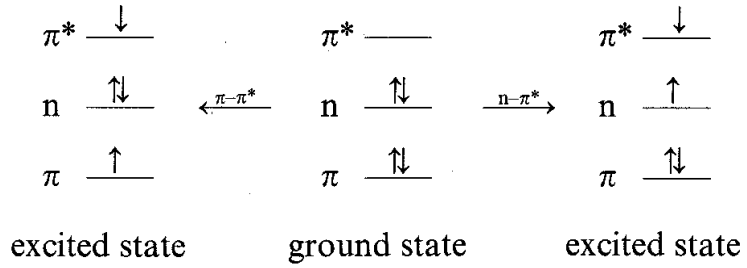


Abb. 13: Termschema des Formaldehyds.

Die π-Bindung der p_z-Orbitale des Sauerstoffs und des Kohlenstoffs wurden durch Linearkombination der Orbitale gebildet,

$$\psi_\pi = 2p_z(C) + 2p_z(O).$$

Die zweite mögliche Linearkombination ergibt

$$\psi_{\pi^*} = 2p_z(C) - 2p_z(O)\ .$$

Dieses anti-bindende π^* Orbital hat eine höhere Energie als das bindende π-Orbital (Abb. 13). Die zwei elektronischen Energieübergänge mit den niedrigsten Energieunterschieden sind durch den Übergang eines Elektrons vom n-Orbital zum π^*-Orbital ($n \rightarrow \pi^*$ Übergang) bzw. eines Elektron vom π-Orbital zum π^*-Orbital ($\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang) gegeben. Zur Berechnung der Intensität des Übergangs muss das Übergangsdipolmoment betrachtet werden. Für obige Übergänge sind dies

$$\langle \psi_{\pi^*} | \vec{\mu} | \psi_\pi \rangle \qquad \text{und} \qquad \langle \psi_{\pi^*} | \vec{\mu} | \psi_n \rangle\ .$$

Diese Integrale können mit Hilfe von Symmetrieargumenten untersucht werden. Ist der Integrand ungerade, d.h. verändert sich nur das Vorzeichen bei Spiegelung an einer der drei Ebenen, die durch das kartesische Koordinatensystem gegeben sind, so verschwindet das Integral. Wir betrachten zuerst das Integral $\langle\psi_\pi^*|\psi_\pi\rangle$. π ist gerade bei Spiegelung an der yz-Ebene ($\pi(x) = \pi(-x)$), während π^* für diese Spiegelung ungerade ist ($\pi^*(x) = -\pi^*(-x)$) (Abb. 12 und Abb. 14).

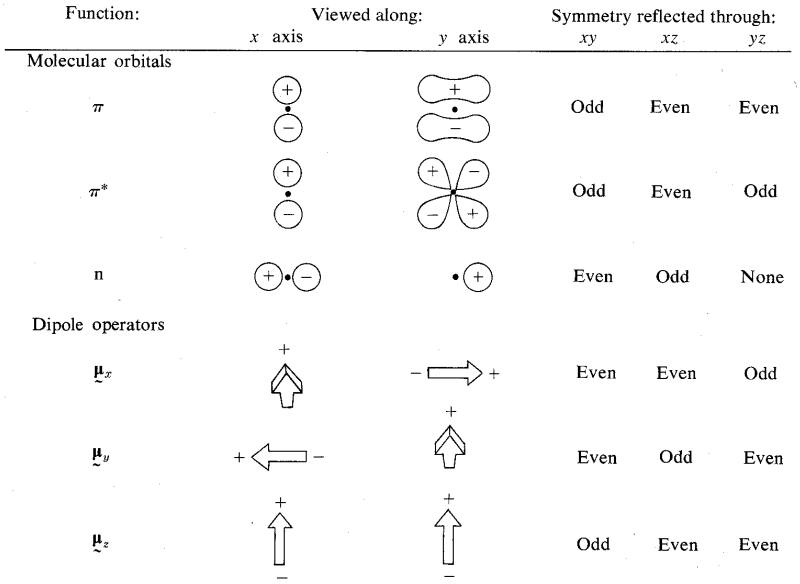


Abb. 14: Symmetrie der Molekülorbitale und der Dipoloperatoren von Formaldehyd.

Daraus folgt, dass das Produkt $\pi\pi^*$ ungerade ist und somit die Integration Null ergibt. Die Integration in *y*- und *z*-Richtungen müssen nicht mehr betrachtet werden. Die Wellenfunktionen sind zueinander orthogonal. Genauso folgt $<\pi|n> = <\pi^*|n> = 0$.

Zur Auswertung von $\langle\psi_\pi^*|\mu|\psi_\pi\rangle$ ist es vorteilhaft, die drei kartesischen Komponenten des Dipoloperators getrennt zu betrachten. Daraus folgt (Abb. 14): $\langle\psi_\pi^*|\mu_x|\psi_\pi\rangle$ ist nicht Null, da das Produkt der Symmetrien von π, π^* und μ_x unter Spiegelung an der *xy*, *yz* oder *xz*-Ebene gerade ist. $\langle\psi_\pi^*|\mu_y|\psi_\pi\rangle$ ($\langle\psi_\pi^*|\mu_z|\psi_\pi\rangle$) ist Null, da die resultierende Symmetrie bei Spiegelung an der *xz* oder *yz* (*xy* oder *yz*) Ebene ungerade ist. Das bedeutet, dass der ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang erlaubt ist, da sein Übergangsdipolmoment nicht verschwindet. Allerdings kommt es nur zu einer Absorption, falls der elektrische Feldvektor des eingestrahlten Lichts eine Komponente in *x*-Richtung hat. Man sagt, dass der Übergang entlang der C=O-Bindung polarisiert ist. In praxi kommt es auch bei anderen elektrischen Feldvektorrichtungen zur Absorption, da keine reinen Orbitalzustände vorliegen.

Für den ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergang gilt: $\langle\psi_\pi^*|\mu_x|\psi_\pi\rangle$ ist Null, da die Symmetrie bei Spiegelung an der *xy* oder *xz*-Ebene ungerade ist. $\langle\psi_\pi^*|\mu_y|\psi_n\rangle$ ($\langle\psi_\pi^*|\mu_z|\psi_n\rangle$) ist Null, da die resultierende Symmetrie bei Spiegelung an der *xy* (*xz*) Ebene ungerade ist. Dieser Übergang ist also nicht erlaubt, d.h. er ist aufgrund der Symmetrie verboten. Allerdings kann auch hier ein Übergang angeregt werden, die Absorption ist jedoch relativ gering (Abb. 15).

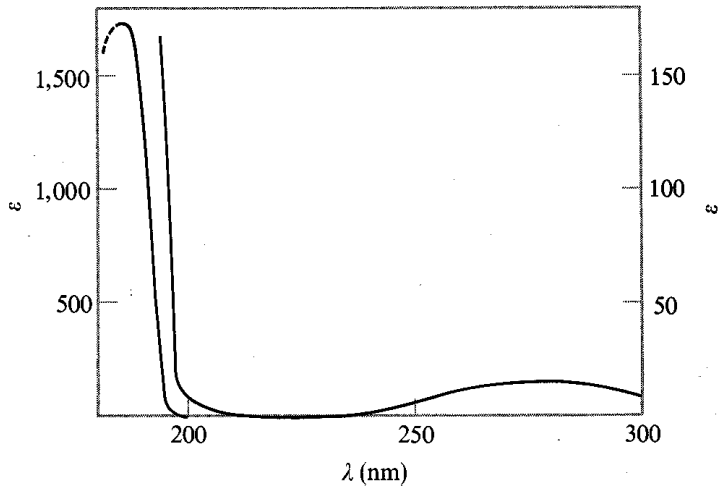


Abb. 15: Absorptionsspektrum von Aceton (CH_3 –CO- CH_3) in n-Hexan.

Der ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergang ist bei 280 nm, der ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang bei 180 nm zu sehen. Beachte die verschiedenen Extinktionsskalen für die zwei Übergänge. Das Spektrum von Formaldehyd sollte ähnlich dem von Aceton sein. Allerdings ist es schwieriger, ein Formaldehydspektrum in Lösung zu messen.

Kopplung von elektronischer und vibronischer Anregung

Tritt ein elektronischer Übergang vom (elektronischen und Schwingungs-) Grundniveau in ein angeregtes elektronisches Niveau auf, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass das Elektron nicht in den Schwingungsgrundzustand, sondern in einen höheren Schwingungszustand des angeregten elektronischen Zustands übergeht. Dieser Sachverhalt kann mit dem Franck-Condon-Prinzip erklärt werden. Da sich die Kerne relativ langsam im Vergleich zu den Elektronen bewegen, verharren sie während eines elektronischen Übergangs (~ 1 fs) praktisch am gleichen Ort ($\tau_{vib} \approx 10 - 100$ fs). Da im allgemeinen Fall die Abstände der Kerne im angeregten Niveau größer sind, werden Vibrationen angeregt. Dies ist in Abb. 16 anschaulich mit einer komprimierten Feder dargestellt.

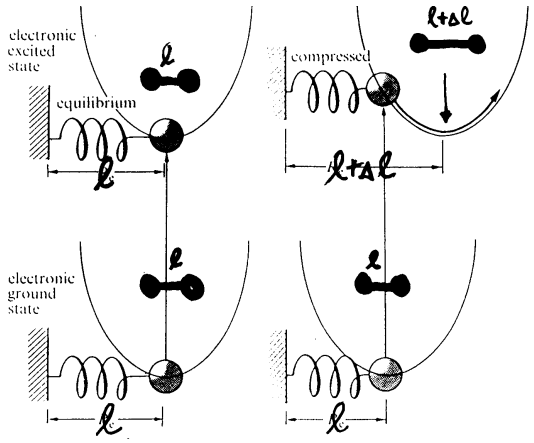


Abb. 16: Klassisches Bild des Franck-Condon-Prinzips.

Quantenmechanisch kann man die Übergangswahrscheinlichkeiten mit der Born-Oppenheimer-Näherung berechnen. Dabei nimmt man an, dass sich die Gesamtwellenfunktion Ψ in die Wellenfunktion der Kerne und Elektronen separieren lässt, da aufgrund der kleineren Masse die Elektronen instantan der Kernbewegung folgen,

$$\Psi(\vec{r},\vec{R}) = \psi(\vec{r};\vec{R})\,\phi(\vec{R})\,.$$

Hier ist ψ die Wellenfunktion der Elektronen und ϕ die der Kerne. Der Ort der Elektronen wird mit $\vec{r}$, der der Kerne mit $\vec{R}$ bezeichnet. Für das Übergangsmatrix erhält man dann

$$\begin{aligned}\vec{\mu} &= -\langle j|e\vec{r}|i\rangle \\ &= -e\iint \psi_j^*(\vec{r})\,\phi_j^*(\vec{R})\,\vec{r}\,\psi_i(\vec{r})\,\phi_i(R)\,d^3\vec{r}\,d^3\vec{R} \\ &= -e\int \psi_j^*(\vec{r})\,\vec{r}\,\psi_i(\vec{r})\,d^3\vec{r}\cdot\int \phi_j^*(\vec{R})\,\phi_i(\vec{R})\,d^3\vec{R}\ .\end{aligned}$$

Der Überlapp der Kernwellenfunktionen (Franck-Condon-Faktor) beeinflusst also die Übergangswahrscheinlichkeit. Dies ist in Abb. 17 dargestellt.

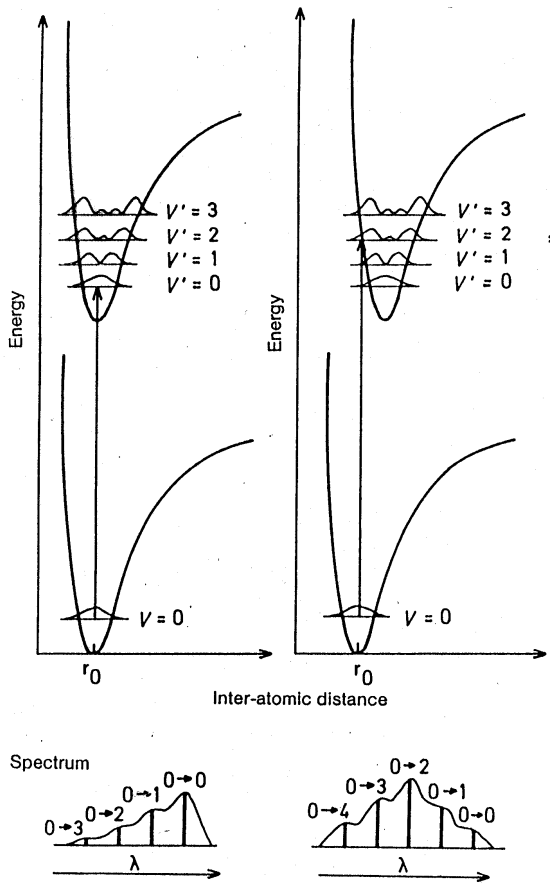


Abb. 17: Darstellung der Beziehung zwischen der Wahrscheinlichkeitsverteilung für den Kernabstand für verschiedene Vibrationszustände, der Wahrscheinlichkeit für einen Schwingungsübergang, der mit einem elektronischen Übergang verbunden ist, und dem Absorptionsspektrum eines zweiatomigen Moleküls.

Da die Kernabstände für den angeregten Atomzustand normalerweise größer sind (rechtes Bild), erhält man für die höheren Vibrationszustände einen größeren Überlapp der Wellenfunktionen. Beachte, dass die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für ein harmonisches Potential für höhere Zustände am Rand des Potentials ansteigt. Damit kann das dargestellte Absorptionsspektrum erklärt werden (Abb. 17, unten). Im Fall der Abb. 17, rechts überlappt die Wellenfunktion im elektronischen Grundzustand (der Vibrationzustand ist hier ebenfalls Null) am stärksten mit der Wellenfunktion des zweiten Schwingungszustands des angeregten elektronischen Niveaus. Daher ist die Absorption für diesen Übergang am größten.
Neben den Schwingungszuständen treten bei kleineren Molekülen auch Rotationszustände auf. Abb. 18 illustriert dies für die zwei niedrigsten elektronischen Zustände. Das Molekül, das sich im Grundzustand befindet, kann nun durch Photonen geeigneter Frequenz nicht nur

in verschiedene Schwingungszustände, sondern auch in viele Rotationszustände des ersten angeregten elektronischen Niveaus übergehen. Man erhält ein Spektrum mit vielen schmalen Linien, falls keine weiteren Effekte vorliegen (Abb. 19, oben links). Experimentell erhält man oft ein breites Spektrum, da alle Übergänge durch verschiedene Effekte (Lebensdauer, Umgebungsheterogenität, Dopplereffekt) verbreitert sind (Abb. 19, Mitte). Am einfachsten ist die Annahme, dass nur ein elektronischer Übergang vorliegt (Abb. 19, unten links). Die rechte Spalte von Abb. 19 zeigt am Beispiel von Benzol, wie die Rotationsbanden mit steigender Viskosität des Lösungsmittels breiter werden.

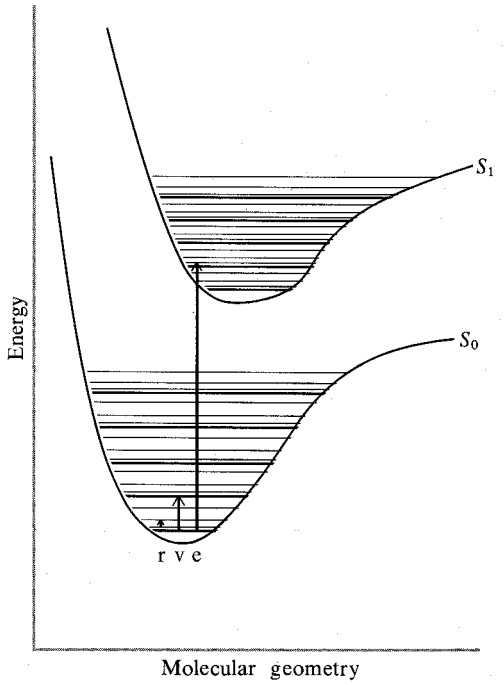


Abb. 18: Energiezustände eines kleinen Moleküls. Zu sehen sind die zwei niedrigsten elektronischen Zustände (S_0 und S_1) und ausgesuchte Schwingungs- (dicke Linien) und Rotationszustände (dünne Linien). Ein elektronischer (e), ein Schwingungs- (v) und ein Rotationsübergang (r) sind eingezeichnet.

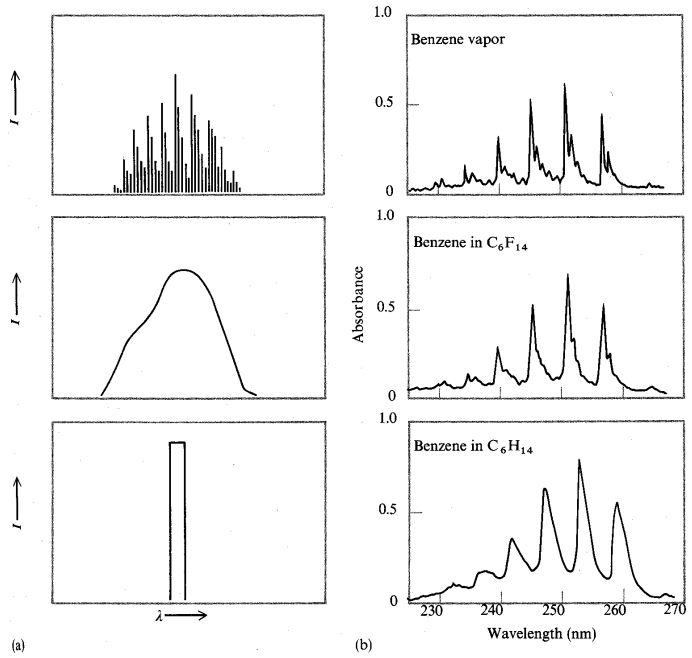


Abb. 19: Absorptionspektren kleiner Moleküle. (a) Typische Spektren für kleine Moleküle in der Gasphase (oben) und in Lösung (Mitte). Oft wird ein einfaches Spektrum angenommen (unten). (b) Verbreiterungseffekte der Absorptionsspektren von Benzol aufgrund des Lösungsmittels.

Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Ein Elektron eines Moleküls kann, nachdem es aufgrund der Absorption eines Photons auf ein höheres Energieniveau gebracht wurde, auf verschiedenen Wegen wieder in den Grundzustand zurückkehren (Abb. 20).

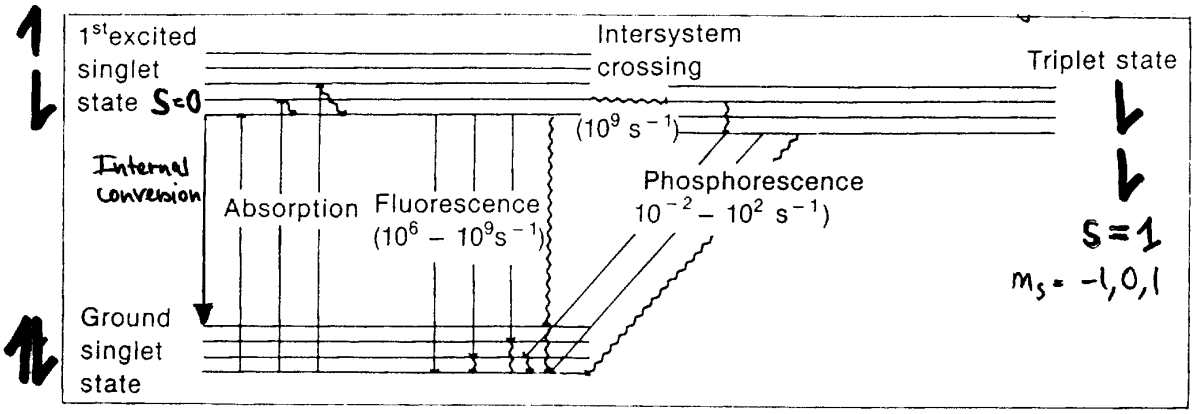


Abb. 20: Jablonski-Diagramm.

Das Elektron befinde sich im (elektronischen und Schwingungs-) Grundzustand. Es seien alle Elektronen gepaart, d.h. der Spin S sei Null (Singulett-Zustand). Dies ist für fast alle Moleküle im Grundzustand der Fall. Wird ein Photon mit geeigneter Frequenz eingestrahlt, so kann das Elektron auf verschiedene Schwingungsniveaus des ersten angeregten Zustand transferiert werden. Bei diesem Übergang verändert sich der Spin nicht (S = 0). Das Elektron wird rasch (einige Pikosekunden) in den Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustands übergehen. Dies erfolgt durch nichtlineare Kopplungen mit anderen Schwingungsfrei-

heitsgraden und führt durch den Übergang von lokalen zu globalen Schwingungen zu einer Temperaturerhöhung der Umgebung. Für die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand gibt es drei verschiedene Möglichkeiten. Bei der **inneren Konversion** geht das Elektron ohne Aussendung eines Photons in den Grundzustand. Die Energie wird in Schwingungsenergie umgewandelt. Im Falle der **Fluoreszenz** geht das Elektron durch spontane Emission eines Photons in einen der Schwingungszustände der elektronischen Grundniveaus über. Die Zerfallszeiten für diesen Prozess liegen typischerweise bei 10^{-9} – 10^{-6} s. Schließlich kann noch **Phosphoreszenz** auftreten. Das angeregte Elektron ´flippt´ beim 'intersystem crossing' seinen Spin, so dass ein Triplet-Zustand (S = 1) vorliegt. Dadurch ergibt sich eine Energieabsenkung aufgrund der Hundschen Regel. Da für den Übergang in den Grundzustand (S = 0) das Elektron (wiederum) seinen Spin verändern muss, ist dieser Zustand relativ langlebig: In kristallinen Festkörpern beobachtet man, dass das Elektron erst nach 10^{-2} – 10^{2} s unter Photonenemission in den Grundzustand zurückgeht. Bei Biomolekülen in wässriger Lösung ist die innere Konversion viel wahrscheinlicher, so dass man keine Lichtemission auf solch langen Zeitskalen beobachtet. Abb. 21 zeigt genauer die Energieübergänge bzw. das Spektrum bei der Fluoreszenz.

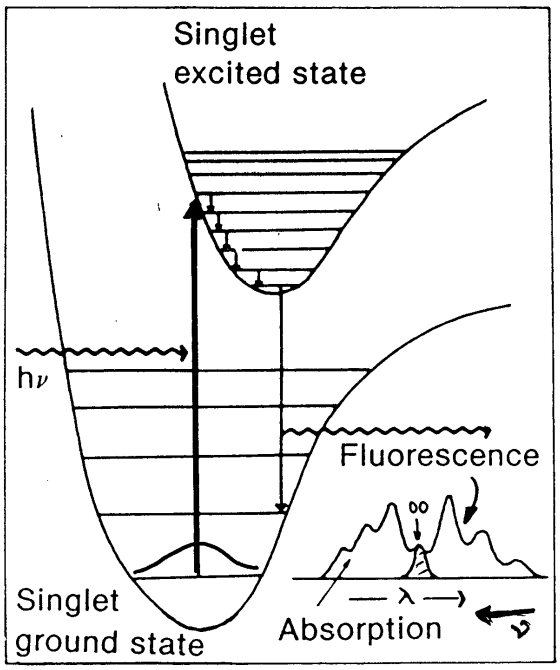


Abb. 21: Fluoreszenz: Energieübergänge und resultierendes Spektrum.

Nach Anregung und anschließender Thermalisierung befindet sich das Elektron im Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten elektronischen Niveaus. Aufgrund des größeren Abstandes der Kerne im angeregten elektronischen Niveau ist die Wahrscheinlichkeit am größten, dass das Elektron nicht in den Schwingungsgrundzustand, sondern in höhere Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustands zurückfällt. Die Energie des emittierten Photons ist somit geringer als die des absorbierten Photons. Haben die Potentiale des elektronischen Grundzustands und des ersten angeregten elektronischen Zustands die gleiche Form, so sind das Absorptionspektrum und das Fluoreszenzspektrum spiegelbildlich zu dem 00-Übergang (dem Übergang von und zu den Schwingungsgrundzuständen der beiden elektronischen Niveaus).

Das entsprechende Diagramm für die Phosphoreszenz ist in Abb. 22 zu sehen. Im S_1-Zustand kann es zu einem Spinflip und damit zu einem Triplettzustand kommen. Dort thermalisiert das Elektron bis zum Schwingungsgrundzustand. Da der Übergang zum Grundniveau verboten ist, ist beim Festkörper die Lebensdauer des angeregten Niveaus relativ lang, und es wird Phosphoreszenz beobachtet. In Flüssigkeiten ist sie kürzer, da strahlungslose Übergänge (z.B. über Stöße) wahrscheinlicher sind.

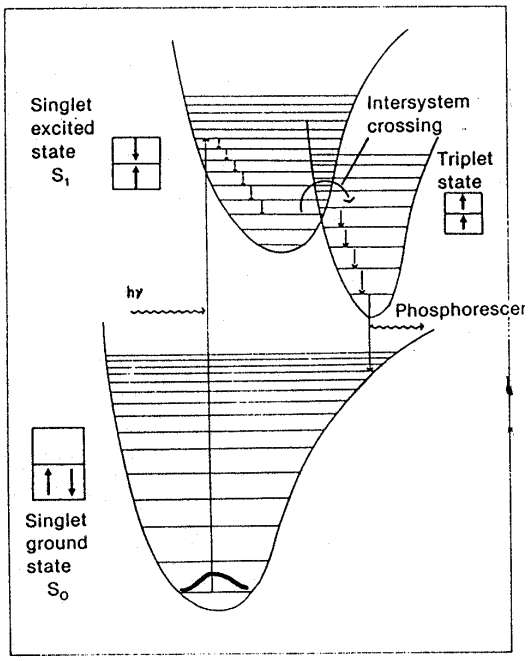


Abb. 22: Termschema bei der Phosphoreszenz.

Messung von Absorptionsspektren

Absorptionspektren werden gewöhnlich mit einem Zweistrahlspektrometer gemessen.

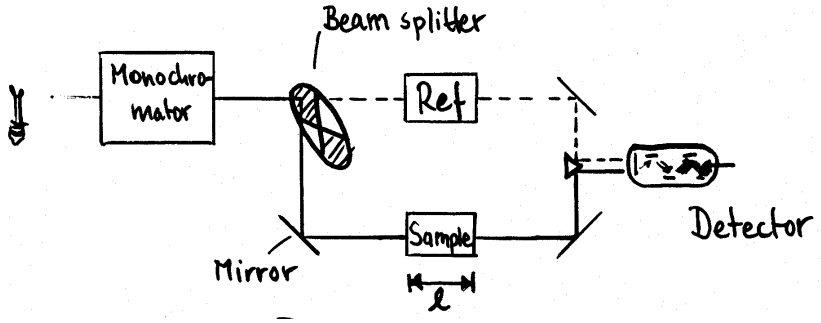


Abb. 23: Aufbau eines Zweistrahlspektrometers.

Von einer breitbandigen Quelle wird mittels eines Monochromators der gewünschte Wellenlängenbereich erzeugt, wobei über die Schlitzbreite des Monochromators die Auflösung verändert werden kann. Da Biomoleküle in der Regel breite Absorptionsbanden zeigen, ist die Auflösung für diese Messungen nicht entscheidend. Mit Hilfe eines rotierenden Strahlteilers wird das Licht einerseits auf die Probe (Biomolekül mit Lösungsmittel) und andererseits auf eine Referenz, die in der Regel nur aus dem Lösungsmittel besteht, gelenkt. Durch die Rotation des Strahlteilers kann abwechselnd an der Probe und an der Referenz die transmittierte Intensität z.B. mit einem Photomultiplier detektiert werden. Für die durch die Probe mit Dicke l transmittierte Intensität I gilt das Lambert-Beersche Gesetz,

$$I(l) = I_0\, 10^{-\varepsilon l c}\,.$$

Hier ist I_0 die eingestrahlte Intensität, *c* die Konzentration und ε der Extinktionskoeffizient. Für die optische Dichte erhält man

$$A = \log \frac{I_0}{I(l)} = \varepsilon l c \ .$$

Mit Hilfe der gemessenen Absorptionspektren lassen sich bei bekanntem ε Konzentrationen von Proben bestimmen. Des weiteren lassen sich strukturelle Informationen gewinnen, da bestimmte Proteine charakteristische Spektren aufweisen. Ebenso kann die Ionisation von Biomolekülen beobachtet werden, da diese je nach Ladungszustand verschiedene Absorptionspektren haben können. Weitere Anwendungen sind Messungen zur chemischen Modifikation, zum Einfluss des Lösungsmittels, zu Konformationsumwandlungen, zum Studium der Faltung/Entfaltung und der Ligandenbindung (z.B. nach einer Photolyse).
Im Folgenden soll auf verschiedene Aspekte der Absorptionsspektren von Biomolekülen eingegangen werden. Das Absorptionsspektrum wird gewöhnlich von der Absorption einer bestimmten chemischen Gruppe dominiert. Solche Gruppen werden Chromophore genannt. Die Absorptionsbanden von Proteinen können in drei Klassen eingeteilt werden: die Absorption der Peptidbindung, die der Aminosäure-Seitenketten und die der prosthetischen Gruppen.
Bei der **Peptidbindung** sind die π-Elektronen über dem Stickstoff, dem Kohlenstoff und dem Sauerstoff in einem gewissen Ausmaß verteilt. Der Übergang mit der geringsten Energie ist der ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergang. Dieser wird typischerweise bei einer Wellenlänge von 210 – 220 nm beobachtet. Abb. 24 zeigt das Absorptionsspektrum von Poly-L-Lysin in verschiedenen strukturellen Formationen; deren Spektren sind aufgrund von Excitoneffekten verschieden.

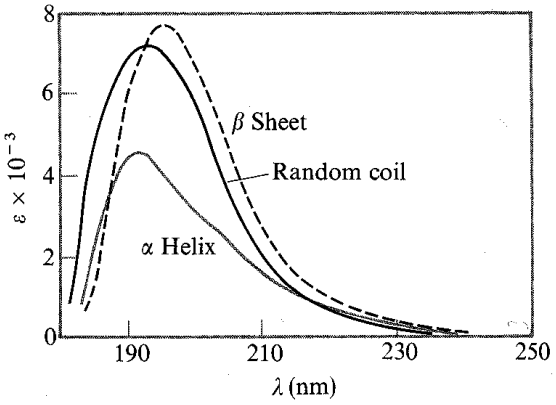


Abb. 24: Absorptionspektrum im Ultravioletten von Poly-L-Lysin in wässriger Lösung: Knäuel: pH 6.0, 25° C; α-Helix pH 10.8, 25° C, β-Faltblatt pH 10.8, 52° C.

Im Falle der α-Helix kann der ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergang als Schulter im Spektrum gesehen werden. Die größere Absorptionsbande mit dem Peak bei ungefähr 190 nm wird durch den ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang verursacht. Bei Formaldehyd ist, wie oben gezeigt, dieser Übergang entlang der C=O-Achse polarisiert. In einem Peptid liegt der Übergangsdipol nicht entlang einer speziellen Bindung, da auch das Stickstoffatom an der π-Bindung beteiligt ist. Die Lage des Übergangsdipols ist in Abb. 25 für Myristamid zu sehen.

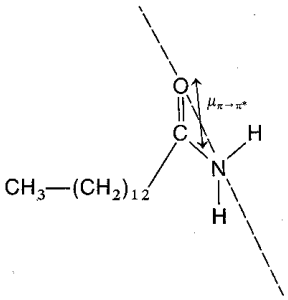


Abb. 25: Lage des Übergangdipols des ($\pi \rightarrow \pi^*$) – Übergangs für Myristamid.

Einige Aminosäureseitenketten (u. a. Asp, Glu, Asn, Gln) absorbieren in demselben Spektralbereich wie der ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang der Peptide. Da in der Regel die Anzahl der Seitengruppen klein ist, ist es schwierig, diese Banden unter denen der Peptidgruppen zu messen. Einfacher ist es, Aminosäureseitengruppen zu untersuchen, die bei Wellenlängen größer als 230 nm absorbieren. Die Absorptionsspektren dieser (aromatischen) Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp) sind in Abb. 26 zu sehen.

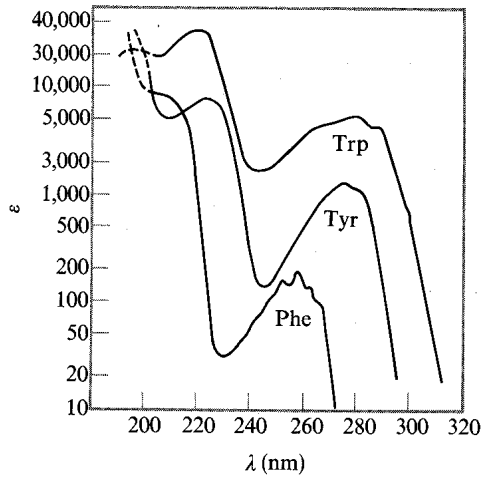


Abb. 26: Absorptionspektren der aromatischen Aminosäuren Trp, Tyr, Phe.

Das Tryptophan zeigt die größte Absorption in dem betrachteten Spektralbereich. Allerdings kommt diese Aminosäure relativ selten vor, und daher liefert auch das Tyrosin einen signifikanten Beitrag zum Absorptionsspektrum. Es muss auch beachtet werden, dass die Absorption von Trp und Tyr, im Gegensatz zur Peptidgruppe, vom pH-Wert abhängt.

Lösungsmitteleffekte

Die Absorptionsspektren vieler Chromophore sind vom Lösungsmittel abhängig. Diese Abhängigkeit kann sich als Veränderung der Intensität, der Bandbreite und der Wellenlänge des Absorptionspeaks bemerkbar machen. Die quantitative Analyse des Effekts des Lösungsmittels ist schwierig. Dabei muss berücksichtigt werden, dass während der Anregungszeit von 10^{-15} Sekunden keine Veränderung der Konformation auftritt. Allerdings treten Polarisationen der Elektronensysteme auf. Allgemein findet man, dass die Anwesenheit des Lösungsmittels die Energiezustände erniedrigt, da die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel derart ist, dass energieabsenkende Orientierungen der Lösungsmittelmoleküle wahrscheinlicher sind. Um eine Verschiebung eines Absorptionsbandes zu bekommen, muss allerdings die Energieabsenkung für die beteiligten Niveaus unterschiedlich groß sein. Man findet, dass der Zustand mit dem größten Dipolmoment die größte Energieabsenkung durch ein polares Lösungsmittel erfährt. Da dieser Zustand fast immer der angeregte Zustand ist, erfährt der ($\pi \rightarrow \pi^*$)-

Übergang eine Rotverschiebung, falls die Polarisationseffekte des Lösungsmittels dominieren (Abb. 27). Bei einem (n→ π^*)-Übergang bildet das 'lone pair' oft Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Lösungsmittel aus. Dies hat eine Blauverschiebung zur Folge.

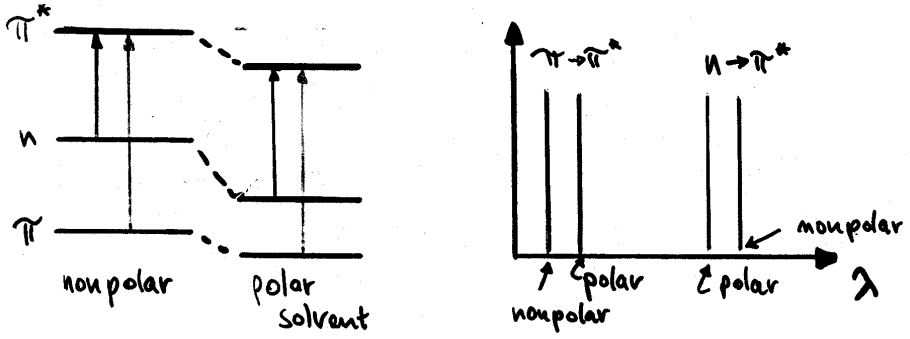


Abb. 27: Einfluss eines polaren bzw. unpolaren Lösungsmittels auf die Energieniveaus und das Spektrum.

Exzitonische Aufspaltung

Im Folgenden sollen die Effekte untersucht werden, die auftreten, falls die Abstände zwischen den Chromophoren so klein sind, so dass sich ihre elektronischen Zustände gegenseitig beeinflussen. Dies tritt z.B. bei den Peptiden eines Proteins auf. Es wird ein Dimer untersucht, das aus gleichen Monomeren besteht und somit auch die gleichen Chromophore besitzt. Die Wechselwirkung zwischen den Monomeren soll klein sein, so dass die Elektronen bei einem Atom lokalisiert sind. Jedes Monomer wird aber vom elektrischen Feld des anderen beeinflusst. Da beide Monomere ungeladen sind, ist die wichtigste Wechselwirkung die Dipol-Dipol-Wechselwirkung *V*,

$$V = \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{R_{12}^3} - 3\frac{\left(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{R}_{12}\right)\left(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{R}_{12}\right)}{R_{12}^5} \ .$$

Hier sind $\vec{\mu}_1$ und $\vec{\mu}_2$ die Dipoloperatoren der beiden Monomere und $\vec{R}_{12}$ der Abstand zwischen den Monomeren. Der Hamiltonian ist dann durch

$$H = H_1 + H_2 + V$$

gegeben. Die Wechselwirkung *V* soll so klein sein, dass man einen störungstheoretischen Ansatz verwenden kann. Die Wellenfunktionen für den Grundzustand und für die angeregten Zustände der Monomere (ψ_{1a} bzw. ψ_{2a} sind die angeregten Zustände des ersten bzw. zweiten Monomers ohne Wechselwirkung) sollen also gute Näherungen für die angeregten Zustände des Dimers sein. Weiterhin wird gefordert, dass der angeregte Zustand stationär ist. Somit erhält man für die beiden möglichen Wellenfunktionen des angeregten Zustands des Dimers

$$\psi_{A\pm} = \frac{1}{\sqrt{2}}\left(\psi_{1a} \pm \psi_{2a}\right) \ .$$

Für die Energien bekommt man

$$E_+ = E_0 + V_{12} \ ,$$
$$E_- = E_0 - V_{12} \ ,$$

mit der energetischen Kopplung

$$V_{12} = \left\langle \psi_{1a} \middle| V \middle| \psi_{2a} \right\rangle \ .$$

Man erhält also eine Aufspaltung der Energieniveaus, die sogenannte Davydov-Aufspaltung (Abb. 28).

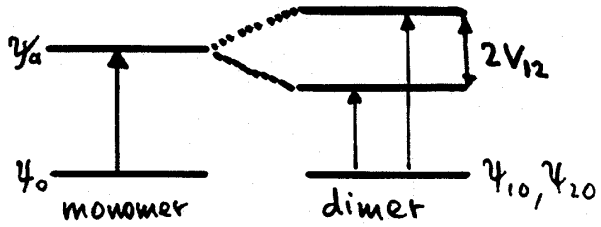


Abb. 28: Energieaufspaltung beim Dimer.

Die Intensität der Linien ist dann durch die Dipolstärke gegeben,

$$D_{0A\pm} = \left|\left\langle \psi_0 \left| \vec{\mu}_1 + \vec{\mu}_2 \right| \psi_{A\pm} \right\rangle\right|^2 = D_{0a} \pm D_{0a} \cos\theta_{12} \ .$$

Hierbei ist θ_{12} ist der Winkel zwischen den Dipolübergängen, die bei der elektronischen Absorption von Monomer 1 und Monomer 2 beteiligt sind. Mit Hilfe der Abb. 29 können die damit entstehenden Spektren verstanden werden.

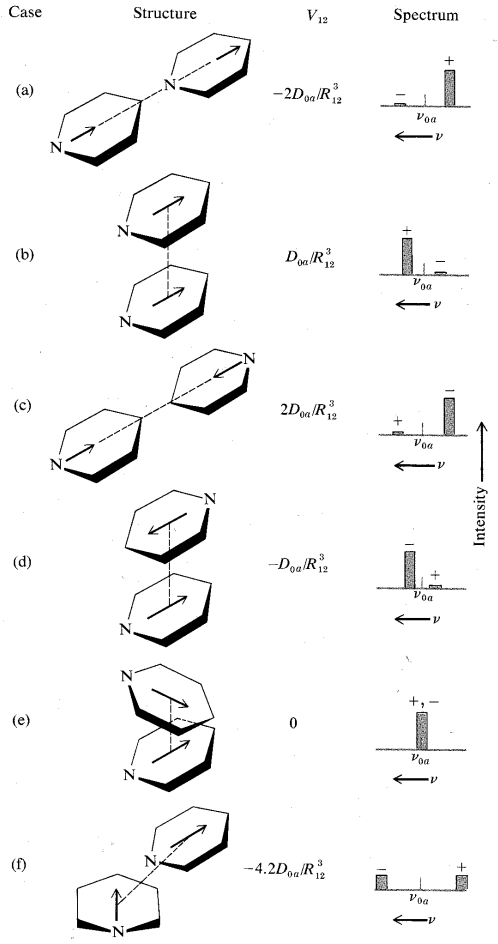


Abb. 29: Monomerwechselwirkungsenergien, Paarwechselwirkungspotentiale und schematische Spektren für 6 mögliche Geometrien eines Pyridin-Dimers. $\vec{R}_{12}$ ist durch die gestrichelte Linie gegeben. Die Orientierungen der Übergangsdipole sind mit Pfeilen für den Übergang $\psi_0 \rightarrow \psi_{A^+}$ eingezeichnet.

Die Wechselwirkungsenergie ist im Falle (a) negativ (V_{12} ist negativ). Die Monomere ziehen sich in Anordnung (a) gegenseitig an (vgl. mit klassischen Dipolen). Somit ist die Energie E_+ (und damit auch die Frequenz) niedriger als die des Monomers. Dies bedeutet, dass die… Absorption rotverschoben ist. Für die Anordnung im Fall (b) ist V_{12} positiv, und die Energie E_+ ist blauverschoben. Für die genannten Fälle (a) und (b) und auch für die Fälle (c) und (d) erhält man eine Verschiebung des Absorptionsmaximums, aber man bekommt keine Aufspaltung. Für andere Winkel ist es aber in der Regel möglich, Aufspaltungen zu beobachten. Im Fall (f) kann sowohl die Aufspaltung als auch die relative Intensität der Übergänge gemessen werden. Daraus kann der Abstand der Chromophore und der Winkel θ bestimmt werden. In Abb. 30 ist eine Messung an Bacteriochlorophyll zu sehen. Das Dimerspektrum zeigt beim langwelligen Übergang eine Aufspaltung, aus der ein Winkel von 82° zwischen den Übergangsmomenten berechnet werden kann.

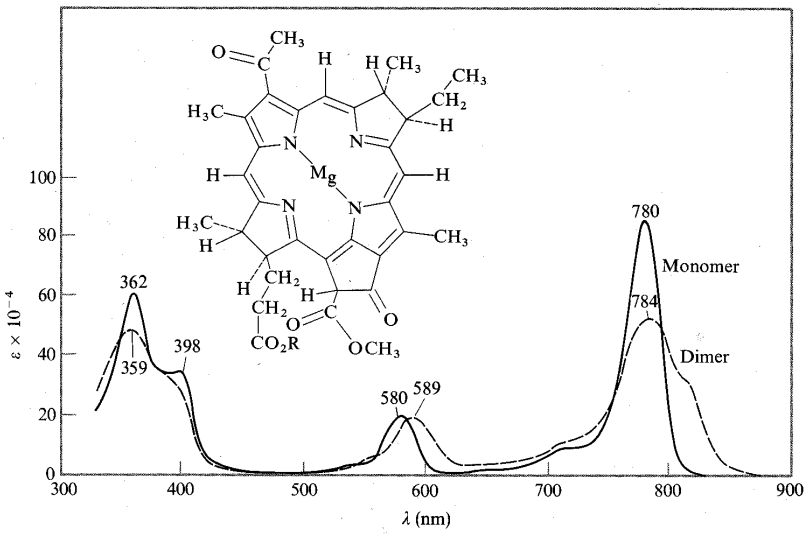


Abb. 30: Monomer und Dimerspektrum von Bacteriochlorophyll in Lösung. Es kann eine Aufspaltung des Dimerübergangs bei ungefähr 800 nm beobachtet werden.

Ein Effekt, der Ähnlichkeiten mit dem exzitonischen Effekt hat, ist die **Hypo- bzw. Hyperchromie**. Man beobachtet, dass die Absorption ab- bzw. zunehmen kann, falls Chromophore sich nah beieinander befinden. Dies wird durch die Wechselwirkung eines elektronischen angeregten Zustandes eines Chromophors mit den verschiedenen angeregten Zuständen der benachbarten Chromophore verursacht. Beachten Sie, dass bei der exzito-nischen Aufspaltung die Wechselwirkung über denselben angeregten Zustand der Monomere geht. Das Übergangsdipolmoment des absorbierenden Chromophors wechselwirkt mit den von dem angelegten E-Feld (nicht resonant) induzierten Dipolen der benachbarten Chromophore. In Abb. 30 sind die Ergebnisse für zwei Geometrien gezeigt.

Abb. 31: Schematisches Diagramm, das den Ursprung der Hypo- (links) und Hyperchromie (rechts) zeigt.

Bei der parallelen Anordnung (a) sind alle Dipole in einer sich gegenseitig abstoßenden Anordnung. Dadurch ist es schwieriger, einen Übergangsdipol am absorbierenden Chromophor zu erzeugen (der Übergangsdipol wird kleiner), d.h. die Absorption nimmt ab (Hypochromie).

Im Falle der linearen Anordnung (b) ziehen die induzierten Dipole den Übergangsdipol an. Der Übergangsdipol wird länger. Es kommt zu einer Stärkung des Übergangs (Hyperchromie).

Linearer Dichroismus

In Proben, bei denen die Moleküle zufällig (isotrop) angeordnet sind (z.B. Lösungen), ist die Absorption unabhängig von der Polarisation des eingestrahlten Lichts. Die Absorption ist proportional zu

$$\left|\left\langle \psi_j \left| \vec{\mu} \right| \psi_i \right\rangle \cdot \vec{E}_0 \right|^2 \ .$$

Dies bedeutet, dass für zufällig angeordnete Proben ein Mittelwert gemessen wird; für orientierte Proben bekommt man dagegen eine Abhängigkeit der Absorption von der linearen Polarisation (linearer Dichroismus).

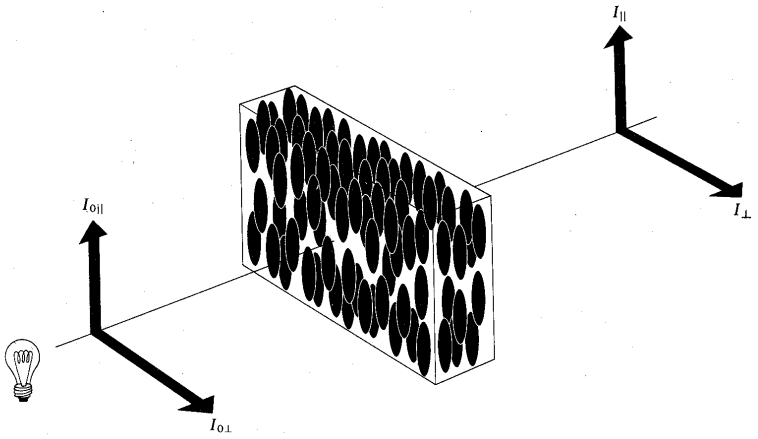


Abb. 32: Schematische Darstellung eines Experiments zur Messung des Lineardichroismus.

Üblicherweise werden zwei Messungen durchgeführt. Bei der einen befindet sich der elektrische Feldvektor parallel zur Ausrichtung der Moleküle (A_{**}), bei der anderen senkrecht dazu (A_{ζ}). Damit kann das dichroitische Verhältnis *d* bestimmt werden,

$$d = \frac{A_{\text{II}} - A_{\perp}}{A_{\text{II}} + A_{\perp}} \ .$$

Aus diesen Messungen können strukturelle Informationen gewonnen werden. Es kann z. B. die Orientierung der intensitätsstärksten Dipolübergänge von aromatischen planaren Molekülen, die in der Ebene des konjungierten Rings liegen, bestimmt werden.

Optische Aktivität

Fast alle Moleküle, die von lebenden Organismen synthetisiert werden, sind optisch aktiv. Die optische Aktivität kleiner Moleküle hat ihre Ursache im Fehlen von Symmetrien. Beispielsweise kommen Aminosäuren, die in der Biosynthese erzeugt wurden, nur als L-Isomere vor. In optisch aktiven Proben ist die Lichtausbreitung von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht unterschiedlich (Abb. 33).

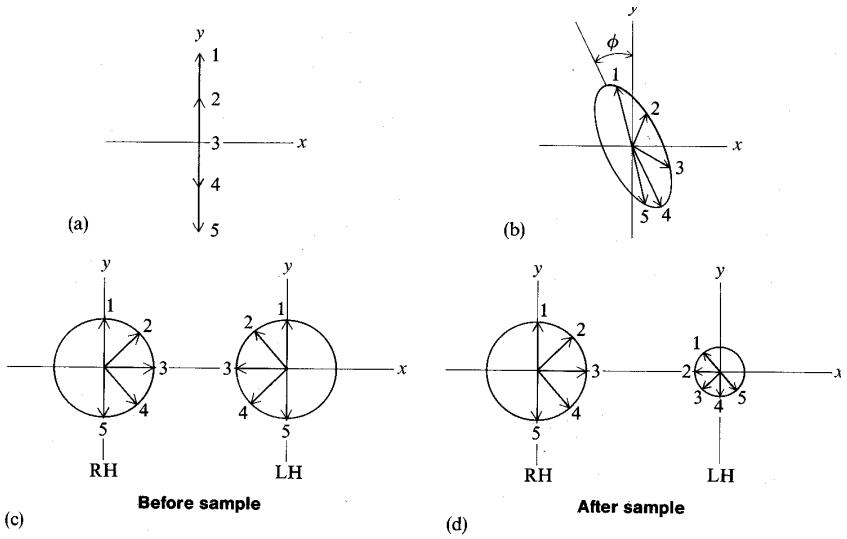


Abb. 33: Einfluss einer optisch aktiven, absorbierenden Probe auf eingestrahltes, linear polarisiertes Licht. Alle Zeichnungen zeigen den elektrischen Feldvektor in der Ebene senkrecht zur Lichtausbreitungsrichtung, die so gewählt ist, dass das Licht auf den Beobachter zuläuft. Die Punkte 1 bis 5 entsprechen fünf aufeinander folgenden Zeitpunkten. (a) Einfallendes, linear polarisiertes Licht. (b) Elliptisch polarisiertes Licht, das nach dem Durchgang des linear polarisierten Lichts durch das optisch aktive Medium erzeugt wurde. (c) Darstellung des linear polarisierten Lichts in links- und rechtszirkular polarisiertes Licht. (d) Auswirkung des optisch aktiven Mediums auf das links- und rechtszirkulare Licht. Die Summe dieser Komponenten ergibt das Ergebnis in (b).

Bei Einstrahlung einer linear polarisierten ebenen Welle treten zwei Effekte auf. Die Polarisationsebene wird um einen Winkel Φ gedreht (optische Rotation). Die Ursache dafür ist die unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeit (Brechungsindizes) des links- und rechtszirkular polarisierten Lichts. Zum anderen ist die Polarisation nicht mehr in einer Ebene lokalisiert (in der zweidimensionalen Projektion handelt es sich um eine Linie). Der elektrische Feldvektor beschreibt nun eine elliptische Schraubenbewegung (in der zweidimensionalen Projektion eine Ellipse). Dieser Effekt kommt durch die unterschiedliche Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht (A_L, A_R) zustande (zirkularer Dichroismus). Die Rotationsstärke eines Übergangs ($0 \rightarrow a$) kann wie folgt berechnet werden,

$$R = \mathrm{Im}\langle\psi_0|\vec{\mu}|\psi_a\rangle\langle\psi_a|\vec{m}|\psi_0\rangle,$$

wobei $\vec{m}$ der magnetische Dipoloperator ist. Der Term $\langle\psi_0|\vec{m}|\psi_a\rangle$ stellt den magnetischen Übergangsdipol, der als lichtinduzierter oszillierender Ringstrom betrachtet werden kann, und der Term $\langle\psi_a|\vec{\mu}|\psi_0\rangle$ den elektrischen Übergangsdipol, der den lichtinduzierten, linear oszillierenden Dipol beschreibt, dar. Eine anschauliche Erklärung der Rotationsstärke gibt Abb. 34.

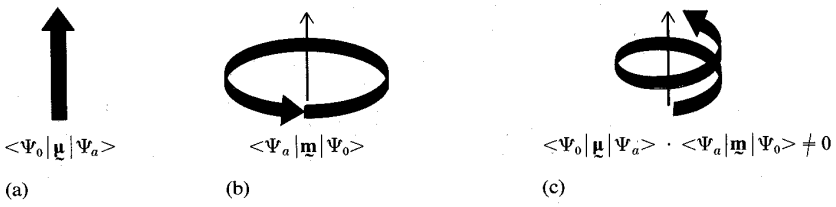


Abb. 34: Schematisches Diagramm der lichtinduzierten Ladungsveränderung in einem Molekül. (a) Reine elektronische Absorption. (b) Reine magnetische Absorption. (c) Optische Aktivität.

Das Prinzip der Messung des zirkularen Dichroismus ist in Abb. 35 dargestellt. Bevor das monochromatisierte Licht auf die Probe trifft, wird es polarisiert. Mit Hilfe eines $\lambda/4$ Modulators (Pockels-Zelle oder 'stress-plate modulator') wird das linear polarisierte Licht abwechselnd in eine links- und rechtszirkular polarisierte Welle umgewandelt und die Absorptionsdifferenz für beide Polarisationen gemessen. Typische Differenzen sind im Bereich 0.03 – 0.3 %. Gewöhnlich wird das Ergebnis in 'Elliptizität' θ, dem Arcustangens des Verhältnisses der kleinen zur großen Achse der Polarisationsellipse, angegeben. Es folgt

$$\theta = 2.303\,(A_L - A_R)\cdot 180/4\pi\,.$$

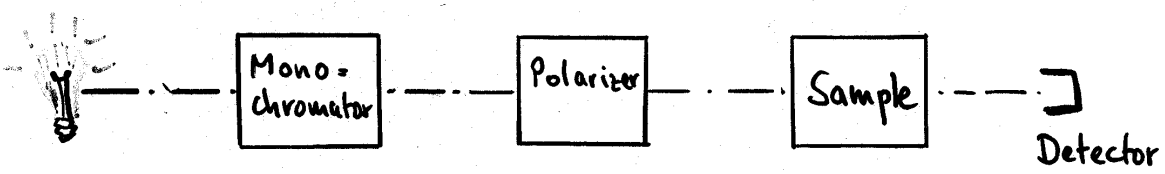


Abb. 35: Schema zur Messung des zirkularen Dichroismus.

Die molare Elliptizität ist

$$[\theta]_\lambda = 100\;\theta / c \cdot l \left[\frac{Grad\cdot \mathrm{cm}^2}{\mathrm{decimol}}\right],$$

mit der Konzentration c [mol/l] und der Weglänge l [cm]. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes erhält man auch

$$[\theta]_\lambda \approx 3300\,\Delta\varepsilon_\lambda\,,$$

wobei $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$.

Messungen des zirkularen Dichroismus sind wichtig für die Ermittlung von Sekundärstrukturen von Proteinen. Üblicherweise wird bei Proteinen die optische Aktivität im Bereich zwischen 190 und 230 nm durch das Peptidrückgrat dominiert. Für die Auswertung der Spektren kann man annehmen, dass das Spektrum sich aus einer linearen Kombination der Spektren von α-Helizes, β-Faltblättern und Knäueln zusammensetzt.

$$\theta = c_1\theta_\alpha + c_2\theta_\beta + c_3\theta_{coil}\,.$$

Es können Messungen des zirkularen Dichroismus an Homopolypeptiden, die nur aus einer der drei Strukturen zusammengesetzt sind, durchgeführt werden. Abb. 36 zeigt die Spektren eines Modell-Polypeptids. Ebenfalls dargestellt ist die Messung an Myoglobin. Die Analyse dieses Spektrums ergibt, dass die Sekundärstruktur von Myoglobin aus 75% α-Helizes und 25% ungeordnetem Bereich besteht.

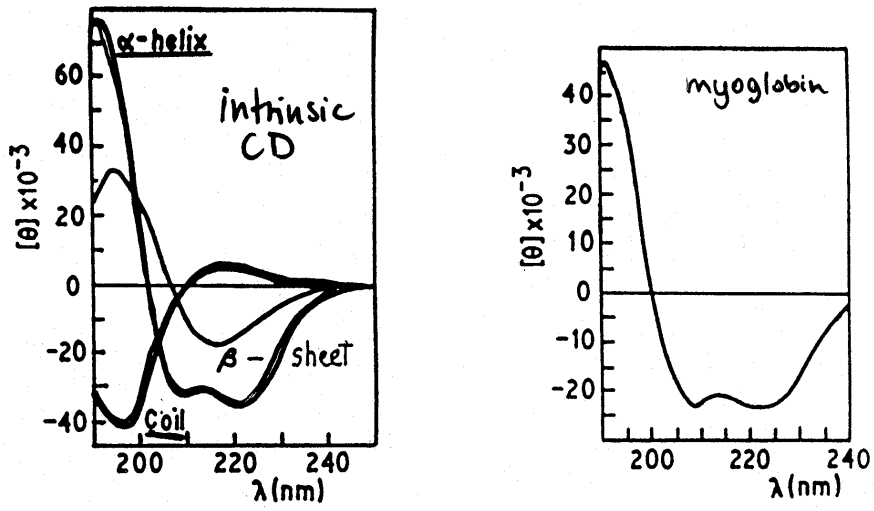


Abb. 36: Zirkularer Dichroismus für ein Modell Polypetid (Poly-L-Lysin). Strukturen aus α-Helices, β-Faltblättern und Knäueln sind zu sehen (links). Zirkularer Dichroismus von Myoglobin (rechts).

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine empfindliche Messmethode, um strukturelle und insbesondere dynamische Eigenschaften von Biomolekülen zu untersuchen. Anstelle der Lichtabsorption wird das von der Probe reemittierte Fluoreszenzlicht beobachtet. Wir betrachten eine Probe, die in den S_1-Zustand angeregt sei. Die Konzentration an angeregten Molekülen zum Zeitpunkt $t = 0$ sei $n_1(0)$. Für die zeitliche Entwicklung der Konzentration gilt, falls nur die Fluoreszenz den S_1-Zustand entvölkert,

$$n_1(t) = n_1(0)\exp[-k_R t]$$

mit $k_R = A_{10} = \hbar\omega^3/(\pi^2 c^3)\, B_{10}$ (index *R*: 'radiative'). Hier ist $k_R = 1/\tau_R$ der Ratenkoeffizient für die Fluoreszenz, τ_R die Lebensdauer, A_{10} und B_{10} sind die Einsteinkoeffizienten für spontane und induzierte Emission. Andere Mechanismen führen aber ebenfalls dazu, dass der angeregte Zustand entvölkert wird. Für den Ratenkoeffizienten der Entvölkerung des angeregten Zustands, welche sich im Abklingen der beobachteten Fluoreszenz widerspiegelt, gilt

$$k_F = k_R + k_{ic} + k_{is} + k_q[Q] \; .$$

Der zweite Term der rechten Seite, k_{ic}, stammt von der inneren Konversion, der dritte, k_{is}, vom 'intersystem crossing', und der letzte, k_q[Q], resultiert aus dem 'quenching'-Prozess. Der Anteil der angeregten Elektronen, der durch Fluoreszenz wieder in den Grundzustand geht, ist durch die Fluoreszenz-Quantenausbeute ϕ_F gegeben,

$$\phi_F = \frac{k_R}{k_F} \, .$$

Bei der **inneren Konversion** geht die Anregungsenergie durch Dissipation in Schwingungsmoden oder durch Kollision mit Lösungsmittelmolekülen verloren. Beide Prozesse nehmen mit ansteigender Temperatur zu, so dass die Fluoreszenz mit ansteigender Temperatur abnimmt. Dieser Effekt kann die temperaturabhängige Messung makromolekularer Konformationsänderungen mittels Fluoreszenz erschweren.
Beim '**intersystem crossing**' wird der angeregte Singulett-Zustand in einen angeregten Triplett-Zustand übergeführt. Dieser Zustand geht entweder mittels Phosphoreszenz oder durch strahlungslose Prozesse in den Grundzustand über. Da die Lebensdauer des Triplett-Zustands relativ lang ist, konkurrieren Kollisionsprozesse und die innere Konversion stark mit der Phosphoreszenz. Sie wird daher nur selten in Biomolekülen beobachtet.
Ein weiterer, mit der Fluoreszenz konkurrierender Prozess ist das '**Quenching**' (Löschung). Es werden dabei zwei Prozesse unterschieden. Beim dynamischen oder Kollisions-Quenching konvertieren gewisse Moleküle oder Ionen (Q), z. B. Grundzustands-Tripletts wie O_2, NO, in einer bimolekularen Reaktion,

$$S_1 + Q \xrightarrow{k_q} T_1 + Q,$$

den Singulettzustand (S_1) des angeregten Niveaus in einen Triplettzustand (T_1). Beim statischen 'quenching' geht das Quenchmolekül (Q) einen nicht fluoreszierenden Komplex mit dem fluoreszierenden Molekül (F) ein,

$$F + Q \underset{\longleftarrow}{\overset{K}{\longrightarrow}} FQ \; .$$

Abb. 1 zeigt ein Jablonski-Diagramm für Fluoreszenz-Anregung und Emission, bei dem zwei angeregte elektronische Singulett-Zustände auftreten.

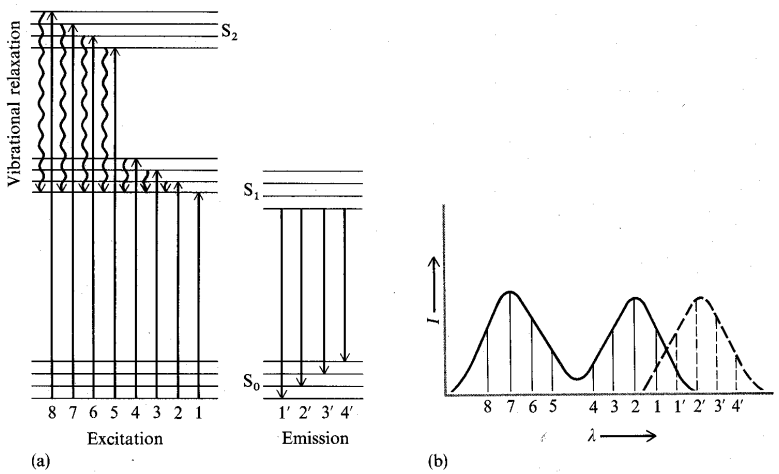


Abb. 1: Anregung und Emission von Fluoreszenz. (a) Energieniveaus; (b) Spektrum.

Sowohl die innere Konversion von S_2 nach S_1 als auch die Relaxation in den Schwingungsgrundzustand von S_1 sind gewöhnlich sehr viel schneller als die Emission des Fluoreszenzphotons. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenzstrahlung in der Regel vom Grundschwingungsniveau des ersten elektronischen Zustands emittiert wird. Somit ist das Fluoreszenzspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge. Falls der Grundzustand und der angeregte elektronische Zustand eine ähnliche Schwingungsstruktur haben, verhält sich das Emissionsspektrum spiegelbildlich zum Absorptionsspektrum. Ausgehend von den oben genannten Argumenten würde man erwarten, dass die Absorption 1 und die Emission 1' (Abb. 1) bei der gleichen Wellenlänge gemessen werden. Man findet aber, dass das Fluoreszenzspektrum um ~20 – 50 nm zu längeren Wellenlängen verschoben ist (Stokes-Verschiebung oder Stokes-Shift). Dieser Effekt kommt für Fluorophore in Lösungen wie folgt zustande: Vor der Absorption sind die Lösungsmittelmoleküle energetisch günstig in Bezug auf den Grundzustand angeordnet. Während des schnellen Absorptionsprozesses (~1 fs) haben die Lösungsmittelmoleküle keine Zeit zur Reorientierung. Für die Absorption ist eine bestimmte Energie *E* notwendig. Nach der Anregung kann sich das Lösungsmittel günstig um das angeregte Molekül herum orientieren. Dies führt zu einer Energieabsenkung (Abb. 2).

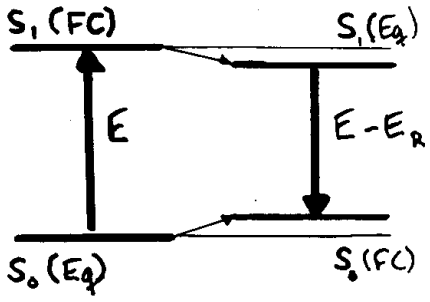


Abb. 2: Energiezustände bei der Stokes-Verschiebung.

Nach der Emission des Fluoreszenzphotons ist das Lösungmittel ungünstig um den Grundzustand herum angeordnet, und somit wird das Grundniveau angehoben. Beide Prozesse vermindern also den Energieunterschied der Niveaus. Eine entsprechende Betrachtung ist gültig für Fluorophore im Inneren von Biomolekülen. Dann spielt die molekulare Umgebung die Rolle des Lösungsmittels.

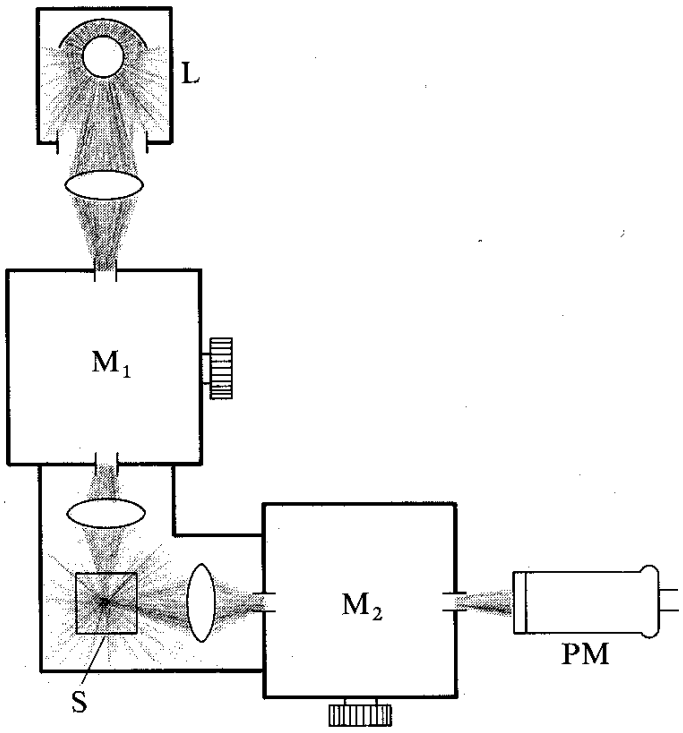


Abb. 3: Apparatur zur Messung der statischen Fluoreszenz. M_1 ist der Anregungs-, M_2 der Emissionsmonochromator, L ist die Lichtquelle, PM der Photomultiplier und S die Probe.

Abb. 3 zeigt eine typische experimentelle Anordnung zur Messung der statischen Fluoreszenz. Das Anregungslicht von der breitbandigen Lichtquelle L kann mit dem ersten Monochromator M_1 durchgestimmt werden. Das von der Probe S emittierte Fluoreszenzlicht wird mittels des zweiten Monochromators M_2 wellenlängenabhängig gemessen. Zwei verschiedene Modi werden für die spektralen Messungen angewandt. Zum einen kann der Monochromator M_1 auf eine bestimmte Anregungswellenlänge (z.B. bei der Wellenlänge maximaler Absorption) fixiert bleiben, während M_2 durchgestimmt wird. Man erhält auf diese Weise ein **Emissionsspektrum**. Im zweiten Modus wird M_2 fixiert (z.B. bei der Wellenlänge maximaler Emission), und M_1 wird durch das Absorptionsband gescannt (**Anregungsspektrum**). Da die angeregten Schwingungszustände sehr schnell in den Grundschwingungszustand des angeregten elektronischen Niveaus übergehen, ist das Anregungsspektrum üblicherweise gleich dem Absorptionsspektrum für eine reine Probe. Die Aufnahme eines Anregungsspektrums hat gegenüber dem Absorptionsspektrum den Vorteil, dass zwei Chromophore, von denen nur einer fluoresziert, leicht getrennt werden können.

Bei Fluoreszenzmessungen steigt die emittierte Intensität nur bei kleinen Probenkonzentrationen mit der Konzentration an. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Emission sogar mit der Konzentration ab. Dieses Verhalten wird durch den inneren Filtereffekt erklärt (Abb. 4): Bei hohen Konzentrationen ist die Absorption so stark, dass das Licht nur in einer dünnen Lamelle an der beleuchteten Seite absorbiert wird. Das meiste Fluoreszenzlicht wird in der Probe absorbiert oder nicht vom Ausgangsspalt gesammelt. Man muss also beachten, dass die Konzentration hinreichend niedrig eingestellt wird, damit der innere Filtereffekt nicht stört. Natürlich muss die Konzentration ausreichend hoch sein, um Fluoreszenzspektren in guter Qualität messen zu können.

Die Möglichkeit, bei sehr geringer Probenkonzentration (10^{-9} M) arbeiten zu können, ist ein großer Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie. Sie wird seit einigen Jahren sogar zur Messung an einzelnen Fluorophoren eingesetzt.

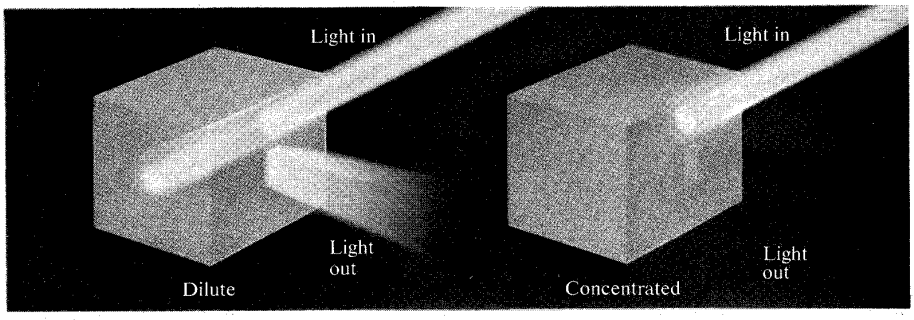


Abb. 4: Innerer Filtereffekt: Auf die Probe einfallendes und emittiertes Licht.

Absolute Messungen der Quantenausbeute sind schwierig, da man die Emissions- und Absorptionsraten exakt messen muss. Daher wird sie in der Regel relativ zu einem Standard bestimmt. Alternativ lässt sich die Quantenausbeute auch über die Zerfallszeiten mit Hilfe von Experimenten in der Zeit- oder Frequenzdomäne ermitteln,

$$\phi = \frac{\tau_F}{\tau_R} \ .$$

Mit zeitaufgelösten Experimenten lassen sich die Kollisionsrate mit dem Quencher, Energietransferraten und Raten von Reaktionen im angeregten Zustand bestimmen. Die Zerfallszeiten werden auch verwendet, um Rotationskorrelationszeiten aus Messungen der Fluoreszenzanisotropie zu messen.

Tab. 1: Fluoreszenzcharakteristik verschiedener intrinsischer Fluorophore

		Absorption		Fluorescence§			Sensitivity
Substance	Conditions	λ_{max} (nm)	$\varepsilon_{max} \times 10^{-3}$	λ_{max} (nm)	ϕ_F	τ_F (nsec)	$\varepsilon_{max}\phi_F \times 10^{-2}$
Tryptophan	H_2O, pH 7	280	5.6	348	0.20	2.6	11.
Tyrosine	H_2O, pH 7	274	1.4	303	0.14	3.6	2.0
Phenylalanine	H_2O, pH 7	257	0.2	282	0.04	6.4	0.08
Y base	Yeast $tRNA^{Phe}$	320	1.3	460	0.07	6.3	0.91
Adenine	H_2O, pH 7	260	13.4	321	2.6×10^{-4}	<0.02	0.032
Guanine	H_2O, pH 7	275	8.1	329	3.0×10^{-4}	<0.02	0.024
Cytosine	H_2O, pH 7	267	6.1	313	0.8×10^{-4}	<0.02	0.005
Uracil	H_2O, pH 7	260	9.5	308	0.4×10^{-4}	<0.02	0.004
NADH	H_2O, pH 7	340	6.2	470	0.019	0.40	1.2

Tab. 1 zeigt die Fluoreszenzeigenschaften von Chromophoren, die in Proteinen und Nukleinsäuren vorkommen (intrinsische Fluorophore). Die Anzahl dieser intrinsischen Fluorophore ist sehr klein; außerdem absorbieren sie verhältnismäßig schwach. In vielen Proteinen wird die Fluoreszenz von Tryptophan dominiert. Da Tyrosin in Proteinen häufiger vorkommt, sollte man trotz der schwächeren Fluoreszenz im Vergleich zu Tryptophan mit einem wesentlichen Beitrag des Tyrosins rechnen. Allerdings wird Tyrosin durch ein benachbartes Tryptophan gequencht. Die gewöhnlichen Nukleinsäuren zeigen sehr schwache Fluoreszenz. Es ist aber möglich, Fluorophore hinzuzufügen, die an die betrachtete Probe binden. Dies kann über kovalente oder nichtkovalente Bindung des Farbstoffs an das Biomolekül erfolgen. Vielfach setzt man auch kovalent Farbstoff-markierte Immunglobulinmoleküle ein, die an ein bestimmtes Biomolekül binden und es damit markieren (Immunfluoreszenz). Diese extrinsischen Fluorophore können so gewählt werden, dass ihr Absorptionsspektrum nicht mit dem des betrachteten Biomoleküls zusammenfällt, so dass die Fluoreszenz nur von dem extrinsi-

schen Fluorophor stammt. Tab. 2 zeigt einige Beispiele aus der großen Anzahl extrinsischer Fluorophore. Die chemischen Strukturen sind in Abb. 5 zu sehen.

Tab. 2: Typische extrinsische Fluorophore

		Absorption		Emission[§]			Sensitivity
Probe*	Uses	λ_{max} (nm)	$\varepsilon_{max} \times 10^{-3}$	λ_{max} (nm)	ϕ_F	τ_F (nsec)	$\varepsilon_{max}\phi_F \times 10^{-2}$
Dansyl chloride	Covalent attachment to protein: Lys, Cys	330	3.4	510	0.1	13	3.4
1,5-I-AEDANS	Covalent attachment to protein: Lys, Cys	360	6.8	480	0.5	15	34
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Covalent attachment to protein: Lys	495	42	516	0.3	4	116
8-Anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)	Noncovalent binding to proteins	374	6.8	454	0.98	16	67
Pyrene, and various derivatives	Polarization studies on large systems	342	40	383	0.25	100	100
Ethenoadenosine, and various derivatives	Analogs of nucleotides bind to proteins, incorporate into nucleic acids	300	2.6	410	0.40	26	10
Ethidium bromide	Noncovalent binding to nucleic acids	515	3.8	600	~1	26.5	38
Proflavine monosemicarbazide	Covalent attachment to RNA 3′-ends	445	15	516	0.02	—	30

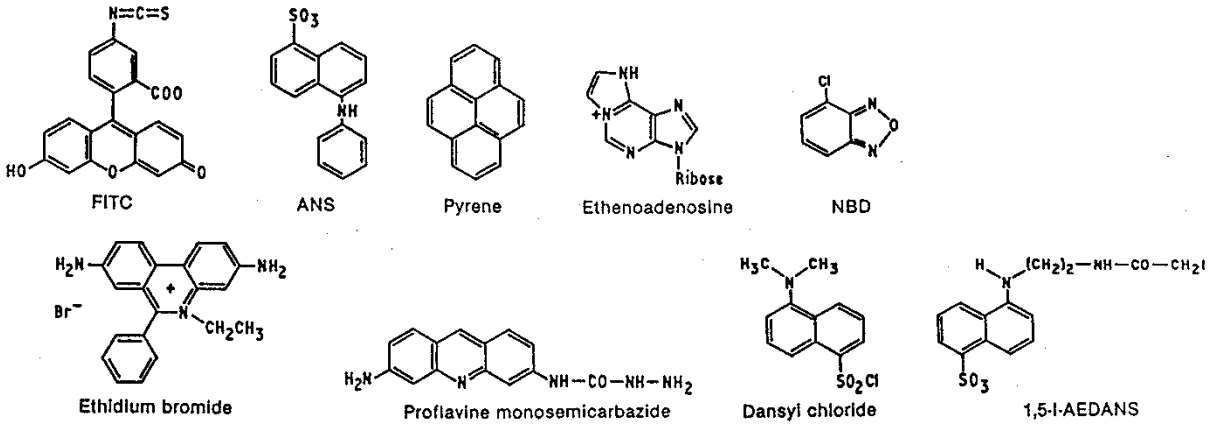


Abb. 5: Strukturen einiger extrinsischer Fluorophore.

Umgebungsabhängigkeit der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz ist generell stärker von der Umgebung beeinflusst als die Absorption. Diese höhere Sensitivität ist dadurch bedingt, dass dynamische Prozesse, die während der Verweilzeit der Fluorophore im angeregten Zustand (~1 − 10 ns) stattfinden, die Fluoreszenzemission beeinflussen. Zu diesen Prozessen gehören: Lösungsmittelrelaxationen, chemische Reaktionen (Protonierung, Ligandenbindung), Veränderungen der Molekülorientierung und Quenching. Der Absorptionsprozess läuft dagegen um Größenordnungen schneller ab, so dass die Umgebung effektiv statisch ist.

Im Folgenden soll die Konzentrationsabhängigkeit des Quenchings genauer untersucht werden. Damit kann z.B. im Falle des Kollisionsquenchings untersucht werden, ob sich der Fluorophor an der Oberfläche des Proteins (in Kontakt mit dem Lösungsmittel) oder in dessen Innern befindet. Für den Quotienten der Fluoreszenzintensität (Quantenausbeute) bei Anwesenheit des Quenchers (F, ϕ) und der Fluoreszenzintensität ohne Quencher (F_0,ϕ_0) gilt

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\phi_0}{\phi} = \frac{k_R / (k_R + k_{ic} + k_{is})}{k_R / (k_R + k_{ic} + k_{is} + k_q \cdot [Q])} .$$

Daraus folgt die Stern-Volmer Relation,

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\phi_0}{\phi} = 1 + \frac{k_q}{k_R + k_{ic} + k_{is}} [Q] .$$

Durch Einsetzen der Zerfallszeiten erhält man

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = \frac{\tau_0}{\tau} .$$

Die Quenchrate k_q kann mit einem Modell, bei dem die Fluorophore und die Quenchmoleküle als Kugeln mit Radien R_f bzw. R_q betrachtet werden, mittels Bestimmung ihrer Kollisionswahrscheinlichkeit bei gegebenen Diffusionskonstanten (D_f bzw. D_q) berechnet werden. Aus der Smoluchowski-Gleichung resultiert der bimolekulare Ratenkoeffizient für Kollisionen,

$$k_0 = \frac{4\pi N_A}{1000} (R_f + R_q)(D_f + D_q) .$$

Nicht jede Kollision führt zu einem Quenchprozess, mit der Quencheffizienz γ gilt daher

$$k_q = k_0 \cdot \gamma .$$

Da die Diffusionskonstanten bei Erhöhen der Temperatur größer werden, nimmt der Quenchvorgang mit höherer Temperatur zu. Die Steigung im Stern-Volmer-Plot wird demnach größer (Abb. 6). Eine umgekehrte Temperaturabhängigkeit kann für statisches Quenching beobachtet werden. Unter der Annahme, dass das fluoreszierende Molekül *F* und das Quenchmolekül einen nicht fluoreszierenden Komplex bilden, gilt für die Gleichgewichtskonstante *K*

$$K = \frac{[F\,Q]}{[F][Q]} = \frac{[F_0] - [F]}{[F][Q]}$$

$$= \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} ,$$

wobei $[F_0]$ die Gesamtkonzentration des Fluorophors darstellt, $[F_0] = [F] + [FQ]$. Damit folgt für das Intensitätsverhältnis

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q].$$

Es folgt also die gleiche [*Q*]-Abhängigkeit wie für das dynamische Quenching. Da die Wahrscheinlichkeit, dass sich Quenchmoleküle und Fluorophore zu einem Komplex verbinden, mit höherer Temperatur abnimmt, erhält man eine kleinere Steigung in Abb. 6. Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturabhängigkeit lassen sich die beiden Quencharten unterscheiden. Bei Messungen der Lebensdauern sind beide Quenchmechanismen leicht auseinanderzuhalten, da sich nur beim dynamischen Quenchen die Fluoreszenzlebensdauern mit der Konzentration des Quenchers verändern.

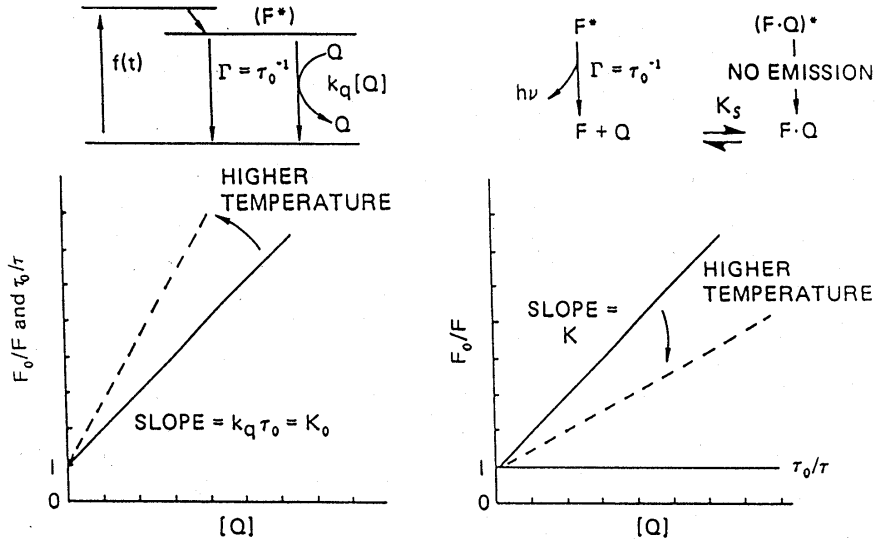


Abb. 6: Temperaturabhängigkeit der Stern-Volmer-Gleichung für dynamisches (links) und statisches Quenching.

Singulett-Singulett Energietransfer (Förstertransfer)

Ein interessanter Effekt ergibt sich aus der Möglichkeit, dass Chromophore Quenching bewirken können, die sich 10 – 100 Å von einem Fluorophor befinden. Betrachtet werden zwei verschiedene Moleküle, deren Spektren in Abb. 7 dargestellt sind.

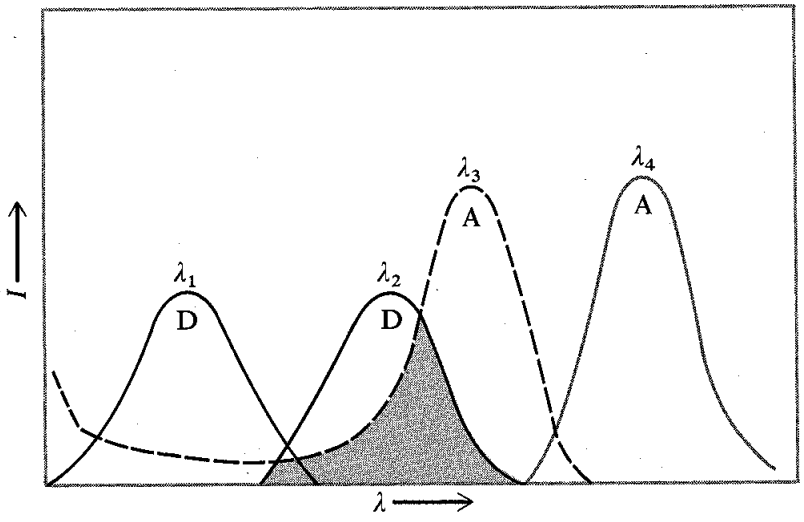


Abb. 7: Schematisches Spektrum eines Donor-Akzeptor-Paares. Gezeigt sind die Absorptions- und Emissionsspektren des Donors D und des Akzeptors A.

Der Chromophor mit dem höheren Absorptionsniveau ist der Donor *D*, der andere der Akzeptor *A*. Der Donor befinde sich im ersten angeregten (Singulett) Zustand. Durch innere Konversion erreicht er schnell den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten Niveaus. Ist ein Überlapp der Emissionsbande des Donors mit der Absorptionsbande des Akzeptors gegeben, so kann folgende Resonanz auftreten:

$$D^* + A \underset{\longleftarrow}{\overset{k_T}{\longrightarrow}} D + A^*,$$

wobei die Transferrate durch k_T gegeben ist. Der Akzeptor wird in den S_1-Zustand angeregt, während der Donor in den elektronischen Grundzustand übergeht. Nach der Anregung des Akzeptors in den ersten elektronischen Zustand wird dieser schnell in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronischen Niveaus und der Donor in den Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundniveaus übergehen (Abb. 8).

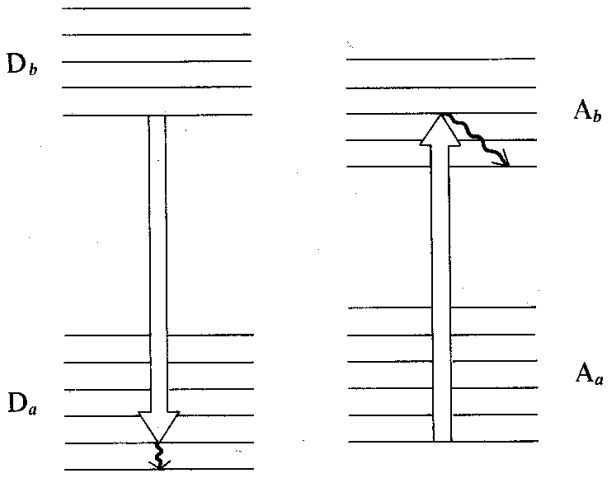


Abb. 8: Energietransfer durch resonante Wechselwirkung der Emission des Donors mit der Anregung des Akzeptors.

Somit ist der Rücktransfer unwahrscheinlich. Der Donor wird also durch die Anregung des Akzeptors gequencht. Für diesen Singulett-Singulett-Energietransfer kann man folgende Transfereffizienz ε definieren,

$$\varepsilon = \frac{k_T}{k_T + k_R^D + k_{ic}^D + k_{is}^D} \ .$$

Diese Effizienz kann bestimmt werden durch Vergleich der Fluoreszenz des Donors ohne Anwesenheit des Akzeptors (D) und bei Anwesenheit des Akzeptors (D, A). Man erhält für das Verhältnis

$$\frac{\phi_{D,A}}{\phi_D} = \frac{k_R^D / \left(k_R^D + k_{ic}^D + k_{is}^D + k_T\right)}{k_R^D / \left(k_R^D + k_{ic}^D + k_{is}^D\right)} = 1 - \varepsilon = \frac{\tau_{D,A}}{\tau_D} \ .$$

Um nützliche strukturelle Informationen aus dem Energietransfer zu bekommen, muss die gemessene Effizienz zu dem Abstand R zwischen den Chromophoren in Relation gesetzt werden. Dieser Zusammenhang wurde von Theodor Förster hergeleitet. Aufgrund der vorliegenden schwachen Kopplung kann Fermi's goldene Regel für die Berechnung verwendet werden. Für die Transferrate gilt dann

$$k_T(\nu) \propto \left| \left\langle \psi_D \psi_{A^*} \left| V \right| \psi_{D^*} \psi_A \right\rangle \right|^2$$

mit dem Dipol-Dipol Kopplungsoperator

$$V = \frac{\vec{\mu}_D \cdot \vec{\mu}_A}{R^3} - \frac{3(\vec{\mu}_D \cdot \vec{R})(\vec{R} \cdot \vec{\mu}_A)}{R^5} = \kappa \frac{|\vec{\mu}_D| \cdot |\vec{\mu}_A|}{R^3} \ ,$$

wobei die Abhängigkeit von der gegenseitigen Orientierung in dem Faktor κ zusammengefasst wurde. Durch Einsetzen des Kopplungsoperators ergibt sich

$$k_T(\nu) \propto \left| \frac{\kappa}{R^3} \left\langle \psi_D \psi_{A^*} \left| \vec{\mu}_D \right| \cdot \left| \vec{\mu}_A \right| \psi_{D^*} \psi_A \right\rangle \right|^2$$

$$\propto \frac{\kappa^2}{R^6} \left| \left\langle \psi_D \left| \vec{\mu}_D \right| \psi_{D^*} \right\rangle \right|^2 \left| \left\langle \psi_{A^*} \left| \vec{\mu}_A \right| \psi_A \right\rangle \right|^2 .$$

Die Transferrate ist also proportional zu R^{-6}. Das erste Betragsquadrat stellt die Dipolstärke des Donors (D_D), das zweite die des Akzeptors (D_A) dar. Es ergibt sich

$$D_A \propto B_{ij} \propto \int \varepsilon_A(\nu) \nu^{-1} d\nu ,$$

$$D_D \propto B_{ji} \propto A_{ji} \nu^{-3} = \tau_R^{-1} \nu^{-3} = \phi_D \tau_D^{-1} \nu^{-3} ,$$

mit

$$\phi_D = \frac{k_R}{k_{F,D}} = \frac{\tau_D}{\tau_R} .$$

Integration über alle Frequenzen liefert dann

$$k_T \propto \frac{\kappa^2}{R^6} \frac{\phi_D}{\tau_D} \int \varepsilon_A(\nu) f_D(\nu) \nu^{-4} d\nu .$$

Hierbei ist $f_D(\nu)$ die normierte Fluoreszenzemission. Ein Problem ist, dass κ nicht direkt bestimmt werden kann. Glücklicherweise gehen Fehler von κ nur mit $(\kappa^2)^{1/6}$ in die Berechnung des Donor-Akzeptor-Abstandes ein. Die hier skizzierte Herleitung gilt nur für Vakuumbedingungen. In einem Medium mit Brechungsindex n muss die Wechselwirkung V durch V/n^2 ersetzt werden. Die Transferrate kann geschrieben werden als

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

mit

$$R_0 = 9.78 \cdot 10^3 (J \kappa^2 n^{-4} \phi_D)^{1/6} \quad [\text{Å}]$$

$$J = \int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \left[\text{cm}^3 \text{M}^{-1} \right] .$$

Für die Transfereffizienz folgt

$$\varepsilon = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} .$$

Die Transfereffizienz ε kann durch Messung der Intensitäten I_D und I_A der Donor- und Akzeptoremission ratiometrisch bestimmt werden,

$$\varepsilon = \frac{I_A}{I_A + \gamma I_D} .$$

Hier ist γ ein Korrekturfaktor, der die unterschiedlichen Detektionseffizienzen und Fluoreszenzquantenausbeuten berücksichtigt. Alternativ kann man, wie oben bereits erläutert, Fluoreszenzlebensdauern der Donorfluoreszenz in An- und Abwesenheit des Akzeptors bestimmen,

$$\varepsilon = 1 - \frac{\tau_{D,A}}{\tau_D} .$$

Dieses Verfahren hat gegenüber der ratiometrischen Messung den Vorteil, dass bei Intensitätsmessungen notwendige Untergrundkorrekturen entfallen. Eine Messung der Transfereffizienz ist in Abb. 9 zu sehen. In dem relativ großen Bereich, in dem die Transfereffizienz stark distanzabhängig ist, lässt sich der Abstand zwischen den Chromophoren recht genau bestimmen.

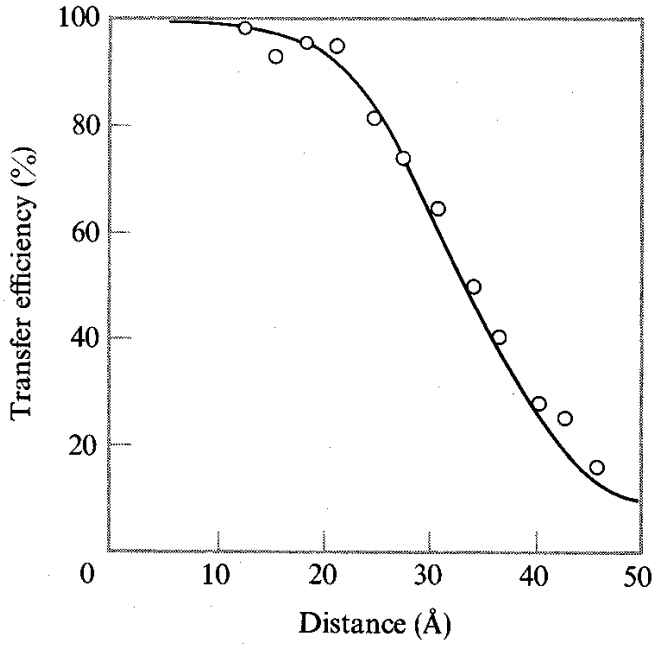


Abb. 9: Energietransfereffizienz als Funktion der Distanz in Dansyl-(Pro)$_n$–NH-NH-CO-NH-Naphthyl für n = 1 to 12.

Fluoreszenzpolarisation

Wird linear polarisiertes Licht auf eine fluoreszierende Probe eingestrahlt und die Polarisation des Fluoreszenzlichts detektiert, so kann man dynamische Informationen über das betrachtete Biomolekül erhalten. Eine typische Messanordnung ist in Abb. 10 zu sehen.

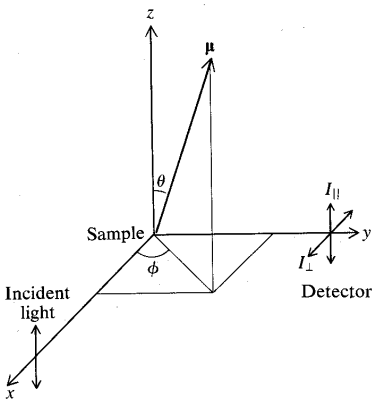


Abb. 10: Koordinatensystem zur Diskussion der Fluoreszenzpolarisation.

Das in *z*-Richtung polarisierte Licht trifft entlang der *x*-Achse auf die Probe. Die *x*- und *z*-Komponenten der Polarisation ($I_\perp$und $I_\parallel$) der in *y*-Richtung emittierten Fluoreszenz werden gemessen. Es wird zuerst eine starre, isotrope Probe betrachtet (z.B. eine eingefrorene Lösung von fluoreszierenden Molekülen). Der Vektor $\vec{\mu}$ definiert die Orientierung des Dipolübergangsmoments der Absorption eines Chromophors. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Chromophor angeregt wird, ist

$$P \approx \left|\vec{\mu} \cdot \vec{E}\right|^2 \approx \cos^2 \theta \ ,$$

da der *E*-Feldvektor in *z*-Richtung zeigt (θ ist der Winkel zwischen $\vec{\mu}$ und der *z*-Achse). Es werden somit bevorzugt Moleküle angeregt, die in *z*-Richtung orientiert sind (Photoselektion). Zur Erklärung der Fluoreszenzpolarisation wird zuerst die Wahrscheinlichkeit für die Anregung eines Fluorophors mit spezieller Orientierung und danach die Wahrscheinlichkeit für Emission in eine bestimmte Richtung berechnet. Für die Wahrscheinlichkeit, ein angeregtes Molekül mit $\vec{\mu}$ zwischen θ und $\theta + d\theta$, ϕ und $\phi + d\phi$ zu finden, gilt

$$P(\theta, \phi)\, d\,\phi\, d\,\theta \approx \cos^2 \theta \sin \theta\, d\,\theta\, d\,\phi \, .$$

Der Anteil an der Gesamtpopulation ist dann

$$W(\theta,\phi) d\phi d\theta = \frac{P(\theta,\phi) d\phi d\theta}{\int_0^{\pi} d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \cos^2 \theta \sin \theta} = \frac{3}{4\pi} \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\phi \, .$$

Abb. 11 zeigt die Verteilung der angeregten Chromophore.

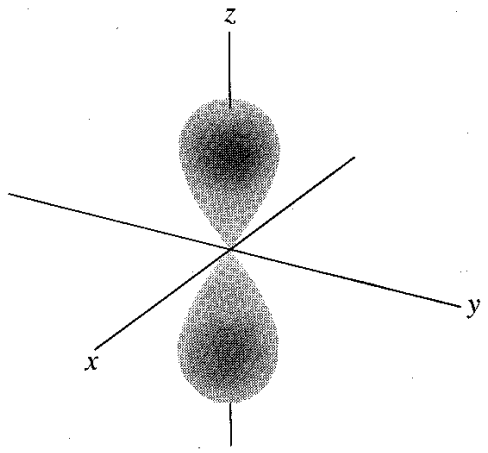


Abb. 11: Verteilung der angeregten Chromophore durch Licht, das in z-Richtung polarisiert ist und sich in x-Richtung ausbreitet.

Falls der gleiche elektronische Zustand, der das Anregungsphoton absorbiert hat, auch das Fluoreszenzphoton emittiert, sind die Richtungen der Übergangsdipolmomente für die Absorption und Emission gleich. Für die Wahrscheinlichkeit der in *z*-Richtung ($\left|\vec{\mu} \cdot \vec{z}\right| \propto \cos^2 \theta$) polarisierten Emission ergibt sich dann

$$I_\parallel \propto \left|\vec{\mu} \cdot \hat{z}\right|^2 \propto \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \cos^2 \theta \, W(\theta,\varphi) = \frac{3}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} d\theta \cos^4 \theta \sin \theta = \frac{3}{5} \ .$$

Für die in *x*-Richtung polarisierte Fluoreszenz gilt ($\left|\vec{\mu} \cdot \hat{x}\right|^2 \propto (\sin \theta \cos \phi)^2$)

$$I_{\perp} \propto \left|\vec{\mu}\cdot\hat{x}\right|^2 \propto \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta (\sin\theta\cos\phi)^2 W(\theta,\phi) = \frac{1}{5}$$

Für den Vergleich mit dem Experiment werden die Größen Polarisation

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

bzw. Anisotropie

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

eingeführt. Für den obigen Fall eines starren Systems mit parallelen Übergangsdipolen für Absorption und Emission ergibt sich somit

$$P = \frac{1}{2}\ ; \qquad A = \frac{2}{5}\ .$$

Für ein starres System, bei dem zwischen beiden Übergangsdipolen ein Winkel ζ besteht, erhält man

$$P_0 = \frac{3\cos^2\xi - 1}{\cos^2\xi + 3}\ ; \qquad A_0 = \frac{3\cos^2\xi - 1}{5} = \frac{2P_0}{3 - P_0}\ .$$

P_0 wird limitierende Polarisation und A_0 limitierende Anisotropie genannt; sie gelten für ein starres System. Je nach Winkel ξ können sich deren Werte zwischen $-1/3 < P_0 < 1/2$ und $-1/5 < A_0 < 2/5$ bewegen.

Werden nun Moleküle betrachtet, die nicht starr sind, so können sie ihre Orientierung während der Zeit ändern, in der sie sich im angeregten Zustand befinden. Die gleich nach der Anregung emittierten Fluoreszenzphotonen sind mit P_0 polarisiert, während die später emittierten Fluoreszenzphotonen stärker depolarisiert sind, weil die Moleküle und damit die Übergangsdipole in Lösung rotieren können. Die Messung der Polarisation (Anisotropie) der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit ermöglicht somit die Bestimmung der Rotationsbewegung der Chromophore.

Die Rotationsbewegung kann im einfachsten Modell als Brownsche Bewegung der Übergangsdipolmomente der Emission beschrieben werden. Mit der Rotations-Diffusionsgleichung folgt

$$\frac{dW(\theta,\phi,t)}{dt} = D_{rot}\nabla^2 W(\theta,\phi,t) = \frac{kT}{6V_h\eta}\nabla^2 W(\theta,\phi,t)\ ,$$

wobei W die Wahrscheinlichkeit darstellt, dass sich das als sphärisch angenommene Molekül in einer bestimmten Orientierung befindet. D_{rot} ist der Diffusionkoeffizient für Rotation, η die Viskosität und V_h das Volumen des Moleküls inklusive der mitrotierenden Hydrathülle. Die ursprüngliche Verteilung der angeregten Moleküle war

$$W(\theta,\phi,0) = \frac{3}{4\pi}\cos^2\theta\sin\theta\ .$$

Für die Berechnung der Emissionsintensität muss der Zerfall des angeregten Zufalls berücksichtigt werden. Somit erhält man für die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül zur Zeit t bei θ, ϕ zu finden,

$$W(\theta,\phi,t)\, e^{-t/\tau_F}\ .$$

Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung, die entlang einer bestimmten Achse *a* polarisiert ist, ergibt sich dann zu

$$I_a(t) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta P_a(\theta,\phi,\xi) W(\theta,\phi,t) e^{-t/\tau_F} \ .$$

P_a ist wiederum gleich $\cos^2\theta$ (für $\xi = 0$) entlang *z* und $\cos^2\phi \sin^2\theta$ (für $\xi = 0$) entlang *x*. Für die parallele Polarisation erhält man

$$I_{II}(t) = \left[\frac{1}{3} + \frac{4}{15} e^{-6D_{rot}t} \frac{3\cos^2\xi - 1}{2}\right] \quad e^{-t/\tau_F} \ .$$

Entsprechend ergibt sich für die senkrechte Polarisation

$$I_{\perp}(t) = \left[\frac{1}{3} - \frac{2}{15} e^{-6D_{rot}t} \frac{3\cos^2\xi - 1}{2}\right] e^{-t/\tau_F} \ .$$

Die Anisotropie ist

$$A(t) = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{2}{5} e^{-6D_{rot}t} \frac{3\cos^2\xi - 1}{2} \ .$$

Sie ist also unabhängig von der Lebensdauer. Daraus folgt für kurze bzw. lange Zeiten sinnvollerweise

$$A(0) = A_0, \qquad A(\infty) = 0. \quad .$$

Die Rotationskorrelationszeit τ_c ist wie folgt definiert,

$$\tau_c = \frac{1}{6} D_{rot} \ .$$

Für ein relativ kleines Protein (25 kD) erhält man für τ_c Werte um 10 ns (in Wasser, 20°C). Die Messung von τ_c erlaubt bei bekannter Viskosität somit die Bestimmung des hydratisierten Volumens. Abb. 12 zeigt den Abfall der Anisotropie von Anthraniloyl-Ser^{195}-α-Chymotrypsin. Neben diesen apparativ recht aufwendigen, zeitabhängigen Messungen werden auch einfachere, statische Methoden verwendet. Es wird die *mittlere*, senkrechte und parallele Polarisationskomponente der Fluoreszenzemission gemessen,

$$\bar{I}_{\parallel} = \tau_F^{-1} \int_0^{\infty} I_{\parallel}(t) dt, \qquad \bar{I}_{\perp} = \tau_F^{-1} \int_0^{\infty} I_{\perp}(t) dt \ .$$

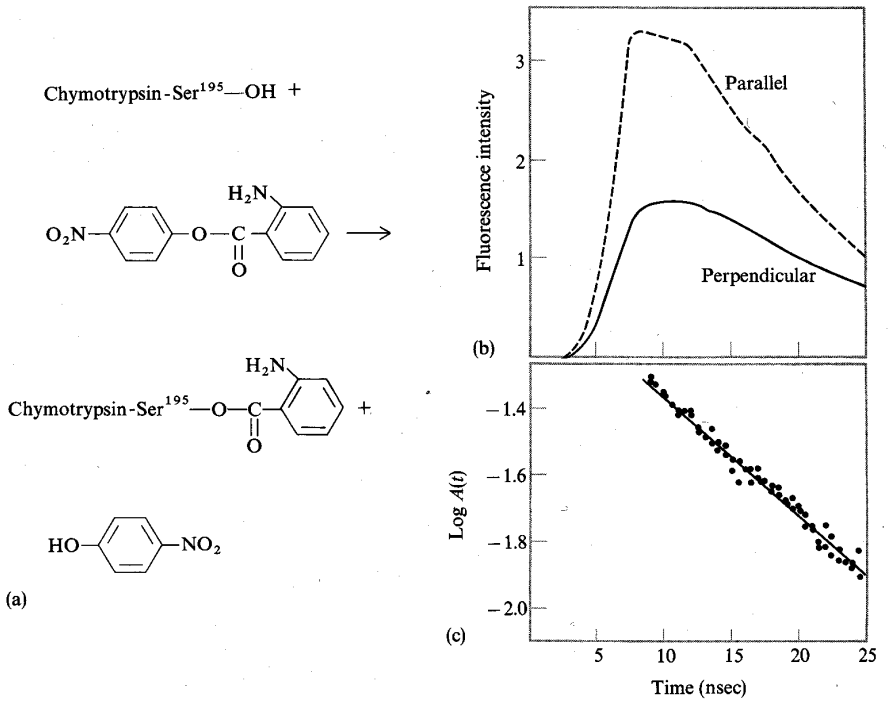


Abb. 12: Abfall der Fluoreszenz-Anisotropie von Anthraniloyl-Ser^{195}-α-Chymotrypsin. (a) Präparation dieses Derivats. (b) Fluoreszenzabfall für die beiden Polarisationskomponenten. (c) Die Anisotropie nach Entfaltung mit dem Anregungspuls.

Daraus folgt für die Anisotropie

$$\overline{A} = \frac{3\cos^2 \xi - 1}{5\left(1 + \tau_F / \tau_C\right)} \ .$$

Dies kann unter Verwendung der limitierenden statischen Anisotropie $\overline{A}_0$ wie folgt dargestellt werden,

$$\frac{1}{\overline{A}} = \frac{1}{\overline{A}_0}\left(1 + \tau_F / \tau_C\right) \ .$$

Mit

$$\tau_c = \frac{V_h \eta}{kT}$$

folgt die Perrin-Gleichung,

$$\frac{1}{\overline{A}} = \frac{1}{\overline{A}_0}\left(1 + \frac{\tau_F k}{V_h}\frac{T}{\eta}\right) \ .$$

Wird die statische Anisotropie der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur oder Viskosität gemessen, so erhält man eine Gerade. Aus dieser lässt sich, falls die Fluoreszenzzerfallszeit bekannt ist, das hydratisierte Volumen bestimmen. Diese Gleichungen wurden für kugelförmige Moleküle hergeleitet. Der allgemeine Fall wird durch die Weber-Perrin-Gleichung beschrieben. Abb. 13 zeigt einen schematischen Perrinplot der Anisotropie.

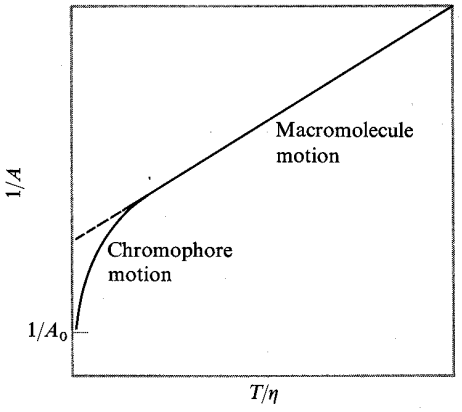


Abb. 13: Schematischer Perrinplot der Anisotropie.

Für kleine Viskositäten (hohe Temperaturen) ist der erwartete lineare Verlauf zu sehen. Bei hohen Viskositäten ist das Makromolekül quasi stationär, während sich der Chromophor unter Umständen noch lokal bewegen kann. Dies führt zu einer größeren Abhängigkeit der Anisotropie von der Viskosität und damit zu einem nichtlinearen Verhalten bei kleinem T/η.

Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer

Die Fluoreszenz-Lebensdauer kann mit zeitaufgelösten Messungen bestimmt werden. Man unterscheidet dabei zwischen Messungen in der Zeit- und Frequenzdomäne. Bei der Messung in der **Zeitdomäne** wird ein kurz gepulster Laser (1 ps – 1 ns Pulsdauer) zur Bestrahlung der fluoreszierenden Probe verwendet. Das emittierte Licht wird dann zeitaufgelöst detektiert. Als Detektoren werden Streakkameras, Photomultiplier oder Avalanchedioden verwendet. Die zeitaufgelöste Messung kann mittels Einzelphotonenzählung durchgeführt werden. Dabei wird über den Anregungspuls ein Startsignal auf den TAC (time-to-amplitude converter) gegeben, so dass dieser eine Spannung linear erhöht, bis ein Stopsignal, das von der Detektion des Fluoreszenzphotons herrührt, eintrifft. Daraufhin wird über die gemessene Spannung (die ja einem Zeitintervall entspricht) der Wert des dazugehörigen Kanals im Vielkanalanalysator (MCPHA) um eins erhöht. Mit der Detektion vieler Photonen baut sich so die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung auf (Abb. 14).

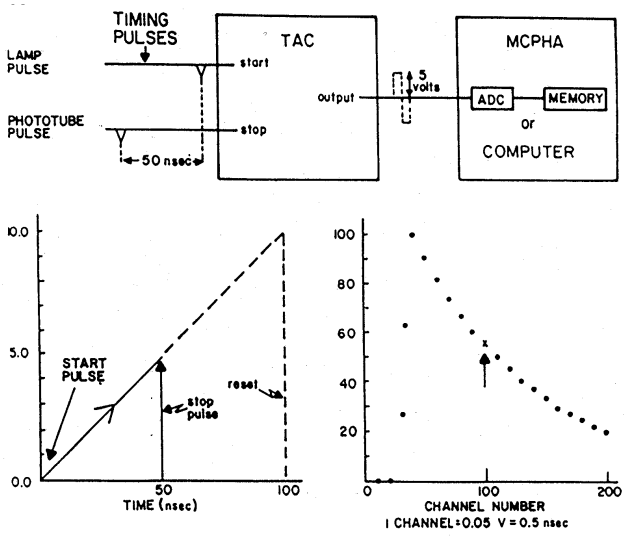


Abb. 14: Schema der Einzelphotonenzählung für zeitaufgelöste Messungen.

Bei der Einzelphotonenzählung muss wegen der Totzeit der Detektion darauf geachtet werden, dass die Fluoreszenzintensität nicht zu groß ist, damit die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass während des Messvorgangs eines Fluoreszenzphotons ein zweites detektiert wird. Abb. 15 zeigt eine Messung an TNS, das eine Zerfallszeit von ~8 ns hat. Ist die Pulsdauer des Anregungslasers nicht sehr viel kleiner als die Fluoreszenz-Lebensdauer, so muss zur Bestimmung der Abklingzeit der Laserpuls entfaltet werden.

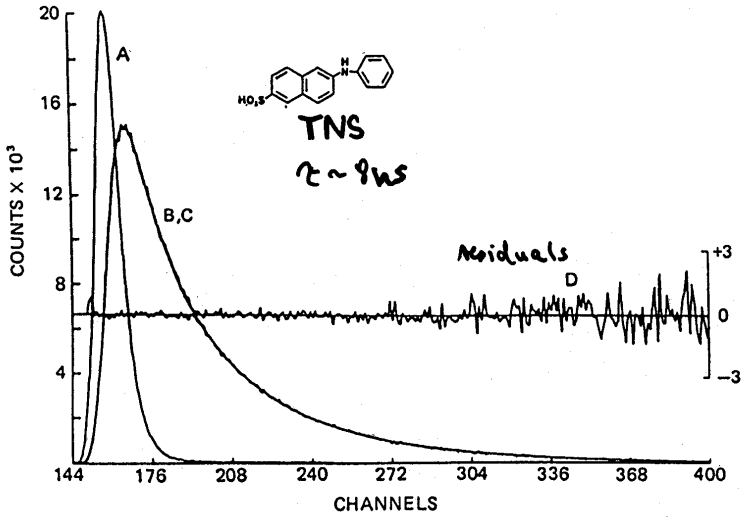


Abb. 15: Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz von TNS. A: Anregungspuls. B, C: Experiment und Fit. Die Abweichungen zwischen dem Experiment und dem Fit sind ebenfalls aufgetragen.

Im Falle der Messung in der **Frequenzdomäne** (Phasenfluorometrie) wird mit in der Intensität *E(t*) moduliertem Licht der Frequenz ω auf die Probe eingestrahlt (Abb. 16). Detektiert wird das emittierte Fluoreszenzlicht *F(t),* das mit der gleichen Frequenz moduliert ist. Allerdings wird die Modulationsamplitude verringert (demoduliert) und es tritt eine Phasenverschiebung zwischen der Anregungs- und Emissionsmodulation auf. Das System kann wie folgt beschrieben werden (lineare Antwort),

$$F(t) = \chi(\omega)E(t)$$

$$= |\chi(\omega)|E_0 e^{-i(\omega t - \phi(\omega))},$$

wobei $\chi(\omega)$ die Suszeptibilität darstellt. Sie setzt sich aus dem Dispersionsterm $\chi(\omega)$ und dem Absorptionsterm $\chi''(\omega)$ zusammen,

$$\chi(\omega) = \chi'(\omega) + i\chi''(\omega).$$

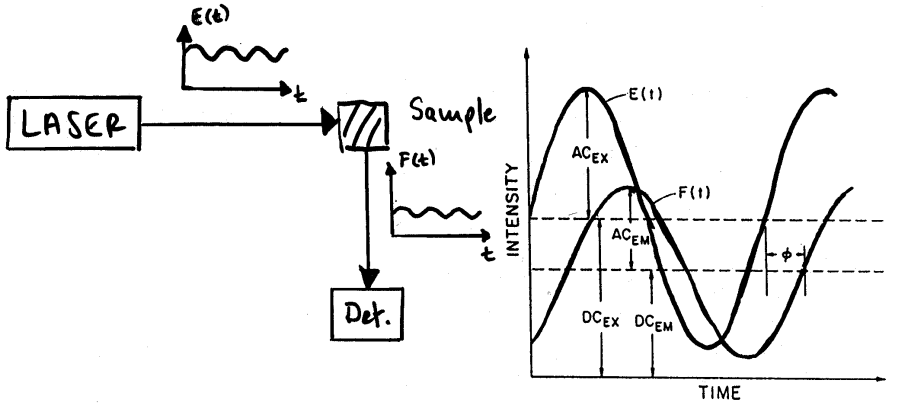


Abb. 16: Bei der Phasenfluorometrie wird intensitätsmoduliertes Licht mit der Amplitude AC_{EX} und dem statischen Anteil DC_{EX} eingestrahlt. Gemessen wird das Fluoreszenzlicht, das eine Amplitude AC_{EM} und einen statischen Anteil DC_{EM} hat.

Für den Betrag und die Phase $\varphi(\omega)$ gilt

$$|\chi(\omega)| = \sqrt{\chi^* \chi} = \sqrt{\chi'^2 + \chi''^2} ,$$

$$\phi(\omega) = -\arctan \frac{\chi''(\omega)}{\chi'(\omega)} .$$

Als einfachste Zeitantwort auf eine ζ-Störung sei eine Debye-Relaxation angenommen,

$$\overline{\chi}(t) = e^{-t/\tau} .$$

Daraus folgt in der Frequenzdomäne

$$\chi(\omega) = FT\left(e^{-t/\tau}\right) = \frac{1}{1 - i\omega\tau} = \frac{1 + i\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} .$$

Für die Phase $\varphi(\omega)$ und die Demodulation *M* ergibt sich

$$\phi(\omega) = \arctan \omega\tau_P ,$$

$$|\chi(\omega)| = \sqrt{\frac{1}{1 + \omega^2\tau_M^2}} = M = \frac{AC_{EM}}{AC_{EX}} .$$

Hier stellt AC_{EM} die Modulation der Fluoreszenzstrahlung und AC_{EX} die der Anregungsstrahlung dar. Es wurde eine Abklingzeit für die Phase τ_p und eine für die Demodulation τ_M eingeführt. Im Falle einer einzigen Abklingzeit, also eines einzelnen Fluorophors, sind diese gleich und unabhängig von der Frequenz. Für mehr als zwei Fluorophore sind sie dagegen unterschiedlich groß und frequenzabhängig.
In Abb. 17 sind phasenfluorometrische Messungen in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge an TNS in Glycerin und an TNS-Apomyoglobin zu sehen. Die Emissionspektren beider Proben entsprechen drei verschiedenen Zeiten nach Einstrahlung des Anregungspulses. Es lässt sich jeweils eine Verschiebung des Spektrums zu längeren Wellenlängen für spätere Zeiten beobachten. Diese Verschiebung ist durch die Umorientierung (Relaxation) der umgebenden Moleküle verursacht (Stokes-Shift, siehe oben). Die Verschiebung des Schwerpunkts der Emissionskurve ist in Abb. 18 dargestellt.

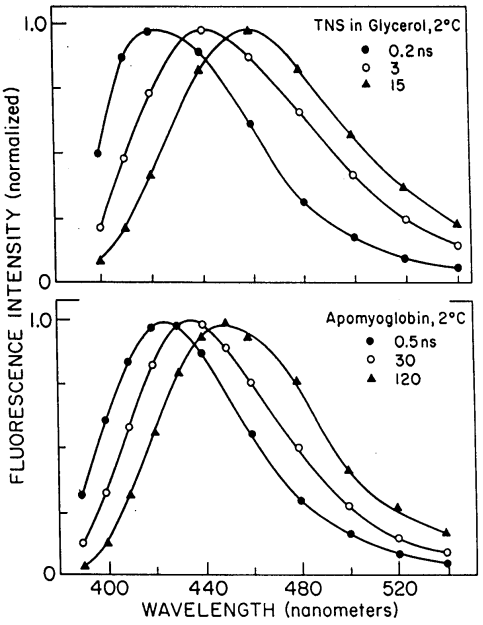


Abb. 17: Fluoreszenzintensität versus Wellenlänge für TNS in Glycerin und TNS-Apomyoglobin. Die Spektren repräsentieren drei verschiedene Zeiten nach dem Anregungspuls.

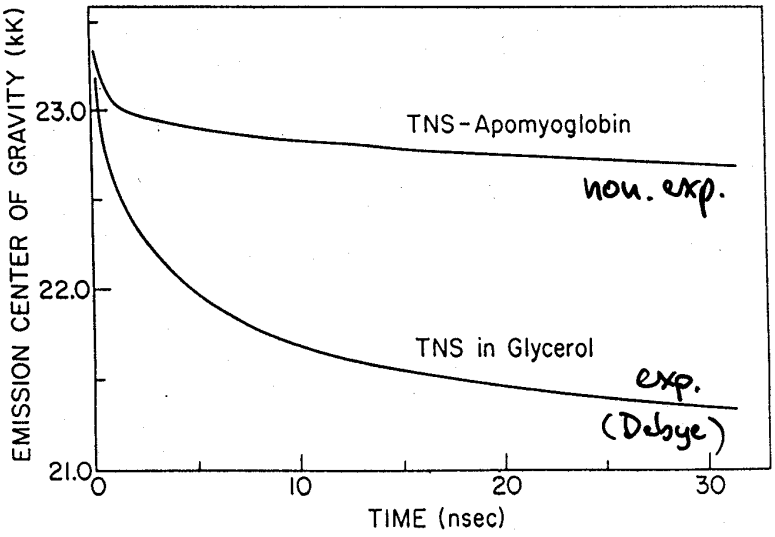


Abb. 18: Verschiebung des Schwerpunkts des Fluoreszenzemissionsspektrums von TNS in Glyzerin und TNS, das in Apomyoglobin gebunden ist.

Für TNS in Glycerin erhält man eine exponentielle Verschiebung des Emissionsschwerpunkts, während dies bei TNS-Apomyoglobin nicht der Fall ist. Das bedeutet, dass für TNS in Glycerin die Annahme einer einzigen Relaxationszeit gerechtfertigt ist. Da bei TNS-Apomyoglobin die Bewegungsfreiheit des TNS beträchtlich vermindert ist, muss die Relaxation mit einer Verteilung von Relaxationszeiten beschrieben werden.
Werden Messungen an einer Probe mit mehreren Fluorophoren durchgeführt, so wird ein Multikomponentenzerfall beobachtet. Allerdings kann selbst ein einzelner Fluorophor durch verschiedene Mikroumgebungen verschiedene Lebensdauern zeigen. Die Verteilung der Fluoreszenzlebenszeiten in Proteinen kommt durch statische und dynamische Heterogenitäten zustande. Abb. 19 zeigt schematisch die Energielandschaft in Abhängigkeit von einer Konformationskoordinate. Befindet sich das Protein in einem Minimum der Energieland-

schaft, so kann ihm eine bestimmte Fluoreszenzlebensdauer zugeschrieben werden. Tab. 3 zeigt Zerfallszeiten von Tryptophan in Proteinen, die nur ein einziges Tryptophan besitzen.

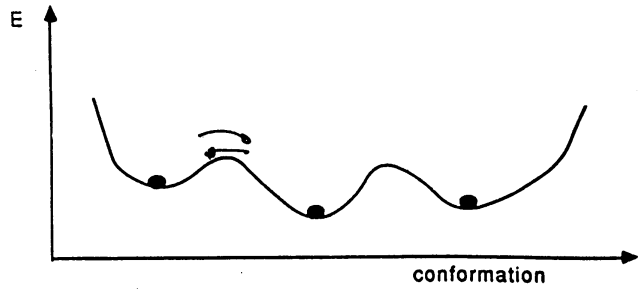


Abb. 19: Skizze der Energielandschaft eines Proteins in Abhängigkeit von einer Konformationskoordinate.

Tab. 3: Fluoreszenzzerfallszeiten für Tryptophan in Proteinen mit einem einzigen Tryptophan

	τ_1 nsec	τ_2 nsec	τ_3 nsec
Apo-azurin	**4.9**		
Nuclease B	**5.1**		
Melittin	**3.1**		
Basic Myelin	**4.7**	**1.97**	
Holo-azurin	**4.8**	**0.18**	
Glucagon	**3.3**	**1.1**	
Adenocorticotropin	**5.1**	**2.0**	
Nuclease	**5.7**	**2.0**	
RNAse T1	**3.3**	**1.5**	
HSA	**7.8**	**3.3**	
PLA2	**7.2**	**2.9**	**0.96**
Tuna-Met-MB	**2.17**	**0.132**	**0.031**
Tuna-Apo-MB	**2.81**	**0.33**	

Die Fluoreszenzabklingkurven wurden mit einer verschieden großen Anzahl von Lebensdauern gefittet. Die so erhaltenen Zerfallszeiten variieren in einem relativ großen Bereich. Es wird versucht, die verschiedenen Abklingzeiten mit verschiedenen Konformationen (Abb. 19) zu begründen. Hierbei ist zu beachten, dass nicht eindeutig ist, mit wie vielen Abklingzeiten die Fluoreszenzkurven gefittet werden müssen. Generell gilt natürlich, dass sich die Abweichung des Fits vom Experiment (χ^2) mit der Anzahl der Fitparameter geringer wird (Tab. 4).

Tab. 4: Analyse der Fluoreszenzzerfallszeiten von Azurin

Exponentials	τ	f	χ²
1	4.78		321
2	5.443		
	0.838	0.146	63
3	10.11	0.392	
	3.11	0.552	
	0.42	0.056	7.1
4	322	0.030	
	8.11	0.451	
	2.88	0.465	
	0.42	0.054	2.9
	Center	Width	Fraction
Gaussian Distribution	4.37	2.41	0.948
(χ^2 = 3.0)	0.174	0.27	0.052

Die Fluoreszenzzerfallskurve von Azurin wurde mit 1 bis 4 Exponentialkurven gefittet, wobei die Zerfallszeiten Γ und die relative Gewichtung f Fitparameter sind. Neben der Verringerung von χ^2 wird eine größere Varianz der Zerfallszeiten mit Vergrößerung der Anzahl der Fitparameter beobachtet. Es ist nicht ersichtlich, mit wievielen Exponentialkurven der Zerfall optimal beschrieben wird. Alternativ kann statt der Summe von Exponentialzerfällen,

$$I(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i} ,$$

eine Verteilung der Zerfallszeiten

$$I(t) = \int_0^\infty f(\tau) e^{t/\tau} d\tau$$

gefittet werden (Abb. 20). zeigt den Fit an der Messung von Azurin für zwei Gaußverteilungen, bei denen die Lage des Zentrums, die Breite und die relative Gewichtung der beiden Gaußverteilungen gefittet wurden.

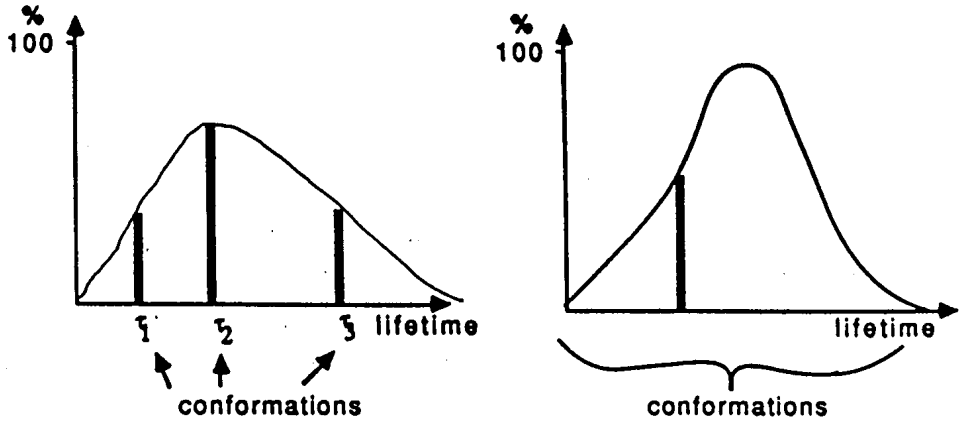


Abb. 20: Darstellung der Fluoreszenzlebenszeiten als Summe von exponentiellen Zerfällen und einer kontinuierlichen Verteilung von exponentiellen Zerfällen.

Schwingungsspektroskopie

Die Übergänge zwischen den Schwingungsniveaus von Biomolekülen treten im Wellenzahlbereich von etwa 10 – 4000 cm^{-1} auf. Die Übergangsenergien sind somit kleiner als die der elektronischen Übergänge. In erster Näherung kann die Abhängigkeit der potentiellen Energie der Molekülbindung von der Bindungslänge mit einer Parabel angenähert werden. Als einfachster Fall wird zunächst die Bindungsschwingung eines zweiatomigen Moleküls diskutiert (Abb. 1).

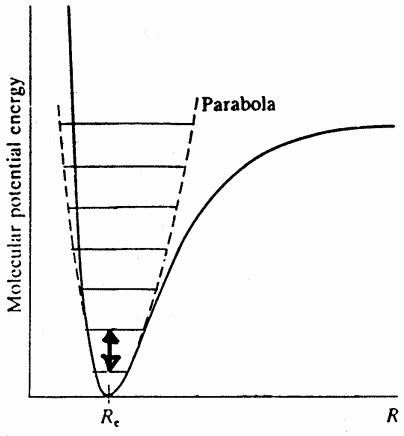


Abb. 1: Die molekulare potentielle Energie kann im tiefsten Punkt durch eine Parabel angenähert werden.

Die parabolische Näherung wird für höhere Energien schlechter und gänzlich unbrauchbar für Energien im Bereich der Dissoziationsenergie. Aus der parabolischen potenziellen Energie V mit der Kraftkonstanten k und dem Kernabstand am Potentialminimum R_e,

$$V = \frac{1}{2} k (R - R_e)^2 ,$$

folgt für die möglichen Energiezustände aus der Schrödingergleichung

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2} \right) \hbar\omega = \left(n + \frac{1}{2} \right) h\nu \ ,$$

wobei die Schwingungskreisfrequenz durch $\omega = \sqrt{k/\mu}$ gegeben ist. Die Größe μ ist die reduzierte Masse. Bei zwei Atomen mit Massen m_1 und m_2 gilt: $1/\mu = 1/m_1 + 1/m_2$. Eine bessere Näherung als das parabolische Potential stellt das Morsepotential dar mit den Parametern a und D,

$$V = D\left[1 - \exp\left(-a(R - R_e)\right)\right]^2 .$$

Man erhält für dieses Potential aus der Schrödingergleichung die Energieeigenwerte

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2} \right) \hbar\omega - \left(n + \frac{1}{2} \right)^2 x_e \hbar\omega ,$$

wobei $x_e = \hbar a^2/(2m\omega^2)$ ist. Die Energieabstände sind nicht mehr äquidistant, sondern werden mit höherer Energie kleiner (Abb. 2).

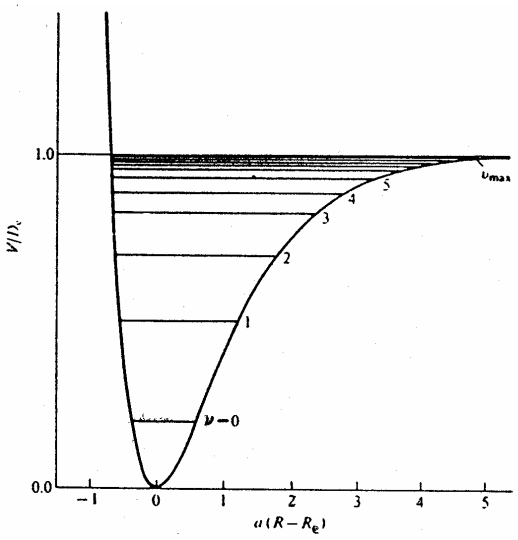


Abb. 2: Morsepotential als molekulare potentielle Energie.

Kopplung von elektromagnetischer Strahlung an Schwingungen

Elektromagnetische Strahlung kann an die Schwingungen der Atome koppeln, falls das elektrische Dipolmoment durch die Kernbewegungen verändert wird. Zur Berechnung der Übergangswahrscheinlichkeit zwischen den Energieniveaus wird die Born-Oppenheimer-Näherung verwendet. Die Wellenfunktion wird also in einen Anteil faktorisiert, der von den Kernkoordinaten abhängt, und einen weiteren, der von den Elektronenkoordinaten abhängt. Es wird ein Übergang im elektronischen Grundniveau vom Schwingungszustand ν in den Zustand ν' betrachtet,

$$\psi_0(\vec{r},\vec{R})\ \phi_\nu(\vec{R}) \rightarrow \psi_0(\vec{r},\vec{R})\ \phi_{\nu'}(\vec{R})\ .$$

Sind die Kerne stationär, so hängt das Dipolmoment nicht von den Kernkoordinaten ab; $\vec{\mu} = \vec{\mu}(\vec{r})$. Für den Übergangsdipol gilt

$$\left\langle \psi_0\phi_\nu \middle| \vec{\mu} \middle| \psi_0\phi_{\nu'} \right\rangle = \left\langle \psi_0 \middle| \vec{\mu} \middle| \psi_0 \right\rangle \left\langle \phi_\nu \middle| \phi_{\nu'} \right\rangle = 0\,,$$

da der erste Erwartungswert aufgrund der ungeraden Parität des Dipoloperators und der zweite Erwartungswert aufgrund der Orthogonalität der Wellenfunktionen verschwindet. Befinden sich die Kerne in Bewegung, so erhält man für das Dipolmoment aus der Taylorentwicklung um die Gleichgewichtsposition $\vec{R}_0$

$$\vec{\mu}(\vec{r},\vec{R}) = \vec{\mu}(\vec{r},\vec{R}_0) + \left.\frac{\partial\,\vec{\mu}}{\partial\,\vec{R}}\right|_{\vec{R}_0} \cdot \left(\vec{R}-\vec{R}_0\right) + \ldots$$

Für den Erwartungswert des Übergangsdipols folgt

$$\left\langle \psi_0\phi_\nu \middle| \vec{\mu} \middle| \psi_0\phi_{\nu'} \right\rangle = \left\langle \psi_0 \middle| \frac{\partial\vec{\mu}}{\partial\vec{R}} \middle| \psi_0 \right\rangle \cdot \left\langle \phi_\nu \middle| \vec{R} \middle| \phi_{\nu'} \right\rangle\ ,$$

da der erste Entwicklungsterm wieder Null ergibt. Es können somit Übergänge auftreten, falls sich das Dipolmoment durch die Kernbewegungen verändert und die Auswahlregel $\nu' = \nu \pm 1$ erfüllt ist. Abb. 3 zeigt Beispiele für infrarot-aktive und inaktive Schwingungen.

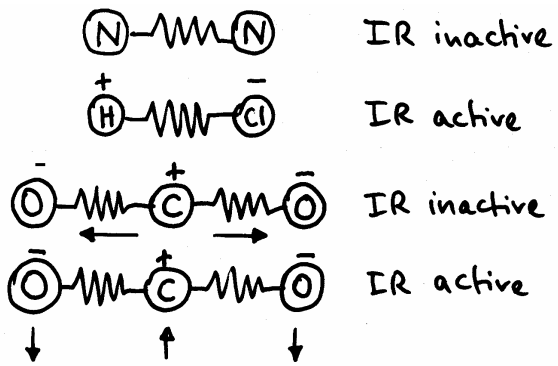


Abb. 3: Beispiele für IR-aktive und inaktive Schwingungsmoden.

Das Stickstoffmolekül ist IR-inaktiv, da kein permanentes Dipolmoment vorliegt. Die symmetrische Streckschwingung des Kohlendioxids zeigt ebenfalls keine Infrarotabsorption, da sich die Veränderungen der Dipolmomente aufgrund der symmetrischen Kernbewegungen aufheben.
Ein Molekül mit *N* Atomen besitzt 3*N* Freiheitsgrade der Bewegung. Da die Translation des Schwerpunkts drei und die Rotation um den Schwerpunkt ebenfalls drei (bei linearen Molekülen zwei) Freiheitsgrade besitzten, bleiben 3*N* − 6 (bei linearen Molekülen 3*N* − 5) Freiheitsgrade für die Schwingungsnormalmoden übrig. Eine Normalmode beschreibt die kollektiven Schwingungen aller Atome bei der Normalmodenfrequenz. In Biomolekülen sind jedoch bei vielen (insbesondere den höherfrequenten) Normalschwingungen nur die Schwingungsamplituden weniger Atome signifikant, so dass lokalisierte Moden vorliegen. Abb. 4 zeigt einige mögliche lokale Schwingungsmoden.

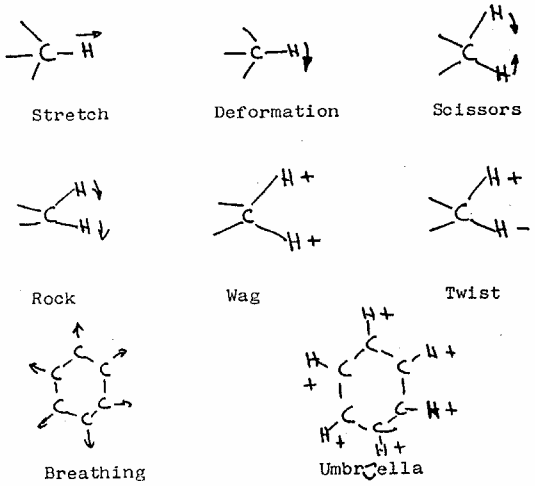


Abb. 4: Einige Schwingungsmoden; + und – beziehen sich auf Bewegungen senkrecht zur Blattebene.

Die Infrarotabsorptionsspektren von Makromolekülen haben viele breite, überlappende Übergänge. Im Bereich von 400 – 1800 cm^{-1} zeigen die Spektren für jedes Molekül typische Merkmale ('fingerprint region'), während sich im Bereich von 2400 – 4000 cm^{-1} die Wasserstoffstreckschwingungen befinden. Zwischen diesen Bereichen sind wenige Schwingungsübergänge vorhanden. Allerdings finden sich hier gerade einige starke Linien kleiner zwei- und dreiatomiger Liganden von Hämproteinen (CO, N_3^-).

Da die Spektren von Makromolekülen sehr viele Schwingungsübergänge zeigen, ist es oft schwierig, diese den dazugehörigen Schwingungen zuzuordnen. Eine Methode, mit der die Zuordnung durchgeführt werden kann, ist die Differenzspektroskopie. Hier wird vor und nach einer lokalen Änderung, die sich auf eine (oder einige wenige) Mode(n) auswirkt, am Makromolekül ein Spektrum aufgenommen. Aus dem Differenzspektrum können dann die Übergänge ermittelt werden, die durch die Wechselwirkung verändert wurden. Beispiele für solche Veränderungen am Makromolekül sind die Photolyse, der Isotopeneffekt und pH-Veränderungen. Bei der Photolyse wird mit Licht geeigneter Wellenlänge auf ein Makromolekül, das eine photoempfindliche Bindung besitzt, eingestrahlt. Dadurch wird die Bindung (z.B. die Bindung des Liganden CO am Häm des Myoglobins) aufgebrochen, und das Verschwinden (bzw. die Veränderung) des Schwingungsübergangs kann beobachtet werden. Da die Schwingungsfrequenz von der Masse der Kerne abhängt, erhält man auch eine Verschiebung der Schwingungsfrequenzen (Isotopeneffekt), falls Isotope ausgetauscht werden (z.B. ^{13}C anstatt ^{12}C). Aus demselben Grund werden auch bei der Protonierung durch Veränderung des pH die Lagen der Schwingungsübergänge verschoben (zum Beispiel für COOH und COO^- in Abb. 5).

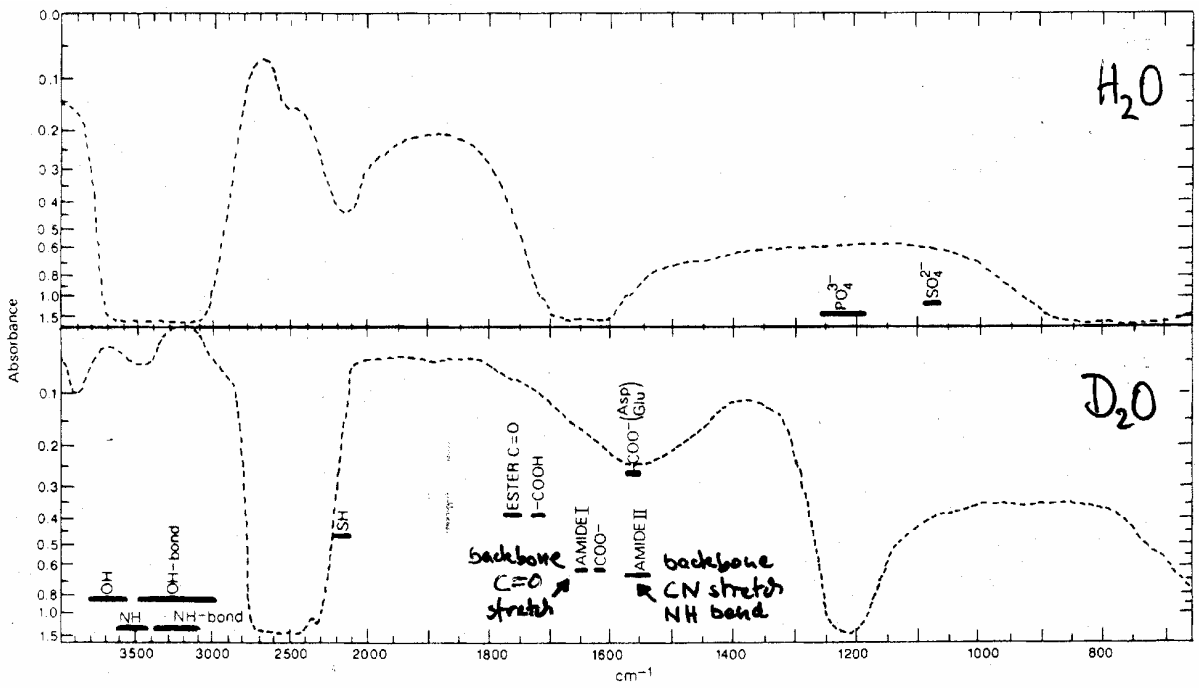


Abb. 5: Spektren der Infrarotabsorption von H_2O und D_2O. Einige charakteristische Absorptionsfrequenzen sind eingezeichnet.

Die relativ starke Absorption von H_2O im Infraroten macht Messungen an Biomolekülen, die sich in wässriger Umgebung befinden, in einigen Spektralbereichen besonders schwierig. Reines Wasser hat eine Konzentration von 55,55 M, während die zu messenden Proteine höchstens Konzentrationen von etwa 1 – 10 mM haben. Abb. 5 zeigt, dass sich die Absorption von D_2O wesentlich von der des H_2O unterscheidet. Somit werden durch Austausch von H_2O mit D_2O andere Spektralbereiche für die Messungen der Makromoleküle zugänglich.

Infrarotspektrometer

Im Prinzip können Infrarotspektren mit einem dispersiven Spektrometer gemessen werden (Abb. 6).

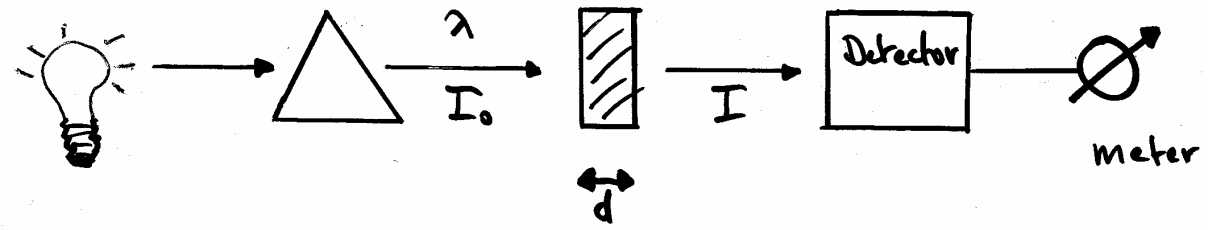


Abb. 6: Dispersives Spektrometer.

Das breitbandige Licht einer Infrarotquelle (Wolframlampe, Globar, Nernst-Stift) wird mittels eines Gitters oder Prismas monochromatisiert, und das durch die Probe transmittierte Licht wird detektiert. Ein Spektrum wird durch die Messung der Transmission in Abhängigkeit von der Anregungsfrequenz erhalten. Als Detektoren werden (mit flüssigem N_2 gekühlte) Halbleiterdioden (HgCdTe, InSb) verwendet, die einen geringen Bandabstand haben, so dass die Energie der Photonen im infraroten Spektralbereich ausreicht, um Elektron-Loch-Paare zu generieren. Für die transmittierte Intensität *I* gilt das Lambert-Beersche Gesetz,

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon x d} \quad .$$

Hier ist *d* die Dicke der Probe, *x* die Konzentration und ε der Extinktionskoeffizient. Im sichtbaren Spektralbereich kann mit obiger Gleichung die Konzentration bei bekanntem ε bestimmt werden. Dies ist im IR-Bereich problematisch, da die Extinktion stark von der Umgebung abhängen kann.
Ein andere Möglichkeit, Schwingungsspektren zu messen, stellt die **Fouriertransformations-Infrarot-Spektroskopie** (FTIR) dar (Abb. 7).

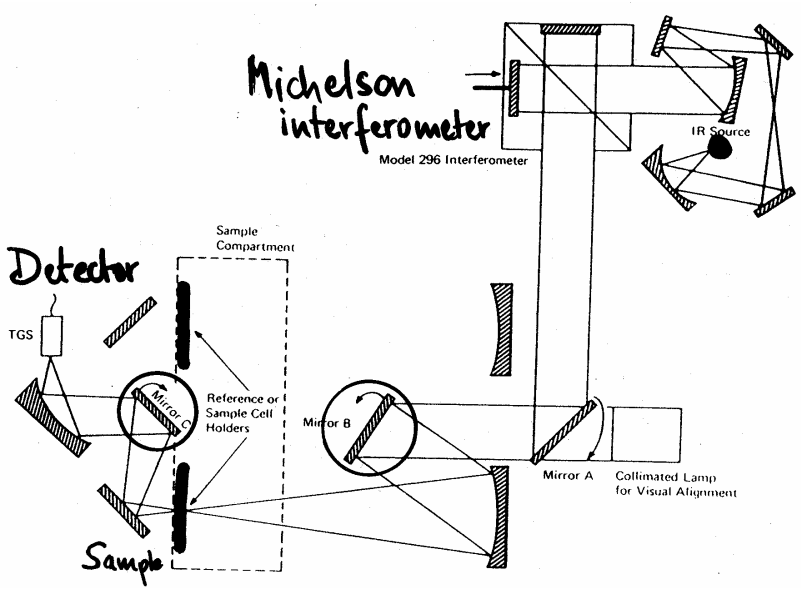


Abb. 7: Aufbau eines FTIR-Spektrometers.

Das Licht einer breitbandigen Infrarotquelle wird mit Spiegeln kollimiert und in ein Michelson-Interferometer eingestrahlt. Danach trifft der Lichtstrahl auf die Probe. Das durch die Probe transmittierte Licht wird detektiert. Die FTIR-Methode bietet einige Vorteile gegenüber der Standardmessung: 1) Es werden alle Frequenzen der breitbandigen Quelle gleichzeitig gemessen ('Felgett's advantage'). 2) Es sind keine den Strahl begrenzenden Elemente, wie Schlitze oder Aperturen, nötig, d.h. die Intensitätsausnutzung ist effektiver ('Jacquinot's advantage'). 3) Die Frequenzstabilität ist sehr hoch, da die Position des beweglichen Spiegels des Michelson-Interferometer mit einem Referenzlaser (HeNe-Laser) bestimmt wird ('Connes's advantage'). Die wesentlichen Elemente eines FTIR-Spektrometers sind in Abb. 8 aufgeführt.

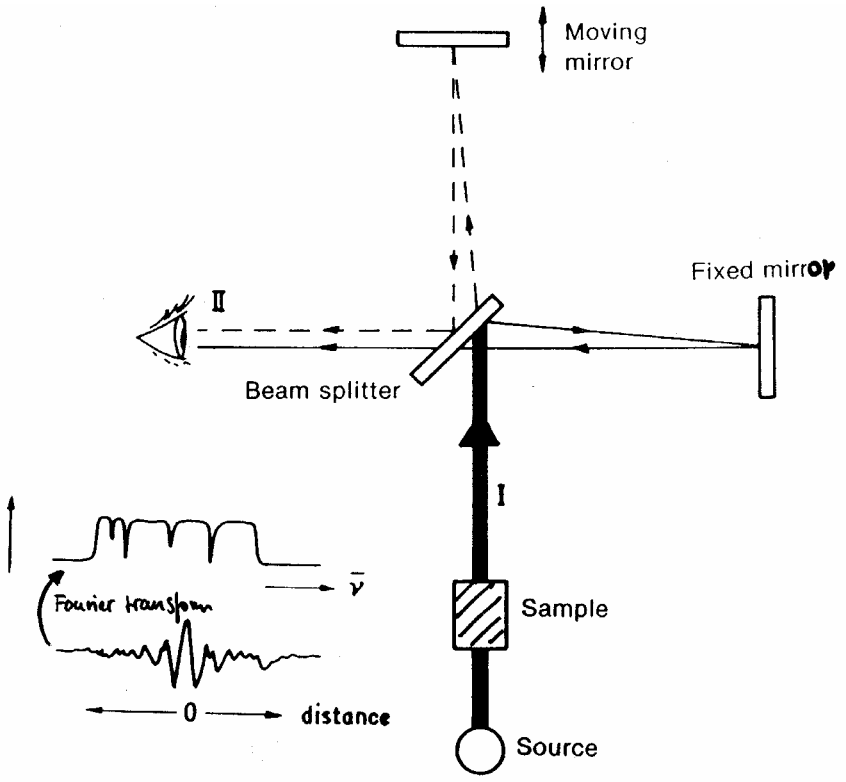


Abb. 8: Grundelemente eines FTIR-Spektrometers.

Um das Absorptionsspektrum der Probe, die sich vor oder hinter dem Michelson-Interferometer befinden kann, zu erhalten, wird sowohl das Spektrum ohne als auch das Spektrum mit Probe gemessen. Nachdem das polychromatische Licht die Probe transmittiert hat, trifft es auf einen Strahlteiler. Die eine Hälfte der Photonen wird auf einen ortsfesten Spiegel, die andere Hälfte auf einen beweglichen Spiegel gelenkt. Die beiden Strahlhälften werden durch den Strahlteiler wieder zusammengeführt, und die Intensität I wird als Funktion der Pfaddifferenz x (der Stellung des beweglichen Spiegels) gemessen (Abb. 8). Haben die beiden Arme des Michelson-Interferometers die gleiche Länge ($x = 0$), so interferieren alle Frequenzen konstruktiv, und man erhält maximale Intensität. Aus der Messung von $I(x)$ kann mittels Fouriertransformation das Spektrum berechnet werden. Zur Herleitung des mathematischen Zusammenhangs wird eine ebene Welle mit Frequenz ν und Wellenzahl $\tilde{\nu}$ betrachtet. Für ihre Amplitude gilt

$$A = e^{i(kx' - \omega t)} = e^{2\pi i(\tilde{\nu} x' - \nu t)} \ .$$

Im Michelson-Interferometer interferieren die beiden Teilstrahlen. Man erhält unter Vernachlässigung der Zeitabhängigkeit

$$A(x,\tilde{\nu}) = \frac{1}{2}\left[e^{2\pi i\tilde{\nu}x_0} + e^{2\pi i\tilde{\nu}(x_0+x)}\right]$$

$$= \frac{1}{2}e^{2\pi i\tilde{\nu}x_0}\left[1 + e^{2\pi i\tilde{\nu}x}\right] .$$

Für die Intensität ergibt sich

$$I(x,\tilde{\nu}) = A^*(x,\tilde{\nu})A(x,\tilde{\nu}) = \frac{1}{2}[1+\cos 2\pi\tilde{\nu}x] .$$

Unter Berücksichtigung der von der Lichtquelle nach der Absorption durch die Probe transmittierten Intensität $S(\nu)$ erhält man für die Gesamtintensität

$$I(x) = \int_0^\infty I(x,\tilde{\nu})S(\tilde{\nu})d\tilde{\nu}$$

$$= \frac{1}{2}\underbrace{\int_0^\infty S(\tilde{\nu})\,d\tilde{\nu}}_{I(0)} + \frac{1}{2}\int_0^\infty \cos(2\pi\tilde{\nu}x)\,S(\tilde{\nu})\,d\tilde{\nu} .$$

Der rechte Term stellt das Fouriercosinusintegral dar. Somit kann das Spektrum durch Fourier-Rücktransformation erhalten werden,

$$S(\tilde{\nu}) = const.\int_0^\infty \left[2I(x) - I(0)\right]\cos(2\pi\tilde{\nu}x)dx .$$

Der obere Grenzwert des Integrals ist in der praktischen Messung auf die doppelte maximale Spiegelauslenkung ($2L_{max}$) beschränkt. Dadurch wird die maximale Auflösung des Systems begrenzt. Zwei Linien, die um $\delta\tilde{\nu}$ auseinander liegen, können noch aufgelöst werden, falls

$$\delta\tilde{\nu} \geq \frac{1}{2L_{\max}}$$

gilt. Um beispielsweise eine Auflösung von 1 cm^{-1} zu erhalten, muss also $L_{max} = \Delta x = 0.5$ cm sein. Andererseits wird durch den Messabstand δx (´Abtastfrequenz´) nach dem Nyquisttheorem die Bandbreite des Spektrums begrenzt,

$$\tilde{\nu}_{\max} - \tilde{\nu}_{\min} = \Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{2\,\delta x} .$$

Ein paar einfache Fouriertransformationen sind in Abb. 9 dargestellt. In der Abb. 9a ist eine monochromatische Welle zu sehen. Mit der Fouriertransformation folgt ein Spektrum mit einer scharfen Linie. Falls Δx endlich ist, wird diese Linie verbreitert. Werden zwei monochromatische Wellen betrachtet, so erhält man in der Ortsdomäne Schwebungen und im Spektrum zwei scharfe Linien (Abb. 9b). Auch sieht man, dass ein breites Interferogramm ein schmales Spektrum (und umgekehrt) verursacht (Abb. 9c und d).

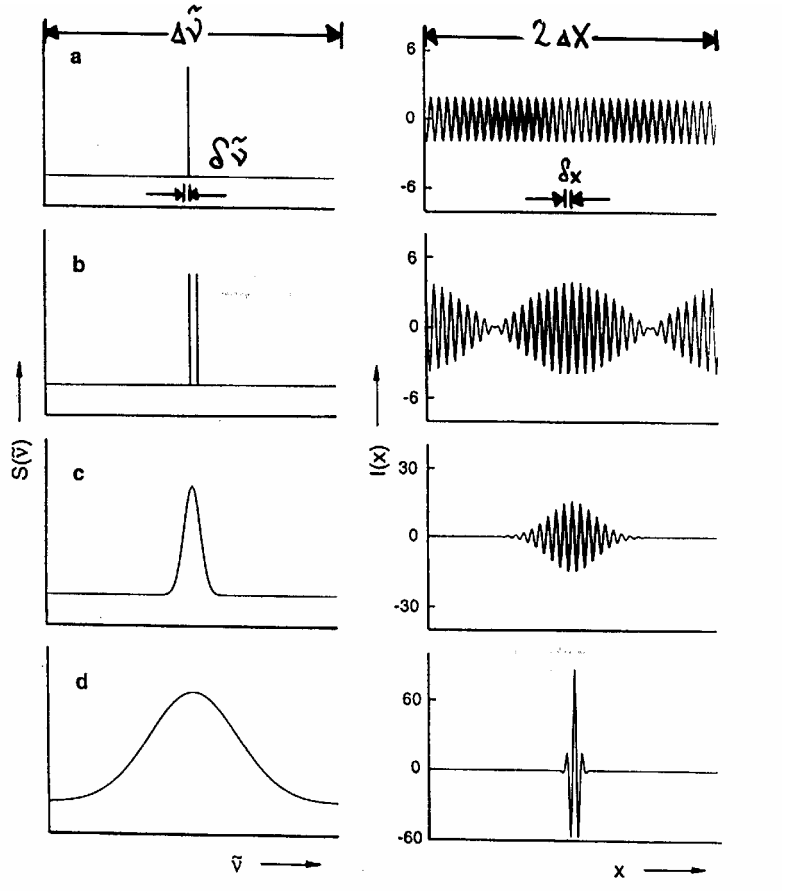


Abb. 9: Beispiele von Spektren und deren Fouriertransformationen.

Der Einfluss der endlichen maximalen Spiegelauslenkung auf die FTIR-Spektren ist in Abb. 10a dargestellt. Wird der Scanbereich des Interferometers bei x_{max} abrupt abgeschnitten (Rechteckprofil), so erhält man im Spektrum zwar eine schmale Linie, aber es treten auch viele Schwingungen als Artefakte auf (Abb. 10a). Durch eine abfallende Gewichtung der Intensität zu den Rändern hin erhält man eine Unterdrückung der Nebenmaxima (Apodisierung), allerdings auf Kosten eines verbreiterten Hauptmaximums. Mathematisch ist der Zusammenhang durch die Faltung gegeben.

$$I'(x) = I(x) \cdot D(x) \qquad \Rightarrow \qquad S(\tilde{\nu}) = S'(\tilde{\nu}) * D(\tilde{\nu})$$

Hier ist $I(x)$ ($S'(\tilde{\nu})$) das ideale Interferogramm (Spektrum), und $I'(x)$ ($S(\tilde{\nu})$) das durch die ungleiche Gewichtung $D(x)$ erhaltene Interferogramm.

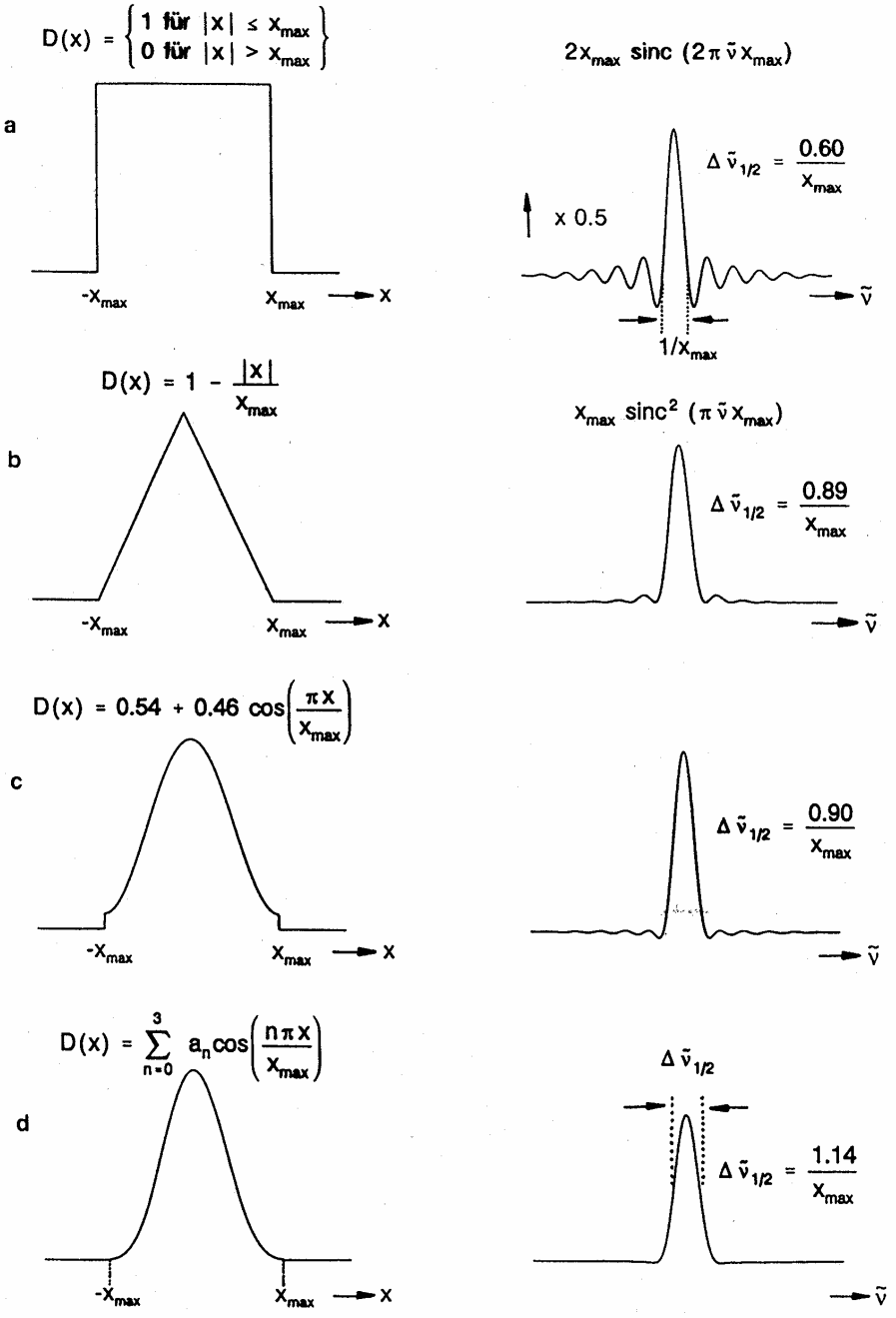


Abb. 10: Auswirkung der Apodisierung.

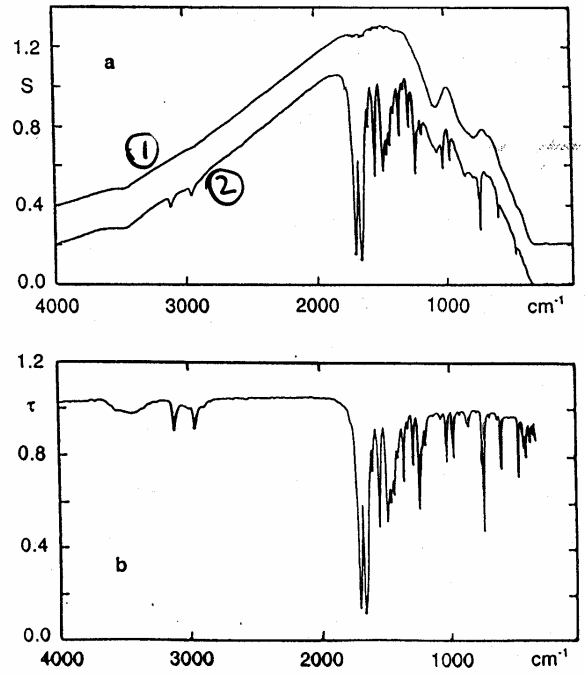


Abb. 11: Spektrum von Koffein. a) Spektrum ohne Probe (1) und mit Probe (2). b) Transmissionsspektrum.

Abb. 11 zeigt das Spektrum von Koffein. Die Spektren ohne Probe und mit Koffeinprobe sind in Abb. 11a dargestellt. Das Transmissionsspektrum von Koffein erhält man dann durch Division der beiden Spektren (Abb. 11b). Das nächste Beispiel zeigt die Bindung von CO an Cytochrom c Oxidase, das terminale Enzym der Atmungskette. Es katalysiert den Elektronentransfer vom reduzierten Cytochrom zum molekularen Sauerstoff. Zur vollständigen Reduktion des O_2 zu H_2O werden vier Elektronen auf den Sauerstoff übertragen und gleichzeitig vier Protonen transloziert (Protonenpumpe). Die Cytochrom c Oxidase enthält zwei Hämgruppen und zwei Kupferzentren. Das Häm a_3 liegt direkt neben dem Cu_B. Im Dunkeln ist der Ligand CO an dem Eisen des Häm a_3 gebunden (Abb. 12).

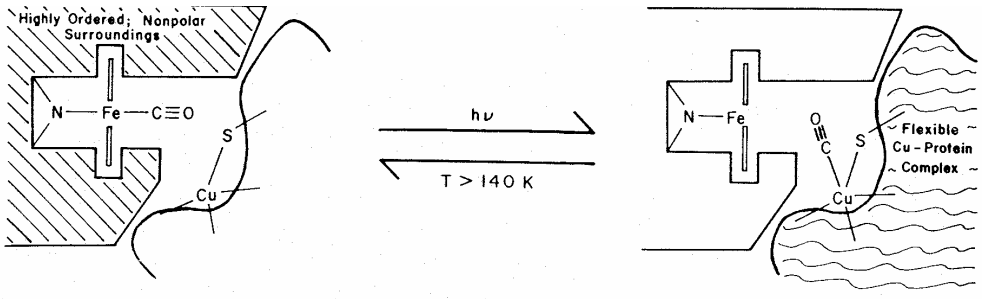


Abb. 12: Schematische Darstellung des binuklearen Zentrums (Häm a_3/Kupfer) der Cytochrom c Oxidase.

Nach dem Einstrahlen von Licht dissoziiert das CO vom Häm a_3 und bindet an das Cu_B.Bei Temperaturen größer als 140 K kann das CO wieder an das Häm a_3 zurückbinden. Abb. 13 zeigt ein Differenzspektrum von Cytochrom c Oxidase vor und nach der Photolyse des CO.

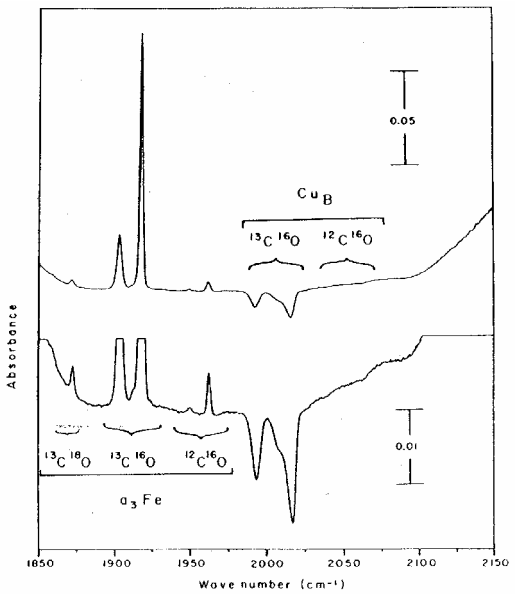


Abb. 13: Infrarotabsorptions-Differenzspektrum von Cytochrom c Oxidase aus Rinderherzen. Die Messungen wurden bei 10 K durchgeführt. Zwei Spektren sind zur Vergrößerung des dynamischen Bereichs gezeigt.

Da das CO als Isotopengemisch vorlag, sind neben den Streckschwingungen von $^{12}C^{16}O$ auch die von $^{13}C^{18}O$ und $^{13}C^{16}O$ zu sehen. Es treten jeweils zwei Übergänge aufgrund zweier unterschiedlicher Konformationen auf. Das Differenzspektrum zeigt, dass die Übergänge des an a_3Fe gebundenen CO verschwinden und dafür die an Cu_B gebundenen CO auftauchen. Das nächste Beispiel zeigt den Einfluss der Proteinsekundärstruktur auf die Normalschwingungen. Dazu werden die Schwingungen der Peptidgruppe betrachtet (Tab. 1).

Tab. 1: Charakteristika der Hauptabsorptionsbanden der Peptidgruppe im Infraroten

		Hydrogen-bonded forms				Non-hydrogen-bonded
		α Helix		β Sheet		
Vibration	$\partial\underset{\sim}{\mu}/\partial R$	Frequency (cm^{-1})	Dichroism	Frequency (cm^{-1})	Dichroism	Frequency (cm^{-1})
N—H stretch	←N—H→	3,290–3,300	∥	3,280–3,300	⊥	~3,400
Amide I (C═O stretch)	←C═O→	1,650–1,660	∥	1,630	⊥	1,680–1,700
Amide II	←C—N→ (H)	1,540–1,550	⊥	1,520–1,525	∥	<1,520?

Die wichtigsten Übergänge sind die N-H Streckschwingung bei ungefähr 3300 cm^{-1}, die C=O Streckschwingung bei 1630 – 1660 cm^{-1} (Amid I) und die C–N Streck-/ N–H Biegeschwingung bei 1520 – 1550 cm^{-1} (Amid II). Tab. 1 zeigt, dass die Schwingungsfrequenzen durch die Anwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst werden. Die C=O Streckschwingung und die N–H Streckschwingung sind im Wesentlichen entlang der jeweiligen Bindung polarisiert, während die Amid II-Schwingung nahezu parallel zur C–N Bindung polarisiert ist. Für gerichtete Polypeptide können diese Charakteristika aufgrund des linearen Dichroismus beobachtet werden. In der α-Helix sind die N–H und C=O-Bindungen parallel zur Achse der Helix angeordnet (Abb. 14).

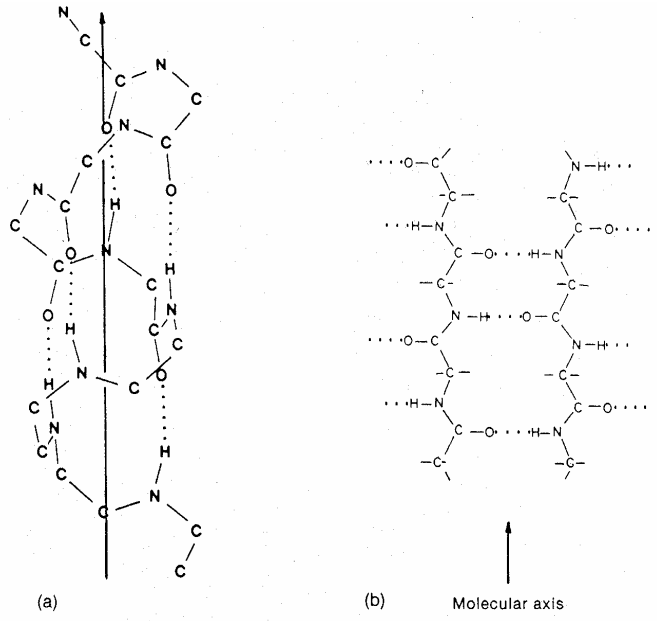


Abb. 14: a) α-Helix-Polypeptid; b) Struktur des β-Faltblattes.

Daher werden die entsprechenden Streckschwingungen besonders gut durch entlang dieser Achse polarisiertes Infrarotlicht angeregt. Die Amid II-Bande zeigt dagegen das umgekehrte Verhalten. Ein typisches Spektrum, das diesen linearen Dichroismus zeigt, ist in Abb. 15 dargestellt.

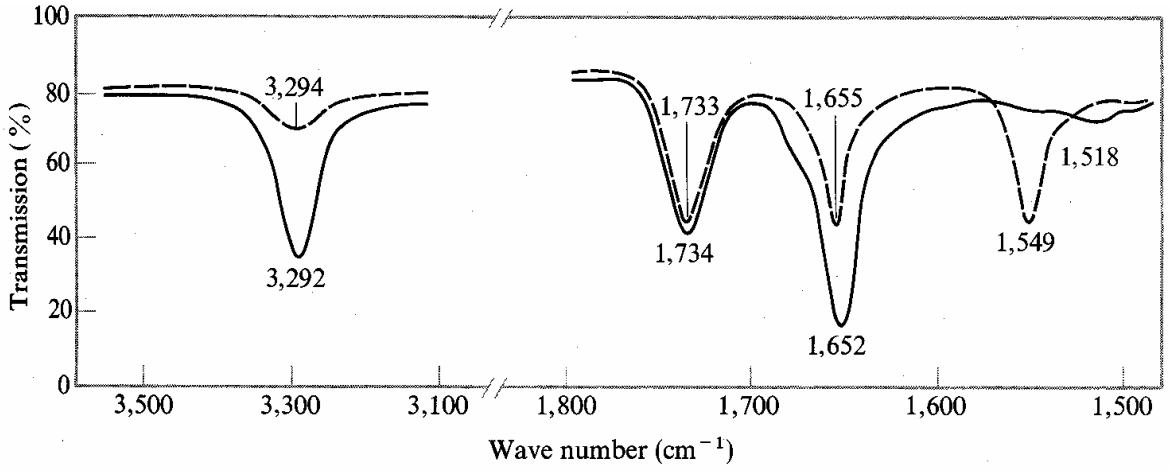


Abb. 15: Linearer Dichroismus von orientierten Filmen von Poly-γ-Benzyl-L-Glutaminsäure. Das Licht ist parallel (durchgezogene Kurve) und senkrecht (gestrichelte Kurve) zur Helixachse polarisiert.

Die N–H und die C=O Streckschwingungen zeigen im Gegensatz zur Amid II-Bande eine größere Absorption für parallel zur Helixachse polarisiertes Licht. Bei 1730 – 1735 cm^{-1} ist der Übergang der Carboxylsäureketten zu sehen. Dieser zeigt wegen der unterschiedlichen Ausrichtung der Seitenketten praktisch keine Abhängigkeit von der Polarisationsrichtung. Für genauere Untersuchungen der Spektren muss berücksichtigt werden, dass die individuellen Peptidschwingungen miteinander koppeln und es zu Aufspaltungen der Übergänge kommt (exzitonische Aufspaltung).

Ramanstreuung

Mit der Ramanstreuung lassen sich ebenfalls molekulare Schwingungen untersuchen. Ein Vorteil der Ramanstreuung gegenüber der Infrarotabsorption ist, dass sichtbares Licht verwendet werden kann. Dadurch werden die Messungen nicht durch die Absorption des Wassers behindert. Für die nichtresonante Ramanstreuung ist allerdings der Wirkungsquerschnitt sehr klein. Deshalb war vor der Erfindung des Lasers die geringe Intensität der Ramanstreuung der begrenzende Faktor für ihre Anwendung. Schematisch ist die Ramanstreuung in Abb. 16 dargestellt.

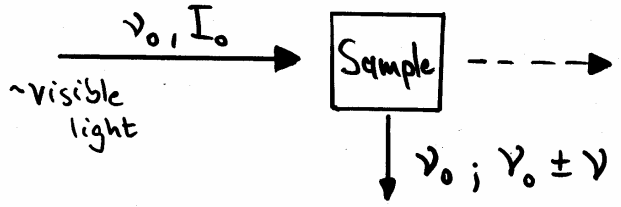


Abb. 16: Streuung von sichtbarem Licht an Molekülen.

Sichtbares Licht der Frequenz ν_0 wird auf die Probe eingestrahlt. Das gestreute Licht besteht aus elastisch gestreutem Licht (Rayleigh-Streuung) und zu einem viel kleineren Teil aus inelastisch gestreutem (Raman-) Licht, das die Frequenz $\nu_0 \pm \nu_{vib}$ hat. Klassisch kann diese inelastische Streuung wie folgt verstanden werden. Eine einfallende elektromagnetische Welle $\vec{E}$ induziert den Dipol $\vec{\mu}$ in einem Molekül mit der Polarisierbarkeit α,

$$\vec{\mu} = \alpha\vec{E} = \alpha\vec{E}_0\cos(2\pi\nu_0 t).$$

Beim Ramaneffekt muss das betrachtete Molekül – im Gegensatz zur Infrarotabsorptions-spektroskopie – keinen permanenten Dipol haben. Der Dipol wird erst durch das angelegte Feld induziert (Effekt zweiter Ordnung). Falls das Molekül Schwingungen mit der Frequenz ν_{vib} durchführt, schwingt die Polarisierbarkeit mit der gleichen Frequenz,

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial\alpha}{\partial Q}Q = \alpha_0 + \frac{\partial\alpha}{\partial Q}Q_0\cos(2\pi\nu_{vib}t).$$

Q ist hier die Normalkoordinate der betrachteten Schwingung. Für das Dipolmoment folgt

$$\vec{\mu} = \left(\alpha_0 + \frac{\partial\alpha}{\partial Q}Q_0\cos(2\pi\nu_{vib}t)\right)\vec{E}_0\cos(2\pi\nu_0 t)$$

$$= \alpha_0\vec{E}_0\cos\omega_0 t + \frac{\partial\alpha}{\partial Q}Q_0\vec{E}_0\frac{1}{2}\left(\cos 2\pi(\nu_0+\nu_{vib})t + \cos 2\pi(\nu_0-\nu_{vib})t\right).$$

Neben der Rayleighstreuung erhält man inelastische Schwingungen bei den Frequenzen $\nu_0 \pm \nu_{vib}$. Wird die Energie des Streuzentrums erhöht (Phononerzeugung) bzw. erniedrigt (Phononenvernichtung), so spricht man von der Stokeslinie bzw. Antistokeslinie. Dies kann anhand eines Jablonski-Diagramms veranschaulicht werden (Abb. 17).

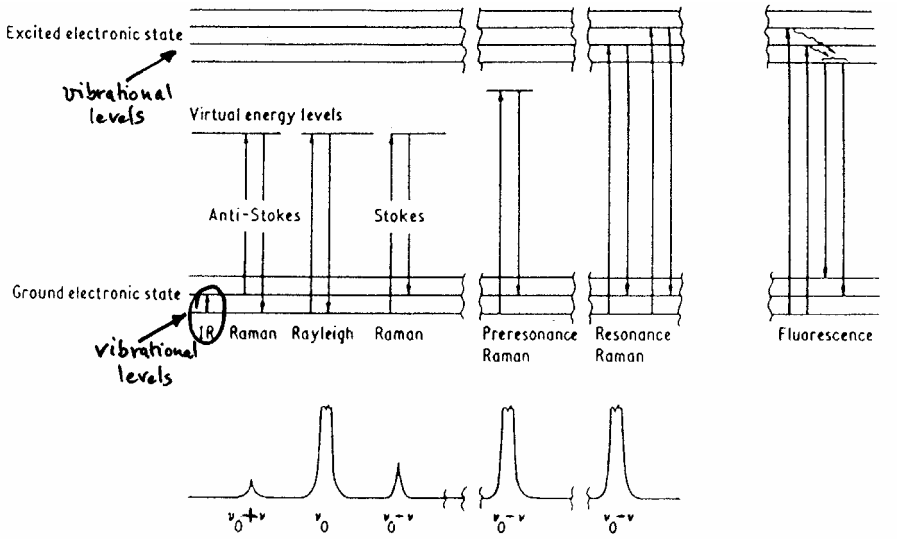


Abb. 17: Jablonski-Diagramm für den normalen, präresonanten und resonanten Ramaneffekt. Ebenfalls aufgeführt sind die Infrarotabsorption und die Fluoreszenz. Die entsprechenden Raman-Linien sind unterhalb des Diagramms zu sehen.

Aufgrund der Besetzungswahrscheinlichkeit der Schwingungszustände gemäß Boltzmann ist die Intensität der Stokeslinie größer als die der Antistokeslinie. Beim normalen Ramaneffekt stimmt die Frequenz des eingestrahlten Lichts nicht mit der eines elektronischen Übergangs überein. Die Elektronen werden auf ein virtuelles Niveau angehoben. Bei der Resonanz-Ramanstreuung wird dagegen ein elektronisches Niveau angeregt. Dies hat zur Folge, dass die Intensität der Ramanstreuung sehr viel stärker ist als beim normalen Ramaneffekt. Allerdings können damit nur Schwingungen untersucht werden, die mit den entsprechenden elektronischen Übergängen koppeln (z.B. mit der Hämgruppe). Fluoresziert das zu untersuchende Molekül, so ist aufgrund der intensiveren Fluoreszenzstrahlung die Messung der Ramanstreuung schwierig. Andererseits erzeugt die Ramanstreuung einen Untergrund bei Fluoreszenzmessungen. Eine typische Apparatur zur Messung von Ramanspektren ist in Abb. 18 zu sehen.

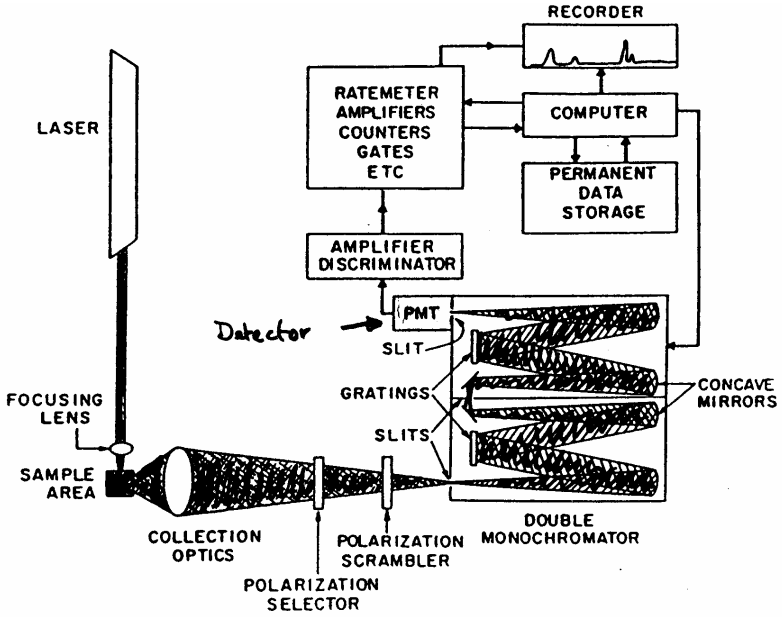


Abb. 18: Aufbau eines Spektrometers zur Messung von Ramanstreuung.

Der Laserstrahl wird zur Erzeugung einer hohen Intensität auf die Probe fokussiert, und das gestreute Licht wird in den Spalt eines Doppelmonochromators eingekoppelt. Durch Verwendung zweier Monochromatoren kann die Dispersion erhöht und die starke Rayleighstreuung unterdrückt werden. Detektiert wird das Licht mit einem Photomultiplier. Es existieren auch Raman-Differenz-Spektrometer, mit denen zwei Proben gleichzeitig (z.B. alternierend mit 50 Hz) gemessen werden können. Abb. 19 zeigt Raman-Differenzspektren der 1313 cm^{-1} Ramanlinie von Cytochrom c für verschiedene Spezies.

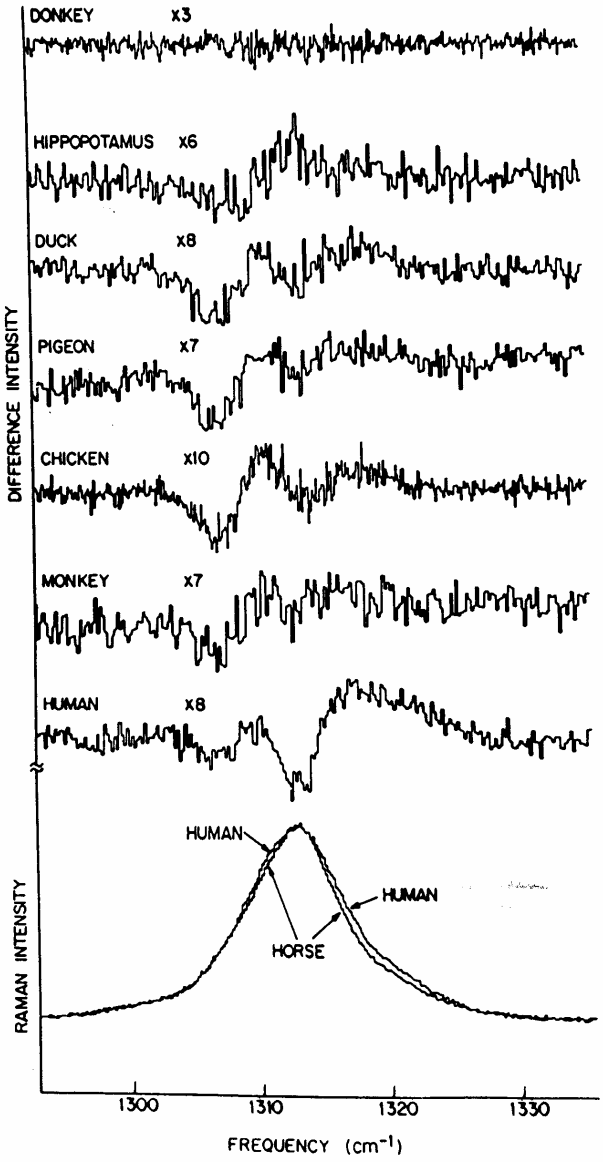


Abb. 19: Differenzspektren der Ramanlinie bei 1313 cm^{-1} von Cytochrom c bei verschiedenen Spezies. Das Spektrum der angezeigten Spezies ist von dem vom Pferd abgezogen und skaliert.

Das Differenzspektrum ist jeweils relativ zu dem vom Pferd aufgeführt. Für das Cytochrom c vom Esel ist kein Unterschied festzustellen, während dies bei den anderen Spezies der Fall ist. Darunter sind die normalen Spektren vom Pferd und vom Menschen zu sehen. Der nächste Graph zeigt Ramanspektren für Ribonuclease A bei verschiedenen Temperaturen (Abb. 20).

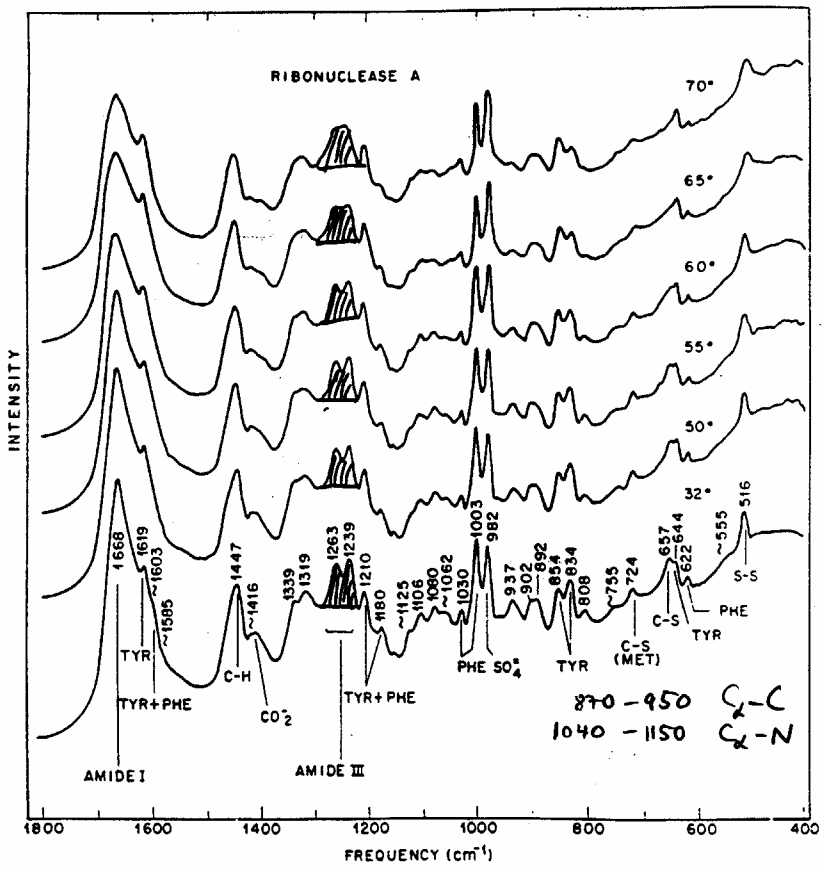


Abb. 20: Ramanspektren von Ribonuclease A bei verschiedenen Temperaturen.

Deutliche Änderungen der Spektren treten bei der Amid III-Schwingung auf (Abb. 21). Liegt eine α-Helix vor, so ist ihre Bande bei ~1265 cm^{-1}; bei einem β-Faltblatt ist sie bei 1240 cm^{-1} und bei einem Knäuel bei 1250 cm^{-1}.

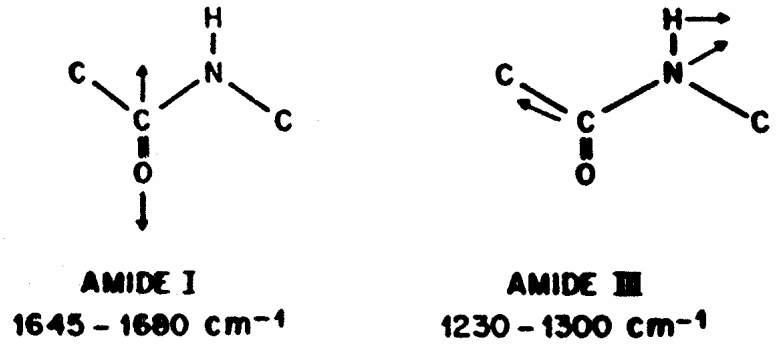


Abb. 21: Die Amid I und Amid III –Schwingungen.

Wird die Temperatur erhöht, so kann beobachtet werden, dass der α-Helix-Peak und der β-Faltblatt-Peak immer mehr verschwinden, und der Peak, der von der Knäuelstruktur verursacht wird, zunimmt. Diese Veränderung wird durch die Denaturierung des Proteins verursacht. Abb. 22 zeigt Ramanspektren von A-DNA und B-DNA aus dem Kalbthymus.

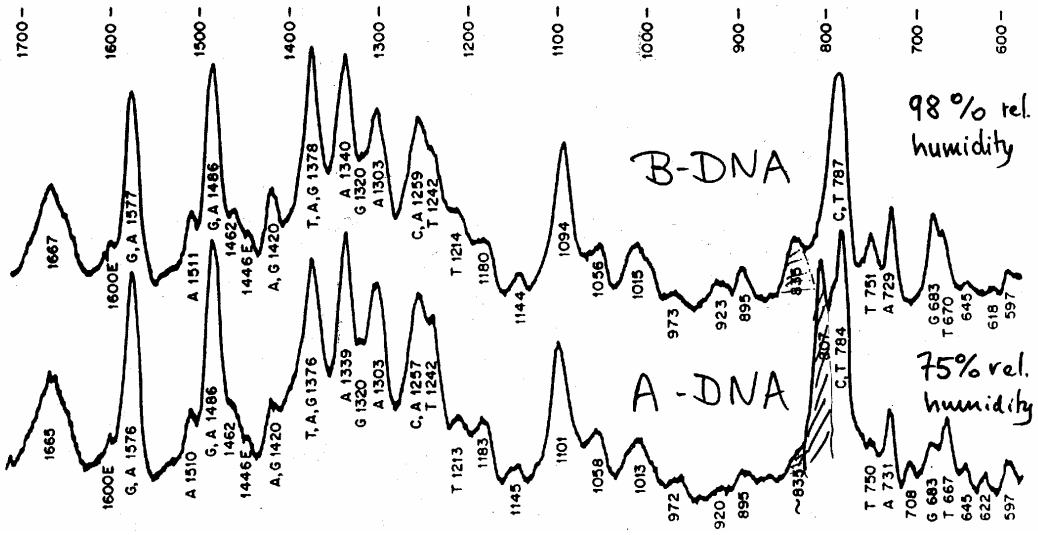


Abb. 22: Ramanspektren von A-DNA und B-DNA vom Kalbthymus.

Neben der üblichen B-DNA gibt es die A-DNA, die auftritt, wenn die relative Luftfeuchtigkeit unter ~75% sinkt. Die A-Helix ist weiter und kürzer als die B-Helix, und ihre Basenpaare liegen etwas geneigt und nicht senkrecht zur Helixachse. Die Strukturunterschiede können am Hervortreten der symmetrischen Schwingung des Phosphatesters bei 807 cm^{-1} im Falle der A-DNA im Ramanspektrum gesehen werden. In Abb. 23 sind Ramanmoden von Phospholipiden und Membranen aufgeführt.

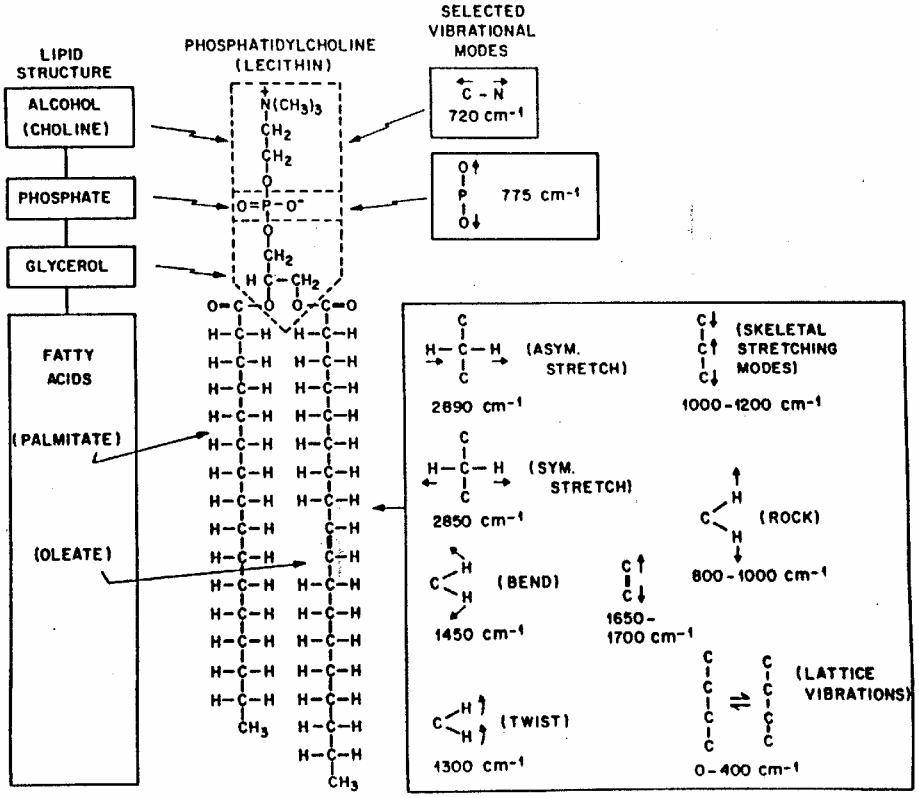


Abb. 23: Ramanmoden bei Phospholipiden und Membranen.

Die Streckschwingungen, bei denen der Wasserstoff (kleine Masse) beteiligt ist, haben die höchsten Frequenzen, während kollektive Schwingungen die kleinsten Frequenzen besitzen.
In Abb. 24 ist eine Apparatur zur Messung zeitaufgelöster Ramanspektren gezeigt, mit der man Bewegungen der Biomoleküle verfolgen kann. Es werden Ramanspektren zeitaufgelöst nach einer Störung des Systems gemessen. In dem in Abb. 24 dargestellten Experiment stellt die Photolyse eines ligandierten Hämoglobins die Störung dar. Der Puls eines frequenzverdoppelten Nd-YAG-Lasers mit einer Dauer von 30 ps wird durch einen Ramanshifter zu einer für die Absorption von Hämoglobin geeigneten Wellenlänge von 435 nm verschoben (Pulsdauer 25 ps). Anschließend wird der Puls zweigeteilt. Ein Teil dissoziiert den Liganden (in diesem Fall CO) vom Hämoglobin; der zweite Puls, der durch eine Verzögerungsstrecke später auf die Probe trifft, erzeugt das Ramanspektrum des photodissoziierten Hämoglobins. Durch Veränderung der Länge der Verzögerungsstrecke kann der Zeitpunkt (relativ zum Dissoziationspuls) für die Aufnahme des Ramanspektrums variiert werden. Diese Experimente ermöglichen die Untersuchung von Tertiär- und Quartärstrukturänderungen, die durch die Ligandenbindung bzw. -dissoziation hervorgerufen werden. Beim Menschen kann das Hämoglobin entweder in der ligandenfreien T-Struktur oder in der ligandierten R-Struktur isoliert werden. Da die T-Struktur weniger dicht gepackt ist als die R-Struktur, kann in ihrer Mitte ein Molekül 2,3 DPG (BPG) binden. Um den Einfluss der R- und T-Struktur untersuchen zu können, muss der Häm-Chromophor jeweils im gleichen Zustand vorliegen. Dies kann mit Hilfe der Photolyse erreicht werden. In weniger als einer Pikosekunde nach Einstrahlung des Lichtpulses erhält man ein deoxygeniertes Häm. Da das Protein viel langsamer relaxiert, ist es somit möglich, ein Deoxyhäm zu generieren, das von einer Proteinstruktur des ligandierten Häm umgeben ist.

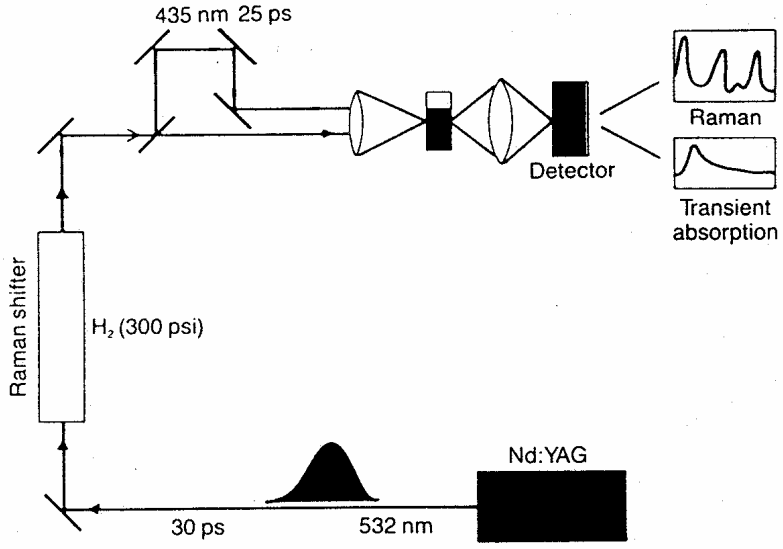


Abb. 24: Experimentelle Anordnung zur Erzeugung und Messung von zeitaufgelösten Ramanspektren (und zeitaufgelösten Absorptionsmessungen) nach einer kurzzeitigen Störung der Probe.

Die mittleren beiden Spektren in Abb. 25 sind die Ramanspektren des Hb, das ursprünglich CO-ligandiert war, 10 ns nach der Photolyse (also noch in der R-Struktur) und im Gleichgewicht (T-Struktur). Es ist eine Verschiebung der Eisen-Histidin-Streckschwingung zu kleineren Frequenzen zu beobachten. Außer diesem Normalfall kann auch der Übergang von der ursprünglich ligandierten R-Struktur in die Gleichgewichts-(unligandierte) R-Struktur und der Übergang von der ursprünglich ligandierten T-Struktur in die Gleichgewichts-(unligandierte)T-Struktur für besondere Hämoglobine gemessen werden. Der erstgenannte Fall tritt bei der Mutante αAsp99Asn des menschlichen Hämoglobins (Hb-Kempsey) (Abb. 25, oben) auf, der letztgenannte beim Thunfisch (Abb. 25, unten).

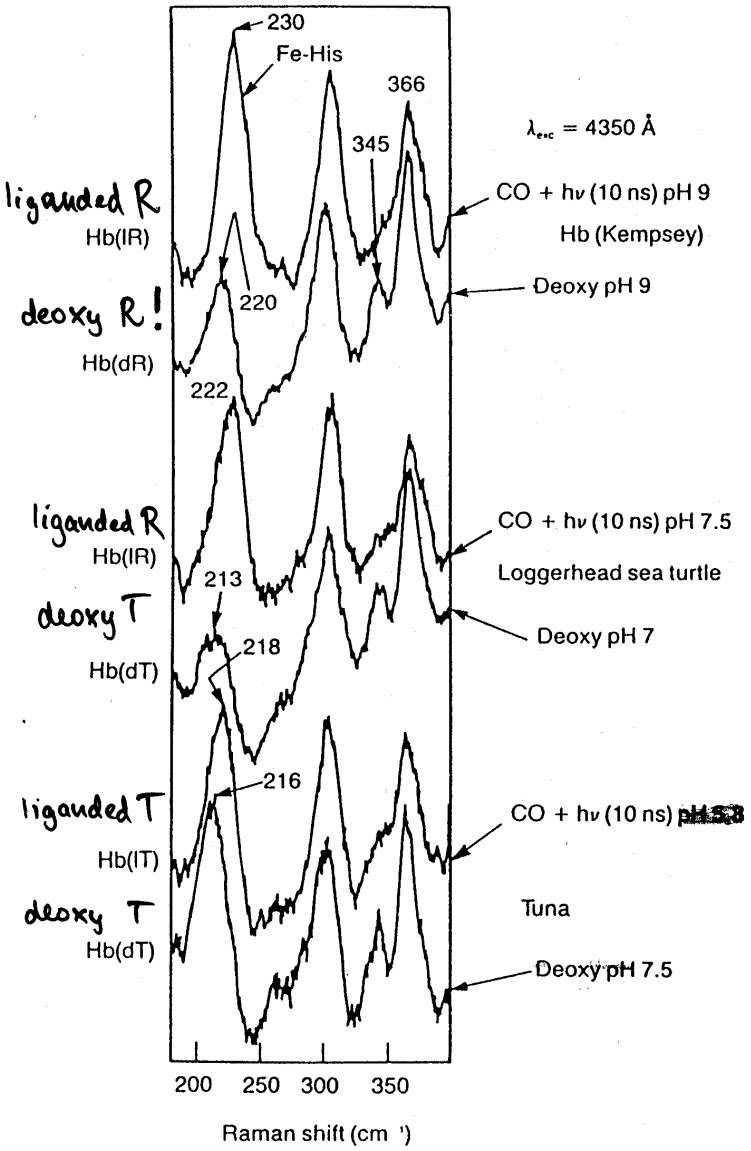


Abb. 25: Ein Teil des Resonanz-Ramanspektrums für verschiedene Gleichgewichts- und Nichtgleichgewichtsstrukturen von Deoxyhämoglobin. Links von den Spektren sind die Tertiärstrukturen, die das Deoxyhäm umgeben, angeschrieben. Die oberen beiden Spektren sind an einer Mutante von menschlichem Hb, die mittleren an Seeschildkröten-Hb und die unteren an Thunfisch-Hb gemessen.

Es zeigt sich, dass die R-Struktur sowohl für das 10 ns nach der Photolyse gemessene Deoxy-Hb (Deoxy-Hb*) als auch für das Gleichgewichts-Deoxy-Hb die höheren Frequenzen im Vergleich zur T-Struktur und somit die stärkere Bindung aufweist. Dies rührt daher, dass bei der T-Struktur die F-Helix um ungefähr ein Angström gekippt werden muss, damit Salzbrücken ausgebildet werden können, die die Quartärstruktur stabilisieren. Diese Kippung schwächt die Eisen-Histidin-Bindung in der T-Struktur (Abb. 26).

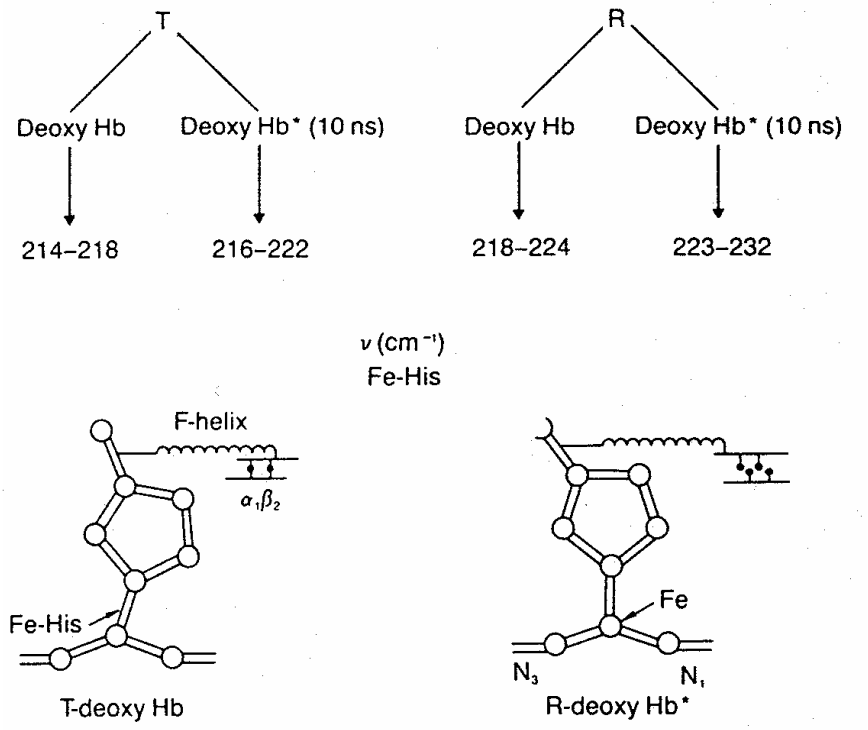


Abb. 26: Variation der Eisen-Histidin-Streckschwingung aufgrund der Proteinumgebung. Die aufgeführten Frequenzbereiche werden durch die spezifischen Unterschiede der verschiedenen Spezies verursacht. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Kippung des Histidins in Bezug zur Hämebene als Funktion der Proteinstruktur. Diese Kippung wird als Grund für die Änderungen der beobachteten Frequenzen angesehen.

Exploration der Konformations-Energieoberflächen der Proteine

Die Gesamtenergie eines Biomoleküls wird nicht nur durch Schwingungs-, Rotations- und elektronische Anregungen bestimmt, sondern hängt ganz wesentlich von der Konformation ab, in der sich das Molekül befindet.

$$E = E_{el.} + E_{vib.} + E_{rot.} + E_{conf}.$$

E_{conf} beschreibt, dass Proteine mit identischen Sequenzen verschiedene interne Energien haben können. Man unterscheidet zwischen Zuständen und Subzuständen. Bei Myoglobin stellen z.B. oxy-Mb und deoxy-Mb zwei Zustände dar, die viele Subzustände haben können, wie in Abb. 1 schematisch dargestellt ist.

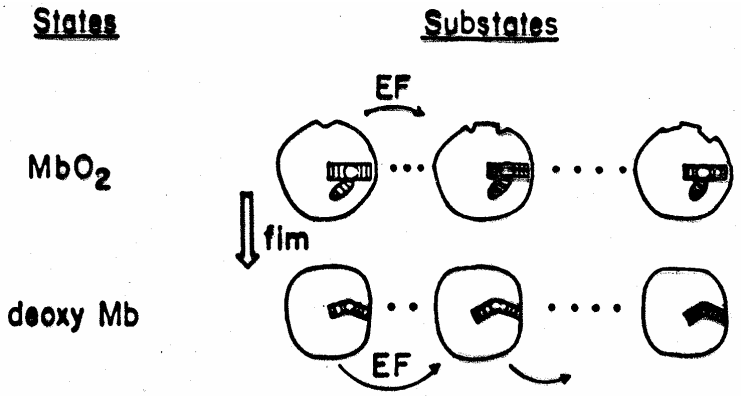


Abb. 1: Zwei Zustände des Myoglobins mit vielen Subzuständen.

Aufgrund dieser Subzustände besteht die Energielandschaft aus vielen lokalen Minima, die durch Energiebarrieren voneinander separiert sind (Abb. 2). Die Eigenschaften der Energielandschaft lassen sich durch Messungen der Übergänge zwischen Zuständen und Subzuständen untersuchen. Es können Relaxationen und Fluktuationen gemessen werden. Zur Vereinfachung wird im Folgenden über die verschiedenen Subzustände integriert, und es werden nur zwei Zustände betrachtet. Für das Potential dieser beiden Zustände als Funktion einer Konformationskoordinate (z.B. des Abstandes zwischen dem Eisenatom und dem Liganden beim Myoglobin) kann man ein Modell ansetzen, wie es in Abb. 3 dargestellt ist.

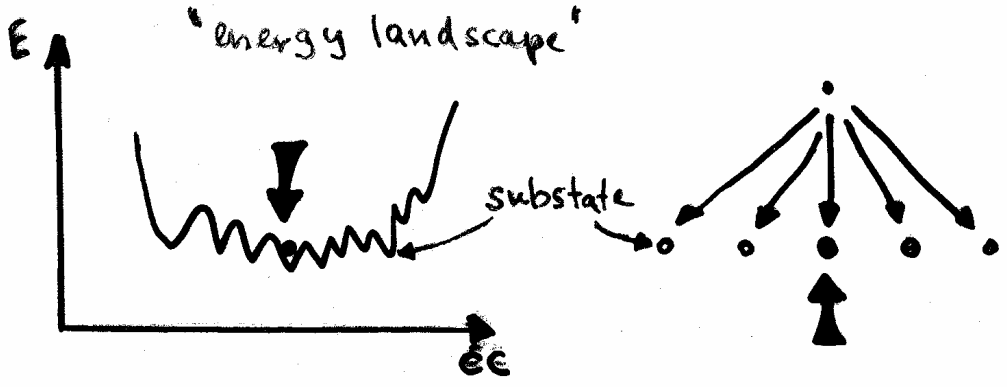


Abb. 2: Energielandschaft eines Zustandes eines Proteins in Abhängigkeit von einer Konformationskoordinate.

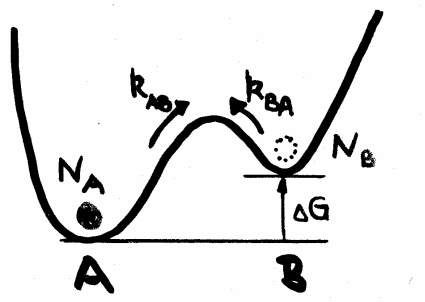


Abb. 3: Energieoberfläche eines Biomoleküls mit zwei Zuständen A und B (ohne explizite Berücksichtigung der Subzustände) als Funktion der Konformationskoordinate.

Der relative Anteil der Proteine in Zustand *A (B)* ist N_A (N_B). Es gilt $N_A+N_B = 1$. Die Ratenkoeffizienten für den Übergang von Zustand *A (B)* in Zustand *B (A)* sind k_{AB} (k_{BA}), und der Unterschied der freien Enthalpie zwischen den Zuständen *A* und *B* ist ΔG. Im Gleichgewicht gilt

$$N_A \cdot k_{AB} = N_B \cdot k_{BA} ,$$

$$\frac{N_B}{N_A} = \frac{k_{AB}}{k_{BA}} \equiv K .$$

Für den Gleichgewichtskoeffizienten K gilt außerdem

$$K = \exp(-\Delta G / RT)$$

$$= \exp(\Delta S / R)\exp(-\Delta H / RT) .$$

Aus Messungen im Gleichgewicht kann somit ΔG ermittelt werden; über die Ratenkoeffizienten (die Höhe der Barriere zwischen A und B) kann aber nichts gefolgert werden. Um die kinetischen Prozesse zu analysieren, werden die Ratenkoeffizienten in einem großen (Druck-, Viskositäts-) Temperaturbereich gemessen. Es können zwei Fälle unterschieden werden: ΔG ist klein, so dass $N_A \sim N_B$ ist, oder ΔG ist groß, so dass $N_B \sim 0$ ist. Wir wollen zunächst den ersten Fall mit der Relaxations-, Dispersions- und Fluktuationsmethode betrachten.

Bei der **Relaxationsmethode** wird das System durch eine deltaförmige Anregung gestört und die Relaxation in den Gleichgewichtszustand beobachtet. Als Störungen kommen z.B. ein plötzlicher Anstieg der Temperatur, des Drucks oder das Einschalten eines E-Feldes in Frage. Quantitativ erhält man für die zeitliche Änderung der Molekülanzahl im Zustand *A,*

$$\frac{dN_A}{dt} = k_{BA}N_B - k_{AB}N_A$$

$$= k_{BA}\left(1 - N_A\right) - k_{AB}N_A .$$

Daraus folgt

$$N_A(t) = N_A(\infty) + \Delta N_A \exp\left(-t/\tau\right),$$

wobei

$$\frac{1}{\tau} = k_{BA} + k_{AB} .$$

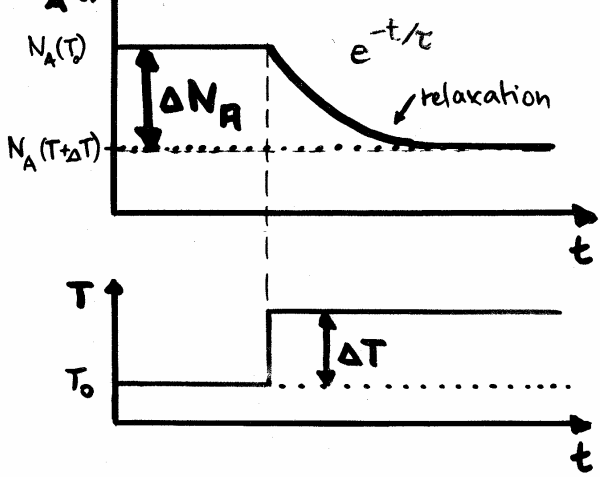


Abb. 4: Relaxation der Besetzungszahl im Zustand A nach einer plötzlichen Temperaturerhöhung.

Das Prinzip der Messung ist für einen Temperatursprung in Abb. 4 skizziert. Durch Bestimmung von τ aus der Relaxationsmessung und von $K = k_{AB} / k_{BA}$ aus der Gleichgewichtsmessung können die Ratenkoeffizienten berechnet werden. Abb. 5 zeigt zwei Versuchsaufbauten zur Erzeugung eines Temperatursprungs. Bei der Stromstoß-Aufheizung wird der Kondensator C auf die Spannung U aufgeladen und über eine getriggerte Funkenstrecke S durch die Messzelle entladen. Dadurch wird die Messzelle, in der die Leitfähigkeit durch Zugabe von Elektrolyten sehr hoch ist, aufgeheizt. Bei der Mikrowellen-Impulsaufheizung absorbiert das Lösungsmittel die Mikrowellen. Es werden Mikrowellenpulse mit Hilfe eines Magnetrons erzeugt, die mit einem Hohlleiter zu dem Messsystem geführt werden.

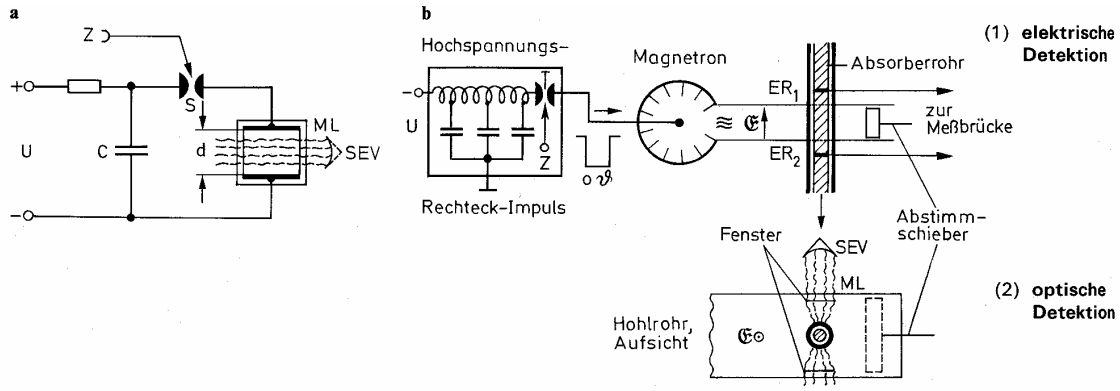


Abb. 5: Schematische Darstellung von Versuchsaufbauten zur Erzeugung schneller Temperatursprünge. a: Stromstoß-Aufheizung nach Czerlinski. U Hochspannung (10-50 kV), C Stoßkondensator, Z Zündimpuls, S Funkenstrecke, ML Meßlichtbündel, d Plattenabstand. b: Mikrowellen-Impulsheizung nach Ertl und Brumm. T = Thyratron, ER Elektrodenring.

Der Relaxationsvorgang kann z.B. mit einem kinetischen Spektralphotometer durch Messung von Absorptionsänderungen des Reaktionssystems analysiert werden (Abb. 6). Das Licht einer breitbandigen Quelle wird monochromatisiert und auf die Probe eingestrahlt. Der Relaxationsprozess wird durch eine Impulsanregung eingeleitet, und die Änderung der Absorption wird mit einem Photomultiplier (Sekundärelektronenvervielfacher, SEV) oder einer Avalanche-Photodiode gemessen.

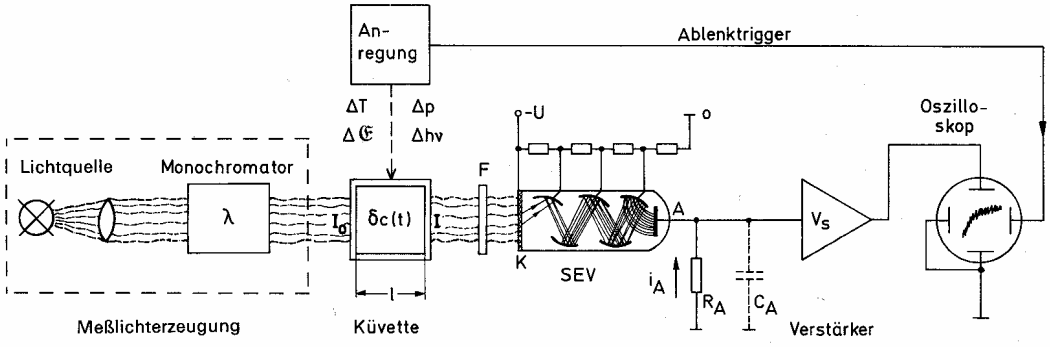


Abb. 6: Schematische Darstellung eines kinetischen Spektralphotometers nach Porter, Witt und Rüppel. K Kathode, A Anode, V_s Nachverstärker, U Kathodenspannung (ca. 500 V bei Photometrie, 500 V bei Fluorimetrie), F Interferenzfilter bei Blitzanregung.

Bei der **Dispersionsmethode** erfolgt nicht eine kurzzeitige, sondern eine periodische (sinusförmige) Störung (z.B. durch ein E-Feld, durch Ultraschall oder Licht). Dadurch erhält man im Falle der sinusförmigen Anregung eine sinusförmige Variation der Konzentration einer Komponente der Probe mit der Amplitude A und der Kreisfrequenz ω,

$$\Delta C(t) = A(\omega) \sin(\omega t - \phi) .$$

Analog zur Messung der Fluoreszenzabklingzeit in der Frequenzdomäne kann man durch Messung der Amplitude und der Phasenverschiebung ϕ die Relaxationszeit bestimmen.
Die dritte Möglichkeit ist die **Fluktuationsmethode**. Hier werden die Fluktuationen der Population N in einem kleinen Messvolumen zeitaufgelöst gemessen. Es gilt

$$\left\langle \left(\frac{\delta N}{N} \right)^2 \right\rangle = \frac{1}{N},$$

wobei δN die Abweichung von N vom Mittelwert darstellt. Für die Autokorrelationsfunktion von δN_A gilt im Falle einer einfachen Relaxation

$$\langle \delta N_A(t)\, \delta N_A(t+t') \rangle \propto \exp[-t'/\tau] .$$

Die Messung der Autokorrelationsfunktion der Fluktuationen erlaubt also die Bestimmung von τ ohne äußere Störung und somit die Bestimmung der Ratenkoeffizienten.
Im Folgenden soll der zweite Fall (ΔG **groß**) diskutiert werden. Dazu muss das System fernab vom Gleichgewicht präpariert werden. Eine Möglichkeit dafür ist die schnelle Mischung von Reaktionspartnern. Es können Messungen im **'stopped flow'** und im **kontinuierlichen Fluss** durchgeführt werden. Im ersteren Fall werden die Reaktionspartner (z.B. Deoxy-Myoglobin und Sauerstoff) mittels zweier Zuführungen in eine Küvette eingefüllt, und die Reaktion wird (z.B. durch Messung der Änderung der Absorption) zeitaufgelöst beobachtet. Im kontinuierlichen Fluss wird die Reaktion statisch an verschiedenen Abständen vom Ort des Zusammenflusses der Reaktionspartner gemessen. Bei dieser Messung muss also nicht zeitaufgelöst detektiert werden. Der Nachteil ist aber, dass bei konventionellen Apparaturen eine größere Probenmenge erforderlich ist. Durch Verwendung der Halbleitertechnik (Nanostrukturierung) lassen sich die Experimente allerdings beträchtlich verkleinern, und es lassen sich Zeitauflösungen bis 1 Mikrosekunde bei geringem Probenverbrauch erreichen. Eine weitere Möglichkeit ist die Pulsradiolyse. Hier werden die Proben mit Mikrosekundenpulsen aus hochenergetischen Elektronen, die von einem Elektronenbeschleuniger stammen, bestrahlt. Die dritte und wichtigste Methode ist die **Photonenanregung**. Kurze Laserpulse im Mikro- bis Pikosekundenbereich setzen lichtinduzierten Elektronentransfer, Isomerisation oder Photolyse von Liganden in Proteinen in Gang.

Nun soll die Photolyse an Myoglobin näher betrachtet werden. Wird ein kurzer Laserpuls (z.B. von einem Nd-YAG-Laser mit ~10 ns Zeitdauer) auf das globuläre Protein eingestrahlt, so wird der Ligand (z.B. das CO) vom Häm ab dissoziiert (Abb. 7).

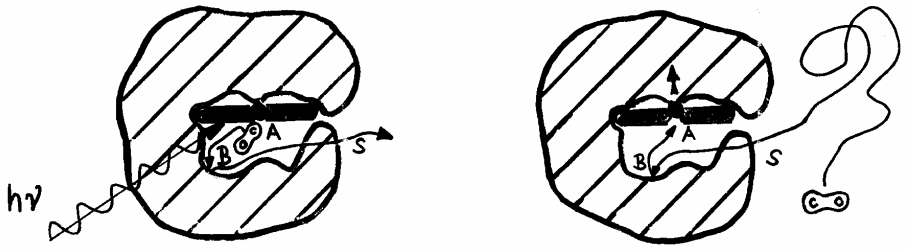


Abb. 7: Blitzphotolyse: Photodissoziation des CO-Liganden vom Häm (links); Rückbindung von CO an das Häm (rechts).

Nach der Dissoziation kann der Ligand in der Hämtasche des Proteins verbleiben oder diese verlassen. Entsprechend ist es möglich, dass der Ligand aus der Hämtasche zurückbindet, oder, falls er die Hämtasche verlassen hat, dass ein Ligand aus der Proteinumgebung an das Häm bindet. Die Kinetik der Rückbindung des Liganden gibt Auskunft über die Proteinkonformation. Experimentell können diese Kinetiken mit Pump/Probe-Experimenten (siehe Ramanstreuung) oder mit der Transientenspektroskopie untersucht werden. Der prinzipielle Versuchsaufbau bei der Transientenspektroskopie ist in Abb. 8 dargestellt.

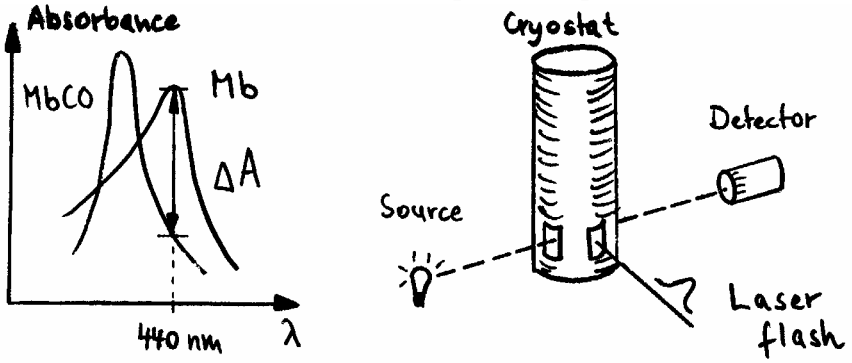


Abb. 8: Blitzphotolyse: schematischer Versuchsaufbau (rechts); Absorptionspektrum von MbCO und Mb in der Nähe der Soretbande.

Bei diesem Experiment wird ausgenutzt, dass die Absorption des Myoglobins (z.B. in der Soretbande) stark von der Bindung des Häms mit einem Liganden abhängt. Die Absorption der Probe wird bei einer geeigneten Wellenlänge (z.B. 440 nm) mit einer schwachen Lichtquelle gemessen, die möglichst wenig Photolyse in der Probe verursacht (Abb. 8). Mit Hilfe eines Kryostaten kann die Temperatur der Probe variiert werden. Durch die Einstrahlung eines Laserpulses wird die Probe photolysiert, und die Absorption verändert sich. Wird die Messung an MbCO durchgeführt und die Absorption bei 440 nm gemessen, so steigt die Absorption der Probe nach der Photolyse durch den Laserstrahl stark an (Abb. 9).

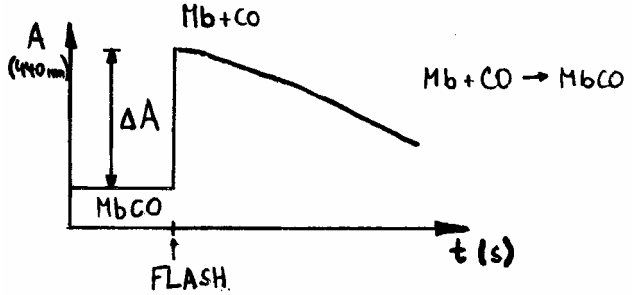


Abb. 9: Veränderung der Absorption bei 440 nm nach Photodissoziation von MbCO.

Nach dem Laserpuls bindet das CO an das Myoglobin zurück, so dass die Absorption wieder abnimmt. Zur besseren Darstellung dieses über viele Größenordnungen der Zeit ablaufenden Relaxationsvorganges wird in der Regel eine doppelt logarithmische Auftragung gewählt. Abb. 10 zeigt diese Darstellung für *N(t)*, der Wahrscheinlichkeit, dass sich das Myoglobin nach einem photolysierenden Lichtblitz im dissoziierten Zustand befindet.

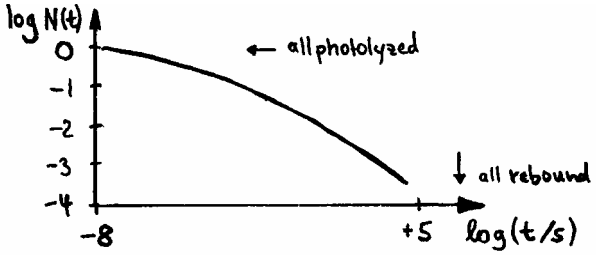


Abb. 10: Doppelt logarithmische Darstellung von N(t) für die Rückbindung von CO an das Mb.

Eine genauere Darstellung einer Blitzphotolyse-Messapparatur ist in Abb. 11 zu sehen. Ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (532 nm) photolysiert die Proteinprobe. Die Absorption der Probe wird bei einer Wellenlänge gemessen, die mit einem Monochromator (MC) aus dem gewählten Spektrum einer breitbandigen Lichtquelle selektiert wird. Ein zweiter Monochromator verhindert, dass Streustrahlung vom Laserpuls auf den Photomultiplier (PMT) trifft. Die dem Lichtsignal proportionale Ausgangsspannung des Photomultipliers (PMT) wird vom Vorverstärker (PA) weiter verstärkt und mit dem Transientenrekorder (WT II) und dem digitalen Oszilloskop (TEK) als Funktion der Zeit registriert. Da sich die Rückbindungskinetiken über viele Größenordnungen der Zeit erstrecken, ist es günstig, die Messungen mit einem Transientenrekorder durchzuführen, der die Spannungswerte auf einer logarithmischen Zeitskala liefert. Das WT misst die Daten kontinuierlich bei einem festen Zeitintervall mit höchster Zeitauflösung (1 μs) und führt dann eine Mittelung durch, so dass die Messwerte kurz nach dem Laserpuls mit höchster Zeitauflösung und die späteren mit einer geringeren Zeitauflösung ausgegeben werden. Konkret liefert das WT m (1 – 20) Messwerte bei der höchsten Zeitauflösung Δ, die nächsten m Werte als Mittelwerte des Zeitintervalls 2Δ, dann folgen m Werte als Mittelwerte des Zeitintervalls $2^2\Delta$ und so weiter. Dadurch ist es nicht nur möglich, in einem sehr großen Zeitbereich zu messen, sondern es wird gleichzeitig aufgrund der Mittelung die Statistik bei großen Zeiten nach dem Laserpuls verbessert. Abb. 12 zeigt die Rückbindungskinetik von CO an Myoglobin nach einer Laser-Photolyse bei zwei verschiedenen Temperaturen.

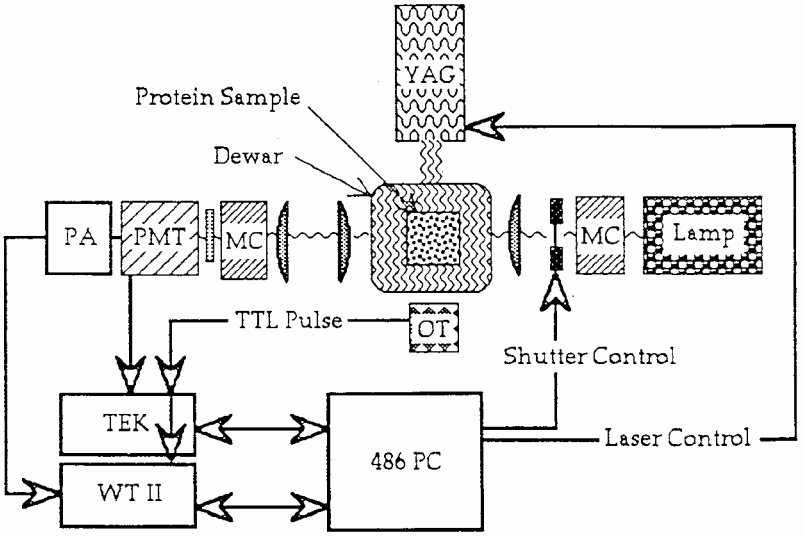


Abb. 11: Schema einer Blitzphotolyse-Apparatur zur Messung der Rückbindungskinetik.

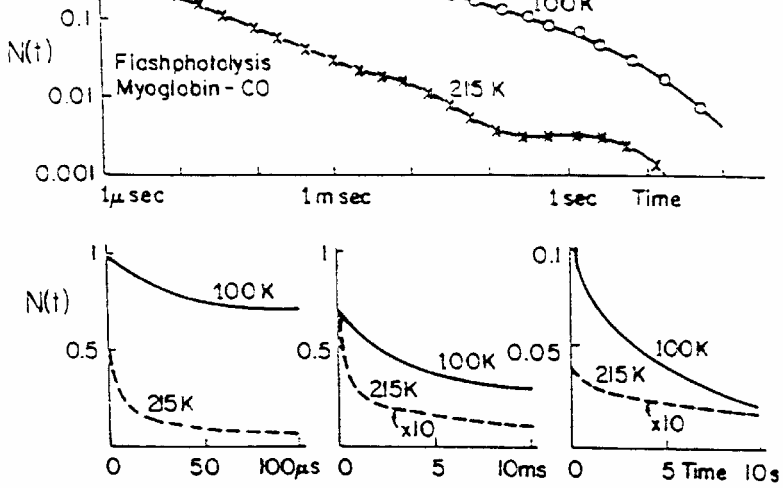


Abb. 12: Kinetik der Rückbindung von CO an Myoglobin nach Photodissoziation bei 100 und 215 K. Die oberen Kurven wurden jeweils durch einen Sweep mit einem Transientenrekorder mit logarithmischer Zeitbasis gemessen. Die unteren Kurven zeigen, wie diese Messungen bei Verwendung eines Oszilloskops aussehen.

Die oberen Kurven zeigen Messungen in doppelt logarithmischer Auftragung, die mit einer logarithmischen Mittelung aufgenommen wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass keine exponentielle Abhängigkeit vorliegt (siehe unten). Im Vergleich dazu sind in der unteren Hälfte der Abbildung Graphen gezeigt, wie sie von einem Oszilloskop gemessen werden, beide Achsen sind also linear skaliert. Um den großen Zeitbereich der obigen Messung darstellen zu können, sind mehrere Messungen nötig. Bei diesen Messungen ist nicht eindeutig ersichtlich, dass ein nicht-exponentieller Zusammenhang vorliegt.

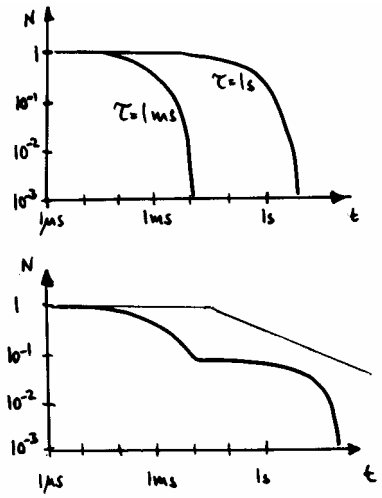


Abb. 13: Doppelt logarithmische Darstellung zweier Exponentialfunktionen mit verschiedenen Abklingzeiten (oben) und einer Summe von zwei Exponentialfunktionen (unten). In der unteren Abbildung ist auch eine Potenzkurve, $N(t) = (1 + t/\tau)^{-n}$, eingezeichnet.

In einer doppelt logarithmischen Auftragung stellt sich eine Exponentialfunktion als eine schnell abfallende Kurve dar (Abb. 13). Es ist leicht möglich, die Summe zweier exponentieller Relaxationen,

$$N(t) = A_1 \exp\left(-t/\tau_1\right) + A_2 \exp\left(-t/\tau_2\right),$$

mit genügend unterschiedlichen Abklingzeiten (τ_1, τ_2) als zweistufigen Prozess zu erkennen.

Eine Vielzahl von Experimenten an Ensembles von Proteinen zeigen für die untersuchten Größen nicht scharfe Werte, sondern Verteilungen. Dies weist darauf hin, dass Proteine viele verschiedene Konformationssubzustände besitzen. Bei der Behandlung der Röntgen- und Neutronenstreuung sowie des Mößbauereffekts wurde gezeigt, dass sich die Messdaten für den Debye-Waller- bzw. den Lamb-Mößbauer-Faktor nur durch Strukturheterogenitäten erklären lassen. Wie oben ausgeführt, sind die Rückbindungskinetiken von Liganden (ebenso wie Konformationsänderungen und Elektronentransferreaktionen) nicht-exponentiell bei tiefen Temperaturen. Dies weist ebenfalls auf Konformationsheterogenitäten hin. Schließlich sind die spektralen Linien der elektronischen und Schwingungsübergänge inhomogen verbreitert (spektrales Lochbrennen, kinetisches Lochbrennen, siehe unten). In Abb. 14 ist das Zustandekommen von verschiedenen Subzuständen von Proteinen schematisch dargestellt.

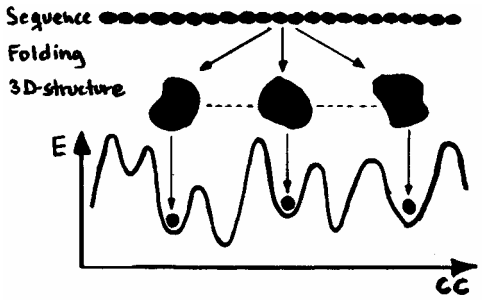


Abb. 14: Schematische Darstellung des Zustandekommens der rauen Energieoberfläche von Proteinen.

Obwohl die Aminosäuresequenz aller Proteinmoleküle in einem reinen Ensemble gleich ist, ergeben sich nach der Faltung der Proteine verschiedene Konformationen, die leicht unterschiedliche Energien haben. In obiger Abbildung ist die Energie nur gegenüber *einer* Konformationskoordinate aufgetragen. Dies ist eine grobe Vereinfachung, da tatsächlich ~3*N* Koordinaten vorhanden sind, wobei *N* die Anzahl der Atome des Proteins ist. Einfache Abschätzungen ergeben z.B. beim Myoglobin Energieminima in der Größenordnung 10^9 – 10^{10}. Im denaturierten Zustand liegen noch viel mehr Subzustände vor.
Konformationssubzustände haben die gleiche Grobstruktur, sie unterscheiden sich jedoch in strukturellen Details, so dass z.B. die Ratenkoeffizienten für einen biologischen Prozess deutlich variieren können. Bei tiefen Temperaturen oder auf kurzen Zeitspannen liegt eine statische Verteilung der Zustandsbesetzung vor. Bei hohen Temperaturen oder bei großen Zeitspannen treten Fluktuationen zwischen den Konformationssubzuständen auf. Durch diese raue Energielandschaft zeigen Proteine auch Eigenschaften von Gläsern. Gläser können als eingefrorene Flüssigkeiten betrachtet werden (Abb. 15).

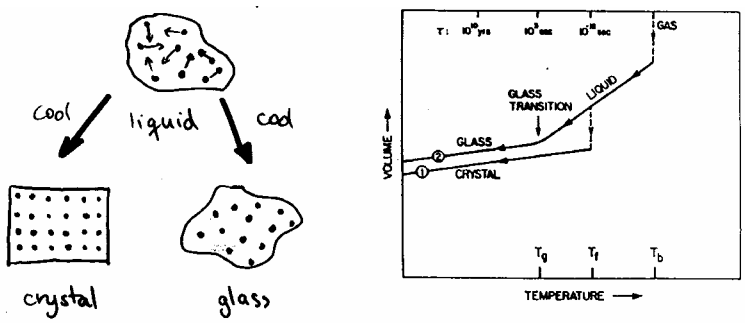


Abb. 15: Übergang einer Flüssigkeit in einen Kristall und in ein Glas (links). Phasendiagramm für diese Flüssigkeit-Glas und Flüssigkeit-Kristall Systeme.

Gläser sind aperiodisch angeordnete Festkörper, die keine langreichweitige Ordnung haben. Im Prinzip kann jede Flüssigkeit in den glasartigen Zustand übergeführt werden, falls nur die Abkühlung so schnell vor sich geht, dass die Atome keine Zeit haben, die Gleichgewichtspositionen einzunehmen. Ein Protein weist sowohl Eigenschaften eines Kristalls als auch eines Glases auf. Die Ordnung eines Kristalls ist bei Proteinen dadurch gegeben, dass die mittlere Lage der Atome wohldefiniert ist. Die glasartige Struktur ist durch die vielen möglichen tatsächlichen Orte (Konformationen) um diese Mittellage der Atome gegeben. Die Variation der möglichen Orte ist dabei im Bereich von einem (bis mehreren) Ångström. Daher haben Biomoleküle wichtige gemeinsame Eigenschaften mit Gläsern, Spingläsern und synthetischen Polymeren: Sie zeigen Verteilungen von charakteristischen Zeitskalen der Bewegung. Des Weiteren kann die Temperaturabhängigkeit der Zeitskalen nicht mit der Formel von Arrhenius beschrieben werden (siehe unten). Schließlich zeigen diese Systeme Metastabilität. So hängt beispielsweise der Zustand des Systems nach einer Abkühlung von der Abkühlungsgeschwindigkeit ab.
Abb. 15 zeigt auch das V-T-Phasendiagramm von Substanzen, die zu Gläsern bzw. Kristallen kondensieren. Im Falle der Bildung eines Kristalls kommt es bei Abkühlung zu einer abrupten Änderung – meistens zu einer Verminderung – des Volumens. Nach diesem Übergang nimmt das Volumen des Kristalls aufgrund der Anharmonizität der Potentiale stetig ab. Bei Gläsern kommt es zu einem langsamen Glasübergang. Die Glasübergangstemperatur ist dabei nicht scharf definiert. Üblicherweise wird sie so festgelegt, dass die Relaxationen unterhalb dieser Temperatur mit charakteristischen Zeiten größer als 10^3 s ablaufen. Wird ein Glaströpfchen mehrfach erwärmt und abgekühlt, so dass sich eine Flüssigkeit und daraufhin wieder ein Glas bildet, so erhält man für jedes Glas einen anderen Konformationszustand (Abb. 16). Es liegt, ähnlich wie bei den Biomolekülen, eine rauhe Energielandschaft vor.

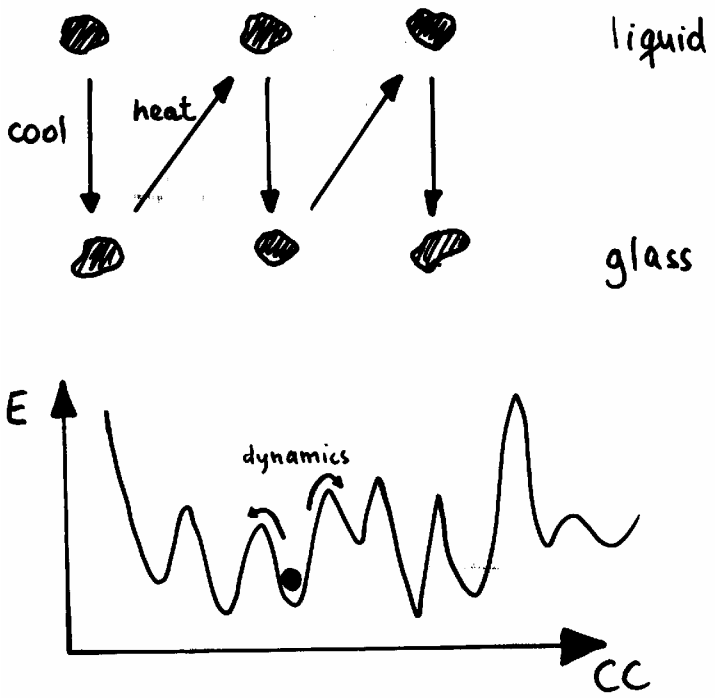


Abb. 16: Auf- und Abkühlen eines Glases in den flüssigen Zustand und zurück (oben). Das Glas nimmt jeweils einen anderen Zustand ein (unten).

Bindung eines Liganden bei tiefen Temperaturen

Durch Einstrahlen eines Laserpulses kann, wie oben dargestellt, ein Ligand (z. B. Kohlenmonoxid, CO) von einem Hämprotein dissoziiert werden. Bei Temperaturen unter ~180 K bleibt das CO in der Hämtasche; es kann das Protein nicht verlassen (Abb. 17).

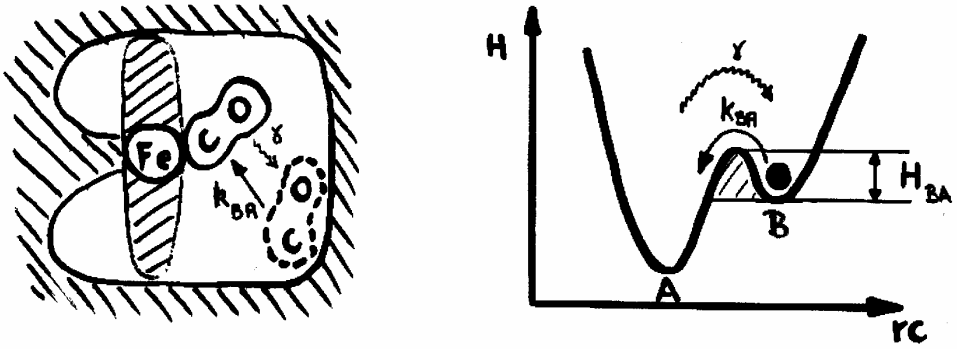


Abb. 17: Photolyse des CO bei tiefen Temperaturen: Der Ligand kann die Hämtasche nicht verlassen (links). Zwei-Zustandsystem zur Beschreibung des Vorgangs (rechts).

Somit kann der Vorgang im einfachsten Modell mit zwei Zuständen beschrieben werden. Im Zustand *A* ist das CO ligandiert. Nach der Einstrahlung des Lichtpulses ist das CO dissoziiert (Zustand *B*). Die beiden Zustände sind durch eine Enthalpiebarriere H_{BA} voneinander getrennt. Mit dieser ist ein Ratenkoeffizient k_{BA} verbunden. Es gilt für die Wahrscheinlichkeit, dass zur Zeit *t* nach der Photolyse ein dissoziiertes Protein vorliegt,

$$N(t) = \exp\left(-k_{BA} \cdot t\right),$$

mit der Arrheniusbeziehung

$$k_{BA} = A_{BA} \frac{T}{T_0} \exp\left(\frac{-H_{BA}}{RT}\right).$$

Abb. 18 zeigt Messungen der Rückbindungskinetik von MbCO und MbO_2 in einer Glyzerin-Wasser-Matrix für Temperaturen zwischen 40 und 160 K. Zum Vergleich ist auch eine exponentielle Kinetik eingezeichnet.

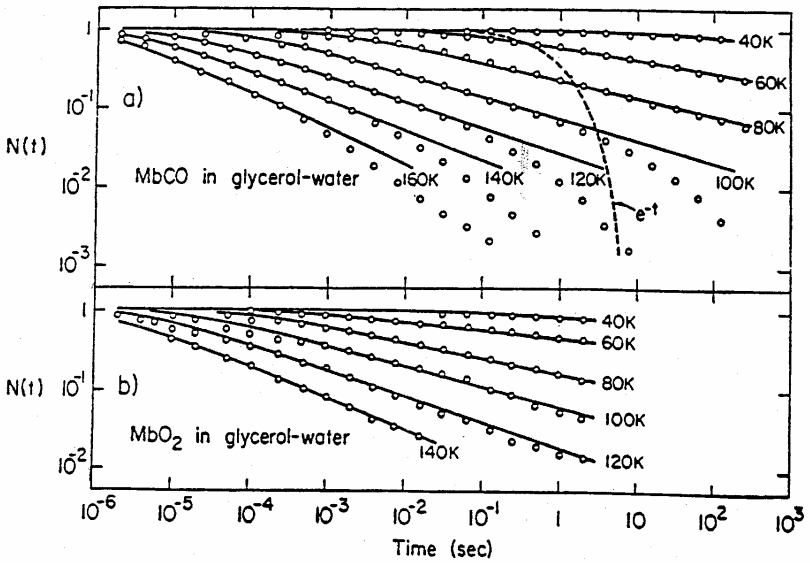


Abb. 18: Rückbindungskinetik von a) CO zu MbCO und b) O_2 zu MbO_2 für verschiedene Temperaturen (Punkte) und angefittete Kurven (durchgezogene Linien).

Die Messungen zeigen große Abweichungen von einem exponentiellen Verlauf von *N(t)*. Die kinetischen Daten können gut beschrieben werden, falls eine Verteilung $f(\lambda)$ von Exponentialfunktionen angenommen wird,

$$N(t) = \int f(\lambda) \exp(-\lambda\, t)\, d \log \lambda\,.$$

Diese Verteilung kann auf zwei Arten zustande kommen. Zum einen kann ein homogenes Ensemble von Proteinen vorliegen, das auf verschiedenen Pfaden zurückbinden kann. Zum anderen kann ein inhomogenes Ensemble vorliegen, so dass durch die verschiedene Struktur der Proteine die Zurückbindung unterschiedlich schnell verläuft (Abb. 19).

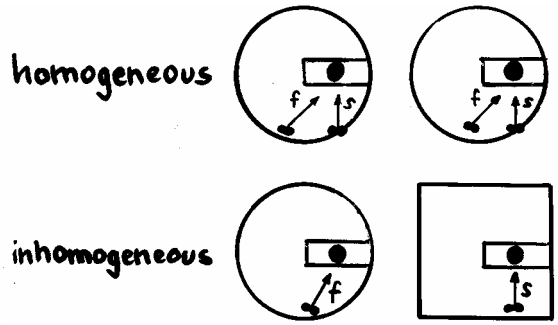


Abb. 19: Schema der beiden Möglichkeiten für die beobachtete Rückbindungskinetik (f: fast, s: slow).

Welche der beiden Möglichkeiten tatsächlich vorliegt, kann mit einem Multipuls-Experiment entschieden werden. Die Proteinprobe wird mit einer Serie von Laserpulsen, die in einem konstanten zeitlichen Abstand auf die Probe eingestrahlt werden, photolysiert. Die Rückbindungskinetik wird dabei kontinuierlich gemessen.
Liegt ein inhomogenes Ensemble vor, so werden immer solche Proteine, die eine schnelle Rückbindung zeigen, zurückgebunden, bevor der nächste Laserpuls eintrifft. Vor jedem Laserpuls nimmt *N(t)* den gleichen Wert an (Abb. 20 oben), und die Kinetik sieht stets gleich aus,

$$N^*(1)=N^*(2)=N^*(n).$$

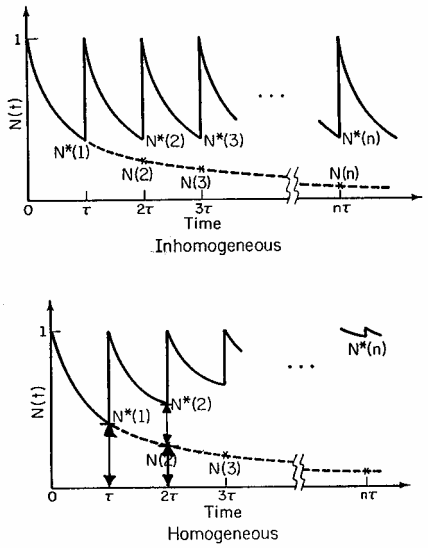


Abb. 20: Rückbindungskinetik bei multiplen Laserpulsen für ein inhomogenes (oben) und ein homogenes (unten) Ensemble.

Liegt ein homogenes Ensemble vor, wobei jedes Proteinmolekül verschieden schnelle Rückbindungspfade aufweist, so wird *N(t)* vor den nächsten Pulsen immer größer werden (Abb. 20, unten). Dies wird mit folgender Überlegung klar: wir nehmen zur Vereinfachung an, dass es in jedem Molekül je einen schnellen und einen langsamen Rückbindungspfad gebe, die bei Photolyse statistisch gleich besetzt werden. Der erste Puls erzeugt dann gleich viele langsame wie schnelle Rückbinder. Bei geeigneter Wahl der Verzögerungszeit photolysiert der zweite Puls bevorzugt diejenigen Moleküle, die schnell zurückgebunden haben und erzeugt zur Hälfte daraus langsame Rückbinder. Für *N(t)* vor dem zweiten Puls gilt dann

$$N^*(2)=N(2)+[1-N^*(1)] \cdot N(1),$$

und entsprechend folgt für *N(t)* vor dem dritten Puls

$$N^*(t)=N(3)+[1-N^*(1)] \cdot N(2) +[1-N^*(2)]N(1).$$

Vor dem *n*-ten Laserpuls erhält man

$$N^*(n)=N(n) + [1-N^*(1)]\, N(n-1) + [1-N^*(2)]\, N(n-2) \ldots$$

Abb. 21 zeigt Messungen von $1 - N^*(m)$ in Abhängigkeit von der Anzahl der Laserpulse m für MbCO bei T = 60 K für einen zeitlichen Abstand zwischen den Pulsen von 100 s. Die Anzahl der Proteine mit zurückgebundenen Liganden ist vor jedem Puls praktisch konstant, d.h., es liegt ein inhomogenes Ensemble von Proteinen vor.

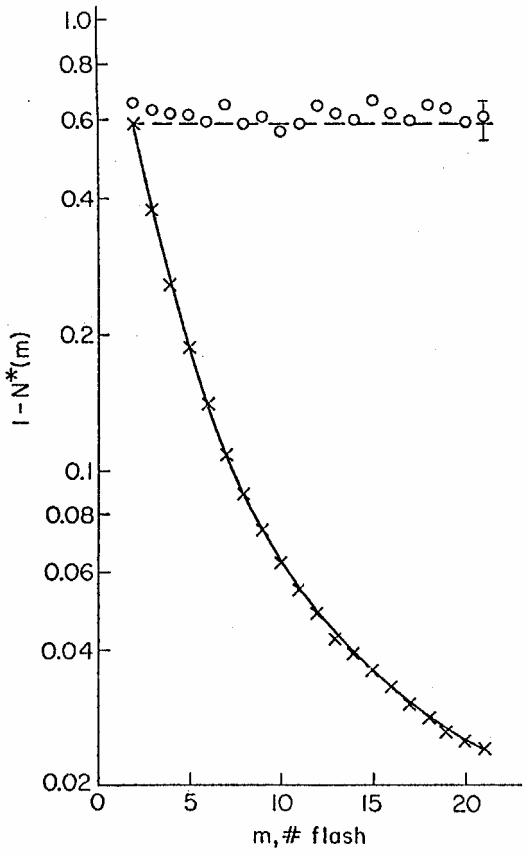


Abb. 21: Rückbindungskinetik: 1–*N in Abhängigkeit von der Anzahl der Laserpulse m. Messungen (o) und Vorhersage für ein homogenes Ensemble (x) von Proteinen.**

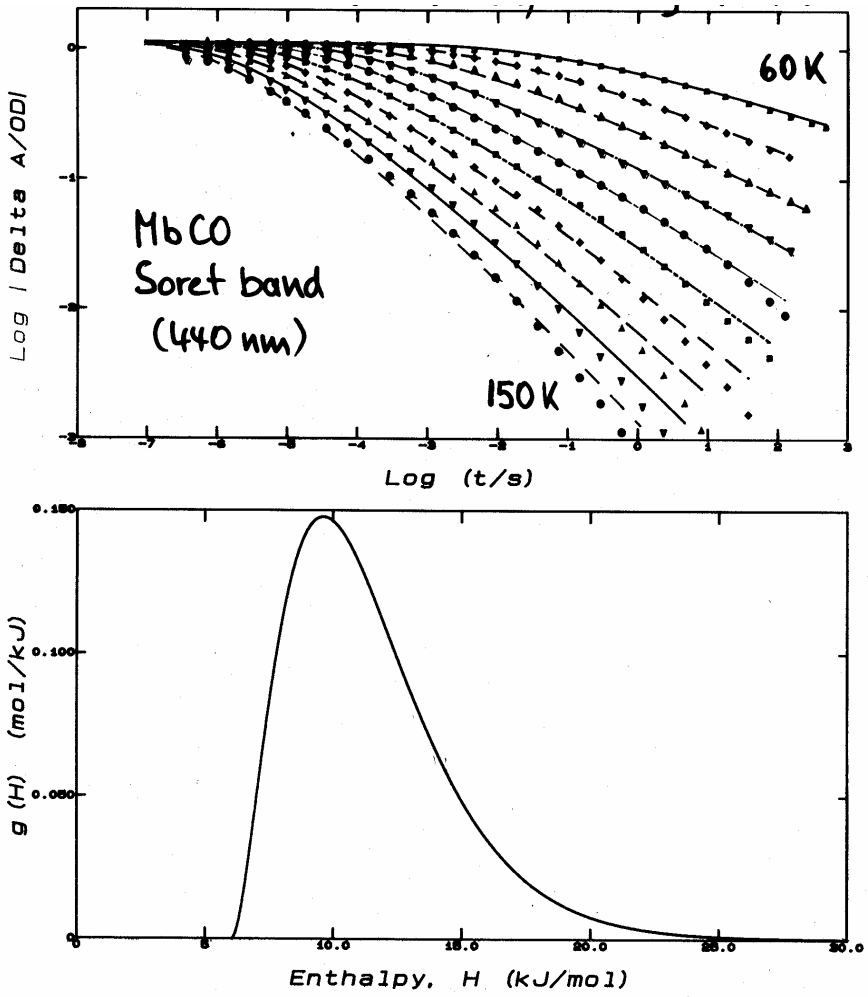


Abb. 22: Rückbindungskinetik von MbCO nach Blitzphotolyse bei Temperaturen zwischen 60 und 150 K (oben) und die daraus berechnete Verteilung der Enthalpiebarrieren.

Das nächste Beispiel zeigt Rückbindungskinetiken, die an der Soretbande (440 nm) von MbCO (in Glyzerin-Wasser) bei Temperaturen zwischen 60 und 150 K gemessen wurden (Abb. 22, oben). Aus den Rückbindungskinetiken, die sich mit

$$N(t) = \int g(H_{BA}) \exp\left(-k_{BA} \cdot t\right) dH_{BA}$$

berechnen lassen, wird die Verteilung der Barrierenhöhen mittels eines globalen Fits an die Messungen bei *allen* Temperaturen zwischen 60 und 150 K durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 22 (unten) zu sehen.

Spektrales Lochbrennen

Ein weiteres Verfahren, mit dem die Heterogenität von Biomolekülen untersucht werden kann, ist das spektrale Lochbrennen. Die elektronischen Absorptionsbanden von Chromophoren in Proteinen sind relativ breit, selbst wenn der Übergang eine lange Lebensdauer im S_1-Zustand hat. Sie setzen sich aus den homogenen Absorptionsbanden (Γ_H) der Proteine zusammen, die sich in der Probe befinden. Da die Chromophore in den Proteinmolekülen verschiedene Umgebungen haben, sind die homogenen Absorptionsbanden der Proteine verschieden, d.h., die Absorptionsbande des Ensembles ist inhomogen verbreitert (Γ_I) (Abb. 23).

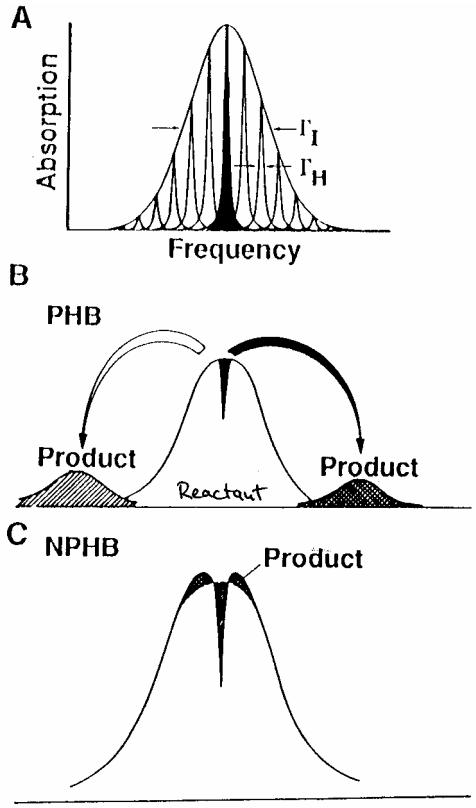


Abb. 23: Spektrales Lochbrennen: A: Inhomogene Verbreiterung der Absorptionslinie. B: Photochemisches Lochbrennen. C: Photophysikalisches Lochbrennen.

Wird ein schmalbandiger Laser in die Probe eingestrahlt, so werden die Photonen nur von denjenigen Proteinmolekülen absorbiert, die bei der entsprechenden Wellenlänge ihre Übergänge haben. Beim sogenannten photochemischen Lochbrennen entstehen nach der Lichtabsorption Photoprodukte, deren Absorptionsspektren relativ weit von der Laserwellenlänge entfernt sind. Beim photophysikalischen Lochbrennen kommt es zu kleinen strukturellen Änderungen in der Umgebung des Chromophors. Dadurch wird die Absorptionsbande der absorbierenden Proteine spektral leicht verschoben. Für beide Arten des Lochbrennens ist nach Einstrahlung des Lasers ein Minimum der Absorption (ein 'Loch') bei der Laserwellenlänge zu sehen. Abb. 24 zeigt die inhomogene Absorptionsbande von Myoglobin, bei dem das Häm durch das Protophorphyrin IX, ein Häm ohne Eisenatom, ersetzt ist.

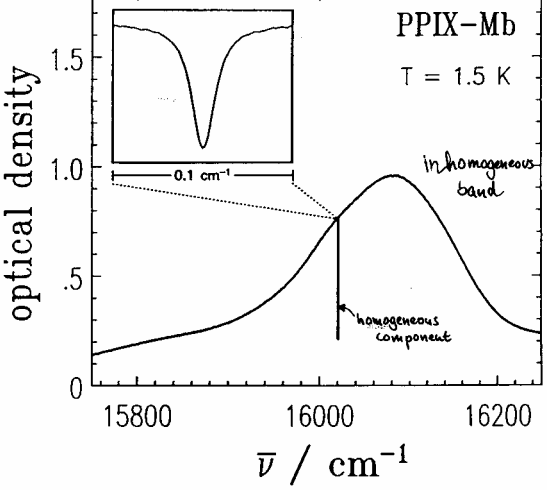


Abb. 24: Inhomogenes Absorptionsspektrum des PPIX-Mb bei 16000 cm^{-1} (1.5 K). Zum Vergleich ist die Linienbreite des homogenen Übergangs zu sehen.

Ebenfalls eingezeichnet ist die Lorentzlinie des homogenen Übergangs (ohne Beteiligung von Phononen). Dessen Linienbreite ist durch die Lebensdauer des angeregten Zustands nach der Heisenbergschen Unschärferelation gegeben, sie ist somit um Größenordnungen kleiner als die der inhomogenen Bande. Erfolgt die Absorption in höhere Phononenzustände, so sind die homogenen Linienbreiten aufgrund der kürzeren Lebensdauer der Phononen breiter.
Ist die Temperatur der Probe nach dem photophysikalischen Lochbrennen unterhalb der Glastemperatur, so bleibt das erzeugte Minimum in der Absorptionsbande erhalten, da die thermische Temperatur nicht ausreicht, die Potentialbarrieren zu überwinden (Abb. 25). Bei Temperaturen oberhalb der Glastemperatur heilen die Absorptionsbanden aus. Die dafür benötigte Zeit gibt Aufschluss über die Dynamik der Probe.

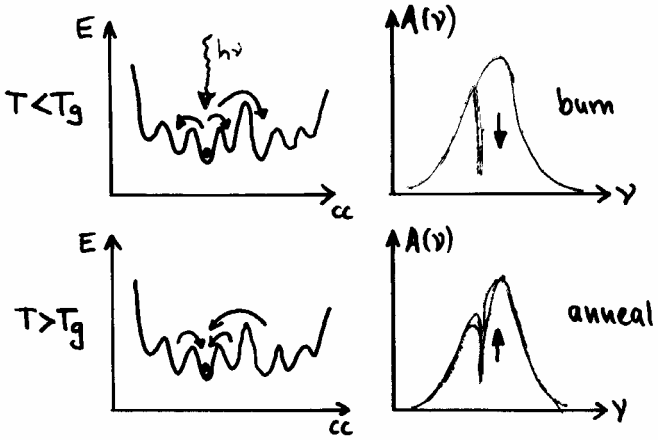


Abb. 25: Spektrales Lochbrennen: Oberhalb der Glastemperatur T_g wird das spektrale Loch in der Absorptionsbande 'ausgeheilt'.

Dies kann durch Messungen der Veränderung der Breite des spektralen Lochs der Absorptionsbande in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden. Dazu wird die Temperatur zyklisch verändert: Das spektrale Loch wird bei einer tiefen Temperatur T_L erzeugt. Dann wird die Probe auf eine bestimmte Temperatur T erwärmt und wieder auf T_L erniedrigt usw. Das Spektrum wird jeweils bei T_L aufgenommen. Somit ist der Beitrag der Phononen konstant und beeinflusst nicht die Änderung der Linienbreite des spektralen Lochs. Abb. 26 zeigt ein solches Experiment an Antennenpigmenten des Photosyntheseapparates, den sogenannten Phycobilisomen der Alge *Mastigocladus laminosus.*

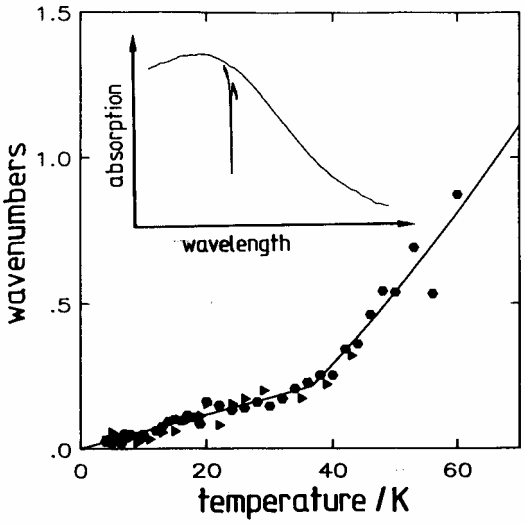


Abb. 26: Vergrößerung der Linienbreite eines spektralen Lochs, gemessen durch zyklisches Verändern der Temperatur. Die Brenntemperatur ist 4.2 K und die Laserwellenlänge 657 nm. Die Probe enthält Phycobilisomen in einem Zucker/Phosphat-Pufferglas. Ein Teil der inhomogen verbreiterten Absorptionslinie zwischen 650 und 665 nm ist ebenfalls gezeigt.

Die Vergrößerung der Linienbreite des Loches mit ansteigender Temperatur zeigt einen linearen Anstieg bis etwa 40 K, danach ist ein stärkerer Anstieg zu sehen. Zur Erklärung dieses Verhaltens wird das Potential des betrachteten Biomoleküls durch ein Zwei-Zustands-System beschrieben (Abb. 27). In diesem Modell kann der durch das Lochbrennen entvölkerte Zustand 2 durch Relaxation von Zustand 1 wieder besetzt werden, was eine Ausheilung des spektralen Loches zur Folge hat. Bei genügend niedrigen Temperaturen kann die Barriere nur durchtunnelt werden, d.h., der Anstieg bis 40 K ist durch die Tunnelwahrscheinlichkeit gegeben. Bei höheren Temperaturen kann die Barriere auch thermisch überwunden werden.

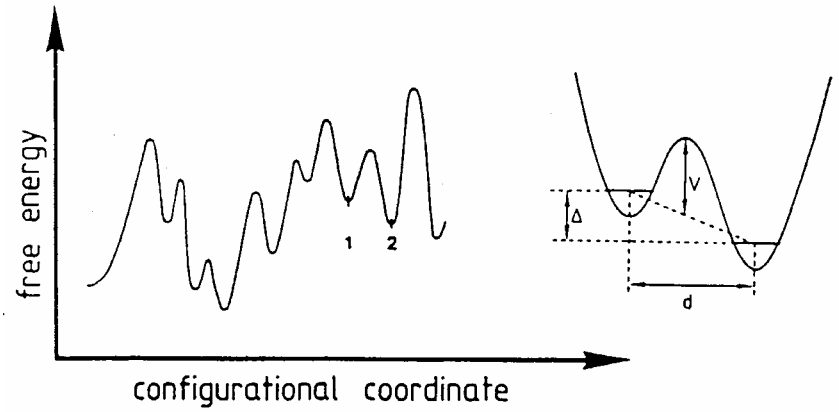


Abb. 27: Schnitt durch den Konfigurationsraum eines Proteins entlang einer fiktiven Koordinationskoordinate. Das einfachste Modell zur Untersuchung der Konformationsrelaxation ist ein Zwei-Zustands-Potential.

Die zeitliche Beobachtung der Absorptionsbande während der Ligandenrückbindung erlaubt ebenfalls Rückschlüsse auf die Dynamik von Proteinen. Betrachtet wird die Bande III von Deoxy-Myoglobin. Diese relativ schwache Absorption des 'high spin'-Eisens im Häm des Myoglobins tritt bei ungefähr 760 nm auf (Abb. 28).

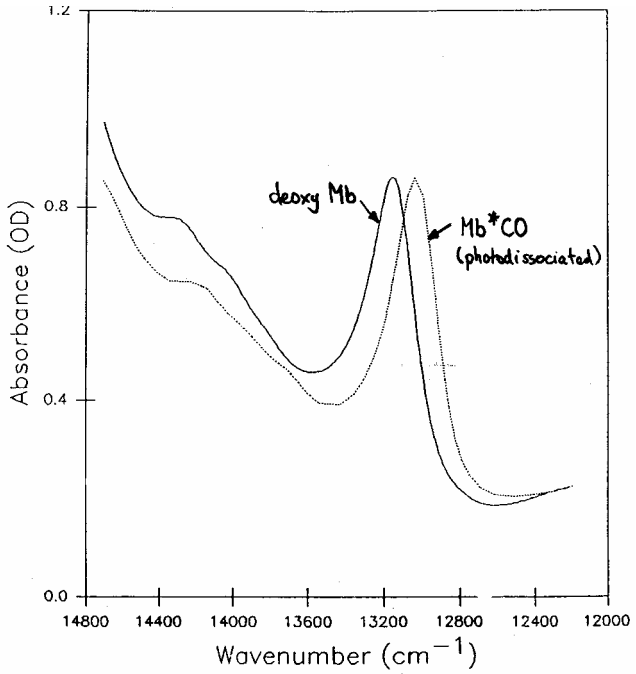


Abb. 28: Absorptionsspektrum der Bande III des Deoxy-Myoglobins und des photodissoziierten Mb*CO bei 5 K.

Diese Absorptionsbande fehlt beim ligandierten Myoglobin. Wird das MbCO bei tiefen Temperaturen (z.B. T = 5 K) photodissoziiert, so tritt diese Bande auf, aber die Struktur des Proteins um den Chromophor gleicht eher der des ligandierten Mb. Deshalb ist die Absorptionslinie verschoben (Abb. 28).
Die Bande III ist durch die Strukturheterogenität des Myoglobins verbreitert. Es zeigt sich, dass Übergänge mit kleinen Barrierenhöhen zur Linie bei niedrigen Frequenzen und Übergänge mit großen Barrierenhöhen zur Linie bei hohen Frequenzen beitragen (Abb. 29).

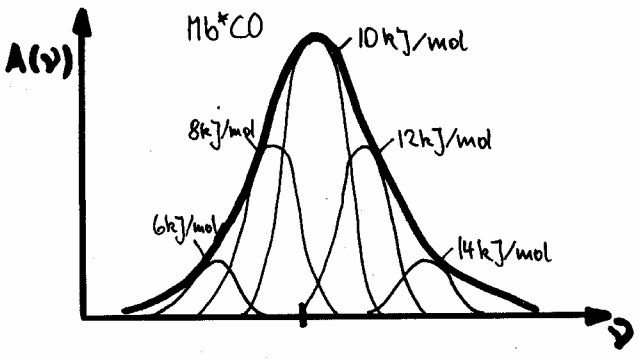


Abb. 29: Zusammensetzung der Absorptionsbande III des Deoxy-Myoglobins aus den Übergängen mit verschiedenen Barrierenhöhen.

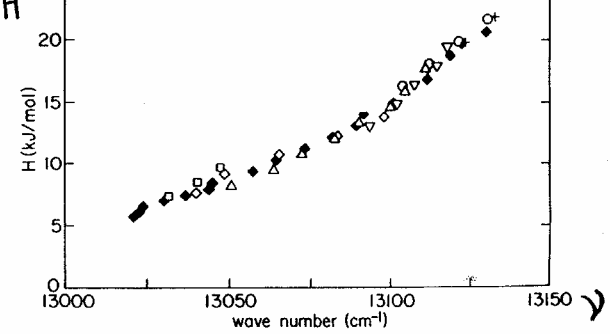


Abb. 30: Abhängigkeit der Barrierenhöhe *H* von der Frequenz der Absorptionsbande.

Die direkte Abhängigkeit der Enthalpie von der Absorptionswellenlänge ist in Abb. 30 aufgetragen. Es wird über einen relativ großen Bereich lineares Verhalten beobachtet. Da die Übergänge mit kleinen Barrierenhöhen schneller zurückbinden, beobachtet man das in Abb. 31 dargestellte zeitliche Verschwinden der Absorptionsbande III aufgrund der Rückbindung des CO.

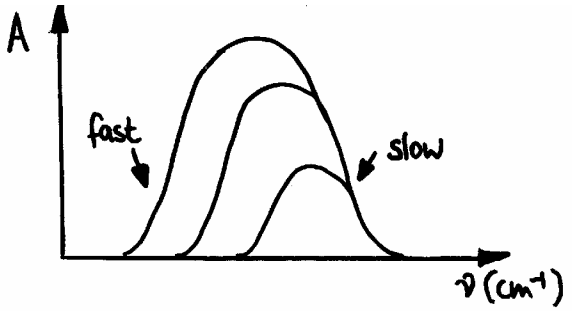


Abb. 31: Veränderung der Absorptionslinie der Bande III während der Rückbindung des CO.

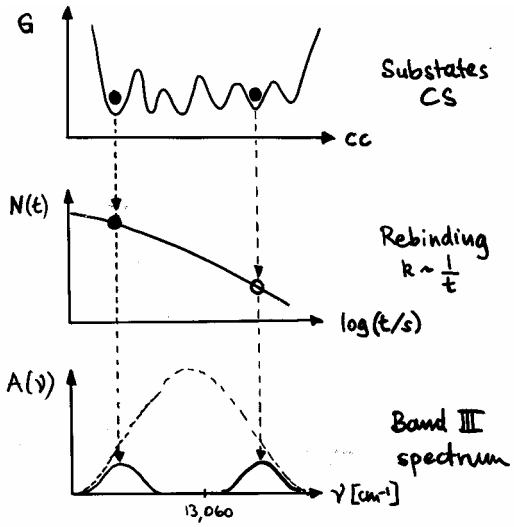


Abb. 32: Auswirkung der unterschiedlich schnellen Rückbindung des CO auf das Absorptionsspektrum.

Abb. 32 fasst den Vorgang des kinetischen Lochbrennens zusammen. Subzustände, die kleine Barrierenhöhen haben, binden schnell zurück. Sie absorbieren bei kleinen Frequenzen der Bande, so dass das Maximum der Absorptionsbande zu höheren Frequenzen wandert.

Erkundung der Energielandschaft der Proteine

Das Ziel vieler Arbeiten ist es, vereinfachende Prinzipien und generelle Eigenschaften der Energielandschaft von Biomolekülen zu finden. Es stellen sich beispielsweise folgende Fragen: Sind bestimmte Zustände stark oder schwach miteinander gekoppelt? Wie ist die Beziehung zwischen räumlicher Struktur und Energielandschaft? Wie sind die Dynamiken in der Energielandschaft zu beschreiben (nicht-exponentielle Relaxation)? Wie ist der Zusammenhang von Energielandschaft und Funktion der Proteine (Charakterisierung der funktionell relevanten Zustände)?
Experimente beweisen, dass die Zustände in Biomolekülen nicht alle energetisch gleichartig sind. Abb. 33 zeigt eine Hierarchie der Subzustände in MbCO. An diesem Protein wurde dieser Sachverhalt besonders intensiv untersucht.

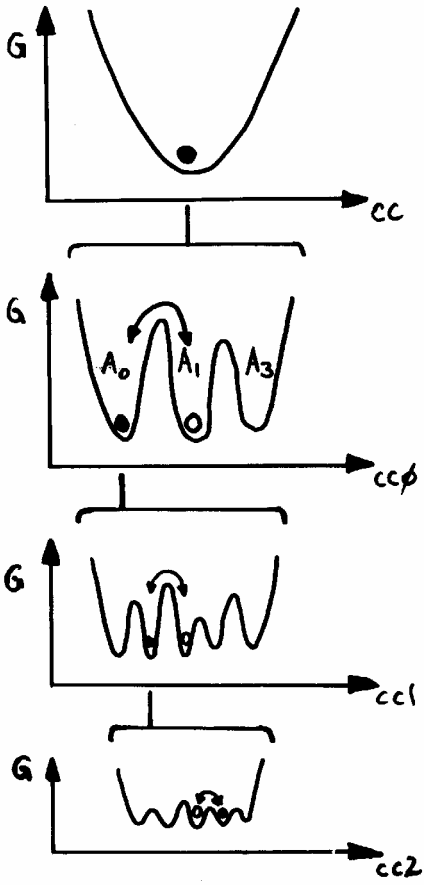


Abb. 33: Hierarchie von Zuständen beim MbCO.

In erster Näherung kann die Energielandschaft als Parabel angenähert werden. Genauer betrachtet zeigt sich, dass drei Subzustände (A_0, A_1 und A_3) existieren, die relativ gut separierte Zustände mit verschiedenen strukturellen Eigenschaften darstellen. Diese Subzustände sind wiederum unterteilt in Zustände mit kleineren Barrieren, welche ihrerseits aus Subzuständen bestehen. Da aufgrund dieser Hierarchie die Barrierenhöhen zwischen den Zuständen sehr verschieden sind, erhält man Übergänge bei sehr niedrigen Temperaturen (unter 1 K) bis hin zu hohen Temperaturen. Außerdem folgt daraus, dass die Rückbindung der Liganden nicht exponentiell ist. Die Zustände A_0, A_1 und A_3 lassen sich durch die Differenz-Fourier-Infrarotspektroskopie untersuchen. Abb. 34 zeigt das Differenzspektrum von MbCO (nicht ligandiertes minus ligandiertes MbCO) bei T = 12 K.

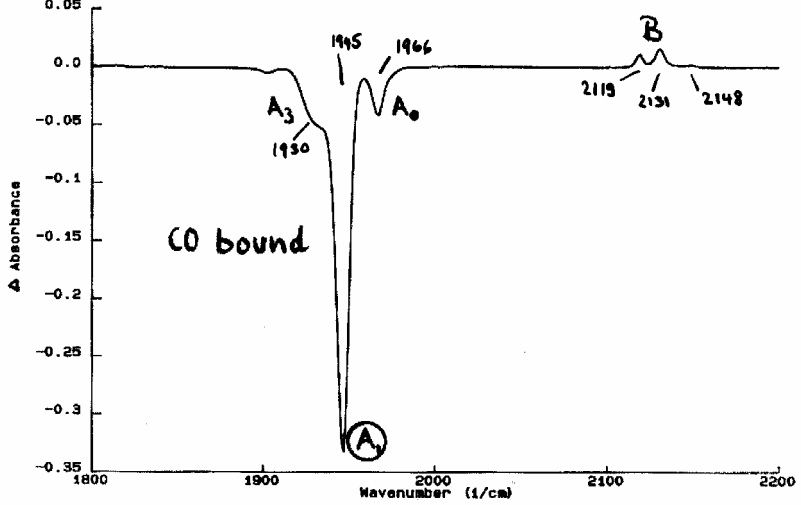


Abb. 34: Differenz FTIR-Spektrum von MbCO bei pH 7 und 12 K.

Ist das CO an das Myoglobin gebunden, so erhält man drei Absorptionsbanden um 1950 cm^{-1}. Wird das CO photolysiert, so befindet es sich aufgrund der niedrigen Temperatur in der Hämtasche. Es werden drei Absorptionsbanden im Bereich 2130 cm^{-1} gemessen. Die genaue Position der Bande reflektiert die Protein-Liganden-Wechselwirkung. Die relative Population der A Subzustände hängen von äußeren Parametern (T, p, pH, Hydration) ab. Diese drei A-Subzustände zeigen ein unterschiedliches kinetisches Verhalten. Abbildung 35 stellt das Rückbindungsverhalten von MbCO für die Zustände A_0, A_1 und A_3 bei tiefen Temperaturen dar.

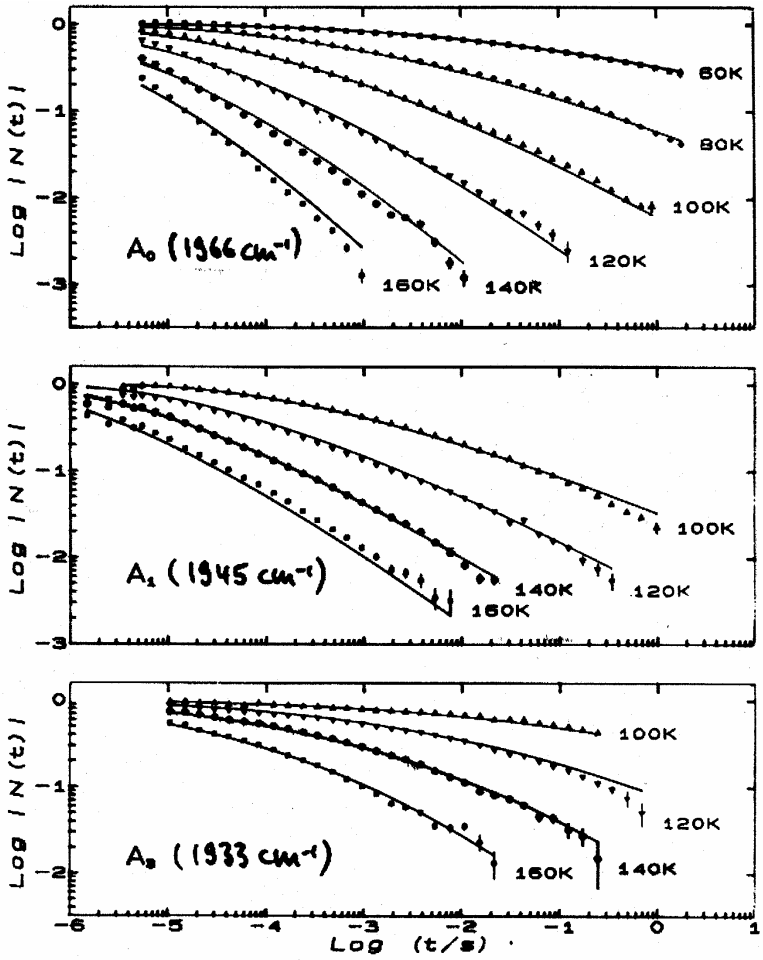


Abbildung 35: Rückbindungskinetiken der A_0, A_1 und A_3 –Zustände von MbCO bei tiefen Temperaturen.

Es folgt aus der Abbildung, dass der Zustand A_0 schneller zurückbindet als die Zustände A_1 und A_3. Dies ist explizit in Abb. 36 für T = 120 K für A_0, A_1 und A_3 aufgetragen.

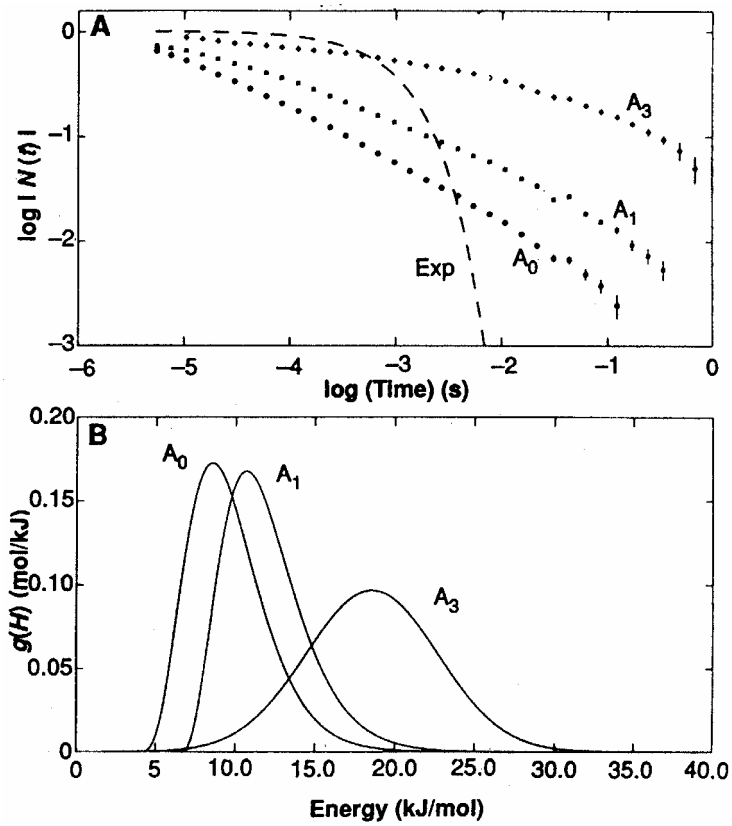


Abb. 36: Rückbindungskinetiken von MbCO für A_0, A_1 und A_3 bei 120 K (oben). Berechnete Verteilung der Barrierenhöhen für A_0, A_1 und A_3.

Ebenfalls eingezeichnet ist eine Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstanten von einer Millisekunde. Die untere Graphik von Abb. 36 zeigt die aus den Rückbindungskinetiken bei den verschiedenen Temperaturen durch einen globalen Fit erhaltenen Verteilungen der Barrierenhöhen der Enthalpie. Es gilt

$$N(t) = \int dH\, g(H)\, \exp\left(-k(H)t\right),$$

mit

$$k(H) = A\frac{T}{T_0}\exp\left(-H/RT\right).$$

Man erhält also verschiedene *g(H)*-Verteilungen und Arrhenius-Vorfaktoren *(A)* für die A_0, A_1 und A_3 –Zustände. Aus den Flächen der Banden lassen sich die relativen Populationen der A-Zustände bestimmen. Diese hängen sowohl von der Temperatur als auch vom Druck ab. Abb. 37 zeigt den Logarithmus des Verhältnisses A_0 zu A_1 für Pottwal-MbCO (swMbCO) in Abhängigkeit von der Temperatur für verschiedene Drücke und pH-Werte.

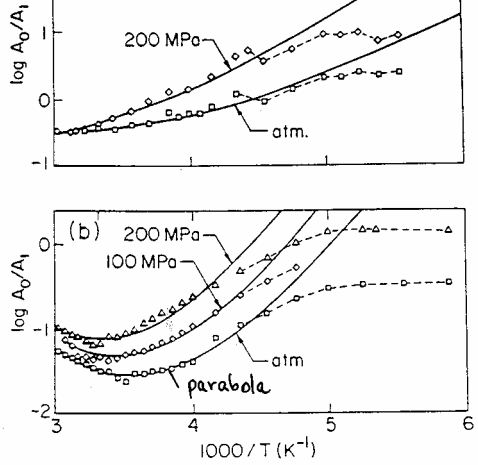


Abb. 37: Logarithmus des Verhältnisses der Flächen von A_0 zu A_1 für die CO-Streckschwingung in swMbCO (in 75% Glyzerin/Wasser) bei pH 5.5 (a) und pH 6.6 (b) als Funktion von 1000/T für verschiedene Drücke.

Bei höherem Druck wird der A_0-Zustand gegenüber dem A_1-Zustand für beide pH-Werte bevorzugt. Bei pH 6.6 können vier Bereiche unterschieden werden. Bei niedrigen Temperaturen ($T < 200$ K, Glasbereich) ist das A_0/A_1 Verhältnis konstant, da die Subzustände eingefroren sind. Danach folgt ein Übergangsgebiet bis ungefähr 300 K; A_0/A_1 nimmt mit ansteigender Temperatur ab. Anschließend ist ein ansteigendes A_0/A_1 Verhältnis zu beobachten. Oberhalb von ~200 K können die Proteinmoleküle zwischen den verschiedenen A-Zuständen auf der Zeitskala der Messung (~1000 s) fluktuieren, d.h., sie befinden sich im Gleichgewicht. Zur quantitativen Auswertung der Temperaturabhängigkeit der A-Zustandspopulation wird ein Zwei-Zustands-Modell betrachtet (Abb. 38).

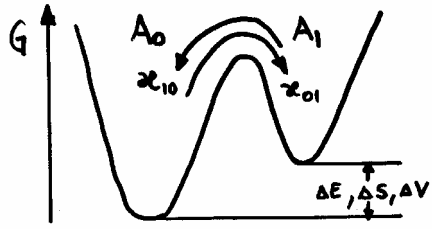


Abb. 38: Zwei-Zustands-System zur Berechnung der Temperaturabhängigkeit des A_0/A_1-Verhältnisses.

Da bei hinreichend hohen Temperaturen κ_{01} und κ_{10} schnell im Vergleich zu den experimentellen Zeitskalen sind, befindet sich das Populationsverhältnis im Gleichgewicht:

$$\frac{A_0}{A_1} = \exp[-\Delta G / RT]$$
$$= \exp[-(\Delta E + P\Delta V - T\Delta S)/RT] .$$

Experimentell beobachtet man in Proteinen einen linearen Anstieg von c_p mit T. Mit

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{c_p}{T} dT$$

folgt

$$S(T) = a + b \ln \frac{T}{T_0} + C \frac{T}{T_0} \approx S(0) + \frac{\partial S}{\partial T} T .$$

Bei konstantem Druck gilt

$$\Delta G(T) = \Delta E(0) - \int_0^T S(T) dT .$$

Somit ergibt sich mit $s = \frac{\partial S}{\partial T}$:

$$\Delta G(T) = \Delta E(0) - T\Delta S(0) - \frac{1}{2} sT^2 .$$

Aufgrund von $\log(A_0 / A_1) \sim -\Delta G / T$ und obiger Gleichung folgt, dass bei der Auftragung in Abb. 37 (x-Achse ~ 1/*T*) folgende Abhängigkeit zu erwarten ist: $y = \log(A_0 / A_1) = ax + b + c/x$, mit den Konstanten a, b und c.
Mit folgendem Experiment kann gezeigt werden, dass bei Temperaturen unterhalb von etwa 200 K keine Gleichgewichtsbedingungen herrschen. Die MbCO-Probe wird vom Ort 0 in der T-P-Ebene zu dem Ort FP (bzw. PF) auf zwei verschiedenen Wegen geführt (siehe Abb. 39). Dabei werden die Spektren der CO-Schwingungsbanden verglichen.

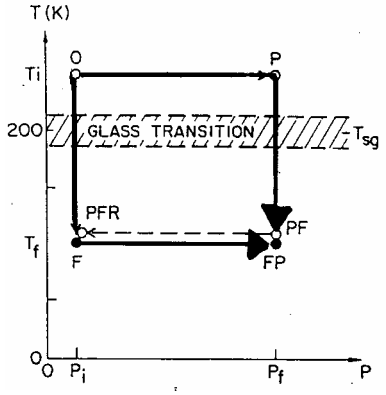


Abb. 39: Das Protein wird von einem Anfangszustand zu einem Endzustand auf verschiedenen Wegen geführt.

Am Ausgangzustand (Endzustand) herrscht die Temperatur T_i = 225 K (T_f = 100 K) und der Druck p_i = 0.1 MPa (p_f = 200 MPa). Bei dem ersten Experiment wird zuerst der Druck erhöht und dann die Temperatur erniedrigt (0, P, PF), bei dem zweiten Experiment wird zuerst die Temperatur erniedrigt und dann der Druck erhöht. Im Gleichgewicht sind die Eigenschaften des Proteinensembles für PF und FP gleich. Das Ergebnis der Infrarotspektren für PF und FP zeigt, dass kein Gleichgewicht, sondern Metastabilität vorliegt (Abb. 40).

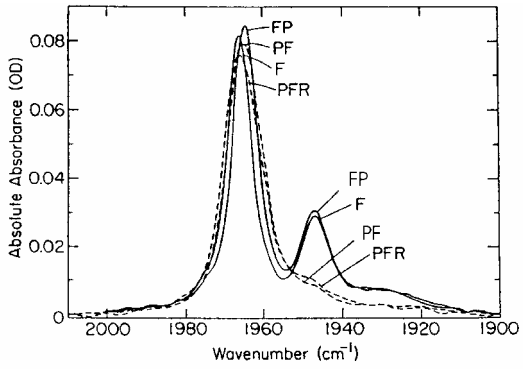


Abb. 40: MbCO-Streckspektren, die an verschiedenen in Abb. 39 gekennzeichneten Stellen aufgenommen wurden. Die Probe ist swMbCO in 75% Glyzerin/Wasser.

Bei höherem Druck wird, wie in Abb. 37 zu sehen, der A_0-Zustand bevorzugt, d.h. die A_1-Bande wird kleiner. Dies trifft aber nur zu, falls die Druckerhöhung bei Temperaturen erfolgt, auf denen das System Gleichgewicht einstellen kann (PF). Wird zuerst die Temperatur erniedrigt und dann der Druck erhöht, so ändert die Druckerhöhung das Spektrum nicht.

Temperaturderivative Spektroskopie

Eine alternative Methode für die Untersuchung der Rückbindungsbarrieren von Proteinen stellt die temperaturderivative Spektroskopie (TDS) dar (Abb. 41).

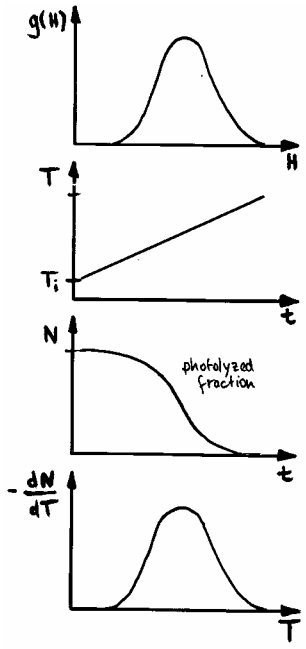


Abb. 41: Schema der TDS.

Zur Bestimmung der Verteilung der Enthalpiebarrieren g(H) wird die Probe am Zeitpunkt $t = 0$ bei der Temperatur T_i photolysiert. Die Temperatur wird daraufhin kontinuierlich gemäß

$$T = T_i + \beta t$$

erhöht und die Spektren während einer gewissen Zeitspanne (z.B. 100 s) gemessen. Typische Werte für β sind 0.3 K/min. Wird nun eine bestimmte Bande betrachtet, so erhält man für die Rückbindungskinetik *N(t)* Kurven, die ähnlich der in Abb. 41 dargestellten sind. Die Ableitung von *N(t)* nach der Temperatur erhält man aus Messungen bei zwei nachfolgenden Temperaturen durch Berechnung des Differenzenquotienten. Diese Größe ist nun mittels der sogenannten Auflösungsfunktion mit der Barrierenhöhenverteilung verknüpft. Der Zusammenhang kann wie folgt hergeleitet werden. Es wird ein Prozess erster Ordnung angesetzt,

$$\frac{dN}{dt} = -kN \ .$$

Daraus folgt

$$N = N_i \exp\left[-\int_0^t k dt' \right] ,$$

da *k* von der Temperatur und diese wiederum von der Zeit abhängt. Mittels Differentiation ergibt sich

$$\frac{dN}{dt} = -kN_i \ \exp\left[-\int_0^t k \ dt' \right] .$$

Wird *t* durch *T* substituiert ($dt = \frac{dT}{\beta}$), so folgt

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{N_i}{\beta} k \exp\left[-\int_{T_i}^{T} \frac{k}{\beta} dT' \right] = -\frac{N_i}{\beta} k \exp[-\theta] \ ,$$

wobei die Auflösungsfunktion ($k \exp[-\theta]$) eingeführt wurde. Der Ratenkoeffizient soll durch die Arrhenius-Beziehung gegeben sein,

$$k = A \frac{T}{T_o} \exp[-H / RT] \ .$$

Daraus folgt

$$\theta = \frac{AT_0}{\beta} \left[\left(\frac{T}{T_0} \right)^2 E_3 \left(\frac{H}{RT} \right) - \left(\frac{T_i}{T_0} \right)^2 E_3 \left(\frac{H}{RT_i} \right) \right],$$

wobei gilt

$$E_m(x) = \int_1^{\infty} \frac{e^{-xt}}{t^m} dt \ .$$

Dies kann wie folgt hergeleitet werden: Aus

$$I = \int_{T_i}^{T} \frac{k}{\beta} dT' = \int_{T_i}^{T} \frac{A}{\beta} \frac{T'}{T_0} e^{-H/RT'} dT'$$

folgt mit der Substitution $T' = \frac{1}{x}$:

$$I = -\frac{A}{\beta T_0} \int_{1/T_i}^{1/T} \frac{1}{x} e^{-\alpha x} \frac{dx}{x^2} = -\frac{A}{\beta T_0} \left[\int_{1/T_i}^{\infty} \frac{1}{x^3} e^{-\alpha x} dx - \int_{1/T}^{\infty} \frac{1}{x'^3} e^{-\alpha x'} dx' \right],$$

wobei $\alpha = H / R$ verwendet wurde. Durch nochmalige Substitution $t = T_i x$ bzw. $t = T x'$ erhält man

$$I = \frac{A}{\beta T_0} \left[T^2 \int_1^{\infty} \frac{e^{-\left(\frac{H}{RT}\right)t}}{t^3} dt - T_i^2 \int_1^{\infty} \frac{e^{-\left(\frac{H}{RT_i}\right)t}}{t^3} dt \right], \text{ q.e.d.}$$

Nach Einführung der Enthalpieverteilung folgt

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{N_i}{\beta} \int_0^{\infty} k e^{-\theta} g(H) dH \ .$$

Dies bedeutet, dass *dN(T)/dT* im Wesentlichen gleich der mit der Auflösungsfunktion gemittelten Enthalpieverteilung ist. Die Auflösungsfunktion ist in Abb. 42 dargestellt. Sie entspricht *dN(T)/dT* für eine δ-Funktion als Enthalpieverteilung: $g(H) = \delta (H - H_0)$.

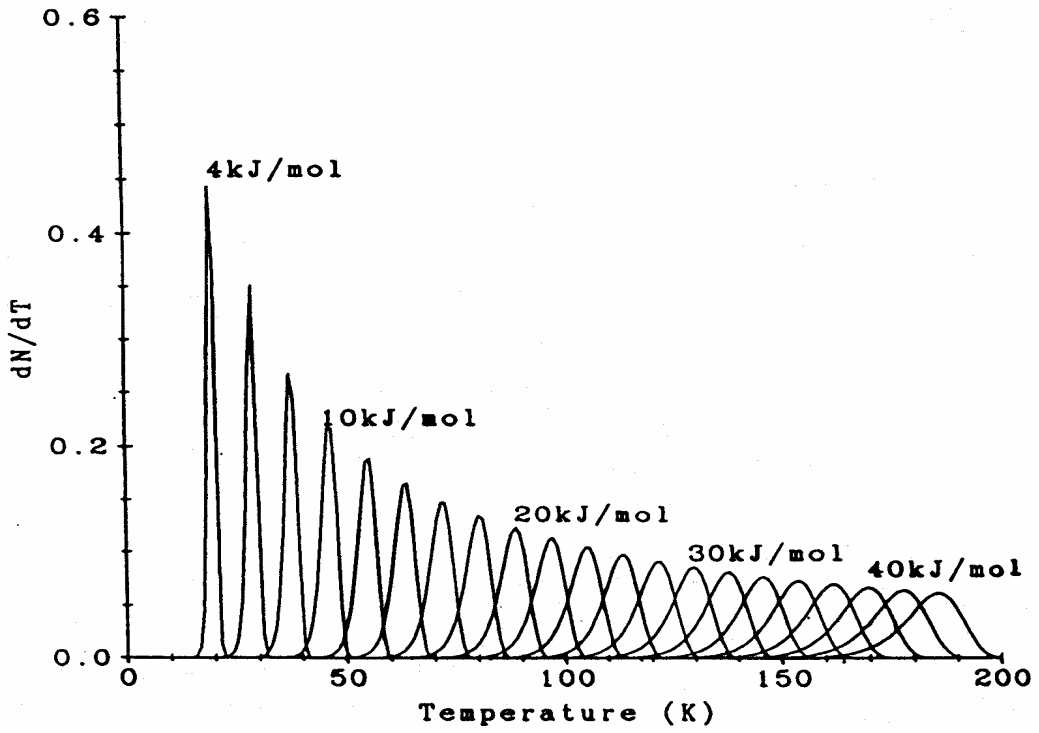


Abb. 42: TDS-Verlauf für verschiedene Werte von H_0 (4, 6,..., 44 kJ/mol). Für die Rechnungen wurden A = $10^{8.8}$ s^{-1}, T_0 = 100 K, β = 3.125 mK/s verwendet.

Die Auflösungsfunktion verbreitert sich kontinuierlich mit der Temperatur. Bei niedrigen Temperaturen ist der Unterschied zwischen *dN/dT* und *g(H)* also geringer.

Wird

$$\frac{d^2N}{dt^2} = 0$$

($N = N_i \exp[-\int k dt]$) gesetzt, so folgt $dk/dt = k^2$, wobei *k* durch die Arrheniusbeziehung gegeben ist. Daraus folgt für die Peaktemperatur

$$T_p = \frac{H}{R\ln(A\tau_c)} ,$$

mit der charakteristischen Zeit

$$\tau_c = \frac{RT_p^3}{\beta T_0 (H + RT_P)} .$$

Die Größe τ_c hängt also selbst von *H* ab. Allerdings geht sie nur logarithmisch in den Ausdruck für T_p ein. Daraus resultiert, dass die Temperaturachse ungefähr proportional zur Enthalpiebarriere ist.

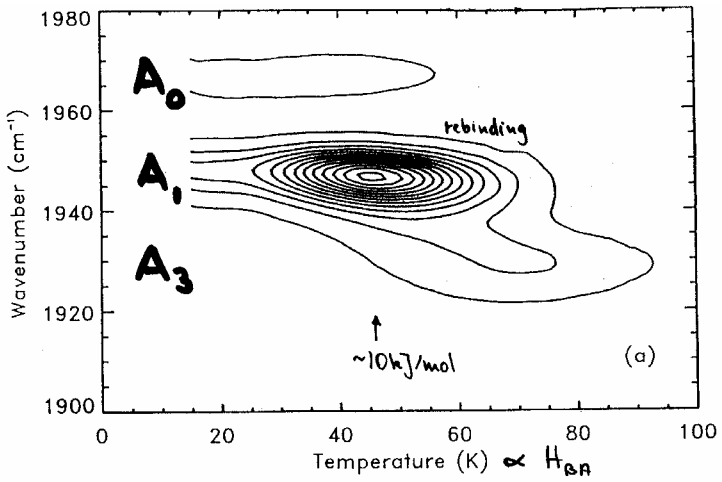


Abb. 43: TDS-Konturplots der A-Banden für Pottwalmyoglobin bei pH 6.6.

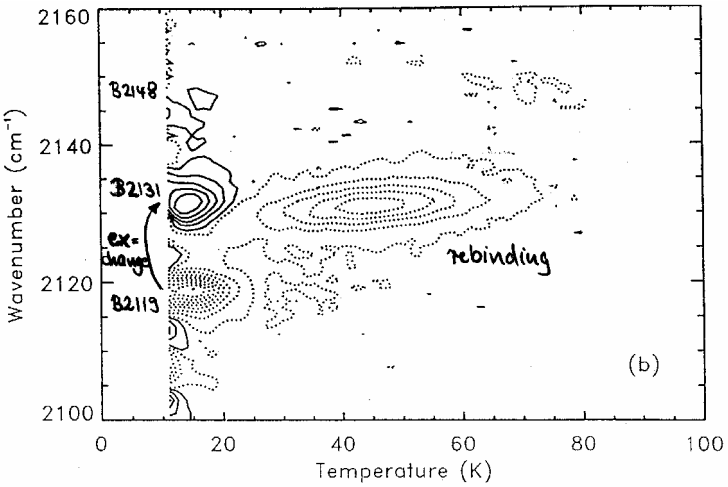


Abb. 44: TDS-Konturplots der B-Banden für Pottwalmyoglobin bei pH 6.6.

Abb. 43 und 44 zeigen TDS-Konturplots (*dN/dT*) von Pottwal-MbCO bei pH 6.6 für die A-Banden bzw. B-Banden. Die durchgezogenen Linien stellen eine Zunahme der Bande, die gestrichelten eine Abnahme dar. Man beobachtet, dass die Zunahme der A_1-Bande stark ausgeprägt ist und ein Maximum bei 46 K hat. Diese Temperatur entspricht einer Enthalpiebarrierenhöhe von ungefähr 10 kJ/mol. Die maximale Zunahme der A_0-Bande tritt dagegen schon bei Temperaturen um 40 K auf, die Verteilung der Barrieren ist also zu kleineren Werten hin verschoben. Für die A_3-Bande ist das Maximum bei ungefähr 70 K, und somit ist die Rückbindung aufgrund der entsprechend hohen Enthalpiebarrieren langsamer als bei den anderen beiden A-Zuständen. Die Zunahme der Population der A-Zustände ist mit einer entsprechenden Abnahme der B-Zustände verbunden. Es tritt aber auch ein Austausch der B-Zustände untereinander (von B2119 nach B2131) bei Temperaturen von 10 bis 20 K auf (Interkonversion), siehe Abb. 44. Das CO-Molekül dreht sich dabei in der Hämtasche. Detaillierte Informationen zum Zusammenhang der beteiligten Subzustände sind in Abb. 45 zu sehen.

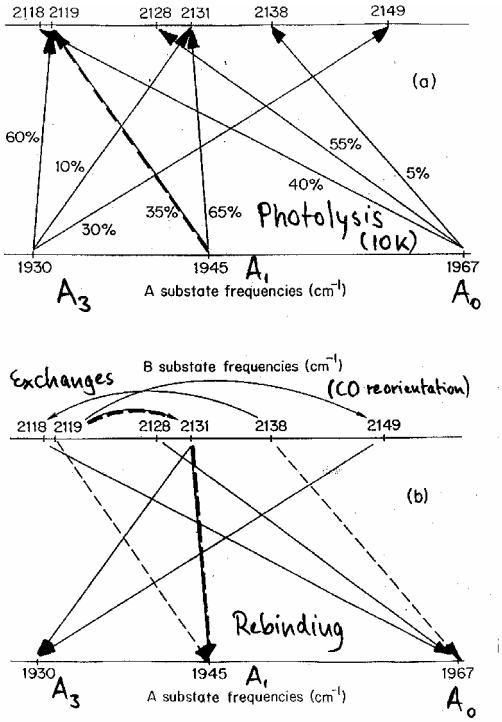


Abb. 45: Ent- bzw. Bevölkerung der A- und B-Banden bei Photolyse (oben) und Rückbindung (unten).

Die A-Zustände zeigen erst oberhalb ~160 K Interkonversionen. In Abb. 46 ist die Interkonversion zwischen dem A_1- und dem A_3-Zustand und dem A_0- und dem A_1- bzw. A_3-Zustand in Abhängigkeit von der Temperatur zu sehen.

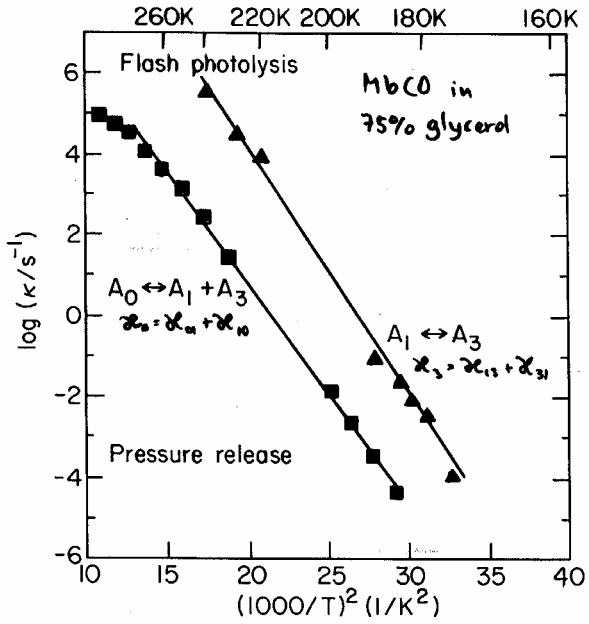


Abb. 46: Übergangsraten für die Interkonversion der A-Zustände.

Der Übergang $A_1 \leftrightarrow A_3$ ist aufgrund der kleineren Barrierenhöhen schnell im Vergleich zu dem Übergang $A_0 \leftrightarrow A_1$ (bzw. A_3). Die Übergangsrate lässt sich wie folgt beschreiben

$$\kappa = A \cdot \exp\left[-E^2/(RT)^2\right] .$$

Sie ist stark von der Lösungsmittelviskosität abhängig. (Abb. 47) zeigt die Rückbindungskinetik für den A_0- und den A_1-Zustand bei Temperaturen zwischen 230 und 260 K.

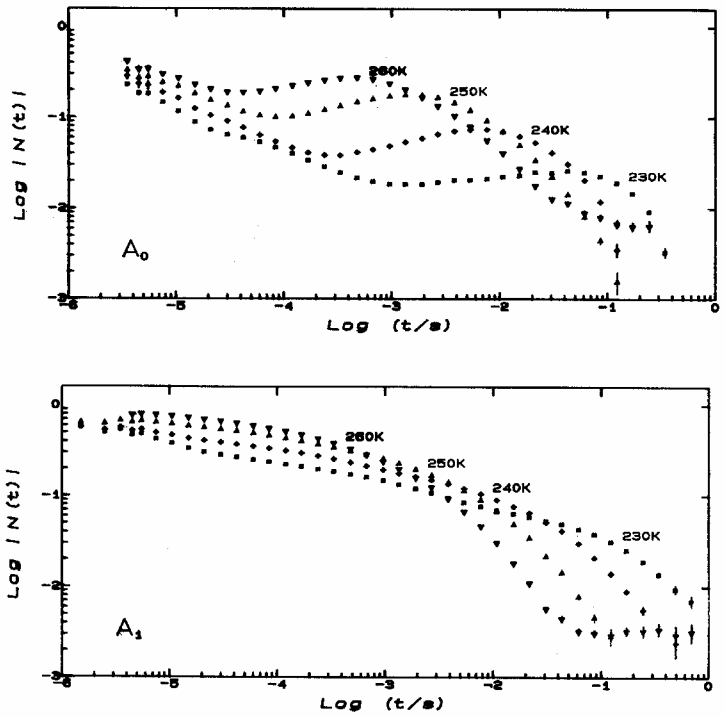


Abb. 47: Rückbindungskinetiken der A_0- (oben) und A_1-Zustände (unten) von MbCO zwischen 230 und 260 K.

Der Anstieg von *N(t)* im A_0-Zustand kommt dadurch zustande, dass die A_0-Zustände, die bei kleinen Zeiten aufgrund der schnellen Rückbindung stärker bevölkert sind als die A_1-Zustände, in die A_1-Zustände konvertieren. Die Rückbindungskinetiken von $N_0(t)$ und $N_1(t)$ können wie folgt beschrieben werden,

$$N_0(t) = \int d\log\lambda \left[f_0(\lambda) - f_e(\lambda)\right] e^{-\lambda t} ,$$

$$N_1(t) = \int d\log\lambda \left[f_1(\lambda) + f_e(\lambda)\right] e^{-\lambda t} ,$$

wobei f_0 bzw. f_1 die Ratenverteilungen für die Rückbindung aus der Tasche bzw. aus der Umgebung nach A_0 bzw. A_1 und f_e die für den Austausch zwischen A_0 und A_1 darstellen. Diese können aus einem globalen Fit ('global maximum entropy method') an beiden Kurven ermittelt werden (Abb. 48).

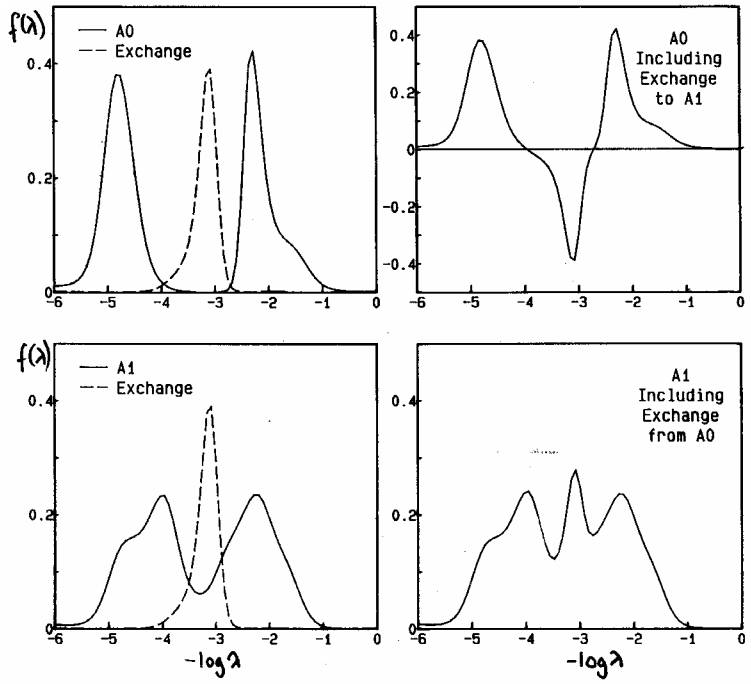


Abb. 48: Verteilungsfunktionen *f* für A_0 und A_1.

Aus diesen Verteilungen kann der Ratenkoeffizient ermittelt werden. Der oben dargestellte Sachverhalt kann auch anhand der Absorptionsspektren dargestellt werden (Abb. 49).

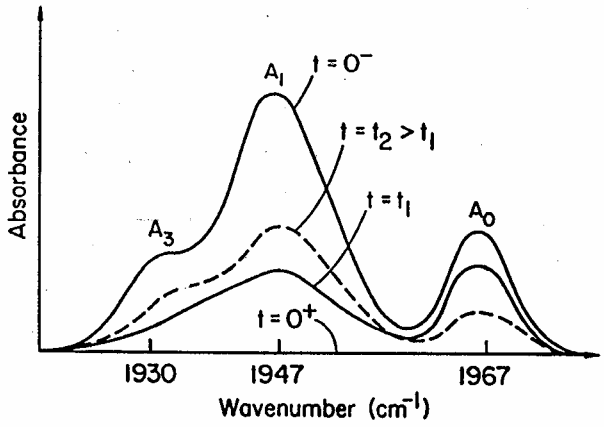


Abb. 49: Infrarot-Absorptionspektren von MbCO bei verschiedenen Zeitpunkten vor/nach der Photolyse.

Vor der Photolyse ist die Ligandenbindung maximal ($t = 0^-$), während sie kurz nach der Photolyse Null ist ($t = 0^+$). Bei Zeiten, die kleiner sind als die Übergangszeit von A_0 zu A_1, nimmt durch die schnellere Rückbindung von A_0 dessen Absorption stärker zu als bei den anderen Zuständen. Schließlich sorgt bei Zeiten größer als die Übergangszeit von A_0 zu A_1 diese Konversion dafür, dass die Absorption von A_0 ab- und die der anderen Zustände zusätzlich zunimmt. Der Ratenkoeffizient der Interkonversion von A_0 nach A_1 kann auch mit einem Drucksprungexperiment bestimmt werden (Abb. 50).

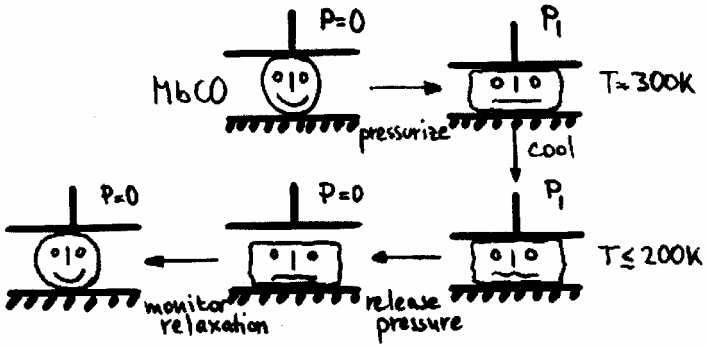


Abb. 50: Schema eines Drucksprungexperiments zur Bestimmung der Interkonversion von A_0 und A_1 bei MbCO

Das MbCO-Protein wird bei T = 300 K von einem niedrigen Druck in einen hohen Druck von z.B. 200 MPa gebracht. Dadurch wird, wie oben beschrieben, der A_0-Zustand bevorzugt. Danach wird die Probe auf Temperaturen unter 200 K abgekühlt, und anschließend wird der Druck plötzlich wieder abgesenkt. Während dieses Drucksprungs werden FTIR-Spektren aufgenommen. Für die Fläche der Absorptionsbande des A_0-Zustands erhält man schematisch die in Abb. 51 dargestellte Relaxationskurve.

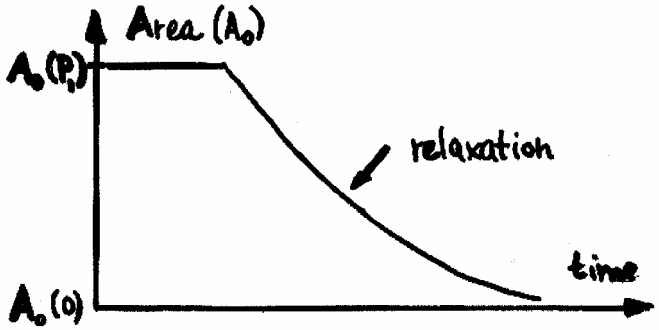


Abb. 51: Relaxation des A_0-Zustands während eines Drucksprungs.

Aus der normalisierten Relaxationsfunktion $\Phi(t)$ lässt sich der Ratenkoeffizient der Interkonversion bestimmen,

$$\Phi(t) = \frac{A_0(t) - A_0(\infty)}{A_0(0) - A_0(\infty)} = e^{-(\kappa_0 t)^\beta} .$$

Abb. 52 zeigt quantitative Spektren aus FTIR-Messungen der Streckschwingungen von MbCO in 75% Glyzerin bei pH 6.6.

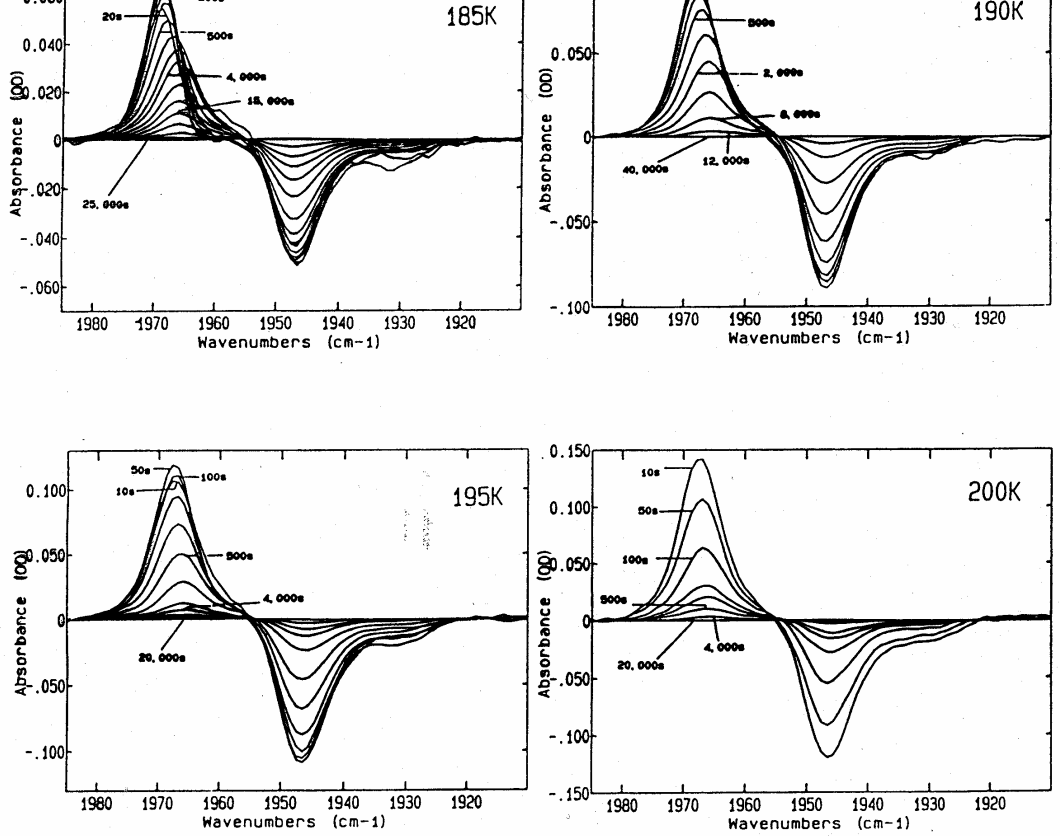


Abb. 52: FTIR-Spektren der A-Banden von MyCO bei einem Drucksprung von 200 auf 25 MPa. Spektren für T= 185, 190, 195 und 200 K und für verschiedene Zeiten nach dem Drucksprung sind zu sehen.

Die Relaxation des A_0-Zustands in den A_1-Zustand ist bei tiefen Temperaturen (z.B. T = 185 K, nahe der Glastemperatur) sehr langsam. Für höhere Temperaturen steigt die Relaxationsrate an.

Abhängigkeit der Myoglobin-A-Subzustände vom pH-Wert

Die Spektren der CO-Streckschwingung des MbCO sind stark vom pH-Wert abhängig. Dies ist für Pottwal-Myoglobin in Abb. 1 zu sehen. Die Besetzung des A_0-Zustands nimmt mit höherem pH-Wert ab, während die Besetzungen der A_1- und A_3-Zustände zunehmen. Außerdem ist eine Verschiebung des Maximums der A_1- und A_3-Zustände zu kleineren Frequenzen für ansteigende pH-Werte zu beobachten. Abb. 1 (unten) zeigt die Basisspektren bei hohem, mittlerem und niedrigem pH-Wert, aus denen die gemessenen Spektren mittels Linearkombination erhalten werden können.

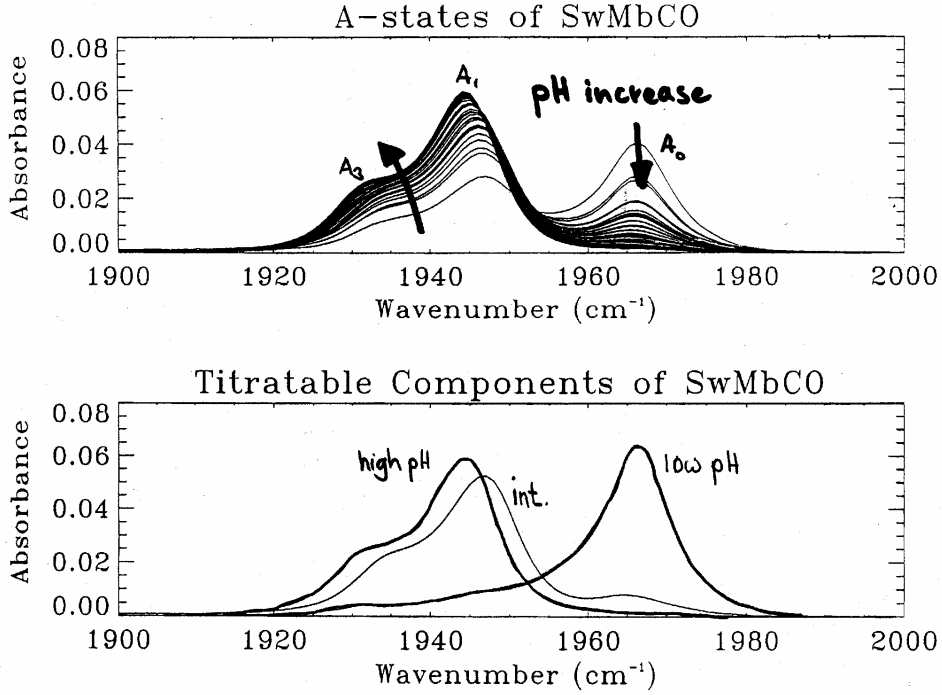


Abb. 1: CO-Streckschwingungs-Spektren von Pottwal-MbCO für den pH-Bereich von 4.2 bis 9.5 (oben). Basisspektren der verschiedenen Protonierungszustände (unten).

In diesem Abschnitt wird die quantitative Analyse der pH-Abhängigkeit der Infrarotspektren diskutiert. Die pH-abhängigen Effekte werden durch Protonierung der beiden Histidin-Seitengruppen nahe am CO, H64 (distales Histidin) und H97 (proximales Histidin), verursacht. Dies folgt aus Infrarotspektren von Mutanten, bei denen ein Histidin durch eine nicht-protonierende Aminosäure ersetzt wurde. Abb. 2 zeigt die CO-Spektren für Myoglobin, bei dem das H97 durch Phenylalanin ausgetauscht wurde. Die Spektren sind ähnlich denen des nativen Proteins, jedoch ist keine spektrale Verschiebung des A_1- und A_3-Zustands zu beobachten. Außerdem schneiden sich die Kurven in einem Punkt (isosbestischer Punkt). Dies deutet darauf hin, dass nur eine einzige Protonierungsreaktion das Spektrum beeinflusst. Aus dieser Messung folgt also, dass die Protonierung von H97 für die spektrale Verschiebung verantwortlich ist. Wird hingegen das H64 durch ein Valin (nicht protonierend) ersetzt, so erhält man das in Abb. 3 gezeigte CO-Streckschwingungsspektrum.

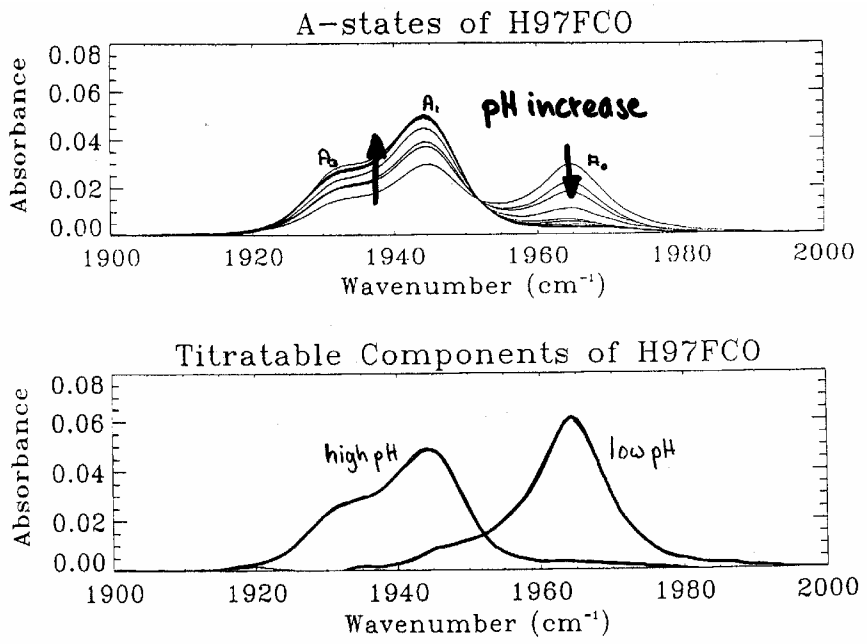


Abb. 2: CO-Streckschwingungs-Spektren von H97F-MbCO im pH-Bereich von 4.2 bis 9.5 (oben). Basisspektren der verschiedenen Protonierungszustände (unten).

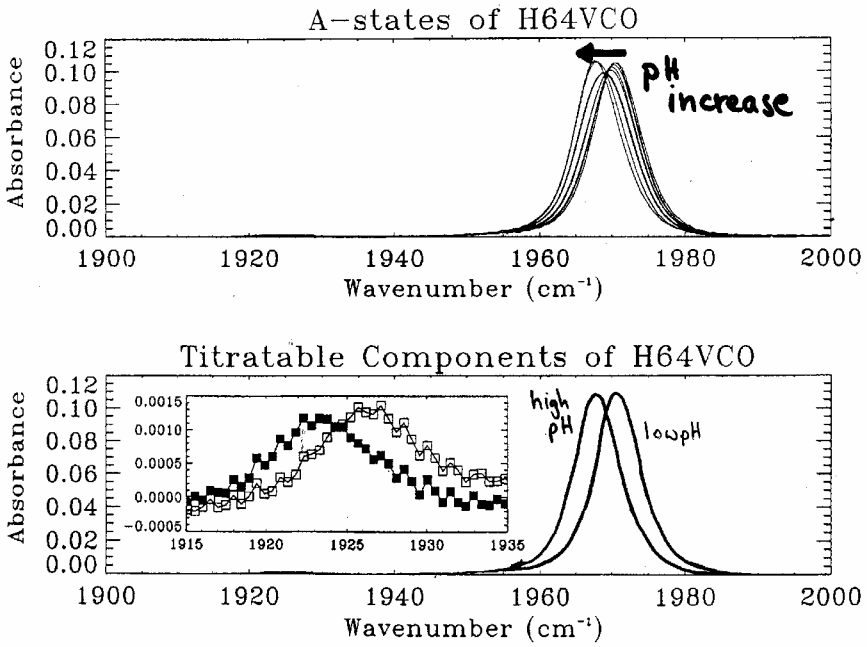


Abb. 3: CO-Streckschwingungs-Spektren von H97V-MbCO für den pH-Bereich von 4.2 bis 9.5 (oben). Basisspektren der verschiedenen Protonierungszustände (unten). Innerhalb der unteren Abbildung sind auch die Basisspektren des ^{13}C-Isotops zu sehen.

Es wird nur noch ein Peak im Bereich des A_0-Zustands beobachtet. Folglich ist die Protonierung von H64 für die Verschiebung der Besetzungszahlen der A-Zustände verantwortlich. Die spektrale Verschiebung der Bande kann aufgrund der chemischen Bindung zwischen CO und dem Hämeisen verstanden werden (Abb. 4).

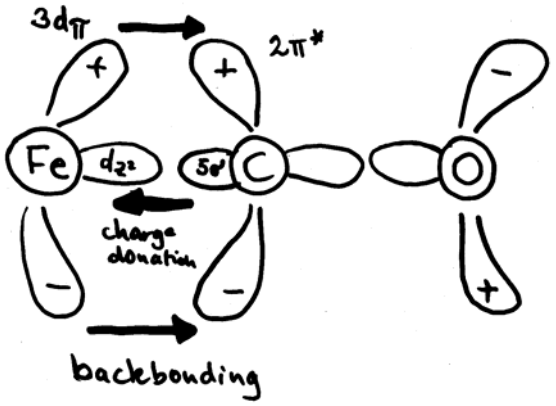


Abb. 4: Bindung des CO an das Hämeisen.

Die Hauptbeiträge der CO-Eisen-Bindung stammen von der Ladungsdonation des schwach antibindenden 5σ-Orbitals des C zum Eisen d_{z^2} -Orbital und des π-'back-bonding' der Eisen-$3d_\pi$-Orbitale in die stark antibindenen 2π*-Orbitale des CO. Daraus folgt, dass mit stärkerer 'back bonding' die Fe–C Bindung stärker und die C–O Bindung schwächer wird. In der Tat wird eine inverse Beziehung für die Streckschwingungsfrequenzen von Fe–C und C–O gefunden. Ist das H97 protoniert, so zieht seine positive Ladung Elektronendichte des π-Elektronensystems des Häms an, und der π-Donorcharakter des Hämeisens nimmt ab. Folglich nimmt die Stärke des 'back-bonding' ab, und die CO-Streckschwingungsfrequenz nimmt zu.
Die pH-abhängigen Spektren können mit einem Modell beschrieben werden, das vier verschiedene Zustände unterscheidet, die protonierten und unprotonierten Zustände der zwei Histidinseitenketten H64 und H97 (Abb. 5).

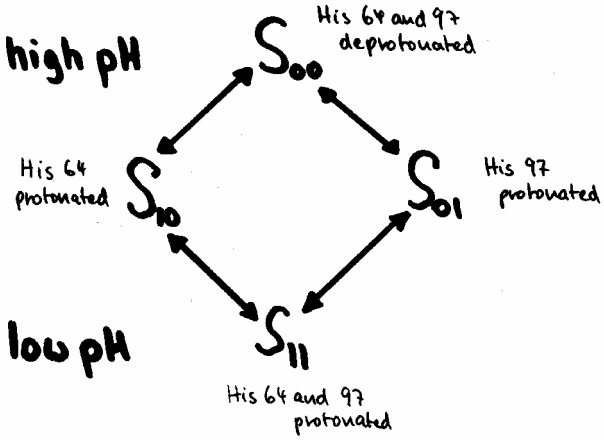


Abb. 5: Schematische Darstellung des 4-Zustandsmodells.

Es wird angenommen, dass die Protonierungsreaktion der zwei Histidin-Seitenketten vom Henderson-Hasselbalch-Typ sind und dass der pK von H64 nicht den Protonierungszustand des H97 beeinflusst und umgekehrt:

$$f_{97} = f_{HH}\left(pH; pK(H97)\right) ,$$

$$f_{64} = f_{HH}\left(pH; pK(H64)\right) ,$$

wobei die Henderson-Hasselbalch-Beziehung gilt,

$$f_{HH} = \frac{1}{1+10^{pH-pK}} .$$

Die Protonierungswahrscheinlichkeiten sind gegeben durch

$$S_{00}: \quad f_{00}(pH) = (1 - f_{64})(1 - f_{97}) \ ,$$
$$S_{10}: \quad f_{10}(pH) = f_{64}(1 - f_{97}) \ ,$$
$$S_{01}: \quad f_{01}(pH) = (1 - f_{64})\, f_{97} \ ,$$
$$S_{11}: \quad f_{11}(pH) = f_{64}\, f_{97} \ .$$

Nur drei der vier Zustände sind linear unabhängig, da ein pH-unabhängiges Gleichgewicht zwischen f_{01} und f_{10} besteht:

$$S_{01} \overset{K}{\longleftrightarrow} S_{10}$$

Für den Gleichgewichtskoeffizienten gilt

$$K = \frac{f_{01}}{f_{10}} = 10^{\,pK_{97} - pK_{64}} \ .$$

Die pH-abhängigen Spektren liefern nur die Superposition der Zustände (gemischter Zustand)

$$S_{[01]} = (1 - f_M)\, S_{01} + f_M\, S_{10} \ ,$$

mit

$$f_M = \frac{f_{10}}{f_{01} + f_{10}} = \frac{1}{1 + K} \ .$$

Der Anteil der gemischten Zustände ist die Summe der beiden einfach protonierten Populationen. Als Gewicht von $S_{[01]}$ ergibt sich

$$f_{[01]} = f_{01} + f_{10} = \frac{f_{10}}{f_M}$$

Die pH-abhängige Population der Zustände ist für pK_{64} = 4.5 und pK_{97} = 6.0 in Abb. 6 zu sehen.

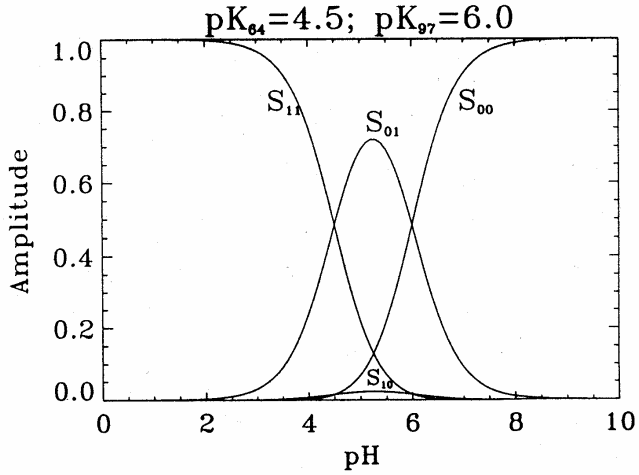


Abb. 6: Population der vier Protonierungszustände für pK_{64} = 4.5 und pK_{97} = 6.0.

Mit Hilfe von speziellen Fitprozeduren (SVD-Methode) können zwei bzw. drei Spektren der beschriebenen vier Zustände und der pK_{64}- und pK_{97}-Wert aus den gemessenen Spektren ermittelt werden. Diese sind in Abb. 1 – 3 für die jeweiligen Messungen zu sehen, wobei in Abb. 1 neben dem S_{00}- (high pH) und S_{11}-Zustand (low pH) der gemischte Zustand $S_{[01]}$ (int.) dargestellt ist.

Das H64 ist, wie bereits erwähnt, für das Zustandekommen der drei A-Zustände verantwortlich. Aus der Röntgenstrukturanalyse von MbCO bei verschiedenen pH-Werten folgt, dass die H64-Seitenkette zwei verschiedene Konformationen einnehmen kann. Abb. 7 zeigt einen Teil der Myoglobinstruktur am aktiven Zentrum bei pH 6 und pH 4.

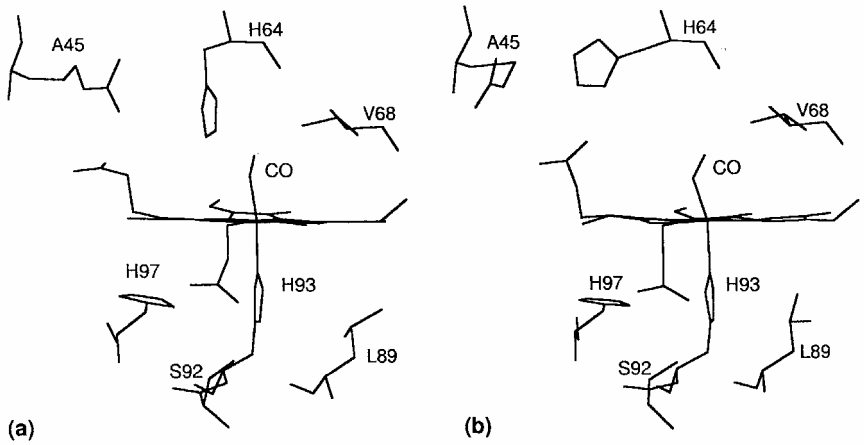


Abb. 7: Hämtaschenumgebung des Pottwal-MbCO bei pH 6 (a) und pH 4 (b).

Bei pH 4 befindet sich der Imidazolring des H64 nicht mehr in der Hämtasche in der Nähe des CO, sondern zeigt aus der Hämtasche in das Lösungsmittel. Der Abstand zum CO ist bei pH 4 größer; damit ist die elektrostatische Wechselwirkung kleiner. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass sich die CO-Streckschwingung bei ähnlichen Wellenzahlen befindet wie bei H64-Mutanten mit aliphatischen Seitenketten.
Wie bereits gezeigt wurde, sind die Rückbindungsbarrieren für die einzelnen A-Zustände unterschiedlich hoch. Daher ist zu vermuten, dass die apparente Ligandenbindungsrate bei Raumtemperatur pH-abhängig ist. Im Falle schneller Interkonversionen zwischen den A-Zuständen ergibt sich

$$\lambda(pH) = C_0(pH)\lambda_0 + C_{1,3}(pH)\lambda_{1,3}$$

wobei C_0 und $C_{1,3}$ die relativen, pH-abhängigen Gewichte von A_0 bzw. A_1/A_3 und λ_0 und $\lambda_{1,3}$ die zugehörigen Ratenkoeffizienten sind. Der Koeffizient $\lambda_{1,3}$ ist bereits eine Kombination aus A_1- und A_3-Zustand, deren relative Populationen allerdings pH-unabhängig sind. Abb. 8 zeigt, dass die Ligandenbindungsraten mit sinkendem pH signifikant ansteigen. Als pK ergibt sich 4.2, was auf die Protonierung von H64 hinweist. Dagegen führt die Änderung des Protonierungszustandes von H97 nur zu minimalen Änderungen der Bindungsraten, etwa 4 % im Falle von H64L.

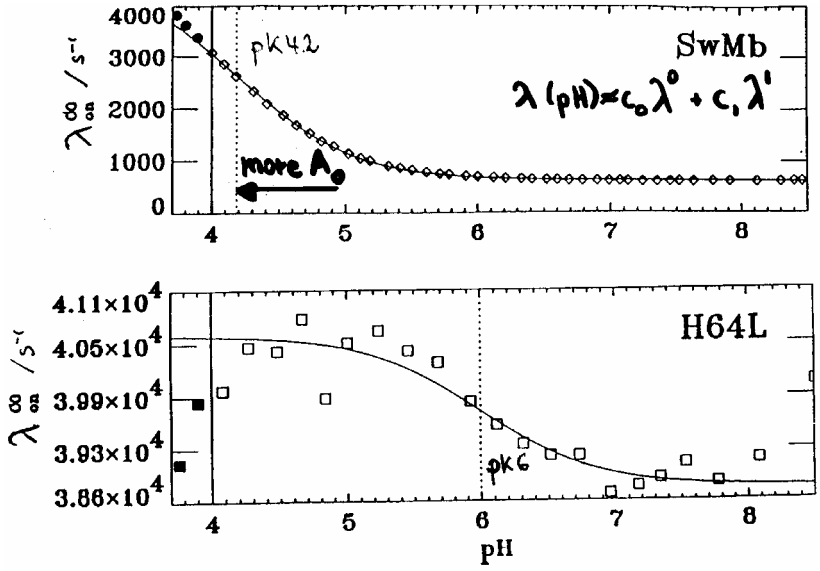


Abb. 8: Rückbindungsrate in Abhängigkeit vom pH-Wert für natives Pottwal-MbCO (oben) und für die Mutante H64L.

Drei-Zustandsmodell

Noch bis in die Siebziger-Jahre glaubte man, dass sich die Ligandenbindung beim Myoglobin mit einem einfachen Zwei-Zustandsmodell beschreiben lässt:

$$Mb + CO \underset{\lambda_{off}}{\overset{\lambda'_{on}}{\Leftrightarrow}} MbCO \ ,$$

mit

$$\Lambda_a = \frac{\lambda'_{on}}{\lambda_{off}} \ .$$

Dies ist graphisch in Abb. 9 skizziert.

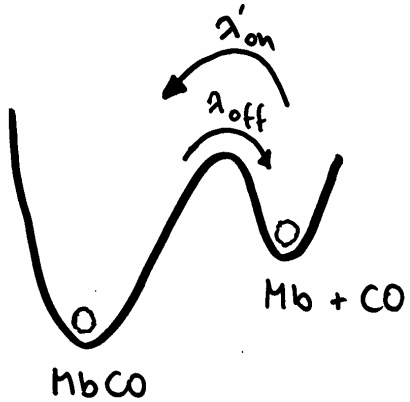


Abb. 9: Zwei-Zustandssystem für MbCO.

Unter der Annahme, dass bei $t = 0$ kein ligandiertes Mb vorhanden ist und die Konzentration von CO sehr viel größer ist als die von Mb,

$$[MbCO(t=0)] = 0 \ , \quad [CO] >> [Mb] \ ,$$

gilt für die Konzentrationen von Mb und MbCO

$$[Mb(t)] = A \cdot \exp(-\lambda t) + B \ ,$$

$$[MbCO(t)] = A \cdot (1 - \exp(-\lambda t)) \ ,$$

mit

$$\lambda = \lambda'_{on}[CO] + \lambda_{off} \ ,$$

$$A = N \frac{\Lambda_a [CO]}{1 + \Lambda_a [CO]} \ , \text{(Gleichgewichtskoeff. } \Lambda_a\text{)}$$

Man erhält also eine exponentielle Rückbindung der Liganden. Dies ist bei Zimmertemperatur gut erfüllt. Bei tieferen Temperaturen werden aber deutliche Abweichungen vom exponentiellen Verhalten gemessen (Abb. 10).

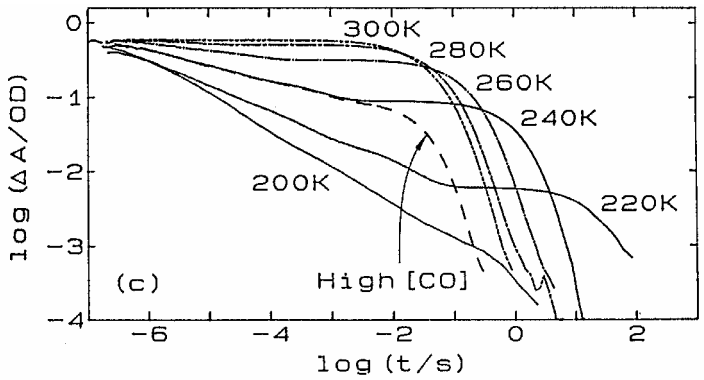


Abb. 10: Rückbindungskinetik von MbCO bei verschiedenen Temperaturen.

Die Rückbindungscharakteristik ist auch von der Konzentration des Liganden im Lösungsmittel abhängig (Abb. 11, oben).

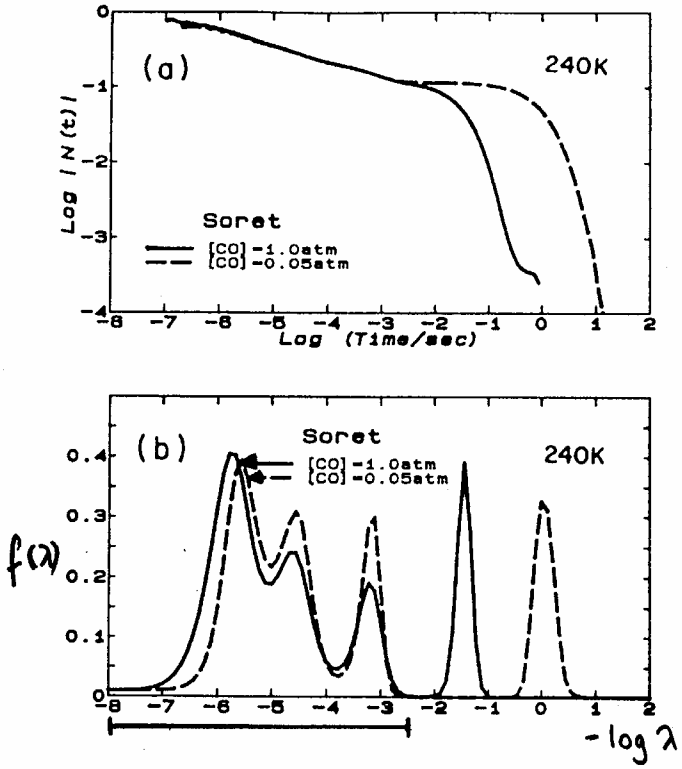


Abb. 11: Rückbindungscharakteristik von MbCO bei 240 K für zwei verschiedene Konzentrationen des CO (oben) und die daraus erhaltenen Ratenverteilungen (unten).

Aus dem Rückbindungsverhalten kann mittels

$$N(t) = \int f(\lambda)\, e^{-\lambda t}\, d\left(\log \lambda\right)$$

die Ratenverteilung berechnet werden (Abb. 11, unten). Der Peak bei kleinen Ratenkoeffizenten ist stark von der CO-Konzentration abhängig. Er beschreibt die CO-Bindung aus dem Lösungsmittel, während die anderen drei Peaks die CO-Bindung aus der Hämtasche darstellen. Die CO-Rückbindung (Zustand A) aus der Hämtasche (Zustand B) bzw. aus der Umgebung (Zustand S) kann somit energetisch wie in Abb. 12 dargestellt werden.

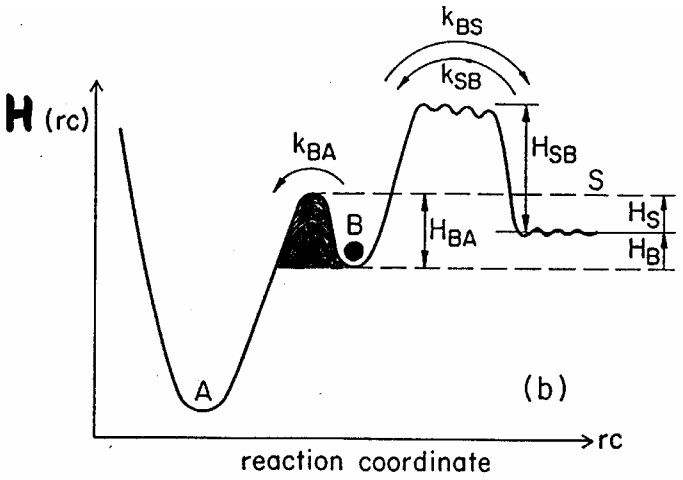


Abb. 12: Modell für die Enthalpiebarrieren für die Ligandenbindung beim MbCO.

Das 3-Zustandssystem

$$A \underset{k_{BA}}{\overset{k_{AB}}{\rightleftarrows}} B \underset{k_{SB}}{\overset{k_{BS}}{\rightleftarrows}} S$$

lässt sich mit folgendem Gleichungssystem beschreiben:

$$\frac{d\,N_A}{dt} = -k_{AB}N_A + k_{BA}N_B \ ,$$

$$\frac{d\,N_B}{dt} = k_{AB}N_A - \left(k_{BA} + k_{BS}\right)N_B + k_{SB}N_S \ ,$$

$$\frac{d\,N_S}{dt} = k_{BS}N_B - k_{SB}N_S \ ,$$

wobei die Normierung $N_A + N_B + N_S = 1$ gilt. Die Anfangsbedingungen nach einem Lichtpuls sind

$$N_B = 1, \quad N_A = N_S = 0 \ .$$

Zu besonders einfachen Lösungen des Differentialgleichungssystems kommt man mit den Näherungen

$$k_{AB} = 0 \quad \text{und} \quad k_{SB} << k_{BA}, k_{BS} \ .$$

Die zweite Bedingung gilt, wenn wir in der Kinetik zwei zeitlich wohlseparierte Prozesse beobachten. Man erhält

$$N(t) = 1 - N_A(t) = N_B(t) + N_S(t)$$

$$= N_I \ \exp\left(-\lambda_I \cdot t\right) + N_S \ \exp\left(-\lambda_S \cdot t\right),$$

mit

$$N_I = \frac{k_{BA}}{k_{BA} + k_{BS}}, \ N_S = \frac{k_{BS}}{k_{BA} + k_{BS}},$$

und

$$\lambda_I = k_{BA} + k_{BS} ,$$

$$\lambda_S = k_{BA} \cdot P_B \cdot N_S = k_{BA} \cdot \frac{k_{SB}}{k_{BS}} \cdot \frac{k_{BS}}{k_{BA} + k_{BS}} = k_{SB} \cdot N_I .$$

Abb. 13 zeigt anschaulich das verwendete 3-Zustandsmodell.

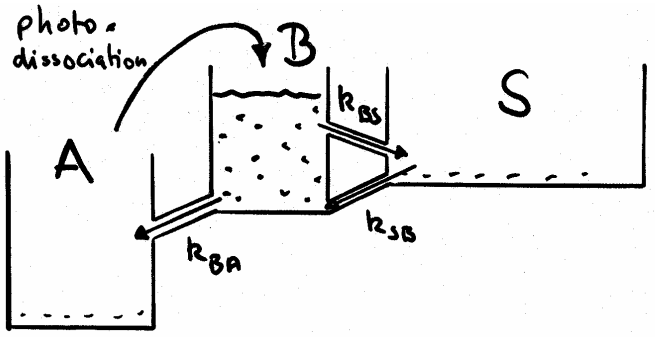


Abb. 13: Modell des 3-Zustandssystems.

Der Anteil der direkt von B zurückbindenden CO-Moleküle ist durch

$$\frac{k_{BA}}{k_{BA} + k_{BS}} = N_I$$

gegeben. Die Entvölkerung des Zustandes B erfolgt durch zwei Prozesse, die Wahrscheinlichkeit ist daher die Summe beider Ratenkoeffizienten,

$$k_{BA} + k_{BS} = \lambda_I \ .$$

Für den Anteil, der von Zustand S zurückbindet, gilt

$$\frac{k_{BS}}{k_{BA} + k_{BS}} = N_S ,$$

und die Entvölkerung von S ist gleich der Wahrscheinlichkeit, von S in den Zustand B zu gehen, mal der Wahrscheinlichkeit, in den Zustand A zurückzubinden,

$$k_{SB} \cdot N_I = \lambda_S \ .$$

Für die folgenden zwei Grenzfälle gilt:

$$(i)\ N_S \approx 1 \quad \rightarrow \quad k_{BA} << k_{BS} \quad \rightarrow \ \lambda_S = k_{BA} \frac{k_{SB}}{k_{BS}} \ ,$$

$$(ii)\ N_S << 1 \quad \rightarrow \quad k_{BA} >> k_{BS} \quad \rightarrow \quad \lambda_S \approx k_{SB} \ .$$

Grenzfall (i) liegt für MbCO bei 300 K vor (bei 250 K > T > 200 K liegt (ii) vor), während MbO_2 bei 300 K zwischen den Grenzfällen (i) und (ii) liegt ($N_s \approx 75\%$).

Ligandenbewegung im Protein

Es ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, wie die Liganden von dem Lösungsmittel in die Hämtasche des Myoglobins (und umgekehrt) kommen. Molekulardynamische Berechnungen unter Einbeziehung von Röntgenstrukturanalysen ergeben gewisse Einblicke in die Vorgänge. Es liegen konzertierte Bewegungen des Protein-Liganden-Systems vor. Dazu wurden diabatische und adiabatische Berechnungen durchgeführt.
Bei der **diabatischen** Rechnung wird das Protein als starr betrachtet. Das CO-Molekül 'erkundet' die Potentialfläche in der Hämtasche, indem es sich elastisch in der Hämtasche bewegt. Nach Photodissoziation fliegt das CO mit einer kinetischen Energie von ~60 kJ/mol vom Hämeisen weg. Die Berechnungen, die für ein Testteilchen, das kleiner als das CO-Molekül ist, durchgeführt wurden, ergaben, dass für das Verlassen aus der Hämtasche 400 kJ/mol nötig sind. Das ist weit mehr als die experimentell gefundenen 12 kJ/mol. Wird eine Rotation der Seitenketten von HisE7, ThrE10 und ValE11 angenommen, wodurch sich ein Kanal öffnet, sinkt die Austrittsbarriere auf ~20 kJ/mol. Allerdings steigt die Proteinenergie um 30 kJ/mol, was einer relativ seltenen Fluktuation entspricht.
Beim **adiabatischen** Modell wird die Energie des Moleküls bei jeder CO-Position minimiert. Somit liegt ein dynamisches Protein vor. Aus diesen Rechnungen ergeben sich mehrere mögliche Austrittswege.
Das Auftreten eines Kanals für die Ligandenbindung durch Drehen von Seitenketten wurde experimentell bei der Reaktion von Phenylhydrazin mit Mb, die eine sperrige Phenylgruppe als Ligand hinterlässt, mittels Röntgenstrukturanalyse beobachtet. Abb. 14 zeigt Metmyoglobin in der Nähe des Häms vor und nach der Bindung der Phenylgruppe. Man beobachtet, wie insbesondere das Arg45 und das His64 weggedreht werden und einen Kanal für den Liganden bilden.

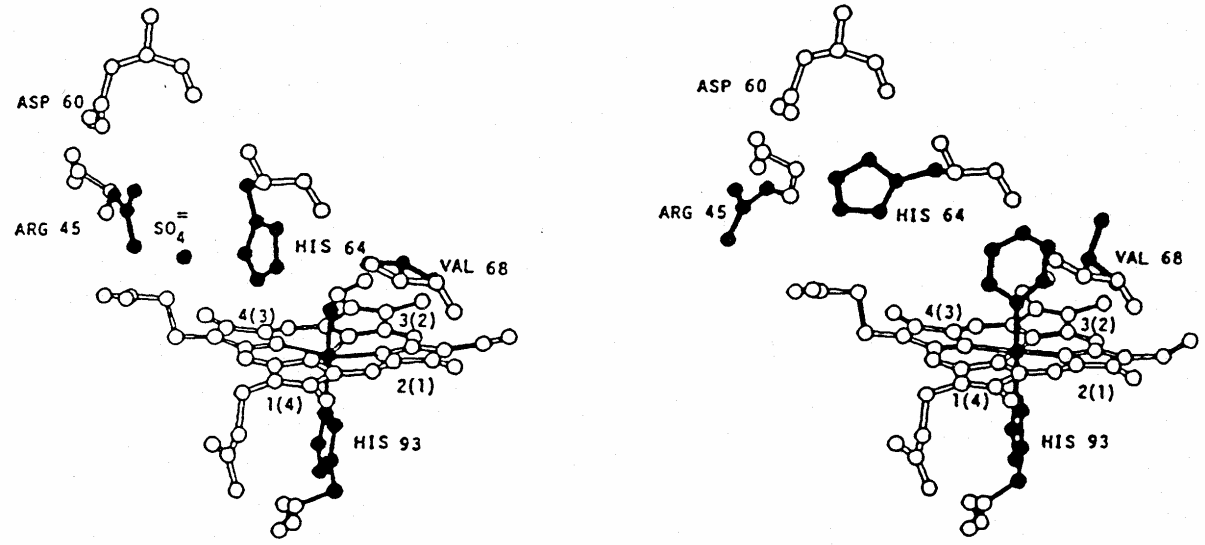


Abb. 14: Modell der Teile des Metmyoglobins, die bei der Bildung eines Kanals bei Zugabe von Phenylhydrazin beteiligt sind. Links: vor der Bindung; rechts: nach der Bindung. Die schwarz eingezeichneten Teile erfahren eine Veränderung bei der Ligandenbindung.

Reaktionstheorie

Die Überwindung von Barrieren bei chemischen Reaktionen wird durch die Reaktionstheorie beschrieben. Wird die Ligandenbindung von Sauerstoff an Myoglobin betrachtet,

$$Mb + O_2 \xrightarrow{k_{BA}} MbO_2 \ ,$$

so erhält man, falls die Konzentration des Sauerstoffs sehr viel größer ist als die des Myoglobins ($[O_2] >> [Mb] \Rightarrow [O_2] \approx const.$), für die Reaktionsgeschwindigkeit:

$$v_r = \frac{-d[Mb]}{dt} = k_{BA}[Mb]\,[O_2] = k'_{BA}[Mb]$$

mit

$$k'_{BA} = k_{BA}[O_2] \ .$$

Es stellt sich die Frage, welche physikalischen Parameter den Ratenkoeffizienten k_{BA} bestimmen. Einen einfachen Ansatz stellt die **Kollisionstheorie** dar. Bei ihr wird angenommen, dass die Reaktion durch Kollision der Moleküle in der Gasphase stattfindet. Die Moleküle müssen bei der Kollision eine genügend hohe Energie haben, um die Potentialbarriere zu überwinden. Dies wird mit dem Arrhenius-Gesetz beschrieben,

$$k = A \cdot \exp\left[-\frac{E_a}{kT}\right],$$

wobei A proportional zur Anzahl der Stöße ist, und die Exponentialfunktion den Anteil der Kollisionen mit genügend hoher Energie beschreibt. Experimentell wird oft das Arrhenius-Gesetz gefunden. Bei einem Arrhenius-Plot wird log k gegen $1/T$ aufgetragen, so dass man nach

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{k}\left(\frac{1}{T}\right)$$

eine Gerade erhält.

Abb. 15 zeigt einen Konturplot der Energiefläche in der Umgebung der Zustände A, dem Reaktionsprodukt, und B, den getrennten Reaktanten sowie Schnitte entlang der kürzesten Verbindung von A nach B und senkrecht dazu.

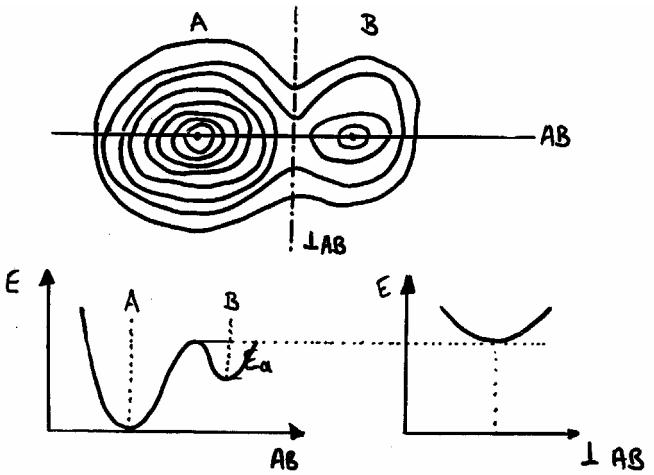


Abb. 15: Potentielle Energie in der Umgebung der Zustände A und B (oben). Schnitte entlang AB und senkrecht zu AB.

Der Übergang von einem Tal zum anderen Tal (Reaktant → Produkt) entspricht der chemischen Reaktion. Es ergeben sich diskrete Energiezustände in dem Potential. Sind die beiden Potentialmulden relativ nah, so treten aufgrund der energetischen Kopplung Aufspaltungen der Energiezustände auf (Abb. 16). Bei niedrigen Temperaturen dominiert der Tunneleffekt für den AB-Übergang, bei hohen Temperaturen die thermische Anregung gemäß Arrhenius. Für eine Reaktion ist der ständige Aufenthalt in A notwendig; das bedeutet, dass auch eine Energiedeaktivierung notwendig ist.

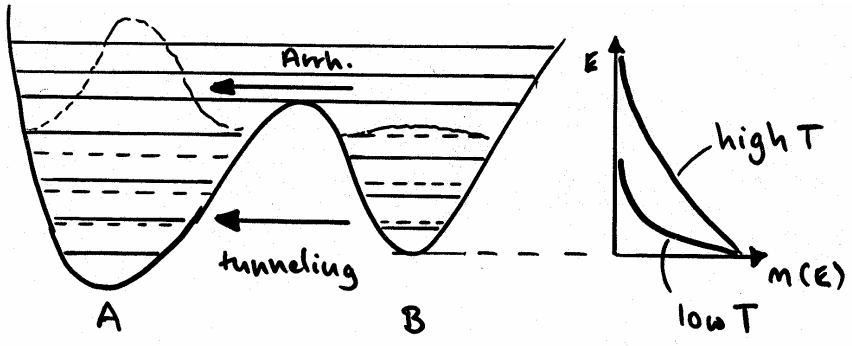


Abb. 16: Diskrete Energieniveaus und Linienaufspaltung im Potential (links). Abhängigkeit der Besetzungszahl von der Energie bei hohen und tiefen Temperaturen (rechts).

Absolute Ratentheorie

Die absolute Ratentheorie (*transition state theory, activated complex theory*) ist in der Chemie für die Beschreibung von Reaktionen weithin akzeptiert, obwohl Probleme bei Reaktionen in der kondensierten Phase auftreten. Es wird von einem Zwei-Zustands-Modell ausgegangen (Abb. 17).

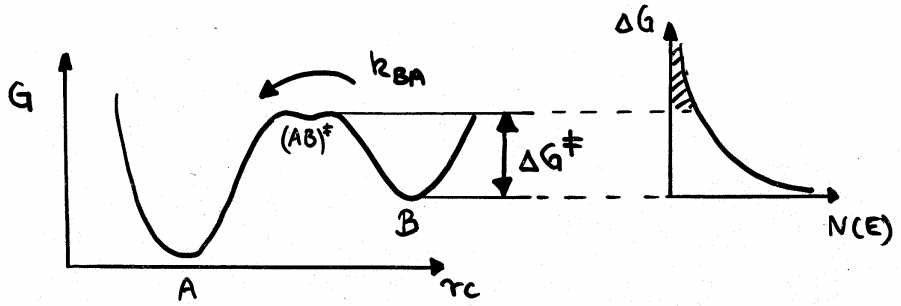


Abb. 17: Zwei-Mulden-Modell mit Boltzmannverteilung der Energiezustände.

Die absolute Ratentheorie führt einen aktivierten Komplex $(AB)^{\neq}$ ein, der sich am Potentialpeak bildet. Der aktivierte Komplex zerfällt mit der Frequenz ν einer kritischen Schwingung. Den Ratenkoeffizienten erhält man mit

$$k_{BA} = \nu \cdot \exp\left[-\Delta G^{\neq} / RT\right].$$

Die Exponentialfunktion stellt die Gleichgewichtsbesetzung des Übergangszustands dar, die sich aus der Boltzmannverteilung ergibt:

$$\frac{\int_{\Delta G_{BA}^{\neq}}^{\infty} e^{\frac{-\Delta G}{RT}} d\Delta G}{\int_{0}^{\infty} e^{\frac{-\Delta G}{RT}} d\Delta G} = e^{\frac{-\Delta G_{BA}^{\neq}}{RT}} \quad .$$

Die kritische Schwingung hat eine niedrige Frequenz, und damit ist ihre mittlere Energie klassisch gegeben durch $h\nu = kT$. Es folgt

$$k_{BA} = \frac{kT}{h} e^{\frac{-\Delta G^{\neq}}{RT}} = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^{\neq}}{RT}} e^{\frac{-\Delta H^{\neq}}{RT}} \quad .$$

Die lineare Temperaturabhängigkeit des Vorfaktors wird von der exponentiellen Abhängigkeit im Arrheniusfaktor dominiert.
Folgende Probleme der absoluten Ratentheorie sind zu konstatieren: (1) Es wird ein thermisches Gleichgewicht zwischen den Reaktanten und dem aktivierten Komplex angenommen, obwohl keine Gleichgewichtssituation vorliegt. (2) Außerdem wird angenommen, dass eine Trajektorie die Barriere nur einmal überquert. (3) Es handelt sich um eine klassische Ableitung. Bei manchen Systemen ist aber eine quantenmechanische Behandlung notwendig. (4) Weiterhin wird angenommen, dass eine definierte Energieoberfläche vorliegt (adiabatische Reaktion). (5) Die Reibung wird nicht geeignet berücksichtigt. Diese ist bei der Kramerstheorie integriert.

Kramers-Theorie

Proteine stellen komplexe dynamische Systeme dar. Bewegungen des Proteins und der Lösungsmittelhülle um das Protein herum beeinflussen die Proteinreaktionsrate. Bei der Kramerstheorie wird die multi-dimensionale Reaktionsoberfläche der Proteine so behandelt, dass eine Reaktionskoordinate isoliert betrachtet wird, die Energie und Impuls mit allen anderen Koordinaten austauscht. Diese fluktuierenden Kräfte bewirken Reibung.
Qualitativ kann der Einfluss der beiden Grenzfälle, schwache und starke Reibung, auf die Reaktion wie folgt verstanden werden: Liegt schwache Reibung vor, so ist sowohl die Anregung im Zustand B, die für die Überwindung der Energiebarriere notwendig ist, als auch die Abregung im Zustand A schwierig. Letztere ist notwendig, damit nach Überwindung der Barriere von B nach A diese nicht wieder in anderer Richtung passiert wird. Somit bewirkt eine kleine Reibung eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit. Ist die Reibung groß, so tritt aufgrund der großen Wechselwirkung mit der Umgebung Brown'sche Bewegung bzw. 'random-walk' auf. Dadurch wird die Barrierenspitze oftmals überquert, ohne dass der Zustand A oder B eingenommen wird. Dies führt ebenfalls dazu, dass die Reaktionsrate verringert wird. Beide Grenzfälle sind in Abb 18 schematisch dargestellt.

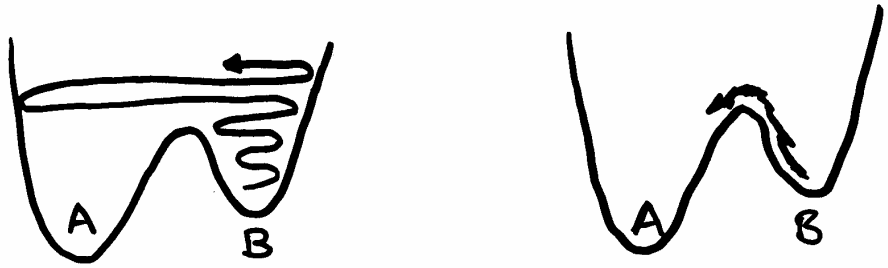


Abb 18: Schematische Darstellung der beiden Grenzfälle: schwache (links) und starke Reibung (rechts).

Die Reibung wird durch die Geschwindigkeits-Autokorrelationszeit τ_v, die die mittlere Zeit der Bewegung mit einer konstanten Geschwindigkeit angibt, quantifiziert:

$$\tau_v = m/\zeta \, .$$

Hier ist m die effektive Masse und ξ der Reibungskoeffizient. Dieser ist nach Stokes

$$\zeta = 6\pi\eta a \, ,$$

wobei a eine charakteristische lineare Distanz und η die Viskosität repräsentieren. Aus der Rechnung von Kramers folgt, dass der Ratenkoeffizient der absoluten Ratentheorie k_{TST} durch einen Transmissionskoeffizienten κ gemäß

$$k = \kappa \, k_{TST}$$

modifiziert werden muss. Dieser ist schematisch in Abb. 19 zu sehen.

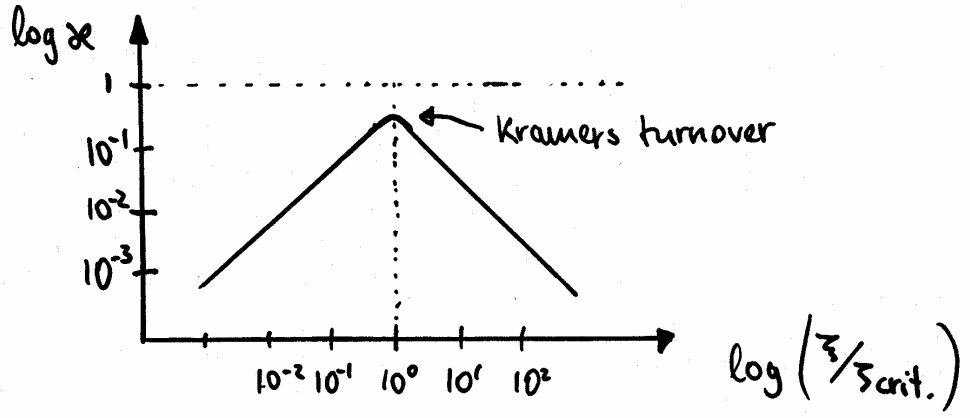


Abb. 19: Schematischer Verlauf des Tramsmissionskoeffizienten in Abhängigkeit vom Reibungskoeffizienten.

Dieser prinzipielle Verlauf des Transmissionkoeffizienten wurde experimentell durch Messungen an Stilben in verschiedenen viskosen Lösungen bestätigt. Dieses Molekül kann in trans- und cis-Konfiguration auftreten, siehe Abb. 20.

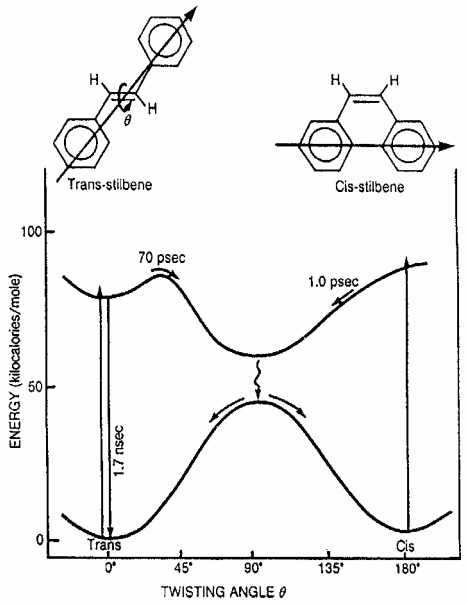


Abb. 20: Strukturdiagramm und schematisch Energieflächen für den Grund-(untere Kurve) und angeregten Zustand (obere Kurve) von trans- und cis-Stilben.

Die Abbildung zeigt ebenfalls die eindimensionalen Energieflächen für den Grund- und angeregten Zustand von cis- und trans-Stilben. Die aufgetragene Reaktionskoordinate ist der Drehwinkel um die C–C-Doppelbindung. Im Grundzustand ist, im Gegensatz zum angeregten Zustand, der Übergang von der einen zur anderen Konformation wegen der hohen Energiebarriere unwahrscheinlich. Der Übergang von einem Isomer in das andere erfolgt über den angeregten Zustand bei einem Drehwinkel von 90°.
Die experimentelle Isomerisationsrate von trans-Stilben in Abhängigkeit von der Reibung, bzw. konkret von der Viskosität des Lösungsmittels, ist in Abb. 21 aufgetragen. Ebenfalls eingezeichnet sind theoretische Daten (durchgezogene Kurve), die von den experimentellen für nicht zu starke Reibung bestätigt werden.

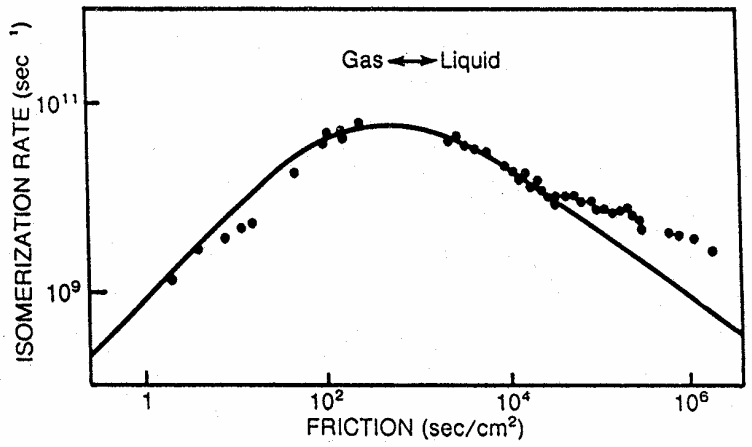


Abb. 21: Isomerisationsrate von trans-Stilben in Abhängigkeit von der Reibung.

Die quantitative Berechnung für den gesamten Bereich des Reibungskoeffizienten ist schwierig. Allerdings können die beiden Grenzfälle $\xi << \xi_{crit}$ und $\xi >> \xi_{crit}$ durch einfache physikalische Argumente erklärt werden, die auf zwei charakteristischen Längen beruhen. Die eine ist die mittlere freie Weglänge λ, welche die Distanz angibt, die das System ohne Geschwindigkeitsveränderung durchläuft.

$$\lambda = v_{m.p.}\tau_v = \sqrt{2mk_BT}\,/\,\zeta \qquad \text{mit} \qquad v_{m.p.} = \sqrt{\frac{2k_BT}{m}}\,.$$

Hierbei ist $v_{m.p.}$ die Geschwindigkeit am Maximum der Maxwell-Boltzmann-Verteilung. Die zweite charakteristische Länge l_{TS} ist durch die Größe des Übergangsbereichs der Barriere gegeben, siehe Abb. 22.

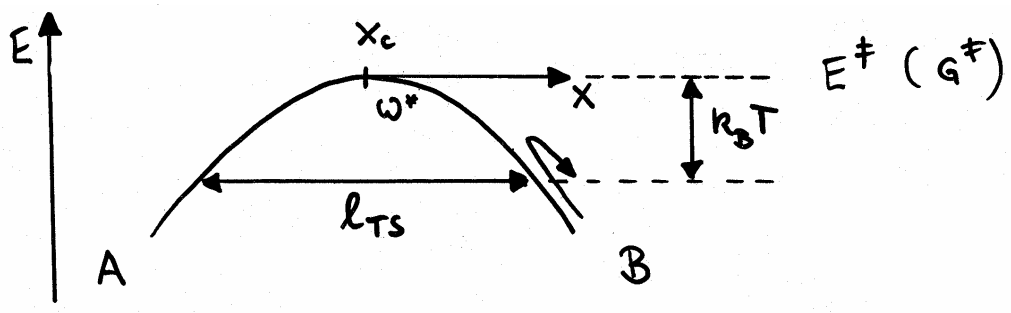


Abb. 22: Schema der Barriere zwischen A und B zur Definition von l_{TS}.

Definiert ist l_{TS} über die Breite der Barriere bei einer Energie k_BT unterhalb des Maximums der Barriere. Für den Energieverlauf in diesem Bereich kann eine Parabel angenommen werden,

$$E = E^{\neq} - \frac{1}{2} m\omega^{*^2} \left(x - x_c \right)^2 \ .$$

Hier stellt ω^* einen Geometriefaktor dar. Gemäß obiger Forderung gilt

$$E^{\neq} - \frac{1}{2} m\omega^{*^2} \left(\frac{l_{TS}}{2} \right)^2 = E^{\neq} - k_B T \ .$$

Daraus folgt

$$l_{TS} = 2\sqrt{2k_B T \Big/ \left(m\omega^{*^2} \right)} \ .$$

Der Charakter des Übergangs kann durch das Verhältnis der beiden charakteristischen Längen

$$\frac{\lambda}{l_{TS}} = \frac{m\omega^*}{2\zeta}$$

bestimmt werden. Ist $\lambda = l_{TS}$ so folgt $2\xi = m\omega^*$, und der Übergang ist kritisch gedämpft. Er ist untergedämpft für $\lambda >> l_{TS}$ (ballistisch, kleine Reibung) und übergedämpft für $\lambda << l_{TS}$ (diffusiv, hohe Reibung).

Für den Fall der **schwachen Reibung** kann die Reibungsabhängigkeit des Transmissionskoeffizienten wie folgt hergeleitet werden. Das System verliert keine Energie, wenn es von Zustand B in Zustand A geht und wieder zurückgeht. Es oszilliert N_c -mal hin und her, wobei gilt

$$N_c = \frac{\tau_E}{\tau_r} \ .$$

Hier ist τ_r die Zeit, die für eine Überquerung der Mulden benötigt wird, und τ_E die Zeit, in der das System die Energie $E = k_BT$ verliert. Letztere ist proportional zur Anzahl der Stöße, wodurch

$$\tau_E \propto \tau_v \propto \zeta^{-1}$$

folgt. Der Transmissionsfaktor ist umgekehrt proportional zur Anzahl der Überquerungen, N_c. Somit ergibt sich

$$\kappa \approx N_c^{-1} = \frac{\tau_r}{\tau_E} \propto \zeta \ .$$

Dieselbe Argumentation gilt auch für die Aktivierung im Zustand B.

Bei **starker Reibung** kommt es aufgrund der Brown'schen Bewegung zu vielen Versuchen, die Barriere zu überwinden, wobei das Maximum der Barriere oftmals in beide Richtungen überquert wird. Für den Transmissionskoeffizienten gilt

$$\kappa = \frac{2}{N_c + 1} \ ,$$

wobei die Anzahl der Überquerungen bis zum endgültigen Übergang, N_c, gegeben ist durch

$$N_c = \frac{\lambda}{l_{TS}} \cdot \left(\frac{l_{TS}}{\lambda}\right)^2 = \frac{l_{TS}}{\lambda} \ .$$

Der erste Faktor stellt die Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Nähe des Maximums, der zweite die Anzahl der Bewegungsänderungen dar. Damit folgt

$$\kappa \approx \frac{2\lambda}{l_{TS}} = \frac{m\omega^*}{\zeta},$$

und somit erhält man für den Ratenkoeffizienten

$$k(T,\zeta) = \frac{m\omega^*}{\zeta}\frac{\omega_B}{2\pi} e^{-\Delta G^*/RT} \ .$$

Hier wurde $H^{\neq}$ *(*$E^{\neq}$*)* durch die Gibbssche freie Energie des aktivierten Zustandes, G^*, ersetzt. Im Bereich zwischen starker und schwacher Reibung hängt der Ratenkoeffizient von der Potentialoberflächentopographie und von Reibungseffekten ab. Der von der absoluten Ratentheorie vorhergesagte Ratenkoeffizient stellt in diesem Bereich das obere Limit dar. Er kann signifikant falsch sein.

Einige Bemerkungen zu obigen Theorien:

1) Es stellt sich die Frage, wie der Einfluss der Viskosität von dem der freien Aktivierungsenthalpie separiert werden kann. Gewöhnlich wird die absolute Ratentheorie herangezogen, und $H^{\neq}$ wird aus der Steigung und $S^{\neq}$ aus dem Offset des Arrheniusplots bestimmt. Man nimmt also an, dass κ = 1 ist, oder dass der Transmissionskoeffizient zumindest temperaturunabhängig ist. Allerdings ist die Reibung stark von der Temperatur abhängig. Es gilt in einem begrenzten Temperaturintervall näherungsweise (siehe 'Kollektive Ratenprozesse')

$$\zeta \approx \zeta(T_0)\, e^{-S_\zeta/k} e^{E_\zeta/kT} \ .$$

Daraus folgt

$$H^{\neq} - H^* = E_\zeta \ ,$$

$$S^{\neq} - S^* = S_\zeta = E_\zeta / T_0 \ ,$$

wobei T_0 eine Referenztemperatur ist. S^* bzw. H^* sind die tatsächlichen Aktivierungs-Entropien bzw. -Enthalpien der betrachteten Reaktion.

2) Der Reibungskoeffizient ist bei hohen Viskositäten frequenzabhängig.

3) Typische Zeiten für den Barrierenübergang sind für den ballistischen Fall 10 fs und für den diffusiven Fall, der gewöhnlich, wie oben gesehen, viele Überquerungen beinhaltet, 1 ps.

Kollektive Ratenprozesse

Bis jetzt wurden nur einfache Barrierenübergänge betrachtet. Da Proteine aber dicht gepackt sind, können bei einer Konformationsänderung viele temperaturabhängige Barrieren involviert sein. Wird z.B. eine Rotation einer inneren Gruppe betrachtet, so liegt bei tiefen Temperaturen eine starke Behinderung der Bewegung vor. Außerdem existieren viele Barrieren, z.B. stören benachbarte Seitenketten die Bewegung. Es liegen kollektive Bewegungen vor, und die Energiefläche ist temperaturabhängig. Bei hohen Temperaturen ermöglichen dagegen die thermischen Fluktuationen der umgebenden Gruppen eine quasi-freie Bewegung. Für kollektive Ratenprozesse ist das Arrhenius-Gesetz nicht mehr anwendbar, und es wird außerdem eine nicht-exponentielle Dynamik beobachtet:

$$\Phi(t,T) = e^{-(k(T)t)^{\beta}}.$$

Gewöhnlich gilt für den Parameter β: 0.2 << β << 1. Dadurch kommt es zu einem langsameren Abfall von Φ für große Zeiten (Abb. 23).

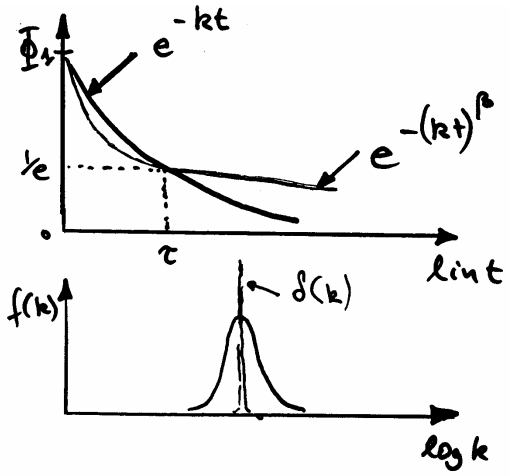


Abb. 23: Exponentielle und nicht-exponentielle Dynamik (oben) und dazugehörige Ratenverteilungen (unten).

Die Abbildung zeigt ebenfalls, wie sich die Verteilung der Ratenkoeffienten von einer Deltafunktion für eine exponentielle Dynamik im Falle einer nicht-exponentiellen Dynamik verbreitert. Die Temperaturabhängigkeit ist also nicht mehr durch Arrhenius gegeben. Abb. 24 zeigt dies für die Relaxations-/Fluktuationszeit von Glyzerin.

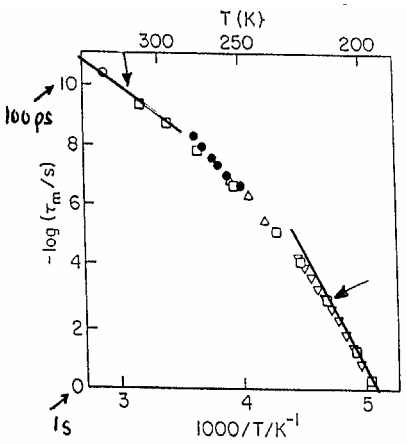


Abb. 24: Relaxations-/Fluktuationszeiten von Glyzerin aus verschiedenen Messungen.

Es liegen mehrere temperaturabhängige Barrierenhöhen vor. Unter der Annahme einer einzigen Barriere,

$$k = A_A \, e^{-E_A/RT} \, ,$$

folgt aus Abb. 24 für hohe Temperaturen E_A = 50 kJ/mol; $A_A = 10^{18}$ s^{-1}, während für niedrige Temperaturen E_A = 140 kJ/mol; $A_A = 10^{36}$ s^{-1}, gefunden wird. Diese Vorfaktoren sind, insbesondere bei tiefen Temperaturen, viel zu hoch, als dass sie Schwingungen von Atomen entsprechen könnten. Es werden alternative Beschreibungen für den Ratenkoeffizienten verwendet:

$$k = A_{VF} \, e^{-E_{VF}/R(T-T_0)} \, ,$$

$$k = A_F \, e^{-\left(\frac{E_F}{RT}\right)^2} \, .$$

Letztere Beziehung beschreibt z.B. das Temperaturverhalten der Viskosität und der dielektrischen Relaxationszeit von Propanol und Glyzerin (Abb. 25).

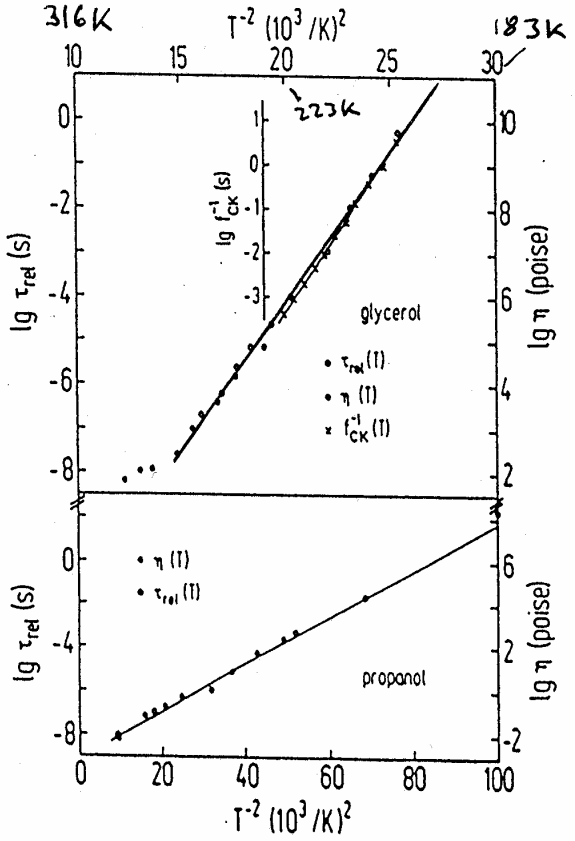


Abb. 25: Temperaturabhängigkeit der Viskosität und der dielektrischen Relaxationszeit für Propanol und Glyzerin.

Tunneln bei der Ligandenbindung

Das einfachste Modell für das Tunneln eines Teilchens durch einen Potentialberg ist das Rechteckpotential (Abb. 26).

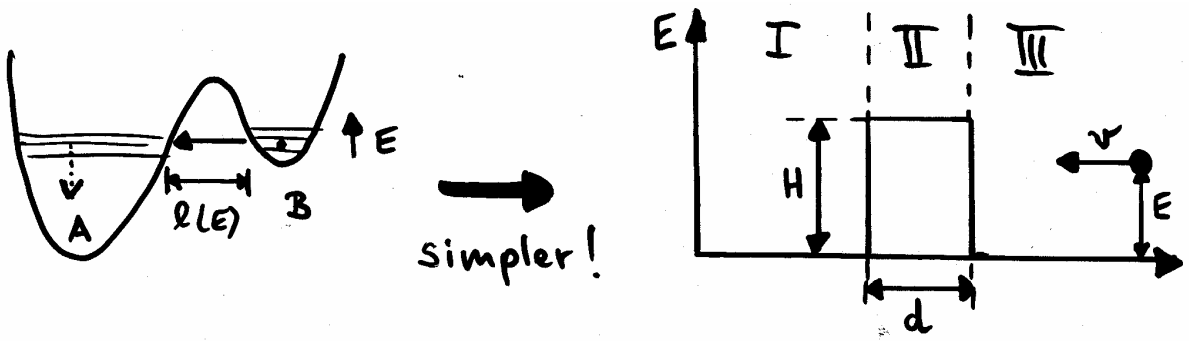


Abb. 26: Rechteckbarriere (rechts) als einfaches Modell eines Zwei-Topf-Systems (links).

Dieses ist durch die Höhe H und die Breite d charakterisiert. Bei der Herleitung der Tunnelwahrscheinlichkeit werden ebene Wellen für die Bereiche I und III angesetzt. Für die Region II erhält man eine exponentiell abklingende Wellenfunktion. Für die Transmissionswahrscheinlichkeit des Teilchens ergibt sich

$$T = e^{-2\kappa d/\hbar} \ ,$$

mit $\kappa = \sqrt{2M(H-E)}$. Für den Ratenkoeffizienten erhält man

$$k_t = A_t(T)\, e^{-\gamma\sqrt{2M(H-E)}d/\hbar} \ ,$$

wobei der Parameter γ von der verwendeten Potentialform abhängt. Für eine rechteckige Barriere ist er 2, für eine dreieckige 4/3 und für eine parabolische $\pi/2$. Der Term im Exponenten wird Gamov-Faktor genannt. Bei der Temperatur 0 K treten nur Tunnelübergänge auf, da Übergänge gemäß Arrhenius nicht möglich sind. Die Tunnelübergänge können von denen nach Arrhenius wie folgt unterschieden werden: Zum einen zeigen sie eine schwache Temperaturabhängigkeit bei Temperaturen nahe 0 K, zum anderen tritt eine starke Massenabhängigkeit der Tunnelwahrscheinlichkeit auf (Isotopeneffekt). Die unterschiedliche **Temperaturabhängigkeit** der beiden Effekte kann am folgenden Beispiel gesehen werden. Abb. 27 zeigt die Rückbindungskinetik von CO an Hb nach Photolyse für Temperaturen zwischen 2 und 100 K.

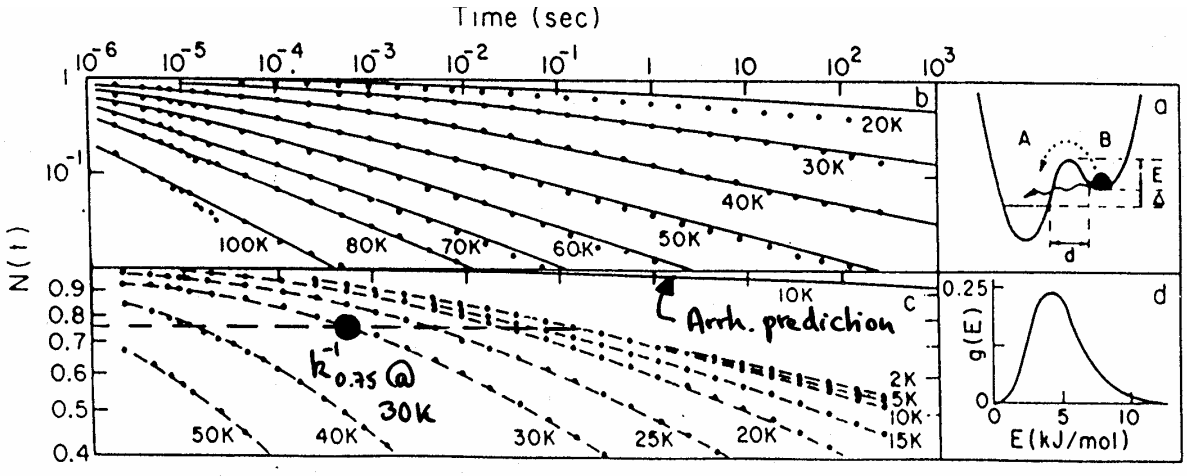


Abb. 27: (a) Ein Molekül in der Mulde B kann entweder durch Überspringen oder durch Tunneln der Barriere zu A gelangen. (b) Rückbindung von CO an Hb nach Photolyse. (c) Wie (b), aber mit vergrößerter Skala. Die durchgezogenen Linie (10 K) ist der ohne Tunneln erwartete Wert für *N(t)*. (d) Aktivierungs-Energiespektrum für HbCO.

Wird die in Abb. 27 (d) gezeigte Verteilung der Enthalpiebarrieren verwendet, um die Rückbindung gemäß Arrhenius,

$$N(t) = \int g(H)\, \exp\left[-A\frac{T}{T_0}\exp\left(-\frac{H}{RT}\right)\cdot t \right] dH\,,$$

zu berechnen, so können die experimentellen Kinetiken für Temperaturen größer als 20 K gut beschrieben werden (Abb. 27 b). Für kleinere Temperaturen bindet das CO aufgrund des Tunneleffekts aber wesentlich schneller an das Hb zurück (Abb. 27 c). Dies wird besonders bei der Auftragung von $k_{0.75}$ dem Inversen der Zeit, bis zu der 25 %-Rückbindung erreicht ist, deutlich (Abb. 28).

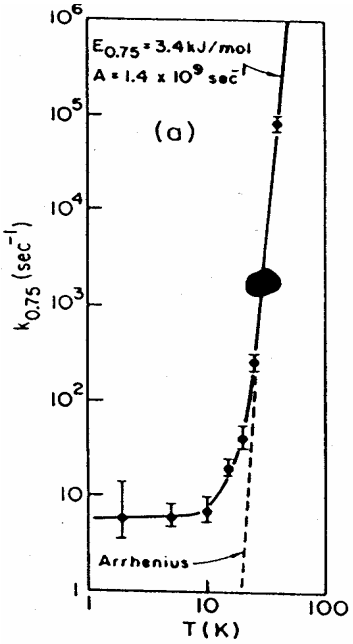


Abb. 28: $k_{0.75}$ in Abhängigkeit von der Temperatur für MbCO. Für große Temperaturen wird die experimentelle Kurve durch das Arrhenius-Gesetz beschrieben, bei tiefen Temperaturen tritt quantenmechanisches Tunneln auf.

Bei hohen Temperaturen erhält man ein Verhalten gemäß Arrhenius. Bei tiefen Temperaturen ändert sich aufgrund des Tunneleffekts die Rückbindungsrate immer langsamer für fallende Temperaturen.
Bei der Verwendung der **Massenabhängigkeit** zur Unterscheidung obiger Effekte wird ausgenutzt, dass die Raten nach Arrhenius nur schwach massenabhängig sind ($\omega_B = \sqrt{D/m}$), während die Tunnelwahrscheinlichkeit eine exponentielle Massenabhängigkeit aufweist. Die Effekte können also durch Rückbindungskinetiken verschiedener Isotope getrennt werden. Die Ratenkoeffizienten eines leichten und schweren Isotops (Index *l* und *h*) sind:

$$\left.\begin{aligned} k_l &= A\exp\left[-C\sqrt{M_l}\right] \\ k_h &= A\exp\left[-C\sqrt{M_h}\right] \end{aligned}\right\} \ln\frac{k_l}{k_h} = C\left(\sqrt{M_h} - \sqrt{M_l}\right) .$$

Aus der ersten Gleichung folgt

$$C = \ln\left(\frac{A}{k_l}\right)\cdot\frac{1}{\sqrt{M_l}} .$$

Durch Einsetzen ergibt sich

$$\ln\frac{k_l}{k_h} = \ln\left(\frac{A}{k_l}\right)\cdot\frac{\sqrt{M_h} - \sqrt{M_l}}{\sqrt{M_l}} .$$

Mit Hilfe der Erweiterung

$$\left(\times\frac{\sqrt{M_h} + \sqrt{M_l}}{\sqrt{M_h} + \sqrt{M_l}}\right)$$

erhält man

$$\ln\frac{k_l}{k_h} \approx \ln\left(\frac{A}{k_l}\right)\cdot\frac{\Delta M}{2M}$$

für $\Delta M << M$, mit

$$\Delta M = M_h - M_l ,$$

$$M = (M_h + M_l)/2 .$$

Das Rückbindungsverhältnis wird groß für lange Zeiten (k_l klein). Liegt eine Verteilung von *k*-Werten vor, ist es also von Vorteil, lange Zeiten (kleine *k*-Werte) zu betrachten. Bei der Messung des Isotopeneffekts muss beachtet werden, dass die Rückbindungskurven bei tiefen Temperaturen flach sind. Dies bedeutet, dass aufgrund des kleinen Isotopeneffekts mit hoher Präzision gemessen werden muss. Abb. 29 zeigt Infrarotmessungen der CO-Banden für die Isotope $^{12}C^{16}O$ und $^{13}C^{16}O$ bei verschiedenen Zeiten nach der Photolyse.

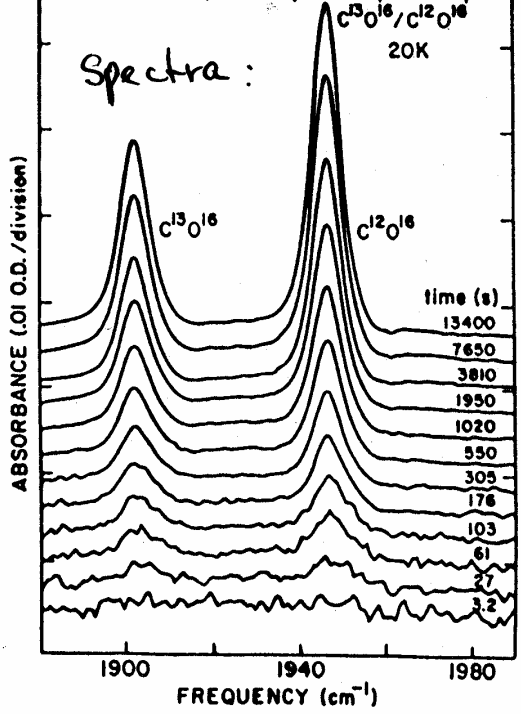


Abb. 29: Infrarotspektren von MbCO zweier CO-Isotope bei 20 K.

Mit Hilfe der Infrarotspektren lassen sich die Kinetiken der beiden Isotope leicht trennen. Ihre Banden liegen bei 1945 cm^{-1} für $^{12}C^{16}O$ und bei 1901 cm^{-1} für $^{13}C^{16}O$ (1902 cm^{-1} für $^{12}C^{18}O$). Aus den Flächen der Peaks der Infrarotspektren resultieren die Kinetiken in Abb. 30. Bei 20 K ist der Isotopeneffekt klar zu sehen, während dieser bei 60 K durch die wenig massenabhängige thermische Rückbindung klein ist.

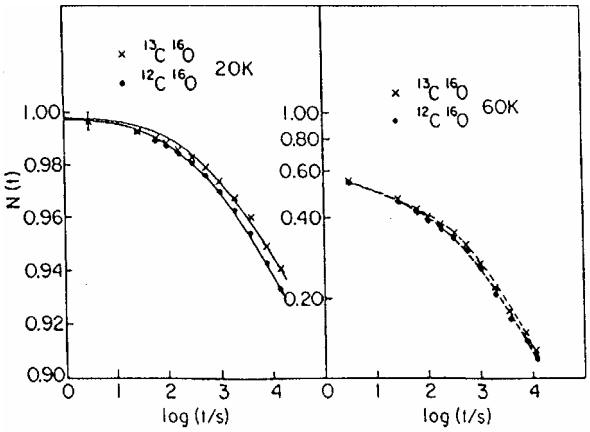


Abb. 30: Rückbindungskinetik zweier CO-Isotope an Mb bei 20 und 60 K.

Generell lässt sich $\Delta M / M$ aus den experimentellen Daten bestimmen. Werden diese mit theoretischen Daten verglichen, so stellt sich die Frage, welche Masse tatsächlich tunnelt. Werden z.B. $\Delta M / M$ -Werte für die $^{12}C^{16}O/^{13}C^{16}O$ -Isotope beim Tunneln von CO verglichen, so stimmen die experimentellen Werte (0.04 ± 0.015) mit den theoretischen (0.035) überein. Für das Isotopenpaar $^{16}O^{12}C/^{18}O^{12}C$ allerdings differiert der experimentelle Wert (0.019 ± 0.007) deutlich von dem theoretischen (0.069). Dies kann damit erklärt werden, dass das CO in der Hämtasche derart bindet, dass sich bei der Rückbindung der Sauerstoff im Gegensatz zum Kohlenstoff wenig bewegt (Abb. 31).

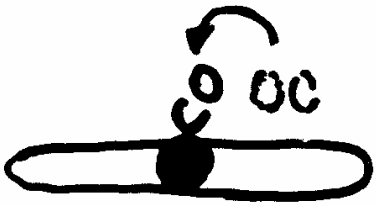


Abb. 31: Bindung des CO von der Hämtasche an das Hämeisen.

Analog zum Fall der Überwindung der Barriere gemäß Arrhenius sind auch beim Tunneleffekt Wechselwirkungen mit der Umgebung notwendig, um das Teilchen im tieferen Topf einzufangen. Andererseits führen Schwingungsanregungen zu Übergängen, bei denen die Barriere nicht so breit ist (Abb. 32).

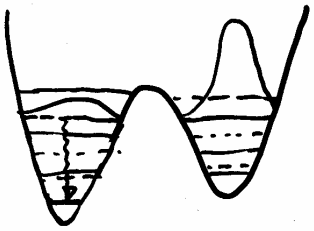


Abb. 32: Beteiligung von Phononen beim Tunneln durch die Energiebarriere.

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Phonon in den Zustand *x* emittiert wird, ist

$$P(x) \propto (1 + n_x),$$

mit der Bose-Einstein-Verteilung:

$$n_x = \left[e^{E_x/kT} - 1 \right]^{-1} .$$

Für $T << E_x / k$ folgt $n_x \approx 0$ und somit $P(x)$ = const. Die Auswirkung der verschiedenen Phononenprozesse auf den Verlauf der Reaktionsrate in Abhängigkeit von der Temperatur ist in Abb. 33 skizziert.

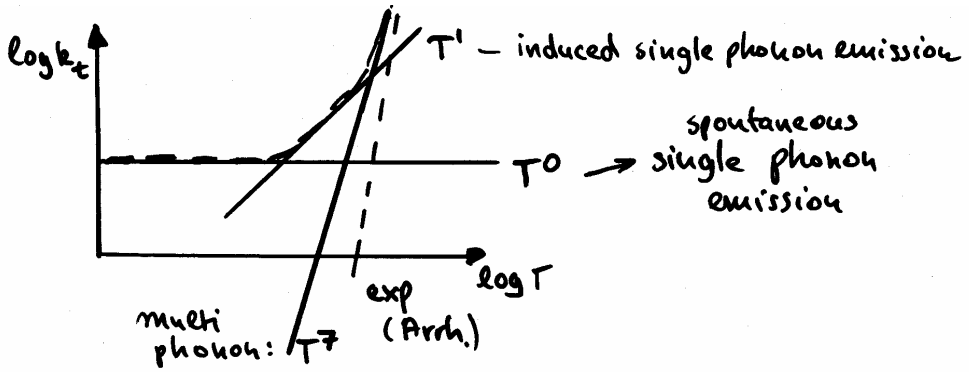


Abb. 33: Beteiligung der verschiedenen Phononenprozesse beim Übergang vom Arrhenius-Gesetz zum Tunneleffekt.

Wie in Abb. 28 zu sehen, ist k_t bis zu Temperaturen von ~10 K konstant. Im Vergleich zu Relaxationen in Festkörpern ist diese Temperatur hoch, d.h. die bei den Übergängen beteiligten Phononen haben relativ hohe Energien ($E \geq 20$ cm^{-1}). Bei Tunnelreaktionen muss beachtet werden, dass nicht nur nukleares Tunneln, sondern auch elektronische Bewegungen (Spin-Übergänge) involviert sind (siehe unten).

Elektronisch kontrollierte Reaktion

Die oben behandelten Theorien (absolute Ratentheorie, Kramerstheorie und Tunneleffekt) nehmen an, dass eine einzige Energieoberfläche vorhanden ist. Dies ist aber nicht generell der Fall. In chemischen Reaktionen müssen sich sowohl die Kerne als auch die Elektronen bewegen. Da die Elektronenmasse sehr viel kleiner als die Kernmasse ist, können sich die Elektronen meist schneller umordnen als die Kerne. Diese Reaktionen, die sterisch, adiabatisch oder nuklear genannt werden, können mit *einer* Energieoberfläche beschrieben werden. Es treten aber auch Situationen auf, bei denen die Elektronenbewegung langsam ist, so dass die adiabatische Näherung nicht gerechtfertigt ist. Dies ist z.B. bei langreichweitigem Elektronentransfer und Elektronenspin-Übergängen in Atomtransfers gegeben. Bei der CO-Bindung an Hämeisen z.B. ändert sich der Spin um den Faktor 2, da der gebundene Zustand Spin 0 und der ungebundene Zustand Spin 2 besitzt. Der durch die Spin-Orbit-Wechselwirkung verursachte Spinübergang ist gewöhnlich langsam, so dass eine adiabatische Behandlung ungerechtfertigt erscheint.
Wird keine Kopplung zwischen dem Spin 0 (s) und dem Spin 2 (q)-Zustand angenommen, so schneiden sich die Kurven zwar, aber es ist kein Übergang möglich. Es gilt für einen gegebenen elektronischen Zustand

$$\Psi(r_e, R_n) = \psi_e(r_e, R_n)\phi_n\,(R_n)$$

Abb. 34 zeigt die Potentialkurven für Spin 0 und Spin 2.

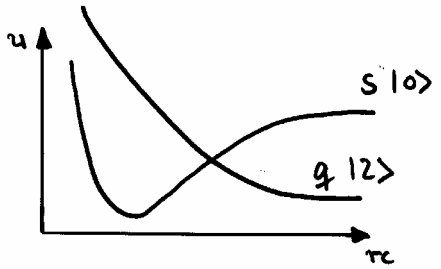


Abb. 34: Potential in Abhängigkeit einer Reaktionskoordinate für Spin 0 und Spin 2.

Wird eine Kopplung zwischen den Zuständen durch einen Spin-Orbit-Term eingeführt, so folgt für den Hamiltonian,

$$H(r_e, R_n) = T(R_n) + H_e(r_e; R_n) + H_{sq}(r_e; R_n)\,,$$

wobei der erste Summand die kinetische Energie der Kerne, der zweite den elektronischen Hamiltonian für konstante nukleare Positionen und der dritte die Spin-Orbit-Kopplung darstellt. Daraus folgt ein Übergangsmatrixelement zwischen den Zuständen *s* und *q*, das ungleich Null ist: $V_{sq} \neq 0$. Dies führt zu einer Energieaufspaltung

$$\Delta = 2\left|V_{sq}\right|\,,$$

und zu den in Abb. 35 dargestellten 'adiabatischen Energiekurven'.

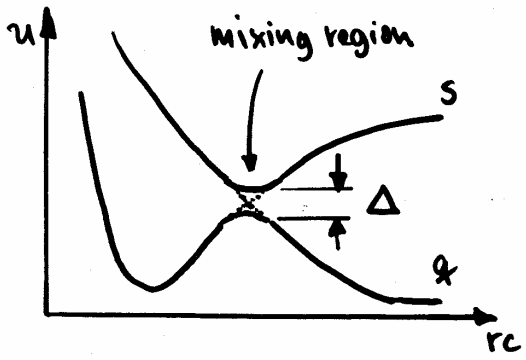


Abb. 35: Kopplung des *s* (Spin 0)- und des *q* (Spin 2)-Zustands in der ´Mischregion´.

Durch die Kopplung kommt es zur Superposition der *s*- und *q*-Zustände in der Mischregion. Je nach Größe der Aufspaltung bzw. der Stärke der Kopplung können zwei Grenzfälle unterschieden werden: Bei der adiabatischen Reaktion ($\Delta >> kT$) bleibt das System auf der unteren Energiefläche, während bei der nicht-adiabatischen Reaktion ($\Delta \leq kT$) die obere Energiefläche energetisch zugänglich ist. Bewegt sich das System in Richtung Bindung, so bleibt es entweder in *q* oder geht auf *s* über, je nach der Zeitskala für die Kern- und die elektronischen Bewegungen. Mit Hilfe der Unschärferelation können die Übergangswahrscheinlichkeiten abgeschätzt werden:

$$E_{LZ} \cdot \tau_{LZ} = \hbar \ ,$$

wobei τ_{LZ} die Zeit ist, in der sich das System in der Mischregion (Landau-Zener-Region) aufhält. Weiterhin gilt

$$\tau_{LZ} = l_{LZ} / v \, ,$$

mit der Geschwindigkeit *v*. Hier beschreibt l_{LZ} die Region, 'in der das Potential innerhalb von Δ des Gipfels ist'. Werden die Ableitungen der beiden Potentiale (F_1, F_2) in der Mischregion betrachtet, so folgt (vgl. Abb. 36)

$$-F_1 \cdot l_{LZ} = \Delta \, , \quad F_2 \cdot l_{LZ} = \Delta$$

und somit

$$l_{LZ}\left(F_2 - F_1\right) = \Delta \, .$$

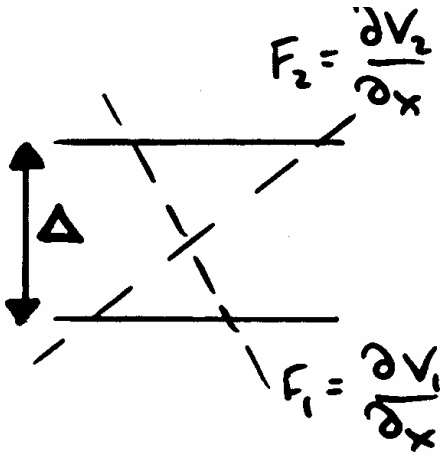


Abb. 36: Ableitung der Potentialkurven in der Mischregion.

l_{LZ} lässt sich nun darstellen als

$$l_{LZ} \approx \frac{\Delta}{\left|F_2 - F_1\right|} \ .$$

Für den Adiabatizitätsparameter gilt dann

$$\gamma_{Lz} = \frac{\Delta}{E_{LZ}} = \frac{\Delta}{\hbar / \tau_{LZ}} = \frac{l_{LZ} \cdot \Delta}{\hbar v} \ ,$$

$$\gamma_{LZ} = \frac{\Delta^2}{\hbar v \left|F_2 - F_1\right|} \ .$$

Gilt $\gamma_{LZ} >> 1$, so liegt der adiabatische Grenzfall vor, d.h., das System bleibt auf der unteren Kurve. Für $\gamma_{LZ} \leq 1$ befindet sich das System im nicht-adiabatischen Grenzfall, d.h., Übergänge in die obere Energiekurve sind möglich. Für die Wahrscheinlichkeit dieses Übergangs gilt nach Landau, Zener und Stueckelberg:

$$P = 1 - \exp\left[-\pi \gamma_{LZ} / 2\right] \ .$$

Ist γ_{LZ} groß, so folgt $P = 1$ (adiabatischer Grenzfall); für kleines γ_{LZ} erhält man durch Entwicklung der Exponentialfunktion (nicht-adiabatischer Grenzfall)

$$P = \frac{\pi}{2} \gamma_{LZ} = \frac{\pi}{2} \frac{\Delta^2}{\hbar \, v \left|F_2 - F_1\right|} \ .$$

Im nicht-adiabatischen Fall kann das System auf der diabatischen Energiefläche bleiben. Das bedeutet, dass nicht bei jedem Aufenthalt in der Mischregion ein Übergang zwischen den Energieflächen erfolgt. Die Proportionalität

$$P \propto \Delta^2$$

erhält man auch aus Störungsrechnungen, bei denen Δ als kleine Störung (schwache Kopplung) angesehen wird, die Übergänge bewirkt (Fermi's Golden Rule).
Bisher wurde ein ballistischer Transport angenommen. Nun soll zusätzlich die Reibung berücksichtigt werden. Für folgende Diskussion sind drei Längenskalen wichtig. Neben der mittleren freien Weglänge λ, sind dies l_{LZ} und l_{TS} (siehe Abb. 37).

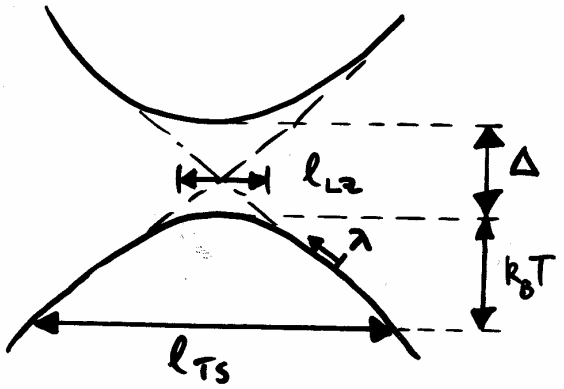


Abb. 37: Schema der physikalischen Größen in der Mischregion.

1. Ist $l_{LZ} >> l_{TS,}$ so folgt $\Delta >> k_B T$; es liegt der adiabatische Fall vor.

2. Für $l_{LZ} << l_{TS} << \lambda$ sind die Übergänge ballistisch (kleine Reibung), und es gilt $\Delta << k_B T$. Es treten viele Übergänge ($N_c >> 1$) durch die Mischregion auf:

$$P = \frac{1}{2}\left[1 - \exp\left(-\pi \gamma_{LZ}^{*}\right)\right] ,$$

mit $\gamma_{LZ}^{*} = N_c \gamma_{LZ} = \frac{\tau_E}{\tau_r}\gamma_{LZ}$.

3. Für $l_{LZ} << \lambda << l_{TS}$ liegt aufgrund der großer Reibung eine diffusive Bewegung vor; es kommt wiederum zu vielen Übergängen durch die Mischregion:

$$P = \frac{1}{2}\left[1 - \exp\left(-\pi \gamma'_{LZ}\right)\right] ,$$

mit $\gamma'_{LZ} = N_c \gamma_{LZ} = \frac{l_{TS}}{\lambda}\gamma_{LZ}$. Somit folgt die in Abb. 38 dargestellte Abhängigkeit des Transmissionskoeffizienten von der Reibung.

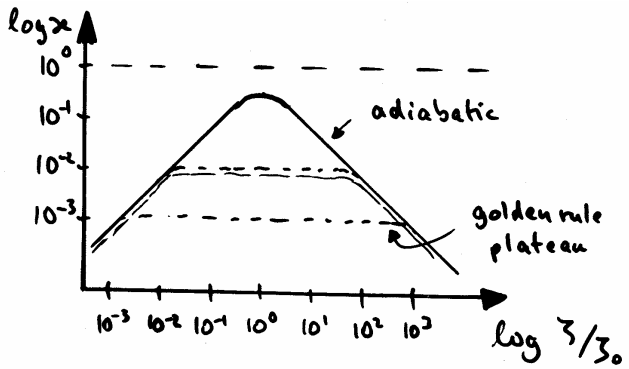


Abb. 38: Abhängigkeit des Transmissionskoeffizienten von der Reibung.

Bei schwacher und starker Reibung erhält man durch die vielen Überquerungen der Mischregion ein adiabatisches Verhalten. Im dazwischen liegenden Bereich ist die Wahrscheinlichkeit für eine einzige Überquerung der Mischregion sehr viel höher und damit die Wahrscheinlichkeit für einen Wechsel der Energieflächen entsprechend geringer. Der Transmissionskoeffizient ist folglich kleiner als beim adiabatischen Fall.

Biologische Energieumwandlung

Die biologische Energieumwandlung findet in Bakterien und in Zellorganellen (Mitochondrien und Chloroplasten) der Pflanzen und Tiere statt. Die Mitochondrien wandeln Kohlenhydrate unter Sauerstoffzufuhr in Kohlendioxid und Wasser um (Atmung):

$$[CH_2O] + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O \ .$$

In den Chloroplasten wird Kohlendioxid und Wasser mit Hilfe der Sonnenenergie in Kohlenhydrate und Sauerstoff umgesetzt (Photosynthese):

$$CO_2 + H_2O \rightarrow [CH_2O] + O_2 \ .$$

Obwohl die Atmung und die Photosynthese entgegengesetzte Richtungen der gleichen Reaktion darstellen, sind die ablaufenden Prozesse sehr ähnlich. Diese werden durch die **Chemiosmosis** (Mitchell, 1961) beschrieben. Sie ist der universelle Energieumwandlungsmechanismus, der den Elektronenfluss, den Protonengradienten und die ATP-Synthese verbindet. Die chemische Energie wird in einem pH-Gradienten oder einem elektrischen Potential über einer Membran gespeichert, in der die energieumwandelnden Proteine angeordnet sind:

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = F \cdot \Delta\psi - 2.3\ RT\Delta\mathrm{pH} \ .$$

Hier ist $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ das elektrochemische Potential der Protonen, F die Faradaykonstante, $\Delta\psi$ die Potentialdifferenz und ΔpH die pH-Differenz über der Membran. Der erste Term spielt bei den Mitochondrien, der zweite bei den Chloroplasten die wesentliche Rolle.
Abb. 1 zeigt schematisch die chemiosmotische Kopplung. Die Sonnenenergie oder die Energie aus der Oxidation von Nährstoffen wird verwendet, um einen Protonengradienten entlang der Membran aufzubauen. Dieser Gradient treibt eine Vielfalt von Reaktionen in den Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien an. In Abb. 2 ist schematisch die strukturelle Organisation eines Chloroplasten, eines Bakteriums und eines Mitochondriums zu sehen.

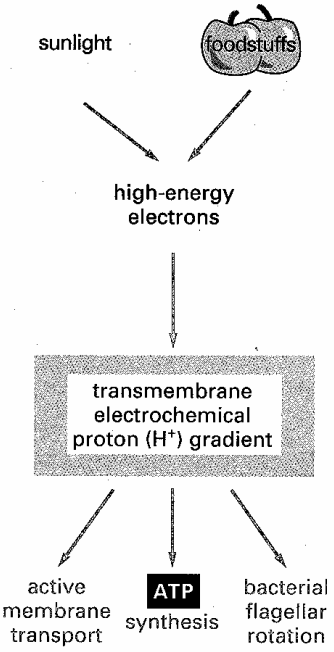


Abb. 1: Chemiosmotische Kopplung.

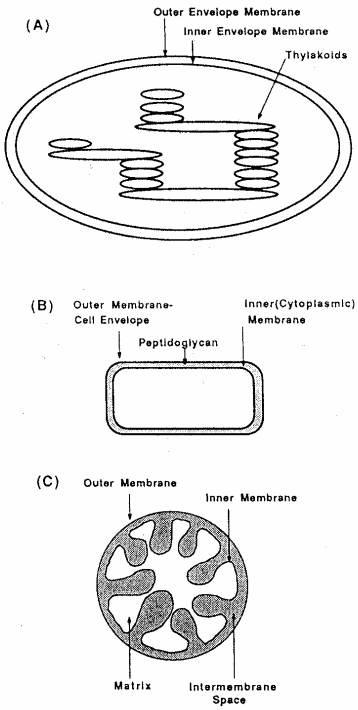


Abb. 2: Schematische Darstellung der strukturellen Organisation (A) eines Chloroplasten, (B) eines gramnegativen Bakteriums (z.B. *E. coli*), (C) eines Mitochondriums.

Beim Mitochondrium wird der Protonengradient an der inneren der beiden Membranen aufgebaut. Der Chloroplast besteht aus drei Membranen. An der sich im Innern des Chloroplasten (Stroma) befindenden Membran (Thylakoidmembran) wird der Protonengradient aufgebaut. Abb. 3 stellt schematisch die Energieumwandlung im Mitochondrium und im Chloroplasten dar.

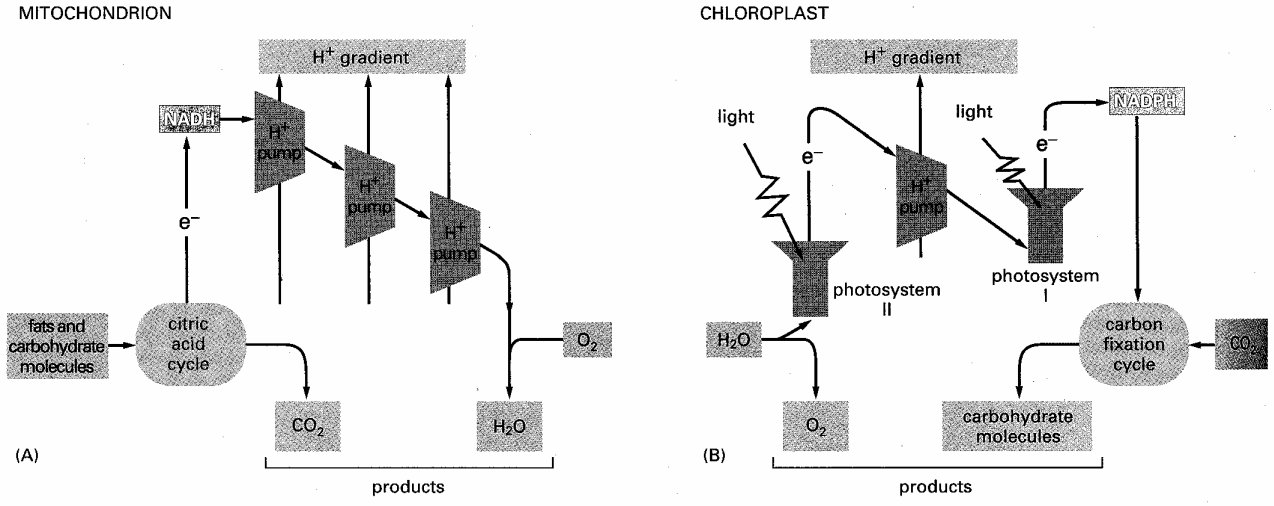


Abb. 3: Mitochondrien (A) und Chloroplasten (B) als elektrische Energieumwandler.

Im Mitochondrium werden energiereiche Elektronen, die aus Fetten und Kohlenhydrat-Molekülen im Verlaufe ihrer Umwandlung in Kohlendioxid erzeugt werden, sequentiell durch drei Proteinkomplexe (NADH Dehydrogenase, bc_1-Komplex, Cytochrom c Oxidase) transportiert. Die freie Enthalpie, die durch den Weg des Elektrons vom Hochenergiezustand zu einem tiefer liegenden Zustand frei wird, wird verwendet, um Protonen durch die Membran des Mitochondriums zu pumpen. Die Elektronen werden dabei durch

diffundierende Moleküle transportiert. Eines der wichtigsten dieser Moleküle ist das NAD^+, das zwei Elektronen und ein Proton aufnimmt, um NADH zu bilden. Das NADH bringt die Elektronen zur NADH-Dehydrogenase in der Mitochondrienmembran. Anschließend werden sie von weiteren Transportmolekülen zu den weiteren Protonenpumpen gebracht. Die dritte Protonenpumpe transferiert das Elektron schließlich zum Sauerstoff.
Im Chloroplasten wird Lichtenergie zur Separation von Ladungen verwendet. Der Elektronentransfer läuft dabei in entgegengesetzter Richtung von der bei den Mitochondrien: Die Elektronen werden dem Wasser entzogen; dabei wird Sauerstoff produziert. Sie werden via NADPH zur Synthese von Kohlenhydraten aus CO_2 weitergeleitet (siehe unten).

Photosynthese

Die Photosynthese in grünen Pflanzen kann in den photophysikalischen Primärprozess, die lichtinduzierte Ladungstrennung, und zwei darauf folgende biochemische Prozesse, Kohlendioxidfixierung und ATP-Synthese, eingeteilt werden. Die lichtinduzierte Ladungstrennung erfolgt in zwei Schritten. Der erste ist die photosynthetische Wasserspaltung:

$$H_2O \rightarrow \tfrac{1}{2}\, O_2 + 2H^+ + 2\, e^-, \qquad E_o' = -0.82\ V,$$

der zweite der Elektronentransfer zu $NADP^+$:

$$NADP^+ + 2\, e^- + H^+ \rightarrow NADPH, \qquad E_o' = -0.32\ V.$$

Die Ladungstrennung findet in großen, die Membran überspannenden Proteinkomplexen, den Reaktionszentren, statt. Diese sind so in der Membran orientiert, dass das Ergebnis des Primärprozesses der lichtinduzierte Transport von Elektronen vom Lumen (Bereich innerhalb der Thylakoidmembran) zum Stroma (Bereich außerhalb der Thylakoidmembran) im Chloroplasten und von Protonen in die andere Richtung ist. Die Energie wird in Form von NADPH gespeichert. Der pH-Wert ist ~5 innerhalb der Membran und außerhalb ~8. Abb. 4 zeigt schematisch den Elektronen- und Protonentransfer über die Thylakoidmembran. Da die Thylakoidmembran für Mg^{2+} und Cl^- durchlässig ist, gleichen sich die Ladungen beiderseits der Membran aus, so dass die Potentialdifferenz über der Membran Null ist. In Mitochondrien ist sie dagegen signifikant, während dort hingegen ΔpH nur ~1 ist.

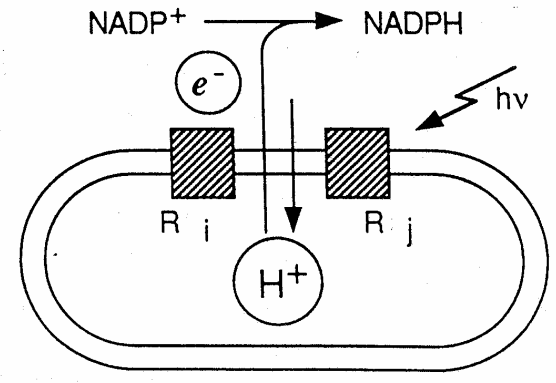


Abb. 4: Elektronen- und Protonentransfer über die Thylakoidmembran im Chloroplasten (R_i, R_j: Reaktionszentren).

Neben den beschriebenen, lichtinduzierten Reaktionen treten auch Dunkelreaktionen auf. Zum einen wird der Protonengradient verwendet, um aus ADP das reaktive ATP zu synthetisieren,

$$ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O.$$

Hier stellt P_i ein Phosphat-Ion dar. Zum anderen kann NADPH, da es ein starkes Reduktionsmittel ist, zusammen mit ATP Kohlendioxid zu CH_2O umwandeln,

$$CO_2 + 2\,NADPH + 3\,ATP^{4-} + 2\,H_2O \rightarrow [CH_2O] + 2\,NADP^+ + 3\,ADP^{3-} + 3\,HPO_4^{2-} + H^+.$$

Abb. 5 a zeigt formal den Atom- und Ladungstransfer. Der erste Schritt in Pflanzen ist allerdings der in Abb. 5 b dargestellte. Hier wird CO_2 an Ribulose-1,5-bisphosphat durch das Enzym Ribulosebisphosphat-Carboxylase (Rubisco) im Stroma gekoppelt. Da dieses Enzym sehr ineffizient ist (3 s^{-1}), sind viele Kopien nötig, so dass es bis zu 50% des Proteingehalts der Chloroplasten ausmacht.

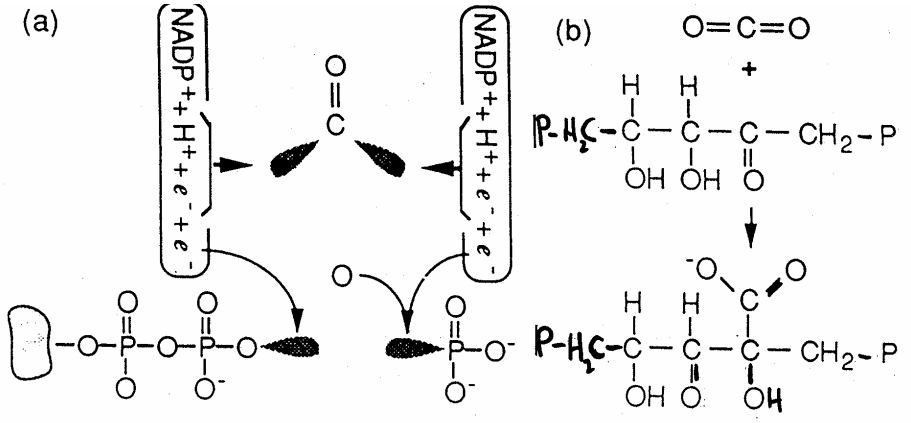


Abb. 5:(a) Darstellung der Ladungsverschiebung bei der CO_2-Reduktion. Die CO_2-Fixierung in Pflanzen erfolgt allerdings im ersten Schritt nach dem Schema (b), der durch ein Enzym katalysiert wird, welches CO_2 an die Verbindung Ribulose-1,5-Bisphosphat koppelt.

Chloroplasten haben die Fähigkeit, Wasser als Elektronendonor zu verwenden. Um NADPH (Redoxpotential ~ – 320 mV) aus Wasser (Redoxpotential ~ + 830 mV) zu generieren, werden zwei Photosysteme verwendet, das PS I (P700) und das PS II (P680). Das letztere ist das wasserspaltende Enzym. Klare Hinweise auf diese beiden Reaktionszentren wurden durch die Messung der Sauerstoffproduktion während der Photosynthese als Funktion der Wellenlänge erhalten (Abb. 6).

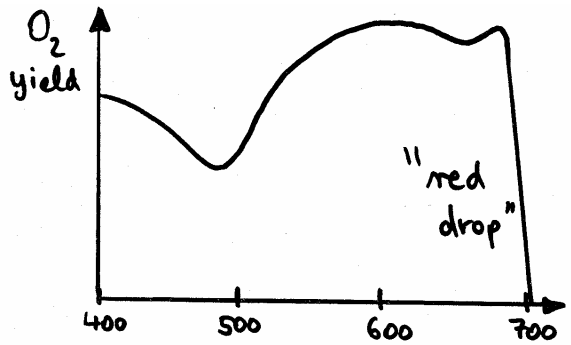


Abb. 6: Photosynthese-Sauerstoffproduktion in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslichts.

Die Anregung kann nur bis zu einer kritischen Wellenlänge erfolgen. Da für 690 nm < λ < 705 nm nur PS I angeregt werden kann, ist die Photosynthese ab diesem Bereich nicht möglich. Das PS II enthält ein 4Mn-Cluster, das Elektronen von Wasser extrahiert,

$$2\,H_2O \xrightarrow{4h\nu} O_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \ .$$

Abb. 7 (rechts) zeigt den Reaktionszyklus, durch den nach vier Lichtpulsen ein Sauerstoffmolekül freigesetzt wird. Darin werden die Reaktionsintermediate des Enzyms mit S_0 – S_4 bezeichnet.

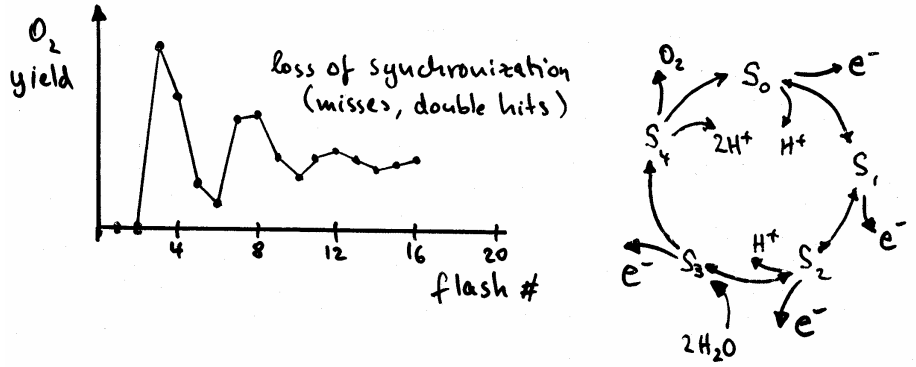


Abb. 7: Sauerstoffausbeute bei der Photosynthese von Chloroplasten in Abhängigkeit von der Blitzanzahl (links). Reaktionszyklus der Sauerstoffbildung (rechts).

Abb. 7 (links) zeigt die Oszillationen der Sauerstoffausbeute bei der Bestrahlung von Chloroplasten mit Lichtblitzen in Abhängigkeit von der Anzahl der Lichtblitze. Das Maximum nach 3 Lichtblitzen kommt daher, dass 75 % der Chloroplasten vor der Bestrahlung im S_1-Zustand (25 % im S_0-Zustand) vorliegen. Durch zweifache oder keine Reaktion während eines Lichtblitzes geht die Synchronisation mit zunehmender Anzahl der Blitze verloren.
Das Reaktionszentrum im Photosystem II produziert starke Elektronendonoren in der Form des Plastochinons. Diese geben die Elektronen zu einer Protonenpumpe (b_6-f Komplex) weiter (Abb. 8). Dieser Komplex pumpt Protonen über die Thylakoidmembran. Die Elektronen werden mit Hilfe eines kleinen, kupferhaltigen Proteins, des Plastocyanins, zum Photosystem I transportiert.

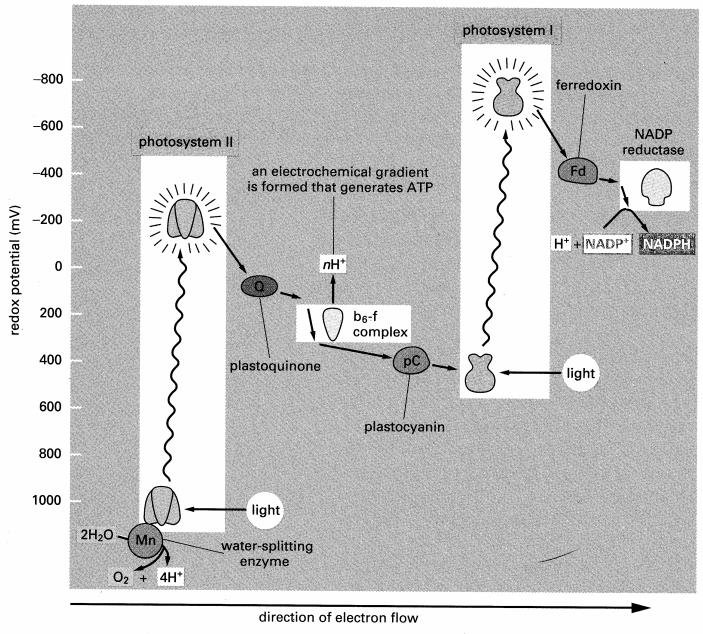


Abb. 8: Veränderung des Redoxpotentials während der Photosynthese.

Das Elektron rekombiniert hier mit dem Loch, das durch Lichtanregung im Chlorophyllmolekül in seinem Reaktionszentrum erzeugt wurde. Das Photosystem I erhöht das Energieniveau des Elektrons, so dass es in das Eisen-Schwefelzentrum des Ferredoxin und daraufhin zum $NADP^+$ gelangen kann, um dort NADPH zu erzeugen. Das Schema in Abb. 8 wird 'Z-Schema' genannt. Die Nettoreaktion ist also

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ \xrightarrow{h\nu} O_2 + 2\,NADPH + 2\,H^+ \ .$$

Beim 'Z-Schema' sind zwei Photonen involviert, da die Energie eines einzelnen sichtbaren Photons nicht ausreicht, das Elektron vom 'Boden' des Photosystems II zur 'Spitze' des Photosystems I zu bringen. Außerdem steht mit zwei Photosystemen noch genügend Energie für das Protonenpumpen in der Thylakoidmembran zur Verfügung. Der resultierende elektrochemische Gradient treibt die Synthese von ATP durch die ATP-Synthase:

$$ADP + P_i + n\,H^+_{in} \Leftrightarrow ATP + H_2O + n\,H^+_{out} \ .$$

Das gesamte elektrochemische Potential des Protons ist

$$\Delta\mu_H = RT\ln\frac{\left[H^+_{out}\right]}{\left[H^+_{in}\right]} + F\Delta\psi \ .$$

Die Richtigkeit dieser chemiosmotischen Hypothese ist durch verschiedene Experimente verifiziert worden. Zum einen nimmt die ATP-Produktion stark mit der Differenz des pH-Werts zu. Andererseits nimmt diese Differenz schneller ab, falls die Konzentration von ADP zunimmt.
Für die ATP-Produktion ist eine freie Enthalpie von 0.35 eV nötig. Das chemische Potential der Protonen sollte also einen Schwellenwert haben, ehe die ATP-Synthese einsetzt. In Abb. 9 ist die relative ATP-Produktion (bezogen auf Chlorophyll a) als Funktion des chemischen Potentials der Protonen für 3 Werte des elektrischen Feldes aufgetragen. Die Zunahme des elektrischen Feldes führt nur zu einer Verschiebung der Kurven. Das bedeutet, dass der elektrische Potentialgradient und der Protonengradient äquivalent sind. Die ATP-Synthese setzt oberhalb einer Schwelle von ~140 mV ein. Daraus folgt, dass drei Protonen für die Synthese eines ATP-Moleküls (350 meV) benötigt werden.

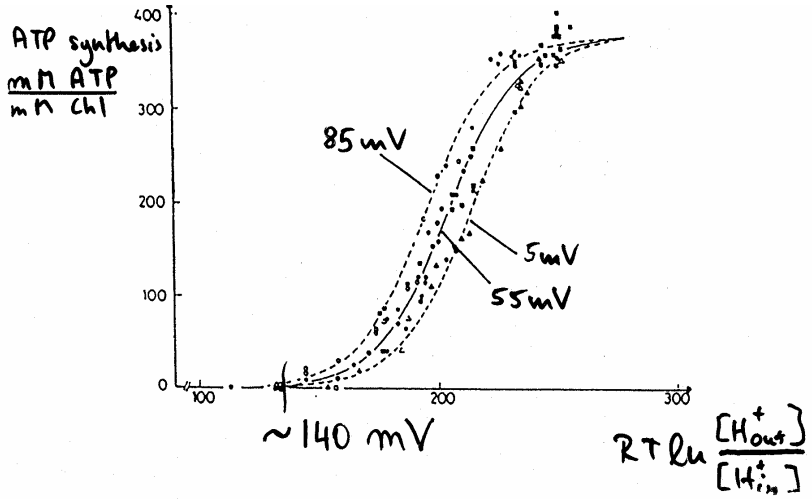


Abb. 9: Abhängigkeit der ATP-Synthese vom elektrochemischen Potential der Protonen.

Das chemiosmotische Prinzip wird auch durch folgendes Experiment bestätigt: Ein Vesikel befindet sich in einem Kondensator. Der Abfall des elektrischen Feldes erfolgt im Wesentlichen in der elektrisch isolierenden Membran (Abb. 10).

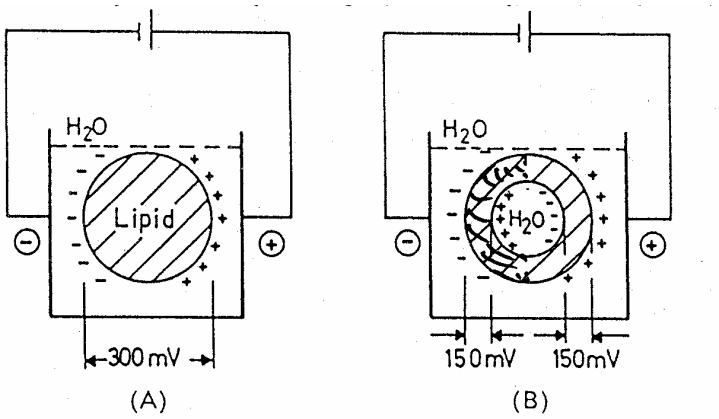


Abb. 10: Prinzip der Methode des externen elektrischen Feldes. Die zwei Elektroden sind 1 mm voneinander getrennt. Es werden 300 V angelegt, so dass die Feldstärke 3000 V/cm ist. Der Spannungsabfall entlang eines Mikrometers ist dann 300 mV (A). Die gegensätzliche Polarität entlang der Lipidmembran (B).

Die Äquivalenz von licht- und feldgetriebener ATP-Produktion ist in Abb. 11 zu sehen. Die ATP-Produktion nimmt linear mit der Zahl der elektrischen Impulse in derselben Weise wie mit Lichtimpulsen zu. Der Unterschied um den Faktor 2 bei der ATP-Produktion kommt daher, dass die Spannung nur für eine Hemisphäre des Vesikels die richtige Orientierung für die ATP-Synthese hat.

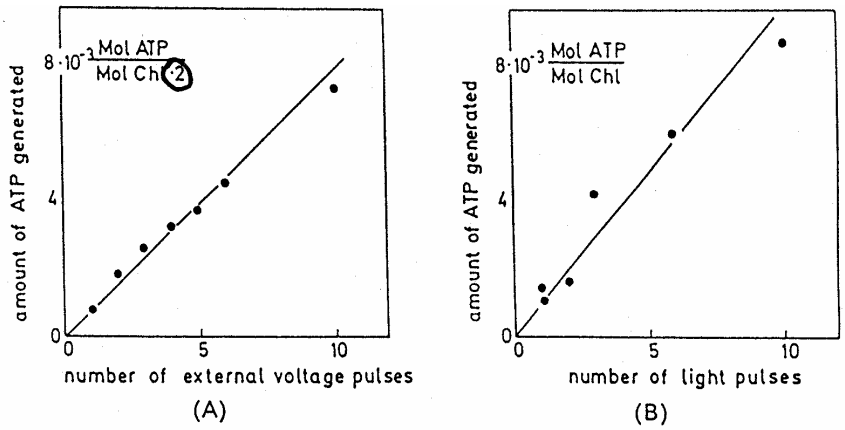


Abb. 11: ATP-Ausbeute, die durch eine externe Spannung im Dunkeln (A) und durch Lichtpulse (B) angetrieben wird.

Die Funktionen und Strukturen der Enzymkomplexe, die die Protonen im zentralen Abschnitt der mitochondrialen Atmungskette pumpen, ähneln denen des entsprechenden Abschnitts in der Elektronentransportkette von Bakterien und Chloroplasten (Abb. 12). Der Photosyntheseapparat der nicht schwefelhaltigen Purpurbakterien ist besonders einfach aufgebaut (Abb. 12 oben), und die beteiligten Proteine sind in ihrer atomaren Struktur bekannt. Daher ist dieser Photosyntheseapparat für detaillierte physikalische Untersuchungen besonders gut zugänglich. In den Purpurbakterien gibt es ein Reaktionszentrum, in dem lichtinduzierte Ladungstrennung erfolgt, worauf Chinon zu Chinol reduziert wird. Das Chinol wird zum Aufbau von NADH verwendet. Außerdem überträgt es Elektronen auf den bc_1-Komplex, der einen Protonengradienten aufbaut. Über ein wasserlösliches Cytochrom c_2 gelangen die Elektronen wie-

der zurück zum Reaktionszentrum. Im Folgenden werden die Energietransfer- und Elektronentransferprozesse diskutiert.

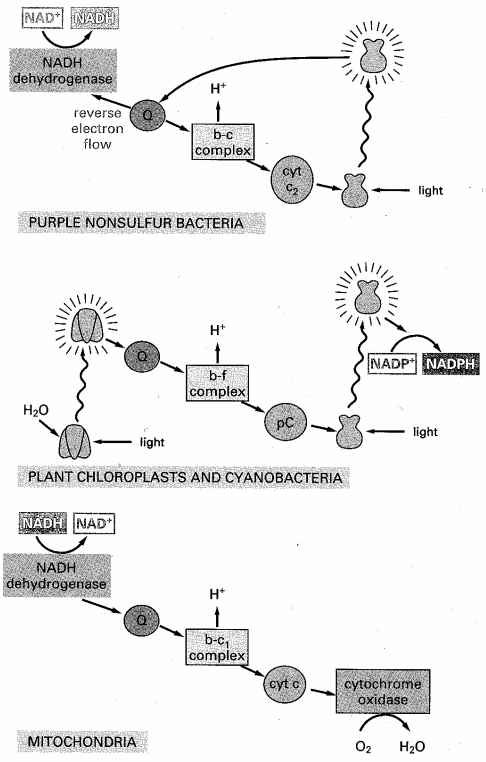


Abb. 12: Vergleich der Elektronentransportketten von Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien.

Bei der Photosynthese erfolgt die Lichtabsorption durch Photorezeptormoleküle. Der wichtigste Rezeptor in den Chloroplasten ist das Chlorophyll a, ein substituiertes Tetrapyrrol (Abb. 13).

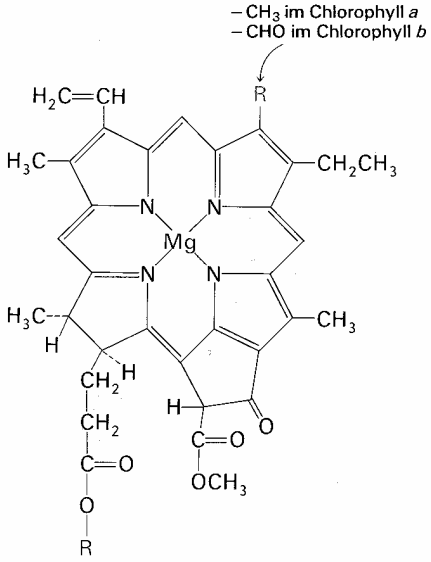


Abb. 13: Die Struktur der Chlorophylle a und b.

Die vier Stickstoffatome der Pyrrolringe sind mit einem Magnesiumion koordiniert. Das Chlorophyll ist also ein Magnesiumporphyrin. Das Chlorophyll b unterscheidet sich vom a-Typ dadurch, dass es eine Formylgruppe anstelle einer Methylgruppe in einem der Pyrrolringe besitzt. Die Absorptionsspektren der beiden Chlorophylle sind in Abb. 14 zu sehen.

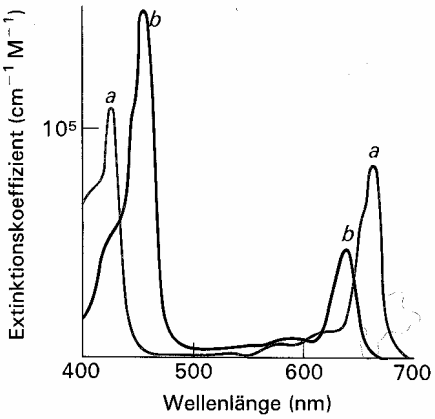


Abb. 14: Absorptionsspektren der Chlorophylle a und b.

Sie ergänzen sich bei der Absorption des einfallenden Sonnenlichts. Allerdings ist die Absorption im Bereich zwischen 500 und 600 nm relativ gering. Diese Wellenlängen werden von anderen Pigmenten absorbiert. Die bakteriellen Chlorophylle zeichnen sich durch starke Absorption im Bereich von 800 nm aus. Die Chlorophylle werden von den Carotinoiden bei der Lichtspeicherung unterstützt. In Abb. 15 ist der primäre photosynthetische Apparat der Membran des Purpurbakteriums zu sehen.

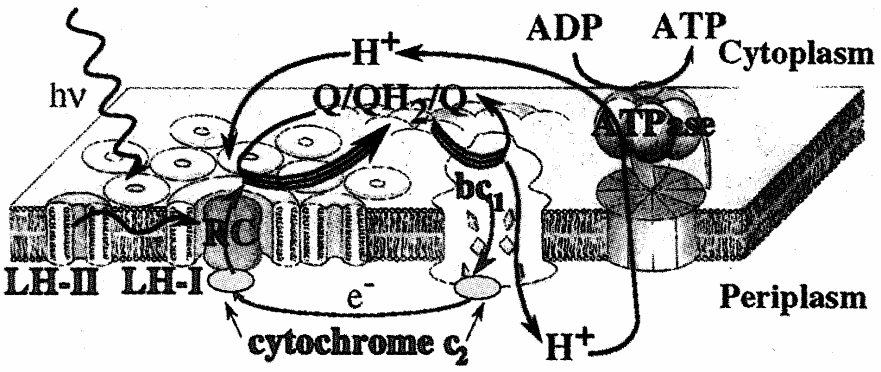


Abb. 15: Schematische Darstellung des photosynthetischen Apparates in der intrazytoplasmitischen Membran eines Purpurbakteriums.

Eine Ansammlung von lichtspeichernden Komplexen absorbiert das Licht und transferiert die gewonnene Energie zum Reaktionszentrum (RC). In den meisten Purpurbakterien besitzt die photosynthetische Membran zwei Typen von lichtsammelnden Komplexen, LH-I und LH-II. LH-I umgibt das RC, während LH-II nicht in direktem Kontakt zum RC steht, aber Energie über LH-I zum RC führt. Bei einigen Spezies existiert ein dritter lichtsammelnder Komplex, LH-III. Purpurbakterien absorbieren Licht hauptsächlich bei 500 nm durch Carotinoide und bei 800 nm durch Bakteriochlorophylle. Abb. 16 zeigt die Energieniveaus der wichtigsten elektronischen Anregungen.

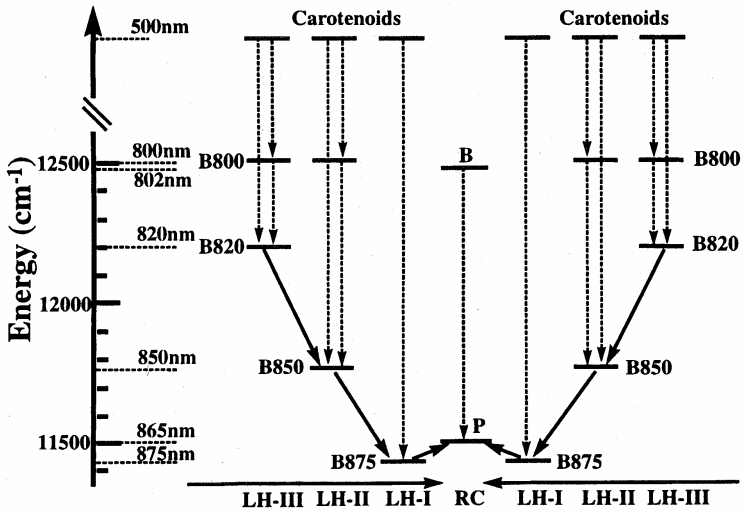


Abb. 16: Energieniveaus der elektronischen Anregungen in der photosynthetischen Einheit des Purpurbakteriums.

Das Diagramm illustriert das 'funneling' der Anregungsenergie zum photosynthetischen Zentrum. Die gestrichelten Linien repräsentieren Anregungen innerhalb, die durchgezogenen Linien Anregungen außerhalb eines Komplexes. In Abb. 17 ist eine Anordnung der LH-I- und LH-II-Komplexe um das Reaktionszentrum zu sehen. Die Struktur wurde mit Hilfe einer Computermodellierung erhalten. Lediglich die Strukturen des Reaktionszentrums und des LH-II-Komplexes sind bisher mit atomarer Auflösung bekannt. Die Struktur von LH-I wurde aus LH-II-Untereinheiten zusammengebaut und um das Reaktionszentrum herum angeordnet.

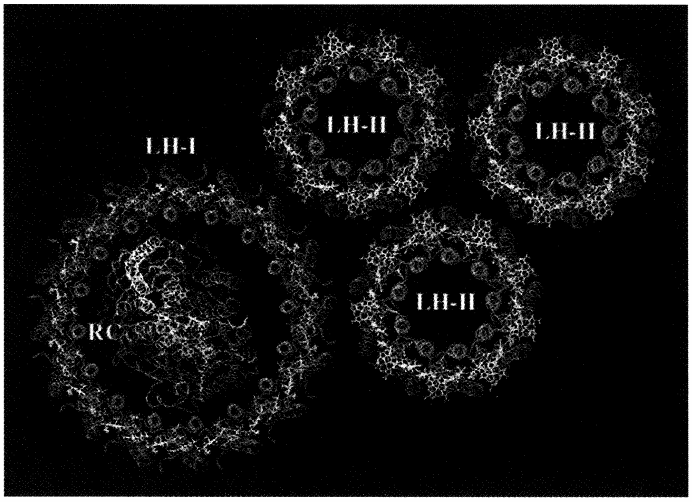


Abb. 17: Anordnung der LH-I und LH-II-Komplexe um ein RC.

Wird das Chlorophyll durch Lichtabsorption in einen angeregten elektronischen Zustand gebracht, so existieren verschiedene Möglichkeiten zur Rückkehr zum ursprünglichen, nicht angeregten Zustand (Abb. 18). a) Die Anregungsenergie kann in Wärme (molekulare Bewegungen) oder in eine Kombination von Wärme und Licht längerer Wellenlänge (Fluoreszenz) umgewandelt werden. b) Sie kann direkt auf ein benachbartes Chlorophyll-Molekül durch einen Prozess, der Resonanzenergietransfer (Förstertransfer) genannt wird, transferiert werden. Es gibt noch einen weiteren Mechanismus, den Dexter-Prozess, bei dem direkt Elektronen ausgetauscht werden. Dies tritt jedoch nur bei starker elektronischer Kopplung auf. c) Schließlich kann das angeregte Elektron an ein benachbartes Molekül (Elektronenakzeptor) gegeben werden. Durch die Aufnahme eines niederenergetischen Elektrons von einem ande-

ren Molekül (Elektronendonor) kehrt das ursprünglich angeregte Chlorophyll wieder in den Grundzustand zurück.
In Abb. 19 ist die Struktur von LH-II von *Rs. molischianum* gezeigt. Die α-helikalen Segmente sind als Zylinder dargestellt. Der Ring aus 16 Chlorophyll-Molekülen ist oben, der aus 8 Chlorophyll-Molekülen ist unterhalb zu sehen. Als Beispiel für ein photosynthetisches Reaktionszentrum ist in Abb. 20 das von *Blastochloris viridis* dargestellt.

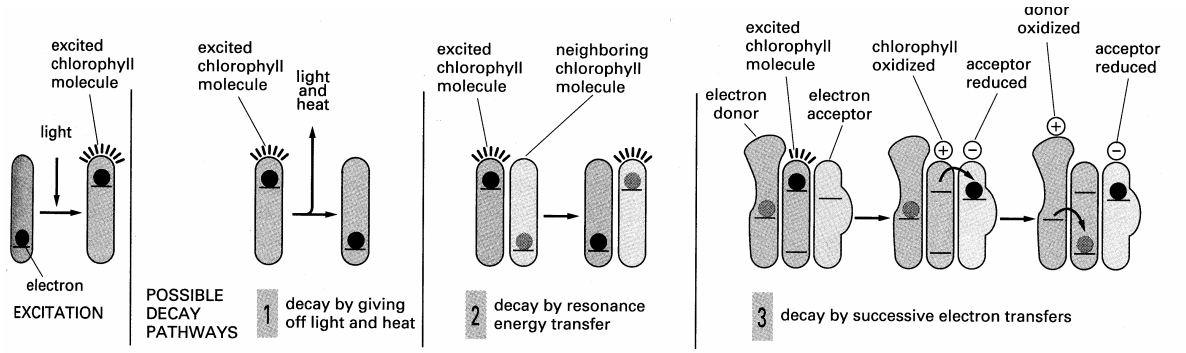


Abb. 18: Drei Möglichkeiten eines angeregten Chlorophyllmoleküls, nach Lichtanregung in den Grundzustand zurückzukehren.

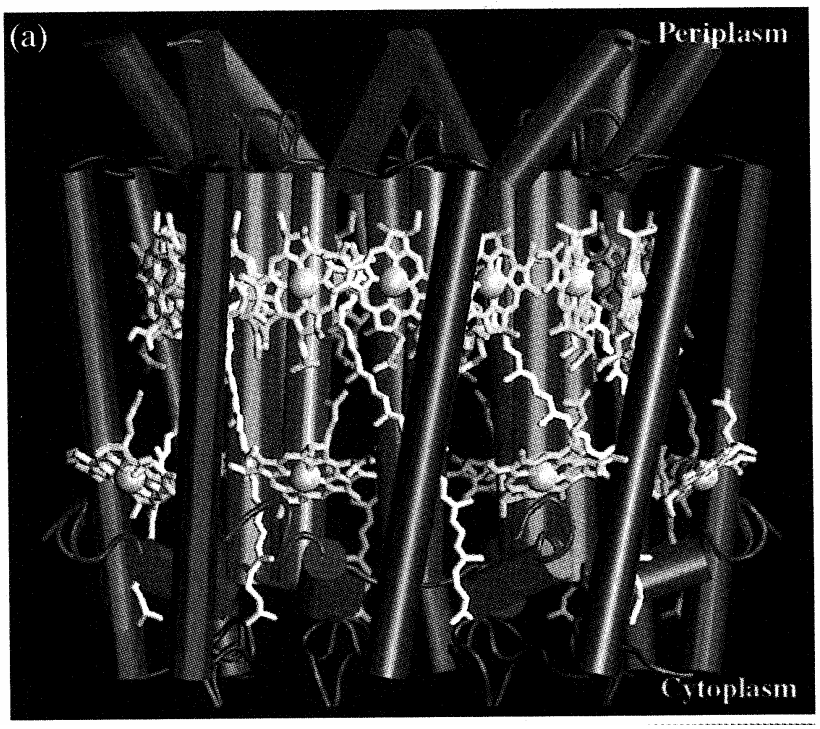


Abb. 19: LH-II-Komplex von Rs. molischianum.

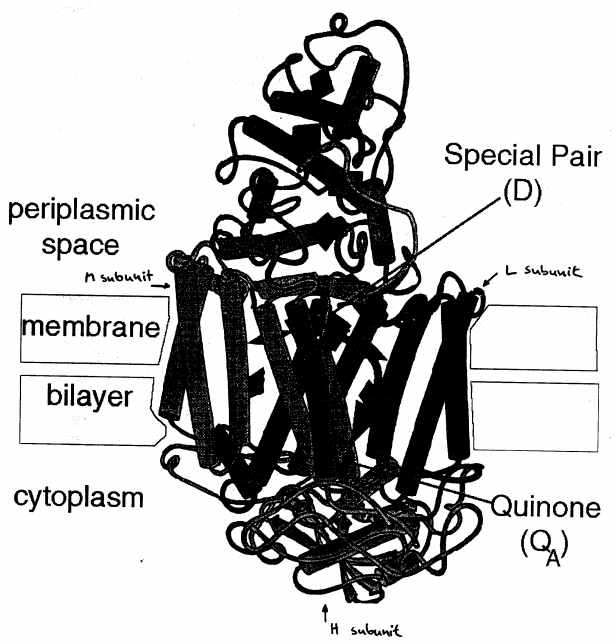


Abb. 20: Struktur des photosynthetischen Reaktionszentrums von *Blastochloris viridis.*

Das Reaktionszentrum besteht aus vier Polypeptiden, den Untereinheiten L, M, H und einem Cytochrom. Dieses liegt auf der einen Seite der Thylakoidmembran, der größte Teil der H-Untereinheit auf der anderen Seite. Die L- und M-Untereinheiten enthalten jeweils 5 Transmembranhelices. Vier Moleküle Bakteriochlorophyll b (BChl b) und zwei Chinone sind als Kofaktoren mit den L- und M-Untereinheiten assoziiert. Die Anregung des Reaktionszentrums führt zu einer Ladungstrennung. Im Reaktionszentrum wird ein Elektron über eine Reihe von Akzeptoren vom dimeren Bakteriochlorophyll (´special pair´) zum Chinon übertragen (Abb. 21). Das Cytochrom liefert das Elektron nach und wird selbst von einem wasserlöslichen Cytochrom c_2 wieder reduziert.

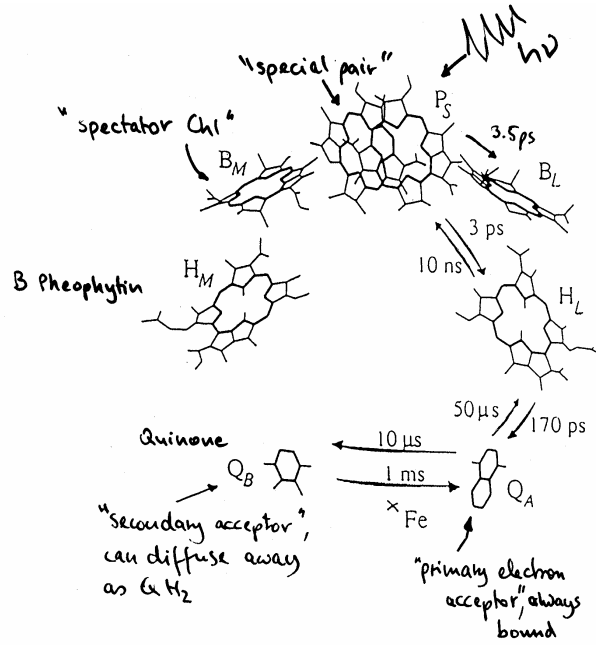


Abb. 21: Elektrontransfer im Reaktionszentrum.

Nachdem der Zyklus zweimal durchlaufen wurde, bindet Q_B Protonen (QH_2) und diffundiert in die Membran. Daraufhin bindet ein neues Q_B an das Reaktionszentrum, und der Prozess beginnt von Neuem. Falls kein Q_B vorhanden ist, rekombiniert das Elektron/Loch-Paar innerhalb von ~100 ms. Die Energieniveaus dieses Zyklus sind in Abb. 22 aufgeführt.

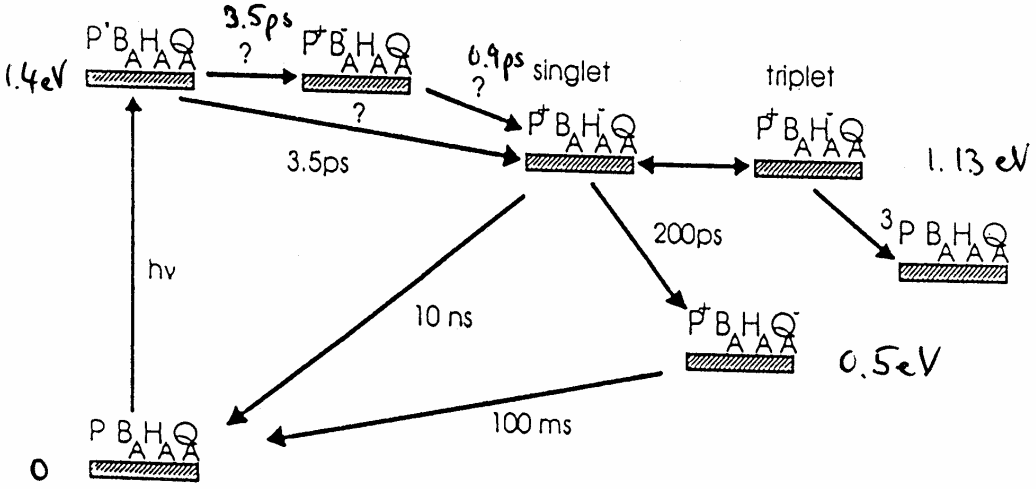


Abb. 22: Energieschema des Elektronentransferzyklus im Reaktionszentrum (in Abwesenheit von Q_B).

Die Rückwärtsreaktionen sind 100 bis 1000 mal langsamer als die Vorwärtsreaktionen. Somit ist die Quanteneffizienz nahe eins. Allerdings gehen fast 2/3 der freien Energie verloren. In Abb. 23 ist ein Überblick über die Energieumwandlung in *Blastochloris viridis* zu sehen. Die Lichtanregung erfolgt über die Lichtsammelkomplexe oder auch direkt über die Chlorophylle im Reaktionszentrum. Dort wird das Elektron auf das Chinon Q_B übertragen. Das Chinon wird nach Aufnahme eines zweiten Elektrons als QH_2 (Chinol) freigesetzt und diffundiert zum Cytochrom bc_1-Komplex, wo es wieder oxidiert wird. Die dabei entstehende Energie wird zum Aufbau eines Protonengradienten verwendet. Die Elektronen laufen über ein Cytochrom c_2 zum Reaktionszentrum zurück; das Chinon diffundiert in der Lipidschicht zum Reaktionszentrum zurück.

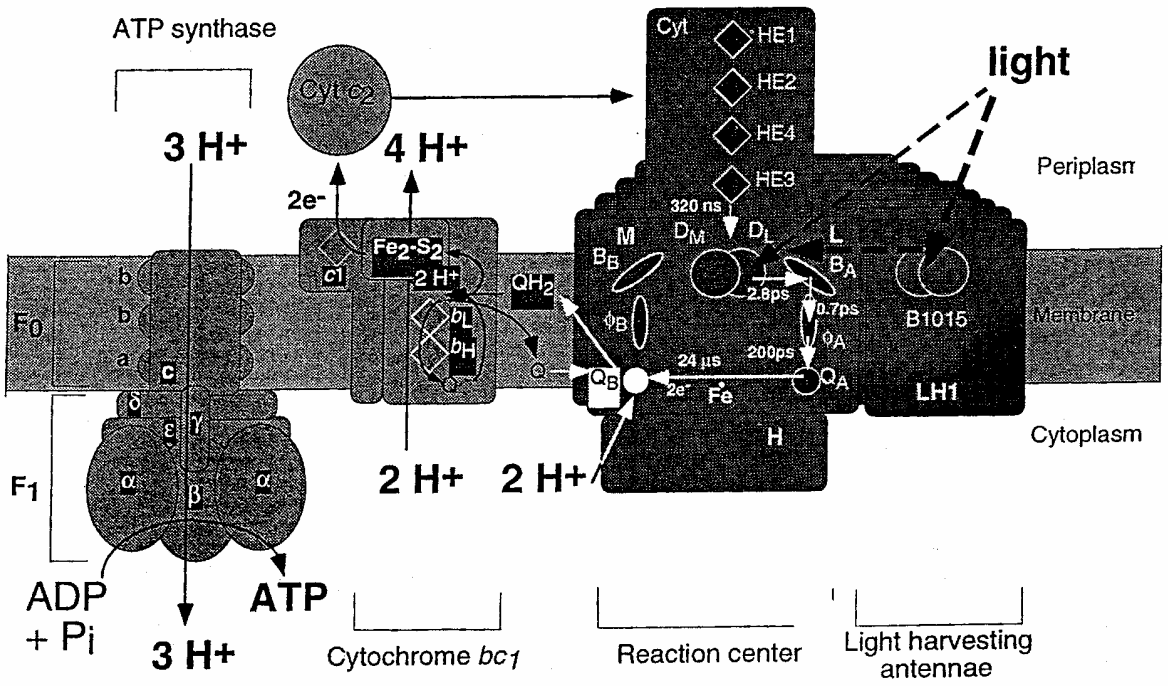


Abb. 23: Energiekonversion in *Blastochloris viridis.*

Energiespeicherung und Transfer bei der Photosynthese

Die Struktur von LH-II (LH-I) enthält einen Chlorophyllring, der sich aus 16 (32) Chlorophyllmolekülen zusammensetzt. Die Chromophore liegen so eng beieinander, dass die Anregungszustände nicht auf den einzelnen Chromophoren lokalisiert, sondern über den Ring delokalisiert sind. Die Struktur von LH II (*Rs. molischianum*) ist ein Oktamer von Dimeren; jeweils zwei Chlorophylle sind stärker aneinander gebunden als zu den übrigen Nachbarn. Durch diese starke Kopplung des Dimers und der schwächeren Kopplung des Oktamers von Dimeren kann das in Abb. 24 gezeigte Anregungsspektrum eines Doubletts von Oktetts erwartet werden.

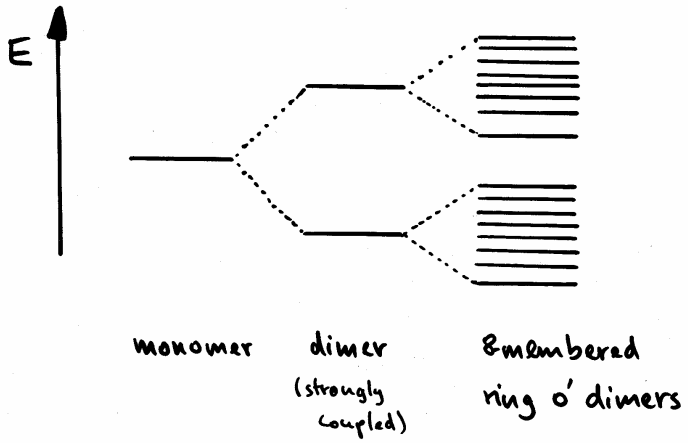


Abb. 24: Schematische Energieaufspaltung eines Oktetts von Dimeren.

Die Wechselwirkung von gekoppelten Monomeren in einem Dimer wurde bereits besprochen. Man erhält als Eigenfunktionen

$$\psi_+ = \frac{1}{\sqrt{2}}\left(\psi_1 + \psi_2 \right) ,$$

$$\psi_- = \frac{1}{\sqrt{2}}\left(\psi_1 - \psi_2 \right) ,$$

wobei gilt

$$\psi_0 = \phi_{10}\, \phi_{20} ,$$

$$\psi_1 = \phi_{1a}\, \phi_{20} ,$$

$$\psi_2 = \phi_{10}\, \phi_{2a} .$$

Hier ist φ_{ij} die Wellenfunktion der Monomere, deren erster Index sich auf das Teilchen 1 oder 2 und deren zweiter Index sich auf den Grundzustand (0) oder den angeregten Zustand (a) bezieht. Das ψ_+ beschreibt die antiparallele Ausrichtung der Dipolübergänge, die mit einer positiven Energiewechselwirkung verbunden ist, und ψ_- die parallele Ausrichtung. Abb. 25 zeigt die Orientierung der Übergangsdipolmomente (Bälkchen auf den Quadraten) in LH-II.

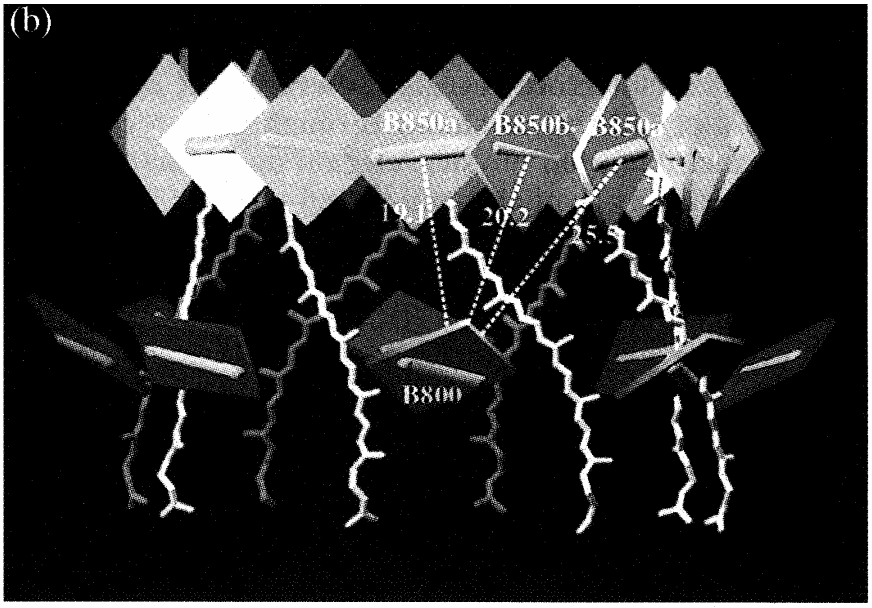


Abb. 25: Anordnung der Chromophore in LH-II.

Die Chlorophylle sind als Quadrate, die Carotinoide als längliche Strukturen dargestellt. Die 16 B850 Chlorophylle bilden einen kontinuierlichen Ring, während die 8 B800 Chlorophylle weiter auseinander liegen.
Im Folgenden soll auf die quantenmechanische Beschreibung dieser Energieaufspaltung eingegangen werden. Die relevanten elektronischen Anregungen werden mit den Anregungen einzelner Chlorophyllmoleküle Q_y beschrieben,

$$|\alpha\rangle = \psi_1(g)\psi_2(g)....\psi_{\alpha-1}(g)\psi_\alpha(Q_y)\psi_{\alpha+1}(g)...\psi_{2N}(g) \ ,$$

wobei $< \alpha|\alpha' > = \delta_{\alpha,\alpha'}$ (Orthonormalität) gilt. Folgende Wechselwirkungen werden mittels quantenmechanischer Rechnung ermittelt,

$$W_{12} = W_{21} = W_{j,j+1} = W_{j+1,j} = v_1 \qquad j = 1,3,5,7...,$$

$$W_{23} = W_{32} = W_{j,j+1} = W_{j+1,j} = v_2 \qquad j = 2,4,6,8...,$$

$$W_{13} = W_{31} = W_{j,j+2} = W_{j+2,j} = v_3 \qquad j = 1,3,5,7...,$$

Dies ist in Abb. 26 schematisch dargestellt.

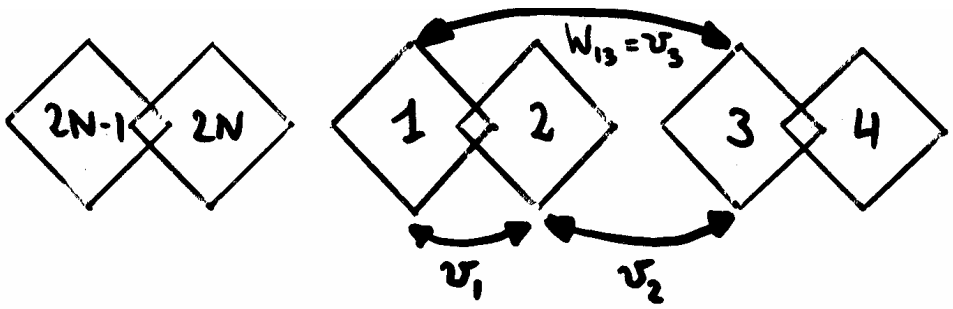


Abb. 26: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen v_1, v_2 und v_3.

Für die anderen Kopplungen wird eine elektrische Dipol-Dipol-Wechselwirkung angesetzt,

$$W_{jk} = C\left(\frac{\vec{d}_j \cdot \vec{d}_k}{r_{jk}^3} - \frac{3(\vec{r}_{jk} \cdot \vec{d}_j)(\vec{r}_{jk} \cdot \vec{d}_k)}{r_{jk}^5} \right),$$

mit

$$C = \nu_3 \left(\frac{\vec{d}_1 \cdot \vec{d}_3}{r_{13}^3} - \frac{3(\vec{r}_{13} \cdot \vec{d}_1)(\vec{r}_{13} \cdot \vec{d}_3)}{r_{13}^5} \right)^{-1}.$$

Hier stellen die $\vec{d}$-Vektoren Einheitsvektoren dar, der Betrag der Dipolstärke, $|D|$, und ε sind in C enthalten. Diese Konstante wird mit Hilfe von ν_3 bestimmt. Aus den quantenmechanischen Rechnungen ergibt sich $\nu_1 = 806\ \text{cm}^{-1}$, $\nu_2 = 377\ \text{cm}^{-1}$, $\nu_3 = -152\ \text{cm}^{-1}$. Der Hamiltonian kann dann wie folgt geschrieben werden,

$$\hat{H} = \begin{pmatrix}
\varepsilon & \nu_1 & W_{1,3} & W_{1,4} & \cdots & & W_{1,2N-1} & \nu_2 \\
\nu_1 & \varepsilon & \nu_2 & W_{2,4} & \cdots & & W_{2,2N-1} & W_{2,2N} \\
W_{3,1} & \nu_2 & \varepsilon & \nu_1 & \cdots & & W_{3,2N-1} & W_{3,2N} \\
W_{4,1} & W_{4,2} & \nu_1 & \varepsilon & \cdots & & \cdot & \cdot \\
\cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdots & & \cdot & \cdot \\
\cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdots & & \cdot & \cdot \\
\cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdots & & \cdot & \cdot \\
\cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdots & \varepsilon & \nu_2 & W_{2N-2,2N} \\
\cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdots & \nu_2 & \varepsilon & \nu_1 \\
\nu_2 & \cdot & \cdot & \cdot & \cdots & W_{2N,2N-1} & \nu_1 & \varepsilon
\end{pmatrix},$$

wobei ε die Selbstenergie ist. Für unseren Fall (B850 des LH-II-Systems) kann der Hamiltonian in eine Form gebracht werden, die die dimere Struktur des Chlorophyllaggregats mit C_8-Symmetrie beschreibt:

$$\hat{H} = \begin{pmatrix}
\hat{H}_{11} & \hat{H}_{12} & \cdots & & \hat{H}_{18} \\
\hat{H}_{21} & \hat{H}_{22} & \cdots & & \hat{H}_{28} \\
\cdot & \cdot & \cdots & & \cdot \\
\cdot & \cdot & \cdots & & \cdot \\
\cdot & \cdot & \cdots & & \cdot \\
\cdot & \cdot & \cdots & & \cdot \\
\cdot & \cdot & \cdots & & \cdot \\
\hat{H}_{81} & \hat{H}_{82} & \cdots & & \hat{H}_{88}
\end{pmatrix}$$

Durch Vergleich findet man die 2×2 – Matrizen H_{ij}, z.B.

$$\hat{H}_{11} = \begin{pmatrix} \varepsilon & \nu_1 \\ \nu_1 & \varepsilon \end{pmatrix}.$$

Aufgrund der C_8-Symmetrie des Chlorophyllaggregats folgen die Symmetrieeigenschaften

$$\hat{H}_{jk} = \hat{H}_{j+m,k+m}.$$

Ebenfalls gilt

$$W_{ij} = W_{ji}\,, \qquad \hat{H}_{ij} = \hat{H}^{+}_{ji}\ .$$

Aufgrund der zyklischen Randbedingungen folgt

$$\psi(s) = \psi(s + M \cdot L)$$

wobei s die Koordinate auf dem Kreis, L der Umfang und M eine ganze Zahl ist. Die Eigenvektoren des Hamiltonian ergeben sich zu

$$\left|n,\beta\right\rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^{N} \exp\left(2\pi\, i\, n \frac{k}{N}\right) \left|k,\beta\right\rangle\ ,$$

wobei n die Kennzeichnung der Eigenfunktionen des Oktetts (N = 8) und β die des Dimers darstellt. Hier ist

$$\left|k,\beta\right\rangle^{+} = (0.....1.....0)\nu_{k\beta}{}^{+}\,.$$

k-te Position

Das zu lösende Eigenwertproblem ist dann

$$\hat{H}\left|n,\beta\right\rangle = E_{n,\beta}\left|n,\beta\right\rangle\ ,$$

$$\left(\sum_{k=1}^{N} \hat{H}_{jk} \exp\left[2\pi\, i(k-j)\frac{n}{N}\right]\right) \exp\left[2\pi\, ij\frac{n}{N}\right] \nu_{n\beta} = E_{n\beta} \exp\left[2\pi\, ij\frac{n}{N}\right] \nu_{n\beta}\ .$$

Durch die obige Symmetrieeigenschaft folgt, dass

$$\hat{h}_n = \sum_{k=1}^{N} \hat{H}_{jk} \exp\left[2\pi\, i(k-j)\frac{n}{N}\right]$$

nicht von j abhängt. Somit gilt

$$\hat{h}_n \nu_{n\beta} = E_{n,\beta} \nu_{n,\beta}\ .$$

Mit Hilfe dieser Gleichung kann das Spektrum berechnet werden. Für $\nu_1 > 0$, $\nu_2 > 0$, $\nu_1 > \nu_2$ erhält man das in Abb. 27 dargestellte Spektrum.

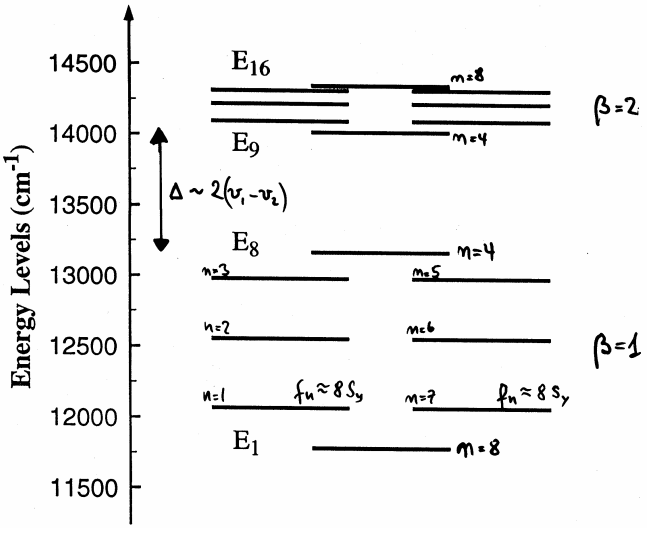


Abb. 27: Energieschema der Eigenzustände des effektiven Hamiltonian des B850 Chlorophylls in LH-II. Der Wert von ε wurde so gewählt, dass E_2 bzw. E_3 mit dem spektralen Maximum des zirkularen Aggregats bei 850 nm übereinstimmt.

Die Oszillatorenstärken aller Zustände sind Null, mit Ausnahme des entarteten Paares E_2/E_3. Dies wird durch folgende Betrachtung anschaulich: Abb. 28 zeigt die Oszillatorenstärken für den niedrigsten angeregten und den höchsten angeregten Zustand für $\beta = 1$ (E_1/E_8).

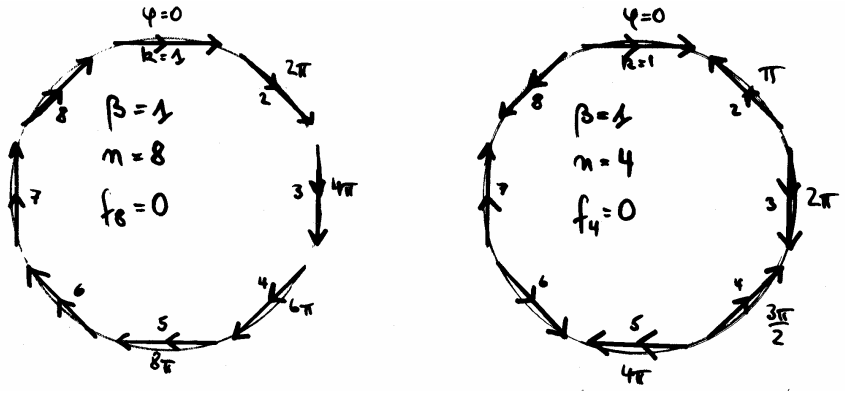


Abb. 28: Anordnung der Oszillatorenstärken für den energetisch niedrigsten (links) und höchsten Zustand (rechts) für $\beta = 1$.

Im ersten Fall beträgt die Phasenverschiebung zwischen den Dimeren 2π, im zweiten π. Werden die Oszillatorstärken vektoriell aufaddiert, so ergibt sich als Summe Null. In Abb. 29 sind die Oszillatorstärken der Dimere für $n = 1$ und $n = 7$ zu sehen (E_2/E_3).

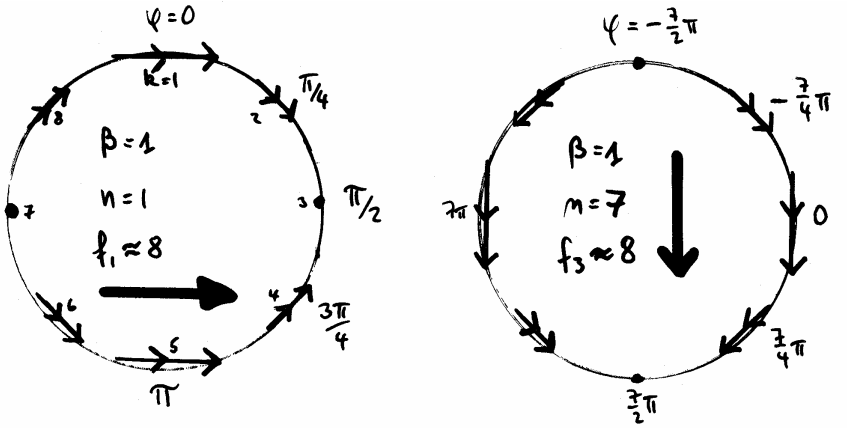


Abb. 29: Anordnung der Oszillatorstärken der Dimere für $n = 1$ und $n = 7$ und $\beta = 1$ (E_2 bzw. E_3).

In diesen Fällen sind die Phasenverschiebungen zwischen den Oszillatorenstärken der Dimere so, dass sie sich nicht wegmitteln. Bei dem oberen Oktett ($\beta = 2$) verschwinden alle Oszillatorenstärken ($\beta = 2$, $n = 8$ hat $f \sim 0.25$, alle anderen haben eine beträchtlich kleinere Oszillatorstärke). Es folgt also aus obigen Berechnungen, dass der niedrigste Exzitonenzustand nicht abstrahlt und somit einen effizienten Energiespeicher darstellt.

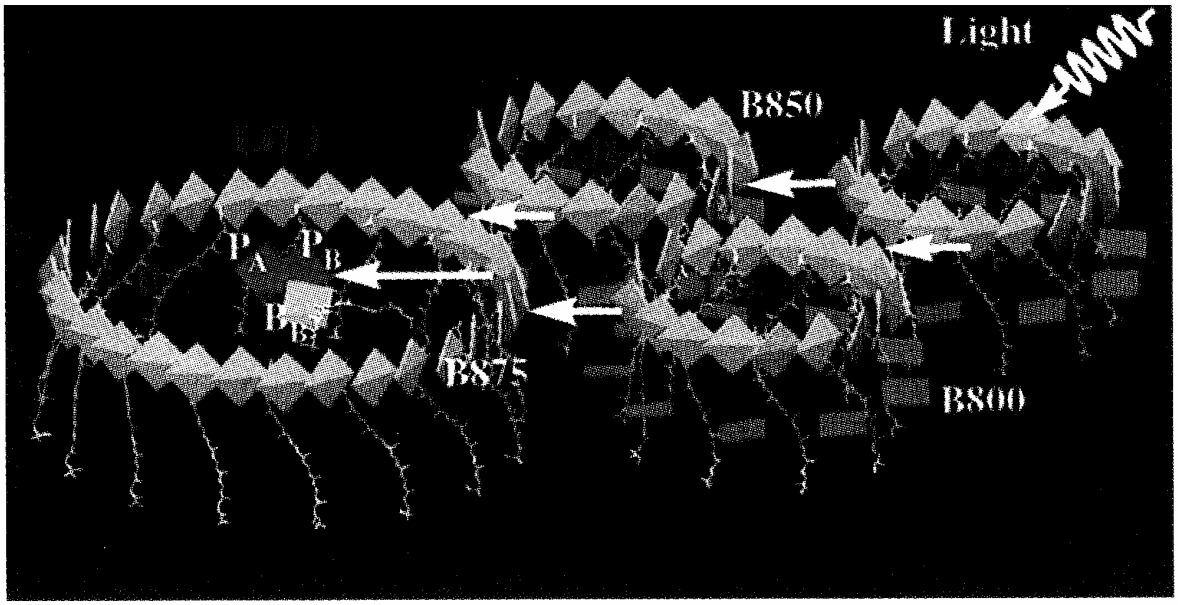


Abb. 30: Anregungstransfer in der bakteriellen photosynthetischen Einheit. Die LH-II (drei Komplexe rechts) haben zwei Typen von Chlorophyllen (B850 und B800). Das LH-I (Ring um RC) besitzt nur einen Chlorophylltyp (B875).

Nun stellt sich die Frage, wie der Anregungstransfer von LH-II zu LH-II abläuft (Abb. 30). Es wird ein Zweiring LH-II-System betrachtet, das mit einer Hamiltonian-Matrix mit 32 Dimensionen beschrieben werden kann,

$$\hat{H} = \begin{pmatrix} \hat{R}_{11} & \hat{R}_{12} \\ \hat{R}_{21} & \hat{R}_{22} \end{pmatrix} .$$

Die Diagonalelemente beschreiben die Kopplung innerhalb der Ringe 1 und 2, während $R_{12}\,(i,j) = W_{i,j}$ die Kopplung zwischen Ring 1 und 2 repräsentieren, wobei $i = 1 \ldots 16$ der Index des Ringes 1 und j der des Ringes 2 ist. Außerdem gilt

$$\hat{R}_{12} = \hat{R}_{21}^{+} .$$

Das Problem wird viel einfacher, falls nur der niedrigste Exzitonenzustand eines jeden Ringes betrachtet wird, $\left|\omega_1^1\right\rangle, \left|\omega_1^2\right\rangle$. Die Dynamik des Zweizustandssystems wird dann durch den Hamiltonian

$$H^1 = \begin{pmatrix} \left\rangle w_1^1 \right| \hat{H} \left| w_1^2 \right\langle & \left\rangle w_1^2 \right| \hat{H} \left| w_1^1 \right\langle \\ \left\rangle w_1^1 \right| \hat{H} \left| w_1^2 \right\langle & \left\rangle w_1^2 \right| \hat{H} \left| w_1^2 \right\langle \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} E_0 & A \\ A & E_0 \end{pmatrix}$$

beschrieben. Für die Wellenfunktion folgt

$$\psi = C_1(t)\left| w_1^1 \right\rangle + C_2(t)\left| w_1^2 \right\rangle .$$

Die Zeitentwicklung erhält man mit

$$i\hbar \frac{\partial c_1}{\partial t} = E_0 c_1 + A c_2 ,$$

$$i\hbar \frac{\partial c_2}{\partial t} = A c_1 + E_0 c_2 \ .$$

Mit den Anfangsbedingungen

$$c_1(0) = 1 \quad \text{und} \quad c_2(0) = 0$$

erhält man die Lösungen

$$c_1(t) = \exp\left[-\frac{i}{\hbar} E_0 t\right] \cos\frac{At}{\hbar} \ ,$$

$$c_2(t) = -i \exp\left[-\frac{i}{\hbar} E_0 t\right] \sin\frac{At}{\hbar} \ .$$

Für die Wahrscheinlichkeit, dass Ring 2 angeregt ist, falls Ring 1 bei $t = 0$ angeregt war, ergibt sich

$$\left|c_2\right|^2 = \sin^2 \frac{\left\langle w_1^2 \middle| \hat{H} \middle| w_1^1 \right\rangle}{\hbar} t \ .$$

Quantitativ erhält man $\left\langle w_1^2 \middle| \hat{H} \middle| w_1^1 \right\rangle = 2.3 \text{ cm}^{-1}$; woraus $\tau = 7$ ps folgt (Abb. 31).

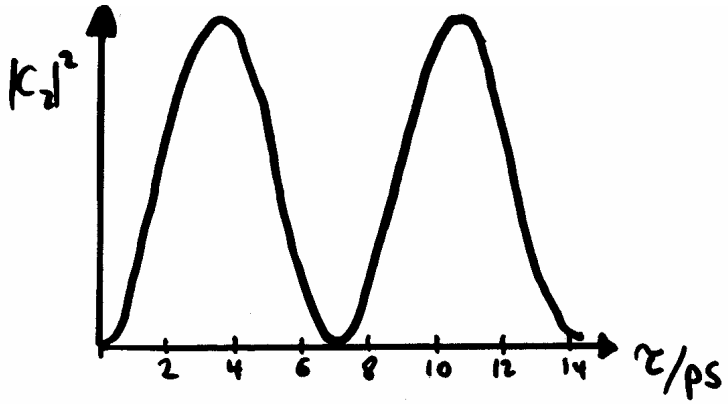


Abb. 31: $\left|c_2\right|^2$ **in Abhängigkeit von der Zeit.**

Der Energietransfer von LH-II zu LH-I wird ähnlich dem Transfer von LH-II zu LH-II behandelt, nur dass die Hamilton-Matrix nun 16 + 32 = 48 Komponenten hat. Wiederum ist eine vereinfachende Behandlung möglich. Der niedrigste Zustand des LH-II ist energetisch den Zuständen E_2/E_3 des LH-I benachbart, welche somit die energieaufnehmenden Zustände sein sollten. Man erhält für das Matrixelement $\left\langle w_1^1 \middle| \hat{H} \middle| w_2^2 \right\rangle \approx 5 \text{ cm}^{-1}$ und somit in Übereinstimmung mit dem Experiment $\tau = 3.3$ ps.
Abschließend soll noch der Energietransfer von LH-I zu dem Reaktionszentrum betrachtet werden. Das einfachste Modell berücksichtigt den niedrigsten Exzitonenzustand |1> von LH-I und den Dimerzustand Q_y des 'speziellen Paars', |2> und |3>. Somit folgt für den Hamiltonian

$$\hat{H}_1 = \begin{pmatrix} \varepsilon_1 & v_{12} & v_{13} \\ v_{12} & \varepsilon_2 & v_{sp} \\ v_{13} & v_{sp} & \varepsilon_2 \end{pmatrix},$$

wobei ε_1= 1135 cm^{-1}, ε_2 = 12560 cm^{-1}, v_{sp} = 1000 cm^{-1}, v_{12} = 0.46 cm^{-1}, v_{13} = 0.50 cm^{-1} ist. Diese spiegeln wieder, dass die Chlorophylle des 'speziellen Paares' sehr viel stärker miteinander koppeln als mit dem ersten Grundzustand des Exzitons in LH-I. Mit diesem Hamiltonian erhält man für die Kopplung von $|1\rangle$ mit dem niederenergetischen Dimerzustand 0.028 cm^{-1}, woraus τ = 595 ps folgt. Die beobachtete Transferzeit ist aber τ = 35 ps. Daraus folgt, dass das obige einfache Modell nicht ausreichend ist. Werden die 'accessory'-Chlorophylle auch noch in das Modell integriert (Zustände $|4\rangle$, $|5\rangle$), so folgt

$$\hat{H}_2 = \begin{pmatrix} \varepsilon_1 & v_{12} & v_{13} & v_{14} & v_{15} \\ v_{12} & \varepsilon_2 & v_{sp} & w_{24} & w_{25} \\ v_{13} & v_{sp} & \varepsilon_2 & w_{34} & w_{35} \\ v_{14} & w_{24} & w_{34} & \varepsilon_3 & w_{45} \\ v_{15} & w_{25} & w_{35} & w_{45} & \varepsilon_3 \end{pmatrix},$$

womit eine Transferzeit τ = 65 ps erhalten wird. Dies liegt wesentlich näher an dem experimentellen Wert, d.h. die 'accessory'-Chlorophylle sind für den Energietransfer von LH-I zu dem Reaktionszentrum relevant. Abb. 32 zeigt schematisch die Wege, über die die Energie-Anregungen von 500 nm und 800 nm-Photonen das Reaktionszentrum erreichen.

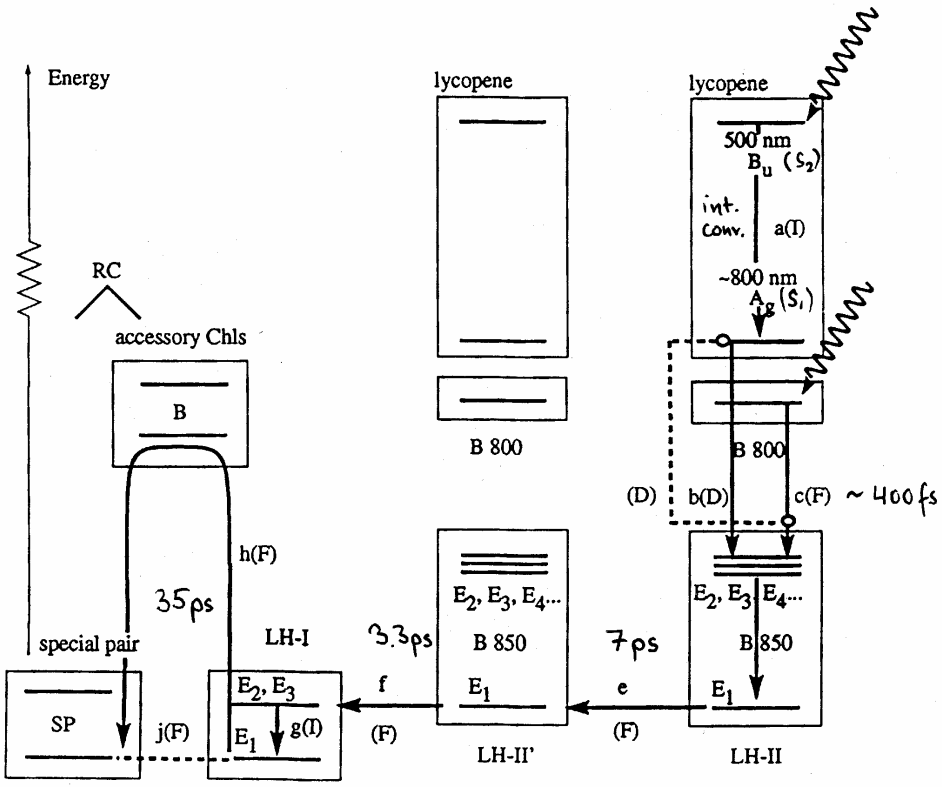


Abb. 32: Schema der Anregungstransferwege eines 500 nm und 800 nm-Photons in der photosynthetischen Einheit.

Elektronentransfer in der Biologie – Theorie und Experiment

Der Elektronentransfer spielt eine entscheidende Rolle beim Energietransport in biologischen Systemen. Sowohl die Photosynthese als auch die Atmung basieren auf dem Prinzip des vektoriellen Transports von Elektronen und Protonen durch eine Membran. Im Folgenden wird untersucht, welche physikalischen Parameter den Elektronentransferprozess bestimmen. Konkret auftretende Fragen sind: Warum gibt es einen ungenutzten Zweig im Reaktionszentrum? Der L-Zweig wird zu über 99 % genützt, der M-Zweig nur zu weniger als 1 %. Warum verwendet Mutter Natur mehr als ein Redoxpaar, um die Membran zu überbrücken? Was macht die Vorwärtsreaktion so viel schneller als die Rückwärtsreaktion (die Quantenausbeute somit nahezu 1)?
Die klassische Version der Elektronentransfertheorie wurde in den Fünfziger- und Sechzigerjahren von Rudy Marcus entwickelt. Sie behandelt den Energietransfer zwischen Ionenpaaren in Lösungen und Ion-Elektroden-Wechselwirkungen, kann aber leicht für die Beschreibung des intramolekularen Energietransfers in biologischen Komplexen mit festem Donor-Akzeptor-Abstand angepasst werden. Marcus verwendete das Konzept eines Komplexes mit schwacher Donor-Akzeptor-Wechselwirkung (andernfalls hätten die beobachteten Reaktionsraten viel schneller sein sollen). In seiner Theorie ist die Energieerhaltung und das Frank-Condon-Prinzip integriert, das zuvor von Libby in dieses Problem eingeführt wurde und das besagt, dass eine sehr schnelle Veränderung der elektronischen Konfiguration ohne Veränderung der Kernkoordinaten möglich ist. In Abb. 33 ist ein Beispiel einer Elektronentransferreaktion in Lösung zu sehen.

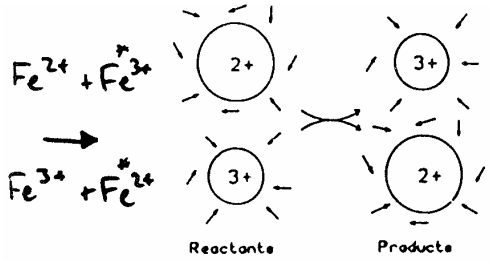


Abb. 33: Typische nukleare Konfiguration für die Reaktanten, Produkte und umgebende Lösungsmittelmoleküle in Lösung.

Diese Reaktion kann durch folgende Kernpotentiale für die Reaktanten und Produkte dargestellt werden (Abb. 34).

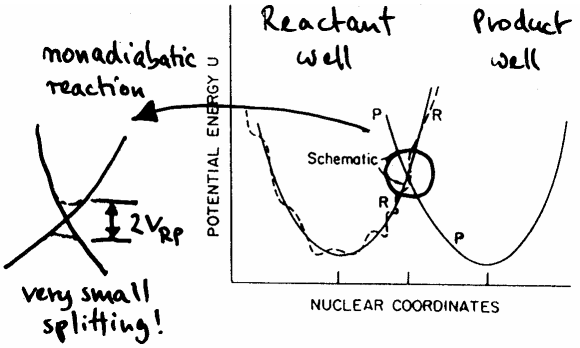


Abb. 34: Potential-Energieoberflächen für Reaktanten und Umgebung (R) und für Produkte und Umgebung, (P). Durchgezogene Kurven: schematisch; gestrichelte Kurve: schematisch, aber realistischer. Die Aufspaltung am Kreuzungspunkt ist links vom Diagramm dargestellt.

Aufgrund der schwachen Kopplung kommt es zu einer sehr kleinen Aufspaltung der Potentialkurven am Kreuzungspunkt (nichtadiabatische Reaktion). Neben den Kernpotentialen muss auch das elektronische System betrachtet werden (Abb. 35).

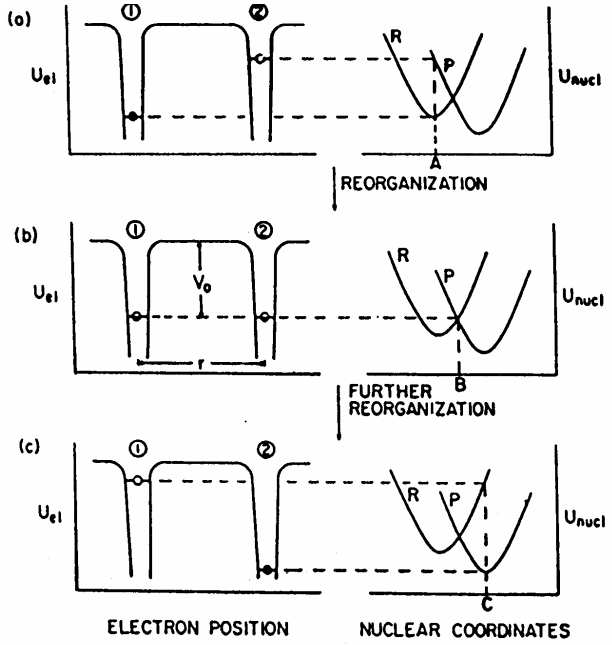


Abb. 35: Elektronische Energiekurven (links) und die korrespondierenden Kernenergiekurven (rechts) für den Anfangszustand mit dem Elektron beim Donor (a), den Übergangszustand (b) und den Endzustand mit dem Elektron beim Akzeptor (c).

Das elektronische System wird durch zwei Potentialmulden 1 und 2 beschrieben. Die endliche Größe der Barriere ermöglicht eine Kopplung und dadurch den Übergang. Die Energieniveaus in den Potentialmulden sind vertikale Ionisationsenergien. Das Energieniveau in Potential 1 ist anfänglich in (a) und das in Potential 2 in (c) besetzt. Falls sich das System aufgrund von Fluktuationen in den Kreuzungsbereich der Potentiale begibt, kann es zu der Produktkurve hinübergehen und zum Boden des Produktpotentials relaxieren. Abb. 36 zeigt nochmals die Kernpotentiale der Reaktanten und der Produkte sowie die Definition der Größen λ, ΔG^0, ΔG^*. λ ist gleich der Energie, die aufgewendet werden muss, um entlang des Produktpotentials durch Störung der Kernkoordinaten von der mittleren Produktkonfiguration zur Reaktantenkonfiguration zu gehen.

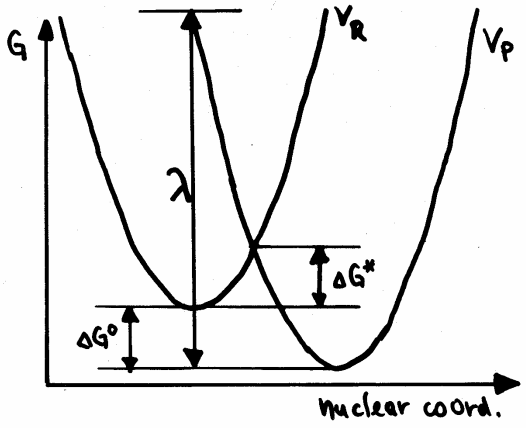


Abb. 36: Kernpotentiale für die Reaktanten und die Produkte.

Für die Reaktionsrate gilt somit

$$k = A e^{-\Delta G^*/RT},$$

mit

$$\Delta G^* = \frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda}.$$

Der Arrheniusvorfaktor A beinhaltet die Kollisionsfrequenz und die elektronische Kopplung, die durch die elektronische Tunnelwahrscheinlichkeit ($\sim e^{-\beta R}$) beschrieben wird. Der allgemeine Ausdruck lautet dann (Marcusgleichung)

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} V_0^2 e^{-\beta R} \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda kT}} e^{-\frac{(\lambda+\Delta G^0)^2}{4\lambda kT}}.$$

Der Faktor V_0^2 beschreibt die elektronische Kopplung beim Abstand 0. In Abb. 37 ist dargestellt, wie sich die freie Energie für verschiedene Werte für ΔG^0 ändert.

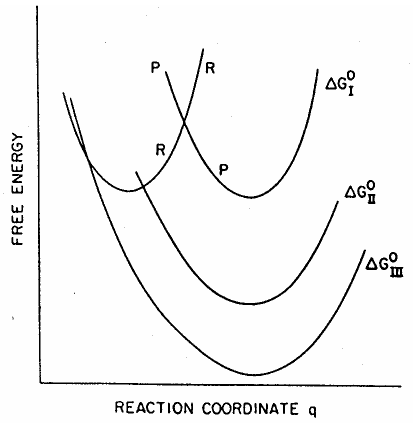


Abb. 37: Die freie Energie als Funktion der Kernkoordinate für die Reaktanten R und die Produkte P für drei verschiedene Werte von ΔG^0.

Wird ΔG^0 vergrößert, so wird ΔG^* kleiner und somit aufgrund der kleineren Barriere der Ratenkoeffizient größer. Ab einem bestimmten ΔG^0-Wert allerdings steigt ΔG^* wieder an, der Ratenkoeffizient wird also wieder kleiner (invertierter Bereich, Abb. 38).

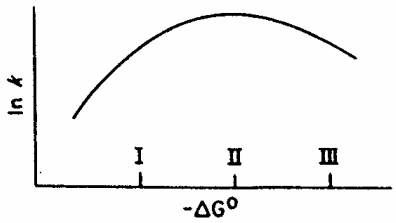


Abb. 38: Verlauf von ln k versus ΔG^0. Die Punkte I bzw. III befinden sich in der normalen bzw. in der invertierten Region. Beim Maximum der Kurve (Punkt II) ist $\Delta G^0 = \lambda$.

Dieser Verlauf der Reaktionsrate wurde experimentell verifiziert. Dazu wurden an einem Akzeptormolekül über eine feste Brücke, die einen gleichen Abstand gewährleistet, verschiedene Akzeptoren gebunden, die verschiedene ΔG^0- Werte haben. Durch Messung der Reaktionsraten konnte das Vorhandensein des invertierten Bereichs bestätigt werden Abb. 39).

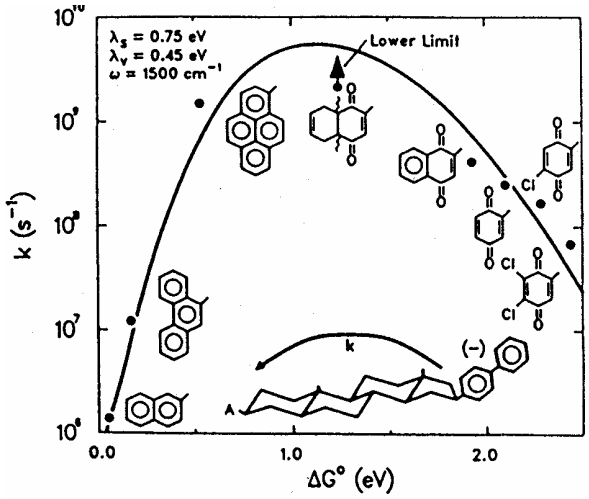


Abb. 39: Experimenteller Nachweis des invertierten Bereiches in chemischen Elektronentransferreaktionen.

Eine quantenmechanische Ableitung der Reaktionsraten wurde von Jortner publiziert (BBA, 594 (1980) 193-230). Es werden zwei Zustände betrachtet. Der Zustand *a* entspricht dem Zustand des Donors und Akzeptors vor und der Zustand *b* nach dem Transfer eines Elektrons vom Donor zum Akzeptor. Es besteht eine schwache Kopplung, so dass der (metastabile) Zustand *a* über einen nichtadiabatischen Transfer in den Zustand *b* übergeht. Dieser Übergang ist irreversibel aufgrund der großen Dichte der Zustände in *b* und der Schwingungsrelaxationen. Wird die Born-Oppenheimer-Näherung verwendet, so erhält man für die Wellenfunktionen der Zustände *a* und *b*

$$\psi_{a,v} = \phi_a(\vec{r};\vec{q})\chi_{av}(\vec{q}) \ ,$$

$$\psi_{b,w} = \phi_b(\vec{r};\vec{q})\chi_{bw}(\vec{q}) \ ,$$

wobei der elektronische Teil der Wellenfunktion mit φ und der nukleare Teil mit χ beschrieben wird. Die elektronischen Koordinaten sind durch $\vec{r}$, die Kernkoordinaten (Normalmoden) durch $\vec{q}$ gegeben, und *v* bzw. *w* stellen die Schwingungsmannigfaltigkeiten (Satz von Schwingungsquantenzahlen) dar. Die Kernbewegungen werden durch die vieldimensionalen Energieoberflächen $U_a(\vec{q})$ und $U_b(\vec{q})$ bestimmt. Zwischen den Zuständen *a* und *b* besteht eine schwache Kopplung (Ein-Elektron-zwei-Zentrums-Austauschwechselwirkung):

$$V_{av,bw} = \int d\vec{r} \int d\vec{q}\, \phi_a(\vec{r},\vec{q})\chi_{av}(\vec{q})\hat{V}(\vec{r})\phi_b(\vec{r},\vec{q})\chi_{bw}(\vec{q}) \ ,$$

die nur den elektronischen Teil der Wellenfunktion beeinflusst (Condon-Approximation):

$$V_{av,b\omega} = \left\langle \phi_a \middle| \hat{V} \middle| \phi_b \right\rangle \langle \chi_{av} | \chi_{bw} \rangle \ .$$

Der mikroskopische Ratenkoeffizient *k* für den nichtadiabatischen Übergang von *a* nach *b* ist durch Fermi's goldene Regel gegeben:

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} \sum_{\omega} \left| V_{av,b\omega} \right|^2 \cdot \delta(E_{b\omega} - E_{av}) \ ,$$

$$= \frac{2\pi}{\hbar} |V|^2 \cdot \sum_{\omega} |\langle \chi_{av} | \chi_{bw} \rangle|^2 \ \delta(E_{b\omega} - E_{av}) \ .$$

Hier ist $V = \langle \psi_a | \hat{V} | \psi_b \rangle$ das elektronische Kopplungsmatrixelement. Gewöhnlich wird angenommen, dass der Elektronentransferprozess von einer ursprünglichen Schwingungsmannigfaltigkeit im thermischen Gleichgewicht stattfindet,

$$k_{ab} = \frac{2\pi}{\hbar} |V|^2 FC ,$$

wobei

$$FC = \sum_v \sum_w \rho_v \left| \langle \chi_{av} \mid \chi_{bw} \rangle \right|^2 \delta \left(E_{bw} - E_{av} \right) ,$$

$$\rho_v = \frac{\exp\left(-E_{av} / k_B T\right)}{\sum_v \exp\left(-E_{av} / k_B T\right)} .$$

In guter Näherung gilt

$$|V|^2 \approx |V_0|^2 e^{-\beta R} .$$

Für Elektronentransfer entlang kovalenter Bindungen findet man $\beta = 0.7$ Å^{-1}, für das Vakuum $\beta = 2.8$ Å^{-1} und für Proteine $\beta = 1.4$ Å^{-1}. Abb. 40 veranschaulicht das Kernüberlappungspotential (Frank-Condon Faktor).

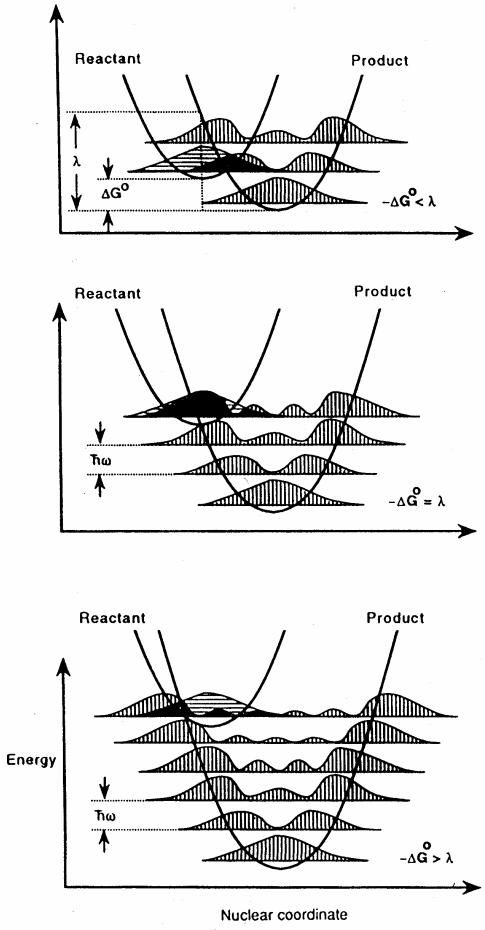


Abb. 40: Frank-Condon-Prinzip für drei Elektrontransferreaktionen mit unterschiedlich großer freier Enthalpie.

Beachten Sie, dass hier Wahrscheinlichkeitsdichten des harmonischen Oszillators in die Energieparabeln eingezeichnet sind, also Betragsquadrate der Wellenfunktionen, nicht die Wellenfunktionen selbst. Der Frank-Condon-Faktor ist proportional dem Quadrat des Überlapps der Kernwellenfunktion des Reaktanten (horizontale Schattierung) und der des Produkts (vertikale Schattierung). Der Überlapp ist maximal, falls die freie Energie der Reaktion mit der Reorganisationsenergie übereinstimmt ($-\Delta G^0 = \lambda$) (mittleres Bild). Er wird für die beiden anderen Fälle jeweils kleiner. Nur das niedrigste Schwingungsniveau des Reaktanten ist eingezeichnet, was für $\hbar\omega > kT$ gegeben ist.
Jortner et al. haben eine auf der Quantenmechanik basierende Korrektur der Markusgleichung hergeleitet:

$$FC = (\hbar\omega)^{-1} \exp[-S(2n+1)] \left(\frac{n+1}{n}\right)^{P/2} I_P\left[2S\sqrt{n(n+1)}\right].$$

wobei $S = \lambda / \hbar\omega$, $P = -\Delta G^0 / \hbar\omega$, und $n = [\exp([\hbar\omega / kT) - 1]^{-1}$ gilt (I_p ist die modifizierte Besselfunktion p-ter Ordnung.
Abb. 41 zeigt Beispiele für Elektronentransfersysteme mit definierten Donor-Akzeptor-Abständen. Nach der Lichtanregung des Bakteriochlorophyll-Dimers (1) geht der Elektronentransfer über dem Bakteriochlorophyll-Monomer (2), dem Bakteriopheophytin (3) und dem primären Chinon (4) zum sekundären Chinon (5). Die Pfeile zeigen die physiologisch produktiven Ladungstrennungen und die nichtproduktiven Ladungsrekombinationen. Die an diesen Systemen bestimmten Reaktionsraten sind in Abb. 42 zu sehen.

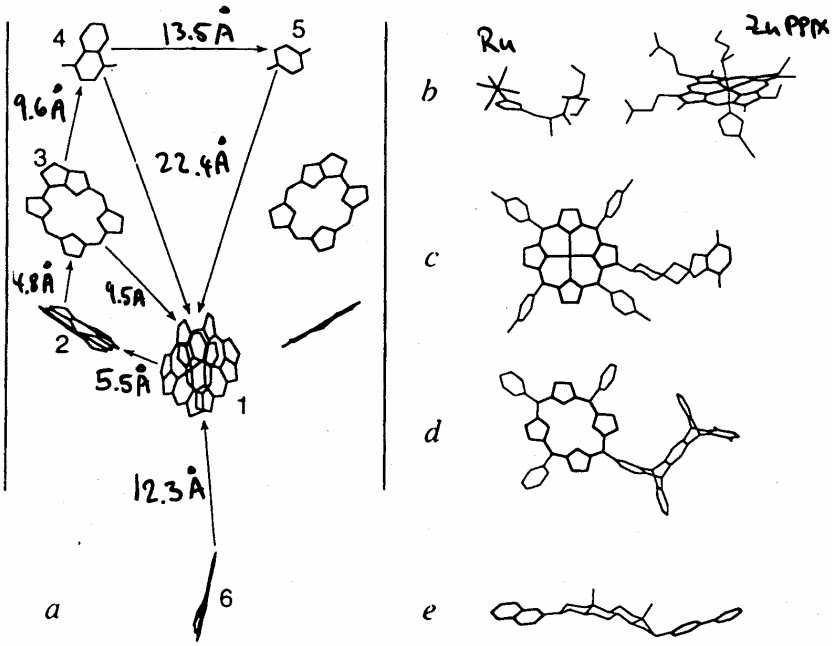


Abb. 41: a: Die Geometrie der Kofaktoren des photosynthetischen Zentrums von *Blastochloris viridis*, die durch Röntgenbeugung bestimmt wurde. b-e: Andere Strukturen von Elektrontransfersystemen mit definiertem Donor-Akzeptor-Abstand.

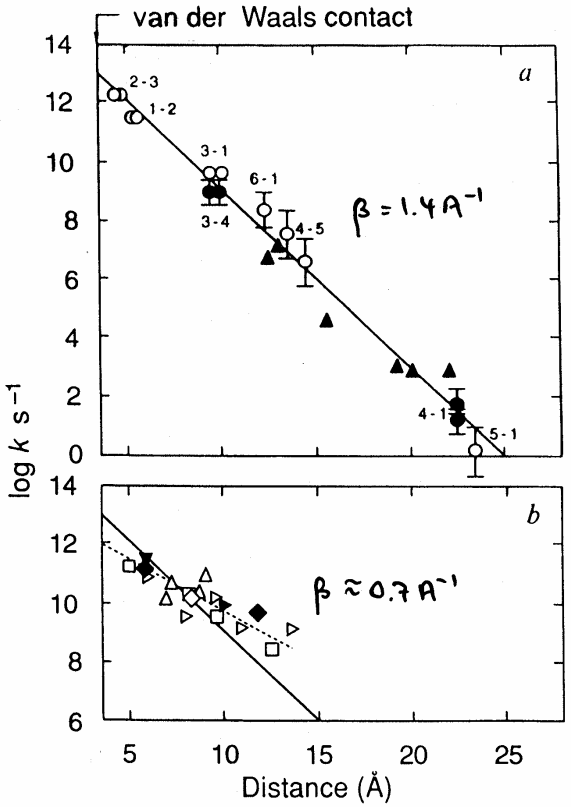


Abb. 42: Die freie-Energie-optimierte Rate für Elektronentransfer in Abhängigkeit vom Abstand. a: Proteine; b: Kovalent-gebundene Systeme.

Abb. 42 (oben) zeigt maximale Reaktionsraten für Proteine als Funktion des Abstands, u.a. auch die der Übergänge im photosynthetischen Reaktionszentrum von *Blastochloris viridis*. Die Ziffern beziehen sich auf Abb. 41. Man erhält für Proteine $\beta = 1.4$ Å^{-1}, d.h., die Reaktionsrate nimmt pro Vergrößerung des Abstandes von 1.7 Å um eine Größenordnung ab. Diese Abnahme ist für kovalent gebundene Systeme wesentlich geringer (Abb. 42, unten). In Abb. 43 sind die Reaktionsraten in Abhängigkeit von der freien Enthalpie zu sehen.

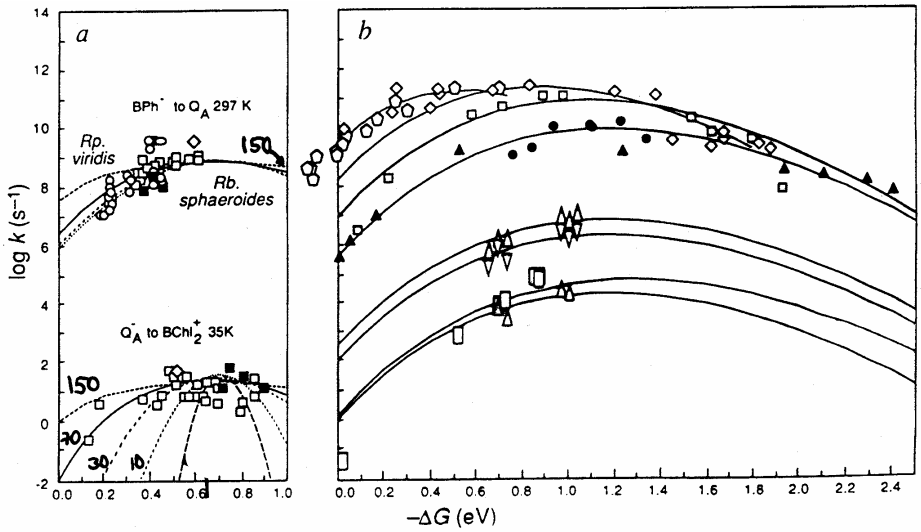


Abb. 43: Die Abhängigkeit der Elektronentransferrate von der freien Energie für verschiedene Systeme. a: Die Übergänge BPh^- zu Q_A und Q_A^- zu $BChl_2^+$ im photosynthetischen Zentrum.

Die freie Enthalpie wurde in Abb. 43a durch Ersetzen des nativen Q_A mit modifizierten Akzeptormolekülen erreicht. Die Fits der Marcustheorie an die experimentellen Daten sind ebenfalls eingezeichnet. Diese wurden mit verschiedenen Werten von $\hbar\omega$ (zwischen 10 und 150 meV, siehe Abb. 43a durchgeführt. Für die Fits in Abb. 43b wurde $\hbar\omega$ = 70 meV angenommen. Die Marcustheorie erlaubt es, die experimentellen Werte zu beschreiben, allerdings ist der Wert für das optimale $\hbar\omega$ relativ groß.
Aus diesen und weiteren Daten lässt sich eine empirische Beziehung herleiten, mit der der Ratenkoeffizient für Elektronentransfer bei Zimmertemperatur berechnet werden kann:

$$\log k_{ET} = 15 - 0.6R - 3.1\frac{(\Delta G - \lambda)^2}{\lambda},$$

wobei R in Å und λ in eV angegeben werden müssen, um k_{ET} in s^{-1} zu erhalten. Des weiteren gilt 0.6 = β/1n10 (für β = 1.4 $Å^{-1}$) und 3.1 = $(2\hbar\omega \ln 10)^{-1}$ für $\hbar\omega \approx 70$ meV. Mit dieser Relation lassen sich die Prinzipien für das Design von Proteinen untersuchen. Bezüglich der Abstände ergeben sich folgende Forderungen:

- Das chemiosmotische Membransystem erfordert einen Elektronentransfer über mindestens 35 Å in dem niedrig-dielektrischen Profil der Membran.
- Es ist unmöglich, Elektronentransfer zwischen zwei Redoxzentren mit einer Reaktionsrate vergleichbar mit der Submillisekunden-Lebenszeit von 'Encounter-Komplexen' (beispielsweise mit Cytochrom c oder Chinonen) zu haben.
- Reaktionszentren unterliegen einer noch größeren zeitlichen Einschränkung: Da die Lebenszeit des Donors im angeregten Zustand ungefähr Nanosekunden beträgt, muss der Elektronentransfer im Subnanosekundenbereich stattfinden, um eine hohe Effizienz zu erzielen. Daraus folgt, dass das photosynthetische Zentrum zumindest 3 Schritte benötigt.

Bezüglich des Frank-Condon Faktors ergibt sich:

- Natürliche Systeme möchten die freie Energiedifferenz in Vorwärtsrichtung minimieren. Allerdings ist für die Vermeidung von thermischen Wiederbesetzungen des Donorzustandes eine Abnahme der freien Enthalpie notwendig.
- Delokalisierte Systeme (Chl, Phe, Q) haben in einer niedrig-dielektrischen Umgebung gewöhnlich kleine Reorganisationsenergien (600 - 800 meV).
- Die anfängliche Ladungstrennung steht im Wettbewerb mit der Rückreaktion mit großem ΔG bei gleichem Abstand. Eine kleine Reorganisationsenergie von $\lambda \approx 300$ meV kann einen Selektionsdruck wiederspiegeln, um die Rückreaktion in den invertierten Bereich zu ziehen.
- Der M-Zweig des Reaktionszentrums ist trotz der gleichen Abstände für den Elektronentransfer aufgrund des Frank-Condon-Faktors inaktiv ($k_M < 0.01\ k_L$).
- Obwohl die ΔG für die Rückkehr des Elektrons von Q_A^- und Q_B^- ähnlich sind, ist es stabiler bei Q_B^- (Sekunden statt Millisekunden), da das relativ polare Q_B große λ gewährleistet.
- Die Zweischritt-Ladungstrennung kann schnell sein, und die Rekombination bei längeren Distanzen ist langsamer ($e^{-\beta R}$).

Diese Erkenntnisse erlauben das Design eines neuen Reaktionszentrums (de novo RC design). Der Kante-zu-Kante-Abstand des Primärdonors und des Endakzeptors wird zu 41 Å und die Photonenenergie zu ~1.4 eV (~870 nm) angenommen. Ein 3-Schritt-Design führt dann zu 20 ns-Ladungsseparation mit einer Effizienz von 99 %. Von der Anfangsenergie von 1.4 eV können ~ 0.8 eV als chemisches Potential erreicht werden. Beim nativen Reaktionszentrum sind es nur 0.4 eV. Abb. 44 zeigt zwei mögliche Anordnungen der Redoxzentren für effiziente Ladungstrennung zwischen Cytochrom und Chinon.

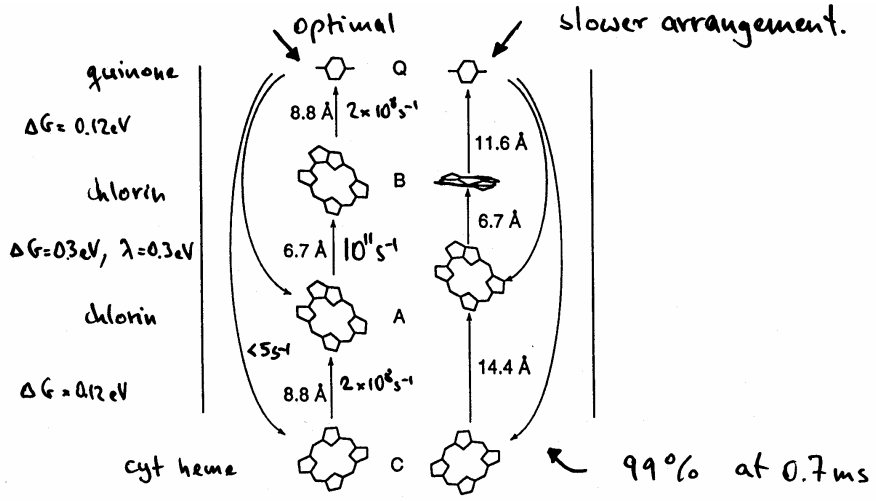


Abb. 44: Zwei Anordnungen der Redoxzentren für effiziente Ladungstrennung in einem hypothetischen photosynthetischen Protein. Die Gesamtdistanz der Ladungstrennung zwischen dem Cytochrom und dem Chinon ist gleich dem des nativen Reaktionszentrums. Die Distanzen und freien Energien der Reaktionen sind so gewählt, dass 99 % Quanteneffizienz bei der Ladungstrennung in der niedrig-dielektrischen Membran mit einer Stabilität von einer Millisekunde oder besser und minimalem Verbrauch von freier Energie erreicht wird. Die optimale Geometrie der Redoxzentren ist links in der Abbildung, während eine nicht-optimale Anordnung rechts zu sehen ist.