

Lehrstuhl für Physik Weihenstephan

**Strukturdynamik von Proteinen
bei tiefen Temperaturen –
anomale Diffusion im Konformationsraum**

Jörg Schlichter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Fischer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Friedrich
2. Univ.-Prof. Dr. F. G. Parak

Die Dissertation wurde am 5.2.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 28.3.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 3 |
| 2 | Grundlagen der Lochbrennspektroskopie | 9 |
| 2.1 | Theorie | 9 |
| 2.1.1 | Optische Übergänge in Festkörpern | 9 |
| 2.1.2 | Mechanismus des spektralen Lochbrennens | 12 |
| 2.1.3 | Spektrale Diffusion | 14 |
| 2.2 | Experiment | 16 |
| 2.2.1 | Aufbau | 16 |
| 2.2.2 | Proben und experimentelle Details | 21 |
| 3 | Spektrale Diffusion im TLS-Bild | 26 |
| 3.1 | Energielandschaften | 26 |
| 3.2 | Das Standard-Tunnel-Modell | 28 |
| 3.2.1 | Der Diffusionskern im TLS-Bild | 30 |
| 3.2.2 | Nichtgleichgewichts-Verteilungen der TLS | 31 |
| 3.3 | Experimente an Wasser-Glycerin-Gläsern | 33 |
| 3.3.1 | Messungen im deuterierten Glas | 33 |
| 3.3.2 | Messungen im protonierten Glas – Abweichungen vom TLS-Modell | 35 |
| 4 | Spektrale Diffusion in Proteinen | 38 |
| 4.1 | Ein Beispiel: Meerrettichperoxidase | 38 |
| 4.2 | Das Diffusionsmodell | 45 |
| 4.2.1 | Anomale Diffusion im Frequenzraum | 45 |
| 4.2.2 | Anomale Diffusion im Konformationsraum | 49 |
| 4.2.3 | Hierarchische Systeme | 51 |
| 4.2.4 | Alterungs-Effekte | 54 |
| 4.2.5 | Größenordnungen und Zahlenwerte | 56 |
| 4.3 | Messungen an weiteren Proteinsystemen | 60 |
| 5 | Der Trehalose-Effekt | 64 |
| 5.1 | Meerrettichperoxidase in Trehalose-Gläsern | 65 |
| 5.2 | Interpretation des Trehalose-Effekts | 69 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 6 | Deuterierungsexperimente | 73 |
| 6.1 | Messungen an Myoglobin | 73 |
| 6.2 | Meerrettichperoxidase in deuterierter Lösung | 82 |
| 7 | Zusammenfassung | 88 |
| A | Nichtstationäre Gauß-Prozesse | 94 |
| | Literaturverzeichnis | 98 |
| | Nachwort | 106 |

Kapitel 1

Einleitung

Seit erstmals durch ein Röntgenbeugungs-Experiment die Struktur eines Proteins entschlüsselt werden konnte (Kendrew, 1961; Perutz, 1963), sind etwa vier Jahrzehnte vergangen. Trotz intensiver Forschung über diesen ganzen Zeitraum hinweg, mit den unterschiedlichsten experimentellen Ansätzen und Methoden, ist man auch heute noch weit von einem vollständigen Verständnis dieser Molekül-gattung entfernt. Dies begann sich schon kurz nach Bestimmung der ersten Proteinstrukturen abzuzeichnen; man erkannte z.B., daß die räumliche Anordnung der Atome im Myoglobin, wie man sie aus den Röntgenbeugungs-Experimenten abgeleitet hatte, die biologische Funktion des Moleküls (die reversible Bindung von Sauerstoff an die im Inneren des Proteins befindliche Hämgruppe) nicht erklären konnte; es gab keinerlei ›Einlaßkanäle‹ für den Sauerstoff. Man nahm deshalb an, daß es in Proteinen zu Strukturfluktuationen kommt; diese erlauben es beispielsweise dem Myoglobin, für kurze Zeiten einen Weg zu öffnen, auf dem Sauerstoff ins Innere des Moleküls gelangen und so gebunden werden kann.

In den folgenden Jahren ergaben sich dann eine Vielzahl an experimentellen Belegen für die komplizierte Natur der Proteine. Eine wichtige Klasse von Untersuchungen betrachtete die Rückbindung von kleinen Liganden an Hämproteine (besonders von Kohlenmonoxid oder Sauerstoff an Myoglobin) nach der Dissoziation durch einen Laserpuls. Für diese Rückbindungsreaktion beobachtete man eine stark nichtexponentielle Zeitabhängigkeit (Austin et al., 1975; Steinbach et al., 1991), die ihre Erklärung schließlich darin fand, daß ein Protein in jedem seiner funktionellen Zustände (auch als ›Konformationen‹ bezeichnet) noch in einer großen Zahl von Unterzuständen existieren kann. Für letztere hat sich die Abkürzung ›CS‹ nach dem englischen ›Conformational Substates‹ eingebürgert (z.B. Frauenfelder et al., 1988, 1979). In allen CS hat ein Protein die gleiche, zur jeweiligen Konformation gehörende biologische Funktion. Die Geschwindigkeit, mit der diese Funktion ausgeübt wird, kann jedoch stark vom jeweiligen CS abhängen. Dies erklärt auch die nichtexponentielle Zeitabhängigkeit, die für die Rückbindung von Liganden an Hämproteine beobachtet wurde: Nach der Abtrennung des Liganden durch einen kurzen Laserpuls befinden sich alle Proteine eines Ensembles im gleichen funktionellen Zustand (dem eines Proteins ohne Liganden),

gleichzeitig jedoch in vielen verschiedenen CS, von denen jeder durch eine andere Höhe der Energiebarriere gekennzeichnet ist, die bei der Rückbindungsreaktion überwunden werden muß. Die Folge ist eine breite Verteilung der Zeitkonstanten für diese Reaktion, die im Ensemblemittel schließlich zu einer nichtexponentiellen Zeitabhängigkeit führt.

Weitere Beweise für die Existenz der CS lieferten auch die Röntgenbeugungs-Experimente, die zur Bestimmung von Proteinstrukturen durchgeführt wurden. Die Röntgenbeugung an Proteinkristallen zeigt – im Vergleich zu Messungen an ›gewöhnlichen‹ kristallinen Festkörpern – ganz spezifische Besonderheiten (Frauenfelder et al., 1988). Eine wichtige Meßgröße solcher Experimente ist die mittlere quadratische Abweichung der einzelnen Atome von ihrem jeweiligen Platz in der Einheitszelle. Diese kann für Atome in einem Proteinkristall deutlich größer sein als in normalen kristallinen Festkörpern; selbst für $T \rightarrow 0$ ergeben sich in Proteinen Werte, die größer sind als die quantenmechanischen Nullpunktsschwingungen. All diese Beobachtungen können durch die Unterzustände (CS) der Proteine erklärt werden: Jedes Protein im Kristall liegt in der gleichen Konformation, aber in einem unterschiedlichen Subzustand vor. Die genaue Molekülstruktur – obwohl im Wesentlichen identisch – zeigt deshalb von Protein zu Protein kleine Abweichungen, abhängig vom jeweiligen CS. Ein Atom kann somit in verschiedenen Proteinen an geringfügig unterschiedlichen Positionen sitzen, die Abweichung der Atome von ihrem ›mittleren Aufenthaltsort‹ ist also relativ groß. Die Röntgenbeugungs-Experimente liefern somit einen direkten Nachweis für die Existenz strukturell unterschiedlicher CS; darüber hinaus ist es möglich, Gebiete eines Proteins mit hoher struktureller Flexibilität und solche mit annähernd ›starrer Struktur‹ zu unterscheiden (Frauenfelder et al., 1979). Das wesentliche Kennzeichen des ›Materiezustands Protein‹ ist daher die gleichzeitige Existenz einer festen *Ordnung* – zu bestaunen in den sehr ästhetischen (mittleren) Molekülstrukturen, wie sie aus Röntgenbeugungs-Experimenten abgeleitet werden – und einer *Unordnung* auf kleinerem Maßstab, die sich aus der Existenz der CS ergibt.

Die CS sind auch die Ursache für die interessanten *dynamischen* Eigenschaften von Proteinen. Messungen mit Hilfe des Mößbauereffekts, die es erlauben, Bewegungen des zentralen Eisenatoms eines Hämproteins auf kurzen Zeitskalen ($\leq 10^{-7}$ s) zu untersuchen, konnten z.B. eine starke Zunahme der Molekülbewegungen im Myoglobin bei Temperaturen über etwa 200 K nachweisen (Parrak, 1985). Ähnliche Ergebnisse – jedoch auf deutlich kürzeren Zeitskalen – lieferten auch Experimente zur Neutronenstreuung (Doster et al., 1989, 1990).¹ Auch die schon erwähnten Experimente zur Rückbindungskinetik von Kohlenmonoxid an Myoglobin sowie wiederum Röntgenbeugungs-Experimente (Ostermann et al., 2000) ergaben ebenfalls Anhaltspunkte für Änderungen im dynamischen Verhalten des Proteins in diesem Temperaturbereich. Interessanterweise ist allerdings die geänderte Dynamik des Myoglobins, die sich in diesen experimentellen Befun-

¹Die starke Zunahme in der Beweglichkeit des Myoglobins in diesem Temperaturbereich wird gewöhnlich als dynamischer Übergang bezeichnet.

den offenbart, nicht verbunden mit einer Änderung in der globalen Struktur des Proteins (Hartmann et al., 1982; Parak et al., 1987); die dynamischen Prozesse beruhen also offensichtlich auf Übergängen zwischen verschiedenen CS des Moleküls. Bei physiologischen Temperaturen können diese Übergänge sehr schnell stattfinden; ein Protein bei Raumtemperatur veranschaulicht man sich daher am besten als ein Molekül mit einer festen Struktur, die allerdings ›verwischt‹ ist aufgrund ständiger schneller Wechsel zwischen leicht unterschiedlichen Unterstrukturen. Verblüffend ist, daß es Strukturfluktuationen in Proteinen auch noch bei Temperaturen im mK-Bereich gibt (Gafert et al., 1995; Schlichter et al., 1999). Natürlich sind die Längenskalen, auf denen die Fluktuationen bei so niedrigen Temperaturen stattfinden, winzig im Vergleich zu den oben erwähnten dynamischen Prozessen. Durch geeignete optische Meßverfahren kann man sie aber dennoch mit hoher Präzision nachweisen. Optische Messungen verwenden gewöhnlich einen Farbstoff (›*Chromophor*‹) im Inneren eines Proteins als ›Sonde‹ für die stattfindenden dynamischen Vorgänge. Dieser Farbstoff kann dabei entweder natürlicher Bestandteil des Proteins sein (Niwa et al., 1996), oder ›von außen‹ in das Molekül eingebracht werden; für die Experimente in dieser Arbeit wurde z.B. die natürliche Hämgruppe der untersuchten Proteine durch leicht veränderte Moleküle ersetzt. Bei Temperaturen im Kelvin-Bereich ist die Linienbreite eines (geeigneten) Farbstoffmoleküls äußerst scharf, Werte ≤ 1 GHz sind mühelos zu erreichen; alle Prozesse in der Umgebung des Chromophors, die dessen Absorptionsfrequenz um einen Betrag ändern, der dieser Linienbreite vergleichbar ist, können (im Prinzip) detektiert werden. Derartige Meßmethoden sind daher durch extreme Sensitivität gekennzeichnet.

Eine Schwierigkeit, mit der alle optischen Messungen zu kämpfen haben, resultiert aber unmittelbar aus den typischen Eigenschaften der Proteine selbst. Wie erläutert, können diese in vielen verschiedenen CS vorliegen. In jedem Molekül ist daher die Wechselwirkung zwischen Protein und Chromophor (aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Strukturen der CS) verschieden, jeder Chromophor hat deshalb eine andere Absorptionsfrequenz. Daraus resultieren sehr breite Banden im Absorptionsspektrum eines Protein-Ensembles, Linienbreiten von einigen hundert Wellenzahlen – also um einen Faktor 10^4 größer als die Linienbreite eines einzelnen Chromophors – sind keine Seltenheit. Aufgrund dieser *inhomogenen Verbreiterung* ist es in einem einfachen Absorptions- oder Fluoreszenzexperiment nicht möglich, von der prinzipiell erreichbaren hohen Auflösung optischer Messungen Gebrauch zu machen. Es sind kompliziertere Meßmethoden nötig, wie z.B. die Photon-Echo-Spektroskopie (Thorn-Leeson und Wiersma, 1995a,b) oder das in dieser Arbeit verwendete *spektrale Lochbrennen* (siehe Kap. 2), um dieses Ziel zu erreichen.

Grundlegende Idee des spektralen Lochbrennens ist es, aus einem Ensemble von Proteinen nur Moleküle mit identischen Absorptionsfrequenzen (des Chromophors) auszuwählen. Dies erreicht man durch Einstrahlung mit einem schmalbandigen Laser an irgendeiner Stelle der inhomogenen Bande. Die dort absorbierenden Moleküle (und nur diese) werden dadurch – einen geeigneten Farbstoff

vorausgesetzt – zu einer photochemischen Reaktion angeregt. Die dabei entstehenden Photoprodukte haben i.a. Absorptionsfrequenzen, die sehr weit außerhalb der untersuchten inhomogenen Bande liegen; an der Stelle, an der mit dem Laser eingestrahlt wurde, ergibt sich deshalb eine verringerte Absorption, man spricht davon, ein *spektrales Loch* zu brennen. Entscheidend dabei ist, daß die Breite eines solchen Loches der Linienbreite eines einzelnen Farbstoffmoleküls vergleichbar ist; seine Reaktion auf beliebige Einflüsse (z.B. dynamische Prozesse im Protein, Anwesenheit externer elektrischer Felder oder Änderungen im hydrostatischen Druck) ist zudem völlig äquivalent zum Verhalten eines Ensembles von Proteinen, die (zur Zeit der Lasereinstrahlung) identische Absorptionsfrequenzen haben; das Problem der inhomogenen Verbreiterung wird somit umgangen.

Ein spektrales Loch kann als sehr sensitive Probe benutzt werden, um dynamische Vorgänge in einem Protein nachzuweisen. Eine Strukturfluktuation eines Proteins, also ein Übergang des Moleküls in einen anderen CS, führt im allgemeinen zu einer geänderten Wechselwirkung zwischen Protein und Chromophor und deshalb zu einer Änderung der Absorptionsfrequenz.² Proteine, die unmittelbar nach dem Lochbrennen gleiche Absorptionsfrequenzen haben, können sich dennoch in unterschiedlichen CS befinden; es treten in ihnen auch unterschiedliche Strukturfluktuationen auf. Die Entartung der Absorptionsfrequenzen wird somit im Laufe der Zeit durch dynamische Prozesse aufgehoben, die Frequenzverteilung des Proteinensembles (bzw. das spektrale Loch) *verbreitert* also, ein Vorgang, der als *spektrale Diffusion* bezeichnet wird. Die Untersuchung der spektralen Diffusion in Hämproteinen war das eigentliche Thema dieser Arbeit.

Die dynamischen Prozesse in einem Protein lassen sich nun aufteilen in *Fluktuationen* und *Relaxationen*. Erstere kann man sich vorstellen als Übergänge zwischen verschiedenen CS des Gleichgewichtszustandes. Führt man in einem equilibrierten Proteinensemble ein Lochbrennexperiment durch, so sind es diese Fluktuationsprozesse, die verantwortlich sind für die spektrale Diffusion, also die Verbreiterung eines spektralen Loches in Abhängigkeit von der zwischen Lochbrennen und Messung vergangenen Zeit. (Diese wird in dieser Arbeit als *Wartezeit* t_w bezeichnet.) In einem Nichtgleichgewichts-Ensemble tragen dagegen zusätzlich noch Prozesse zur spektralen Diffusion bei, in denen die Moleküle ihrem Gleichgewicht entgegenstreben. Diese sog. Relaxationen klingen jedoch im Lauf der Zeit immer stärker ab, bis schließlich (möglicherweise allerdings erst nach sehr langer Zeit) das dynamische Verhalten ausschließlich durch die Fluktuationen bestimmt wird. Spektrale Löcher, die in einem Nichtgleichgewichts-Ensemble zu verschiedenen Zeitpunkten gebrannt werden, zeigen deshalb unterschiedliche Verbreiterung (nach der gleichen Wartezeit). Aus einer solchen Messung lassen sich somit Aussagen über das Zeitverhalten der Relaxationsprozesse gewinnen. Ein Experiment, daß derartige Nichtgleichgewichtsvorgänge untersucht, wird in dieser Arbeit *Alterungsexperiment* genannt, analog dazu wird die Zeitspanne zwi-

²Solche Frequenzsprünge können in Einzelmolekül-Experimenten direkt beobachtet werden (Tamarat et al., 2000; Weiss, 1999, und dortige Referenzen).

schen dem Abkühlen eines Proteinensembles und dem Brennen eines spektralen Loches als *Alterungszeit* t_a bezeichnet.

Ziel solcher Experimente ist es natürlich, die Natur der im Protein ablaufenden dynamischen Prozesse aufzudecken. Dies ist auf direktem Wege aber leider nicht möglich. Man benötigt vielmehr eine Modellvorstellung, die bestimmte strukturelle Vorgänge im Protein postuliert und daraus die Abhängigkeit der spektralen Diffusion von den Zeitparametern t_w und t_a berechnet. Diese kann dann mit den experimentellen Ergebnissen verglichen werden.

Spektrale Diffusion wird nicht nur in Proteinen beobachtet, sondern auch in anderen Systemen wie etwa Gläsern oder Polymeren. Zur Erklärung der spektralen Diffusion in Gläsern wird gewöhnlich das sog. *Standard-Tunnel-Modell* (Anderson et al., 1972; Philips, 1972) herangezogen, das ursprünglich eingeführt wurde, um thermodynamische Besonderheiten von amorphen Tieftemperatursystemen zu erklären; es ist allerdings in natürlicher Weise auch auf die spektrale Diffusion übertragbar (Reinecke, 1979). Die wesentliche Idee dieses – in Kap. 3.2 ausführlich beschriebenen – Modells ist es, alle in einem Glas stattfindenden Relaxations- oder Fluktuationsprozesse als Tunnelübergänge lokalisierter Zwei-Niveau-Systeme (sog. >TLS< = $\text{>Two Level Systems<}$) zu beschreiben. Diese Tunnel-systeme wechselwirken mit im Glas gelösten Farbstoffmolekülen, man beobachtet daher spektrale Diffusion. Entscheidend ist nun die Annahme, daß die typischen Zeitkonstanten der TLS über viele Größenordnungen verteilt sind; daraus resultiert letztlich die Forderung des Modells nach einer *logarithmischen* Abhängigkeit der spektralen Diffusion von der Wartezeit.

Die Gültigkeit des Tunnelmodells wurde in dieser Arbeit in Wartezeit- bzw. Alterungsexperimenten an einem deuterierten und einem protonierten Glas untersucht. Für die deuterierte Probe ergab sich dabei eine sehr gute Übereinstimmung mit der Theorie, die Messungen im protonierten Glas zeigen allerdings signifikante Abweichungen. Mögliche Gründe dafür werden in Kap. 3.3.2 erläutert.

Proteine und Gläser zeigen bei tiefen Temperaturen in vielen Belangen sehr ähnliches Verhalten. Es war daher naheliegend, das aus der Theorie der Gläser stammende Tunnelmodell auch zur Interpretation der spektralen Diffusion in Proteinen heranzuziehen. Wie in Kap. 4.1 gezeigt wird, schlägt dieser Versuch aber völlig fehl. Die wesentliche Beobachtung in allen Experimenten an Proteinen in dieser Arbeit war eine Abhängigkeit der spektralen Diffusion von der Wartezeit nach einem *Potenzgesetz*. Ein solches Verhalten steht aber im völligen Widerspruch zu den Vorhersagen des Tunnelmodells, das ja, wie erwähnt, eine logarithmische Zeitabhängigkeit fordert³.

In Kap. 4.2 wird deshalb ein anderer Ansatz zur Interpretation der Proteindaten – das sog. *Diffusionsmodell* – entwickelt (Schlichter und Friedrich, 2001b; Schlichter et al., 2000a). Grundlegende Idee dieses Modells ist es, die dynamischen Prozesse in einem Protein als *Diffusionsbewegung in dessen Konformationsraum* aufzufas-

³Ein Potenzgesetz läßt sich als Exponentialfunktion in $\ln(t_w)$ schreiben und unterscheidet sich somit fundamental von einer einfachen logarithmischen Zeitabhängigkeit.

sen. Die diffundierenden Molekülgruppen eines Proteins stehen aber in vielfachen Wechselwirkungen miteinander, die Diffusionsbewegung ist deshalb zahlreichen Hemmungen ausgesetzt. Als Folge davon erwartet man keine freie, sondern sog. *anomale Diffusion*, deren wesentliches Kennzeichen eine Zeitabhängigkeit gemäß eines Potenzgesetzes der Form $t_w^{\alpha/2}$ (mit $\frac{\alpha}{2} \neq \frac{1}{2}$) ist. In Kap. 4.2.2 wird gezeigt, daß die Zeitabhängigkeit der spektralen Diffusion, die sich aus solchen Prozessen im Konformationsraum der Proteine ableiten läßt, gerade den experimentellen Beobachtungen entspricht.

Die Gültigkeit des Diffusionsmodells wurde in Experimenten an verschiedenen Protein/Lösungsmittel-Systemen untersucht. Kap. 5 stellt zunächst Messungen an *Meerrettichperoxidase* vor. Dieses Protein wurde in verschiedenen Umgebungen (Wasser-Glycerin- bzw. Trehalose-Wasser-Glycerin-Gläser mit unterschiedlicher Trehalose-Konzentration) vermessen. Es konnten signifikante Einflüsse der Umgebungen auf die spektrale Diffusion beobachtet werden, jedoch ließen sich die Ergebnisse dieser Experimente immer ausgezeichnet im Rahmen des Diffusionsmodells beschreiben. Die Meßdaten gestatteten es außerdem, Vermutungen über die Natur des biologisch bedeutsamen *Trehalose-Effekts* anzustellen, der es vielen Organismen erlaubt, Zustände extremer Trockenheit oder Kälte unbeschadet zu überstehen.

In Kap. 6.1 werden vergleichbare Experimente an *Myoglobin* vorgestellt, dessen natürliche Hämgruppe gegen den Farbstoff *Zink-Phaeophorbid a* ausgetauscht war. An diesem Protein wurden Vergleichsmessungen in protonierten sowie deuterierten Proben durchgeführt. Deren Ergebnisse befanden sich wiederum in völliger Übereinstimmung mit dem Diffusionsmodell; die Auswirkungen der Deuterierung erlaubten es zudem, den Mechanismus der beim Lochbrennen in Zink-Phaeophorbid stattfindenden Photoreaktion zu untersuchen. Deuterierungsexperimente auch an der Meerrettichperoxidase werden dann in Kap. 6.2 erörtert, Kap. 7 gibt schließlich eine Zusammenfassung der theoretischen und experimentellen Ergebnisse.

Kapitel 2

Grundlagen der Lochbrennspektroskopie

2.1 Theorie

Bevor von den (in der Einleitung bereits erwähnten) unterschiedlichen Modellen zur Interpretation der spektralen Diffusion die Rede ist und ihre Anwendbarkeit auf die in verschiedenen Glas- und Proteinsystemen gefundenen Meßdaten untersucht wird, soll zunächst etwas detaillierter auf das spektrale Lochbrennen eingegangen werden, das ja in allen Experimenten dieser Arbeit als Meßmethode verwendet wurde. Sinnvollerweise werden dafür zuerst einige der für die Spektroskopie in Festkörpern wichtigen Größen eingeführt.

2.1.1 Optische Übergänge in Festkörpern

Ausgangspunkt der Betrachtungen ist zunächst ein einzelnes Farbstoffmolekül (Chromophor) im Vakuum, oder genauer gesagt ein Übergang zwischen Grundzustand und einem elektronisch angeregten Zustand dieses Moleküls. Die Linienbreite dieses Übergangs hängt ab von der Lebensdauer T_1 des angeregten Zustandes, die durch Prozesse wie Fluoreszenz, Intersystem Crossing etc. begrenzt wird. Nach der Heisenbergschen Unschärferelation ist mit dieser Lebensdauer eine Linienbreite des Überganges verknüpft, die als *natürliche Linienbreite* γ_0 bezeichnet wird:

$$\gamma_0 = \frac{1}{2\pi T_1} \quad (2.1)$$

Baut man nun ein Ensemble solcher Farbstoffmoleküle in einen *idealen* Kristall ein, so wird die Wechselwirkung mit der Kristallumgebung die Lage der Energieniveaus in den Farbstoffmolekülen modifizieren. Dies führt zu einer Verschiebung der Übergangsfrequenz (*›Lösungsmittel-Verschiebung‹*). Da in einem idealen Kristall aber jeder Chromophor die gleiche Umgebung hat, ist diese Verschiebung für alle Farbstoffe identisch.

Darüber hinaus beobachtet man auch eine Änderung in der Linienbreite des Überganges. Der Grund hierfür ist die sog. Phasenrelaxation, die durch thermische Bewegungen des Kristallgitters verursacht wird. Dieser Mechanismus läßt sich veranschaulichen am Beispiel eines Ensembles von Chromophoren, die kohärent (etwa mit einem geeigneten Laserpuls) in eine Überlagerung aus Grund- und angeregtem Zustand gepumpt werden. Direkt nach der Anregung ist in allen Farbstoffmolekülen ein phasengleich oszillierendes Dipolmoment vorhanden, die Folge ist eine ebenfalls oszillierende makroskopische Polarisation des Ensembles. Ändert sich jetzt durch eine thermische Bewegung im Wirtsgitter aber die Umgebung eines Chromophors, so wird kurzzeitig auch die Oszillationsfrequenz seines Dipolmoments beeinflusst; daraus resultiert dann ein (zufälliger) Phasensprung. Im Lauf der Zeit geht so die Phasenkorrelation zwischen den Dipolen verloren, bis nach T_2^* , der sog. *reinen Phasenrelaxationszeit* die Phasen der Dipole völlig statistisch verteilt sind; eine makroskopische Polarisation ist dann nicht mehr vorhanden. Da diese zusätzlich auch verringert wird, wenn es es zu Zerfallsprozessen des angeregten Zustandes kommt, findet man letztlich für die effektive Zerfallszeit T_2 der Polarisation die Beziehung:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_1} + \frac{2}{T_2^*} \quad (2.2)$$

Mit den Zeiten T_1 und T_2 läßt sich jetzt berechnen, welchen Wert γ die Messung einer Linienbreite (durch Abscannen des zugehörigen Übergangs mit einem Laser) ergibt¹:

$$\gamma = \frac{1}{2\pi T_2} \sqrt{1 + \Omega^2 T_1 T_2} \quad (2.3)$$

Ω ist hierbei die sog. Rabi-Frequenz und hängt neben atomaren Größen auch von der *Intensität* des eingestrahlten Lichtes ab. Dies ist die Ursache der sog. *Leistungsverbreiterung*, also einer Zunahme der Linienbreite bei Messung mit größerer Laserleistung. Für schwache Lichtintensitäten gilt allerdings $\Omega \rightarrow 0$. Der Wert, der sich unter dieser Voraussetzungen für die Linienbreite ergibt, wird als *homogene Linienbreite* γ_h bezeichnet. Sie ist gerade – bis auf einen Faktor 2π – der Kehrwert der Zeitkonstanten T_2 . (Es ist klar, daß γ_h empfindlich von der Temperatur des Systems abhängt, da die Bewegungen des Wirtsgitters natürlich mit wachsender Temperatur zunehmen.)

Ein dritter Effekt beim Einbau der Farbstoffe in einen Kristall ist schließlich, daß jetzt die Anregung von sog. *Phononseitenlinien* möglich wird. Dabei wird die Energie des absorbierten Lichtes nicht nur zur Anregung des Chromophors verwendet, sondern verursacht darüber hinaus Schwingungen des Kristallgitters. Die Folge sind Absorptionslinien, die blauverschoben gegenüber der *Nullphononenlinie* sind. Aufgrund der großen Zahl von verschiedenen Schwingungsmoden, die in einem Kristall angeregt werden können, erhält man allerdings eine solche Vielzahl

¹Man behandelt dabei das System aus Grund- und Anregungszustand in Wechselwirkung mit dem Lichtfeld formal in völliger Analogie zu einem Spinsystem in der NMR.

von zusätzlichen Linien, daß diese nicht einzeln aufgelöst werden, sondern sich zur sog. *Phononseitenbande* überlagern. Wie intensiv diese Seitenbande ausgeprägt ist, hängt von der Wechselwirkung zwischen Chromophor und Gitter (*Elektron-Phonon-Kopplung*) ab und wird durch den *Debye-Waller-Faktor* α beschrieben. Die Phononenzustände haben i.a. sehr viel kürzere Lebensdauern als der niedrigste angeregte elektronische Zustand, also sehr viel größere Linienbreiten. Ein typisches Absorptionsspektrum für Chromophore, die in einem idealen Kristall gelöst sind, sieht daher aus wie in Abb. 2.1a gezeigt.

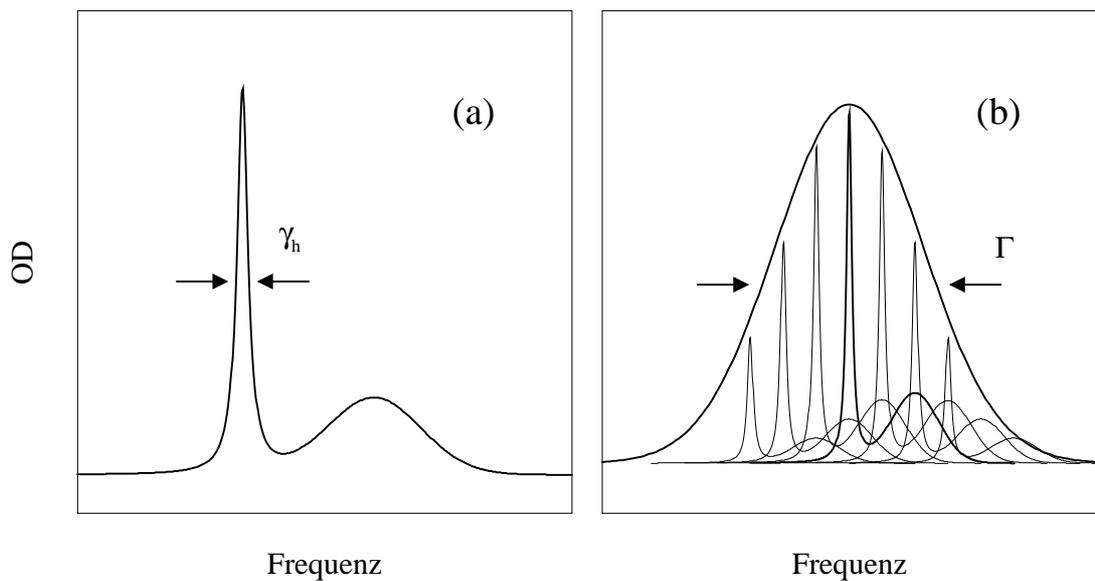


Abbildung 2.1: (a) Ein typisches Absorptionsspektrum von Chromophoren in einem idealen Kristall. Zu erkennen sind die schmale Nullphononenlinie und der breite Phononenflügel. (b) Haben die einzelnen Chromophore unterschiedliche Umgebungen, kommt es durch inhomogene Verbreiterung zu breiten Absorptionsbanden.

Komplizierter sind die Verhältnisse, wenn die Chromophore in ein mehr oder weniger ungeordnetes System (z.B. ein Protein oder ein Glas) eingebaut werden. Wie oben bereits erwähnt, verursachen die Unterschiede in der lokalen Umgebung jedes Chromophors unterschiedliche Lösungsmittel-Verschiebungen; das Absorptionsspektrum eines Ensembles von Farbstoffmolekülen kann deshalb als Überlagerung der Absorptionslinien verschiedener Subensembles interpretiert werden (siehe Abb. 2.1b), die jeweils bei verschiedenen Frequenzen angeordnet sind. Man spricht hierbei von *inhomogener Verbreiterung* des Absorptionsprofils. Mathematisch entspricht dieser Mechanismus einer Faltung der homogenen Linie mit einer Verteilungsfunktion, die die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten bestimmter Lösungsmittel-Verschiebungen angibt. Diese Verteilungsfunktion wird in der Regel als gaußförmig angenommen. Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Systemen (und bei einer Temperatur von 4.2K) lag die Breite Γ dieser Verteilungsfunktion um Größenordnungen über den homogenen Linienbreiten; typische

Werte waren ca. 100 cm^{-1} für Γ und ca. $0,03 \text{ cm}^{-1}$ für γ_h .

2.1.2 Mechanismus des spektralen Lochbrennens

Unter Lochbrennen versteht man verschiedene Arten von spektroskopischen Techniken, die auf irgendeine Weise Sättigungseffekte in inhomogen verbreiterten Systemen nutzen. Ziel all dieser Techniken ist es, die unter der inhomogenen Verbreiterung verborgene *homogene* Linie eines Übergangs zu vermessen und so die Empfindlichkeit eines spektroskopischen Experimentes enorm zu steigern. Die erste Demonstration eines Verfahrens mit dieser Eigenschaft gelang 1948 im Bereich der NMR-Spektroskopie (Bloembergen et al., 1948). Im optischen Bereich gab es Ende der 60er Jahre erstmals vergleichbare Experimente. Das sog. *photochemische* bzw. *photophysikalische* Lochbrennen, das in dieser Arbeit zur Anwendung kam, wurde 1974 von zwei verschiedenen Gruppen eingeführt (Gorokhovskii et al., 1974; Kharlamov et al., 1974).

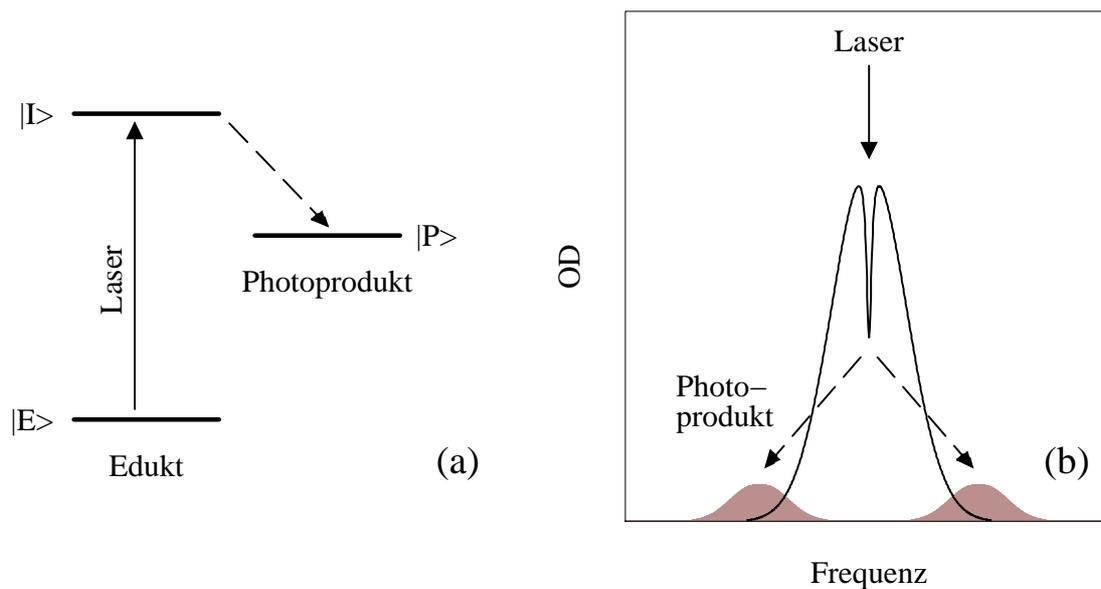


Abbildung 2.2: (a) Ein typisches Niveauschema für photochemisches bzw. photophysikalisches Lochbrennen. (b) Einstrahlung mit einem schmalbandigen Laser führt zu einem spektralen Loch bei der Laserfrequenz und zusätzlichen Absorptionsbanden weit entfernt davon.

Idee dieser Technik ist es, mit einem Laser *schmalbandig* in einen bestimmten Bereich einer inhomogenen Bande einzustrahlen und die dort absorbierenden Moleküle in einen langlebigen Photoproduktzustand $|P\rangle$ zu pumpen (*›Brennen‹*). Das kann zum Beispiel wie in Abb. 2.2a geschehen: Ein absorbierendes Molekül wird durch die Lasereinstrahlung angeregt und zerfällt mit einer gewissen Quanten-

ausbeute nach $|P\rangle$.² Der Photoproduktzustand $|P\rangle$ repräsentiert ein strukturell unterschiedliches Molekül, dessen Absorption gewöhnlich bei einer weit entfernten Wellenlänge liegt. Insgesamt wird deshalb die Absorption bei der Brennwellenlänge verringert – es stehen dort weniger absorbierende Moleküle zur Verfügung als vor dem Brennen. Das so erzeugte Minimum im Absorptionsspektrum wird als *spektrales Loch* bezeichnet. (Eine schematische Darstellung des Prozesses zeigt Abb. 2.2b.)

Die Breite eines spektralen Loches ist (einen hinreichend schmalbandigen Laser vorausgesetzt) von der Größenordnung der homogenen Linienbreite, seine Lebensdauer wird nur durch die Lebensdauer des Photoproduktzustandes begrenzt und kann bei tiefen Temperaturen Tage und Wochen betragen. Man verfügt somit über ein spektroskopisches Werkzeug, das Messungen mit hervorragender Auflösung über lange Zeiten hinweg ermöglicht. Oft ist es günstig, sich ein spektrales Loch als das »negative Absorptionsspektrum« eines Ensembles von Chromophoren vorzustellen, die zum Zeitpunkt des Lochbrennens alle die gleiche Absorptionsfrequenz haben.³ Ändert man nach dem Lochbrennen experimentelle Parameter, z.B. durch Anlegen eines externen elektrischen Feldes oder eines hydrostatischen Druckes, oder kommt es im Lauf der Zeit zu Strukturänderungen in der Umgebung der markierten Moleküle, so würde ein solches Ensemble darauf genauso reagieren wie ein spektrales Loch – die beiden Konzepte sind also austauschbar (Köhler, 1998).

Wie oben bereits erwähnt unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Photo-transformationen (für Details siehe Friedrich und Haarer, 1984). Beim photochemischen Lochbrennen werden die photoaktiven Moleküle durch den Anregungsprozeß chemisch verändert; eine Folge davon ist, daß das Photoprodukt seine Absorption gewöhnlich deutlich außerhalb der ursprünglichen Absorptionsbande hat. Im Gegensatz dazu bleibt beim photophysikalischen Lochbrennen das photoaktive Molekül chemisch unverändert, es findet nur eine Umlagerung innerhalb der umgebenden Matrix statt. Zwar treten durch die so veränderte Chromophor-Matrix-Wechselwirkung ebenfalls Verschiebungen in der Absorptionsfrequenz des Moleküls auf, jedoch sind diese kleiner als im photochemischen Fall, so daß die Photoprodukt-Absorption nahe bei der durch den Laser selektierten Frequenz und innerhalb der ursprünglichen Absorptionsbande liegen kann.

Die Linienbreite eines spektralen Lochs wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Entscheidend ist natürlich die homogene Linienbreite γ_h des verwendeten Überganges. Findet das Brennen mit hoher Laserintensität statt, so kann eine zusätzliche Leistungsverbreiterung gem. Gl. 2.3 auftreten. Dies kann aber verhindert werden, wenn beim Brennen mit relativ niedrigen Leistungen gearbeitet wird; um

²Es sind natürlich auch kompliziertere Übergänge möglich, etwa der Umweg vom angeregten Zustand über einen Tripletzustand nach $|P\rangle$.

³Es soll betont werden, daß die Chromophore in einem solchen Ensemble trotz gleicher Absorptionsfrequenz ganz unterschiedliche Umgebungen haben können; die Wechselwirkung mit der Umgebung führt lediglich zu einer identischen *Energiedifferenz* zwischen Grund- und Anregungszustand des Chromophors.

die gleiche Ausbeute an Molekülen im Photozustand zu erzielen, muß dann natürlich die Brenndauer entsprechend erhöht werden. Ein schwierigeres Problem besteht in der sog. *Energieverbreiterung*. Diese kommt dadurch zustande, daß die Absorptionsbande bei der Laserfrequenz durch das Brennen ausgebleicht wird. Als Folge davon ist dann in den Flanken des Loches die Zahl der absorbierenden Moleküle größer als im Zentrum, so daß die Photoreaktion vorzugsweise bei den dortigen Molekülen stattfindet. Das Ergebnis ist eine Verbreiterung des Loches (über die homogene Linienbreite hinaus) mit wachsender Brennenergie. Man kann zeigen (Breinl et al., 1986), daß im Grenzfall kleiner Brennenergien und unter der Annahme einer lorentzförmigen Nullphononenlinie die Breite γ_τ eines Loches linear mit seiner Fläche A_τ zusammenhängt:

$$\gamma_\tau = 2\gamma_h + cA_\tau \quad (2.4)$$

c ist hierbei eine Konstante, die u.a. von atomaren Konstanten und der Laserpolarisation beim Brennen und Scannen abhängt, der Index τ soll ein Loch bezeichnen, das durch Brennen mit einer konstanten Laserintensität über eine Zeit τ hinweg entstanden ist. Gl. 2.4 zeigt, wie es trotz Energieverbreiterung möglich ist, die homogene Linienbreite γ_h zu messen: Man brennt ein Loch wiederholt, also mit sich ständig aufsummierenden Brenndauern, und mißt jeweils die Breite des Loches als Funktion seiner Fläche. Die Extrapolation für $A_\tau \rightarrow 0$ liefert dann gerade das Zweifache der homogenen Linienbreite. (Der Faktor 2 resultiert aus dem doppelten Einfluß der Linienbreite beim Brennen und beim anschließenden Abscannen des Loches.) Allerdings muß bei dieser Meßmethode vorausgesetzt werden, daß sich das Loch in den Zeiten zwischen den einzelnen Brennvorgängen nicht verändert. Dies ist bei Anwesenheit von *spektraler Diffusion* (s.u.) nicht unbedingt gewährleistet und kann zur Folge haben, daß die so gemessene Linienbreite größer ist als der über $\gamma_h = 1/2\pi T_2$ definierte ›wirkliche‹ Wert; man spricht in diesem Fall von einer *quasihomogenen* Linienbreite. Spektrale Diffusion ist deshalb verantwortlich für die Abweichung in den homogenen Linienbreiten, die sich als Ergebnisse ›schneller‹ experimenteller Methoden (wie z.B. dem Zweipuls-Photonecho) und ›langsamer‹ Techniken (wie dem spektralen Lochbrennen) ergeben (Pack et al., 1990).

2.1.3 Spektrale Diffusion

In der Einleitung wurde bereits angesprochen, daß in Proteinen selbst bei Temperaturen im mK-Bereich immer noch Strukturfluktuationen vorkommen; außerdem finden Relaxationsprozesse statt, in denen die Moleküle auf ihren Gleichgewichtszustand zustreben. Ein analoges Verhalten findet man auch in Gläsern. Ein in ein Protein oder ein Glas eingebetteter Chromophor hat deshalb eine sich *im Lauf der Zeit verändernde Umgebung*, die i.a. zu Schwankungen seiner Absorptionsfrequenz führt. Seit einigen Jahren ist es möglich, diese Frequenzschwankungen bei einzelnen Chromophoren, die in einen Festkörper eingebaut sind, direkt zu

beobachten (Moerner und Kador, 1989; Orrit und Bernard, 1990). Die Ergebnisse eines Ensemble-Experiments – z.B. mit Hilfe des spektralen Lochbrennens – werden durch diese Frequenzfluktuationen aber ebenfalls beeinflusst.

Es ist naheliegend, die Strukturänderungen in der Chromophorumgebung aufzuteilen in schnelle Prozesse mit Zeitkonstanten kleiner als T_1 und langsame mit größeren Zeitkonstanten (Friedrich und Haarer, 1986). Die erstgenannten wurden bereits in Kap. 2.1.1 angesprochen. Wie dort erläutert führen sie z.B. zur Dephasierung eines kohärent angeregten Ensembles von Chromophoren und wirken sich dadurch auf die homogene Linienbreite gemäß Gl. 2.2 bzw. Gl. 2.3 aus. Es ist jedoch offensichtlich, daß langsamere Prozesse nicht in dieser Weise wirken können: Bis nämlich ein solch langsamer Prozess stattfindet, ist ein Ensemble von kohärent angeregten Chromophoren längst vollständig dephasiert bzw. in den Grundzustand zerfallen; ein Einfluß auf die homogene Linienbreite ist daher nicht möglich. Ein spektrales Loch hingegen kann durch die langsamen Prozesse durchaus beeinflusst werden. Wie oben erwähnt, ist ein solches Loch unmittelbar nach dem Brennen einem Ensemble von Chromophoren äquivalent, die alle die gleiche Absorptionsfrequenz haben. Andererseits haben diese Chromophore dennoch unterschiedliche Umgebungen und erfahren im Lauf der Zeit auch unterschiedliche Strukturänderungen in ihrer Nachbarschaft. Diese Strukturänderungen führen zu unterschiedlichen Verschiebungen in der Absorptionsfrequenz der einzelnen Chromophore – das Absorptionsprofil des gesamten Ensembles wird also im Lauf der Zeit verbreitern. Völlig analoge Beobachtungen macht man bei einem spektralen Loch: Die schnellen Strukturänderungen beeinflussen die Anfangsbreite eines Loches (über die homogene Linienbreite); die langsamen führen dagegen zu einer Verbreiterung des Loches im Lauf der Zeit. Diese Verbreiterung wird als *spektrale Diffusion* bezeichnet.⁴

Mathematisch wird die spektrale Diffusion durch den *spektralen Diffusionskern* beschrieben; dieser ist die *bedingte Wahrscheinlichkeit* dafür, daß ein Chromophor zur Zeit t_1 bei der Frequenz ν_1 absorbiert, wenn er zur Zeit t_0 bei der Frequenz ν_0 absorbiert hat. Das Lochprofil $L_1(\nu)$ zur Zeit t_1 ergibt sich dann als Faltung des Lochprofils zur Zeit t_0 mit dem Diffusionskern $P(\nu_1, t_1 | \nu_0, t_0)$:

$$L_1(\nu_1) = \int_{-\infty}^{\infty} d\nu_0 P(\nu_1, t_1 | \nu_0, t_0) L_0(\nu_0) \quad (2.5)$$

$L_0(\nu)$ wird in dieser Arbeit gewöhnlich mit dem ersten Lochprofil identifiziert, das (üblicherweise einige Minuten) nach Abschluß des Brennvorgangs gemessen wurde. Einen Ausdruck ›from first principles‹ dafür herzuleiten, ist schwierig: Selbst wenn man annimmt, daß das Loch direkt nach dem Ende des Brennens lorentzförmig ist, so kann in der Zeit zwischen Brennen und erster Messung spektrale Diffusion zu einer Änderung der Lochform führen. Durch welchen Diffusionskern

⁴Um einer Begriffsverwirrung vorzubeugen: Mit spektraler Diffusion werden in dieser Arbeit alle Prozesse bezeichnet, die zur Verbreiterung eines spektralen Loches beitragen. Diese müssen aber nicht unbedingt mit Diffusionsprozessen im klassischen Sinn zu tun haben.

dieser Vorgang auf kurzen Zeitskalen beschrieben wird, ist aber unbekannt. Darüber hinaus kann bereits während des Brennens spektrale Diffusion aufgetreten sein, was eine weitere Komplikation für die Berechnung der Lochform bedeutet. In den Experimenten in dieser Arbeit ließen sich die Anfangslöcher allerdings immer ausgezeichnet durch Lorentzprofile beschreiben; diese ist somit als empirische Näherung gerechtfertigt.

Um einen Ausdruck für den Diffusionskern zu erhalten, muß ein mikroskopisches Modell eingeführt werden, das sowohl die Strukturänderungen in der Chromophorumgebung als auch die Kopplung zwischen Farbstoff und Umgebung beschreibt. Wird dafür das sog. TLS-Modell (siehe Kap. 3.2) verwendet, so ergibt sich ein *lorentzförmiger* Verbreiterungskern; aus Gl. 2.5 resultiert dann auch für die verbreiterten Löcher eine Lorentzform. Werden die Strukturänderungen dagegen in einem Diffusionsbild (siehe Kap. 4.2) beschrieben, so ist der Diffusionskern *gaußförmig*; die verbreiterten Löcher haben dann nach Gl. 2.5 die Form von Voigtkurven.

2.2 Experiment

2.2.1 Aufbau

Lochbrennexperimente bei tiefen Temperaturen mit hoher spektraler Auflösung erfordern einigen experimentellen Aufwand. So stellt sich z.B. an die verwendete Lichtquelle die Forderung nach einer genügend schmalen Linienbreite - ein Laser ist hierbei unverzichtbar. Auch benötigt man das übliche Zubehör der Tieftemperaturtechnik (Vakuumpumpen, Kryostaten), um überhaupt in einen Temperaturbereich vorstoßen zu können, der das spektrale Lochbrennen - also schmale homogene Linien - erlaubt. Schließlich ist die Auswahl von geeigneten Proben entscheidend - nicht jeder Chromophor in jedem Protein eignet sich zum Lochbrennen. Auf die genannten Punkte soll im Folgenden eingegangen werden.

Optik und Kryostat

Alle in dieser Arbeit besprochenen Experimente wurden in einer *Absorptionsanordnung* durchgeführt (siehe Abb. 2.3). Die Proben befanden sich dabei im Inneren eines Helium-Badkryostaten (Eigenbau der Universität Bayreuth) mit optischen Fenstern. Typische He-Standzeiten des Kryostaten lagen bei etwa 15 Stunden. Die Probe selbst war unmittelbar von flüssigem Helium umgeben, was für die ganze Dauer eines Experiments eine genau definierte Probertemperatur von 4.2 K garantierte.

Als Lichtquellen standen über einen Frequenzbereich von 30 GHz durchstimmbare cw-Farbstofflaser zur Verfügung (Coherent 699-21 bzw. 899-21), als Pumplaser dafür dienten zum einen ein Multiline-Argonlaser (Coherent Innova 90), zum

anderen ein frequenzverdoppelter Nd:Vanadate-Laser (Coherent Verdi), der seinerseits über einen Lichtleiter durch ein Array von Laserdioden gepumpt wurde. Je nach benötigtem Wellenlängenbereich wurden als Laserfarbstoff DCM-Spezial (bei ca. 666 nm, für die Experimente an Myoglobin), Sulforhodamin (bei ca. 610-615 nm, für die Experimente an Meerrettichperoxidase) sowie Rhodamin 6G (bei ca. 580 nm, für die Glaseexperimente) verwendet. Typische Ausgangsleistungen der Farbstofflaser lagen bei einigen hundert Milliwatt. Die Linienbreiten der Farbstofflaser (nach Herstellerangaben in der Größenordnung von einigen hundert KHz) waren gegenüber den Linienbreiten der in dieser Arbeit untersuchten Systeme (typischerweise einige GHz) vollkommen zu vernachlässigen. Auch die Frequenzdrift der Laser (Größenordnung: einige MHz/Stunde) war ohne Bedeutung.

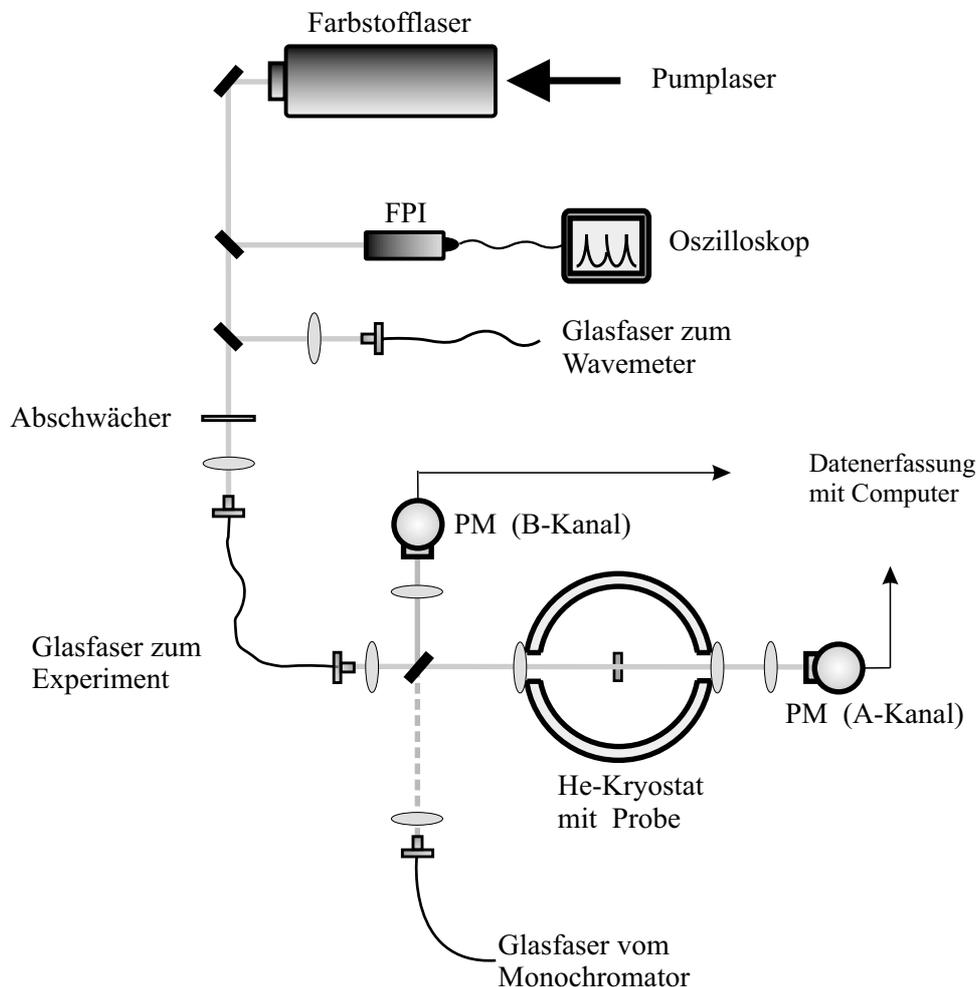


Abbildung 2.3: Üblicher experimenteller Aufbau für Messungen in Absorption. Einzelheiten finden sich im Text.

Das Licht gelangte vom Laser über eine Glasfaser zum Tieftemperaturteil des Experimentes, wo die durch die Probe transmittierte Lichtintensität mit Hilfe eines

rauscharmen Photomultipliers (Hamamatsu R928) gemessen wurde. Zusätzlich fand mit einem identischen Photomultiplier eine zweite Intensitätsmessung vor der Probe statt, um Leistungsschwankungen des Lasers aus den Ergebnissen eliminieren zu können. Die Ausgangsströme der Photomultiplier wurden – nach Glättung und Verstärkung – über eine A/D-Wandlerkarte vom Computer eingelesen.

Um den vom Laser abgescannten Frequenzbereich genau kalibrieren zu können, wurde außerdem mit einem Teil des Laserlichtes durch ein Fabry-Perot-Interferometer (FPI) hindurch eine Photodiode bestrahlt. Der Free-Spectral-Range (FSR) dieses Interferometers war sehr genau definiert (es standen Modelle mit einem FSR von 0.3, 1.5 und 7.5 GHz zur Verfügung); ein Abzählen der Transmissionsmaxima des FPI während eines Scans erlaubte somit eine genaue Bestimmung des Scanbereichs.

Für eine genaue absolute Messung der Laserwellenlänge wurde schließlich ein weiterer Teil des Laserlichtes über eine Single-Mode-Glasfaser zu einem Michelson-Interferometer abgezweigt (s.u.).

Die Intensität der Laser wurde während der Lochbrennexperimente stets stark abgeschwächt; die beim Scannen spektraler Löcher verwendeten Leistungen waren immer um ca. vier Größenordnungen schwächer als beim Brennen. Eine Lochverbreiterung durch Nachbrenneffekte während eines Experimentes konnte so ausgeschlossen werden.

Neben den Lasern stand für Übersichtsspektren über größere Wellenlängenbereiche ein Monochromator der Firma Jobin Ivon zur Verfügung. (1 m-Czerney-Turner-Anordnung, Gitter mit 1200 Strichen/mm bzw. 600 Strichen/mm, geblazed für verschiedene Wellenlängenbereiche.) Als Lichtquelle dafür diente eine Xenon-Hochdruck-Bogenlampe (75 W). Für Ein- und Ausgangsspalt des Monochromators wurde gewöhnlich eine Breite von $100\ \mu\text{m}$ gewählt. Die Auflösung des Monochromators lag damit bei etwa $1\ \text{cm}^{-1}$, was für alle in dieser Arbeit untersuchten Systeme ausreichend war.

Frequenzmessung

Für die Durchführung eines Lochbrenn-Experimentes über einen größeren Zeitraum hinweg ist eine genaue Messung der (absoluten) Laserfrequenz unumgänglich – eine ganze Reihe spektraler Löcher muß zuverlässig wiedergefunden und auch unterschieden werden. Kommerziell erhältliche Geräte zur Wellenlängenmessung (mit Auflösungen besser als $1\ \text{cm}^{-1}$) sind aber äußerst kostspielig. Aus diesem Grund wurde in Rahmen dieser Arbeit ein Michelson-Interferometer (ein sog. ›Wavemeter‹) konstruiert, das die nötige Meßgenauigkeit zur Verfügung stellte (siehe Abb. 2.4).

Grundlegende Idee der Frequenzmessung ist es, die (unbekannte) Wellenlänge eines Farbstofflasers mit der eines frequenzstabilisierten Helium-Neon-Lasers zu vergleichen. Zu diesem Zweck wird das Licht des Farbstofflasers in zwei Strahlen

aufgespalten; die Einzelstrahlen treffen jeweils auf einen Reflektor, werden zurückgeworfen und schließlich auf einer Photodiode vereinigt. Je nach Phasenunterschied der beiden Strahlen kommt es am Ort der Photodiode zu konstruktiver oder destruktiver Überlagerung, also maximaler oder minimaler Lichtintensität. Wird nun der Reflektor in Bewegung gesetzt, so ändert sich der Phasenunterschied der beiden Strahlen - es kommt zu einem ständigen Wechsel von Intensitätsminima bzw -maxima auf der Photodiode und somit zu einem periodisch modulierten Photostrom. Der frequenzstabilisierte HeNe-Laser wird entlang des gleichen optischen Pfades ins Wavemeter eingekoppelt; auch er erzeugt bei einer zweiten Photodiode ein moduliertes Ausgangssignal.

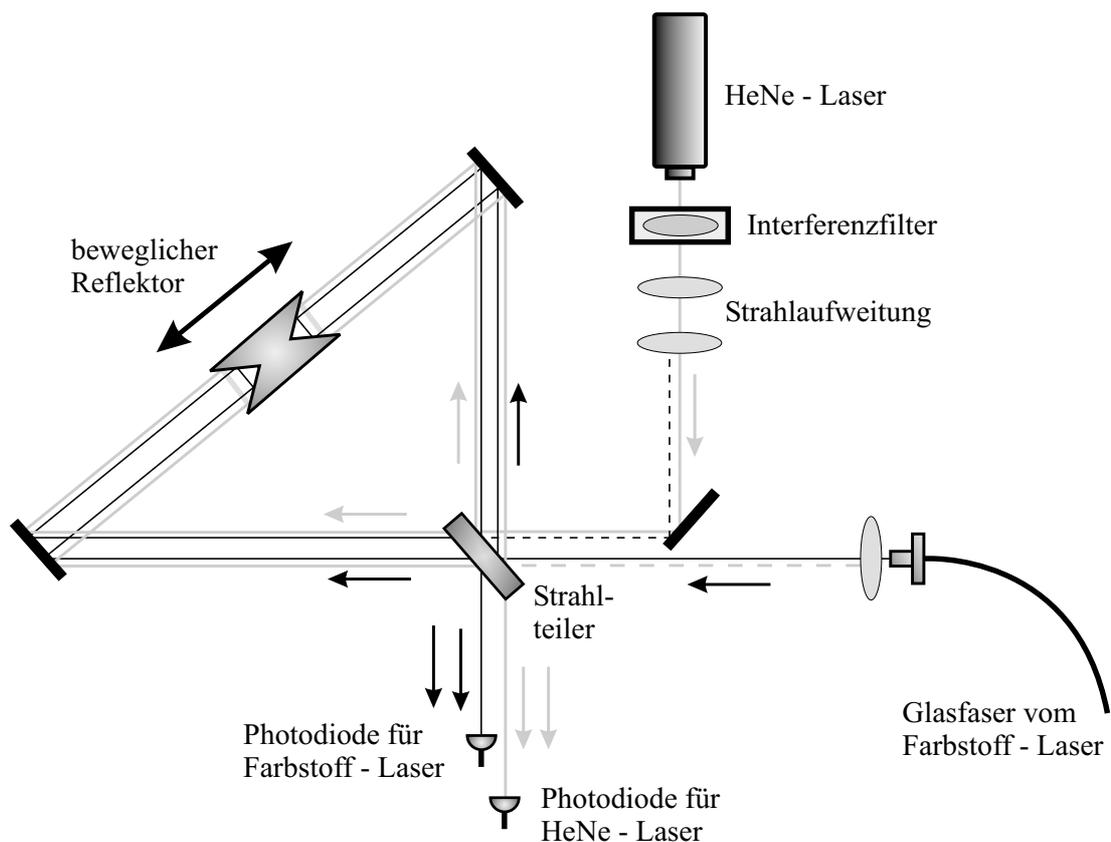


Abbildung 2.4: Michelson-Interferometer zur exakten Bestimmung der Laserwellenlänge. Einzelheiten finden sich im Text.

Die Zahl der Maxima N_{Dye} bzw. N_{HeNe} , die jede Photodiode in einem bestimmten Zeitraum mißt, hängt nur ab von der Geschwindigkeit der Reflektorbewegung und der Wellenlänge des jeweils gemessenen Lasers (für Details siehe Demtröder, 1996); für den Quotienten findet man:

$$\frac{N_{Dye}}{N_{HeNe}} = \frac{\lambda_{HeNe}}{\lambda_{Dye}} \quad (2.6)$$

Da die Wellenlänge des HeNe-Lasers bekannt ist, erlaubt Gl. 2.6 die Bestimmung der Wellenlänge λ_{Dye} des Farbstofflasers.

Einige technische Details: Die Frequenz des stabilisierten HeNe-Lasers (Spectra 117A) betrug 473.61254 THz, seine Frequenzdrift wurde vom Hersteller auf weniger als 3.0 MHz pro Tag beziffert. Ein schmalbandiger Interferenzfilter verhinderte die Beeinträchtigung des HeNe-Lasers durch das Licht des Farbstofflasers (der gewöhnlich bei anderen Frequenzen als der HeNe-Laser betrieben wurde). Um die Bewegung der Reflektoren möglichst erschütterungsfrei durchführen zu können, wurden sie auf einen luftkissengelagerten Wagen montiert. Die Reflektoren selbst, sog. ›corner-cubes‹, garantierten einen exakt parallel zurückreflektierten, aber etwas versetzten Strahl. Eine deutliche Steigerung der Meßgenauigkeit wurde schließlich durch *phasengerechtes* Auszählen der Photodioden-Signale erreicht: Das Zeitfenster für eine Zählung beginnt, wenn in *beiden* Kanälen ein Nulldurchgang des Signals gemessen wird und endet auch erst, wenn diese Bedingung wieder erfüllt ist (siehe Abb. 2.5). Um diese phasengerechte Zählung durchführen zu können, wurde eine Elektronik konstruiert, die bei jedem Nulldurchgang einen sehr kurzen TTL-Puls erzeugt. Die TTL-Pulse aus beiden Kanälen wurden (im Prinzip) auf ein AND-Gatter gegeben, Start und Ende einer Messung waren nur möglich, wenn der Ausgang dieses Gatters auf ›High‹ lag. Die eigentliche Zählung geschah über eine Zählerkarte mit dem Computer, in dem auch die Umrechnung in Wellenlängen erfolgte; darüber hinaus waren bestimmte Mittelungsprozeduren möglich.

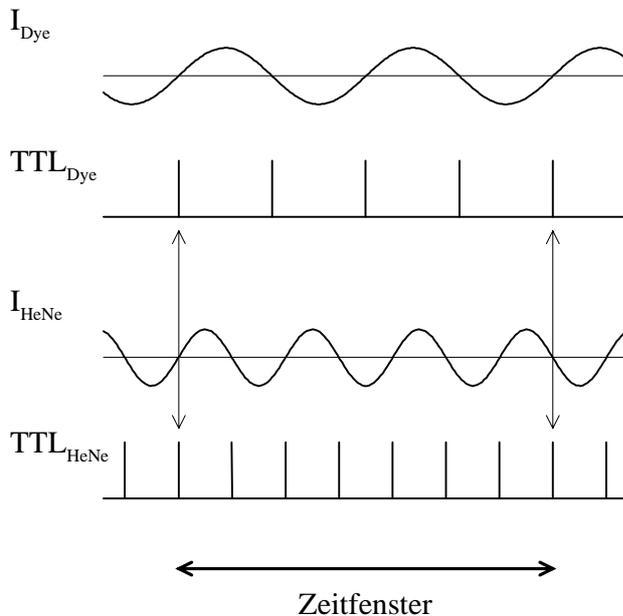


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des phasengerechten Auszählens der Wavemetersignale. Gezeigt sind die Ströme I_{Dye} und I_{HeNe} der beiden Photodioden sowie die schnellen TTL-Pulse, die jeweils bei einem Nulldurchgang des zugehörigen Signals erzeugt werden. Das Zeitfenster für eine Zählung beginnt und endet genau dann, wenn in beiden Kanälen ein TTL-Puls anliegt.

Die Auflösung, die mit dem Wavemeter auf diese Weise erzielt werden konnte, war in der Größenordnung von 100 MHz. Dieser Wert ist deutlich kleiner als die typi-

schen Breiten der spektralen Löcher, die in dieser Arbeit vermessen wurden; das Auffinden und Identifizieren eines Loches war deshalb mit Hilfe des Wavemeters problemlos möglich. (Ein kommerzielles Gerät, das bisher Verwendung gefunden hatte, war in seiner Auflösung mindestens um zwei Größenordnung schlechter.)

2.2.2 Proben und experimentelle Details

Alterungs- und Wartezeitexperimente

An allen in dieser Arbeit untersuchten Systemen wurden in analoger Weise kombinierte *Alterungs- und Wartezeitexperimente* durchgeführt. Die jeweilige Probe wurde dafür direkt in flüssiges Helium gebracht, der ganze Kühlvorgang von Raumtemperatur auf 4.2K erfolgte gewöhnlich innerhalb von zwei bis drei Minuten. Der Zeitnullpunkt eines Experimentes wird mit dem Erreichen der Endtemperatur gleichgesetzt. Aufgrund des schnellen Kühlvorganges ist er relativ genau definiert, Details des Einkühlprozesses sollten schon nach wenigen Minuten ohne Bedeutung sein. Das Brennen spektraler Löcher erfolgte ebenfalls in relativ kurzen Zeiten (≈ 1 min); auch dieser Zeitpunkt ist – im Vergleich zu typischen Zeitskalen der Experimente (s.u.) – also eine recht genau definierte Größe.

Spektrale Löcher wurden zu verschiedenen Zeiten nach dem Einkühlen der Probe, den sog. *Alterungszeiten* t_a , gebrannt, ihre Verbreiterung wurde anschließend über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen als Funktion der zwischen Brennen und Messung vergangenen *Wartezeit* t_w beobachtet. Ein Experiment dieser Art stellt ein (fast) ideales Diffusionsexperiment dar: Man betrachtet das Auseinanderfließen einer zu Beginn praktisch δ -förmigen Verteilung (im Frequenzraum) im Laufe der Zeit. Unterschiede im Verhalten von Löchern, die zu verschiedenen Alterungszeiten gebrannt wurden, erlauben es darüber hinaus, *nichtstationäre* Eigenschaften des Diffusionsprozesses zu untersuchen; es wurde in der Einleitung bereits erwähnt, daß sich diese mit den Nichtgleichgewichts-Relaxationen der untersuchten Systeme in Verbindung bringen lassen.

Wasser-Glycerin-Gläser

Die ersten Messungen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden (Kap. 3.3), wurden an Wasser-Glycerin-Gläsern durchgeführt. Als Chromophor diente dabei Resorufin (siehe Abb. 2.6), das in niedrigen Konzentrationen in protonierten oder deuterierten Wasser-Glycerin-Gemischen gelöst wurde. Resorufin ermöglicht schmalbandiges Lochbrennen bei einer Temperatur von 4.2 K, als Lochbrennmechanismus wurde in der Literatur das optisch induzierte Aufbrechen einer Wasserstoffbrücke zwischen Chromophor und Lösungsmittel vorgeschlagen (Schellenberg und Friedrich, 1993).

Für die Zubereitung der Proben wurde Resorufin entweder in deuteriertem oder

protoniertem Wasser gelöst und anschließend mit (protoniertem) Glycerin gemischt, um eine Glasbildung während des Einkühlens zu garantieren. Die Farbstoffkonzentration betrug in beiden Proben etwa $1.9 \cdot 10^{-4}$ mol/l, das Verhältnis von Wasser und Glycerin jeweils ca. 1:2.5 (v:v). Für die Alterungsexperimente wurden spektrale Löcher in einem engen Frequenzbereich von ca. 10 Wellenzahlen gebrannt.

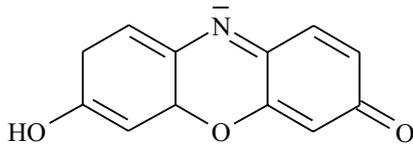


Abbildung 2.6: Strukturformel von Resorufin, das als Farbstoff in den Glaseexperimenten verwendet wurde.

Die Proben wurden für die Experimente jeweils in Glasküvetten mit einer Dicke von 1 mm gefüllt; die optische Dichte in den Absorptionsbanden lag dann etwa bei 1.0. Die Tiefe der spektralen Löcher während der Wartezeitexperimente betrug ungefähr 30 % der Absorptionsbande.

Meerrettichperoxidase

Schwerpunkt dieser Arbeit waren allerdings nicht Experimente an Gläsern, sondern Messungen an zwei Hämproteinen, nämlich Meerrettichperoxidase (ab jetzt abgekürzt mit ›HRP‹ für das englische ›Horseradish peroxidase‹) und Myoglobin (s.u.), die in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht wurden. Meerrettichperoxidase (in ihrer nativen Form) kommt – wie der Name andeutet – neben anderen Pflanzen auch in Meerrettich vor, wo sie für die Katalyse von Oxidationsprozessen verantwortlich ist.

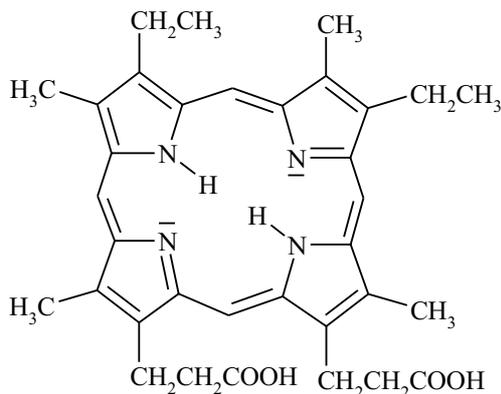


Abbildung 2.7: Freie-Base-Mesoporphyrin IX, das als Chromophor in der Meerrettichperoxidase verwendet wurde. (Die natürliche Hämgruppe des Proteins enthält statt der zwei zentralen Wasserstoffe ein Eisenatom.)

In ihrer natürlichen Form eignet sich HRP nicht zum spektralen Lochbrennen. Der Grund dafür liegt in der kurzen Lebensdauer der angeregten Zustände, die man für das zentrale Hämeisen findet (Pahapill und Rebane, 1989). Daraus resultieren

homogene Linienbreiten, die den inhomogenen Verbreiterungen der Absorptionsbanden vergleichbar sind. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde deshalb eine Form der Meerrettichperoxidase verwendet, bei der das zentrale Eisenatom der Hämgruppe durch zwei Wasserstoffatome ersetzt war; der Chromophor (siehe Abb. 2.7) des Proteins wird dann als ›Freie-Base-Mesoporphyrin‹ bezeichnet. Die strukturelle Abweichung zwischen dieser Form und dem natürlich vorkommenden Protein ist vermutlich klein; es wurde z.B. gezeigt, daß trotz der Substitution des Häms die Fähigkeit des Proteins, kleine Moleküle zu binden, noch vorhanden ist (Horie et al., 1985). Darüber hinaus sollten in dieser Arbeit ja nicht biologische Funktionen eines bestimmten Proteins, sondern typische Merkmale in der Tieftemperaturdynamik dieser Moleküle untersucht werden; das ist natürlich auch bei geringfügig veränderten Proteinen möglich. Der Lochbrennmechanismus in Freie-Base-Mesoporphyrin beruht auf einem lichtinduzierten Transfer der beiden zentralen Wasserstoffe (Fidy et al., 1992).

Für das in Kap. 4.1 geschilderte Experiment wurde gefriergetrocknete Meerrettichperoxidase in einem 10 mM Phosphat-Puffer (pH 8.0) gelöst; anschließend wurde Glycerin in einem Verhältnis von 1:1 (v:v) hinzugefügt. Die Konzentration an HRP in der Probe betrug etwa $2.3 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Für die Trehalose-Experimente aus Kap. 5 wurde zunächst eine gesättigte Trehalose/Pufferlösung hergestellt, in der die Meerrettichperoxidase gelöst wurde. Zu diesem Gemisch wurden dann unterschiedliche Mengen an Glycerin hinzugegeben, um eine Probe niedrigerer Trehalose-Konzentration (Probe I, 40/50/10%, v:v für Trehaloselösung/Glycerin/Puffer) bzw. höherer Trehalose-Konzentration (Probe II, 60/33/7%, v:v) zu erhalten.

Schließlich wurde noch eine Probe in deuterierter Lösung (Kap. 6.2) vermessen. Für diese wurde zunächst ein protonierter einmolarer Phosphatpuffer (pH 8.0) mit deuteriertem Wasser auf 10 mM herunterverdünnt. Der so erhaltene Puffer enthielt also zu 99 % deuterierte Wassermoleküle. Mit diesem Puffer wurde dann eine gesättigte Trehalose-Lösung hergestellt, in der die Meerrettichperoxidase gelöst wurde, anschließend wurde wiederum (protoniertes) Glycerin hinzugegeben. Das Konzentrationsverhältnis der einzelnen Bestandteile in dieser Probe entsprach dem der protonierten Probe I (s.o.), mit dem alleinigen Unterschied, daß praktisch alle Wassermoleküle durch deuterierte Moleküle ersetzt waren.

Für alle HRP-Experimente wurden die Proben in Glasküvetten der Dicke 1.5 mm eingefüllt, das Lochbrennen wurde jeweils in einem Frequenzbereich von ca. 10 Wellenzahlen im Maximum der inhomogenen Banden bei ca. 16300 cm^{-1} durchgeführt. Die spektralen Löcher wurden dann über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen beobachtet, lediglich die Messungen zum Trehaloseeffekt an Probe II erstreckten sich nur über einige Tage; es war nach dieser Zeit klar, daß die unterschiedlichen Trehalose-Konzentrationen der Proben I und II keinen Unterschied in der Proteindynamik bewirkten.

Myoglobin

Das andere in dieser Arbeit untersuchte Hämprotein, Myoglobin ($\langle \text{Mb} \rangle$), ist wahrscheinlich das meistuntersuchte Protein überhaupt. Es dient in den Muskeln von Säugetieren zur Bindung und Speicherung von Sauerstoff (siehe z.B. Lehninger et al., 1994). Auch im Myoglobin mußte die natürliche Hämgruppe ausgetauscht werden, um schmalbandiges spektrales Lochbrennen zu ermöglichen. Anders als bei der Meerrettichperoxidase wurde hierbei aber nicht nur das zentrale Eisenatom ersetzt, sondern ein etwas anderer Chromophor, nämlich *Zink-Phaeophorbid a*, in das Protein eingebaut ($\langle \text{Zn-Mb} \rangle$). (Die Prozedur des Chromophoraustauschs wird in (Schlichter et al., 2001b) und den dortigen Referenzen beschrieben.)

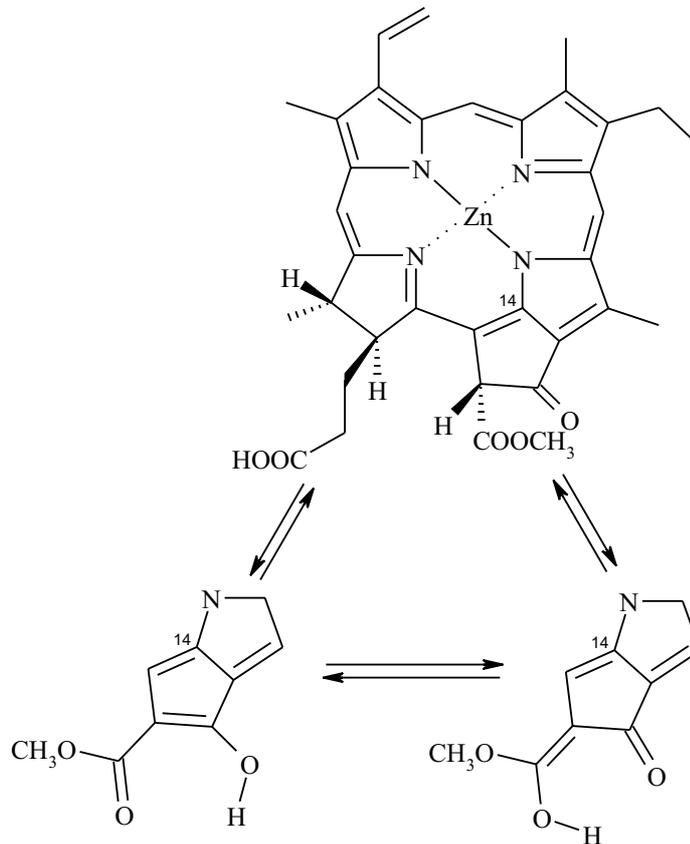


Abbildung 2.8: *Zn-Phaeophorbid a* wurde statt der natürlichen Hämgruppe in den Myoglobin-Experimenten verwendet. In der unteren Bildhälfte ist der Protonenübergang dargestellt, der wahrscheinlich als Photoreaktion beim Lochbrennen genutzt wird.

Der genaue Lochbrennmechanismus am Zink-Phaeophorbid ist noch nicht bekannt, es wird aber vermutet, daß es sich um einen lichtinduzierten Protonentransfer handelt. Diese These konnte durch die Experimente in dieser Arbeit

belegt werden: Die Rate, mit der die Rückreaktion der Phototransformation bei einer Temperatur von 4.2 K stattfindet, ändert sich stark bei einer Deuterierung der Probe (siehe Kap. 6.1); dies deutet auf einen Tunnelprozeß eines Protons hin. Ein mögliches Reaktionsschema ist in Abb. 2.8 vorgeschlagen.

An Zn-Mb wurden zwei Alterungs- und Wartezeit-Experimente durchgeführt, einmal in einer protonierten, das andere Mal in einer deuterierten Lösung. Für das erste Experiment wurde dazu das Protein in einem protonierten Puffer gelöst; für die zweite Messung wurde dagegen (in analoger Weise wie bei der Meerrettichperoxidase) zunächst ein fast vollständig deuterierter Puffer hergestellt, in dem dann das Protein gelöst wurde; anschließend wurde in beiden Fällen (protoniertes) Glycerin hinzugegeben.

Bei beiden Proben war die Verwendung relativ dicker Küvetten (≈ 3 mm) nötig, um genügend optische Dichte für Durchführung von Lochbrennexperimenten zu erhalten. Als Folge davon ergab sich nach dem Einfrieren eine deutlich schlechtere Glasqualität der Proben als etwa in den HRP-Experimenten, und daraus resultierend ein recht hoher Anteil an Streulicht. Dies führte zu einem deutlich schlechteren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis als es in den HRP-Messungen auftrat.

Für die Durchführung der Alterungsexperimente wurden in beiden Proben spektrale Löcher im Frequenzbereich zwischen 14980 und 15000 cm^{-1} gebrannt. In der protonierten Probe wurde zudem eine mögliche Frequenzabhängigkeit der spektralen Diffusion untersucht. Zu diesem Zweck wurden in einem weiteren Experiment drei spektrale Löcher im Bereich zwischen 14967 und 15108 cm^{-1} gebrannt und anschließend einige Tage beobachtet. Die Alterungszeit war in diesem Fall für alle drei Löcher praktisch identisch (≈ 100 min).

Kapitel 3

Spektrale Diffusion im TLS-Bild

Nachdem im vorigen Kapitel einige theoretische und experimentelle Grundlagen der Lochbrennspektroskopie besprochen wurden, sollen nun die beiden mikroskopischen Modelle eingeführt werden, die in dieser Arbeit zur Interpretation der spektralen Diffusion verwendet werden. Den Anfang macht dabei das sog. Standard-Tunnel-Modell, eine Besprechung des Diffusionsmodells folgt dann in Kap.4.2. Es erweist sich allerdings als günstig, zuvor noch das Konzept der sog. *Energielandschaften* vorzustellen (Frauenfelder und Leeson, 1998; Frauenfelder et al., 1991), das einen äußerst nützlichen Ansatz zur Beschreibung der komplizierten Eigenschaften komplexer Systeme darstellt.

3.1 Energielandschaften

Man versteht unter einer Energielandschaft die Darstellung der potentiellen Energie eines Systems (beispielsweise eines Proteins) als Funktion all seiner Koordinaten. Die Minima dieser hochdimensionalen Landschaft entsprechen den verschiedenen strukturellen Zuständen des Systems, Übergänge zwischen diesen Minima stellen Strukturänderungen dar, deren Zeitkonstanten (bei gegebener Temperatur) durch die zu überwindenden Energiebarrieren bestimmt werden. Die Energielandschaft charakterisiert deshalb sowohl Struktur als auch Dynamik eines Systems vollständig – auch der Faltungsprozeß eines Proteins kann z.B. als Relaxationsvorgang in einer solchen Landschaft interpretiert werden (Dobson et al., 1998; Karplus, 2000). Das Konzept ist also von fundamentaler Bedeutung.

Eine Energielandschaft ist im Prinzip durch den Hamiltonian des jeweiligen Systems eindeutig festgelegt und daher zeitunabhängig. In Experimenten wird allerdings oft nicht die globale Energielandschaft untersucht, sondern lediglich ein Unterraum, der von einigen wenigen Systemkoordinaten, sog. *essentiellen Koordinaten*, aufgespannt wird. Diese *effektive Energielandschaft* kann aber durchaus zeitabhängig sein. Ein gutes Beispiel für diesen Sachverhalt geben wieder die schon in der Einleitung erwähnten Messungen zur Rückbindung von Kohlenmonoxid an Myoglobin nach der Abtrennung durch einen Laserpuls. In diesen Experimenten

machte man die zunächst verblüffende Entdeckung, daß die Rückbindungsreaktion bei *höheren* Temperaturen *langsamer* verläuft, eine Erscheinung, die als inverser Temperatureffekt bezeichnet wird (Sastry und Agmon, 1997, und dortige Referenzen). Verantwortlich für diesen Effekt sind *zeitliche Änderungen* in der Höhe der Energiebarriere, die das Kohlenmonoxid bei der Rückreaktion überwinden muß, verursacht durch Relaxationsprozesse des gesamten Proteins. Da die Proteinrelaxationen bei höheren Temperaturen schneller verlaufen, beobachtet man das unerwartete Temperaturverhalten. Faßt man daher die Energiebarriere, dargestellt längs einer für die Rückreaktion wichtigen essentiellen Koordinate, als effektive Energielandschaft auf, so findet man gerade die behauptete Zeitabhängigkeit. Ein Mechanismus, der in ähnlicher Weise auf einer zeitlich veränderlichen Energielandschaft beruht, wird in Kap. 4.2 zur Erklärung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet.

Aus den verschiedenen experimentellen Ergebnissen, die im Lauf der Jahre über das Verhalten von Proteinen gesammelt wurden, war es möglich, einige qualitative Merkmale ihrer Energielandschaften herauszudestillieren. Alle Experimente deuten auf einen *hierarchischen* Aufbau hin (Frauenfelder, 1995; Frauenfelder und McMahon, 2000); im Falle des Myoglobins sind zumindest vier Hierarchieebenen eindeutig belegt (Ansari et al., 1985; Frauenfelder et al., 1991): Ein funktioneller Zustand dieses Proteins¹ kann in drei verschiedenen Unterzuständen vorkommen, den sog. taxonomischen Zuständen, die durch relativ hohe Energiebarrieren getrennt sind. Sie bilden die oberste Hierarchieebene. Zu jedem dieser taxonomischen Zustände existiert eine große Zahl von weiteren CS, die durch kleinere Barrieren getrennt sind (zweite Hierarchieebene); auch diese Subzustände enthalten weitere Unterzustände und so fort. Belege für Hierarchieebenen mit sehr niedrigen Energiebarrieren liefern Messungen zur spektralen Diffusion, die ja selbst bei Temperaturen im mK-Bereich noch beobachtet werden kann. Hierbei sind wahrscheinlich Tunnelübergänge zwischen verschiedenen CS von großer Bedeutung. Die Energielandschaft eines Proteins ist also gekennzeichnet durch eine komplizierte, »raue« Struktur. Dies ist der Grund für die vielen Eigenschaften, die das Tieftemperaturverhalten von Proteinen mit anderen Systemen gemeinsam hat; auch Gläser weisen beispielsweise eine ähnlich komplizierte Energielandschaft auf. (Die spezielle hierarchische Struktur scheint allerdings ein besonderes Merkmal der Proteine sein). Als Folge dieser Ähnlichkeit findet man z.B. auch in Proteinen ein dem Glasübergang (Angell, 1995) analoges Phänomen (Doster et al., 1989; Rasmussen et al., 1992): Unterhalb einer gewissen Temperatur T_G wird die Zeit, die ein Protein oder Glas benötigt, um aus einem lokalen Minimum seiner Energielandschaft in ein anderes zu wechseln, sehr viel länger als alle experimentell relevanten Zeitskalen. Die interne Beweglichkeit des Systems verringert sich deshalb drastisch, es kann in vernünftigen Zeiten nicht mehr equilibrieren und wird somit *nichtergodisch*. Zu den vielen Gemeinsamkeiten im Verhalten von Proteinen und Gläsern unterhalb von T_G gehören z.B. stark nichtexponentielle Rela-

¹z.B. MbCo, also Myoglobin mit gebundenem Kohlenmonoxid

xationsprozesse (Iben et al., 1989) oder große inhomogene Verbreiterungen der optischen Absorptionslinien (Friedrich, 1995; Thorn-Leeson et al., 1997). Auch bei Temperaturen im Kelvinbereich (und darunter) zeigen sich Übereinstimmungen, beispielsweise eine lineare Abhängigkeit der spezifischen Wärme von der Temperatur (Singh et al., 1984; Yang und Anderson, 1986; Zeller und Pohl, 1971) oder auch das Auftreten von spektraler Diffusion in beiden Systemen.

Diese vielen Ähnlichkeiten legen es nahe, zur Erklärung von Messungen an Proteinen Modelle heranzuziehen, die sich bei der Beschreibung von Gläsern bewährt haben. Aus diesem Grund wird im folgenden Kapitel das sog. *Standard-Tunnel-Modell* vorgestellt. Dieses Modell ist in der Lage, eine Vielzahl von Tieftemperaturphänomenen in Gläsern zu beschreiben; auch Experimente zur spektralen Diffusion können damit oft erfolgreich interpretiert werden. Eine Anwendung des Modells auf die in dieser Arbeit durchgeführten Lochbrennexperimente an Gläsern wird in Kap. 3.3 gegeben; die spektrale Diffusion in Proteinen aus dem Blickwinkel des Tunnel-Bildes wird dann in Kap. 4.1 untersucht.

3.2 Das Standard-Tunnel-Modell

Grundlegende Idee des 1972 von zwei Gruppen (Anderson et al., 1972; Philips, 1972) parallel eingeführten Standard-Tunnel-Modells ist es, die komplizierte Energielandschaft eines Glases durch ein Ensemble von Zwei-Niveau-Systemen anzunähern. Wie ist diese Näherung zu begründen?

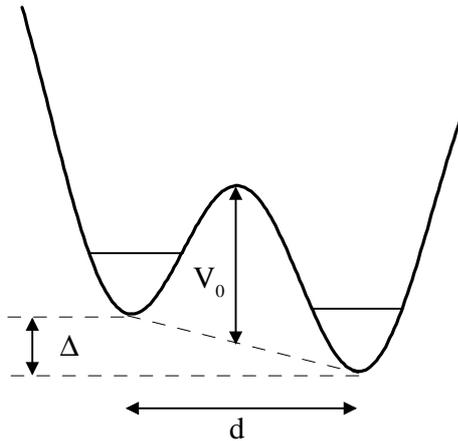


Abbildung 3.1: Ein Tunnelsystem (TLS) mit den wichtigsten Parametern Δ (Energieasymmetrie), V_0 (Höhe der Potentialbarriere) und d (Tunnelabstand). Das Potential ist längs einer geeigneten Konformationskoordinate für den Tunnelübergang aufgetragen.

Bei genügend tiefen Temperaturen finden aktivierte dynamische Prozesse, die das Überwinden einer Barriere in einer Energielandschaft erfordern, praktisch nicht mehr statt. Es sind aber weiterhin *Tunnelübergänge* zwischen benachbarten Potentialmulden möglich. Ist $k_B T$ sehr viel kleiner als die Abstände zwischen Grund- und Anregungszustand in den am Tunnelprozeß beteiligten Potentialmulden, so sind dort praktisch ausschließlich die Grundzustände besetzt. Die beiden durch

den Tunnelprozeß verknüpften Grundzustände bilden also gleichsam ein abgeschlossenes Zwei-Niveau-System, das gewöhnlich als *TLS* (Two-Level-System) oder auch als Tunnelsystem bezeichnet wird. Ein Tunnelübergang eines solchen TLS entspricht einer kleinen strukturellen Änderung im Glas², beispielsweise einem geringfügigen Ortswechsel eines Atoms (oder wahrscheinlicher einer Gruppe von Atomen). Koppeln nun die Tunnelsysteme an im Glas vorhandene Schwingungen, ist also ein Übergang verknüpft mit der Vernichtung oder Erzeugung eines Phonons, so ist vorstellbar, daß die thermodynamischen Eigenschaften eines Glases bei sehr tiefen Temperaturen durch die Tunnelsysteme beeinflusst oder sogar bestimmt werden können können.

Für eine quantitative Beschreibung kann ein einzelnes Tunnelsystem durch zwei Parameter charakterisiert werden (siehe Abb.3.1), z.B. durch seine Energieasymmetrie Δ und den Tunnelparameter λ . Letzterer ist eine Funktion der Barrierenhöhe V_0 , des Tunnelabstandes d und der Masse m der am Tunnelprozeß beteiligten Teilchen (Friedrich und Haarer, 1986). Für die Energiedifferenz zwischen den beiden Eigenzuständen des Tunnelsystems gilt dann:

$$E = \sqrt{\Delta^2 + (\hbar\Omega)^2 \exp(-2\lambda)} \quad (3.1)$$

($\hbar\Omega$ ist eine Energie von der Größe der Nullpunktsschwingung in einer Potentialmulde.) Verschiedene Tunnelsysteme eines Glases werden sich nun sicherlich in ihren Parametern unterscheiden, somit auch unterschiedliche Energien E aufweisen. Zu ihrer Beschreibung muß deshalb eine zunächst unbekannte Zustandsdichte $p(E)$ eingeführt werden, die den Bruchteil von TLS mit der Energie E (pro Einheitsvolumen) angibt. Messungen in Gläsern bei tiefen Temperaturen (unter 1 K) haben nun aber eine etwa *lineare* Abhängigkeit der spezifischen Wärme von der Temperatur ergeben (Zeller und Pohl, 1971). Diese kann erklärt werden, wenn die Zustandsdichte $p(E)$ konstant in E ist (Anderson et al., 1972). Man nimmt also an:

$$p(E) = \text{const.} = p_0 \quad (3.2)$$

Es sollte erwähnt werden, daß die erwähnten Messungen der spezifischen Wärme keinen Aufschluß darüber geben, wie $p(E)$ sich bei höheren Temperaturen verhält, da dort der Einfluß von Phononen auf die spezifische Wärme überwiegt. Gl. 3.2 ist also nur für Energien in der Gegend von $k_B T$ mit $T \leq 1$ K belegt.

Kann man nun auch Verteilungsfunktionen in den Parametern Δ und λ angeben, die mit einer linearen Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wärme kompatibel sind? Die Höhe der Energieniveaus in den Potentialmulden wird durch die Tunnelprozesse wenig beeinträchtigt, die Verteilung in Δ (also dem Abstand der Niveaus im Falle einer beliebig hohen Potentialbarriere V_0) entspricht also im Wesentlichen der Verteilung für E . Man findet sogar, daß die Annahme von unabhängigen *konstanten* Verteilungen sowohl für Δ als auch für λ mit einer linearen Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wärme kompatibel ist³ (Friedrich und

²Genau genommen gilt das nur für asymmetrische Tunnelsysteme.

³Für $p(E)$ ergibt sich in diesem Fall eine sehr schwache, logarithmische Energieabhängigkeit.

Haarer, 1986):

$$p(\Delta) = \text{const.} = p_{\Delta} \quad p(\lambda) = \text{const.} = p_{\lambda} \quad (3.3)$$

Es muß außerdem noch eine Wechselwirkung zwischen Tunnelsystemen und den Glas-Phononen in das Modell integriert werden. Man nimmt dabei an, daß ein Phonon eine Verformung im Potential eines Tunnelsystems bewirkt und auf diese Art evtl. einen Tunnelübergang verursacht. Es kann dann mit Hilfe der Verteilungen aus Gl. 3.3 berechnet werden, mit welcher Rate Phononen einer bestimmten Energie absorbiert oder emittiert werden (Jäckle, 1972), woraus sich wiederum eine Fülle von Aussagen über die thermodynamischen und dynamischen Eigenschaften von Tieftemperaturgläsern ableiten lassen. Deren Übereinstimmung mit einer großen Zahl von experimentellen Beobachtungen – z.B. der schon erwähnten linearen Abhängigkeit der spezifischen Wärme von der Temperatur (Schmidt et al., 1993; Zeller und Pohl, 1971), der quadratischen Temperaturabhängigkeit der Wärmeleitfähigkeit (Zeller und Pohl, 1971), der Zeitabhängigkeit der spezifischen Wärme (Loponen et al., 1980, 1982) und der Wärmeabgabe nach einer plötzlichen Erwärmung (Zimmermann und Weber, 1981), der Existenz von Phononenechos (Black und Halperin, 1977; Golding und Graebner, 1976), der Abschwächung von Ultraschall-Pulsen (Golding et al., 1973; Jäckle, 1972), der Intensitätsabhängigkeit der dielektrischen Absorption (von Schickfus und Hunklinger, 1977) sowie im optischen Bereich (s.u.) der Temperaturabhängigkeit der homogenen Linienbreite (Schmidt et al., 1993; Selzer et al., 1976) – belegen die Richtigkeit des Modells.

Unbefriedigend bleibt allerdings, daß die wirkliche physikalische Natur der Tunnelsysteme nach wie vor relativ ungeklärt ist. Zwar gab es Versuche, mit numerischen Methoden typische Strukturen in Modellgläsern zu identifizieren, die als TLS in Frage kommen (Dab et al., 1995; Heuer und Silbey, 1993), die Tunnelsysteme haben aber nach wie vor eher den Status abstrakter dynamischer Freiheitsgrade.

3.2.1 Der Diffusionskern im TLS-Bild

Auch die spektrale Diffusion, die in vielen Tieftemperatur-Gläsern gemessen wurde (z.B. Breinl et al., 1984; Fritsch et al., 1996a), läßt sich im Rahmen des TLS-Bildes erklären, wenn die Tunnelsysteme in irgendeiner Weise an die im Glas gelösten Chromophore koppeln. Das kann z.B. über elektrostatische Wechselwirkung oder auch durch Strain-Felder geschehen (Black und Halperin, 1977). Ein Tunnelübergang führt dann zu einer Änderung in der Absorptionsfrequenz eines Chromophors. Da einzelne Chromophore jeweils unterschiedliche Tunnelsysteme in ihrer Nachbarschaft haben, kommt es in einem Ensemble solcher Farbstoffmoleküle auch wieder zu unterschiedlichen Frequenzschwankungen und somit zu spektraler Diffusion.

Ein Tunnelübergang ist, wie erwähnt, aus Energieerhaltungsgründen an die Absorption oder Emission eines Phonons gekoppelt, die typische Zeitskala τ , auf der ein solcher Übergang stattfindet, hängt also ab von der Phononendichte im Glas und somit von der Temperatur. Zusätzlich findet man für τ eine *exponentielle* Abhängigkeit vom Tunnelparameter λ (Reinecke, 1979). Aus der breiten Verteilung von λ (Gl.3.3) folgt deshalb, daß die Zeiten τ , in denen es zu TLS-Übergängen kommt, über viele Größenordnungen verteilt sind. Auch spektrale Diffusion kann deshalb in Gläsern über riesige Zeitbereiche beobachtet werden.

Es ist möglich, im TLS-Bild unter einigen einschränkenden Annahmen einen analytischen Ausdruck für einen *spektralen Diffusionskern* herzuleiten (Reinecke, 1979). Man schließt dabei eine Wechselwirkung der Tunnelsysteme untereinander aus; die Wechselwirkung zwischen TLS und Chromophor ist in dieser Betrachtung vom Dipol-Dipol-Typ. Für den Diffusionskern ergibt sich dann:

$$P_{TLS}(\nu, t_w | \nu_0) = \frac{2}{\pi} \frac{\gamma(t_w, T)}{[\gamma(t_w, T)]^2 + 4(\nu - \nu_0)^2} \quad (3.4)$$

Der Diffusionskern ist also *lorentzförmig*, für seine Breite γ gilt

$$\gamma(t_w, T) \propto \left\langle \frac{\Delta(\lambda, E)}{E} n(t_w, T) \right\rangle_{\lambda, E}, \quad (3.5)$$

wobei $n(t_w, T)$ den Bruchteil der TLS bezeichnet, die während der Zeit t_w ihren Zustand gewechselt haben.⁴

Um nun die Zahl der in einer bestimmten Zeit stattfindenden TLS-Übergänge auszurechnen, wird im Standard-TLS-Modell davon ausgegangen, daß sich die Tunnelsysteme im *thermischen Gleichgewicht* befinden. Aus der Kopplung der TLS ans Phononenbad läßt sich dann $n(t_w, T)$ bestimmen; man findet so in guter Näherung eine *logarithmische Zeitabhängigkeit* für die Breite des Diffusionskerns (z.B. Friedrich und Haarer, 1986):

$$\gamma \propto \ln(t_w) \quad (3.6)$$

3.2.2 Nichtgleichgewichts-Verteilungen der TLS

Die sich über Größenordnungen erstreckende Verteilung in den Zeitkonstanten τ der einzelnen Tunnelsysteme legt nahe, daß die Annahme einer Gleichgewichtsverteilung der TLS nicht vollständig exakt sein kann. Befinden sich nämlich die TLS bei einer Temperatur T_i im thermischen Gleichgewicht, so wird das nicht mehr der Fall sein, wenn das Glas plötzlich auf eine Temperatur $T_f < T_i$ heruntergekühlt wird. Die Einstellung des neuen Gleichgewichts wird von den Zeitkonstanten $\tau(T_f)$ bestimmt und kann um Größenordnungen länger dauern als jedes Experiment. In einem solchen Fall (der genau die Situation der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen widerspiegelt) ist es deshalb nötig, *Nichtgleichgewichtseffekte*

⁴Die Mittelung über die Parameter λ und E der Tunnelsysteme sorgt dafür, daß die unterschiedlichen Zeitkonstanten der einzelnen TLS berücksichtigt werden.

mit in das TLS-Bild aufzunehmen.

Ansatzpunkt für eine solche Modifikation ist Gl. 3.5, genauer gesagt der Bruchteil $n(t_w, T)$ der TLS, die in der Zeit t_w ihren Zustand wechseln. Der Wert für $n(t_w, T)$ hängt sicher davon ab, ob die TLS zu Beginn des Experimentes in einer Gleichgewichtsverteilung waren oder nicht. In (Fritsch, 1997; Fritsch et al., 1996a) wurde ein sehr allgemeiner Ansatz entwickelt, um dem Rechnung zu tragen. Es wird dort angenommen, daß die Tunnelsysteme dem Kühlvorgang des Glases nur bis zu einer bestimmten Temperatur T_i folgen können, bei der sie dann in einer Gleichgewichtsverteilung verharren, während das Glas auf eine Temperatur $T_f < T_i$ weitergekühlt wird. Als Nullpunkt der Zeitskala wird in allen Betrachtungen der Augenblick gewählt, in dem das Glas seine Endtemperatur T_f erreicht. Nach einer bestimmten *Alterungszeit* t_a wird ein spektrales Loch gebrannt, das kurz darauf zum ersten Mal abgescannt wird; die Zeitspanne zwischen Brennen und erstem Scan wird im Folgenden mit t_0 bezeichnet. Wie sieht nun der spektrale Diffusionskern aus, der die Verbreiterung eines Loches unter diesen Bedingungen beschreibt?

Natürlich ist der Kern nach wie vor lorentzförmig (siehe Gl. 3.4), seine Breite γ hängt nun aber ab von den zwei Zeiten t_a und t_w sowie von den beiden Temperaturen T_f und T_i .⁵ Es zeigt sich nun, daß γ additiv aus zwei Beiträgen zusammengesetzt ist, einem *Gleichgewichtsanteil* γ_e , der die gewöhnlich spektrale Diffusion im Standard-TLS-Modell beschreibt, und einem *Nicht-Gleichgewichtsanteil* γ_{ne} , der daraus resultiert, daß die Tunnelsysteme zum Zeitpunkt des Lochbrennens ihr Gleichgewicht noch nicht erreicht hatten. Ihre Relaxation hin auf einen Gleichgewichtszustand bei der Temperatur T_f liefert einen weiteren Beitrag zur spektralen Diffusion. Für die Verbreiterung eines Loches seit dem ersten Scan zur Zeit $t_a + t_0$ ergibt sich so im Detail

$$\gamma = \gamma_e + \gamma_{ne}, \quad (3.7)$$

wobei gilt

$$\gamma_e = \left[\frac{AT_f}{2} \int_0^\infty dx (1 - \tanh^2(x)) \right] \ln \frac{t_w}{t_0} \quad (3.8)$$

sowie

$$\gamma_{ne} = \left[\frac{AT_f}{2} \int_0^\infty dx \tanh(x) \left(\tanh(x) - \tanh\left(x \frac{T_f}{T_i}\right) \right) \right] \ln \frac{t_w + t_a}{t_a} \quad (3.9)$$

(A ist eine Proportionalitätskonstante, die u.a. von der Kopplungsstärke zwischen Tunnelsystemen und Chromophoren sowie der Dichte der Tunnelsysteme abhängt.)

Gl. 3.7–3.9 bilden die Grundlage für die Auswertung eines Wartezeit- und Alterungsexperimentes im Rahmen des TLS-Modells. Man beobachtet in einem solchen Experiment die Verbreiterung einer Serie von spektralen Löchern (die zu

⁵ T_i ist kein Parameter, der experimentell vernünftig kontrollierbar ist, er wird in den Auswertungen deshalb als Fitparameter behandelt.

verschiedenen Alterungszeiten t_a gebrannt wurden) als Funktion der Wartezeit t_w . Alle Daten sollten sich mit Hilfe der obigen Gleichungen durch eine gemeinsame Kombination der Parameter A und T_i beschreiben lassen. Dies wird in den folgenden Kapiteln für verschiedene Glas- und Proteinproben untersucht. Zwei fundamentale Eigenschaften des TLS-Bildes sollen zuvor aber noch einmal explizit erwähnt werden:

- ▷ Der Gleichgewichtsanteil der spektralen Diffusion hängt logarithmisch von der Zeit ab (s. Gl. 3.8): $\gamma_e \propto \ln(t_w)$. Die Gleichgewichtsdiffusion dominiert im Experiment für den Fall $t_w \ll t_a$; alle Tunnelsysteme, die während der Wartezeit t_w ›flippen‹ können, hatten zum Zeitpunkt des Lochbrennens bereits eine Gleichgewichtsverteilung erreicht. *Stationäres nichtlogarithmisches Verhalten ist also mit dem TLS-Modell nicht vereinbar.*
- ▷ Übersteigt in einem Experiment die Wartezeit die Alterungszeit, so müssen entweder Alterungseffekte auftreten (verursacht durch Tunnelsysteme, die so langsam sind, daß sie zum Zeitpunkt des Lochbrennens noch keine Gleichgewichtsverteilung erreichen konnten) oder die spektrale Diffusion muß sättigen; letzteres passiert, wenn es keine Tunnelsysteme gibt, deren Zeitkonstanten größer sind als die Alterungszeit. Dieses Verhalten ist unabhängig von den Verteilungsfunktionen, die den Tunnelsystemen zugeschrieben werden.

3.3 Experimente an Wasser-Glycerin-Gläsern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Wartezeit- bzw. Alterungsexperimente an Wasser-Glycerin-Gläsern durchgeführt (Schlichter und Friedrich, 2001a), wobei im einen Fall protoniertes, im anderen deuteriertes Wasser für die Herstellung des Glases verwendet wurde. Als Chromophor diente der in niedriger Konzentration gelöste Farbstoff Resorufin (Einzelheiten zur Herstellung der Proben und zur Durchführung des Experimentes siehe Kap. 2.2.2). In Lochbrennexperimenten an solchen oder ähnlichen Glas/Farbstoff-Systemen wurden bereits früher Druck- und Lösungsmittelverschiebungen untersucht (Zollfrank und Friedrich, 1992). Die spektralen Löcher in beiden Glasexperimenten konnten (zu allen Warte- und Alterungszeiten) stets ausgezeichnet durch Lorentzkurven angefüttet werden. Die Breite des ebenfalls lorentzförmigen Diffusionskerns ließ sich daher leicht bestimmen, indem von der Breite eines Loches nach einer Wartezeit t_w jeweils die Lochbreite zur Zeit t_0 des ersten Scans subtrahiert wurde.

3.3.1 Messungen im deuterierten Glas

In der *deuterierten* Glasprobe wurden sieben spektrale Löcher nach Alterungszeiten zwischen 40 und 16000 Minuten gebrannt; ihre Verbreiterung über einen

Zeitraum von etwa zwei Wochen ist in Abb. 3.2 dargestellt, aus Gründen der Übersichtlichkeit allerdings nur für vier ausgewählte Datensätze. Gut zu erkennen ist der Einfluß der Alterungszeit auf die Meßergebnisse: Löcher, die zu einem späteren Zeitpunkt gebrannt wurden, zeigen eine deutlich geringere Verbreiterung. Die Ergebnisse befinden sich in völliger Übereinstimmung mit der Theorie des TLS-Modells, die im vorigen Kapitel erläutert wurde; es ist im Rahmen der experimentellen Genauigkeit sehr gut möglich, alle Datensätze mit Gl. 3.7–3.9 und einem gemeinsamen Parameterpaar (A, T_i) zu fiten (durchgezogene Linien in Abb. 3.2). Für die Temperatur T_i , bei der die Tunnelsysteme dem Einkühlvorgang ›nicht mehr folgen können‹, ergab sich in diesem Experiment ein Wert von etwa 30 K.⁶

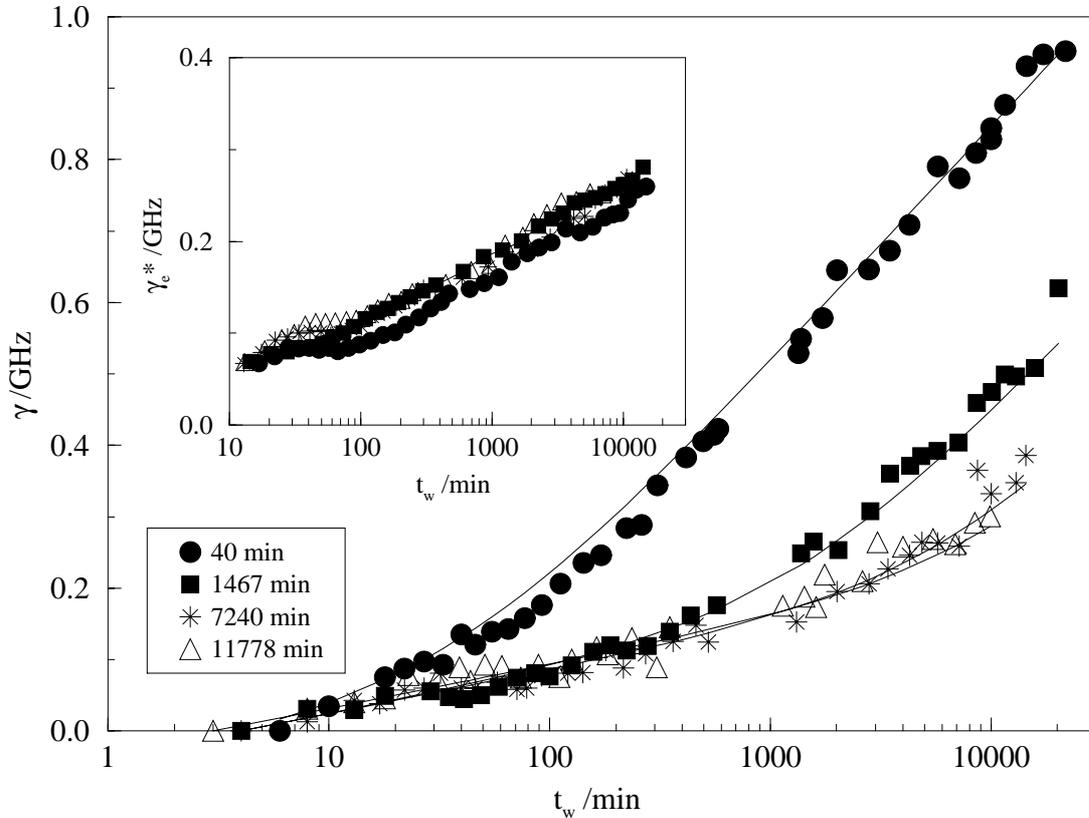


Abbildung 3.2: Lochverbreiterung als Funktion der Wartezeit, gemessen bei 4.2 K an Resorufin in einem deuterierten Wasser-Glycerin-Glas. Deutlich zu erkennen ist der Einfluß der Alterungszeit (40 – 11778 Minuten) auf die spektrale Diffusion. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den bestmöglichen Fit nach Gl. 3.7–3.9. Der Einschub zeigt den Gleichgewichtsanteil γ_e^* der spektralen Diffusion.

Bei Kenntnis der Parameter A und T_i ist es möglich, den Nichtgleichgewichtsanteil der spektralen Diffusion aus den Meßergebnissen zu eliminieren. In diesem

⁶Für die Bestimmung von A und T_i wurden natürlich alle gemessenen Datensätze verwendet.

Fall sollten alle Meßpunkte, unabhängig von der Alterungszeit, zu der ein Loch gebrannt wurde, auf einen gemeinsamen Gleichgewichtsast fallen. Man kann darüber hinaus noch berücksichtigen, daß die Zeit t_0 , zu der ein Loch zum ersten Mal gescaant wird, nicht für alle Datensätze gleich ist. Sinnvollerweise trägt man daher

$$\gamma_e^* \equiv (\gamma - \gamma_{ne}) + [\dots] \ln \left(\frac{t_0}{min} \right) \quad (3.10)$$

als Funktion der Wartezeit auf. (Dabei steht $[\dots]$ abkürzend für die eckige Klammer in Gl. 3.8.) Dies ist im Einschub der Abb. 3.2 dargestellt. Man kann erkennen, daß alle Meßpunkte im Rahmen der experimentellen Genauigkeit wirklich eine logarithmische Zeitabhängigkeit zeigen und auf einem gemeinsamen Gleichgewichtsast liegen.

Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, daß die Ergebnisse dieses Experiments gut durch das TLS-Bild beschrieben werden können. Voraussetzung dabei ist allerdings, daß Nichtgleichgewichtseffekte, wie sie im vorigen Kapitel erläutert wurden, berücksichtigt werden.

3.3.2 Messungen im protonierten Glas – Abweichungen vom TLS-Modell

In völliger Analogie zu dem gerade geschilderten Experiment wurde nun eine zweite Messreihe an einem *protonierten* Glas durchgeführt, wiederum bei einer Temperatur von 4.2K. Die spektralen Löcher wurden dabei nach praktisch den gleichen Alterungszeiten gebrannt wie im Falle des deuterierten Glases.

Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abb. 3.3 dargestellt. Auffallend ist, daß die spektrale Diffusion im Vergleich zu den im vorigen Abschnitt geschilderten Messungen deutlich zugenommen hat; man findet beispielsweise für den ersten Datensatz nach einer Wartezeit von 10000 Minuten eine Lochverbreiterung von etwa 1.4 GHz, gegenüber etwa 0.85 GHz in der deuterierten Probe. Auch in den Messungen am protonierten Glas ist eine starke Abhängigkeit der spektralen Diffusion von der Alterungszeit festzustellen. Allerdings ist es jetzt problematisch, die Meßergebnisse durch das TLS-Modell zu erklären: Der bestmögliche Fit gemäß Gl. 3.7–3.9 zeigt nur schlechte Übereinstimmung mit den Meßergebnissen.⁷ Noch deutlicher ist die Abweichung vom TLS-Modell zu erkennen, wenn man versucht, die Meßdaten auf einen gemeinsamen Gleichgewichtsast zu reduzieren, völlig analog zum Vorgehen im vorigen Kapitel. Man erhält in diesem Fall ein deutlich *nichtlogarithmisches* Verhalten für $\gamma_e^*(t_w)$, auch ist die Abweichung aller Datensätze von einem gemeinsamen Verlauf viel größer (siehe Einschub in Abb. 3.3). Das TLS-Modell scheint daher – auch bei Berücksichtigung von Nichtgleichgewichtseffekten – *nicht* geeignet zu sein, die Resultate dieses Experimentes zu erklären.

⁷Es wurden natürlich wieder alle gemessenen Datensätze für die Bestimmung der Fitparameter (A , T_i) verwendet, nicht nur die in Abb. 3.3 dargestellten.

Eine Möglichkeit, das TLS-Modell auch mit nichtlogarithmischen Meßergebnissen in Einklang zu bringen, besteht natürlich darin, andere als die in Kap. 3.2 eingeführten (konstanten) Verteilungsfunktionen für die Parameter der Tunnelsysteme zu verwenden. Dies ist aber relativ unbefriedigend, da geänderte Verteilungsfunktionen nur schwer physikalisch zu begründen sind, während das Standard-Modell durch eine Vielzahl von Experimenten gestützt wird.

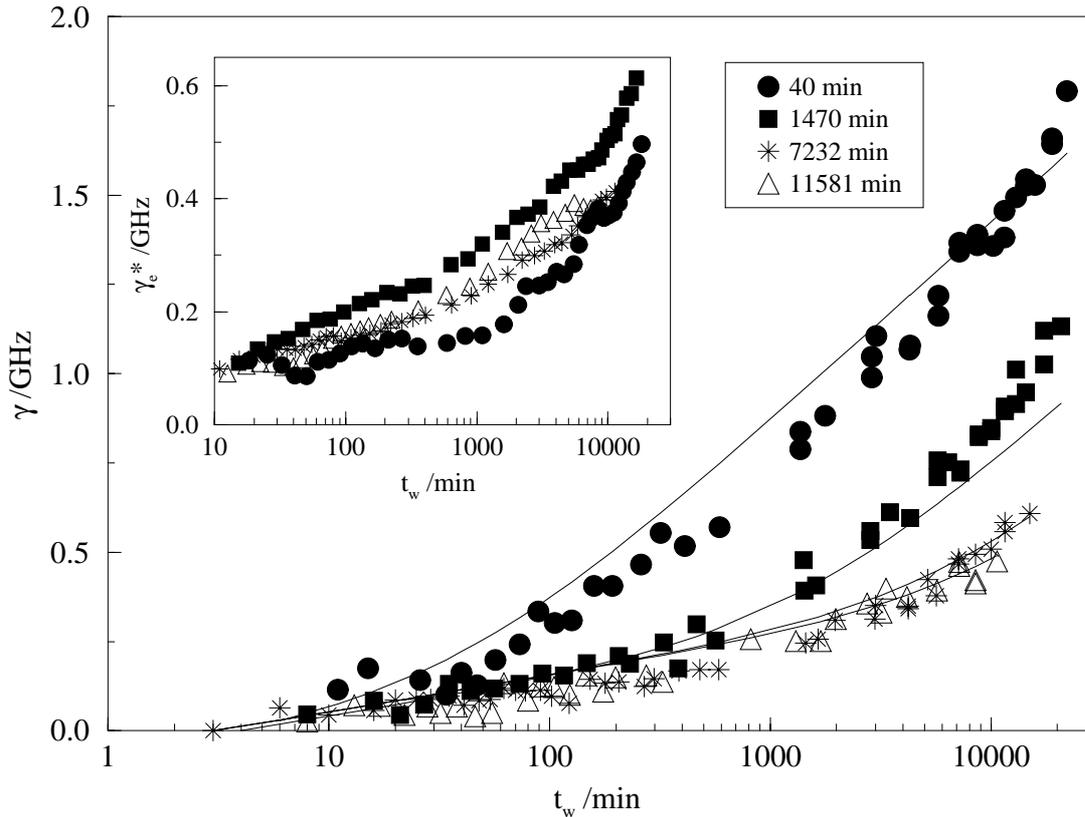


Abbildung 3.3: Lochverbreiterung als Funktion der Wartezeit, gemessen bei 4.2 K in einem protonierten Wasser-Glycerin-Glas. Die Darstellung ist die gleiche wie in Abb. 3.2.

Eine in der Literatur vorgeschlagene Modifikation des Tunnelmodells (Heuer und Neu, 1997) geht davon aus, daß durch die im Glas gelösten Chromophore (oder evtl. auch durch andere Verunreinigungen) zusätzliche TLS induziert werden, die zu geänderten Verteilungsfunktionen für die Parameter der Tunnelsysteme führen. Die Folge ist eine geänderte Zeitabhängigkeit der spektralen Diffusion auf langen Zeitskalen. Es war mit diesem Ansatz möglich, Abweichung vom Standard-TLS-Modell zu erklären, die in Lochbrennexperimenten an PMMA⁸ bei Temperaturen unter 2 K gefunden wurden (Maier et al., 1996); bei höheren Temperaturen gelang dies allerdings nicht mehr (Müller et al., 1999, 2000). Es ist auch fraglich,

⁸PMMA = Polymethylmethacrylat

ob diese Theorie zur Begründung der oben erläuterten Messungen geeignet ist. Falls durch den Farbstoff wirklich neue Tunnelsysteme induziert werden, ist es plausibel, daß deren Verteilungsfunktionen im protonierten und deuterierten Glas große Ähnlichkeit haben; man würde daher in beiden Fällen eine Abweichung vom Tunnelmodell erwarten und nicht nur – wie in obigen Messungen – in der protonierten Probe.

Ein anderer Ansatz (Burin und Kagan, 1995) geht von einer ›kohärenten‹ Kopplung zwischen den Tunnelsystemen aus; Kern dieses Modells sind gemeinsame Übergänge zweier TLS. Allerdings ist eine solche kohärente Kopplung nur bei sehr niedrigen Temperaturen von Bedeutung, zur Begründung der obigen Meßdaten ist daher auch dieser Ansatz schlecht geeignet.

Eine mögliche Erklärung der Ergebnisse in den Wasser-Glycerin-Gläsern könnte dagegen darin bestehen, daß sich die beobachtete Dynamik nicht mehr durch einfache Zwei-Niveau-Übergänge beschreiben läßt. Es ist klar, daß dieses Bild eine Tieftemperatur-Näherung darstellt, die irgendwann zusammenbrechen muß – die Dynamik bei höheren Temperaturen ist von komplizierterer Natur. Die Zahl der TLS, in denen es auf der Zeitskala eines Experimentes zu Übergängen kommt, nimmt natürlich mit steigender Temperatur zu; effektiv hat man also mit einer immer höheren Dichte an *relevanten Tunnelsystemen* zu tun. Es ist vorstellbar, daß daher auch Wechselwirkungen zwischen diesen Tunnelsystemen an Bedeutung gewinnen. Der Übergang eines bestimmten TLS kann z.B. zu einer Modifikation im Potential eines anderen führen und so kurzzeitig einen Weg in einen neuen Potentialtopf öffnen. Man kann daher oberhalb einer gewissen, für ein System typischen Temperatur, einen Übergang von einer ›Two-Level‹- in eine ›Multi-Level‹-Dynamik erwarten.

Aus den obigen experimentellen Resultaten wird sofort klar, daß an der beobachteten Dynamik in den Wasser-Glycerin-Gläsern *Tunnelübergänge von Protonen* großen Anteil haben. Die Raten dieser Übergänge werden (aufgrund der größeren Tunnelmassen) bei der Deuterierung stark vermindert; hieraus wiederum resultiert die beobachtete, deutlich kleinere spektrale Diffusion im deuterierten Glas. Tunnelübergänge sind dort seltenere Ereignisse als in der protonierten Probe, oder anders gesagt: Durch Deuterierung wird die Dichte der *relevanten Tunnelsysteme* verringert. Eine mögliche Wechselwirkung zwischen den TLS skaliert sicherlich mit deren Dichte und kann anscheinend im deuterierten Glas (und bei 4.2K) noch vernachlässigt werden. Die Folge ist die im Experiment beobachtete, gut durch das Tunnelmodell zu beschreibende Dynamik.

In der protonierten Probe scheint dagegen die Dichte der relevanten Tunnelsysteme so hoch zu sein, daß ihre Wechselwirkung bereits merklichen Einfluß hat. Aus diesem Grund lassen sich dort die Meßdaten nicht mehr durch einfach Two-Level-Übergänge interpretieren; in diesem Glas hat offensichtlich bereits ein Übergang zu einer Multi-Level-Dynamik stattgefunden.

Kapitel 4

Spektrale Diffusion in Proteinen

Das eigentliche Interesse dieser Arbeit galt allerdings nicht der spektralen Diffusion in Gläsern, sondern dem Verhalten von Hämproteinen. Dieses wurde in einer ganzen Reihe von Experimenten untersucht. Interessanterweise ergaben sich dabei signifikante Abweichung von einem ›typischen‹ Glasverhalten; das Standard-Tunnel-Modell erwies sich beispielsweise stets als völlig ungeeignet zur Interpretation der Ergebnisse. Dies wird im Anschluß detailliert am Beispiel einer Messung gezeigt, die an (in einem Wasser-Glycerin-Glas gelöster) Meerrettichperoxidase durchgeführt wurde (Schlichter et al., 2000a). Völlig analoge Resultate fanden sich aber auch in allen anderen Protein-Experimenten dieser Arbeit – es wurden immer die gleichen Gesetzmäßigkeiten für das Zeitverhalten der spektralen Diffusion festgestellt. Der folgende Abschnitt soll deshalb vor allem ›experimentelles Anschauungsmaterial‹ liefern, das es erlaubt, ein den Resultaten angemessenes Modell der Proteindynamik zu formulieren. Eine genauere Analyse der experimentellen Ergebnisse ist dann den späteren Kapiteln vorbehalten.

4.1 Ein Beispiel: Meerrettichperoxidase

Das oben erwähnte Experiment an HRP (in Wasser-Glycerin) verlief in völliger Analogie zu den in den vorigen Kapiteln geschilderten Glasexperimenten (Details siehe Kap. 2.2.2): Nach einem schnellen Abkühlvorgang von Raum- auf Heliumtemperatur wurden spektrale Löcher in einen engen Frequenzbereich der inhomogenen Absorptionsbande des Proteins gebrannt (siehe Abb. 4.1); deren Verbreiterung wurde dann über einen Zeitraum von etwa zwei Wochen beobachtet. Da an dieser Messung zunächst die Anwendbarkeit des Tunnelmodells überprüft werden soll, liegt der Auswertung der Daten wieder ein lorentzförmiger Diffusionskern zugrunde. Seine Breite γ als Funktion von t_w bzw. t_a ist in Abb. 4.2 dargestellt. Einige interessante Beobachtungen fallen dort ins Auge:

- ▷ Die Verbreiterung der spektralen Löcher (als Funktion der Wartezeit) zeigt ein ausgeprägt nichtlogarithmisches Verhalten; dies ist gut in der halblogarithmischen Auftragung der oberen Bildhälfte zu erkennen. In einer doppelt-

logarithmischen Darstellung (unten) ergibt sich dagegen ein linearer Verlauf, die spektrale Diffusion folgt also einem *Potenzgesetz* in t_w .

- ▷ Die Alterungszeit hat nur einen kleinen Einfluß auf die Lochverbreiterung. Bereits für $t_a \geq 20$ h beobachtet man eine annähernd stationäre spektrale Diffusion – alle später gebrannten Löcher zeigen fast identisches Verhalten.
- ▷ Der Exponent des Potenzgesetzes in t_w hängt nicht von der Alterungszeit ab. In der unteren Bildhälfte ist gut zu erkennen, daß Datensätze, die zu einer größeren Alterungszeit gehören, in einer doppelt-logarithmischen Darstellung nur parallel nach unten versetzt sind, aber die gleiche Steigung (und somit den gleichen Exponenten) haben.

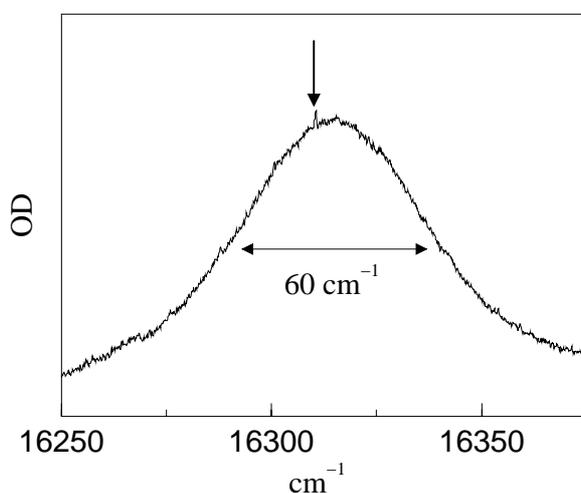


Abbildung 4.1: Die langwellige Absorptionsbande von Meerrettichperoxidase (HRP) in einem Wasser-Glycerin-Glas bei 4.2 K. Der Chromophor ist Mesoporphyrin-IX. Ein Gaußfit liefert eine Breite von ca. 60 cm^{-1} (FWHM) für diese Bande; das Lochbrennen wurde in einem schmalen Frequenzbereich nahe des Maximums durchgeführt (Pfeil).

Es ist nach den Ausführungen in Kap. 3.2.2 unmittelbar klar, daß ein solches Verhalten nicht im Rahmen des Standard-Tunnel-Modell zu erklären ist. Eine wesentliche Vorhersage dieses Modells ist ja die Forderung nach einer logarithmischen Zeitabhängigkeit der Lochverbreiterung. Abweichungen davon kann es nur geben, falls Nichtgleichgewichtseffekte zur Dynamik beitragen; in diesem Fall muß sich aber ein deutlich unterschiedliches Verhalten für spektrale Löcher ergeben, die zu verschiedenen Alterungszeiten gebrannt wurden. Spektrale Diffusion, die nicht von der Alterungszeit abhängt, ist im Rahmen des Modells dagegen nur möglich, wenn die Tunnelsysteme im thermischen Gleichgewicht sind und die spektrale Diffusion somit einem $\ln t_w$ -Gesetz gehorcht. Ein (praktisch) stationäres Verhalten, das – wie in den obigen Daten – durch ein Potenzgesetz beschrieben werden kann, ist deswegen mit dem Modell nicht vereinbar. Es ist also keine Überraschung, daß ein Fit der Meßergebnisse mit Gl. 3.7–3.9 völlig fehlschlägt (siehe Einschub in Abb. 4.2 unten, aus Gründen der Übersichtlichkeit nur für ausgewählte Datensätze).

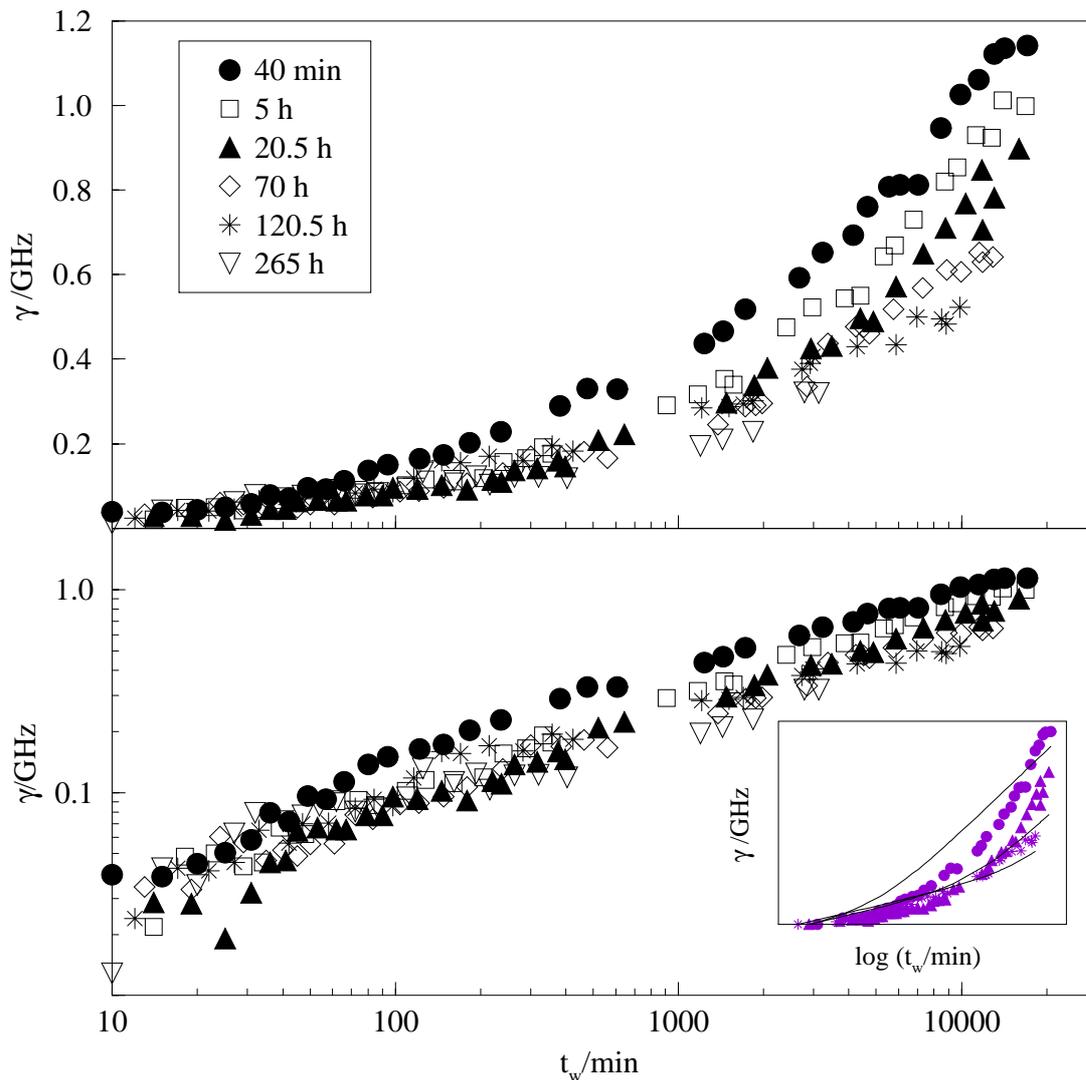


Abbildung 4.2: Oben: Lochverbreiterung in HRP bei 4.2 K für verschiedene Alterungszeiten. Unten: Eine doppelt-logarithmische Darstellung der Daten zeigt, daß die spektrale Diffusion einem Potenzgesetz in der Wartezeit folgt; eine Beschreibung der Daten mit dem TLS-Modell schlägt daher völlig fehl (Einschub).

Wie schon im vorigen Kapitel erläutert wurde, ist es natürlich immer möglich, die Vorhersagen des Tunnelmodell geeignet zu modifizieren, indem andere Verteilungsfunktionen für die TLS-Parameter Δ und λ postuliert werden, als sie im Standard-Modell üblich sind. Dies ist zur Erklärung der spektralen Diffusion in Proteinen aber noch unbefriedigender als bei den oben erwähnten Experimenten in Gläsern: Eine geänderte Verteilung der TLS-Parameter, die durch den Chromophor selbst induziert wird, ist z.B. in Hämproteinen kaum zu begründen – der Chromophor ist hier ja ein natürlicher Bestandteil des Proteins und nicht etwa eine künstlich eingeführte ›Verunreinigung‹. Auch eine TLS-TLS-Kopplung ist sicher ohne Bedeutung: Zum einen wurden die Messungen an den Proteinen

bei zu hohen Temperaturen durchgeführt, als daß eine kohärente Wechselwirkung zwischen den Tunnelsystemen wahrscheinlich wäre, zum anderen ist aus verschiedenen Experimenten (die sich im Gegensatz zu den obigen Diffusionsmessungen im Rahmen des Tunnelmodells interpretieren lassen) bekannt, daß die Zahl der Tunnelsysteme pro Protein sehr klein ist und etwa in der Größenordnung von eins liegt (Kurita et al., 1995; Singh et al., 1984). Eine TLS-TLS-Wechselwirkung ist deshalb bei hinreichend niedriger Konzentration der Proteine in der Probe ausgeschlossen – sie müßte zwischen unterschiedlichen Proteinen stattfinden.

Die gerade vorgestellten Meßergebnissen an HRP – wie auch die Experimente an allen anderen Protein/Lösungsmittel-Systemen, die in dieser Arbeit untersucht wurden – legen daher den Schluß nahe, daß *das TLS-Modell nicht geeignet ist, um die spektrale Diffusion in Proteinen zu beschreiben.*

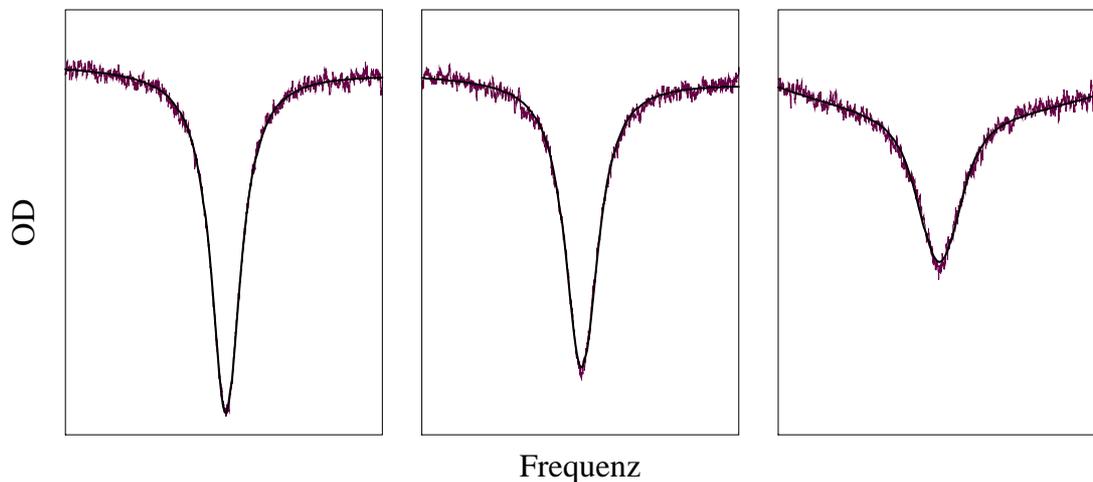


Abbildung 4.3: Ein spektrales Loch in HRP unmittelbar nach dem Brennen sowie nach einer Wartezeit von 240 und 17093 min. Gezeigt sind außerdem Fits mit einer Lorentzfunktion (Anfangsloch) sowie mit Voigtfunktionen (verbreiterte Löcher).

In Kap.4.2 wird deshalb ein anderer theoretischer Ansatz vorgestellt, der den experimentellen Beobachtungen eher angemessen ist. In diesem sog. *Diffusionsmodell* wird die Lochverbreiterung als Folge von *Diffusionsbewegungen im Konformationsraum der Proteine* interpretiert. Der Diffusionskern, dessen Breite ja die Meßgröße der Experimente ist, wird deshalb nicht mehr als lorentz- sondern als gaußförmig angenommen; die unmittelbar nach dem Brennen lorentzförmigen Löcher müssen also zu späteren Zeiten durch Voigtprofile beschrieben werden (siehe Gl.2.5). Die Genauigkeit der experimentellen Daten läßt es leider nicht zu, zwischen einer Lorentz- oder Voigtform der spektralen Löcher zu unterscheiden – beide Funktionen liefern ausgezeichnete Fits. Abb.4.3 zeigt das Beispiel eines spektrales Loches (wiederum in HRP) direkt nach dem Brennen, nach einer Wartezeit von ca. vier Stunden, sowie nach etwa zwölf Tagen. Das Anfangsloch

wurde dabei mit einem Lorentzprofil, die Löcher zu späteren Zeiten mit Voigtkurven gefittet; offensichtlich beschreiben letztere die Lochformen ausgezeichnet. Im Folgenden sollen nun die wesentlichen Resultate der Protein-Experimente aus der Sicht des Diffusionsmodells zusammengefaßt werden, als Beispiel dienen dabei wieder die gerade schon erläuterten Messungen an HRP in einem Wasser-Glycerin-Glas. Die Theorie des Modells wird dann in Kap. 4.2 anhand dieser experimentellen Daten erläutert.

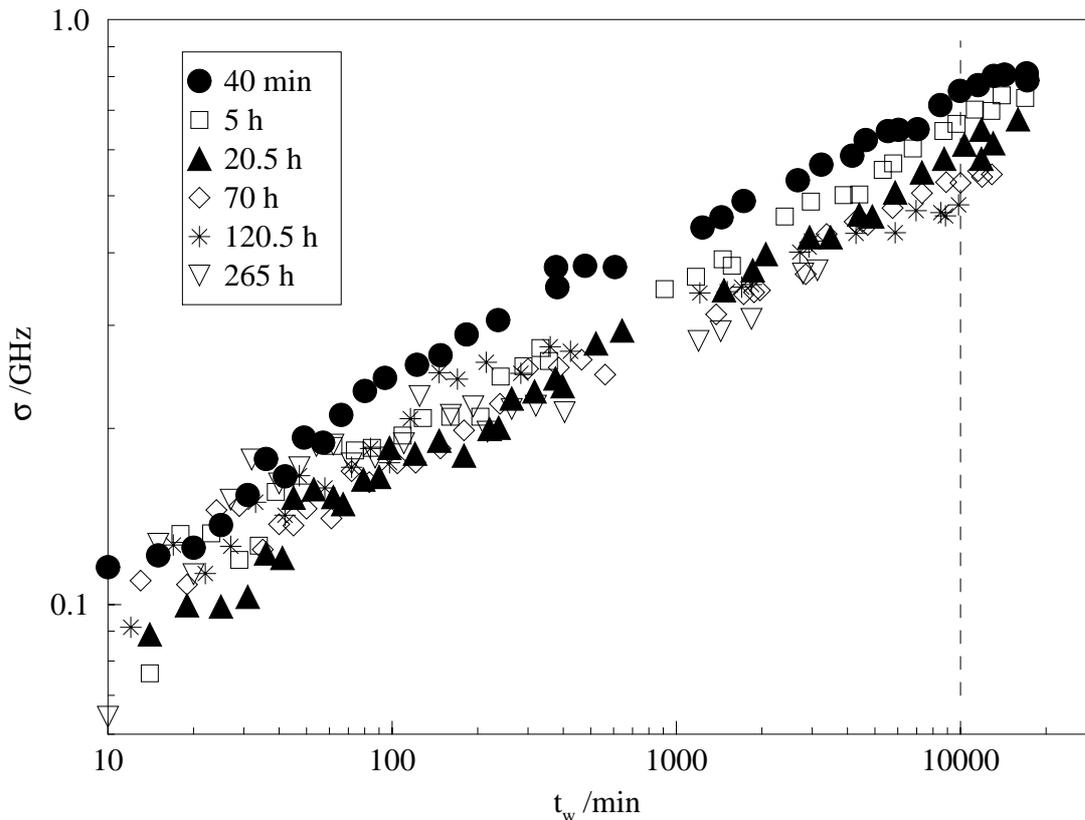


Abbildung 4.4: Die gleichen Messungen wie in Abb. 4.2, allerdings ausgewertet mit einem gaußförmigen Verbreiterungskern. Dessen Breite (FWHM) zur Zeit t_w ist durch $\sqrt{8 \ln 2} \sigma(t_w)$ gegeben. Der lineare Verlauf der Daten in einer doppelt-logarithmischen Darstellung dokumentiert ein Potenzgesetz in t_w . Ein Schnitt bei einer festen Wartezeit von 10000 min erlaubt die Bestimmung der Alterungsdynamik.

Abb.4.4 zeigt also noch einmal die gleichen Meßdaten, die schon in Abb.4.2 vorgestellt wurden, diesmal allerdings ausgewertet mit einem gaußförmigen Diffusionskern. Dessen Breite nach einer bestimmten Wartezeit t_w wird mit $\sigma(t_w)$ bezeichnet. Man erkennt, daß die oben aufgeführten Beobachtungen auch in dieser neuen Auswertung der Meßdaten ihre Gültigkeit behalten:

▷ σ hängt von der Wartezeit wiederum nach einem Potenzgesetz ab, nimmt

also einen linearen Verlauf in einer doppelt-logarithmischen Darstellung. Diese Feststellung ist somit unabhängig von der Form des Diffusionskerns, der der Auswertung zugrunde gelegt wird; das gleiche Ergebnis wurde ja bereits in Abb. 4.2, also bei einer Auswertung mit einem Lorentzkern, gefunden. Die Steigung in der doppelt-logarithmischen-Darstellung (also der Exponent des Potenzgesetzes) variiert aber durchaus mit dem verwendeten Modell. Im Rahmen des Diffusionsmodells wurde für *alle Proteine, die in dieser Arbeit vermessen wurden*, die Steigung $\alpha/2 = 0.25 \pm 0.02$ gefunden; es gilt also: $\sigma \propto t_w^{\alpha/2}$.

- ▷ Auch die Alterungsdynamik zeigt ein Verhalten, das analog zu den oben gefundenen Ergebnissen ist: Lediglich der Achsenabschnitt in einer doppelt-logarithmischen Darstellung hängt von der Alterungszeit ab; die Steigung der Graphen bleibt dagegen davon unberührt. Datensätze, die zu größeren Alterungszeiten gehören, sind wieder parallel nach unten versetzt.

Die genaue Abhängigkeit der spektralen Diffusion von der Alterungszeit läßt sich bestimmen, wenn man zu einer festen Wartezeit, etwa bei $t_w = 10000$ min einen ‘Schnitt’ durch Abb. 4.4 legt. Die wenigen Messpunkte, die eine solche Prozedur liefert, sind in Abb. 4.5 (wieder in doppelt-logarithmischer Form) aufgetragen. Man erkennt deutlich die Abnahme der spektralen Diffusion mit der Alterungszeit. Diese folgt – im Rahmen der experimentellen Genauigkeit – ebenfalls einem Potenzgesetz (gestrichelte Linie). Für dessen Exponenten β findet man einen Wert von (0.07 ± 0.01) , es gilt also: $\sigma(t_w = \text{const.}, t_a) \propto t_a^{-\beta}$.

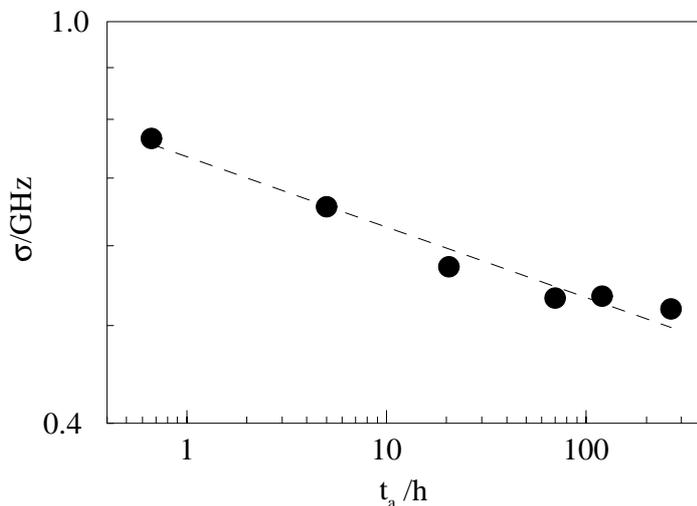


Abbildung 4.5: Abhängigkeit der spektralen Diffusion von der Alterungszeit. Man findet wieder ein Potenzgesetz: $\sigma \propto t_a^{-\beta}$ mit $\beta \approx 0.07$.

Es ist damit jetzt möglich, den Einfluß der Alterungsdynamik aus den Messdaten ›herauszuskalieren‹: Man teilt hierzu die Lochverbreiterung $\sigma(t_w)$ durch ihre zugehörige Abhängigkeit von der Alterungszeit $t_a^{-\beta}$. Alle Messpunkte fallen dann auf einen gemeinsamen Graphen (siehe Abb. 4.6), der im Folgenden als ›Masterplot‹ bezeichnet wird.

Was bedeutet nun diese Skalierung der experimentellen Daten? Wie schon mehrfach erwähnt, tragen zur spektralen Diffusion sowohl Relaxations- als auch Fluktuationsvorgänge bei. Relaxationen sind Nichtgleichgewichtsprozesse und klingen daher im Lauf der Zeit ab. Dennoch ist natürlich in einem (evtl. riesigen Zeitfenster) eine stationäre Relaxation möglich – beispielsweise in einem System, das sehr weit entfernt ist von seinem Gleichgewichtszustand. In einem Masterplot sind gleichsam die nichtstationären Anteile der Relaxationen herauskaliert worden; zur dort aufgetragenen spektralen Diffusion tragen nur noch (auf der Zeitskala des Experimentes) stationäre Relaxationen und natürlich Fluktuationsprozesse bei. Es gibt allerdings keine Möglichkeit, diese beiden Anteile im Experiment zu unterscheiden.

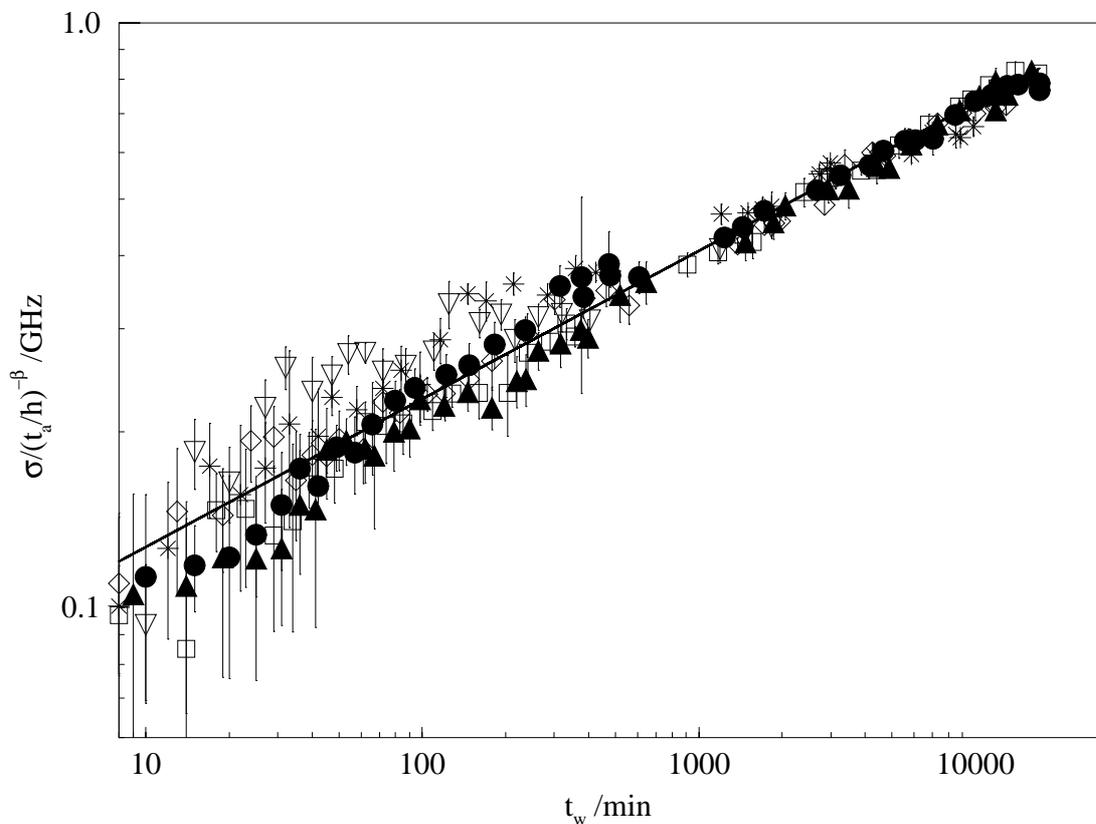


Abbildung 4.6: Skaliert man die Messdaten mit ihrer jeweiligen Abhängigkeit von der Alterungszeit, so fallen alle Punkte auf einen gemeinsamen Graphen (*Masterplot*), der sich ausgezeichnet durch ein Potenzgesetz (durchgezogene Linie) fitten läßt. Für den Exponenten $\alpha/2$ ergibt sich ein Wert von 0.25.

Abb.4.6 belegt darüber hinaus noch einmal die Tatsache, daß die spektrale Diffusion in Proteinen nicht durch das TLS-Modell beschrieben werden kann: die Abweichung des stationären Anteils der Lochverbreiterung von einem logarithmischen Verhalten wird in der Auftragung als Masterplot besonders deutlich.

4.2 Das Diffusionsmodell

Im diesem Kapitel soll nun das schon mehrfach erwähnte *Diffusionsmodell* vorgestellt werden, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, um die speziellen Eigenheiten der spektralen Diffusion in Proteinen zu erklären (Schlichter und Friedrich, 2001b; Schlichter et al., 2000a). Zentrales Anliegen ist dabei natürlich, eine physikalische Begründung für das Potenzgesetz zu finden, durch das die Verbreiterung spektraler Löcher (als Funktion der Wartezeit) charakterisiert wird. Potenzgesetze treten in physikalischen Systemen stets auf, wenn Diffusionsprozesse (in der engsten Bedeutung dieses Wortes) von Bedeutung sind; ein klassisches Beispiel dafür ist das Brownsche Teilchen, dessen Wahrscheinlichkeitsverteilung im Ortsraum bekanntermaßen mit einem $t^{1/2}$ -Gesetz verbreitert. Gelingt es somit, die spektrale Diffusion in Proteinen als echten Diffusionsprozeß zu formulieren, so lassen sich die gemessenen Potenzgesetze auf sehr natürliche Weise erklären. Eine solche Formulierung wird im folgenden Kapitel zunächst rein phänomenologisch eingeführt: Die Fluktuationen in der Absorptionsfrequenz eines Proteins (bzw. seines Chromophors) werden als echter, stochastischer Diffusionsprozeß behandelt; wie diese Fluktuationen mit den Strukturänderungen des Proteins verknüpft sind, wird dabei zunächst außer acht gelassen; dieses Problem wird dann im anschließenden Kapitel untersucht.

4.2.1 Anomale Diffusion im Frequenzraum

Ist es überhaupt sinnvoll, die Fluktuationen in der Absorptionsfrequenz eines Proteins als echte Diffusion aufzufassen? Aus Einzelmolekülexperimenten ist bekannt, daß die Frequenzänderungen eines solchen Moleküls *diskontinuierlich* geschehen, d.h. es treten *Frequenzsprünge* auf. In einem echten Diffusionsprozeß dagegen sollten alle Änderungen stetig verlaufen (Gardiner, 1985). Nun ist die Weite der Frequenzsprünge allerdings winzig, verglichen etwa mit der Breite der zugehörigen inhomogenen Absorptionsbande. Die Situation ist somit analog zu einem klassischen Random-Walk-Prozeß, bei dem die Schrittweite (fast) infinitesimal klein ist. Es ist bekannt, daß ein solcher (eigentlich diskontinuierlicher) Prozeß ausgezeichnet durch eine klassische Diffusionsgleichung angenähert werden kann. In gleicher Weise können auch die Frequenzfluktuationen eines Proteins in guter Näherung als Diffusionsprozeß behandelt werden.

Die Absorptionsfrequenz $\nu(t)$ eines Proteins wird also als rein stochastische Größe aufgefaßt, die zufälligen, aber stetig verlaufenden Schwankungen unterworfen ist. Aussagen darüber sind nur im Sinne von Wahrscheinlichkeiten möglich. Die *einzeitige Wahrscheinlichkeit* $P(\nu, t)$ kann direkt in einem Absorptionsexperiment gemessen werden: Sie beschreibt, wie wahrscheinlich es ist, daß ein Protein zur Zeit t bei der Frequenz ν absorbiert, oder – anders gesagt – welcher Bruchteil eines Ensembles von Proteinen zur Zeit t gerade die Absorptionsfrequenz ν hat. $P(\nu, t)$ gibt also (bei geeigneter Normierung) gerade das Profil der inhomogenen Bande wieder.

In Kap. 2.1.3 wurde bereits erläutert, daß auch die *bedingte Wahrscheinlichkeit* $P(\nu_1, t_1 | \nu_0, t_0)$ experimentell zugänglich ist – sie ist als spektraler Diffusionskern die eigentliche Meßgröße eines Lochbrenn-/Wartezeitexperimentes. Sowohl $P(\nu, t)$ als auch $P(\nu_1, t_1 | \nu_0, t_0)$ gehorchen einer *Fokker-Planck-Gleichung*; dies folgt mathematisch aus der Stetigkeit von $\nu(t)$ (Gardiner, 1985).

Eine wichtige Annahme über die stochastischen Eigenschaften von $\nu(t)$ führt nun zu einer wesentlichen Vereinfachung des Modells (Skinner et al., 1999): $\nu(t)$ wird als *Gaußscher stochastischer Prozeß* aufgefaßt (siehe Anhang A). Die interessierenden Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(\nu, t)$ und $P(\nu_1, t_1 | \nu_0, t_0)$ werden in diesem Fall durch Gaußprofile approximiert.

In (Kador, 1991b) findet sich eine gründliche Diskussion dieser Näherung. Es wird dort gezeigt, daß sie immer dann gerechtfertigt ist, wenn die Frequenz eines Chromophors durch viele (quasi unabhängige) Residuen in seiner Nachbarschaft zugleich moduliert wird, oder anders gesagt: wenn der mittlere Abstand zwischen zwei solchen Residuen klein ist im Vergleich zu den Abmessungen des ›Hohlraums‹, der den Chromophor beherbergt. Die gaußförmigen Wahrscheinlichkeitsprofile sind in diesem Fall eine Folge des zentralen Grenzwertsatzes. Bei Hämproteinen ist diese Näherung sicherlich vernünftig, koppelt dort doch ein relativ großes Farbstoffmolekül mit einem weitläufigen π -Elektronensystem an viele Aminosäure-Residuen des Proteins. (Es sollte angemerkt werden, daß dem lorentzförmigen Diffusionskern im TLS-Bild gerade eine entgegengesetzte Annahme zugrunde liegt: Hier wird von einer sehr geringen TLS-Dichte ausgegangen, der mittlere Abstand zwischen zwei Tunnelsystemen ist also viel größer als die Abmessungen des Chromophor-Hohlraums.)

Als weitere Näherung soll schließlich noch die in den Experimenten beobachtete Alterungsdynamik einstweilen vernachlässigt werden; es handelt sich bei ihr ohnehin nur um einen ›kleinen Effekt‹. Ziel ist es zunächst, einen Formalismus zu entwickeln, der ein Potenzgesetz in der Wartezeit für die spektrale Diffusion erklärt. Alterungsphänomene werden dann in Kap. 4.2.4 in den Formalismus integriert. Mathematisch gesprochen wird also die spektrale Diffusion zunächst als *stationärer Prozeß* aufgefaßt, d.h. die Lochverbreiterung soll nur von der zwischen Lochbrennen und Messung vergangenen Wartezeit t_w abhängen, jedoch nicht vom dem genauen Zeitpunkt, zu der ein Loch gebrannt wurde.

Mit diesen Näherungen ist es jetzt möglich, relativ einfache Ausdrücke für die im Experiment zugänglichen Wahrscheinlichkeiten anzugeben (Details der Herleitungen finden sich im Anhang A). Für die einzeitige Wahrscheinlichkeit ergibt sich:

$$P(\nu, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_0^2}} \exp\left[-\frac{\nu^2}{2\sigma_0^2}\right], \quad (4.1)$$

also eine Gaußkurve mit der Breite $\sigma_0\sqrt{8\ln 2}$ (FWHM). Dies ist, wie oben erläutert, gerade die Breite der inhomogenen Absorptionsbande.¹

¹Bei der Herleitung von Gl. 4.1 und 4.2 wurde σ_0 als nicht zeitabhängig behandelt, da in den Experimenten dieser Arbeit niemals eine Änderung der inhomogenen Bande mit der Zeit be-

Der spektrale Diffusionskern hat nach den obigen Annahmen die Form

$$P(\nu_1, t_w | \nu_0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2(t_w)}} \exp \left[-\frac{(\nu_1 - \nu_0 C(t_w))^2}{2\sigma^2(t_w)} \right], \quad (4.2)$$

wobei abkürzend verwendet wurde

$$\sigma^2(t_w) = \sigma_0^2 [1 - C^2(t_w)], \quad C(t_w) = \frac{1}{\sigma_0^2} \langle \nu(t_w) \nu(0) \rangle. \quad (4.3)$$

Auch der spektrale Diffusionskern ist also gaußförmig. Wie bereits erläutert folgt daraus, daß im Rahmen des Diffusionsmodells spektrale Löcher durch Voigtprofile – also als Faltung eines lorentzförmigen Loches mit einem gaußförmigen Verbreiterungskern – beschrieben werden. Die Breite $\sigma(t_w)$ des Diffusionskerns ist die eigentliche Meßgröße der Lochbrennexperimente; sie war auch in den Abbildungen in Kap. 4.1 dargestellt.

Nach Gl. 4.3 kommt die Zeitabhängigkeit der Lochverbreiterung $\sigma(t_w)$ über die *Frequenz-Korrelationsfunktion* $C(t_w)$ zustande. Diese beschreibt die ›mittlere Erinnerung‹, die ein Chromophor zur Zeit t_w an seine Absorptionsfrequenz zum Zeitpunkt des Lochbrennens hat. Für kurze Wartezeiten t_w führen die Fluktuationen in ν nur zu kleinen Änderungen (somit $C \approx 1$), nach genügend langer Zeit hingegen kann die Absorptionsfrequenz eines Chromophors zu jeder beliebigen Stelle in der inhomogenen Bande gedriftet sein. In diesem Fall wird die Korrelationsfunktion gleich Null. Sind die für die spektrale Diffusion verantwortlichen Prozesse *nichtstationär*, so hängt die Korrelationsfunktion nicht nur von der Zeitdifferenz zwischen zwei Messungen der Chromophorfrequenz ab, sondern auch vom absoluten Zeitpunkt, an dem ein spektrales Loch gebrannt wird.

Neben einer Lochverbreiterung sagt Gl. 4.2 auch eine *Drift* der spektralen Löcher voraus: Das Maximum des Diffusionskerns zur Zeit t_w liegt bei der Frequenz $\nu_0 C(t_w)$. Ein spektrales Loch, das bei der Frequenz ν_0 gebrannt wird, wandert also im Lauf der Zeit (d.h. für $C \rightarrow 0$) auf das Maximum der inhomogenen Bande zu. Allerdings konnte eine solche Drift im Experiment niemals beobachtet werden. Der Grund dafür sind die riesigen Zeitkonstanten τ , die die Frequenzfluktuationen in Proteinen bei Temperaturen im Kelvinbereich bestimmen. Mit einer geeigneten Korrelationsfunktion (s.u.) und den obigen Gleichungen kann man zeigen, daß in der Zeitabhängigkeit der *Lochdrift* (t_w/τ) immer in höherer Ordnung auftritt als in der *Lochverbreiterung*. Letztere kann (bei $T = 4.2$ K) in Experimenten von einigen Wochen Dauer noch beobachtet werden; die Lochdrift dagegen ist – wenn überhaupt – nur in Messungen bei höheren Temperaturen nachweisbar.

Die entscheidende Größe in den obigen Gleichungen, die sowohl Lochverbreiterung als auch Lochdrift bestimmt, ist die Frequenz-Korrelationsfunktion $C(t_w)$. Aussagen über deren genaue Form liefert die stochastische Theorie allerdings nicht.

obachtet werden konnte. Weiterhin wurde das Maximum der inhomogenen Bande als Ursprung der Frequenzskala gewählt.

Hierfür sind zusätzliche Annahmen über die physikalischen Eigenheiten des untersuchten Systems nötig. Es ist nun naheliegend, $C(t_w)$ so zu wählen, daß sich aus Gl. 4.3 ein Potenzgesetz für die Lochverbreiterung $\sigma(t_w)$ ergibt; man befindet sich dann in Übereinstimmung mit den experimentellen Beobachtungen. Es muß aber natürlich untersucht werden, ob eine solche Wahl auch physikalisch zu begründen ist (siehe Kap. 4.2.3). Zunächst wird für $C(t_w)$ aber rein empirisch die Form einer *gestreckten Exponentialfunktion* angenommen:

$$C(t) = \exp(-t_w/\tau)^\alpha \quad (4.4)$$

Ist die *Korrelationszeit* τ lang im Vergleich zu den experimentellen Zeitskalen, so kann die Exponentialfunktion in Gl. 4.4 bis zur ersten Ordnung entwickelt werden; es ergibt sich dann aus Gl. 4.3 in guter Näherung:

$$\sigma(t_w) = \sqrt{2}\sigma_0 \left(\frac{t_w}{\tau}\right)^{\alpha/2} \quad (4.5)$$

Das ist gerade das gesuchte Potenzgesetz, das nötig ist, um die experimentellen Daten zu erklären. Die spektrale Diffusion kann also wirklich als echter Diffusionsprozeß (im Frequenzraum) beschrieben werden; charakterisiert wird sie durch die Korrelationsfunktion in Gl. 4.4. Da die Zeitabhängigkeit dieser Diffusion nicht einem $t_w^{1/2}$ -Gesetz folgt, sondern einem allgemeineren Potenzgesetz, spricht man dabei von *anomaler Diffusion*.

Es sollte jetzt schon darauf hingewiesen werden, daß Korrelationsfunktionen wie in Gl. 4.4 nur in einem bestimmten *Zeitfenster* Gültigkeit haben (siehe Kap. 4.2.3); die im Experiment wichtigen Zeiten zwischen einigen Minuten (erste Messung eines spektralen Loches) und einigen Wochen (längste Wartezeit) scheinen aber vollständig im Inneren dieses Fensters zu liegen, der obige Ansatz ist also angemessen. Der Fall $t_w \rightarrow 0$ wird durch den gerade entwickelten Formalismus allerdings nicht abgedeckt. Für die Interpretation der Meßergebnisse ist er aber ohne Bedeutung.

Über Gl. 4.5 läßt sich nun auch ein *Diffusionskoeffizient* D_ν für die Vorgänge im Frequenzraum einführen. Definiert man diesen über

$$\sigma^2(t_w) \equiv 2D_\nu t_w \quad , \quad (4.6)$$

so ergibt sich der Ausdruck:

$$D_\nu(t_w) = \frac{\sigma_0^2}{\tau} \left(\frac{t_w}{\tau}\right)^{\alpha-1} \quad (4.7)$$

Der Diffusionskoeffizient muß also *zeitabhängig* sein, um die im Experiment beobachtete anomale Diffusion beschreiben zu können. (Es sollte erwähnt werden, daß verschiedene Definitionen eines Diffusionskoeffizienten möglich sind, z.B. auf ›makroskopische Weise‹ wie in Gl. 4.6 oder durch einen ›mikroskopischen Ansatz‹, etwa über die Stärke von fluktuierenden Zufallskräften in einer Langevin-Gleichung.

Die verschiedenen Definitionen können durchaus unterschiedliche Ergebnisse liefern, wenn man eine gebundene Diffusion in einem Potential betrachtet. Im Limes kurzer Zeiten, in dem alle Experimente dieser Arbeit immer liegen, sind die unterschiedlichen Definitionen des Diffusionskoeffizienten aber äquivalent.)

Die obige Definition von $C(t_w)$ – der zentralen Größe des Modells – war bisher rein phänomenologisch. In Kap. 4.2.3 wird aber gezeigt, daß diese Definition den komplizierten Verhältnissen in einem Protein durchaus angemessen ist. Zuvor ist es allerdings noch nötig, einen Zusammenhang herzustellen zwischen der Diffusion im Frequenzraum eines Proteins und seiner strukturellen Dynamik. Das soll im folgenden Abschnitt geschehen.

4.2.2 Anomale Diffusion im Konformationsraum

Wie oben erwähnt, ist es die Korrelationsfunktion $C(t)$, die die eigentliche Physik des untersuchten Systems beinhaltet: Sie beschreibt, nach welchem Gesetz und auf welchen Zeitskalen die Absorptionsfrequenz eines Chromoproteins fluktuiert. Die Fluktuationen sind aber eine Folge der Strukturänderungen des Proteins. Kann man daher diese Strukturänderungen als Funktion der Zeit beschreiben und kennt die Wechselwirkungen zwischen Protein und Chromophor, so ist es möglich, die Frequenz-Korrelationsfunktion durch molekulare Größen auszudrücken. Ein solcher Ansatz wird in (Saven und Skinner, 1993; Stephens et al., 1997) unter sehr allgemeinen Annahmen verfolgt. Im Rahmen in dieser Arbeit genügt allerdings ein etwas einfacheres Modell (Schlichter und Friedrich, 2001b), das im Folgenden erläutert werden soll.

Ein Chromophor hat in einem Protein eine andere Absorptionsfrequenz als im Vakuum, man spricht dabei von einer Lösungsmittelverschiebung. Der Grund dafür ist die Wechselwirkung des Chromophors mit den verschiedenen Aminosäure-Residuen des Proteins. Bezeichnet man den Abstand zwischen dem i -ten Residuum und dem Chromophor mit R_i und nimmt an, daß die Wechselwirkung zwischen beiden gemäß R_i^{-n} vom Abstand abhängt, so findet man für die gesamte Lösungsmittelverschiebung

$$\nu = \sum_i cR_i^{-n}, \quad (4.8)$$

also einfach die Summe über die Beiträge der einzelnen Residuen. c ist hierbei eine Kopplungskonstante, die die Änderung der Energiedifferenz zwischen Grund- und Anregungszustand des Chromophors aufgrund der Wechselwirkung mit einem Residuum beschreibt.²

Die Konformationsdynamik im Protein führt nun dazu, daß es im Lauf der Zeit zu kleinen Änderungen x_i in den Abständen zwischen Chromophor und den einzelnen

²Bei genauerer Betrachtung sind natürlich die Kopplungskonstanten für verschiedene Residuen unterschiedlich, ebenso können verschiedene Potenzen n in der Entfernungsabhängigkeit auftreten. Dieser allgemeinere Fall läßt sich aber völlig analog zu den hier vorgestellten Rechnungen behandeln und führt im Wesentlichen zu den gleichen Ergebnissen.

Residuen kommt. Daraus wiederum resultiert eine Änderung der Lösungsmittelverschiebung:

$$R_i \longrightarrow R_i + x_i \quad \Longrightarrow \quad \nu \longrightarrow \nu + \delta\nu \quad (4.9)$$

Mit Gl. 4.8 läßt sich $\delta\nu$ berechnen. Sinnvollerweise berücksichtigt man dabei, daß $x_i \ll R_i$. In erster Ordnung in x_i/R_i findet man dann:

$$\delta\nu = -nc \sum_i x_i R_i^{-(n+1)} \quad (4.10)$$

In einem Lochbrennexperiment wird nun stets ein Ensemble von Proteinen betrachtet. In jedem davon treten andere Strukturänderungen auf, es kommt zu unterschiedlichen Frequenzänderungen $\delta\nu$ und dadurch zur Verbreiterung eines spektralen Loches. Diese Verbreiterung – also $\sigma(t_w)$ aus dem vorigen Kapitel – erhält man aus dem quadratischen Mittel von $\delta\nu$:

$$\sigma^2(t_w) = \langle \delta\nu^2(t_w) \rangle = n^2 c^2 \sum_i \langle x_i^2(t_w) \rangle R_i^{-2(n+1)} \quad (4.11)$$

(Die Mittelung wird hierbei über ein Ensemble gleichartiger Proteine durchgeführt.) Ersetzt man schließlich $\langle x_i^2(t_w) \rangle$ durch eine mittlere quadratische Auslenkung $\overline{\langle x^2(t_w) \rangle}$ der Residuen, so erhält man:

$$\sigma^2(t_w) = \overline{\langle x^2(t_w) \rangle} \left[n^2 c^2 \sum_i R_i^{-2(n+1)} \right] \equiv \overline{\langle x^2(t_w) \rangle} f_D^2 \quad (4.12)$$

(Der Strich kennzeichnet nun einen Mittelwert über die verschiedenen Residuen eines Proteins.) Aus Gl. 4.12 lassen sich jetzt einige wichtige Schlüsse ziehen:

- ▷ Die in einem Wartezeitexperiment gemessene Lochverbreiterung $\sigma(t_w)$ ist proportional zur Wurzel des mittleren Verschiebungsquadrats $\overline{\langle x^2(t_w) \rangle}$ der Residuen, die Proportionalitätskonstante wird im Folgenden mit f_D bezeichnet. Ein solches Experiment erlaubt deswegen die direkte Beobachtung nicht nur der Frequenz- sondern auch der *Strukturfluktuationen* der Proteine.
- ▷ Aus dieser Proportionalität folgt unmittelbar, daß auch die Konformationsdynamik der Proteine von *anomaler Diffusion* beherrscht wird; diese folgt dem gleichen Potenzgesetz wie die spektrale Diffusion:

$$\overline{\langle x^2(t_w) \rangle} \propto t_w^\alpha \quad (4.13)$$

Auch dieses Potenzgesetz für die *Diffusion im Konformationsraum* des Proteins wird wieder als Kurzzeitentwicklung einer gestreckten Exponentialfunktion aufgefaßt.

- ▷ Die Abstände R_i zwischen dem Chromophor und den Aminosäure-Residuen gehen in Gl. 4.12 mit hohen negativen Exponenten ein.³ Damit ist klar, daß

³Eine typische Größenordnung für n ist 6, etwa im Fall von höheren elektrostatischen oder dispersiven Wechselwirkungen.

nur Residuen in der unmittelbaren Nachbarschaft des Chromophors merklich zur spektralen Diffusion beitragen können. Ein Lochbrennexperiment ist deshalb nur sensitiv für einen *Unterraum* des gesamten Protein-Konformationsraumes, oder anders gesagt: die spektrale Diffusion wird nur von wenigen essentiellen Proteinkoordinaten beeinflusst. Weiterhin ist damit auch sichergestellt, daß ein solches Experiment wirklich das Protein vermißt und nicht dessen Umgebung.

Auch für die Diffusion im Konformationsraum kann abschließend ein Diffusionskoeffizient $D_x(t_w)$ definiert werden:

$$\overline{\langle x^2(t_w) \rangle} \equiv 2D_x(t_w)t_w \quad (4.14)$$

Mit Gl. 4.6 und 4.12 kann man dann leicht zeigen, daß auch die Diffusionskoeffizienten in Konformations- bzw. Frequenzraum über die Proportionalitätskonstante f_D miteinander verknüpft sind:

$$D_x(t_w) = \frac{D_\nu(t_w)}{f_D^2} \quad (4.15)$$

Daraus folgt insbesondere, daß $D_x(t_w)$ die gleiche Zeitabhängigkeit aufweist wie $D_\nu(t_w)$; es gilt also:

$$D_x(t_w) \propto t_w^{\alpha-1} \quad (4.16)$$

Es ist damit gelungen, aus den (optischen) Messungen der spektralen Diffusion einen Diffusionskoeffizienten zu bestimmen, der die Struktur- und Dynamik der Proteine beschreibt. Eine solche Größe ist bei anderen experimentellen Vorgehensweisen nur auf sehr indirektem Wege zu erhalten (Ansari, 2000). Im folgenden Abschnitt wird außerdem gezeigt, daß sich aus theoretischen Modellen eine Zeitabhängigkeit für $D_x(t_w)$ herleiten läßt, die genau der in Gl. 4.16 gefundenen entspricht.

4.2.3 Hierarchische Systeme

Nach den Ergebnissen des vorigen Kapitels resultiert die spektrale Diffusion in Proteinen aus Diffusionsprozessen im Konformationsraum der Moleküle, deren zeitliche Korrelation durch eine gestreckte Exponentialfunktion beschrieben wird. Eine solche Korrelationsfunktion ist bisher aber rein phänomenologisch eingeführt worden. Es stellt sich die Frage, ob sie auch von einem mikroskopischen Standpunkt aus plausibel gemacht werden kann.

Jede mikroskopische Beschreibung eines Systems, das so komplex ist wie ein Protein, hat – aus mehreren Gründen – mit massiven Schwierigkeiten zu kämpfen. Zum einen sind in jedem realistischen System die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bewegungsfreiheitsgraden so kompliziert, daß es nicht möglich ist, den Hamiltonian des Systems zu diagonalisieren. Die Bewegung in einem Freiheitsgrad wird stets durch andere gehemmt. Weiterhin sind solche Systeme gewöhnlich nichtergodisch, es hat also keinen Sinn, eine Beschreibung mit Hilfe von

Gleichgewichtsverteilungen zu versuchen. Schließlich können die Zeitkonstanten, auf denen Relaxationen verschiedener Freiheitsgrade stattfinden, über einen riesigen Bereich verteilt sein. Eine vernünftige Beschreibung komplexer Systeme sollte aus diesem Grund drei Forderungen erfüllen (Palmer et al., 1984):

- ▷ Die Relaxation eines Freiheitsgrades unterliegt *Hemmungen* durch die anderen Freiheitsgrade.
- ▷ Die Beschreibung beruht auf *Dynamik*, nicht auf Statistik.
- ▷ Es gibt eine *Hierarchie* verschiedener Zeitskalen für die Bewegungen in unterschiedlichen Freiheitsgraden.

Ein Modell, das all diese Forderungen berücksichtigt, ist das sog. *Traffic-Light-Modell* von Berlin und Burin (Berlin und Burin, 1997). Es erweist sich als überaus geeignet zur Beschreibung der Experimente dieser Arbeit und soll deshalb im Folgenden kurz skizziert werden.

Das Modell unterteilt die verschiedenen Freiheitsgrade, in denen die Strukturänderungen eines Proteins stattfinden, in drei Hierarchieebenen (siehe Abb. 4.7). Die erste Ebene beinhaltet dabei die ›schnellen‹ Freiheitsgrade, die auf der typischen Zeitskala eines Experiments bereits equilibriert sind. Für die Erklärung zeitabhängiger Effekte in den Messungen sind diese Freiheitsgrade uninteressant. Die zweite Ebene enthält eine *Konfigurationskoordinate* x , die die essentielle Koordinate für das Experiment ist. Nach den Ausführungen in Kap. 4.2.2 ist es naheliegend, x mit den kleinen Verschiebungen x_i der Residuen in der Chromophornachbarschaft zu identifizieren, die ausschlaggebend für die spektrale Diffusion sind.⁴ Die Bewegung des Proteins in dieser Koordinate wird – genau wie im Ansatz der vorigen Kapitel – als Diffusionsprozeß aufgefaßt. x gehorcht deshalb einer Fokker-Planck-Gleichung mit einem Diffusionskoeffizienten D_x .

Die dritte Ebene des Modells beinhaltet die restlichen, noch nicht berücksichtigten Freiheitsgrade y_i des Proteins, in denen dynamische Prozesse auf breit verteilten Zeitskalen stattfinden. Diese Prozesse werden durch Sprünge zwischen den Minima einer Zufalls-Energielandschaft modelliert. Eine Verteilungsfunktion $g(E)$ beschreibt dabei, wie wahrscheinlich das Auftreten eines Energieminimums der Tiefe E in dieser Landschaft ist. Entscheidend ist jetzt, daß die Bewegungen in der dritten Hierarchieebene Hemmungen für die Diffusion in x zur Folge haben. Dies wird durch einen einfachen Mechanismus beschrieben: Die Diffusion in x kann nur stattfinden, *während* ein Sprung in irgendeiner Koordinate y_i von einem Minimum zum nächsten passiert, ansonsten ist sie unmöglich. Anschaulich gesprochen muß also immer ein Teil des Proteins sich bewegen und (kurzzeitig) ›Platz machen‹, damit ein Residuum in der Chromophornachbarschaft seine Diffusionsbewegung ausführen kann. Dies bedeutet natürlich nichts anderes, als daß

⁴*Berlin et. al.* versuchen in ihrem Modell in erster Linie eine Erklärung für die nichtexponentielle Rückbindungskinetik von CO an Myoglobin zu geben. Sie identifizieren x deshalb mit dem Abstand zwischen Hämebene und Hämeisen im Myoglobin, der diese Reaktion beeinflusst. Ihre Formulierung erlaubt aber unmittelbar eine Verallgemeinerung auf andere Fälle.

diese Diffusion in einer *zeitabhängigen Energielandschaft* stattfindet, die meistens durch sehr hohe Barrieren gekennzeichnet ist (und deshalb keinerlei Bewegungen zuläßt), von Zeit zu Zeit aber ihre Gestalt ändert und dann für eine gewisse Zeitspanne Diffusionsvorgänge erlaubt.

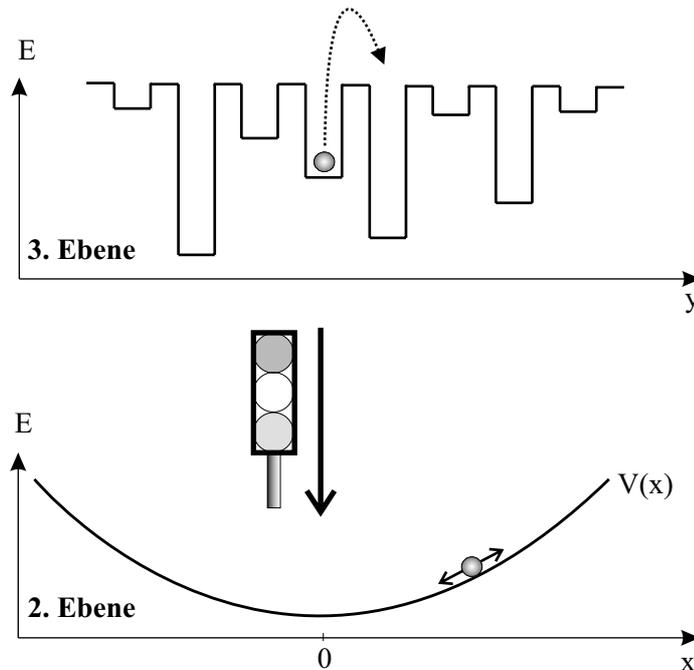


Abbildung 4.7: Das Traffic-Light-Modell nach Berlin und Burin. Fluktuationen in der für ein Experiment essentiellen Koordinate x werden als Diffusion beschrieben. Bewegungen in den anderen Proteinkoordinaten y führen zu Hemmungen dieser Diffusion, woraus ein zeitabhängiger Diffusionskoeffizient in x resultiert.

1. Ebene: Schnelle Freiheitsgrade

Bei genauer Analyse des Modells zeigt sich, daß die durch die Koordinaten y verursachten Hemmungen zu einem *zeitabhängigen Diffusionskoeffizienten* $D_x(t)$ für die Bewegung in x führen. Unabhängig von der genauen Form der Verteilungsfunktion $g(E)$ gibt es immer ein Zeitfenster, in dem $D_x(t)$ folgende Gestalt hat:

$$D_x(t) = \frac{D_0}{(1 + \Omega_0 t)^{1-\alpha}} \quad t_{min} < t < t_{max} \quad (4.17)$$

(D_0 , Ω_0 und α ergeben sich aus den Parametern des Modells, t_{max} kann je nach Wahl von $g(E)$ im Unendlichen liegen.) Für lange Zeiten (innerhalb des Zeitfensters), also für den Fall $\Omega_0 t \gg 1$ erhält man eine Zeitabhängigkeit dieses Diffusionskoeffizienten, der genau von der Form ist, wie sie im vorigen Kapitel für D_x abgeleitet wurde:

$$D_x(t) \propto t^{\alpha-1} \quad (4.18)$$

Mit diesem zeitabhängigen Diffusionskoeffizienten ist es jetzt möglich, die Fokker-Planck-Gleichung zu lösen, die die Diffusion in x beschreibt (Berlin, 1996), und die Korrelationsfunktion für den Diffusionsvorgang zu berechnen. Diese hat Gestalt:

$$C_x(t) = \exp(-t/\tau)^\alpha \quad (4.19)$$

In einem bestimmten Zeitfenster – das sich über viele Größenordnungen erstrecken kann – wird die Diffusion der für das Experiment essentiellen Koordinate x also durch eine gestreckte Exponentialfunktion beschrieben. Nach Kap.4.2.2 bestimmt diese Korrelationsfunktion dann aber auch die spektrale Diffusion.

Auch wenn das Modell von Berlin et al. sicher eine Vereinfachung der komplizierten Verhältnisse in einem Protein darstellt, erfüllt es doch alle wesentlichen Forderungen, die an eine Beschreibung der Dynamik in einem so komplexen System gestellt werden müssen. Es liefert daher eine gute Begründung, daß die zentrale Annahme des in den letzten Kapiteln eingeführten Formalismus – die Charakterisierung der Fluktuations-Korrelationen durch eine gestreckte Exponentialfunktion – durchaus physikalisch gerechtfertigt ist. Darüber hinaus liefert es eine Vorstellung, durch welche physikalischen Prozesse diese gestreckte Exponentialfunktion zustande kommt. Entscheidend ist dabei das Wechselspiel zwischen einer essentiellen Koordinate, die im Experiment direkt in Erscheinung tritt, und dem restlichen Protein. In einem Lochbrennexperiment kann die essentielle Koordinate mit den Positionen der Aminosäure-Residuen in der Chromophor-Nachbarschaft identifiziert werden; der zugehörige Teil des Konformationsraumes wird ab jetzt als ›Light Space‹ bezeichnet, der Rest des Konformationsraumes (also die Residuen, die die Chromophor-Frequenz nicht direkt beeinflussen) entsprechend als ›Dark Space‹ (Schlichter et al., 2001a). Die Bewegungen im Light Space werden durch die Vorgänge im restlichen Protein behindert, es sind Bewegungen im Dark Space nötig, damit in der Chromophor-Nachbarschaft eine Fluktuation stattfinden kann. Die Bewegungen im Dark Space werden aber im Lauf der Zeit immer langsamer; dies zeigt sich im Modell von Berlin et al. an der mit der Zeit zunehmenden Wahrscheinlichkeit, daß das System in einer tiefen Potentialmulde der (den Dark Space beschreibenden) Energielandschaft gefangen wird. Die Rückwirkungen auf den Light Space führen dann zu einer Verlangsamung der dort auftretenden Strukturfluktuationen und sind so letztlich verantwortlich für die gestreckten Exponentialfunktionen, durch die die Fluktuations-Korrelationen und somit auch die spektrale Diffusion charakterisiert werden.

4.2.4 Alterungs-Effekte

Es bleibt jetzt nur noch die Frage zu klären, wie die experimentell beobachteten Alterungseffekte in das Diffusionsmodell integriert werden können. Bisher wurden ja ausschließlich stationäre Prozesse behandelt, alle Alterungsphänomene wurden dabei vernachlässigt.

Ansatzpunkt für eine Modifikation des oben eingeführten Modells ist natürlich wieder die Korrelationsfunktion, die ja alle zeitabhängigen Vorgänge bestimmt. In Kap. 4.2.1 wurde bereits erwähnt, daß eine solche Korrelationsfunktion i.a. von *zwei* Zeiten abhängt, z.B. dem Zeitpunkt, zu dem ein spektrales Loch gebrannt wird, und der Zeit, zu der ein Scan erfolgt. (Eine sehr allgemeine mathematische Behandlung dieser Frage findet sich in Anhang A.) Im Falle eines stationären Prozesses hingegen ist es ohne Bedeutung, wann ein Loch gebrannt wird, entschei-

dend für die Lochverbreiterung ist in diesem Fall nur die Zeitdifferenz zwischen Brennen und Scannen des Loches.

Offensichtlich ist die spektrale Diffusion in Proteinen das Ergebnis eines nichtstationären stochastischen Prozesses – man beobachtet eine (wenn auch schwache) Abhängigkeit von der Alterungszeit. Ein Ausdruck für die Korrelationsfunktion, der nur die Zeitdifferenz zwischen zwei Messungen berücksichtigt, kann daher in Strenge nicht gültig sein. Aus diesem Grund wird im Folgenden zwischen den beiden Zeiten t_a und t_w unterschieden; die *Alterungszeit* t_a entspricht – wie schon erwähnt – der Zeitspanne zwischen Einkühlen einer Probe und dem Lochbrennen, die *Wartezeit* t_w der Zeitdifferenz zwischen Lochbrennen und Scan.

Die Korrelationsfunktion für den stationären Fall, wie sie in Kap. 4.2.1 eingeführt wurde, ist durch drei Parameter charakterisiert (siehe Gl. 4.4): σ_0 , α und τ . Eine naheliegende Verallgemeinerung auf nichtstationäre Prozesse ist es nun, für einen oder mehrere dieser Parameter eine Abhängigkeit von der Alterungszeit t_a zuzulassen. Dazu noch einmal ein Blick auf die experimentellen Ergebnisse: In einer doppelt logarithmischen Auftragung der Lochverbreiterung gegen die Wartezeit (siehe Abb. 4.4) bilden die Messreihen zu verschiedenen Alterungszeiten *parallele* Geraden. Das heißt aber, daß durch die Alterungsprozesse nur die Parameter σ_0 oder τ beeinflusst werden können, nicht jedoch der Parameter α , der die Steigung der Geraden bestimmt. Die experimentellen Befunde sprechen aber auch dagegen, eine Zeitabhängigkeit für σ_0 anzunehmen: σ_0 wurde in den vorigen Kapiteln mit der Breite der inhomogenen Absorptionsbande eines Proteinensembles identifiziert; für diese Breite konnte aber niemals eine Zeitabhängigkeit beobachtet werden. Daraus ergibt sich der Schluß, daß die beobachteten Alterungsphänomene allein aus einer *Zeitabhängigkeit der Korrelationszeit* τ resultieren: $\tau = \tau(t_a)$. Auch die Form dieser Zeitabhängigkeit läßt sich aus den Experimenten bestimmen. Trägt man die Lochverbreiterung als Funktion der Alterungszeit (bei einer festen Wartezeit t_{w_0}) auf, so gehorcht diese ebenfalls einem Potenzgesetz (siehe Abb. 4.5):

$$\sigma(t_{w_0}, t_a) \propto t_a^{-\beta} \quad (4.20)$$

Gemäß Gl. 4.5 ergibt sich ein solches Verhalten gerade, wenn auch die Korrelationszeit τ von der Alterungszeit nach einem Potenzgesetz abhängt:

$$\tau = \tau_0 \left(\frac{t_a}{T} \right)^{\frac{2\beta}{\alpha}} \quad (4.21)$$

Interpretiert man auch dieses Potenzgesetz wieder als Kurzzeitentwicklung einer gestreckten Exponentialfunktion, gilt also

$$\tau = \tau_0 \left(1 - e^{-\left(\frac{t_a}{T}\right)^{\frac{2\beta}{\alpha}}} \right), \quad (4.22)$$

so ist offensichtlich, wie die Parameter τ_0 und T zu interpretieren sind: T beschreibt die typische Zeitskala, auf der die Prozesse stattfinden, die zur Änderung der Frequenzkorrelationszeit τ führen; sind alle diese Prozesse abgeklungen (für

sehr lange Alterungszeiten), so strebt τ gegen den Wert τ_0 , also gegen eine *stationäre* Korrelationszeit. Man kann T deshalb mit der Korrelationszeit der *Relaxationen*, τ_0 dagegen mit der der (Gleichgewichts)-*Fluktuationen* identifizieren. Für experimentell zugängliche Alterungszeiten sind stets beide Prozesse von Bedeutung, aus diesem Grund ist die im Experiment beobachtete Korrelationszeit τ eine Funktion sowohl von τ_0 als auch von T .

Faßt man all diese Ergebnisse zusammen, so hängt die Lochverbreiterung (für experimentell interessante Zeiten, also in Kurzzeitznäherung) in folgender Weise von t_w und t_a ab:

$$\sigma(t_w, t_a) = \sqrt{2}\sigma_0 \left(\frac{t_w}{\tau}\right)^{\alpha/2} \left(\frac{t_a}{T}\right)^{-\beta} \quad (4.23)$$

Rein phänomenologisch ist es also durchaus möglich, auch Alterungsphänome in das Diffusionsbild zu integrieren; dennoch bleibt eine solche Behandlung unbefriedigend, solange es nicht gelingt, eine mikroskopische Vorstellung zu entwickeln, die eine Änderung der Korrelationszeit als Funktion der Zeit begründen kann. Dies soll im Rest dieses Kapitels versucht werden.

Als Erklärungsmodell für die experimentellen Beobachtungen diene bisher ein hierarchisches Schema, wie es in Kap. 4.2.3 erläutert wurde: Die Absorptionsfrequenz eines Chromoproteins fluktuiert aufgrund von Diffusionsprozessen, die Aminosäure-Residuen in der unmittelbaren Nachbarschaft des Chromophors, also im Light Space, durchführen. Deren Diffusion aber wird beeinflusst durch die Bewegungen des restlichen Proteins, dem sog. Dark Space. Der hemmende Einfluß des Dark Space ist letztlich die Ursache für die gestreckten Exponentialfunktionen, die im Experiment gemessen werden.

In diesem Modell ist allerdings nicht berücksichtigt worden, daß eine Wechselwirkung auch in der umgekehrten Richtung stattfinden kann. Relaxationsprozesse in der Chromophor-Umgebung haben sicherlich auch Auswirkungen auf die Bewegungen im Dark Space; im Modell von Berlin und Burin könnte man sich zum Beispiel vorstellen, daß sich dadurch die Verteilungsfunktion $g(E)$, durch die Energielandschaft des Dark Space beschrieben wird, im Laufe der Zeit ändert. Auch die Vorgänge im Dark Space erfolgen also in einer *zeitabhängigen Energielandschaft*, in der beispielsweise die Wahrscheinlichkeit tiefer Potentialminima im Laufe der Zeit zunimmt. Die Hemmungen, die der Dark Space der Chromophor-Umgebung auferlegt, nehmen daher ebenfalls zu, was natürlich zu einer Verlangsamung der Konformations-Diffusion im Light-Space (und damit der spektralen Diffusion) führt; letztlich beobachtet man deshalb Alterungseffekte im Experiment.

4.2.5 Größenordnungen und Zahlenwerte

Mit der Berücksichtigung der Alterungseffekte ist das Diffusionsmodell nun vollständig und beinhaltet eine Beschreibung aller Befunde, die die Experimente dieser Arbeit erbrachten. Es wurde aber bisher noch nicht über die absoluten Größen der Parameter gesprochen, die in den vorigen Kapiteln eingeführt wurden. Ein

wichtiger Test des Modells besteht natürlich darin, ob sich für diese Parameter physikalisch sinnvolle Werte ergeben, die auch im Einklang stehen mit den Ergebnissen anderer experimenteller Ansätze. Diese Frage soll im Folgenden untersucht werden.

Ein Lochbrennexperiment wählt (im Prinzip) aus einem Ensemble von Proteinen nur Moleküle aus, die zur Zeit des Lochbrennes identische Absorptionsfrequenzen haben. Die Proteine dieses Subensembles belegen nur einen Teil des Konformationsraumes, der den Molekülen bei der Temperatur des Experimentes zugänglich wäre. Im Lauf der Zeit beginnen sie allerdings, immer größere Bereiche des Konformationsraumes abzumustern, als Folge davon verbreitert das spektrale Loch. Nach unendlich langer Wartezeit schließlich haben sich die Moleküle des Subensembles über den gesamten Konformationsraum verteilt, das spektrale Loch erstreckt sich dann gemäß Gl. 4.3 über die gesamte inhomogene Bande, es gilt also:

$$t_w \longrightarrow \infty : \quad \sigma(t_w) \longrightarrow \sigma_0 \quad (4.24)$$

Da die Proteine nach unendlich langer Zeit aber den ganzen (zugänglichen) Konformationsraum belegen, muß die mittlere quadratische Abweichung, die sich dann für die Aminosäure-Residuen in den Proteinen ergibt, identisch sein mit der, die man in Röntgenbeugungsexperimenten mißt. (Ein Röntgenbeugungsexperiment wird ja an einem über den gesamten Konformationsraum verteilten Proteinensemble durchgeführt.) Es gilt also auch:

$$t_w \longrightarrow \infty : \quad \overline{\langle x^2(t_w) \rangle} \longrightarrow \langle x^2 \rangle_R \quad (4.25)$$

Nach Gl. 4.12 sind $\sigma^2(t_w)$ und $\langle x^2(t_w) \rangle$ aber proportional zueinander. Mit Gl. 4.24 und 4.25 ist es deshalb möglich, die Proportionalitätskonstante f_D zu bestimmen:

$$t_w \longrightarrow \infty : \quad f_D^2 = \frac{\sigma^2(t_w)}{\langle x^2(t_w) \rangle} \longrightarrow \frac{\sigma_0^2}{\langle x^2 \rangle_R} \quad (4.26)$$

Eine typische Größenordnung für $\langle x^2 \rangle_R$ bei Heliumtemperatur ist 0.05 \AA^2 (z.B. Parak et al., 1987), $\sigma_0 \sqrt{8 \ln 2}$ entspricht der Breite (FWHM) der inhomogenen Bande, in der das Lochbrennexperiment durchgeführt wird ($\approx 60 \text{ cm}^{-1}$ in obigem Experiment an Meerrettichperoxidase.) Für die Proportionalitätskonstante f_D ergibt sich dann: $f_D \approx 115 \text{ cm}^{-1}/\text{\AA}$; eine mittlere Verschiebung der Residuen in der Nachbarschaft des Chromophors um 1 \AA führt also zu einer Änderung in der Absorptionsfrequenz des Proteins um etwa 100 Wellenzahlen.

Dies ist ein durchaus vernünftiger Zahlenwert für f_D . Einen Vergleichswert dafür erhält man beispielsweise aus Experimenten, die die Auswirkungen von hydrostatischem Druck auf die Absorptionsfrequenz eines Chromoproteins untersuchen. Dies kann mit hoher Auflösung wiederum mit Hilfe des spektralen Lochbrennens geschehen (Zollfrank und Friedrich, 1991; Zollfrank et al., 1992). Man beobachtet in solchen Experimenten sowohl eine *Lochverbreiterung* als auch eine *Lochverschiebung* bei einer Änderung des Druckes. Aus letzterer läßt sich u.a. die

isotherme Kompressibilität κ des Proteins bestimmen (Kador, 1991a; Laird und Skinner, 1989). Diese ist definiert als:

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left(\frac{\delta V}{\delta p} \right) \approx -\frac{1}{V} \frac{\Delta V}{\Delta p} \quad (4.27)$$

Für Meerrettichperoxidase (bei Messungen in der sog. B1-Bande, in der auch die Wartezeitexperimente in dieser Arbeit durchgeführt wurden) hat κ einen Wert von 0.12 GPa^{-1} (Köhler, 1998).

Nach den Überlegungen aus Kap. 4.2.2 beeinflussen nur Aminosäure-Residuen in der Nachbarschaft des Chromophors direkt dessen Absorptionsfrequenz und somit die Ergebnisse eines Lochbrennexperimentes. Nimmt man an, daß sich diese in einem mittleren Abstand R vom Chromophor befinden⁵ und durch eine Erhöhung Δp des hydrostatischen Drucks um eine Strecke x näher an diesen ›herangepreßt‹ werden, so gilt:

$$|\kappa| = \left| \frac{1}{\frac{4\pi}{3}R^3} \cdot \frac{4\pi R^2 x}{\Delta p} \right| = \frac{3}{R} \cdot \left| \frac{x}{\Delta p} \right| \quad (4.28)$$

(Hierbei wurde der Einfachheit halber sphärische Geometrie für den ›Light Space‹ angenommen.)

Die Verbreiterung eines spektralen Loches aufgrund einer Änderung des hydrostatischen Drucks läßt sich gut durch einen Gaußförmigen Integralkern beschreiben; die Form des Loches nach der Druckänderung geht somit aus der Faltung des Anfangsloches mit diesem Kern hervor. Die Breite $\Delta\sigma$ des Kerns und die Änderung des hydrostatischen Drucks sind proportional zu einander (Laird und Skinner, 1989):

$$\Delta\sigma = c|\Delta p| \quad (4.29)$$

Für die Konstante c findet man im Experiment für Meerrettichperoxidase einen Wert von etwa $0.04 \text{ cm}^{-1}/\text{MPa}$ (Köhler et al., 1998). Aus Gl. 4.28 und 4.29 läßt sich nun - genau wie aus den Experimenten zur spektralen Diffusion (Gl. 4.12) - eine Proportionalität zwischen der mittleren Verschiebung x der Aminosäure-Residuen und der Verbreiterung $\Delta\sigma$ eines spektralen Loches herleiten:

$$\Delta\sigma = \underbrace{\left(\frac{3c}{R\kappa} \right)}_{f_P} \cdot |x| \quad (4.30)$$

Für die Proportionalitätskonstanten f_D (aus den Diffusionsexperimenten) und f_P (aus den Druckexperimenten) sollte man vergleichbare Werte erwarten - in beiden experimentellen Ansätzen liegt der Lochverbreiterung ein ähnlicher Mechanismus zugrunde. Nimmt man für den Radius R des Light Space einen Wert von etwa 9 \AA an, so gilt gerade $f_P = f_D$.

Diese Wahl für R ist durchaus vernünftig, typische Abstände zwischen Chromophor und Aminosäure-Residuen sind genau in dieser Größenordnung; der Radius

⁵R entspricht somit dem Radius des ›Light Space‹.

eines ganzen HRP-Moleküls beträgt beispielsweise etwa zwanzig Angstrom, die Hämgruppe selbst hat einen Durchmesser von etwa einem Nanometer (Frauenfelder, 1984). Der Wert für R ist also auch mit der Annahme konsistent, daß nur ein Teilraum des Proteins direkt Einfluß auf die Absorptionsfrequenz des Chromophors nimmt. Aus zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen lassen sich somit sehr ähnliche Werte für die Proportionalitätsfaktoren f ableiten; die zentrale Annahme des Diffusionsmodells, das als Ursache der spektralen Diffusion die räumliche Diffusion der Aminosäure-Residuen ansieht, findet dadurch natürlich starken Rückhalt.

Es sollte an dieser Stelle vielleicht erwähnt werden, daß eine Betrachtung der spektralen Diffusion im Lichte des TLS-Modells (sofern dieses durch entsprechende Verteilungsfunktionen der Tunnelparameter an die Gegebenheiten in Proteinen angepaßt würde) es kaum zuläßt, z.B. an die Ergebnisse von Röntgenbeugungsexperimenten anzuknüpfen. Der Grund hierfür ist die nach wie vor völlig ungeklärte Natur der Tunnelsysteme.

Mit Kenntnis der Proportionalitätskonstante f_D ist es nun auch möglich, die Längenskalen abzuschätzen, auf denen die Konformationsänderungen während eines Wartezeitexperimentes vor sich gehen. Eine typische Lochverbreiterung σ (nach einer Wartezeit von etwa zwei Wochen) betrug in dem oben geschilderten Experiment etwa 1 GHz (siehe Abb. 4.4). Die mittlere Verschiebung der Aminosäure-Residuen war deshalb etwa von der Größe $\langle x^2 \rangle^{1/2} = \sigma/f_D \approx 10^{-4} \text{ \AA}$. Die Möglichkeit, derart kleine Konformationsänderungen der Proteine nachzuweisen, zeigt noch einmal, welch hohe Auflösung durch spektrales Lochbrennen erzielt werden kann.

Eine weitere interessante Größe, die in den Diffusionsexperimenten auftritt, ist die Korrelationszeit τ . Eine Abschätzung dafür (unter Vernachlässigung aller Alterungsphänomene) erhält man leicht aus einer doppelt logarithmischen Auftragung der Lochverbreiterung als Funktion der Wartezeit. Der Achsenabschnitt in dieser Darstellung ist nach Gl. 4.5 gegeben durch den Logarithmus des Ausdrucks $\sqrt{2}\sigma_0(\tau/\text{min})^{-\alpha/2}$. Mit Hilfe der experimentellen Werte (z.B. Abb. 4.4) läßt sich damit abschätzen, daß τ in der Größenordnung von 10^{17} s ist. Die Zeit, die ein Protein bei Heliumtemperatur benötigt, um seinen gesamten Konformationsraum abzumustern, ist also von der gleichen Größenordnung wie das Alter des Universums!

Dieses Ergebnis mag auf den ersten Blick befremdlich anmuten, entspricht aber durchaus dem, was für Tieftemperaturproteine zu erwarten war. Es wurde bereits mehrfach erwähnt, daß es sich dabei um *nichtergodische* Systeme handelt; die Zeiten, in denen sie ein thermodynamisches Gleichgewicht erreichen, übersteigen um Größenordnungen jede experimentelle Zeitskala. Genau das ist aber durch obige Abschätzung gezeigt worden.

Es stellt sich dann natürlich die Frage, ob aus den Experimenten zur spektralen Diffusion überhaupt Ergebnisse allgemeinerer Natur zu erhalten sind – schließlich durchmustert ein Protein in der Zeitspanne eines Experimentes nur einen winzigen Teil des ihm zur Verfügung stehenden Konformationsraumes. Man muß allerdings

bedenken, daß die Zahl der Konformationssubzustände, die ein durch Lochbrennen ausgewähltes Proteinenensemble einnimmt (und im Lauf der Zeit abmustert), dennoch riesig ist; ein solches Ensemble kann deshalb durchaus als statistisch repräsentativ angesehen werden. Ein Indiz dafür ist z.B. das völlig identische Verhalten spektraler Löcher, die bei ganz unterschiedlichen Frequenzen gebrannt wurden und somit wohl auch unterschiedliche Bereiche des Konformationsraumes belegen (siehe Kap. 6.1). Es ist deshalb plausibel, daß die Diffusionsexperimente wirklich allgemeine Eigenschaften der Energielandschaft eines Proteins widerspiegeln, und daß die daraus abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten auch noch bei sehr viel höheren Temperaturen ihre Gültigkeit haben könnten. Allerdings müßten dafür die wichtigen Parameter wie die Korrelationszeit τ oder der Diffusionskoeffizient $D(t_w)$ geeignet mit ihrer Temperaturabhängigkeit skaliert werden (Zwanzig, 1988).

4.3 Messungen an weiteren Proteinsystemen

Die in den vorigen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse des Diffusionsmodells sind in ihrer Gültigkeit nicht beschränkt auf Messungen an Meerrettichperoxidase in einem Wasser-Glycerin-Glas. Völlig analoge Resultate wurden im Rahmen dieser Arbeit auch in Experimenten an dem gleichen Protein in verschiedenen Trehalose-Gläsern (Kap. 5), sowie an Myoglobin (Kap. 6.1) erzielt. Auch eine Deuterierung der Lösungsmittel (Kap. 6.1 und Kap. 6.2) führte für beide Proteine zu vergleichbaren Ergebnissen.

Darüber hinaus wurden auch ältere Meßdaten (Fritsch, 1997) zur spektralen Diffusion in Proteinen neu ausgewertet (Schlichter et al., 2000b, 1999); dazu war es vor allem nötig, die Datensätze mit Voigtprofilen neu zu fitten (die frühere Auswertung ging – der Theorie des Tunnel-Modells folgend – von lorentzförmigen spektralen Löchern aus). Wie auch schon in den Experimenten an der Meerrettichperoxidase war es nicht möglich, anhand der Lochformen zwischen TLS- und Diffusionsmodell zu unterscheiden; die Qualität der Voigtfits war (mindestens) ebenso gut wie die der Lorentzfits. Da auch diese älteren Messungen weitere Belege für die Gültigkeit des Diffusionsmodells liefern, sollen sie im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Es handelt sich dabei ebenfalls um kombinierte Alterungs- und Wartezeitexperimente, die an *Cytochrom c* und an *Myoglobin* durchgeführt wurden, allerdings – im Gegensatz zu den sonstigen Messungen in dieser Arbeit – nicht in einem einfachen Helium-Badkryostaten, sondern in einem ^3He - ^4He -Mischkryostaten. In einem solchen Kryostaten ist es nicht möglich, eine Probe in kurzer Zeit (\approx einige Minuten) auf die Endtemperatur herunterzukühlen.

Die Messungen bei 4.2 K wurden deshalb nach einem relativ langsamen Einkühlvorgang (Dauer: 1-2 Tage) durchgeführt. Dies ist der Grund dafür, daß in diesen Experimenten praktisch keine Alterungsdynamik auftritt; man beobachtet lediglich den (quasi)stationären Anteil der spektralen Diffusion.

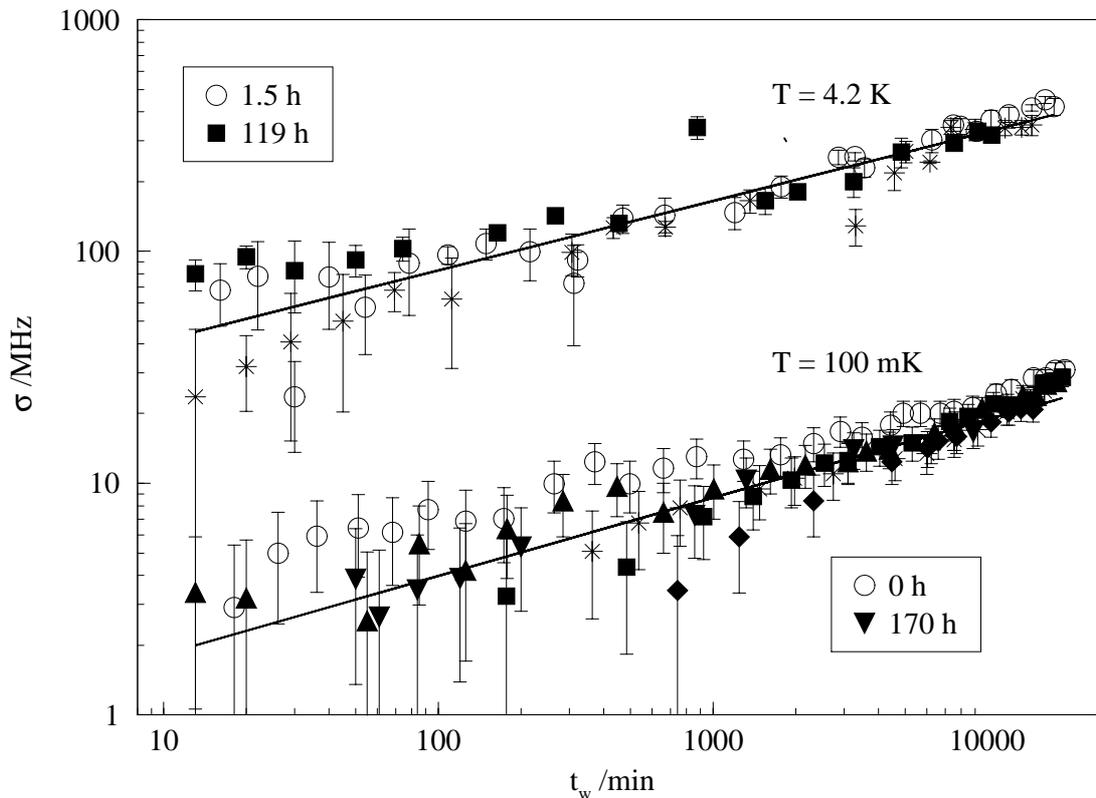


Abbildung 4.8: Spektrale Diffusion in *Cytochrom c* bei 4.2 K (oben) und 100 mK (unten). Auch in diesem Protein gehorcht die Lochverbreiterung einem Potenzgesetz in der Wartezeit. (Daten aus (Fritsch, 1997)).

In den Experimenten bei 100 mK wurden dagegen die Proben zunächst etwa 10 Tage auf der Endtemperatur gehalten und dann einem Temperaturzyklus zwischen 100 mK und 4.2 K unterzogen. Das Wiedererreichen der Endtemperatur 100 mK wird als Startpunkt des Experimentes aufgefaßt, die Alterungszeiten der verschiedenen spektralen Löcher sind von diesem Zeitpunkt aus gemessen. Im Gegensatz zu den Experimenten bei 4.2 K findet man bei diesen Daten durchaus eine Abhängigkeit von der Alterungszeit.

Abb. 4.8 zeigt nun die Ergebnisse in *Cytochrom c* bei den zwei Temperaturen. Man erkennt deutlich, daß die Lochverbreiterung (sowohl bei 4.2 K als auch bei 100 mK) wieder ausgezeichnet durch ein Potenzgesetz in der Wartezeit beschrieben werden kann (durchgezogene Linien). Der Exponent dieses Gesetzes hat bei beiden Temperaturen den gleichen Wert, man findet $\alpha/2 \approx 0.30$. Wie oben erwähnt zeigen die Daten für 4.2 K praktisch keine Alterungsdynamik, bei 100 mK hingegen ergibt sich eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Alterungszeit, wie sie auch schon bei der Meerrettichperoxidase beobachtet wurde: Die Alterungsdynamik verändert lediglich den Achsenabschnitt in einer doppelt-logarithmischen Darstellung, die Steigung (also der Exponent des Potenzgesetzes) bleibt dagegen

unberührt. Die Alterungsdynamik beeinflusst somit als einzigen Parameter des Diffusionsmodells die Korrelationszeit τ .

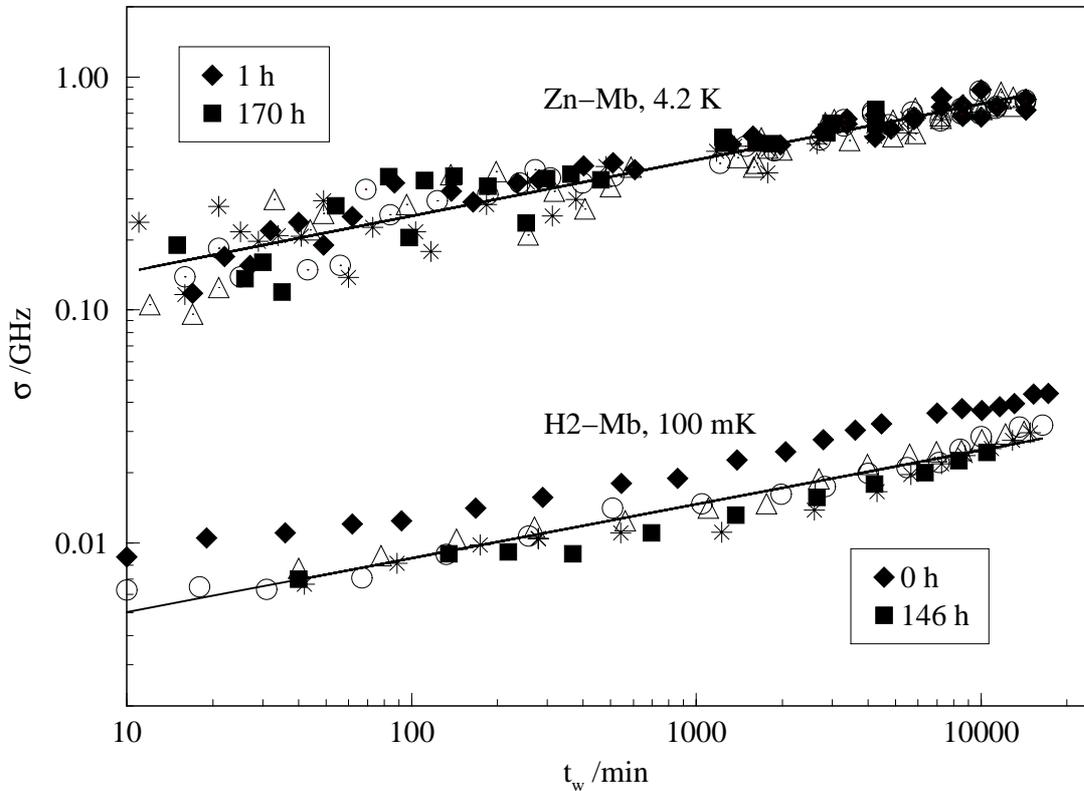


Abbildung 4.9: Spektrale Diffusion in Myoglobin bei 4.2 K (Chromophor: Zink-Phaeophorbid a) und bei 100 mK (Chromophor: Freie-Base-Protoporphyrin IX). Beide Datensätze folgen dem gleichen Potenzgesetz in der Wartezeit mit $\alpha/2 \approx 0.24$. (Daten bei 100 mK aus (Fritsch, 1997)).

Diese typische Abhängigkeit der Daten von der Alterungszeit ist noch schöner in den Messungen an *Myoglobin* bei 100 mK (siehe Abb. 4.9 unten) zu erkennen. Dieses Experiment ist an Proteinen durchgeführt worden, bei denen die natürliche Hämgruppe durch Freie-Base-Protoporphyrin IX ($\langle \text{H2-Mb} \rangle$) ersetzt worden war. In der vorliegenden Arbeit wurde im Gegensatz dazu Zink-Phaeophorbid a als Chromophor im Myoglobin ($\langle \text{Zn-Mb} \rangle$) verwendet. Man kann in Abb. 4.9 gut erkennen, daß die Ergebnisse aber nicht vom jeweiligen Chromophor abhängen: Die Messungen an Zn-Mb bei 4.2 K und die an H2-Mb bei 100 mK gehorchen offenkundig dem gleichen Potenzgesetz in der Wartezeit; für beide Datensätze findet man den gleichen Exponenten $\alpha/2 \approx 0.24$.⁶

⁶Die Experimente an Zn-Mb bei 4.2 K werden im Detail in Kap. 6.1 erläutert. Sie zeigen – anders als die analogen Ergebnisse am Cytochrom c – durchaus eine Abhängigkeit von der Alterungszeit. Diese wurde in Abb. 4.9 allerdings herauskaliert, um einen direkten Vergleich der Potenzgesetze in t_w zu erlauben.

Offensichtlich befinden sich also auch die gerade geschilderten Experimente in völliger Übereinstimmung mit dem Diffusionsmodell. Interessanterweise ergeben sich für unterschiedliche Proteine, Chromophore und Glasumgebungen (siehe folgende Kapitel) praktisch identische Parameter des Modells. Die typischen Korrelationszeiten τ sind in allen Fällen von der gleichen Größenordnung, und auch der Exponent des Potenzgesetzes in t_w hat fast immer einen identischen Wert von 0.25 ± 0.02 . Lediglich im Cytochrom c beobachtet man eine kleine Abweichung davon. Der Grund hierfür ist noch unklar.

Kapitel 5

Der Trehalose-Effekt

Nachdem im vorigen Kapitel das Diffusionsmodell eingeführt und auch bereits an einigen Beispielen diskutiert wurde, sollen nun in den nächsten beiden Kapiteln Messungen vorgestellt werden, die in dieser Arbeit an verschiedenen Protein-Lösungsmittel-Systemen durchgeführt wurden und die weiteren Rückhalt für die Gültigkeit des Modells liefern.

Eine Schwierigkeit bei Lochbrennexperimenten an Proteinen besteht immer darin, zu entscheiden, durch welche dynamischen Prozesse die beobachtete Lochverbreiterung zustande kommt – sind ausschließlich Vorgänge innerhalb des Proteins dafür verantwortlich oder auch solche, die in seiner (ebenfalls nicht statischen) Glasumgebung stattfinden? Ein Vergleich von Messungen an einem im Protein eingebetteten Chromophor mit solchen, in denen der Farbstoff in einem der Proteinumgebung entsprechenden Glas gelöst war, lieferten z.B. signifikante Unterschiede in der spektralen Diffusion (Fritsch et al., 1996b; Thorn-Leeson et al., 1997) – ein Hinweis darauf, daß Lochbrennexperimente durchaus in der Lage sind, relevante Aussagen über das untersuchte Protein zu machen.

Eine andere Möglichkeit, diese Frage anzugehen, besteht darin, Experimente an einem bestimmten Protein-Chromophor-System in *verschiedenen* Glasumgebungen durchzuführen. Ein solches Vorgehen wurde in dieser Arbeit gewählt. Verglichen wurden dabei die (in Kap.4.1 schon vorgestellten) Messungen an HRP in einem Wasser-Glycerin-Glas mit solchen, die am gleichen Protein in Wasser-Glycerin-Trehalose-Gläsern durchgeführt wurden (Schlichter et al., 2001a).

Bei Trehalose handelt es sich um ein Disaccharid, das in der Natur von großer Bedeutung ist. Viele biologische Systeme sind in der Lage, extreme Trockenheit oder auch tiefe Temperaturen lange Zeiten unbeschadet zu überstehen und anschließend innerhalb kürzester Zeit ihre biologische Funktion wiederaufzunehmen, indem sie mehr oder minder große Mengen an Trehalose anlagern (Womersley, 1981, und dortige Referenzen). Auch wenn der genaue Mechanismus dieser Schutzwirkung von Trehalose noch nicht im Detail verstanden ist, scheinen doch zwei spezielle Eigenschaften des Stoffes dabei von Bedeutung zu sein: Trehalose zeigt zum einen eine große Affinität zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken (Crowe et al., 1998). Sie könnte daher in der Lage sein, die Wasserhülle eines Proteins zu ersetzen

und so auch im trockenen Zustand die Stabilität des Proteins zu erhalten. Auffällig ist außerdem die hohe Glasübergangstemperatur von Trehalose(lösungen) (Miller et al., 1999), die deutlich über der von Wasser-Glycerin-Gemischen liegt (Green und Angell, 1989). Es ist beispielsweise problemlos möglich, Trehalose-Gläser bei Raumtemperatur herzustellen; die Glasübergangstemperatur für ein reines Trehalose-Glas liegt bei etwa 117 °C (Miller und de Pablo, 2000). Diese Fähigkeit der Glasbildung bei (annähernd) physiologischen Temperaturen trägt anscheinend ebenfalls zur biologische Funktion der Trehalose bei (Crowe et al., 1998, 1994).

Es ist zu erwarten, daß die speziellen Eigenschaften der Trehalose auch die Ergebnisse eines Experimentes zur spektralen Diffusion deutlich beeinflussen. Die naive Annahme wäre, daß ein Protein in einem Trehalose-Glas ›versteift‹ und deshalb die spektrale Diffusion verlangsamt würde. Die im nächsten Abschnitt dargestellten Messungen scheinen allerdings auf ein komplizierteres Verhalten hinzudeuten.

5.1 Meerrettichperoxidase in Trehalose-Gläsern

Genau wie bei den in Kap. 4.1 besprochenen Messungen wurde auch für die Trehalose-Experimente wieder HRP verwendet, deren Hämgruppe durch Freie-Base-Mesoporphyrin IX ersetzt war. Die Proteine wurden in einem Wasser-Glycerin-Trehalose-Gemisch der Konzentration (10:50:40% v:v) gelöst; eine zweite Probe mit höherer Trehalosekonzentration (7:33:60% v:v) wurde ebenfalls hergestellt.¹ An beiden Proben wurden Alterungs-/Wartezeitexperimente in der üblichen Weise durchgeführt. (Details zu Zubereitung der Proben und zur Durchführung der Experimente finden sich in Kap. 2.2.2). Die Ergebnisse der Messungen sollen im Folgenden kurz zusammengefaßt werden, eine genauere Diskussion folgt dann in Kap. 5.2.

Abb. 5.1 zeigt die inhomogene Absorptionsbande von HRP in Wasser-Glycerin, bzw. im Trehalose-Glas niedrigerer Trehalose-Konzentration. (Dieses ist, sofern nicht ausdrücklich anders erwähnt, im Rest dieses Kapitels immer gemeint, wenn von Trehalose die Rede ist.) Beide Spektren wurden bei einer Temperatur von 4.2 K aufgenommen. Man erkennt deutlich, daß die Anreicherung der Protein-Umgebung mit Trehalose *keinerlei Auswirkungen auf die Breite der inhomogenen Bande* hat; die Spektren sind im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch.

Das spektrale Lochbrennen in der Trehaloseprobe wurde – wie üblich – in einem engen Frequenzbereich der inhomogenen Bande durchgeführt. Die Verbreiterung der zu unterschiedlichen Alterungszeiten gebrannten Löcher ist in Abb. 5.2 dargestellt; man erkennt ein Verhalten, das völlig analog zu dem von HRP in einem Wasser-Glycerin-Glas ist (siehe Kap. 4.1): Die Lochverbreiterung geht schon nach relativ kurzen Alterungszeiten in ein (fast) stationäres Verhalten über, das aber

¹Die Verwendung eines Wasser-Trehalose-Gemisches ohne zusätzliches Glycerin führte beim Einfrieren stets zu einer so schlechten Glasqualität, daß spektroskopische Messungen daran nicht möglich waren.

nichtlogarithmisch von der Wartezeit abhängt.

Ein Einfluß der Trehalose-Konzentration auf diese Ergebnisse konnte nicht beobachtet werden; dies ist im Einschub der Abb. 5.2 zu erkennen. Es ist dort die Verbreiterung zweier spektraler Löcher dargestellt, die nach identischen Alterungszeiten (und bei der gleichen Frequenz) in den beiden Proben mit unterschiedlicher Trehalose-Konzentration gebrannt wurden. Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit zeigen beide Löcher offensichtlich *identisches Verhalten*. (Das größere Rauschen im Falle des Glases mit höherer Trehalosekonzentration rührt von der schlechteren Glasqualität her, die sich hier nach dem Einfrieren ergeben hat. Als Folge davon hatte die Messung mit einem deutlich größeren Anteil an Streulicht zu kämpfen.)

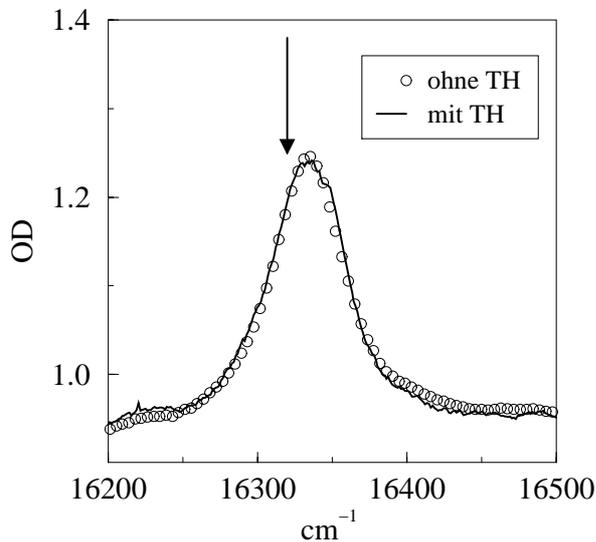


Abbildung 5.1: Vergleich der inhomogenen Absorptionsbanden von HRP in einem Trehalose-Glas (TH) und einem Trehalose-freien Glas. Temperatur: 4.2 K. Das Lochbrennen wurde jeweils in einem schmalen Frequenzbereich der inhomogenen Bande (Pfeil) durchgeführt.

In Abb. 5.3 wird die Abhängigkeit der spektralen Diffusion von der Alterungszeit untersucht. Die Daten für den Fall des Trehalose-Glases stammen dabei aus einem ›Schnitt‹ durch Abb. 5.2 bei einer festen Wartezeit von 10000 min (analog zum Vorgehen in Kap. 4.1); die Daten für das Trehalose-freie Glas sind dieselben wie in Abb. 4.5. Beide Datensätze wurden hier allerdings auf ihren jeweiligen Anfangswert normiert, um ihr Zeitverhalten direkt vergleichen zu können. Die Alterungsdynamik für HRP ist in beiden Gläsern offensichtlich völlig identisch. Die Daten lassen sich gut durch ein Potenzgesetz in t_a fiten; für dessen Exponenten ergibt sich ein Wert von $\beta = 0.07 \pm 0.01$.

Es ist damit jetzt wieder möglich, die Alterungsdynamik aus den Messungen herauszukalieren, indem man alle Datensätze durch ihre jeweilige Abhängigkeit von der Alterungszeit teilt. (Diese Art der Darstellung wurde bereits in Kap. 4.1 als sog. Masterplot eingeführt). In Abb. 5.4 werden die Masterplots der Messungen im Trehalose-Glas bzw. im Trehalose-freien Glas miteinander verglichen (letzterer ist identisch mit Abb. 4.6). Man erkennt, daß die Datensätze auf zwei parallele

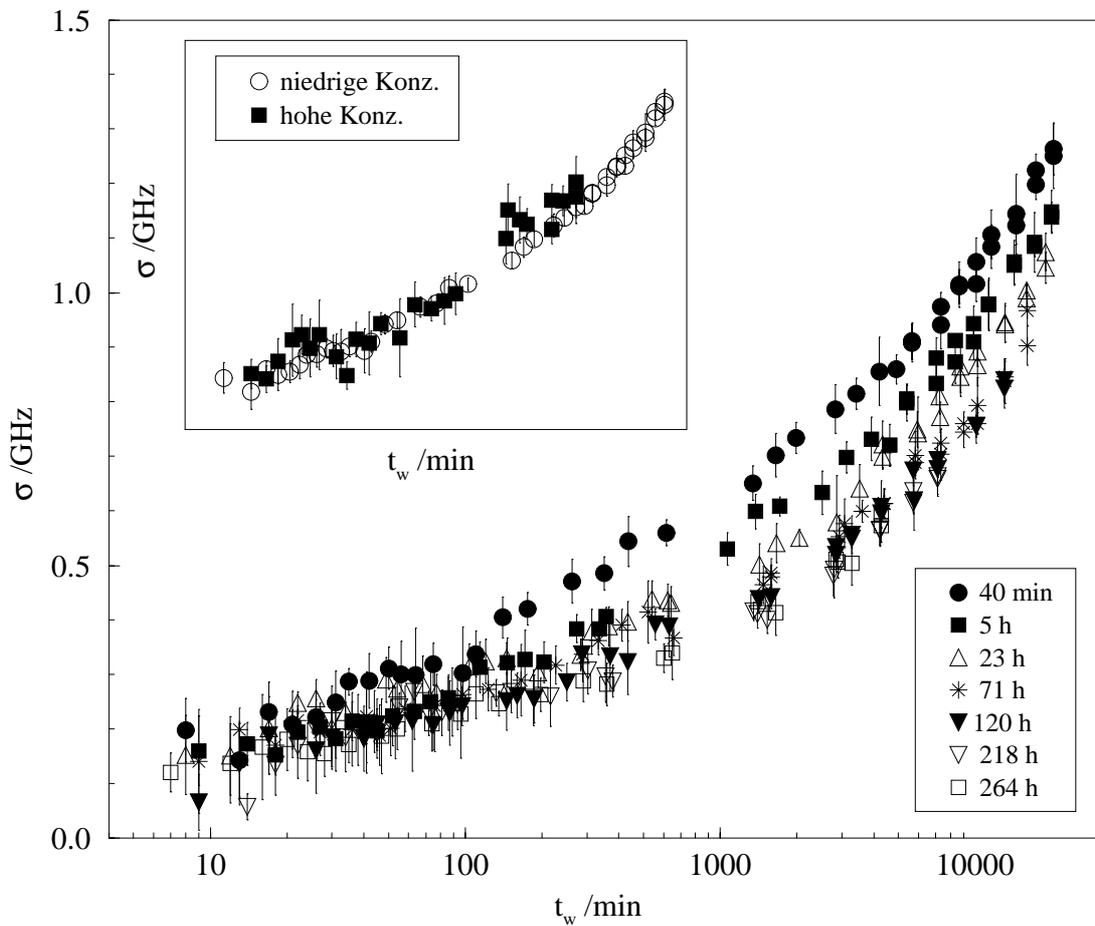


Abbildung 5.2: Lochverbreiterung von HRP in einem Trehalose-Glas für verschiedene Alterungszeiten. Temperatur: 4.2 K. Für die längeren Alterungszeiten ergibt sich ein (fast) stationäres, nichtlogarithmisches Verhalten. Einschub: Vergleich der spektralen Diffusion in Proben mit unterschiedlicher Trehalose-Konzentration. (Die Löcher wurden hierbei nach identischen Alterungszeiten gebrannt.)

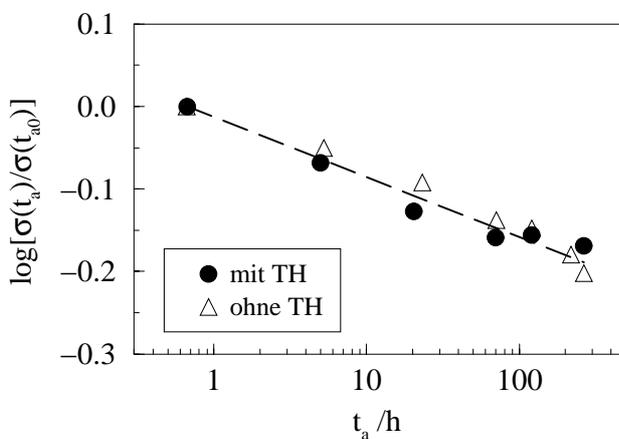


Abbildung 5.3: Abhängigkeit der spektralen Diffusion von der Alterungszeit für HRP in einem Trehalose-Glas und in einem Trehalose-freien Glas. Beide Meßreihen sind jeweils auf ihren Anfangswert $\sigma(t_{a0})$ normiert. Die Daten lassen sich gut durch ein Potenzgesetz fitten (Linie).

Geraden in einer doppelt-logarithmischen Darstellung fallen; die Meßreihen gehorchen somit dem *gleichen Potenzgesetz* $\sigma \propto t_w^{\alpha/2}$. Für dessen Exponenten ergibt sich in sehr guter Übereinstimmung in beiden Fällen ein Wert von $\alpha/2 \approx 0.25$. Durch die unterschiedlichen Glasumgebungen wird lediglich der Achsenabschnitt der Masterplots beeinträchtigt. Auffallend ist auch, daß die spektrale Diffusion in HRP in einer Trehalose-Umgebung deutlich *größer* ist als in einem Wasser-Glycerin-Glas.

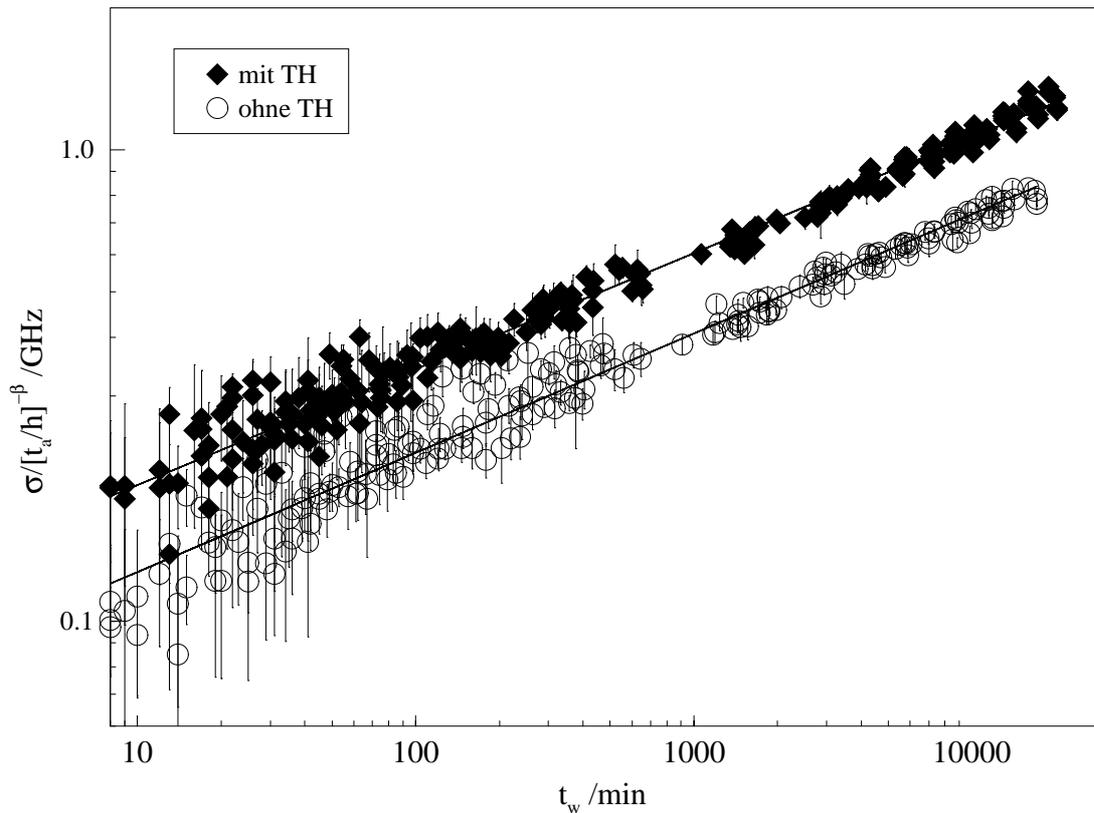


Abbildung 5.4: Spektrale Diffusion von HRP in einem Trehalose-Glas und in einem Trehalose-freien Glas, nachdem die Abhängigkeit von der Alterungszeit herauskaliert wurde (*Masterplots*). Die spektrale Diffusion gehorcht in beiden Fällen einem Potenzgesetz mit dem gleichen Exponenten. Die unterschiedlichen Glasumgebungen haben lediglich Einfluß auf die Achsenabschnitte der Masterplots.

In Abb. 5.5 sind schließlich noch Messungen der (quasi)homogenen Linienbreite von HRP in den verschiedenen Glasumgebungen dargestellt. Das Prinzip einer solchen Messung wurde in Kap. 2.1.2 erläutert. Um eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Laserintensität auszuschließen, wurde das Experiment mit unterschiedlichen Laserleistungen wiederholt; die Ergebnisse in Abb. 5.5 enthalten aber offenbar keine signifikante Intensitätsverbreiterung. Man erkennt, daß die (quasi)homogene Linienbreite von HRP im Trehalose-Glas größer ist als im

Trehalose-freien Glas; darüber hinaus stehen die Linienbreiten in einem vergleichbaren Verhältnis zueinander wie die Achsenabschnitte der Masterplots in Abb. 5.4. Es ist daher plausibel, daß (im Wesentlichen) die spektrale Diffusion für die (quasi)homogenen Linienbreiten verantwortlich ist. Eine Messung dieser Linienbreiten ist aber nur sensitiv für Vorgänge auf viel kürzeren Zeitskalen, als sie z.B. in einem Wartezeit-Experiment von Bedeutung sind – die längste auftretende Zeitkonstante ist eine typische Lochbrennzeit, also in der Größenordnung von einer Minute. Auf dieser Zeitskala scheinen aber bereits die gleichen Gesetzmäßigkeiten zu herrschen wie in den Wartezeitexperimenten. Dies läßt den Schluß zu, daß die Wartezeitexperimente immer innerhalb des Zeitfensters liegen, in dem das Diffusionsmodell bereits seine Gültigkeit hat. (siehe Kap. 4.2.3).

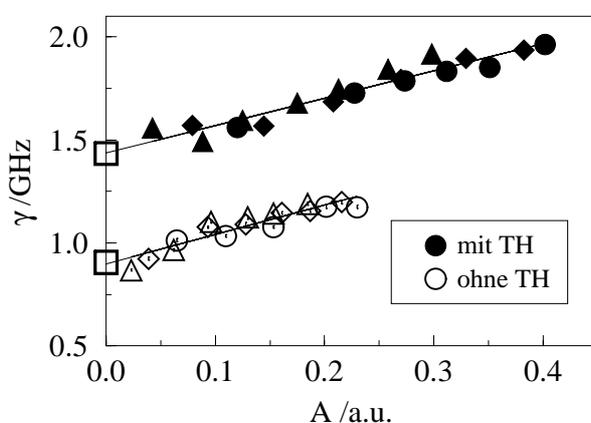


Abbildung 5.5: Messung der (quasi)homogenen Linienbreite von HRP in einem Trehalose-Glas und einem Trehalose-freien Glas (Temperatur 4.2 K). Die verschiedenen Symbole deuten unterschiedliche Intensitäten des Lasers während des Lochbrennens an.

5.2 Interpretation des Trehalose-Effekts

Aus den experimentellen Resultaten des vorigen Abschnitts (Abb. 5.1 - 5.5) können nun einige interessante Schlüsse gezogen werden:

- ▷ Die inhomogene Linienbreite der (langwelligen) Absorptionsbande von HRP ist ausschließlich durch die Unordnung in der unmittelbaren Umgebung des Chromophors – also nur durch *proteininterne* Eigenschaften – bestimmt.

Diese Behauptung wurde in Kap. 4.2.2 schon aus theoretischen Überlegungen abgeleitet; die Messungen von HRP in verschiedenen Gläsern liefern aber einen direkten experimentellen Beweis dafür. Wie in Abb. 5.1 zu sehen ist, findet man für HRP die gleiche Breite der inhomogenen Bande, unabhängig davon, ob sich das Protein in einer Wasser-Glycerin- oder in einer Trehalose-Umgebung befindet. Aufgrund der wesentlich höheren Glasübergangstemperatur des Trehalose-Gemisches läßt sich aber annehmen, daß das Trehaloseglas einen deutlich größeren Teil seines Konformationsraums ausfüllt als das Wasser-Glycerin-Glas, oder anders formuliert: das Trehaloseglas zeigt ›größere Unordnung‹. Gäbe es nun eine direkte Wechselwirkung zwischen dem (proteininternen) Chromophor und dem

Glas in der Proteinumgebung, so müßten sich die inhomogenen Banden in den beiden Proben unterscheiden; die Breite der inhomogenen Bande ist ja ein Maß für die Unordnung, an die der Chromophor koppelt. Da das nicht der Fall ist, kann man schließen, daß der Chromophor von der Glasumgebung nicht beeinflusst wird. Dies erlaubt eine weitere wichtige Folgerung:

- ▷ Durch ein Lochbrenn-Experiment zur spektralen Diffusion werden nur Vorgänge im Inneren des Proteins untersucht.

Diese Aussage liegt nun auf der Hand: Nur Fluktuationen von *proteininternen* Residuen können zur spektralen Diffusion beitragen, da nur diese an den Chromophor koppeln. Die Proteinoberfläche oder auch das umgebende Glas können dagegen ausschließlich auf indirektem Weg die spektrale Diffusion beeinflussen, z.B. über Änderungen in der Korrelationszeit, die sich für die Fluktuationen der Residuen in Chromophornähe ergibt.

Eine andere wichtige Beobachtung ergibt sich aus Abb. 5.4:

- ▷ Die Korrelationszeit für die Fluktuationen in HRP ist in einer Trehalose-Umgebung kleiner als in einer Trehalose-freien Umgebung.

Dieser Schluß läßt sich aus der deutlich größeren spektralen Diffusion ableiten, die in der Trehalose-Probe gefunden wurde. Man erkennt zunächst, daß die spektrale Diffusion in beiden Gläsern dem gleichen Potenzgesetz in t_w folgt. Die Trehalose-Umgebung hat also ausschließlich einen Einfluß auf den Achsenabschnitt in der doppelt-logarithmischen Darstellung. Dieser ist nach Gl. 4.23 aber auf folgende Weise durch die Parameter des Diffusionsmodells bestimmt:

$$\text{Achsenabschnitt} = \sqrt{2}\sigma_0 \left(\frac{\tau_0}{\text{min}} \right)^{-\alpha/2} \left(\frac{T}{h} \right)^\beta \quad (5.1)$$

Welcher Parameter ist nun für die Änderung des Achsenabschnittes verantwortlich? σ_0 wurde in Kap. 4.2.1 mit der Breite der inhomogenen Bande identifiziert. Wie oben erläutert, ist diese aber unabhängig von der Trehalose-Konzentration der Proteinumgebung; σ_0 kann also nicht verantwortlich sein für die Unterschiede in der spektralen Diffusion von HRP in den beiden Gläsern. Ebenso wenig können die Exponenten α und β der Potenzgesetze für die spektrale Diffusion (Abb. 5.4) bzw. für die Alterungsdynamik (Abb. 5.3) die Ursache des Trehalose-Effektes sein; offensichtlich ist auch ihr Wert unabhängig von der Glasumgebung des Proteins. Von Bedeutung sind somit nur die Zeitkonstanten τ_0 oder T . Der Einfluß der letztgenannten wird aber durch den kleinen Exponenten $\beta \approx 0.07$ in Gl. 5.1 stark gemildert; es wären sehr große Änderungen in T nötig, um die Unterschiede der spektralen Diffusion in den beiden Gläsern zu erklären. Es ist deswegen plausibel, daß der Trehalose-Effekt ausschließlich auf einer *Abnahme der Korrelationszeit* τ_0 beruht, die die Zeitskala der *Fluktuationsprozesse* des Proteins charakterisiert.²

²Um die experimentellen Daten zu erklären, muß τ_0 für HRP im Trehalose-Glas etwa um einen Faktor vier kleiner sein als im Falle des Trehalose-freien Glases.

In der Literatur ist der Einfluß von Trehalose auf die Proteindynamik ausführlich diskutiert worden. Schwerpunkt der Untersuchungen war vor allem die Rückbindungskinetik von Kohlenmonoxid an Myoglobin nach der Photodissoziation durch einen Laserpuls. Diese hängt empfindlich davon ab, ob sich das Myoglobin in einem Wasser-Glycerin-Gemisch (Post et al., 1993; Steinbach et al., 1991) oder in einer Trehalose-Umgebung (Hagen et al., 1995, 1996) befindet. Vergleichbare Messungen an Hämoglobin in einer Trehalose-Umgebung wurden in (Gottfried et al., 1996) vorgestellt.

Die CO-Rückbindung an Myoglobin in einem Wasser-Glycerin-Gemisch zeigt eine komplizierte Temperatur- und Zeitabhängigkeit. Auffallend ist vor allem der (schon erwähnte) *inverse Temperatureffekt*, den man für Temperaturen oberhalb von etwa 200 K beobachtet: Die Geschwindigkeit der CO-Rückbindung nimmt in diesem Bereich mit *steigender Temperatur ab*. Erklärt wird diese Beobachtung gewöhnlich durch Relaxationsprozesse in den untersuchten Proteinen, deren Zeitkonstanten in diesem Temperaturbereich den experimentellen Zeitskalen vergleichbar werden und die deshalb merklichen Einfluß auf die Reaktionsraten haben. Diese Relaxationsvorgänge (in Richtung auf einen Gleichgewichtszustand des Proteins ohne gebundenen Liganden) haben zur Folge, daß die Energiebarrieren für die Rückreaktion des Kohlenmonoxids im Lauf der Zeit immer höher werden und deshalb die Reaktionsraten abnehmen. Da Proteinrelaxationen bei höheren Temperaturen schneller erfolgen, kommt es nach dieser Vorstellung zu einem inversen Temperaturverhalten. Die Tatsache, daß ein solches in Messungen an Myoglobin in einem Trehaloseglas nicht beobachtet werden konnten, erklärten Hagen et al. daher auch durch die völlige Abwesenheit von Relaxationsbewegungen in den untersuchten Proteinen (selbst noch bei physiologischen Temperaturen). Als Ursache dafür sahen sie die hohe Viskosität des Trehalose-Glases an, durch das die Proteine gleichsam ›fixiert‹ würden.

Eine andere Interpretation dieser Experimente findet sich in (Sastry und Agmon, 1997). Die Autoren gelangen dort – nach einer neuerlichen Auswertung der Meßdaten mit Hilfe eines zweidimensionalen, empirischen Modellpotentials – zu der Meinung, daß der inverse Temperatureffekt in den Wasser-Glycerin-Experimenten nur zum Teil durch die Relaxationsprozesse der Proteine verursacht wird. Darüberhinaus soll noch ein statischer Effekt, der sog. *Protein-Kollaps*, ganz wesentlich für das beobachtete Temperaturverhalten verantwortlich sein. Sastry und Agmon verstehen darunter eine großflächige Relaxationsbewegung des Proteins, die (bei höheren Temperaturen) unmittelbar nach der Dissoziation des Kohlenmonoxids stattfinden soll und eine Angleichung der Gleichgewichtspositionen für die gebundene und die Deoxyform des Myoglobins zur Folge hat. Dies führt dann ebenfalls zu einer – allerdings statischen – Erhöhung der Energiebarrieren für die Rückbindung des Kohlenmonoxids und somit zu einer Verminderung der Reaktionsraten. Bei tiefen Temperaturen (genauer: unterhalb der Glasübergangstemperatur des Lösungsmittels) sind großflächige Strukturänderungen der Proteine dagegen unterdrückt, der inverse Temperatureffekt tritt deshalb nicht auf. Aus diesen Überlegungen läßt sich nun insbesondere schließen, daß das Fehlen eines

inversen Temperatureffekts in Anwesenheit einer Trehaloseumgebung – mit einer Glasübergangstemperatur im physiologischen Bereich – keinenfalls bedeuten muß, daß in diesem Fall keine Proteinrelaxationen mehr stattfinden; lediglich der großflächige Proteinkollaps wird durch das Trehaloseglas unterdrückt. Sastry und Agmon kommen in ihrer weiteren Auswertung daher auch zu dem interessanten Ergebnis, daß es auch in einem Trehaloseglas noch zu Relaxationsprozessen *innerhalb* des Myoglobins kommt, diese aber völlig von der Proteinoberfläche (und damit der Glasumgebung) entkoppelt sind. Verblüffend ist dabei vor allem der Befund, daß solche proteininternen Prozesse in einem Trehaloseglas *schneller* verlaufen als in einer Wasser-Glycerin-Umgebung.

Als mikroskopische Erklärung dieses Resultats führen Sastry und Agmon die Eigenschaft der Trehalose an, *interne Wassermoleküle* des Myoglobins zu konservieren, während diese in einer Glycerinumgebung aus dem Protein entfernt werden. Diese internen Wassermoleküle bilden Wasserstoffbrücken innerhalb des Proteins aus und besetzen so Stellen, an denen sonst innermolekulare Bindungen des Myoglobins entstünden, die eine ›Versteifung‹ des Proteins zur Folge hätten. Die internen Wasser – und damit die Trehalose – bewirken also eine *höhere innere Beweglichkeit* des Proteins.

In (Gajhede et al., 1997) wurde gezeigt, daß auch in HRP interne Wassermoleküle in der Nachbarschaft der Hämtasche vorhanden sind, das Modell von Sastry et al. sollte sich also auch auf dieses Molekül übertragen lassen. Tatsächlich stehen die erläuterten Meßergebnisse an HRP in völliger Übereinstimmung mit obigen Überlegungen: Es wurde gezeigt, daß auch in einem Trehaloseglas Konformationsänderungen in HRP stattfinden; andernfalls würde keine spektrale Diffusion beobachtet. Wie oben erläutert, ist diese zurückzuführen auf Residuen-Bewegungen im *Inneren* des Proteins und völlig entkoppelt von der Proteinoberfläche. Die Anwesenheit von Trehalose führte außerdem zu einer Zunahme der spektralen Diffusion, also zu *schnelleren* Konformationsfluktuationen im Protein. Nach Sastry et. al. ist genau ein solches Verhalten zu erwarten: Durch die Trehalose werden interne Wassermoleküle am Verlassen der Hämtasche gehindert, woraus eine höhere Beweglichkeit des Proteins resultiert. Die Konformationsfluktuationen erfolgen deshalb schneller, die Korrelationszeit τ_0 nimmt ab.

Zusammenfassend untermauern obige Messungen also die These, daß *die wesentliche Wirkung der Trehalose darin besteht, interne Wassermoleküle der Proteine zu konservieren*. Darüber hinaus sollte noch einmal angemerkt werden, daß die hier vorgestellten Experimente an HRP in Trehalose-Gläsern sich ausgezeichnet im Rahmen des Diffusionsmodells beschreiben lassen.

Kapitel 6

Deuterierungsexperimente

6.1 Messungen an Myoglobin

Alle Experimente dieser Arbeit wurden bei einer Temperatur von 4.2 K durchgeführt. Es ist anzunehmen, daß in diesem niedrigen Temperaturbereich Tunnelprozesse (insbesondere von Wasserstoffatomen) von großer Wichtigkeit für die ablaufenden dynamischen Prozesse sind. Eine Deuterierung der untersuchten Proteine sollte daher deutlichen Einfluß auf die Konformationsdynamik haben. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Alterungs-/Wartezeitexperimente an Myoglobin in einem *protonierten* bzw. *deutერიerten* Lösungsmittel durchgeführt, die im Anschluß erläutert werden sollen.

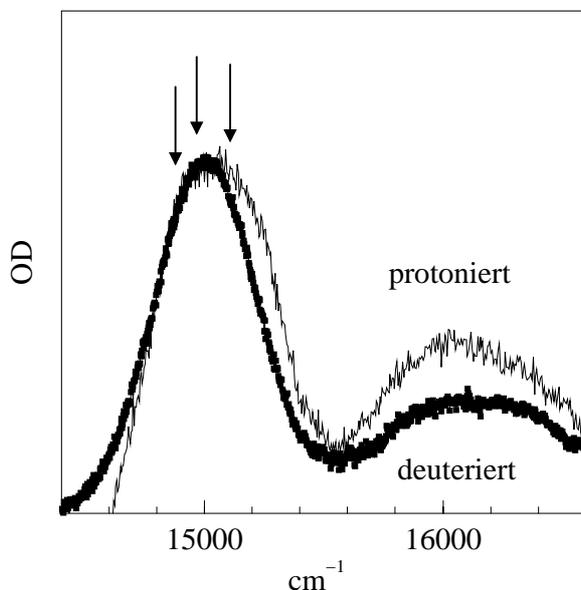


Abbildung 6.1: Absorptionsbanden von Myoglobin in einem deuterierten und einem protonierten Lösungsmittel (Temperatur 4.2 K). Statt der natürlichen Hämgruppe diente Zn-Phaeophorbid a als Chromophor (Zn-Mb). Die Pfeile markieren die Frequenzen, bei denen Lochbrennexperimente durchgeführt wurden.

Für die Messungen wurde Myoglobin verwendet, in dem die natürliche Hämgruppe durch *Zink-Phaeophorbid a* ersetzt worden war; dadurch wurde schmalbandiges

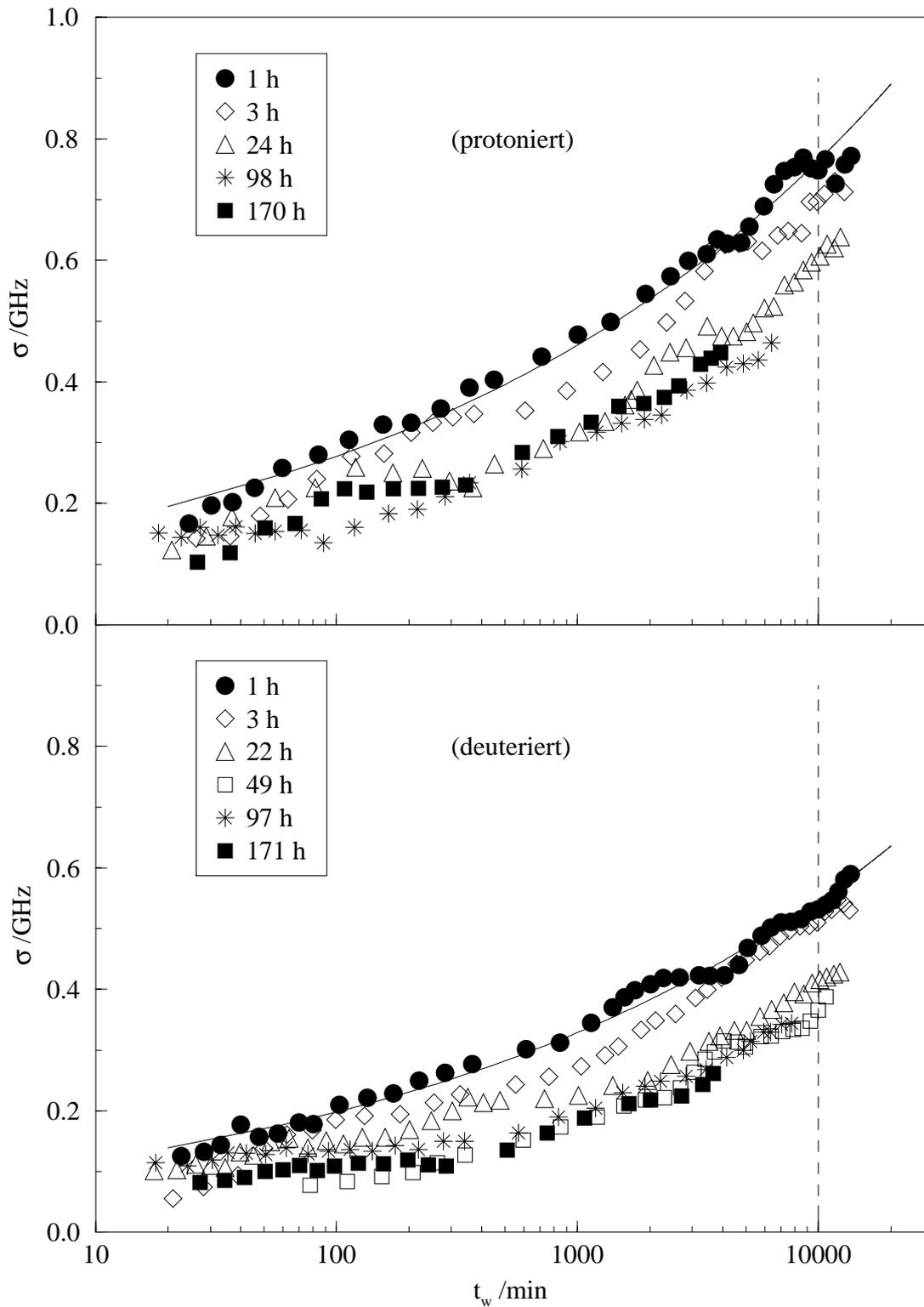


Abbildung 6.2: Lochverbreiterung als Funktion der Wartezeit, gemessen an Zn-Mb in einer protonierten bzw. deuterierten Lösung. Temperatur 4.2 K. Die einzelnen Datensätze lassen sich wieder gut durch ein Potenzgesetz anfitten (durchgezogene Linien).

Lochbrennen möglich. Die Proteine wurden in einem Fall in einem protonierten, im anderen in einem deuterierten Puffer gelöst; um Kristallisation während des Einfrierens zu vermeiden, wurde außerdem noch (protoniertes) Glycerin hinzugefügt. Die Glasqualität nach dem Abkühlen auf Heliumtemperatur war allerdings in beiden Proben relativ schlecht; Lichtstreuung an zahlreichen Sprüngen verursachte einen unerfreulich hohen Rauschpegel der Meßergebnisse. Durch geeignete Mittelungsverfahren (mehrere Scans pro Meßpunkt, lange Integrationszeiten etc.) war es aber dennoch möglich, signifikante Ergebnisse zu erhalten. Die Durchführung der Messungen erfolgte in völlig analoger Weise zu den in den vorigen Kapiteln geschilderten Experimenten, Einzelheiten dazu wie auch zur Zuberereitung der Proben finden sich in Kap. 2.2.2.

Die langwelligen Absorptionsbanden der beiden Proben bei einer Temperatur von 4.2 K zeigt Abb. 6.1. Während die Bande in der deuterierten Probe sich gut durch einen Gaußkurve anpassen läßt¹, legt die Linienform in der protonierten Probe den Schluß nahe, daß die Bande aus zwei (oder mehr) Sub-Banden aufgebaut ist. Im Folgenden wird davon ausgegangen, daß die Breite σ_0 dieser Subbanden in beiden Proben die gleiche ist – es gibt keinen plausiblen Grund, warum eine Deuterierung Einfluß auf die inhomogene Verteilung nehmen sollte.

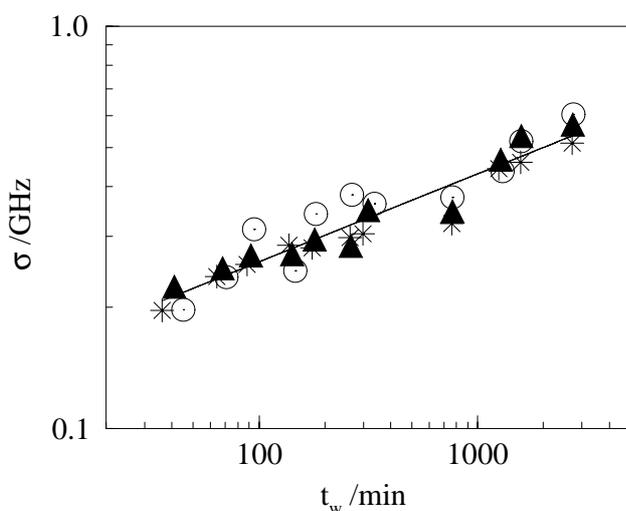


Abbildung 6.3: Spektrale Diffusion für unterschiedliche Brennfrequenzen (Pfeile in Abb. 6.1). Die Alterungszeiten waren bei allen Messungen identisch. Probe: Zn-Mb in protonierten Lösung (Temperatur: 4.2 K).

In beiden Proben wurden nun (nach unterschiedlichen Alterungszeiten) spektrale Löcher gebrannt, jeweils in einem schmalen Frequenzbereich im Maximum der inhomogenen Bande. Abb. 6.2 zeigt deren Verbreiterung als Funktion der Wartezeit in linear-logarithmischer Darstellung. Das Verhalten beider Proben zeigt eine starke Ähnlichkeit mit den Ergebnissen an der Meerretichperoxidase, die in den vorigen Kapiteln vorgestellt wurden:

- ▷ Die spektrale Diffusion hängt (unabhängig von der Deuterierung) *nichtlogarithmisch* von der Wartezeit ab; die Datensätze lassen sich gut durch ein

¹Man erhält eine Breite der Bande von ca. 460 cm^{-1} (FWHM)

Potenzgesetz anpassen (siehe durchgezogene Linien in Abb. 6.2); dessen Exponent ist identisch für beide Proben ($\alpha/2 = 0.24 \pm 0.02$) und entspricht darüber hinaus im Rahmen der Meßgenauigkeit dem Wert, der auch in den Experimenten an der Meerrettichperoxidase gefunden wurde.

- ▷ Die spektrale Diffusion geht für lange Alterungszeiten in einen (fast) *stationären Prozeß* über: Die zugehörigen Datensätze fallen praktisch aufeinander.
- ▷ Die spektrale Diffusion verläuft in der protonierten Myoglobin-Probe deutlich schneller als in der deuterierten.

Diese Ergebnisse sind unabhängig davon, an welcher Stelle in der inhomogenen Bande das Lochbrennexperiment durchgeführt wird. Dies ist in Abb. 6.3 zu erkennen. Dort ist die Lochverbreiterung für drei spektrale Löcher aufgetragen, die – in einem unabhängigen Experiment – nach praktisch identischen Alterungszeiten bei verschiedenen Frequenzen in der protonierten Probe gebrannt und anschließend einige Tage lang beobachtet wurden. Die Brennfrequenzen erstreckten sich dabei über einen Bereich von ca. 230 cm^{-1} (siehe Pfeile in Abb. 6.1). Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit ist die spektrale Diffusion für alle drei Datensätze identisch.

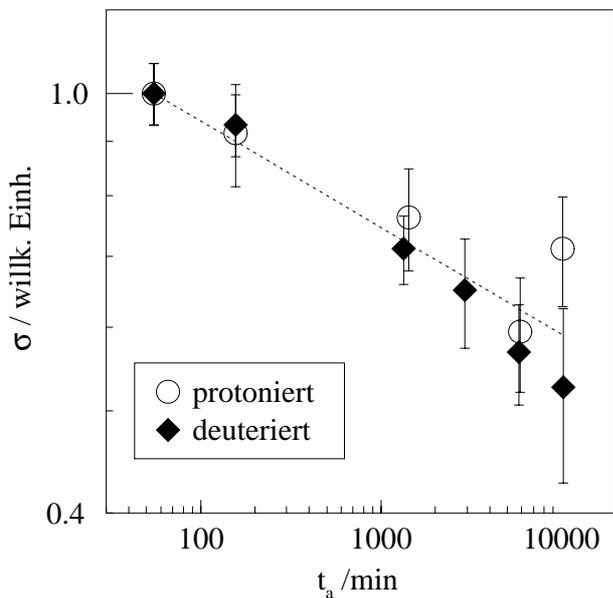


Abbildung 6.4: Abhängigkeit der spektralen Diffusion von der Alterungszeit. Die Daten folgen aus Abb. 6.2 durch einen Schnitt bei einer festen Wartezeit von 10000 min. Im Rahmen der Meßgenauigkeit gehorchen die Datensätze dem gleichen Potenzgesetz in der Alterungszeit, der Exponent ist $\beta = 0.10 \pm 0.01$

Die Alterungsdynamik der beiden Proben wurde analog zum Vorgehen in den vorigen Kapiteln untersucht: Es wurde ein ›Schnitt‹ bei einer festen Wartezeit $t_w = 10000 \text{ min}$ durch Abb. 6.2 gelegt (gestrichelte Linien), um so die Lochverbreiterung als Funktion der Alterungszeit zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Prozedur sind in Abb. 6.4 für beide Proben dargestellt; die Datensätze wurden zur besseren Vergleichbarkeit dabei wieder auf ihren Anfangswert normiert.

- ▷ In beiden Proben zeigt die Alterungsdynamik (im Rahmen der experimentellen Genauigkeit) die gleiche Zeitabhängigkeit; genau wie in den Experimenten an der Meerrettichperoxidase findet man ein Potenzgesetz in t_a . Für den Exponenten ergibt sich diesmal $\beta = 0.10 \pm 0.01$.

Mit dieser Alterungsabhängigkeit kann man jetzt (genau wie in den vorigen Kapiteln) die Daten aus Abb. 6.2 skalieren; die daraus resultierenden *Masterplots* sind in Abb. 6.5 dargestellt; man erkennt wieder große Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen der Meerrettichperoxidase-Experimente:

- ▷ Alle Datensätze einer Probe fallen in einer doppelt-logarithmischen Darstellung auf einen gemeinsamen Ast, der sich jeweils ausgezeichnet durch ein Potenzgesetz in der Wartezeit beschreiben läßt (durchgezogene Linien).
- ▷ Der Exponent dieses Potenzgesetzes ist in protonierter und deuterierter Probe identisch; man findet (wie oben bereits erwähnt): $\alpha/2 = 0.24 \pm 0.02$.
- ▷ Die Deuterierung der Probe hat lediglich einen Einfluß auf den Achsenabschnitt in einer doppelt-logarithmischen Darstellung; der Masterplot der protonierten Messung ist gegenüber der deuterierten nach oben verschoben – die spektrale Diffusion in der protonierten Probe verläuft also schneller.

Auch die (quasi)homogenen Linienbreiten bei 4.2 K wurden (für unterschiedliche Brennintensitäten des Lasers) gemessen, die Ergebnisse finden sich in Abb. 6.6. Es ergibt sich $\gamma_{hom} \approx 1.3$ GHz für die protonierte sowie $\gamma_{hom} \approx 1.0$ GHz für die deuterierte Probe. Identische Werte bei unterschiedlichen Laserleistungen während des Brennens der spektralen Löcher (volle bzw. offene Symbole in Abb. 6.6) zeigen, daß keine signifikante Leistungsverbreiterung in den Messungen enthalten ist. Die (quasi)homogenen Linienbreiten stehen in einem ähnlichen Verhältnis zueinander wie die spektrale Diffusion zu einer bestimmten Wartezeit (s. Abb. 6.5); dies legt wieder die Idee nahe, daß die (quasi)homogene Linienbreite im Wesentlichen durch spektrale Diffusion bestimmt ist. (In Kap. 5.1 wurde bereits erläutert, daß dies ein Anhaltspunkt für die Gültigkeit des Diffusionsmodells ist.)

Als letztes Ergebnis der Messungen an Myoglobin soll schließlich noch das Verhalten der *Flächen der spektralen Löcher* als Funktion der Wartezeit betrachtet werden (Abb. 6.7). Alle Lochflächen sind hierbei auf ihren Wert unmittelbar nach dem Lochbrennen normiert worden. Es lassen sich mehrere wichtige Beobachtungen machen:

- ▷ In beiden Proben zeigt die Abnahme der Lochfläche einen deutlich *nichtexponentiellen Verlauf*, im Falle der protonierten Probe ergibt sich vielmehr in recht guter Näherung eine logarithmische Abhängigkeit von der Wartezeit. Bei der deuterierten Probe geht die Zeitabhängigkeit dagegen erst nach einer gewissen Zeit in dieses logarithmische Verhalten über.

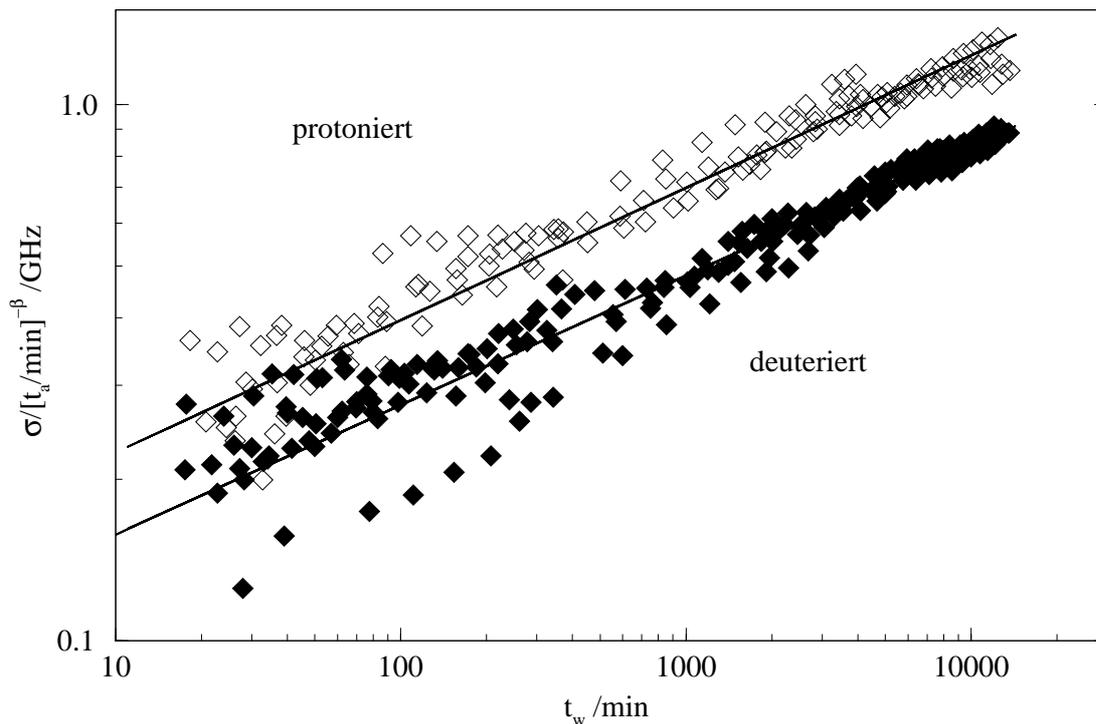


Abbildung 6.5: Meßdaten aus Abb. 6.2 nach einer Skalierung mit der Alterungszeit (\triangleright Masterplots \triangleleft). Die Ergebnisse lassen sich gut durch ein Potenzgesetz in der Wartezeit fitten, der Exponent $\alpha/2 \approx 0.24$ wird durch die Deuterierung nicht beeinflusst.

- ▷ Die Lochflächen nehmen in der protonierten Probe deutlich schneller ab als in der deuterierten; ein Rückgang der Lochfläche auf ca. 70 %, der sich für erstere nach etwa 1000 min zeigt, stellt sich in letzterer beispielsweise erst nach einer Wartezeit von ungefähr 7000 min ein.
- ▷ In der protonierten Probe ist eine kleine, aber signifikante Abhängigkeit der Lochauffüllung von der Alterungszeit zu beobachten. Dies ist deutlich im Einschub in Abb. 6.7 zu erkennen, der das Verhalten des spektralen Loches mit der kürzesten (≈ 1 h) bzw. längsten Alterungszeit (≈ 170 h) wiedergibt. Offensichtlich wird die Abnahme der Lochfläche mit zunehmender Alterungszeit langsamer.

Aus den gerade aufgeführten experimentellen Ergebnissen lassen sich nun eine Reihe interessanter Schlüsse ziehen. Am auffälligsten ist natürlich die große Ähnlichkeit der Daten mit den in den vorigen Kapiteln erläuterten Messungen an Meerrettichperoxidase; die spektrale Diffusion in Myoglobin (unabhängig von der Deuterierung des Lösungsmittels) zeigt alle Merkmale, die auch dort beobachtet wurden: Eine Abhängigkeit von der Wartezeit nach einem Potenzgesetz, zudem mit einem Exponenten $\alpha/2$, der für beide Proteine praktisch identisch ist; eine Alterungsdynamik, die in beiden Proteinen ebenfalls einem Potenzgesetz gehorcht

(hierbei findet man allerdings unterschiedliche Werte für den Exponenten β); schließlich ein analoges Verhalten von spektraler Diffusion und (quasi)homogener Linienbreite. Offensichtlich fügen sich also auch die experimentellen Ergebnisse am Myoglobin ausgezeichnet in das Bild des Diffusionsmodells. Die Beobachtungen sind anscheinend nicht an ein einzelnes Protein gebunden, sondern spiegeln möglicherweise allgemeine Eigenschaften zumindest der Hämproteine wider. Für diese ganze Klasse von Proteinen könnte sich daher das Diffusionsmodell, wie es in Kap. 4.1 eingeführt wurde, als geeigneter Weg zur Beschreibung der Konformationsdynamik bzw. spektralen Dynamik erweisen.

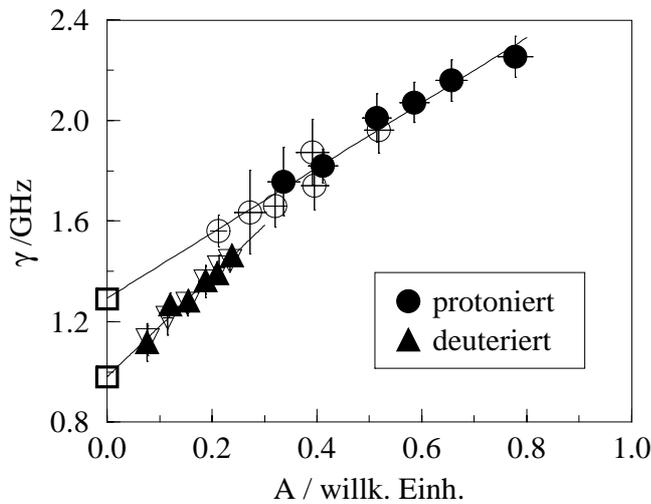


Abbildung 6.6: Bestimmung der (quasi)homogenen Linienbreiten für $T = 4.2$ K. (Die verschiedenen Symbole entsprechen unterschiedlichen Laserleistungen.)

Interessant ist auch das unterschiedliche Verhalten der beiden Myoglobin-Proben, das am deutlichsten in Abb. 6.5 zutage tritt: Durch Deuterierung wird der Masterplot in der doppelt-logarithmischen Darstellung nach unten verschoben, behält aber die gleiche Steigung $-\alpha/2$, der Exponent des Potenzgesetzes in der Wartezeit ist also unverändert. Auch die Abhängigkeit von der Alterungszeit ist für beide Proben gleich, β ist in beiden Fällen identisch (Abb. 6.4). Analog zur Argumentation in Kap. 5.2 kann man daher schließen, daß nur zwei der Parameter des Diffusionsmodells durch die Deuterierung beeinträchtigt werden können: T , die Zeitkonstante der Relaxationen oder τ_0 , die Korrelationszeit der Fluktuationen. Wie erwähnt schlagen Änderungen in T aber aufgrund des sehr kleinen Exponenten β , mit dem T in alle relevanten Formeln (z.B. Gl. 5.1) eingeht, kaum zu Buche. Es ist deshalb plausibel, daß die aus der *Deuterierung* des Lösungsmittels resultierenden Beobachtungen ausschließlich auf eine *Änderung der Korrelationszeit für die Fluktuationen* τ_0 zurückgehen; eine Auswertung der Daten ergibt etwa eine Vervierfachung von τ_0 als Folge der Deuterierung. Die Folge der längeren Korrelationszeit ist die geringere spektrale Diffusion, die in der deuterierten Probe beobachtet wird.

Eine Aussage zu treffen, welche mikroskopischen Vorgänge für diese Änderung in τ_0 verantwortlich sind, ist natürlich bis zu einem gewissen Grad Spekulation. Da

die deuterierte Myoglobin-Probe vor dem Einfrieren aber einige Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, kann man von einem weitgehenden Austausch der proteininternen Protonen gegen die Deuteronen des Lösungsmittels ausgehen. Der interessanteste Effekt eines solchen Austausches (bei tiefen Temperaturen) besteht in der Verringerung der Raten, mit denen Tunnelübergänge von Wasserstoffatomen stattfinden; der Grund hierfür sind die höheren Tunnelmassen der Deuteronen. Auch die im Experiment beobachtete Verlangsamung der spektralen Diffusion könnte ihre Ursache letztlich darin haben. Einen wichtigen Beitrag zur Stabilität eines Proteins liefern ja die Wasserstoffbrücken innerhalb des Moleküls; dynamische Prozesse erfordern es wahrscheinlich, solche Wasserstoffbrücken kurzzeitig zu lösen und (evtl. an einer etwas anderen Stelle) wieder zu schließen. Bei tiefen Temperaturen sind an einem solchen Vorgang sicherlich Tunnelübergänge von Protonen beteiligt. Die Deuterierung kann daher – aufgrund der kleineren Tunnelraten – für eine Verlangsamung in der Dynamik des gesamten Proteins verantwortlich sein. Durch die schon angesprochene Wechselwirkung zwischen der (im Experiment ja direkt untersuchten) Nahumgebung des Chromophors und dem restlichen Protein resultiert daraus dann auch eine Verlangsamung der spektralen Diffusion.

Klarere Schlußfolgerungen lassen hingegen die Ergebnisse in Abb. 6.7 zu. Die dort aufgetragenen Flächen der spektralen Löcher sind ein Maß dafür, wieviele Moleküle sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in dem (durch das Lochbrennen bevölkerten) Photoproduktzustand befinden. Ein Abnahme der Lochfläche im Lauf der Zeit spiegelt also die Rückkehr der Proteinchromophore aus dem Photoproduktzustand wider. Der zeitliche Verlauf dieser Rückreaktion wird stark durch die Deuterierung beeinträchtigt, die Rückreaktion verläuft in der protonierten Probe deutlich schneller. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, daß die Photoreaktion einen *lichtinduzierten Protonentransfer* beinhaltet. Ein mögliches Reaktionsschema ist in Kap. 2.2.2 bereits vorgestellt worden. Die Rückreaktion des am Transfer beteiligten Protons geschieht wahrscheinlich durch einen Tunnelprozeß und reagiert deshalb sehr sensitiv auf Deuterierung.

Interessant ist auch die (annähernd) logarithmische Zeitabhängigkeit der Lochauffüllung, die in Abb. 6.7 zu beobachten ist. Diese läßt sich interpretieren als Folge einer *breiten Verteilung von Reaktionsraten* in verschiedenen Proteinen; das nichtexponentielle Verhalten ist in dieser Sichtweise also keine Eigenschaft eines Einzelmoleküls, sondern ein Ensembleeffekt. Unterschiedliche Reaktionsraten resultieren aus verschiedenen hohen Tunnelbarrieren in den einzelnen Molekülen; diese wiederum sind eine Folge der für Proteine typischen Unordnungseigenschaften: Beim Lochbrennen werden Moleküle in unterschiedlichen strukturellen Unterzuständen (CS) ausgewählt, die lediglich die gleiche Absorptionsfrequenz des Chromophors aufweisen. Die (kleinen) strukturellen Unterschiede in den einzelnen Proteinen führen dann zu den unterschiedlichen Energiebarrieren. Eine völlig analoge Beobachtung wurde in den CO-Rückbindungs-Experimenten an Myoglobin gemacht, die bereits mehrfach angesprochen wurden. Auch dort stellte man aufgrund einer breiten Verteilung von Barrierenhöhen einen stark nichtexponen-

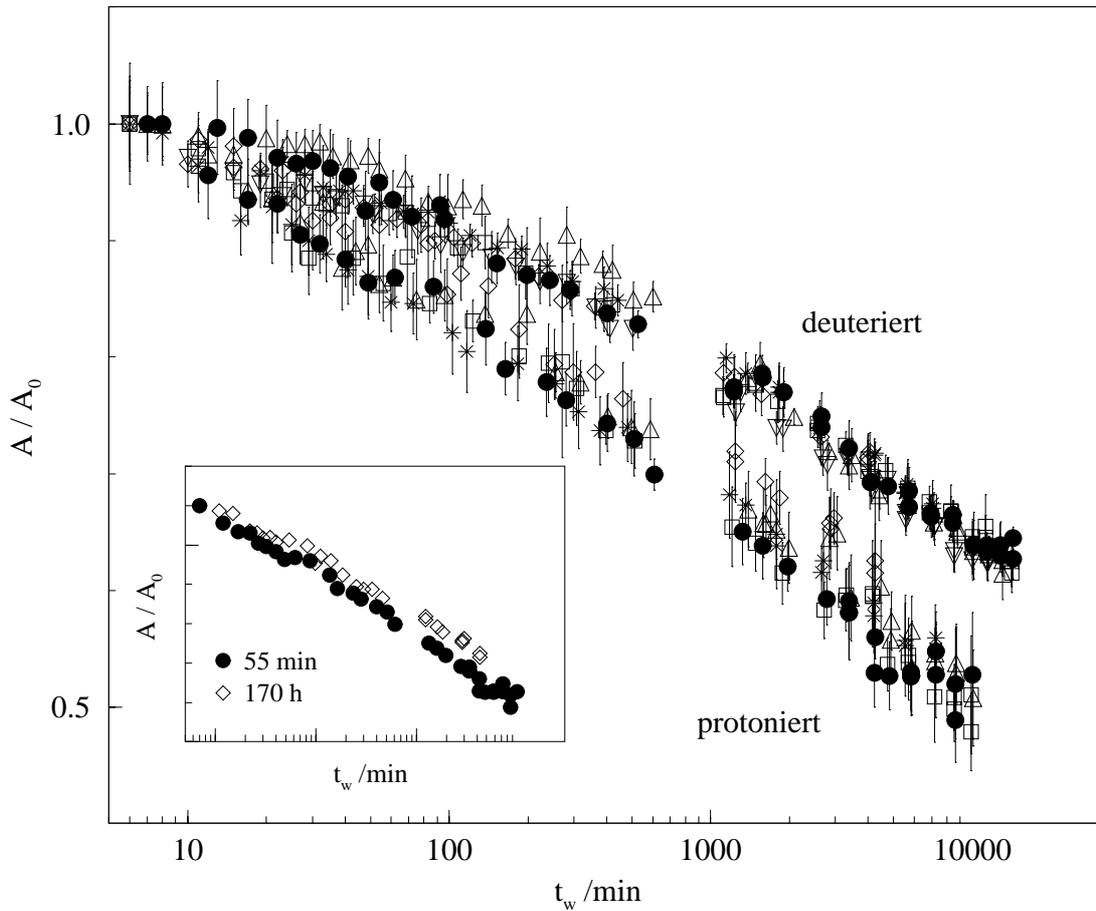


Abbildung 6.7: Abnahme der Lochfläche A als Funktion der Wartezeit. Die verschiedenen Symbole entsprechen unterschiedlichen Alterungszeiten. Der Einschub zeigt das Verhalten der spektralen Löcher mit der kürzesten (volle Symbole) bzw. längsten Alterungszeit (offene Symbole) in der protonierten Probe.

tiellen Verlauf der Rückbindungsreaktion fest.

Einen logarithmischen Verlauf einer Reaktion erhält man immer, wenn die experimentellen Zeitskalen t im Zeitfenster der auftretenden Tunnelraten liegen (Friedrich und Haarer, 1986):

$$\frac{1}{R_{max}} < t < \frac{1}{R_{min}} \quad (6.1)$$

(R_{max} und R_{min} bezeichnen die schnellste bzw. langsamste Reaktionsrate, die in der Verteilung vorkommt.) Im Falle der protonierten Myoglobinprobe ist dieses Zeitfenster offensichtlich schon nach einer Zeit erreicht, die kürzer ist als alle im Experiment interessanten Zeitskalen; man beobachtet deshalb von Anfang an logarithmisches Verhalten. Bei der deuterierten Probe ist R_{max} dagegen kleiner, das Zeitfenster aus Gl.6.1 wird deshalb erst nach einer (nichtlogarithmischen) Anfangsphase erreicht.

In den CO-Rückbindungsexperimenten wurde neben einem nichtexponentiellen

Verhalten der Reaktion auch eine Änderung der Barrierenhöhen mit der Zeit beobachtet; Grund dafür waren die in Proteinen stattfindenden Relaxationsprozesse. Diese sind, wie in den vorigen Kapiteln geschildert, auch für die in der spektralen Diffusion beobachteten Alterungsphänomene verantwortlich. Die Rückreaktion des lichtinduzierten Protonentransfers in obigen Experimenten wird ebenfalls von diesen Relaxationen beeinflusst, man beobachtet im Fall der protonierten Probe eine kleine, aber signifikante Abhängigkeit der Lochauffüllung von der Alterungszeit (siehe Einschub in Abb. 6.7). Dies ist durch die Relaxationsprozesse im Protein leicht zu verstehen: Durch die Annäherung des Proteins an seine optimale Struktur wachsen die Barrierenhöhen, die Tunnelprozesse und somit die Lochauffüllung werden langsamer. Daß ein solches Verhalten in der deuterierten Probe nicht beobachtet werden kann, liegt vermutlich daran, daß dort die Relaxationsprozesse zu langsam verlaufen. (Dies würde in anderen Worten bedeuten, daß die Zeitkonstante T der Relaxationsprozesse in der deuterierten Probe größer ist als in der protonierten. Wegen des kleinen Exponenten β , mit dem T in allen relevanten Gesetzen auftritt, ist dies in den Diffusionsexperimenten aber nicht feststellbar.)

6.2 Meerrettichperoxidase in deuterierter Lösung

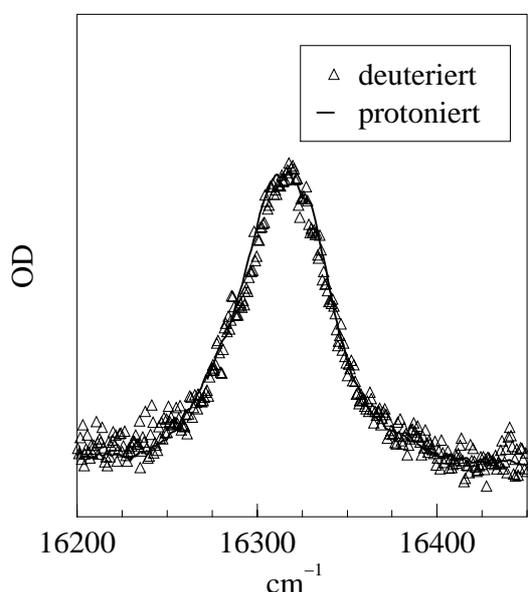


Abbildung 6.8: Langwellige Absorptionsbande von HRP in deuterierter und protonierter Trehalose-Lösung. Temperatur: 4.2 K.

Der Einfluß eines deuterierten Lösungsmittels auf die Proteindynamik wurde auch am Beispiel der Meerrettichperoxidase (>HRP<) untersucht. Hierbei fand wieder eine Probe Verwendung, in der das Protein in einem Trehalose/Wasser/Glycerin-Gemisch gelöst war; allerdings enthielt die Mischung diesmal *deutertes* Wasser, im Gegensatz zu den in Kap. 5.1 vorgestellten Messungen in einer identischen

protonierten Lösung. (Details zur Zubereitung der Probe finden sich wieder in Kap. 2.2.2.)

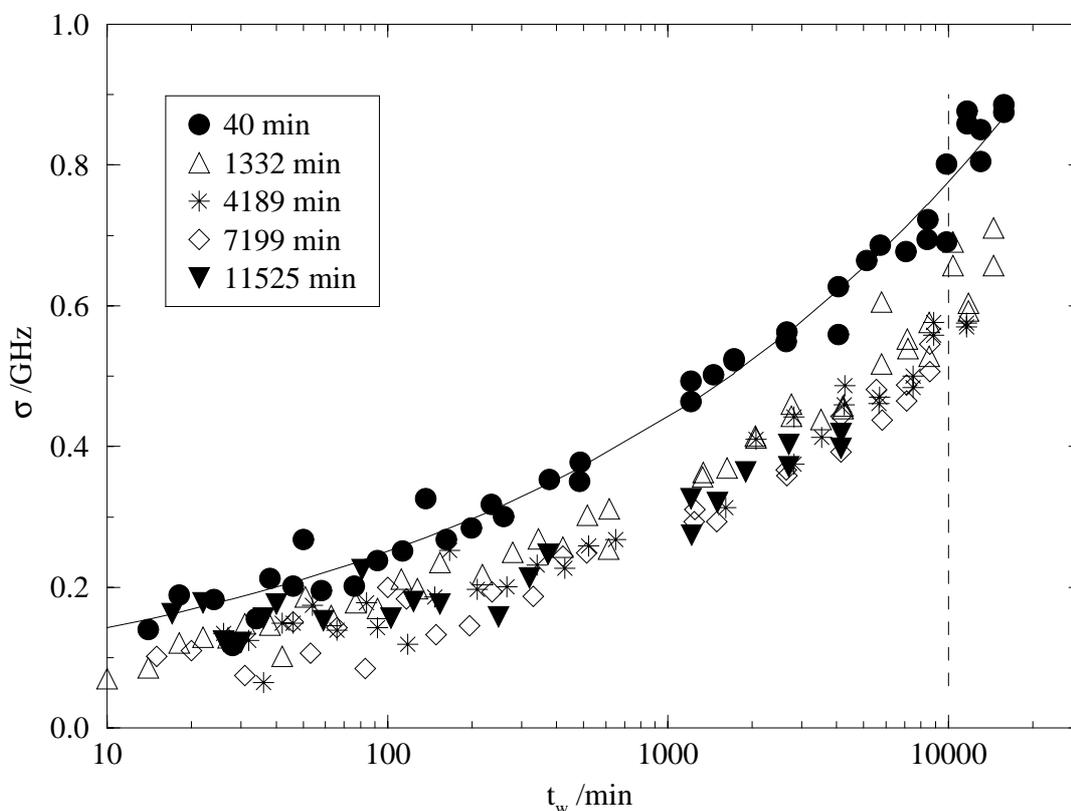


Abbildung 6.9: Spektrale Diffusion in HRP in einer deuterierten Trehalose-Lösung für verschiedene Alterungszeiten. Die Datensätze lassen sich wieder gut durch ein Potenzgesetz in der Wartezeit anpassen (durchgezogene Linie).

Die Durchführung dieses Experiments wie auch seine Ergebnisse befinden sich in völliger Übereinstimmung mit den gerade besprochenen Myoglobinmessungen, so daß auf die experimentellen Beobachtungen nur in aller Kürze eingegangen werden soll:

- ▷ Auch in diesem Experiment hat die Deuterierung keinerlei Einfluß auf die Breite der inhomogenen Linie (siehe Abb. 6.8). Die Breite der Absorptionsbande läßt sich wieder ausgezeichnet durch eine Gaußkurve mit der Breite 60 cm^{-1} (FWHM) fitten.
- ▷ Die spektrale Diffusion gehorcht wieder einem Potenzgesetz in der Wartezeit (durchgezogene Linie in Abb. 6.9). Der Exponent $\alpha/2$ beträgt auch diesmal 0.25 ± 0.02 , genau wie bei allen anderen Experimenten an HRP in dieser Arbeit.

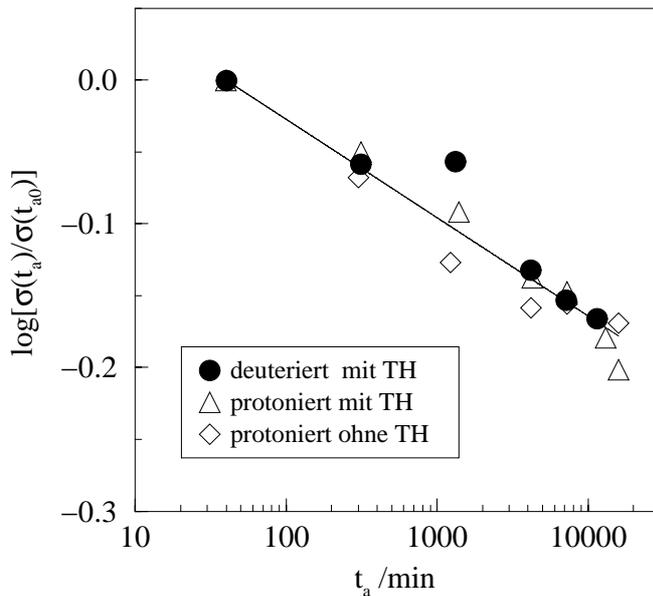


Abbildung 6.10: *Alterungsverhalten von HRP in deuterierter und protonierter Trehalose-Lösung, sowie in Trehalose-freier Lösung. Alle drei Datensätze lassen sich durch das gleiche Potenzgesetz in der Alterungszeit fitten. Exponent $\beta \approx 0.07$. (Zum Vergleich wurden alle Daten auf ihren jeweiligen Anfangswert normiert.)*

- ▷ Für längere Alterungszeiten zeigt die spektrale Diffusion auch in der deuterierten Probe ein (beinahe) stationäres Verhalten.
- ▷ Für die Alterungsdynamik findet man wieder ein Potenzgesetz in t_a (siehe Abb.6.10). Der Exponent $\beta \approx 0.07$ ist derselbe, der bereits in den Experimenten an HRP in protonierten Lösungsmitteln gefunden wurde.
- ▷ Auch für die Daten der deuterierten Probe ist es wieder möglich, einen Masterplot (durch Skalierung der Ergebnisse mit ihrer Abhängigkeit von der Alterungszeit) zu erhalten (siehe Abb.6.11). Der Masterplot der deuterierten Probe ist im Vergleich zu dem der entsprechenden protonierten Probe nach unten versetzt, fällt aber praktisch zusammen mit dem, der für HRP in einer protonierten, Trehalose-freien Lösung gefunden wurde. Wieder hat die Deuterierung also nur Auswirkungen auf den Achsenabschnitt in einer doppelt-logarithmischen Darstellung, jedoch nicht auf die Steigung.
- ▷ Die (quasi)homogenen Linienbreiten in der deuterierten bzw. protonierten Probe zeigen wieder ein analoges Verhalten wie die Masterplots (siehe Abb.6.12), die Deuterierung führt wieder zu einer Verminderung der homogenen Linienbreite. Wie schon in den vorigen Kapiteln wird das als Beleg dafür gedeutet, daß die homogene Linienbreite im Wesentlichen durch spektrale Diffusion dominiert ist. Auch in diesem Experiment wurden die Linienbreitenmessungen mit unterschiedlichen Laserintensitäten durchgeführt, um eine eventuelle Leistungsverbreiterung auszuschließen.

Die Ergebnisse des Experimentes an HRP in einer deuterierten Lösung lassen sich also ebenfalls erfreulich gut im Rahmen des Diffusionsmodells deuten; man beobachtet ein Verhalten, das sich in völliger Übereinstimmung mit allen anderen

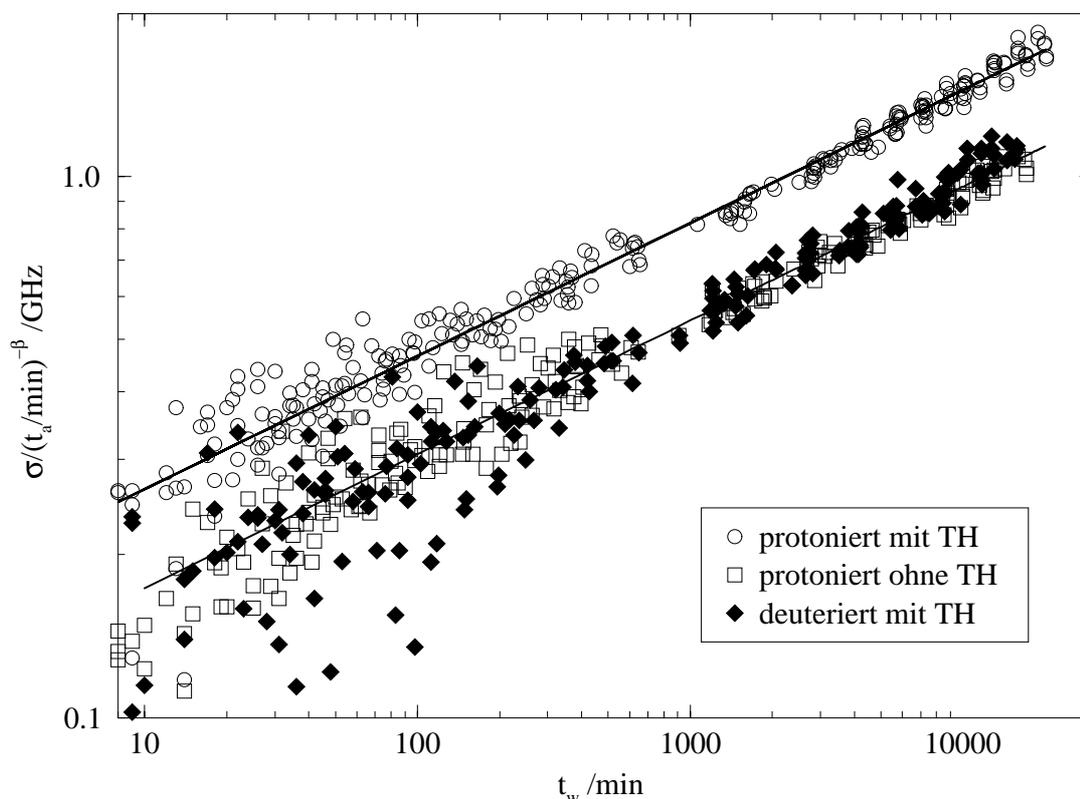


Abbildung 6.11: Masterplots für HRP in deuterierter und protonierter Trehalose-Lösung sowie in protonierter Trehalose-freier Lösung. Alle drei Datensätze gehorchen dem gleichen Potenzgesetz in der Wartezeit mit einem Exponenten $\alpha/2 \approx 0.25$.

Messungen an Proteinen in dieser Arbeit befindet. Auffälligstes Ergebnis ist natürlich wiederum das Potenzgesetz in der Wartezeit, dem die spektrale Diffusion gehorcht. Wie in den vorigen Kapiteln kann dieses als Folge der anomalen Diffusion im Konformationsraum der Proteine gedeutet werden. Weiterhin läßt sich auch das beobachtete Alterungsverhalten wieder auf den Einfluß der Proteinrelaxation zurückführen. Die *Auswirkungen der Deuterierung* auf die Parameter des Diffusionsmodells bestehen – genau wie im Fall des Myoglobins – ausschließlich in einer *Zunahme der Korrelationszeit* τ_0 , die den Fluktuationsanteil an der Proteindynamik beschreibt, da ja die beiden Exponenten $\alpha/2$ und β der Potenzgesetze unverändert bleiben.²

Interessant ist die Beobachtung, daß die spektrale Diffusion in der deuterierten Trehalose-Probe praktisch übereinstimmt mit der, die für HRP in einem protonierten, aber Trehalose-freien Glas gefunden wurde: In beiden Lösungen findet man vergleichbare Korrelationszeiten τ_0 für die Frequenz- bzw. Konforma-

²Wie im vorigen Kapitel schon erwähnt, kann ein Einfluß der Deuterierung auf die Zeitkonstante der Proteinrelaxation T nicht ausgeschlossen werden; allerdings resultiert daraus aufgrund des kleinen Exponenten β kein signifikanter Unterschied in den Messungen.

tionsfluktuationen. Wie ist das zu erklären? Man erwartet natürlich für Meerrettichperoxidase ähnliche Auswirkungen der Deuterierung wie sie auch in den oben geschilderten Experimenten an Myoglobin beobachtet wurden, nämlich eine deutliche Verlangsamung der spektralen Diffusion. In den Myoglobinexperimenten wurde für diese Phänomen eine geringere Beweglichkeit der Wasserstoffbrücken innerhalb des Proteins verantwortlich gemacht, die wiederum aus den geringeren Tunnelraten der (deuterierten) Wasserstoffe resultierte. Eine Verlangsamung der spektralen Diffusion wird nun auch in HRP beobachtet – τ_0 ist ja in der deuterierten Probe deutlich länger als in der entsprechenden protonierten. Soweit befinden sich die Ergebnisse also in Übereinstimmung mit den Myoglobin-Experimenten.

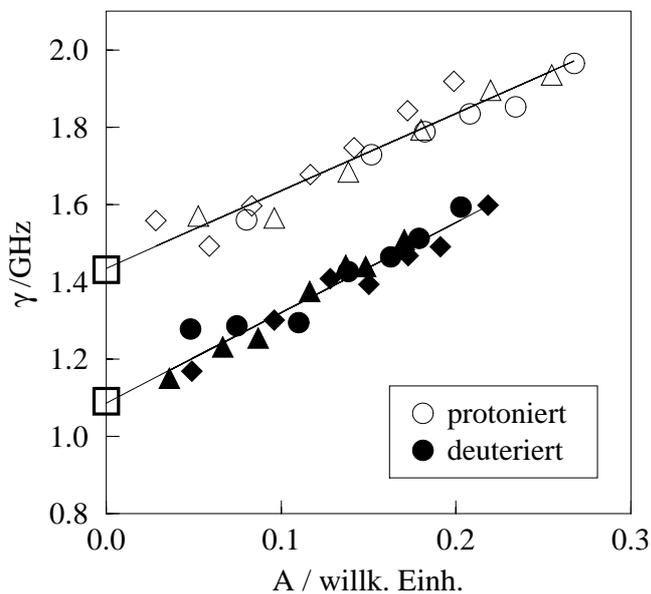


Abbildung 6.12: Bestimmung der (quasi)homogenen Linienbreite von HRP in protonierter und deuterierter Trehalose-Lösung. Temperatur 4.2 K.

Es darf allerdings hierbei nicht unberücksichtigt bleiben, daß die deuterierte HRP-Probe sich in einer Trehalose-Umgebung befindet. Als mögliche Wirkung der Trehalose wurde in Kap. 5.2 ja die Konservierung von internen Wassern in den (eingefrorenen) Proteinen vorgeschlagen. Diese internen Wasser verhindern laut (Sastri und Agmon, 1997) die Ausbildung von direkten Wasserstoffbrücken zwischen Proteingruppen, die zu einer Versteifung des Moleküls führen würden. Die Folge ist eine höhere interne Beweglichkeit des Proteins, wenn es in einer Trehalose-Lösung eingefroren wird, und somit eine Zunahme der spektralen Diffusion. Der Trehalose-Effekt wirkt also den Folgen der Deuterierung gerade entgegen. Dies läßt sich auch in den experimentellen Resultaten an HRP erkennen: Trotz Deuterierung verläuft die spektrale Diffusion in der deuterierten Probe nicht langsamer als die in einer protonierten, aber Trehalose-freien Umgebung. Trehalose-Effekt und Deuterierung scheinen hier also gerade von der gleichen Größenordnung zu sein, ihre Auswirkungen heben sich praktisch gegenseitig auf.

Die experimentellen Befunde an HRP in einer deuterierten Lösung stehen damit

in guter Übereinstimmung mit den Resultaten und Interpretationen der vorigen Kapitel. Im Rahmen des Diffusionsmodells ist es also möglich, alle Ergebnisse dieser Arbeit in einem einheitlichen Bild zu deuten. Darüber hinaus sind physikalisch sinnvolle Mechanismen vorstellbar, die (auf mikroskopischer Ebene) für die Besonderheiten der verschiedenen Messungen verantwortlich gemacht werden können.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Dynamische Vorgänge in Proteinen erfolgen bei tiefen Temperaturen auf winzigen Längenskalen und überaus langsam, die Zeit, die zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes benötigt wird, übersteigt die Dauer jedes Experiments um Größenordnungen – Tieftemperatur-Proteinen sind also nichtergodische Systeme. Alle dynamischen Vorgänge setzen sich deshalb aus zwei Anteilen zusammen: Den Relaxationsprozessen, in denen die Proteine ihrem Gleichgewicht entgegenstreben, und den Fluktuationen, die man sich als Übergänge zwischen unterschiedlichen Gleichgewichtskonfigurationen vorstellen kann. Diese beiden dynamischen Anteile lassen sich – mit Hilfe des spektralen Lochbrennens – in kombinierten Alterungs- bzw. Wartezeitexperimenten unterscheiden: Während die Verbreiterung eines einzelnen spektralen Loches (als Funktion der Wartezeit) sowohl durch Relaxationen als auch durch Fluktuationen bestimmt wird, resultieren die Unterschiede im Verhalten spektraler Löcher, die zu verschiedenen Alterungszeiten gebrannt wurden, ausschließlich aus den Relaxationsprozessen. Experimente zur spektralen Diffusion erlauben es deshalb, Aussagen über die Zeitabhängigkeit beider dynamischer Vorgänge zu machen. Um daraus Informationen über die strukturellen Vorgänge im Protein zu erhalten, ist allerdings eine Modellvorstellung nötig, die Annahmen macht über die Natur der strukturellen Änderungen im Protein sowie über die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Restprotein.

Der übliche Ansatz zur Erklärung von dynamischen Tieftemperaturprozessen war bisher das aus der Theorie der Gläser stammende *Standard-Tunnel-Modell*. Dieses schreibt alle Relaxations- bzw. Fluktuationsprozesse Tunnelübergängen lokalisierter Zwei-Niveau-Systeme zu. Diese Übergänge entsprechen kleinen Ortsänderungen einzelner Atome- oder Atomgruppen, die Kopplung eines Tunnelsystems an einen Chromophor bewirkt eine Änderung in dessen Absorptionsfrequenz. Jedes Tunnelsystem ist durch eine typische Zeitkonstante gekennzeichnet, die Zeitkonstanten verschiedener Tunnelsysteme sind über einen riesigen Bereich verteilt. Spektrales Lochbrennen ist nun ein typisches Ensembleexperiment, die Lochverbreiterung spiegelt also die Frequenzschwankungen einer großen Zahl von Chromophoren wider. Jeder Chromophor hat andere Tunnelsysteme in seiner Nachbarschaft und erfährt deshalb andere Frequenzschwankungen. Spektrale Diffusi-

on ist in diesem Modell daher ein *heterogener* Prozeß. Nimmt man an, daß alle Tunnelsysteme zur Zeit des Lochbrennens im thermischen Gleichgewicht waren, so sagt das Tunnelmodell eine logarithmische Zeitabhängigkeit der Lochverbreiterung vorher. Nichtgleichgewichtsprozesse können in das Modell in einfacher Weise implementiert werden, indem man für die Tunnelsysteme geeignete Besetzungsverteilungen annimmt. Daraus resultierend ergibt sich in der spektralen Diffusion ein zusätzlicher Nichtgleichgewichtsanteil, der durch die Relaxation der Tunnelsysteme in Richtung auf ihre Gleichgewichtsverteilung verursacht wird; auch für diesen Nichtgleichgewichtsanteil findet man eine logarithmische Zeitabhängigkeit. Die spektrale Diffusion sollte deshalb als *Summe zweier logarithmischer Äste* gegeben sein.

Das Standard-Tunnel-Modell ist oft erfolgreich für die Beschreibung der spektralen Diffusion in Gläsern verwendet worden. Auch ein in dieser Arbeit durchgeführtes Experiment an einem *deutერიerten Wasser-Glycerin-Glas*, in geringer Konzentration versetzt mit dem Farbstoff Resorufin, ließ sich ausgezeichnet durch das Tunnelmodell erklären, vorausgesetzt, der Nichtgleichgewichtsanteil der spektralen Diffusion wurde in der oben beschriebenen Weise berücksichtigt. Interessanterweise zeigte ein völlig analoges Experiment an einem *protonierten Wasser-Glycerin-Glas* relativ schlechte Übereinstimmung mit der Theorie.

Es ist klar, daß das Tunnel-Modell eine Tieftemperaturnäherung darstellt, die oberhalb einer gewissen kritischen Temperatur nicht mehr vernünftig ist – die Dynamik erfolgt dann nicht mehr ausschließlich in lokalisierten Zwei-Niveau-Systemen, sondern es werden auch kompliziertere ›Multi-Level-Übergänge‹ möglich. Aus den beiden Diffusionsexperimenten ist abzulesen, daß diese kritische Temperatur in einem protonierten Glas offensichtlich tiefer liegt als in einem deutერიerten. Dies ist aber durchaus nachvollziehbar: Die Zeitkonstanten der protonierten Tunnelsysteme sind (aufgrund der geringeren Tunnelmassen) kleiner, es gibt also mehr Tunnelsysteme, in denen es während der Dauer eines Experiments zu Übergängen kommt, oder anders gesagt: die Dichte der experimentell relevanten Tunnelsysteme ist im protonierten Glas höher als im deutერიerten. Damit steigt aber auch die Wahrscheinlichkeit einer gegenseitigen Wechselwirkung, die z.B. zu einer kurzzeitigen Verformung im Potential eines einzelnen Tunnelsystems führen kann und deshalb gelegentlich auch ›Multi-Level-Übergänge‹ ermöglicht. Die Folge ist eine Zeitabhängigkeit der spektralen Diffusion, die sich nicht mehr durch das Standard-Tunnel-Modell beschreiben läßt. Die Temperatur für den Übergang zur ›Multi-Level-Dynamik‹ scheint im deutერიerten Glas dagegen oberhalb der Temperatur des Experimentes zu liegen; die Ergebnisse dieser Messung können daher noch einwandfrei im Rahmen des Tunnel-Modells interpretiert werden. Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß durch die beiden Experimente Grenzen für die Anwendbarkeit des Tunnel-Modells abgesteckt werden konnten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war allerdings die Untersuchung der spektralen Diffusion in Hämproteinen; diese wurde an verschiedenen Protein/Lösungsmittel-Systemen sowie an protonierten und deutერიerten Proben vermessen. Ein wesent-

liches Ergebnis, das sich in *all diesen Experimenten* ergab, war die Tatsache, daß die spektrale Diffusion in Proteinen – abgesehen von einem kleinen Alterungseffekt – immer einem *Potenzgesetz in der Wartezeit* gehorcht. Auch der Exponent dieses Potenzgesetzes war im Rahmen der Meßgenauigkeit bei allen untersuchten Systemen praktisch identisch: $\alpha/2 \approx 0.25$.

Es ist offensichtlich, daß ein solches Verhalten durch das Tunnelmodell (das ja eine logarithmische Zeitabhängigkeit der spektralen Diffusion fordert) nicht zu erklären ist. Es war deshalb nötig, einen anderen Ansatz, das sog. *Diffusionsmodell* zu entwickeln, um die Meßdaten konsistent interpretieren zu können. Dieses Modell macht *diffusionsartige Prozesse* derjenigen Aminosäure-Residuen eines Proteins, die sich in der Nachbarschaft des Chromophors befinden (*›Light Space‹*), verantwortlich für die gemessenen Lochverbreiterungen. Die Bewegung dieser Residuen ist aber gekoppelt an die Vorgänge im restlichen Protein (*›Dark Space‹*). Den Bewegungen im Light Space werden dadurch Hemmungen auferlegt, die zu Abweichungen von einem *›normalen‹* Diffusionsverhalten (wie beispielsweise dem eines Brownschen Teilchens) führen.¹

Von Berlin und Burin wurde gezeigt (Berlin, 1996; Berlin und Burin, 1997), daß sich ein solcher Sachverhalt theoretisch durch ein *hierarchisches Modell* der im Protein stattfindenden dynamischen Prozesse beschreiben läßt. Man findet dabei, daß die Korrelationsfunktion einer solcherart gehemmten Diffusion die Form einer *gestreckten Exponentialfunktion* hat. Ist die zugehörige Korrelationszeit lang gegen die experimentellen Zeitskalen (was bei Tieftemperaturexperimenten in Proteinen immer der Fall ist), so läßt sich diese Exponentialfunktion in erster Ordnung entwickeln; es ergibt sich dann schließlich ein Potenzgesetz (mit einem Exponenten ungleich 1/2) für die Zeitabhängigkeit des Diffusionsprozesses. Man spricht in diesem Fall von *anomaler Diffusion* im Konformationsraum der Proteine. Die Kopplung zwischen den diffundierenden Aminosäure-Residuen und dem Chromophor führt dazu, daß auch die spektrale Diffusion dem gleichen Potenzgesetz folgt – die experimentellen Daten können durch das Modell also erklärt werden. Im Unterschied zum Standard-Tunnel-Modell ist im Diffusionsbild die spektrale Diffusion somit ein *homogener Prozeß*, das nichtexponentielle Verhalten ist eine generische Eigenschaft jedes einzelnen Proteins, nicht nur Resultat eines Ensemblemittels.

Die (schwachen) Alterungsphänomene, die in den Messungen an allen Proteinen gefunden wurden, lassen sich ebenfalls durch das Wechselspiel von Light Space und Dark Space – also Nahumgebung des Chromophors und Restprotein – erklären. In beiden Räumen treten wie erwähnt Relaxationsprozesse in Richtung auf eine Gleichgewichtskonfiguration auf, d.h. die Struktur eines Proteins wird im Lauf der Zeit immer *›kompakter‹*. Dadurch wird beispielsweise eine Bewegung im Dark Space immer schwieriger, die Hemmungen für die Diffusion im Light Space werden deshalb seltener gelockert, die spektrale Diffusion verlangsamt sich also. Auch für die Alterungsdynamik der Proteine findet man im Experiment eine

¹Anders ausgedrückt findet die Diffusion also in einer zeitabhängigen Energielandschaft statt.

Zeitabhängigkeit gemäß eines Potenzgesetzes.

Ein großer Vorteil des Diffusionsmodelles ist es nun, daß seine Parameter direkt mit den Ergebnissen anderer experimenteller Ansätze (wie z.B. Röntgenbeugungsexperimenten) verglichen werden können. Eine Beschreibung nach dem Tunnel-Modell – sofern dieses geeignet modifiziert werden könnte, um auch das nichtlogarithmische Verhalten der spektralen Diffusion in Proteinen zu erfassen – läßt das dagegen kaum zu; der Grund hierfür ist die noch immer weitgehend ungeklärte Natur der Tunnelsysteme. Das Diffusionsmodell erlaubt es, die Verbreiterung eines spektralen Loches direkt mit den quadratischen Abweichungen $\langle x^2 \rangle$ der Aminosäure-Residuen von ihrer mittleren Position in Verbindung zu bringen. Diese können aber auch in einem Röntgenexperiment vermessen werden. Ein Vergleich der Werte ermöglicht deshalb z.B. die Bestimmung einer Proportionalitätskonstanten f_D , die den Zusammenhang zwischen der Verbreiterung eines spektralen Loches und der mittleren Verschiebung $\langle x^2 \rangle$ der Residuen in der Chromophornachbarschaft charakterisiert. Der so ermittelte Wert für f_D befindet sich in völliger Übereinstimmung mit entsprechenden Resultaten, die man z.B. aus Druckexperimenten ableiten kann – ein starker Beleg für die Gültigkeit des Diffusionsmodells.

Mit Kenntnis der Proportionalitätskonstanten f_D ist man auch in der Lage, die typischen Längenskalen abzuschätzen, auf denen die Diffusionsprozesse der Proteine bei Temperaturen im Kelvinbereich ablaufen – das Diffusionsmodell gestattet es also, wirkliche Strukturinformationen aus den optischen Messungen abzuleiten. Trotz der sehr kleinen Werte, die man für die Bewegungen der Aminosäure-Residuen findet – eine typische Größenordnung ist 10^{-4} Å pro Residuum – lassen sich diese Vorgänge dennoch nachweisen; dies ist natürlich nur aufgrund der hohen Empfindlichkeit des spektralen Lochbrennens möglich.

Interessant sind schließlich auch die typischen Korrelationszeiten der Fluktuationen eines Tieftemperaturproteins; auch diese ergeben sich unmittelbar aus den experimentellen Daten. Man findet dabei riesige Zeitkonstanten, ein zweifelsfreier Beleg für die nichtergodische Natur dieser Moleküle: Ein Protein kann (bei Temperaturen im Kelvinbereich) niemals seinen ganzen Konformationsraum in ›vernünftigen‹ Zeiten absuchen.

Die Gültigkeit des Diffusionsmodelles konnte nun an vielen unterschiedlichen Systemen verifiziert werden: Zunächst wurden Experimente an *Meerrettichperoxidase*² in verschiedenen Glasumgebungen (Wasser-Glycerin bzw. Trehalose-Wasser-Glycerin mit unterschiedlicher Trehalose-Konzentration) durchgeführt. In all diesen Experimenten wurde immer das gleiche Verhalten der spektralen Diffusion gefunden – die Lochverbreiterung gehorchte stets einem Potenzgesetz. Die unterschiedlichen Umgebungen hatten keinerlei Einfluß auf dessen Exponenten, lediglich die Korrelationszeiten der verschiedenen Systeme unterschieden sich. Durch die Trehalose-Experimente konnte auch ein zweifelsfreier Beleg dafür erbracht werden, daß Lochbrennexperimente an Hämproteinen wirklich nur das Verhalten

²Chromophor: Freie-Base-Mesoporphyrin IX

der Proteine und nicht das der Proteinumgebung testen. Eine andere interessante Beobachtung dieser Experimente – die *Zunahme* der spektralen Diffusion in einer Trehalose-Umgebung im Vergleich zu einem Trehalose-freien Glas – befand sich in Übereinstimmung mit Schlußfolgerungen, die Sastry und Agmon aus CO-Rückbindungsexperimenten an Myoglobin gezogen haben (Sastry und Agmon, 1997): Die Wirkung der Trehalose besteht vor allem darin, interne Wassermoleküle am Verlassen der Proteine zu hindern. Diese Wassermoleküle besetzen dann Plätze, an denen sonst proteininterne Wasserstoffbrücken ausgebildet würden, und führen so zu einer höheren inneren Beweglichkeit des Proteins und dadurch auch zu stärkerer spektraler Diffusion.

Auch Messungen an *Myoglobin*³ standen völlig im Einklang mit dem Diffusionsmodell; wiederum folgte die spektrale Diffusion einem Potenzgesetz in der Zeit; dessen Exponent war im Rahmen der experimentellen Genauigkeit identisch mit dem, der bereits in den Experimenten an der Meerrettichperoxidase gefunden worden war. Ein Vergleich mit älteren Meßdaten an Protoporphyrin-IX-Myoglobin zeigte zudem, daß das beobachtete Verhalten der spektralen Diffusion keine Eigenschaft eines speziellen Chromophors ist, sondern allgemeinere Eigenschaften der untersuchten Proteine widerspiegelt.

In den Myoglobin-Experimenten wurde auch die Auswirkung einer weitgehenden *Deuterierung* der Probe auf die spektrale Diffusion untersucht. Wieder beobachtete man keinerlei Änderungen am prinzipiellen Verhalten – die Lochverbreiterung gehorchte weiter dem gleichen Potenzgesetz in der Zeit; allerdings hatte die Deuterierung eine Verlängerung der Korrelationszeiten zur Folge. Eine mögliche mikroskopische Erklärung für diesen Sachverhalt könnte eine veränderte Dynamik der proteininternen Wasserstoffbrücken (verursacht durch verringerte Tunnelraten von Wasserstoffen nach der Deuterierung) sein. Vergleichbare Auswirkungen einer Deuterierung wurden schließlich auch in einem Experiment an Meerrettichperoxidase gefunden.

Ein anderer Aspekt der Deuterierungsexperimente am Myoglobin bestand darin, den Mechanismus aufzuklären, der das Lochbrennen am verwendeten Chromophor (Zink-Phaeophorbid a) ermöglichte. Ein Weg, diese Frage zu untersuchen, bestand in der Vermessung der Zeitabhängigkeit, die sich für die *Flächen* der spektralen Löcher ergab: Die Fläche eines Loches ist proportional zur Zahl der Chromophore, an denen während des Lochbrennes eine Photoreaktion ausgelöst wurde. Nimmt die Lochfläche im Lauf der Zeit ab, so läßt sich daran direkt das Zeitverhalten der Rückreaktion ablesen. Diese war in der deuterierten Probe stark verlangsamt – ein klarer Hinweis auf einen Tunnelprozeß eines Protons bzw. Deuterons. Dieses Ergebnis läßt daher den Schluß zu, daß der entscheidende Schritt in der Photoreaktion am Zink-Phaeophorbid a mit einem Protonentransfer verbunden ist. Interessanterweise zeigte die Rückreaktion in der protonierten Myoglobin-Probe auch eine (schwache) Alterungsdynamik; diese kann gut durch die im Laufe der Zeit stattfindenden Relaxationen des Proteins erklärt werden,

³Chromophor: Zink-Phaeophorbid a

die höhere Energiebarrieren für die Rückreaktion und damit kleinere Reaktionsraten zur Folge haben.

Abschließend läßt sich also feststellen, daß in einer ganzen Reihe von Experimenten an verschiedenen Protein-Systemen übereinstimmendes Verhalten gefunden wurde, das sich im Rahmen des Diffusionsmodells einheitlich deuten ließ. Das Modell scheint daher den geeigneten Ansatz zur Interpretation von Diffusionsexperimenten zumindest an Hämproteinen darzustellen. Interessant ist die (vielleicht in zukünftigen Messungen zu klärende) Frage, inwieweit den Aussagen des Modells universeller Charakter zukommt; speziell der Exponent des Potenzgesetzes in der Wartezeit hatte ja in allen Experimenten einen praktisch identischen Wert. Eine weitere interessante Fragestellung für zukünftige Arbeiten ist die Anwendbarkeit des Modells auf Messungen bei höheren Temperaturen. Im Gegensatz zu den Aussagen des TLS-Bildes gibt es ja keinen prinzipiellen Grund, warum das Diffusionsmodell nicht über einen weiten Temperaturbereich Gültigkeit haben sollte.

Anhang A

Nichtstationäre Gauß-Prozesse

Die Gaußsche Näherung eines *nichtstationären* stochastischen Prozesses wird in der Literatur selten behandelt; da sie für die Formulierung des Diffusionsbildes in Kap. 4.2.1 aber von großer Bedeutung ist, sollen die nötigen Überlegungen hier kurz skizziert werden.

In einem Ensemble von Chromoproteinen mißt man eine breite Verteilung der Absorptionsfrequenzen. $P(\nu)$ bezeichnet den Bruchteil der Proteine, die die Absorptionsfrequenz ν haben. Ist die Linienbreite eines einzelnen Proteins klein gegen die Breite der Verteilung $P(\nu)$, so spricht man von einem inhomogen verbreiterten Spektrum; dessen Profil wird dann gerade durch $P(\nu)$ beschrieben.

Kommt es im Proteinensemble zu Frequenzfluktuationen, also zu spektraler Diffusion, so kann im Prinzip auch das inhomogene Profil einer zeitlichen Änderung unterworfen sein. Dieses muß im allgemeinsten Fall also geschrieben werden als $P(\nu, t)$; mathematisch gesprochen handelt es sich dabei um eine zeitabhängige *einzeitige Wahrscheinlichkeit*.

Ein Lochbrennexperiment wählt (im Prinzip, siehe Kap. 2.1.2) zu einem Zeitpunkt t_0 ein Subensemble von Proteinen aus, die in diesem Augenblick alle die gleiche Absorptionsfrequenz ν_0 haben. Im Lauf der Zeit driften die Frequenzen dieser Proteine aber auseinander, analog dazu beobachtet man die Verbreiterung spektraler Löcher. Zu einer späteren Zeit t_1 wird die so entstandene Frequenzverteilung des Subensembles deshalb beschrieben durch die *bedingte Wahrscheinlichkeit* $P(\nu_1, t_1 | \nu_0, t_0)$, ein Molekül mit der Absorptionsfrequenz ν_1 zu finden, unter der Voraussetzung, daß es zur Zeit t_0 die Frequenz ν_0 hatte.

Damit kann jetzt auch die *zweizeitige Wahrscheinlichkeit* $P(\nu_1, t_1; \nu_0, t_0)$ definiert werden, die angibt, wie wahrscheinlich es ist, zur Zeit t_0 ein Protein mit der Absorptionsfrequenz ν_0 zu finden und zur Zeit t_1 eines mit der Frequenz ν_1 :

$$P(\nu_1, t_1; \nu_0, t_0) = P(\nu_1, t_1 | \nu_0, t_0) P(\nu_0, t_0) \quad (\text{A.1})$$

Ansatzpunkt für die Gaußsche Näherung sind nun die sog. *charakteristischen Funktionen*, die als Fouriertransformierte der n-zeitigen Wahrscheinlichkeitsver-

teilungen ($n = 1, 2 \dots$) definiert sind:

$$\phi(\dots; s_1, t_1; s_0, t_0) = \frac{1}{(2\pi)^{n/2}} \int_{-\infty}^{\infty} \dots d\nu_1 d\nu_0 P(\dots; \nu_1, t_1; \nu_0, t_0) e^{-i \sum_k \nu_k s_k} \quad (\text{A.2})$$

Idee der Gaußschen Näherung ist es, für diese charakteristischen Funktion einen Näherungsausdruck zu finden und (durch inverse Fouriertransformation) auf diesem Weg auch eine Näherung für die Wahrscheinlichkeiten selbst herzuleiten. Um dieses Ziel zu erreichen wird zunächst der *Logarithmus* von $\phi(\dots)$ in einer Taylor-Reihe entwickelt; für eine zweizeitige charakteristische Funktion erhält man dann z.B. (Gardiner, 1985):

$$\ln \phi(s_1, t_1; s_0, t_0) = \sum_{r=1}^{\infty} i^r \sum_{(m)} \langle \langle \nu_0^{m_0} \nu_1^{m_1} \rangle \rangle \frac{s_0^{m_0} s_1^{m_1}}{m_0! m_1!} \delta \left(r, \sum_{i=1}^r m_i \right) \quad (\text{A.3})$$

(Meist zeigt der Logarithmus einer Funktion einen ›glatteren‹ Verlauf als die Funktion selbst, es ist also für ihn eher möglich, seine Taylorreihe nach wenigen Gliedern abzurechnen. Aus diesem Grund ist in Gl. A.3 $\ln \phi(\dots)$ und nicht $\phi(\dots)$ selbst entwickelt worden.) Die Entwicklungskoeffizienten $\langle \langle \nu_0^{m_0} \nu_1^{m_1} \rangle \rangle$ werden als *Kumulanten* bezeichnet. Man kann zeigen, daß die Kumulanten niedriger Ordnung einfachen stochastischen Größen entsprechen (Gardiner, 1985), nämlich:

$$\langle \langle \nu_i \rangle \rangle = \bar{\nu}_i \equiv \int d\nu P(\nu, t_i) \nu \quad (\text{A.4})$$

$$\langle \langle \nu_i^2 \rangle \rangle = \sigma_i^2 \equiv \int d\nu P(\nu, t_i) (\nu - \bar{\nu})^2 \quad (\text{A.5})$$

$$\langle \langle \nu_0 \nu_1 \rangle \rangle = \langle \langle \nu_1 \nu_0 \rangle \rangle = C(t_1, t_0) \sigma_0^2 \quad (\text{A.6})$$

(Hierbei gilt jeweils $i = 0, 1$) Die Kumulanten erster Ordnung (Gl. A.4) entsprechen also gerade dem Mittelwert der Absorptionsfrequenz zur Zeit t_i ; ist die inhomogene Absorptionsbande symmetrisch, so fällt dieser Mittelwert zusammen mit dem *Zentrum der Bande*.

Die Kumulanten in Gl. A.5 enthalten ebenfalls Informationen über die inhomogene Bande; sie beschreiben die Streuung der Absorptionsfrequenzen um ihren Mittelwert, also die *Breite der Bande* zur Zeit t_i .¹

Der Kumulant in Gl. A.6 schließlich entspricht (bis auf eine Normierung) der *Frequenzkorrelationsfunktion* $C(t_1, t_0)$. Diese beschreibt die ›mittlere Erinnerung‹ der Absorptionsfrequenz eines Proteins zur Zeit t_1 an die Frequenz, die es zur Zeit t_0 innehatte. Wie in Kap. 4.2.1 erläutert ist die Frequenzkorrelationsfunktion von zentraler Bedeutung für jedes Experiment zur spektralen Diffusion.

Der wesentliche Schritt der Gaußschen Näherung besteht nun darin, die Kumulantenentwicklung in Gl. A.3 nach der zweiten Ordnung abzurechnen. Man leitet

¹Genau genommen geben sie das Quadrat der Varianz in ν an.

dann (mit den obigen Beziehungen für die Kumulanten) folgenden Ausdruck für die zweizeitige charakteristische Funktion her:

$$\begin{aligned} \phi(s_1, t_1; s_0, t_0) &\approx \exp[i(\bar{\nu}_0 s_0 + \bar{\nu}_1 s_1)] \\ &\times \exp\left[-\frac{1}{2} \left(\sigma_0^2 s_0^2 + \sigma_1^2 s_1^2 + 2\sigma_0^2 C(t_0, t_1) s_0 s_1 \right)\right] \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

Hieraus läßt sich (durch inverse Fouriertransformation) die zweizeitige Wahrscheinlichkeit $P(v_1, t_1; v_0, t_0)$ in Gaußscher Näherung gewinnen. Ein völlig analoges Vorgehen ist auch für die einzeitige Wahrscheinlichkeit $P(\nu, t_0)$ möglich. Aus beiden zusammen ergibt sich schließlich nach Gl. A.1 für die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(v_1, t_1|v_0, t_0)$:

$$P(v_1, t_1|v_0, t_0) \approx \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2(t_1, t_0)}} \exp\left[-\frac{((\nu_1 - \bar{\nu}_1) - C(t_1, t_0)(\nu_0 - \bar{\nu}_0))^2}{2\sigma^2(t_1, t_0)}\right] \quad (\text{A.8})$$

Dabei wurde abkürzend geschrieben:

$$\sigma^2(t_1, t_0) \equiv \sigma_1^2 - \sigma_0^2 C(t_1, t_0) \quad (\text{A.9})$$

A.8 ist ein *allgemein gültiger* Ausdruck für die (zweizeitige) bedingte Wahrscheinlichkeit eines nichtstationären stochastischen Prozesses in Gaußscher Näherung. Angewendet auf die in den vorigen Kapiteln geschilderten Experimente lassen sich jedoch noch einige Vereinfachungen vornehmen. Wie bereits erwähnt, konnte in dieser Arbeit niemals eine Änderung der inhomogenen Absorptionsbande im Verlauf eines Experimentes festgestellt werden. Das Zentrum $\bar{\nu}$ und die Breite σ der Bande sind also *zeitunabhängige* Größen:

$$\bar{\nu}_1 = \bar{\nu}_0 \equiv 0 \quad \sigma_1^2 = \sigma_0^2 \quad (\text{A.10})$$

(Hierbei wurde außerdem das Zentrum der inhomogenen Bande als Nullpunkt der Frequenzskala gewählt.) Gl. A.8 vereinfacht sich unter diesen Voraussetzungen zu

$$P(v_1, t_1|v_0, t_0) \approx \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2(t_1, t_0)}} \exp\left[-\frac{(\nu_1 - C(t_1, t_0)\nu_0)^2}{2\sigma^2(t_1, t_0)}\right], \quad (\text{A.11})$$

wobei jetzt gilt: $\sigma^2(t_1, t_0) = \sigma_0^2[1 - C(t_1, t_0)]$. Mit der Annahme einer *zeitlich konstanten* inhomogenen Bande ergibt sich die Zeitabhängigkeit der bedingten Wahrscheinlichkeit – also des spektralen Diffusionskerns – somit ausschließlich aus der Korrelationsfunktion $C(t_1, t_0)$.

Eine letzte Vereinfachung ist schließlich noch möglich, wenn der untersuchte stochastische Prozeß *stationär* ist. In einem Lochbrennexperiment hängt dann die Lochverbreiterung nur noch ab von der Zeitspanne zwischen Brennen und Scannen des Loches, der genaue Zeitpunkt, zu dem das Loch gebrannt wurde, ist aber irrelevant. Mathematisch bedeutet das:

$$P(v_1, t_1|v_0, t_0) = P(v_1, t_1 - t_0|v_0, 0) \quad (\text{A.12})$$

Auch die Frequenzkorrelationsfunktion hängt dann nur noch von der Zeitdifferenz $t \equiv t_1 - t_0$ ab; in Gl. A.11 gilt deshalb:

$$C(t_1, t_0) = C(t_1 - t_0) = C(t) \quad \Longrightarrow \quad \sigma^2(t) = \sigma_0^2 [1 - C^2(t)] \quad (\text{A.13})$$

In dieser Näherung ist der spektrale Diffusionskern bzw. die Korrelationsfunktion in Kap. 4.2.1 eingeführt worden.²

Der Vollständigkeit halber soll schließlich auch noch die einzeitige Wahrscheinlichkeit in Gaußscher Näherung angegeben werden; diese ist nach nach obigen Annahmen nicht mehr zeitabhängig und hat die einfache Gestalt:

$$P(v) \approx \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_0^2}} \exp \left[-\frac{v^2}{2\sigma_0^2} \right] \quad (\text{A.14})$$

²Allerdings wurden dort die mehr dem Experiment angemessenen Bezeichnungen $t_a = t_0$ sowie $t_w = t_1 - t_0$ verwendet.

Literaturverzeichnis

- P. W. Anderson, B. I. Halperin, und C. M. Varma, Anomalous low-temperature thermal properties of glasses and spin glasses, *Philos. Mag.*, 25:1–9, 1972.
- C. A. Angell, Formation of glasses from liquids and biopolymers, *Science*, 267:1924–1935, 1995.
- A. Ansari, Mean first passage time solution of the Smoluchowski equation: Application to relaxation dynamics in myoglobin, *J. Chem. Phys.*, 112:2516–2522, 2000.
- A. Ansari, J. Berendzen, S. F. Browne, H. Frauenfelder, I. E. T. Iben, T. B. Sauke, E. Shyamsunder, und R. D. Young, Protein states and proteinquakes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:5000–5004, 1985.
- R. H. Austin, K. W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, und I. C. Gunsalus, Dynamics of ligand binding in myoglobin, *Biochemistry*, 14:5355–5373, 1975.
- Y. A. Berlin, Irreversible random transition theory as applied to rate processes in condensed media: Transient effects of constrained configuration rearrangements in complex systems, *Chem. Phys.*, 212:29–39, 1996.
- Y. A. Berlin und A. L. Burin, Hierarchically constrained dynamics of the configurational coordinate for rate processes in complex systems, *Chem. Phys. Lett.*, 267:234–243, 1997.
- J. L. Black und B. I. Halperin, Spectral diffusion, phonon echoes, and saturation recovery in glasses at low temperatures, *Phys. Rev. B*, 16:2879–2895, 1977.
- N. Bloembergen, E. M. Purcell, und R. V. Pound, Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption, *Phys. Rev.*, 71:679–712, 1948.
- W. Breinl, J. Friedrich, und D. Haarer, Spectral diffusion of a photochemical proton transfer system in an amorphous organic host: Quinizarin in alcohol glass, *J. Chem. Phys.*, 81:3915–3921, 1984.
- W. Breinl, J. Friedrich, und D. Haarer, Linewidth study of the dye molecule quinizarin in solid alcohol glasses, *Phys. Rev. B*, 34:7271–7277, 1986.

- A. Burin und Y. Kagan, Low-energy collective excitations in glasses. New relaxation mechanism for ultralow temperatures, *JETP*, 80:761–768, 1995.
- J. Crowe, J. Carpenter, und L. Crowe, The role of vitrification in anhydrobiosis, *Annu. Rev. Physiol.*, 60:73–103, 1998.
- J. Crowe, S. Leslie, und L. Crowe, Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying?, *Cryobiol.*, 31:355–366, 1994.
- D. Dab, A. Heuer, und R. J. Silbey, Low temperature properties of glasses: A preliminary study of double well potentials microscopic structure, *J. Lumin.*, 64:95–100, 1995.
- W. Demtröder, Laser spectroscopy. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, zweite Auflage, 1996.
- C. M. Dobson, A. Sali, und M. Karplus, Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht, *Angew. Chem.*, 110:909–935, 1998.
- W. Doster, S. Cusack, und W. Petry, Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering, *Nature*, 337:396–399, 1989.
- W. Doster, S. Cusack, und W. Petry, Dynamic instability of liquidlike motions in a globular protein observed by inelastic neutron scattering, *Phys. Rev. Lett.*, 65:1080–1083, 1990.
- J. Fidy, J. M. Vanderkooi, J. Zollfrank, und J. Friedrich, More than two pyrrole tautomers of mesoporphyrin stabilized by a protein, *Biophys. J.*, 61:381–391, 1992.
- H. Frauenfelder, From atoms to biomolecules, *Helv. Phys. Acta*, 57:165–187, 1984.
- H. Frauenfelder, Complexity in proteins, *Nat. Struct. Biol.*, 2:821–823, 1995.
- H. Frauenfelder und D. T. Leeson, The energy landscape in non-biological and biological molecules, *Nat. Struct. Biol.*, 5:757–759, 1998.
- H. Frauenfelder und B. H. McMahon, Energy landscape and fluctuations in proteins, *Ann. Phys.*, 9:655–667, 2000.
- H. Frauenfelder, F. Parak, und R. D. Young, Conformational substates in proteins, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17:451–479, 1988.
- H. Frauenfelder, G. A. Petsko, und D. Tsernoglou, Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics, *Nature*, 280:558–563, 1979.
- H. Frauenfelder, S. G. Sligar, und P. G. Wolynes, The energy landscape and motions of proteins, *Science*, 254:1598–1603, 1991.

- J. Friedrich, Hole burning spectroscopy and physics of proteins, *Methods in Enzymology*, 246:226–259, 1995.
- J. Friedrich und D. Haarer, Photochemisches Lochbrennen und optische Relaxationsspektroskopie in Polymeren und Gläsern, *Angew. Chem.*, 96:96–123, 1984.
- J. Friedrich und D. Haarer, Structural relaxation processes in polymers and glasses as studied by high resolution optical spectroscopy, *Optical Spectroscopy of Glasses*, 96:149–198, 1986.
- K. Fritsch, Vergleichende Lochbrennexperimente zur spektralen Diffusion in Proteinen und Gläsern — Die Energielandschaft von Proteinen, Dissertation, Technische Universität München, 1997.
- K. Fritsch, J. Friedrich, und B. M. Kharlamov, Nonequilibrium phenomena in spectral diffusion physics of organic glasses, *J. Chem. Phys.*, 105:1798–1806, 1996a.
- K. Fritsch, J. Friedrich, F. Parak, und J. Skinner, Spectral diffusion and the energy landscape of a protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:15141–15145, 1996b.
- J. Gafert, H. Pschierer, und J. Friedrich, Proteins and glasses: A relaxation study in the millikelvin range, *Phys. Rev. Lett.*, 74:3704–3707, 1995.
- M. Gajhede, D. Schuller, A. Henriksen, A. Smith, und T. Poulos, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nature Struct. Biol.*, 4: 1032–1038, 1997.
- C. W. Gardiner, Handbook of stochastic methods. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, zweite Auflage, 1985.
- B. Golding und J. Graebner, Phonon echoes in glass, *Phys. Rev. Lett.*, 37:852–855, 1976.
- B. Golding, J. Graebner, B. Halperin, und R. Schutz, Nonlinear phonon propagation in fused silica below 1 K, *Phys. Rev. Lett.*, 30:223–226, 1973.
- A. A. Gorokhovskii, R. K. Kaarli, und L. A. Rebane, Hole burning in the contour of a pure electronic line in a Shpol'skii system, *JETP Letters*, 20:216–218, 1974.
- D. Gottfried, E. Peterson, A. Sheikh, J. Wang, M. Yang, und J. Friedman, Evidence for damped hemoglobin dynamics in a room temperature trehalose glass, *J. Phys. Chem.*, 100:12034–12042, 1996.
- J. Green und C. Angell, Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly, *J. Phys. Chem.*, 93:2880–2882, 1989.

- S. Hagen, J. Hofrichter, und W. Eaton, Protein reaction kinetics in a room-temperature glass, *Science*, 269:959–962, 1995.
- S. Hagen, J. Hofrichter, und W. Eaton, Geminate rebinding and conformational dynamics of myoglobin embedded in a glass at room temperature, *J. Phys. Chem.*, 100:12008–12021, 1996.
- H. Hartmann, F. Parak, W. Steigemann, G. A. Petsko, D. Ringe Ponzi, und H. Frauenfelder, Conformational substates in a protein: Structure and dynamics of metmyoglobin at 80 K, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4967–4971, 1982.
- A. Heuer und P. Neu, Tunneling dynamics of side chains and defects in proteins, polymer glasses and OH-doped network glasses, *J. Chem. Phys.*, 107:8686–8696, 1997.
- A. Heuer und R. J. Silbey, Microscopic description of tunneling systems in a structural model glas, *Phys. Rev. Lett.*, 70:3911–3914, 1993.
- T. Horie, J. M. Vanderkooi, und K.-G. Paul, Study of the active site of horseradish peroxidase isoenzymes A and C by luminescence, *Biochemistry*, 24:7935–7941, 1985.
- I. E. T. Iben, D. Braunstein, W. Doster, H. Frauenfelder, M. K. Hong, J. B. Johnson, S. Luck, P. Ormos, A. Schulte, P. J. Steinbach, A. H. Xie, und R. D. Young, Glassy behavior of a protein, *Phys. Rev. Lett.*, 62:1916–1919, 1989.
- J. Jäckle, On the ultrasonic attenuation in glasses at low temperatures, *Z. Physik*, 257:212–223, 1972.
- L. Kador, Pressure effects on hole-burning spectra in glasses: Calculations beyond the gaussian approximation, *J. Chem. Phys.*, 95:846–853, 1991a.
- L. Kador, Stochastic theory of inhomogeneous spectroscopic line shapes reinvestigated, *J. Chem. Phys.*, 95:5574–5581, 1991b.
- M. Karplus, Aspects of protein reaction dynamics: Deviations from simple behaviour, *J. Phys. Chem. B*, 104:11–27, 2000.
- J. C. Kendrew, The three-dimensional structure of a protein molecule, *Scient. Amer.*, 205:96–110, 1961.
- B. Kharlamov, R. I. Personov, und L. A. Bykovskaya, Stable γ gap in absorption spectra of solid solitons of organic molecules by laser irradiation, *Opt. Commun.*, 12:191–193, 1974.
- M. Köhler, Chromophor-Protein-Wechselwirkungen: Lochbrennspektroskopie an Hämproteinen, Dissertation, Technische Universität München, 1998.

- M. Köhler, J. Friedrich, und J. Fidy, Proteins in electric fields and pressure fields: Basic aspects, *Biochem. Biophys. Acta*, 1386:255–288, 1998.
- A. Kurita, Y. Shibata, und T. Kushida, Two-level systems in myoglobin probed by non-lorentzian hole broadening in a temperature-cycle experiment, *Phys. Rev. Lett.*, 74:4349–4352, 1995.
- B. B. Laird und J. L. Skinner, Microscopic theory of reversible pressure broadening in hole-burning spectra of impurities in glasses, *J. Chem. Phys.*, 90:3274–3281, 1989.
- A. L. Lehninger, D. L. Nelson, und M. M. Cox, Prinzipien der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, zweite Auflage, 1994.
- M. Lopenen, R. Dynes, V. Narayanamurti, und J. Garno, Observation of time-dependent specific heat in amorphous SiO₂, *Phys. Rev. Lett.*, 45:457–460, 1980.
- M. Lopenen, R. Dynes, V. Narayanamurti, und J. Garno, Measurements of the time-dependent specific heat of amorphous materials, *Phys. Rev. B*, 25:1161–1173, 1982.
- H. Maier, B. Kharlamov, und D. Haarer, Two-level-system dynamics in the long-time limit: A power-law time dependence, *Phys. Rev. Lett.*, 76:2085–2088, 1996.
- D. Miller und J. de Pablo, Calorimetric solution properties of simple saccharides and their significance for the stabilization of biological structure and function, *J. Phys. Chem. B*, 104:8876–8883, 2000.
- D. Miller, J. de Pablo, und H. Corti, Viscosity and glass transition temperature of aqueous mixtures of trehalose with borax and sodium chloride, *J. Phys. Chem. B*, 103:10243–10249, 1999.
- J. Müller, D. Haarer, O. V. Khodykin, und B. M. Kharlamov, Long-time scale spectral diffusion in PMMA: Beyond the TLS model?, *Phys. Lett. A*, 255:331–335, 1999.
- J. Müller, H. Maier, G. Hannig, O. V. Khodykin, D. Haarer, und B. M. Kharlamov, Long-time scale spectral diffusion in polymer glass, *J. Chem. Phys.*, 113:876–882, 2000.
- W. E. Moerner und L. Kador, Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid, *Phys. Rev. Lett.*, 62:2535–2538, 1989.
- H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, und F. I. Tsuji, Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:13617–13622, 1996.

- M. Orrit und J. Bernard, Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal, *Phys. Rev. Lett.*, 65:2716–2719, 1990.
- A. Ostermann, R. Waschipky, F. G. Parak, und G. U. Nienhaus, Ligand binding and conformational motions in myoglobin, *Nature*, 404:205–208, 2000.
- D. W. Pack, L. R. Narasimhan, und M. D. Fayer, Solvation shell effects and spectral diffusion: Photon echo and optical hole burning experiments on ionic dyes in ethanol glass, *J. Chem. Phys.*, 97:4125–4138, 1990.
- J. Pahapill und L. Rebane, Persistent spectral hole-burning in heme proteins: Cytochrome c and myoglobin, *Chem. Phys. Lett.*, 158:283–288, 1989.
- R. G. Palmer, D. L. Stein, E. Abrahams, und P. W. Anderson, Models of hierarchically constrained dynamics for glassy relaxation, *Phys. Rev. Lett.*, 53:958–961, 1984.
- F. Parak, Strukturfluktuationen in Proteinen, *Phys. Bl.*, 41:396–399, 1985.
- F. Parak, H. Hartmann, K. D. Aumann, H. Reuscher, G. Rennekamp, H. Bartunik, und W. Steigermann, Low temperature X-ray investigation of structural distributions in myoglobin, *Eur. Biophys. J.*, 15:237–249, 1987.
- M. F. Perutz, X-ray analysis of hemoglobin, *Science*, 140:863–869, 1963.
- W. A. Philips, Tunneling states in amorphous solids, *J. Low Temp. Phys.*, 7: 351–360, 1972.
- F. Post, W. Doster, G. Karvounis, und M. Settles, Structural relaxation and nonexponential kinetics of CO-binding to horse myoglobin, *Biophys. J.*, 64: 1833–1842, 1993.
- B. F. Rasmussen, A. M. Stock, D. Ringe, und G. A. Petsko, Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K, *Nature*, 357:423–424, 1992.
- T. L. Reinecke, Fluorescence linewidth in glasses, *Solid State Comm.*, 32:1103–1106, 1979.
- G. Sastry und N. Agmon, Trehalose prevents myoglobin collapse, *Biochem.*, 36: 7097–7108, 1997.
- J. G. Saven und J. L. Skinner, A molecular theory of the line shape: Inhomogeneous and homogeneous electronic spectra of dilute chromophores in nonpolar fluids, *J. Chem. Phys.*, 99:4391–4402, 1993.
- P. Schellenberg und J. Friedrich, A pressure tuning hole burning study of resorufin in protic solvents, *J. Lumin.*, 56:143–149, 1993.

- J. Schlichter und J. Friedrich, Glasses and proteins: Similarities and differences in their spectral diffusion dynamics, *J. Chem. Phys.*, 114:8718–8721, 2001a.
- J. Schlichter und J. Friedrich, New concepts in spectral diffusion physics of proteins, *Phot. Sci. News*, 6:100–110, 2001b.
- J. Schlichter, J. Friedrich, L. Herenyi, und J. Fidy, Protein dynamics at low temperatures, *J. Chem. Phys.*, 112:3045–3050, 2000a.
- J. Schlichter, J. Friedrich, L. Herenyi, und J. Fidy, Trehalose effect on low temperature protein dynamics: Fluctuation and relaxation phenomena, *Biophys. J.*, 80:2011–2017, 2001a.
- J. Schlichter, J. Friedrich, M. Parbel, und H. Scheer, Influence of isotopic substitution on the conformational dynamics of frozen proteins, *J. Chem. Phys.*, 114:9638–9644, 2001b.
- J. Schlichter, K.-D. Fritsch, und J. Friedrich, Dynamics of frozen proteins as investigated by optical hole burning experiments, *J. Mol. Liq.*, 86:127–136, 2000b.
- J. Schlichter, K.-D. Fritsch, J. Friedrich, und J. M. Vanderkooi, Conformational dynamics of a low temperature protein: Free base cytochrome-c, *J. Chem. Phys.*, 110:3229–3234, 1999.
- Th. Schmidt, J. Baak, D. van de Straat, H. Brom, und S. Völker, Temperature dependence of optical linewidth and specific heat in rare-earth-doped silicate glasses, *Phys. Rev. Lett.*, 71:3031–3034, 1993.
- P. Selzer, D. Huber, und D. Hamilton, Anomalous fluorescence linewidth behavior in Eu^{3+} -doped silicate glass, *Phys. Rev. Lett.*, 36:813–816, 1976.
- G. P. Singh, H. J. Schink, H. v. Löhneysen, F. Parak, und S. Hunklinger, Excitations in metmyoglobin crystals at low temperatures, *Z. Physik B*, 55:23–26, 1984.
- J. L. Skinner, J. Friedrich, und J. Schlichter, Spectral diffusion in proteins: A simple phenomenological model, *J. Phys. Chem. A*, 103:2310–2311, 1999.
- P. Steinbach, A. Ansari, J. Berendzen, D. Braunstein, K. Chu, B. Cowen, D. Ehrenstein, H. Frauenfelder, J. Johnson, D. Lamb, S. Luck, J. Mourant, G. Nienhaus, P. Ormos, R. Philip, A. Xie, und R. Young, Ligand binding to heme proteins: The connection between dynamics and function, *Biochem.*, 30:3988–4001, 1991.
- M. D. Stephens, J. G. Saven, und J. L. Skinner, Molecular theory of electronic spectroscopy in nonpolar fluids: Ultrafast solvation dynamics and absorption and emission line shapes, *J. Chem. Phys.*, 106:2129–2144, 1997.

- Ph. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, und M. Orrit, Ten years of single-molecule spectroscopy, *J. Phys. Chem. A*, 1:1–16, 2000.
- D. Thorn-Leeson, D. Wiersma, K. Fritsch, und J. Friedrich, The energy landscape of myoglobin: An optical study, *J. Phys. Chem. B*, 101:6331–6340, 1997.
- D. Thorn-Leeson und D. A. Wiersma, Looking into the energy landscape of myoglobin, *Nat. Struct. Biol.*, 2:848–852, 1995a.
- D. Thorn-Leeson und D. A. Wiersma, Real time observation of low-temperature protein motions, *Phys. Rev. Lett.*, 74:2138–2141, 1995b.
- M. von Schickfus und S. Hunklinger, Saturation of the dielectric absorption of vitreous silica at low temperatures, *Phys. Lett.*, 64A:144–146, 1977.
- S. Weiss, Fluorescence spectroscopy of single biomolecules, *Science*, 283:1676–1683, 1999.
- C. Womersley, Biochemical and physiological aspects of anhydrobiosis, *Comp. Biochem. Physiol.*, 70:669–678, 1981.
- I.-S. Yang und A. C. Anderson, Specific heat of melanin at temperatures below 3 K, *Phys. Rev. B*, 34:2942–2944, 1986.
- R. C. Zeller und R. O. Pohl, Thermal conductivity and specific heat of noncrystalline solids, *Phys. Rev. B*, 4:2029–2041, 1971.
- J. Zimmermann und G. Weber, Thermal relaxation of low-energy in vitreous silica, *Phys. Rev. Lett.*, 46:661–664, 1981.
- J. Zollfrank und J. Friedrich, Photochemical holes under pressure: Compressibility and volume fluctuations of a protein, *J. Chem. Phys.*, 94:8600–8603, 1991.
- J. Zollfrank und J. Friedrich, Pressure shift and solvent shift: A hole-burning study of resorufin-doped glasses, *J. Phys. Chem.*, 96:7889–7895, 1992.
- J. Zollfrank, J. Friedrich, und F. Parak, Spectral hole burning study of protoporphyrin IX substituted myoglobin, *Biophys. J.*, 61:716–724, 1992.
- R. Zwanzig, Diffusion in a rough potential, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2029–2030, 1988.

Nachwort

Auf keinen Fall unerwähnt bleiben soll die Hilfe und Unterstützung, die mir im Lauf dieser Arbeit von meinen Kollegen zuteil wurde, und ohne die einfach gar nichts ›gegangen‹ wäre. Dafür möchte ich mich in diesem abschließenden Kapitel bedanken.

An erster Stelle ist dabei natürlich Prof. Friedrich zu nennen, dessen stets ungeminderte Begeisterung für die Physik der Proteine meine Motivation immer wieder aufs Neue wachrütteln konnte (auch zu Zeiten, in denen das nicht einfach war – etwa in der Endphase eines langen, langen Wartezeitexperiments). Sein schier unerschöpfliches Detailwissen war stets ein Rettungsanker angesichts aller nur vorstellbaren Schwierigkeiten, er hatte immer ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme. Kurz und gut: ein Chef, wie man ihn sich wünscht.

Großen Dank schulde ich auch all denen, die direkt an Aufbau oder Durchführung meiner Experimente beteiligt waren: Zu allererst natürlich Ellen Schneider, für professionell und prompt gemischte Proben, für Unterstützung bei den Langzeitexperimenten auch zu entlegensten Uhrzeiten, für tausend Hilfestellungen im Labor und nicht zuletzt natürlich auch für ausgiebige Beratung in allen Design- und Lebensfragen; ebenso meinem Zimmergenossen Martin Pinsker, für ungezählte technische Hilfestellungen vor allem in der oft mühsamen, aber auch lustigen Zeit unseres Laboraufbaus, und natürlich für seine ausgiebige Unterstützung in allen Computerangelegenheiten; und schließlich auch Ludwig Hütt, ohne dessen feinmechanische Hilfe der Aufbau der Experimente eine traurige Sache gewesen wäre.

Auch auf die Hilfsbereitschaft und Kollegialität all meiner anderen Mitdoktoranden – Andreas Fräbel, Christoph Schnell, Harald Lesch, Jürgen Friebe, Markus Stübner (mit Schmackes!), Vladimir Ponkratov sowie in der Anfangszeit Martin Köhler – konnte ich mich immer verlassen; das gilt natürlich auch für unseren zeitweiligen ›halben‹ Postdoc Axel Parbel, dem ich außerdem die Proben für die Myoglobin-Experimente verdanke. Gerade in einem großen Gemeinschaftslabor wie dem unseren ist ein derart freundschaftliches Verhältnis zu den Kollegen von enormer Wichtigkeit.

Sehr lustig (und darüber hinaus produktiv) war auch die Zeit mit unseren beiden Fachhochschul-Praktikanden Thomas Dornschlögel und Bastian Steinacher. Unvergesslich sind vor allem die Erfahrungen im Grenzgebiet zwischen Hochfrequenztechnik und Parapsychologie, die mir letzterer während des Wavemeter-Neubaus

ermöglichte.

Danken möchte ich weiterhin auch Dr. Levente Herenyi und Prof. J. Fidy vom Biophysikalischen Institut der Semmelweis-Universität in Budapest für die ausgezeichnete Zusammenarbeit an den Meerrettichperoxidase-Experimenten und natürlich auch für die freundliche Aufnahme während meiner Zeit in Budapest.

Eine große Hilfe angesichts aller organisatorischen Probleme (und ein Hort der guten Laune während unserer morgendlichen Kaffeerunde) war Erika Bischofs; ihr wie auch all anderen (aus Platzgründen noch nicht genannten) Kollegen möchte ich abschließend für das ausgezeichnete Arbeitsklima in ›unserem‹ Institut danken, das die eigentliche Voraussetzung dafür war, dort mit soviel Spaß arbeiten zu können.