

Hochauflösende Laserphotochemie  
an organischen Gläsern  
und Proteinen

Dissertation  
zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Chemie  
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

**Jürgen Zollfrank**

geboren in Kulmbach

Mainz 1991

## Inhalt:

### 1. Einleitung

### 2. Gläser und Proteine

- 2.1 Optische Spektroskopie an dotierten Gläsern
- 2.2 Zweiniveau-Systeme (TLS) und spektrale Diffusion
- 2.3 Die Methode des spektralen Lochbrennens
- 2.4 Optische Spektroskopie an Proteinen
  - 2.4.1 Aufbau und Funktion von Biopolymeren
  - 2.4.2 Lochbrennen an Proteinen
  - 2.4.3 Proteine unter Druck

### 3. Experimentelles

- 3.1 Versuchsaufbau
  - 3.1.1 Allgemeine Funktionsweise
  - 3.1.2 Beschreibung einzelner Komponenten
- 3.2 Durchführung der thermozyklischen Experimente
- 3.3 Hydrostatische Druckvariation
- 3.4 Vorstellung der untersuchten Systeme
  - 3.4.1 Resorufin in Alkohol-Gläsern
  - 3.4.2 Mesoporphyrin IX substituierte Meerrettich-Peroxidase
  - 3.4.3 Carboxy-Myoglobin (MbCO) und substituiertes Myoglobin (MbP)
  - 3.4.4 Charakterisierung der Photoreaktion
- 3.5 Hinweise zur Auswertung spektraler Löcher

### 4. Verteilung von Barrieren der Photoreaktion

- 4.1 Einleitung
- 4.2 Thermozyklische Experimente an Meerrettich-Peroxidase
  - 4.2.1 Messungen mit Lochbrennen
  - 4.2.2 Breitbandig detektierte Spektren
- 4.3 Modellbeschreibung
  - 4.3.1 Zusammenhang zwischen Flächenrückgang und Barrierenverteilung

4.3.2 Zusammenhang zwischen Barrierenverteilung und Art der Photoreaktion

4.3.3 Interpretation der Messungen an MRP

4.4 Die Barrieren für die CO-Rückbindung in Carboxy-Myoglobin

4.4.1 Beobachtung der Rückbindung als Funktion der Zyklus-Temperatur

4.4.2 Interpretation und Vergleich mit anderen Methoden

## 5. Konformationsänderungen in Meerrettich-Peroxidase und Myoglobin

5.1 Messung der irreversiblen Lochverbreiterung in drei verschiedenen Tautomeren von Meerrettich-Peroxidase

5.2 Vergleichsmessung "ohne Apo-Protein": Mesoporphyrin IX in Glycerin

5.3 Thermisch induzierte Lochverbreiterung in Myoglobin

5.4 Diskussion der irreversiblen Lochverbreiterung von Proteinen in Lösung

5.4.1 Spektrale Diffusion als Indikator für Konformationsänderungen

5.4.2 Interpretation mit Hilfe eines Zwei-Domänen-Modells

## 6. Hydrostatische Druckexperimente

6.1 Einleitung

6.2 Druckexperimente an dotierten Alkohol-Gläsern

6.2.1 Der Farbeffekt bei der Lochmitten-Verschiebung

6.2.2 Druckverbreiterung

6.3 Druckexperimente an Proteinen

6.4 Diskussion der Ergebnisse

6.4.1 Ein einfaches Modell für die Druckverschiebung

6.4.2 Interpretation der Messungen an den Alkohol-Gläsern

6.4.3 Verwendete Näherungen und Grenzen des Modells

6.4.4 Interpretation der Druckmessungen an Proteinen

6.4.5 Suche nach irreversiblen Effekten

## 7. Zusammenfassung

## 8. Literatur

---

**Glossar**

TLS	two level system / Zweiniveau-System
MP	Mesoporphyrin IX
MRP	Mesoporphyrin IX substituierte Meerrettich-Peroxidase
NCHA	Naphthalincarbonsäurehydroxyamid
MbCO	Carboxy-Myoglobin
MbO <sub>2</sub>	oxygeniertes Myoglobin
MbP	Protoporphyrin IX substituiertes Myoglobin
EtOH	Ethanol
MeOH	Methanol
EG	Ethylen Glykol
EGH	Ethylen Glykol / Wasser
FWHM	full width half maximum / volle Linienbreite auf halber Höhe
$\Delta OD$	Änderung der optischen Dichte
PMMA	poly-Methylmethacrylat
$\nu_{vac}$	Vakuum-Absorptionsfrequenz
$\nu_b$	Brennfrequenz
$\Delta \Gamma$	Änderung der Lochbreite
$\Delta p$	Druckänderung
s	Frequenzänderung bei einer bestimmten Brennfrequenz
$\Delta \omega_{ir}$	Anteil der irreversiblen Lochverbreiterung



## 1. Einleitung

Seit der Entwicklung leistungsfähiger, hochauflösender Lasersysteme nimmt die Lochbrennspektroskopie eine führende Rolle bei der Untersuchung amorpher Festkörper im optischen Spektralbereich ein /1/. Ein spektrales Loch ist eine Art Sonde für dynamische und statische Wechselwirkungen des Farbstoff-Matrix Systems. Interessante Informationen erhält man durch Veränderung äußerer Parameter, wie z.B. Temperatur, Druck oder elektrische Felder /2/.

So ermöglichte Lochbrennen in Verbindung mit einer speziellen Temperaturzyklusmethode einen empfindlichen und sehr direkten Nachweis struktureller Relaxationen in einer Reihe von Polymeren, Proteinen und Gläsern bei tiefen Temperaturen /3/. Lokale Konformationsänderungen von Atomen oder Atomgruppen ändern elastische oder elektrische Felder der Matrix und führen zu einem Auseinanderlaufen des Loches auf der Frequenzskala, zur sogenannten spektralen Diffusion. Modelliert werden Konformationsänderung durch Übergänge in Zweiniveau-Systemen /4/ im Rahmen des Tunnelmodells (TLS). Die bislang einzige Messung dieser Art an Proteinen, und zwar an Antennenkomplexen photosynthetischer Bakterien /5/, zeigte große Ähnlichkeit mit glasartigem Verhalten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals, mit Hilfe spektraler Diffusion, Konformationsänderungen in einem relativ kleinen Chromoprotein, Mesoporphyrin IX substituierte Meerrettich-Peroxidase, nachgewiesen /6,7/. Es zeigte sich, daß sowohl die Nahumgebung des Chromophors (Apo-Protein) als auch die Fernumgebung (Lösungsmittel) einen Beitrag zur spektralen Diffusion liefern. Der Lösungsmittelanteil ist in einem Vergleichsexperiment quantitativ bestimmt worden und zeigt glasartiges Verhalten. Der Proteinanteil hingegen weist eine diskrete Stufe auf. Weiterhin wurde spektrale Diffusion auch in Protoporphyrin IX substituiertem Myoglobin gefunden.

Eine weitere Informationsquelle über die Wechselwirkung der Matrix mit

dem Chromophor ist die Natur der Photoreaktion, bzw. deren Umkehrung durch Erwärmen der Probe. So konnte in früheren Experimenten durch thermisches Austasten, die Verteilung der Barrieren zwischen Photoedukt und Photoprodukt in einer Reihe von Gläsern und Polymeren, aber auch in Antennen-Proteinen bestimmt werden /8,9/. Meßgröße war hierbei die Fläche eines spektralen Loches.

Hier nun wurde dieses Verfahren zur Bestimmung der Verteilung der Photoproduktbarrieren in Carboxy-Myoglobin sowie in Meerrettich-Peroxidase benutzt /10/. In beiden Fällen lassen sich die Messungen durch gaußförmige Barrierenverteilungen erklären, wobei in Myoglobin eine monomodale Verteilung, in Meerrettich-Peroxidase hingegen eine Vielzahl von Verteilungen um verschiedene Mittelwerte gefunden wurden. Allerdings handelt es sich hierbei um zwei grundlegend verschiedene Prozesse: während man bei Carboxy-Myoglobin das Wiederanbinden eines CO-Moleküls betrachtet, besteht die Photoreaktion im Falle der Meerrettich-Peroxidase in einer Proton-Transfer Reaktion.

Inhomogen verbreiterte Banden optischer Übergänge sind kennzeichnend für ungeordnete Systeme wie Gläser aber auch Proteine. Sie spiegeln die *statische* Wechselwirkung zwischen Sonde und Matrix wider. Druckeffekte an spektralen Löchern erlauben die Bestimmung des Wechselwirkungspotentials und makroskopischer Parameter, wie z.B. Solvent Shift, Vakuumabsorptionsfrequenz und Matrixkompressibilität /11/. Dabei wird, wegen der Schärfe des spektralen Loches, die Empfindlichkeit um mehrere Größenordnungen gegenüber herkömmlichen Hochdruckexperimenten /12,13/ erhöht. Kürzlich wurde die Anwendbarkeit der Methode zur Bestimmung makroskopischer Kenngrößen in Polymeren nachgewiesen /14/.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Einführung einer neuartigen Probenpräparation die für derartige Messungen zu Verfügung stehende Substanzklasse erheblich erweitert werden. Es war möglich, Druckexperimente an "weichen" organischen Gläsern wie Ethanol/Methanol, Ethylenglykol/Wasser und Glycerin durchzuführen /15,16/. Außerdem wurden Druckexperimente an

den Proteinen Meerrettich-Peroxidase /17/ und substituiertem Myoglobin /18/ gemacht. Sowohl bei den Alkohol-Gläsern als auch bei den Proteinen zeigte es sich, daß sich die Proben bei den hier verwendeten Drücken vollkommen elastisch verhalten. Unter Ausnutzung des "Farbeffektes", d.h. der Abhängigkeit der Druckeffekte von der Brennposition innerhalb der inhomogenen Bande, konnten Parameter wie die Tieftemperatur-Matrix-Kompressibilität und die Vakuum-Frequenz der Chromophore bestimmt werden. Es stellte sich heraus, daß die Kompressibilität von Proteinen ähnliche Werte wie die von Gläsern bei tiefen Temperaturen hat. Die für die Vakuum-Absorptionsfrequenzen erhaltenen Werte können als Ausgangspunkt für Molekülrechnungen dienen, da sie, im Gegensatz zu Messungen in ultrakalten Jets /19,20/, das Farbstoffmolekül *im eingebauten Zustand* beschreiben.

## 2. Gläser und Proteine

Dieses Kapitel soll einen kurzen Überblick über den Stand der Forschung auf dem Gebiet der optischen Spektroskopie an Gläsern und Proteinen geben. Es wird ein Modell vorgestellt, das viele der ungewöhnlichen Tieftemperatureigenschaften von ungeordneten Systemen erklärt, aufbauend auf speziellen niederenergetischen Anregungszuständen (TLS). Als Untersuchungsmethode wird das spektrale Lochbrennen erklärt.

### 2.1 Optische Spektroskopie an dotierten Gläsern

Gläser unterscheiden sich von Kristallen durch räumliche und energetische Unordnung. Im Gegensatz zu kristallinen Festkörpern, wo jedes Atom oder Molekül eine feste Anzahl von nächsten Nachbarn hat und definierte Abstände zwischen allen nächsten Nachbarn vorliegen, kennt man in Gläsern nur eine statistische Verteilung von Abständen zu nächsten Nachbarn [21]. Gläser haben keine langreichweitige Ordnung und nur eine schlecht verstandene Nahordnung. Röntgen- und Neutronenstreudaten führen zu radialen Verteilungsfunktionen, die höchstens eine oder zwei Koordinationsschalen zeigen. Neben den klassischen, auf  $\text{SiO}_2$ -Basis beruhenden Gläsern, ist in letzter Zeit auch die Forschung an sogenannten "weichen" organischen Gläsern wie Ethanol, Glycerin oder 3-Methylpentan verstärkt worden.

Man erhält Gläser aus dem flüssigen Zustand durch rasches Abkühlen. Das spezifische Volumen verläuft dabei linear als Funktion der Temperatur und ändert innerhalb eines Bereiches, der als unterkühlte Flüssigkeit bezeichnet wird, *stetig* seine Steigung. Unterhalb einer Temperatur  $T_g$ , die man als Glaspunkt bezeichnet, ist der Glaszustand erreicht.  $T_g$  hängt dabei logarithmisch von der Abkühlrate ab. Für jede Temperatur gibt es eine charakteristische Relaxationsrate, mit der das Glas Temperaturänderungen

folgen kann. Die Relaxationszeiten reichen von  $10^{-12}$  sek in der Flüssigkeit bis  $10^{10}$  Jahre weit unterhalb von  $T_g$ . Das System befindet sich aufgrund der riesigen Anzahl der möglichen erreichbaren Konfigurationen, die zum Zustand "Glas" führen, lediglich in einem lokalen Minimum der freien Energie. In Abhängigkeit von der Temperatur kann das System im Laufe der Zeit deshalb alle erreichbaren Zustände des Phasenraumes durchqueren.

Die Tatsache, daß sich ungeordnete Festkörper grundsätzlich von kristallinen Medien unterscheiden, wurde u.a. bei Messungen der spezifischen Wärme und der thermischen Leitfähigkeit von Gläsern bei Temperaturen kleiner als 1 K bemerkt /22,23/. In Kristallen erwartet man für beide Größen eine kubische Abhängigkeit von der Temperatur. In Gläsern wurde aber für die spezifische Wärme ein zusätzlicher linearer und für die thermische Leitfähigkeit ein zusätzlicher quadratischer Anteil gefunden. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, daß, während die Tieftemperatureigenschaften von Kristallen von akustischen Phononen bestimmt sind, in Gläsern zusätzliche niederenergetische Anregungen das Verhalten bei tiefen Temperaturen bestimmen. Diese Anregungen werden modelliert durch Übergänge zwischen den beiden tiefsten Energieniveaus von Doppelminimumpotentialen /4,24/, die eine breite Verteilung von Energieaufspaltungen und Potentialbarrieren haben. Sie werden allgemein als "two level systems" (TLS) bezeichnet. Als Folge der breiten Verteilung der dynamischen Parameter der TLS kann auf der Zeitskala des Experiments nur ein Bruchteil der TLS ins thermische Gleichgewicht gelangen. Die gefundene Zeitabhängigkeit der spezifischen Wärme ist ein anschauliches Beispiel dafür /22/.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Spektren von Sondenmolekülen in Gläsern. Die intrinsische Absorption dieser Wirtsmatrizen liegt außerhalb des optischen Spektralbereichs und wird deshalb nicht berücksichtigt. Als Konsequenz der räumlichen Unordnung sind die optischen Spektren von Molekülen in Glasmatrizen inhomogen verbreitert /25/. Jedes Molekül "sieht" eine geringfügig andere Nahumgebung, was zu

einer Verteilung der Energien von Grund- und Anregungszustand führt. Die Breite der Absorptionsbanden ist somit ein grobes Maß für den Grad der Unordnung. Sie verhindert allerdings eine einfache Messung der homogenen Linienbreite des Übergangs. Mit Hilfe hochauflösender Methoden wie Fluoreszenzlinien-Verschmälerung oder spektralem Lochbrennen wird dieses Hindernis umgangen. Es zeigte sich, daß die homogene Linienbreite mit  $T^n$  ( $1 \leq n \leq 2$ ) von der Temperatur abhängt, ganz im Gegensatz zu Kristallen, wo die homogene Linienbreite mit  $T^7$  variiert. Dieses außergewöhnliche Temperaturverhalten der Dephasierung von Molekülen in amorphen Medien führte zu einer intensiven Untersuchung dieses Phänomens und der Entwicklung einer Reihe von Modellen auf der Basis der TLS (Übersichtsartikel z.B. /26/ und /44/). Die Modelle variieren im wesentlichen bezüglich der Kopplung der TLS mit anderen Freiheitsgraden, wie z.B. Phononen, Fraktonen oder librationellen Anregungen.

Ein weiterer Effekt, den man in Gläsern beobachtet, ist die *irreversible* Verbreiterung von Spektrallinien (bzw. von spektralen Löchern), die sogenannte "spektrale Diffusion" /27,28,29/. Sie wird im nächsten Kapitel näher erläutert. Dabei geht man davon aus, daß zwischen den Matrix-TLS und dem Sondenmolekül eine dipolare Wechselwirkung existiert. Findet in der Glasmatrix eine Relaxation statt, was einem Übergang im TLS entspricht, verschiebt sich aufgrund der Kopplung die Absorptionsfrequenz der Sonde. Hat man zuvor den ursprünglichen Zustand markiert, z.B. durch ein spektrales Loch, kann man die Matrixrelaxationen durch ein "Auseinanderlaufen" des Loches beobachten.

Dieser Prozeß eines Drifts der Resonanzfrequenz findet auf allen Zeitskalen von der Lebensdauer des angeregten Zustandes bis hin zu Jahren statt, und der Beitrag zur Linienbreite kann ein Vielfaches der homogenen Linienbreite betragen. Falls es Relaxationen gibt, die schneller als die Phasenrelaxationszeit sind, so tragen sie lediglich zur homogenen Linienbreite bei. Ein Experiment, dessen Dauer auf einer typischen Zeitskala von  $\tau_{\text{exp}}$  verläuft, kann nur Prozesse untersuchen, für deren Raten



gilt:  $R \leq 1/\tau_{\text{exp}}$ . Die Messung der spektralen Diffusion ist der wohl direkteste und empfindlichste Nachweis von Matrixrelaxationen. Eine weitere Möglichkeit wäre z.B. die Messung der Zeitabhängigkeit der spezifischen Wärme. Aus dem Verlauf der thermisch induzierten spektralen Diffusion erhält man Informationen über die Verteilung der Relaxationsraten oder den Relaxationsmechanismus, wie z.B. quantenmechanisches Tunneln oder thermisches Überqueren von Potentialbarrieren /3/. Es wurde gezeigt, daß die Raten dieser Prozesse mehrere Größenordnungen in der Zeit umfassen /30/. Die Barrieren können extrem niedrig sein, sodaß in Alkohol bereits bei Temperaturen von 500 mK spektrale Diffusion beobachtet wurde /31/.

Es sei darauf hingewiesen, daß die Lochverbreiterung und der Rückgang der Lochfläche, verschiedene Ursachen haben. Während die Verbreiterung strukturelle Relaxationen der Matrix anzeigt, ist die Lochfläche ein Maß für die Zahl der phototransformierten Moleküle. Diese kann konstant bleiben während sich das Loch verbreitert /32/.

## 2.2 Zweiniveau-Systeme (TLS) und spektrale Diffusion

Das Modell der Zweiniveau-Systeme (TLS) wurde 1972 von Anderson, Halperin und Varma /4/ sowie von Phillips /24/ zur phänomenologischen Beschreibung der in Kapitel 2.1 beschriebenen charakteristischen Tieftemperatur-Eigenschaften von Gläsern eingeführt. Es geht von dem Postulat aus, daß es eine gewisse Anzahl von Atomen oder Atomgruppen gibt, die in jeweils einer von zwei Gleichgewichtspositionen sitzen können. Übergänge zwischen den Positionen sind entweder thermisch aktiviert oder, bei tiefen Temperaturen, durch Tunneln möglich. Dabei ist die wahre mikroskopische Natur derartiger Übergänge nur in wenigen Fällen bekannt. In PMMA wird beispielsweise eine Rotation von Methylgruppen vermutet /33/. Das TLS-Modell findet eine breite Anwendung, da es eine Vielzahl von Erscheinungen erklärt, während konkurrierende Modelle meist nur auf

einzelne Experimente anwendbar sind /35/.

Während Kristalle durch periodische Potentiale mit wohldefinierten und identischen Potentialwällen charakterisiert sind, werden Gläser durch Potentiale mit verteilten Energieminima und verteilten Potentialbarrieren beschrieben. Die Zufälligkeit des Potentialverlaufs (Abb. 2.1) reflektiert die lokale Unordnung des amorphen Zustandes.

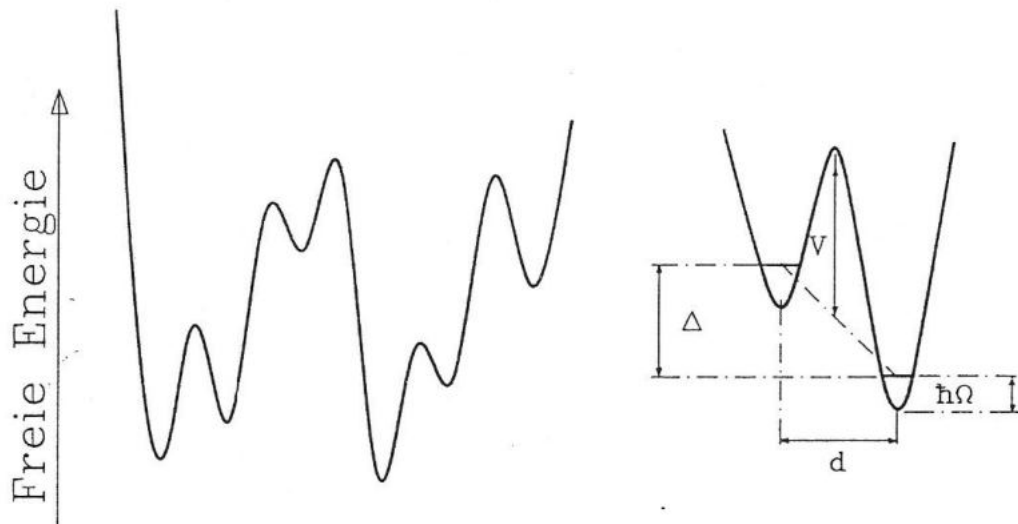


Abb. 2.1: Freie Energie als Funktion einer fiktiven Konfigurationskoordinate eines hochdimensionalen Konfigurationsraums eines Glases und Vergrößerung eines Ausschnittes daraus (Doppelminimum-Potential).

Ein einzelnes TLS stellt das einfachste Element aus der Hyperfläche der freien Energie als Funktion einer fiktiven Konfigurationskoordinate dar, das noch strukturelle Relaxationen zulässt (Abb. 2.1). Die Dynamik des gesamten Systems wird durch die Dynamik eines einzelnen TLS simuliert, bei gleichzeitiger Verteilung des Tunnelparameters  $\lambda$  und der Asymmetrie  $\Delta$ . Der Abstand der beiden Potentialminima wird mit  $d$  bezeichnet. Man betrachtet nur die beiden tiefsten Zustände. Der Hamilton-Operator  $H$  des



Doppelminimumpotentials lautet:

$$H = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \Delta & \Delta_0 \\ \Delta_0 & -\Delta \end{bmatrix}. \quad (2.2)$$

$\Delta$  ist der Asymmetrieparameter des ungestörten Systems und  $\Delta_0$  das Tunnelmatrixelement:

$$\Delta_0 = 2\hbar\Omega e^{-\lambda}. \quad (2.3)$$

$\hbar\Omega$  ist die Energie der Nullpunktsschwingung in einem Potentialminimum.  $\Delta_0$  beschreibt die Energieverschiebung aufgrund der Kopplung und ist bestimmt durch den Tunnelparameter  $\lambda$ :

$$\lambda = \sqrt{\frac{2m d^2 V}{\hbar^2}}. \quad (2.4)$$

Dabei ist  $d$  der Abstand der Potentialminima,  $V$  die Barrierenhöhe und  $m$  die Masse des Tunnelteilchens. Die Energieaufspaltung  $E$  im Doppelminimumpotential beträgt:

$$E = \sqrt{\Delta^2 + \Delta_0^2}. \quad (2.5)$$

Die grundlegendste Annahme des Tunnelmodells /4/ ist eine breite, konstante Verteilung  $P(\Delta, \lambda)$  der Asymmetrie  $\Delta$  und des Tunnelparameters  $\lambda$ :

$$P(\Delta, \lambda) d\Delta d\lambda = \bar{P} d\Delta d\lambda. \quad (2.6)$$

Diese Annahme hat eine Reihe weitreichender Konsequenzen: Das glasartige System wird durch dynamische Parameter charakterisiert, deren

Verteilung so breit ist, daß die langsamen Komponenten innerhalb endlicher Meßzeiten ihre Gleichgewichts-Konfigurationen bzw. Energien nie erreichen. Wenn man mit einem geeigneten optischen Experiment das System lange genug mit hoher Auflösung beobachten kann, wird man auch in der Lage sein, diese für ein Nichtgleichgewichtssystem typischen Veränderungen zu sehen.

Eine interessante Frage, die sich bei der Betrachtung eines Systems mit verteilten Barrierenhöhen und Energien stellt, ist die Verteilung der Relaxationsraten. Jäckle /36/ hat die Ratenverteilung  $P(R)dR$  für amorphe Systeme mit einer konstanten Verteilung  $\bar{P}(\Delta, \lambda)$  angegeben als:

$$P(R) dR = \frac{1}{2} \bar{P}(\Delta, \lambda) \frac{dR}{R (1 - R/R_{\max})^{1/2}} \quad (2.7)$$

Diese Verteilung hat jeweils einen Pol bei  $R \rightarrow 0$  und bei  $R \rightarrow R_{\max}$ . Der Pol bei  $R_{\max}$  ist integrierbar. Man kann zeigen /30/, daß  $R_{\max}$  gerade die Rate für symmetrische TLS darstellt, d.h.  $\Delta = 0$ . Physikalisch sinnvoll ist es, den Pol bei  $R \rightarrow 0$ , durch Einführung einer minimalen Rate  $R_{\min}$  zu eliminieren, was einer maximalen Barrierenhöhe bzw. Tunneldistanz entspricht. Wegen der  $1/R$ -Abhängigkeit der Verteilung, wird der größte Beitrag zu dynamischen Prozessen aus dem Bereich der Kurve für "kleine  $R$ " stammen. Anschaulich ist dies der Grund für die beobachteten logarithmischen Zeitabhängigkeiten in Systemen, die durch TLS modelliert werden /45/.

Für bestimmte Relaxationsprozesse läßt sich aus der Annahme einer konstanten Verteilung des Tunnelparameters  $\lambda$  eine Aussage über die Verteilung der Potentialbarrieren  $P(V)$  ableiten. So ist im Falle von Protonentunneln die Tunnelmasse relativ gut definiert. Außerdem kann man annehmen, daß in Gläsern aufgrund der kurzreichweitigen Ordnung, auch die Tunneldistanz  $d$  ziemlich scharf ist. In diesem Fall folgt sofort aus (2.4) und mit  $p(\lambda)d\lambda = \bar{P}d\lambda = P(V)dV$ :

$$P(V) = \bar{P} \frac{d\lambda}{dV} \propto \bar{P} \frac{d}{dV} \sqrt{V} \propto \bar{P} \frac{1}{\sqrt{V}}. \quad (2.8)$$

Es sei angemerkt, daß in dieser Betrachtung stets *intrinsische* TLS, d.h. TLS der Glasmatrix gemeint sind. Oftmals betrachtet man jedoch auch den Ausgangs- und Endzustand einer photoinduzierten Reaktion eines Farbstoffmoleküls als eine Art *extrinsisches* TLS. Es liegt nahe, für die extrinsischen TLS eine ähnliche Verteilungsfunktion wie für die intrinsischen anzunehmen, also eine näherungsweise konstante Verteilung in  $\Delta$  und  $\lambda$ . Die Grenzen der Verteilungen können jedoch durchaus sehr verschieden sein. Tatsächlich wurde die Verteilung aus Gl. 2.8 in einer ganzen Reihe von organischen Gläsern /8/ und Polymeren /34/ gemessen.

Auch das Phänomen der spektralen Diffusion läßt sich im Rahmen des TLS-Modells erklären. Dabei wird eine formale Analogie zwischen den TLS und Spin-1/2 Systemen hergestellt /37/. Zur Beschreibung der spektralen Diffusion bei Spinresonanzexperimenten /38/ unterteilt man die Spins in A-Spins und B-Spins. Die A-Spins sind in Resonanz mit der Anregungsfrequenz. Die B-Spins sind nicht in Resonanz, beeinflussen die A-Spins jedoch durch Spin-Spin-Kopplung. Der Übergang eines B-Spins ändert das lokale Feld am Ort des A-Spins und führt zu einer Verschiebung von dessen Resonanzfrequenz. Reinecke /39/ übertrug diesen Formalismus zur Beschreibung der Wechselwirkung von TLS-Übergängen (Flips von B-Spins) auf optische Übergänge von Farbstoffmolekülen (A-Spin). Die Kopplung erfolgt über elektrische oder elastische Dipolfelder. Die B-Flips seien nicht korreliert, was einer geringen Dichte der TLS entspricht.

Betrachtet man zur Zeit  $t=0$  eine Anzahl von Farbstoffmolekülen, die zufällig die gleiche Energiedifferenz zwischen Grund- und Anregungszustand haben, so wird diese Entartung mit fortschreitender Zeit  $t$  durch statistisch über das Probenvolumen verteilte Übergänge von Matrix-TLS aufgehoben. Die ursprünglich  $\delta$ -förmige Frequenzverteilung erhält die Form einer Lorentzlinie /38/:

$$D(\omega - \omega_0, t, T) = \frac{\Delta\omega(t, T)}{2\pi} \frac{1}{(\omega - \omega_0)^2 + \left(\frac{\Delta\omega(t, T)}{2}\right)^2} \quad (2.9)$$

Dabei ist der Diffusionskern  $D$  die bedingte Wahrscheinlichkeit, zur Zeit  $t$  bei der Frequenz  $\omega$  einen Absorber zu finden, der zur Zeit  $t=0$  bei der Frequenz  $\omega_0$  absorbiert hat.  $\Delta\omega(t, T)$  ist die Breite (FWHM) der Frequenzverteilung:

$$\Delta\omega = C \left\langle \left| \frac{\Delta}{E} \right| n_f(t, T) \right\rangle_{E, \lambda} \quad (2.10)$$

$C$  ist eine Kopplungskonstante,  $\Delta$  der Asymmetrieparameter und  $E$  die Energieaufspaltung der TLS. Da  $E$  und  $\lambda$  breit verteilt sind, muß über sie gemittelt werden. Angenommen, man kann zur Zeit  $t=0$  bei der Temperatur  $T_b$  einen Mikrozustand markieren, so ist  $n_f(t, T)$  die Anzahl der TLS, die zur Beobachtungszeit  $t$  eine ungerade Anzahl von Flips ausgeführt haben und deshalb einen Beitrag zur spektralen Diffusion liefern.  $n_f(t, T)$  kann durch einfache Ratengleichungen berechnet werden /37/. Führt man Temperaturzyklusexperimente durch (vgl. Kap. 3.2), so wird  $n_f(t, T)$  im wesentlichen dadurch bestimmt, daß bei einer Temperaturerhöhung auf eine Temperatur  $T$  eine Anzahl von TLS "auftauen", deren Barrieren  $V(\lambda)$  bei dieser Temperatur gerade noch überquert werden können. Wird das System nach der Temperaturerhöhung wieder auf  $T_b$  abgekühlt, so fallen diese TLS wieder aus dem thermischen Gleichgewicht und es bleibt eine irreversible Verbreiterung  $\Delta\omega_{ir}$  der Linie zurück /40/:

$$\Delta\omega_{ir}^{(th)} = K \sqrt{\ln(R_0\tau)} \left( T^{3/2} - T_b^{3/2} \right) \int_0^\infty dx \operatorname{sech}^2 x \quad (2.11)$$

Der Index "th" weist darauf hin, daß als Relaxationsmechanismus ein thermisch aktiviertes Überqueren der Potentialbarriere (mit einem Präexponentialfaktor  $R_0$ ) verwendet wurde. Dieser Mechanismus führt also zu einer irreversiblen Verbreiterung, die mit  $T^{3/2}$  zunimmt, was bei einer Vielzahl von Messungen an Gläsern und Polymeren bestätigt wurde /3/.

Wichtig ist, daß diese Verbreiterung von der Dauer  $\tau$  der Messung abhängt. Allerdings ist diese Zeitabhängigkeit wegen des Logarithmus sehr schwach, und Änderungen von  $R_0\tau$  um einige Größenordnungen haben keinen wesentlichen Einfluß auf die Resultate der Experimente.

Kürzlich wurden Modellrechnungen gezeigt /41/, die den Diffusionskern beschreiben, unter der Voraussetzung, daß die Matrix-TLS räumlich nicht homogen um den Chromophor verteilt sind. Dabei zeigte sich, daß der Diffusionskern zunehmend gaußförmig wird, je mehr Schalen um den Chromophor herum frei von TLS sind.

### 2.3 Die Methode des spektralen Lochbrennens

Farbstoffmoleküle zeigen in ungeordneten Festkörpern eine starke inhomogene Verbreiterung der Absorptionsbanden. Ursache für die Verbreiterung ist die Vielzahl der möglichen Einbaulagen des Farbstoffes. Jede Einbaulage steht für eine geringfügig andere Farbstoff-Matrix-Wechselwirkung und damit für eine spezifische Lösungsmittelverschiebung bezüglich der Vakuumabsorptions-Frequenz. Ist die Probe photoreaktiv, so kann man durch Bestrahlen mit einem Laser, dessen Frequenz im Bereich der Absorptionsbande liegt, eine Klasse von Absorbern selektiv ausbleichen. Im Spektrum erscheint eine spektrale Einkerbung, deren Breite unter gewissen Bedingungen nahe bei der homogenen Linienbreite liegt /42/. Handelt es sich bei der Photoreaktion um eine echte chemische Reaktion, so spricht man von *Photochemie*. Ein Beispiel ist die Rotation von Protonen bei Porphyrinen /43/. Im Gegensatz dazu bezeichnet man mit *Photophysik* eine Änderung der Farbstoff-Matrix-Konfiguration /44/. Beide Mechanismen lassen sich durch die Lage der Absorption ihrer Photoprodukte bezüglich der inhomogenen Bande unterscheiden. Da bei der Photophysik nur eine Umwandlung in bereits

vorhandene Konfigurationen geschieht, liegt hierbei das Produkt innerhalb der inhomogenen Bande in der Nähe des Loches. Photochemie führt zu einer größeren, meist langwelligen Verschiebung.

Da die meisten für das Lochbrennen genutzten Photoreaktionen thermisch reversibel sind, muß bei Temperaturen des flüssigen Heliums gearbeitet werden. Außerdem nimmt die homogene Linienbreite bei steigender Temperatur zu. Spektrale Löcher sind bei tiefen Temperaturen über Jahre hinweg stabil /45/. Der Hauptvorteil der Methode ist die spektrale Schärfe des Loches. Es ist ein äußerst empfindlicher Sensor für Änderungen der Matrix (spektrale Diffusion), für Änderungen innerhalb des Lösungsmittelkäfigs (Photoreaktion, bzw. deren thermische Umkehrung) sowie für Änderungen unter äußeren Parametern (Druck, Temperatur, elektrische Felder).

Die bei der Photoreaktion umgewandelten Moleküle sind zwar bezüglich ihrer Anregungsenergie entartet, haben jedoch i.a. verschiedene mikroskopische Umgebungen. Für das Photoprodukt geht die Energiekorrelation verloren, und es ist breit im Frequenzraum verteilt.

Spektrales Lochbrennen eignet sich ideal zum Markieren eines speziellen Mikrozustandes, wie es für Messungen der spektralen Diffusion verlangt wird (vgl. Kap. 2.2). Es werden genau die Moleküle weggebrannt, die sich bei einer bestimmten Konfiguration der umgebenden Matrix-TLS gerade bei der Laserfrequenz befinden. Die Lochform  $L(\omega-\omega_L)$  ist zu jedem Zeitpunkt  $t$  eine Faltung des ursprünglich gebrannten Loches  $L_b(\omega-\omega_L)$  mit dem Diffusionskern  $D(\omega-\omega_0, t, T)$  der spektralen Diffusion (Gl. 2.9):

$$L(\omega-\omega_L) = \int_{-\infty}^{\infty} d\omega_0 L_b(\omega_0-\omega_L) D(\omega-\omega_0, t, T) . \quad (2.12)$$

Sowohl das gebrannte Loch als auch die Verbreiterung sind lorentzförmig /2/. Der irreversible Beitrag der spektralen Diffusion  $\Delta\omega_{ir}$  kann somit durch einfache Subtraktion der Lochbreiten vor und nach der Änderung ermittelt werden. Anders verhält es sich, wenn, wie im Falle einer

druckinduzierten Lochverbreiterung, die Änderung einen gaußförmigen Kern hat. Dann hat die gemessene Linie ein Voigt-Profil /46/.

## 2.4 Optische Spektroskopie an Proteinen

### 2.4.1 Aufbau und Funktion von Biopolymeren

Proteine sind biologische Makromoleküle, die sich aus 20 bestimmten Aminosäuren zusammensetzen. Die Ziele der Forschung an Proteinen lassen sich grob in verschiedene Teilbereiche gliedern /47/:

- a) Bestimmung der Aminosäure-Sequenz
- b) Ermittlung der räumlichen Struktur und deren Zusammenhang mit der Aminosäure-Sequenz (Faltung)
- c) Bestimmung der Struktur-Funktion Beziehung (Proteindynamik) und deren Abhängigkeit von äußeren Parametern.

Diese Teilbereiche sind stark verknüpft und ergeben nur im Zusammenhang ein Bild der äußerst komplexen Vorgänge, die zum "Funktionieren" von Proteinen notwendig sind. Zur Bestimmung der Aminosäure-Sequenz gibt es mittlerweile eine Reihe ausgefeilter und standardisierter Methoden. Nur in Ansätzen verstanden ist dagegen der Zusammenhang zwischen Sequenz und Faltung /48/.

Proteine sind hochorganisierte Makromoleküle, die eine biologische Funktion zu erfüllen haben. Ihre dreidimensionale Struktur ist deshalb streng vorgegeben und stimmt, auf den ersten Blick, bei verschiedenen Proteinen der gleichen Sorte praktisch überein. Seitdem es geglückt ist, Proteinkristalle herzustellen, kennt man die dreidimensionale Struktur vieler Proteine mit hoher Genauigkeit /49,50,51/. Bald jedoch zeigte es sich, daß die so gewonnenen Strukturdaten im Widerspruch zu der Funktion



des Proteins stehen können. So läßt sich z.B. aus den Röntgendaten kein "Kanal" im Sauerstoff-Speicherprotein Myoglobin finden, der das Eindringen von  $O_2$  ins Innere des Proteins ermöglicht. Eine Aufklärung dieses Problems fand sich mit Hilfe von Messungen der mittleren quadratischen Auslenkung  $\langle \chi^2 \rangle$  einzelner Atome des Protein-Rückgrats, die zeigten, daß Proteine nicht vollkommen starr sind, sondern an bestimmten Stellen der Aminosäurekette eine gewisse Beweglichkeit aufweisen können /52/.

Interpoliert man die gefundenen temperaturabhängigen Daten von  $\langle \chi^2 \rangle$  für  $T \rightarrow 0$ , so erhält man für 51 Aminosäuren nichtverschwindende Werte bei  $T = 0$ . Daraus wurde geschlossen, daß, für viele Atome im Protein, der überwiegende Beitrag zu  $\langle \chi^2 \rangle$  nicht von einfachen harmonischen thermischen Schwingungen herrührt, sondern durch eine Art struktureller Verteilung Zustände kommen. Der Grund liegt in der Komplexität des Aufbaus von Proteinen: Starke kovalente Bindungen bilden die primäre Struktur (Polypeptid-Kette). Schwache Wasserstoff- und Disulfidbrücken verbinden verschiedene Teile der primären Kette und stabilisieren auf diese Weise die Tertiärstruktur. Die Wasserstoffbrücken können eine Vielzahl von Positionen einnehmen und die Seitenketten der Aminosäuren können in verschiedenen Molekülen ebenfalls leicht unterschiedliche Positionen haben. Als Konsequenz kann das gleiche Protein in einer Vielzahl von geringfügig abweichenden Gesamtstrukturen vorkommen.

Frauenfelder et al. /47/ bezeichnen die so entstehenden, geringfügig voneinander abweichenden Proteinstrukturen, mit "Konformations-Subzuständen". Sie erfüllen die gleiche biologische Funktion, z.B. im Falle von Myoglobin das Anbinden von  $O_2$ , jedoch mit unterschiedlichen Raten. Die Konformations-Subzustände haben einen deutlichen Einfluß auf die optische Spektroskopie an Proteinen. Jeder Subzustand stellt für einen, in das Apo-Protein eingelagerten Chromophoren eine andere Nahumgebung dar. Infolgedessen sind die Absorptionlinien mehr oder weniger stark inhomogen verbreitert.

Selbst bei Temperaturen um 1 K sind Konformationsänderungen des



Proteins möglich, die Übergängen zwischen Konformations-Subzuständen entsprechen /5,9/. Frauenfelder et al. konnten in einer Vielzahl von Experimenten zeigen, daß diese Relaxationen unterhalb der Glas temperatur des Proteins eine nichtexponentielle Kinetik aufweisen /53/. Nichtexponentielle Relaxation darf als typisches Merkmal von Systemen hoher Komplexität angesehen werden /71/. Beobachtet wurde dieses Verhalten zum Beispiel für das Wiederanbinden von O<sub>2</sub> oder CO an das Eisenatom des Häm-Farbstoffes in Myoglobin oder Hämoglobin. Meßgröße für diesen Prozess war dabei das Flächenverhältnis von optischen Banden (Soret-Bande) oder von IR-Banden des CO bzw. O<sub>2</sub>-Moleküls. Die Daten konnten erklärt werden, wenn man eine Verteilung g(V) von Potentialbarrieren zwischen der deligierten und der gebundenen Form zugrunde legt. Die Fläche unter den Spektralbanden der deligierten Form ist proportional zur Anzahl der noch nicht wiederangegebenen Moleküle N(t), wobei

$$N(t) \propto \int_0^{\infty} g(V) \exp(-t R_0 \exp(-V/kT)) dV \quad (2.13)$$

Mißt man die Kinetik des Wiederanbindens bei verschiedenen Temperaturen, kann man durch unvollständige inverse Laplace-Transformation des Integrals die Verteilungsfunktion g(V) berechnen. Dies ist jedoch, selbst bei einer Messung über mehrere Größenordnungen in der Zeit, ein schlecht konditioniertes Verfahren. Vielfach wird deshalb eine analytisch vorgegebene Verteilungsfunktion angefitet, z.B. eine Verteilung der Art  $g(V) = V^n \exp(-\psi V)$ , mit  $V_{\max} = n/\psi$  /54/.

In vielen physikalischen Eigenschaften zeigen Proteine ein ähnliches Verhalten wie Gläser, z.B. eine lineare spezifische Wärme bei Temperaturen unterhalb 1 K /55/. Folgerichtig bietet es sich an, auch für Proteine das ursprünglich für Gläser entwickelte TLS Modell zur Erklärung der Messungen zu verwenden. Dabei wird eine Konformationsänderung des Proteins mit einem Übergang, bei tiefen Temperaturen ( $T < 25K$ ) durch Tunneln /56/, in einem TLS gleichgesetzt. Welcher Vorgang sich bei einer Konformationsänderung im

einzelnen abspielt, ist in den meisten Fällen unbekannt.

Eine der wenigen Ausnahmen bildet CO in Myoglobin. Dort bringt man bei Temperaturen oberhalb von 180 K verschiedene Konformationszustände mit unterschiedlichen Bindungswinkeln des CO bezüglich der Häm-Ebene in Verbindung /57,58/. Ein Umklappen des CO in einen anderen Bindungswinkel wird mit einer Konformationsänderung der Proteins in Verbindung gebracht.

#### 2.4.2 Lochbrennen an Proteinen

Voraussetzung für optische Experimente ist das Vorhandensein geeigneter Chromophore die in für Laser zugänglichen Spektralbereichen absorbieren. Deshalb sind solche Proteine, die von Natur aus Farbstoffe enthalten, bevorzugte Kandidaten. In einigen Fällen ist es möglich, Chromophore gezielt auszutauschen, und die für das Experiment gewünschten Eigenschaften somit künstlich zu erzeugen /18/. Insgesamt gibt es momentan nur relativ wenige Proteine, an denen permanente spektrale Löcher gebrannt worden sind. In manchen Fällen wird auch direkt an aromatischen Aminosäuren des Proteingerüsts spektroskopiert. Beispielsweise absorbiert Tryptophan bei 280 nm und weist im sichtbaren Spektralbereich Phosphoreszenzmission auf.

Seit Beginn der achtziger Jahre wird die Lochbrennmethode an Proteinen der Photosynthese und an Transport- und Speicherproteinen angewendet /59/. Die Messungen konzentrieren sich wegen der einzuhaltenden Randbedingungen (vgl. Kap. 2.3) auf tiefe Temperaturen. Man kann drei Schwerpunkte der Forschung erkennen: Die Dynamik angeregter Zustände von Antennenkomplexen, die Dynamik des primären Donor-Zustandes von Reaktionszentren-Proteinen und die Dynamik des Grundzustandes des Proteins als Ganzes. Während sich die beiden ersten Felder mit der Physik der Photosynthese befassen, interessiert man sich im letzten Bereich für

grundlegende Eigenschaften des Festkörperzustandes "Protein".

Die Lochbrennspektroskopie liefert als unmittelbares Ergebnis den Nachweis, ob und wie stark Absorptionsbanden inhomogen verbreitert sind. Betrachtet man die Temperaturabhängigkeit der homogenen Linienbreite, lassen sich Aussagen über die Kopplung von Chromophor und Apo-Protein machen. In Phycocyanin z.B., einem Antennenpigment in Rot- und Blaualgen, verläuft die homogene Linienbreite proportional zu  $T^n$ , mit  $n = 1.16$  /60/. Werte für  $n$  zwischen 1 und 2 sind charakteristisch für amorphe Polymere und Gläser. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Proteindynamik, zumindest bei  $T < 10\text{K}$ , durch glasartige Freiheitsgrade bestimmt sein kann. Extrapoliert man die homogene Linienbreite für  $T \rightarrow 0$ , so erhält man den Wert für die Lebensdauer des angeregten Zustandes, der im o.g. Fall des Phycocyanin zu 1.6 ns bestimmt wurde. Da die Lochbreite bei  $T = 0$  umgekehrt proportional zur Lebensdauer ist, liegt die Stärke der Lochbrennmethode insbesondere bei der Untersuchung kurzlebiger Zustände. In der vorliegenden Arbeit wurden zwar keine temperaturabhängigen Untersuchungen der Linienbreiten in Proteinen durchgeführt, anhand der Lochbreite bei  $T = 1.5\text{ K}$  lassen sich aber untere Grenzen für die Lebensdauer angeben.

Wie auch in Polymeren und Gläsern ist es möglich, Konformationsänderungen in Proteinen auf sehr direkte Weise mit thermischen Zyklen an spektralen Löchern nachzuweisen. Messungen an Phycobilisomen /5/ haben gezeigt, daß unterhalb von 37 K ein Tunnelmechanismus die Relaxation bestimmt, und oberhalb dieser Temperatur thermisch aktivierte Prozesse (beschrieben durch Gl. 2.11) einsetzen. Vorausgesetzt wurde dabei, daß die strukturellen Relaxationen an relativ lokalisierten Gruppen, ähnlich wie in Gläsern, stattfinden. Interessanterweise setzen diese Prozesse schon bei Temperaturen um 4 K ein.

Schließlich läßt sich auch die Verteilung  $g(V)$  von Reaktionsbarrieren des Proteins auf einfache Weise durch Temperaturzyklusexperimente bestimmen /10,61/. Im Gegensatz zur Bestimmung von  $g(V)$  über Kinetik-Messungen hat man hierbei nur geringen numerischen Aufwand zu betreiben.

### 2.4.3 Proteine unter Druck

Frühe Untersuchungen von Proteinen unter hohem Druck konzentrierten sich zunächst auf breitbandige Veränderungen optischer Spektren /62/. Bei der Anwendung von Drücken bis zu 700 MPa an Myoglobin, Hämoglobin, Cytochrom c und Meerrettich-Peroxidase /63/ fand man im wesentlichen ein Einsetzen der Denaturierung verbunden mit Intensitäts- bzw. Positionsänderungen von Spektralbanden. Die Änderungen treten je nach Protein bei verschiedenen Drücken ein und sind z.T. irreversibel.

Weiterhin untersucht wurde auch der Einfluß von Drücken bis zu 600 MPa auf die Fluoreszenz von Tryptophan einiger Ferri-Hämproteine /64/. Die Fluoreszenz wird durch Energie-Transfer vom Tryptophan zur Häm-Gruppe geschwächt, falls durch Druck der Abstand R zwischen Donor und Akzeptor verringert wird. Die Energietransfer-Rate ist stark vom Abstand abhängig und damit ein relativ empfindlicher Nachweis für lokale Konformationsänderungen in der Umgebung des Tryptophan. Ab einem gewissen Druck entfaltet sich das Protein (z.B. 200 MPa für Pottwal-Myoglobin), was zu einer starken Zunahme der Fluoreszenz führt. Wegen verschiedener Nebeneffekte ( z.B. einer Druckabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute um 10% pro 100 MPa) wurden bei diesen Messungen keine Angaben zur Kompressibilität gemacht. Die bislang einzigen quantitativen Aussagen über Protein-Kompressibilitäten bei Raumtemperatur konnten mit Hilfe von Schallgeschwindigkeits-Messungen an Proteinlösungen gemacht werden /65-67/. Dabei wird die adiabatische Kompressibilität  $\kappa_{ad} = -1/V (\delta V/\delta p)_S$  gemessen über  $\kappa_{ad} = 1/\rho c^2$ . Die Dichte  $\rho$  und die Schallgeschwindigkeit  $c$  einer Proteinlösung sind dabei abhängig von der Proteinkonzentration. Die Methode mißt allerdings eine Überlagerung der Kompressibilitäten des Proteins, der Hydrathülle um das Protein sowie des Lösungsmittels. Die Proteinwerte erhält man unter gewissen Annahmen durch Korrekturen der Meßwerte. Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle am Ende von Kap. 6 aufgeführt. Daraus ist auch ersichtlich, daß Proteine, verglichen mit Wasser oder organischen Lösungsmitteln bei

Raumtemperatur, relativ inkompressibel sind.

Die Kompressibilität liefert Information über die Packungsdichte und die molekularen Wechselwirkungen. Was für Proteinmoleküle, wie z.B. Myoglobin, ebenfalls sehr interessant ist, ist die Tatsache, daß sich aus der Kenntnis der Kompressibilität ein Wert für die Größe von Volumenfluktuationen angeben läßt. Für Transportproteine sind ausreichend große Volumenfluktuationen eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion. Ab und zu bilden sich Kanäle im Protein /68/, die es kleinen Molekülen wie O<sub>2</sub> oder CO erlauben, aus der Lösung ins Innere des Proteins, z.B. zum Eisenatom des Häm-Chromophoren zu gelangen, wo sie gebunden werden.

Die relativen Volumenänderungen eines Systems sind bestimmt durch die Kompressibilität, die Temperatur und das Volumen /69,70/:

$$\frac{\Delta V}{V} = \sqrt{\frac{k T \kappa}{V}} \quad (2.12)^{14}$$

Die umfangreichsten Untersuchungen an Proteinen unter Druck wurden wohl an MbCO und MbO<sub>2</sub> gemacht /71/. Hierbei wurde ein Temperaturbereich von 40 K bis 350 K abgedeckt, und Drücke bis zu 400 MPa verwendet. Meßgrößen war u.a. die Frequenzverschiebung der CO-Schwingungsbanden im Infraroten oder der Soret-Bande um 23500 cm<sup>-1</sup>. Da die Verschiebung trotz hoher Drücke relativ gering war ( $\Delta\nu/\nu_{\text{inh}}$  ca. 0.2), wurden jeweils nur Anfangs- und Endzustände angegeben, ohne einen funktionellen Zusammenhang zwischen Druck und Frequenzverschiebung aufzuzeigen. Interessanterweise stellte es sich heraus, daß der Betrag der Verschiebung davon abhängt, ob man zunächst unter die Glastemperatur des Proteins abkühlt und dann Druck anlegt, oder umgekehrt. Dieser Unterschied wird auf Konformationseffekte zurückgeführt. Je nach angelegtem Druck wird das Protein in verschiedenen Konformationen eingefroren, was zu unterschiedlichen Positionen der Banden führen kann. Im Falle der

Soret-Bande wurde der "Konformationsanteil" der Druckverschiebung mit ca. 3 GHz/MPa angegeben. Außerdem ist auch die Kinetik des Wiederanbindens von CO nach einem Lichtblitz abhängig davon, wie der Punkt im pT-Diagramm erreicht wurde.

Insgesamt werden diese Resultate als Hinweis für die Metastabilität des Proteinzustandes gesehen, d.h. der Zustand des Systems hängt unterhalb des Glaspunktes von seiner Vorgeschichte ab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden (Kap. 6), daß dieser Effekt nur bei Anwendung von relativ hohen Drücken auftritt.

### 3. Experimentelles

Der überwiegende Teil der in dieser Arbeit gezeigten Messungen wurde am Institut für Physikalische Chemie der Universität Mainz gemacht. Die Messungen an Carboxymyoglobin stammen aus den Anfangsmonaten der Promotion, die am Lehrstuhl für Experimentalphysik IV in Bayreuth begonnen wurde. Die benutzte Apparatur war bei Beginn der Arbeit in ihren wesentlichen Teilen bereits vorhanden und wurde von W. Köhler konzipiert.

#### 3.1 Versuchsaufbau

##### 3.1.1 Allgemeine Funktionsweise

Bei der verwendeten Apparatur handelt es sich um einen Standard-Aufbau zur Transmissionsspektroskopie (Abb. 3.1). Das Licht einer Xenon-Bogenlampe (XBO) wird durch einen 1-m Monochromator spektral zerlegt. Mittels Linsenoptik und PMMA-Lichtleiter wird der Ausgangsspalt des Monochromators auf die sich im Kryostaten befindliche Probe abgebildet. Das transmittierte Licht wird mit einem GaAs-Photomultiplier (A) detektiert und auf das Signal des Referenzmultipliers (B) normiert. Die Signale der beiden Kanäle gelangen über einen A/D-Wandler und variable RC-Glieder zum Computer. Für Proben mit geringer optischer Dichte (z.B. Proteine) verwendet man vorteilhaft die Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie. Das Emissionslicht wird dabei breitbandig als Funktion der Anregungsfrequenz detektiert, bei gleichzeitiger Unterdrückung des Anregungslichtes mit einem Farbglassfilter.



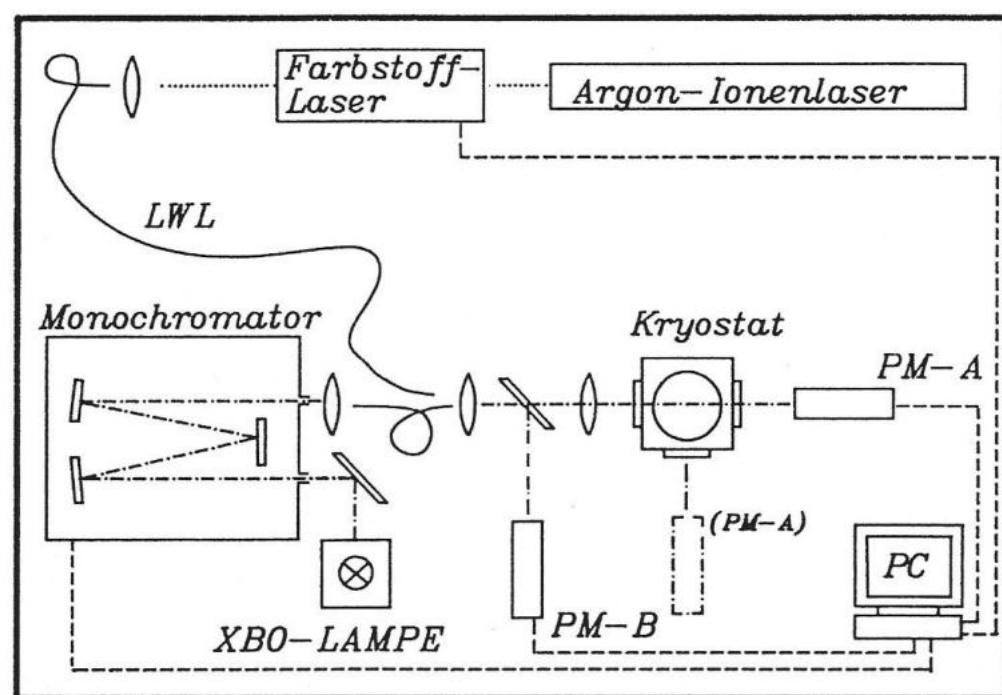


Abb. 3.1: Skizze des Versuchsaufbaus. Die Probe befindet sich im Kryostat.

### 3.1.2 Beschreibung einzelner Komponenten

Der 1-m Czerney-Turner Monochromator stammt von Jobin-Yvon und ist mit einem Gitter mit 1200 Strichen/mm ausgestattet. Er hat eine maximale Auflösung von  $0.16 \text{ cm}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von  $5000 \text{ \AA}$  in 2. Ordnung (Spaltbreite  $10 \text{ \mu m}$ ). Der Monochromator wurde vorwiegend für Übersichtsspektren sowie für Messungen breitbandiger Photochemie benutzt. Lochspektren wurden mittels eines durchstimmbaren CW-Ringlasers (Coherent, 699-21) aufgenommen. Dessen Scan-Bereich beträgt  $30 \text{ GHz}$  ( $\hat{=} 1 \text{ cm}^{-1}$ ) bei einer spezifizierten Auflösung von  $500 \text{ kHz}$  ( $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ ). Der Scan-Bereich muß, insbesondere bei größeren Veränderungen der Wellenlänge, mit Hilfe eines Monitor-Etalons geeicht werden. Die Aufnahme eines Lochspektrums dauerte typischerweise 30 sek. Die Verwendung eines Lichtleiters erlaubte einen schnellen Wechsel vom Monochromator zum Laser,



---

ohne die Strahlgeometrie und vor allem die Justierung des Strahles auf der Probe zu verändern. Bei einer großen Entfernung zwischen Laser und Kryostat (z.B. Aufstellung in verschiedenen Labors) ist eine direkte Übertragung des Lichtes mit Hilfe von Spiegeln aufgrund von Gebäudevibrationen sehr instabil. Der Lichtleiter selbst mußte im Gegensatz dazu bewußt in Vibration versetzt werden (z.B. mit Hilfe einer laufenden Pumpe). Dadurch wurde das typische Spekle-Muster quasi weggemittelt und die Stabilität des Signals entscheidend verbessert. Der Lichtpunkt auf der Probe hatte einen Durchmesser von ca. 1 mm. Die optischen Bauteile sind mit Bälgen lichtdicht verbunden und können in kurzer Zeit in anderer Konfiguration aufgebaut werden.

Alle Proben waren bei Raumtemperatur flüssig. Sie wurden, außer bei Druckmessungen, in Flachglas-Küvetten gefüllt und anschließend eingefroren. Die Dicke der Probe in Strahlrichtung betrug 1–2 mm. Zur Erzeugung von Temperaturen im Bereich von 1.2 K bis 4.2 K fand ein He-Badkryostat mit optischen Fenstern (Eigenbau, Universität Bayreuth) Verwendung. Durch Abpumpen des He-Bades und geregelter Gegenheizen konnte in diesem Temperaturbereich eine Genauigkeit von 1/100 K erreicht werden. Die Temperaturmessung erfolgte direkt über Ablesen des Dampfdruckes oder indirekt über geeichte Kohle-Widerstände. Zusätzlich erlaubte ein He-Durchflußkryostat Messungen im Temperaturbereich von 2.7 K bis Raumtemperatur. Ab ca. 50 K wurde die Temperatur mit Hilfe eines DIN-Platinwiderstandes gemessen.

Üblicherweise wurde der Laser um einen Faktor  $10^6$  vor der Probe abgeschwächt. Zum einen vermeidet dies ein Aufheizen der Probe, zum anderen sind die benötigten Intensitäten zum Auslösen einer Photoreaktion bei tiefen Temperaturen entsprechend gering. Für Lochbrennen an Porphyrinen genügten Brennintensitäten von einigen  $10 \text{ nW/cm}^2$ . Beim Brennen wurde bei fester Laserfrequenz für eine gewisse Zeit (einige Minuten) auf die Probe eingestrahlt. Anschließend wurde die Intensität nochmals um einen Faktor  $10^2$  bis  $10^3$  verringert, um ein "Nachbrennen" beim Scan des Loches zu

---

vermeiden. Die Löcher hatten meist eine relative Tiefe von 30 % und waren deshalb teilweise aufgrund von Sättigungseffekten /2/ künstlich verbreitert. Für die vorliegenden Messungen war dies jedoch nicht von Bedeutung, da man sich für *Änderungen* von Meßgrößen interessiert, die von den Parametern des ursprünglichen Loches unabhängig sind. Erfassung und Auswertung der Daten geschah mit IBM-kompatiblen 16MHz PC-AT.

### 3.2 Durchführung der thermozyklischen Experimente

Bei dieser Art von Experiment /28,72,73/ wird zunächst durch Einstrahlen bei einer Brenn-Temperatur  $T_b$ , die i.a. die tiefste erreichbare Temperatur ist, eine Photoreaktion ausgelöst. Erfolgt die Einstrahlung schmalbandig, so wird dadurch ein spektrales Loch erzeugt. Benutzt man zur Einstrahlung breitbandiges Licht (z.B. Monochromator mit großer Spaltöffnung), kann ein größerer Teil der inhomogenen Bande ausgebleicht werden. Nun wird die Temperatur im Durchflußkryostat auf die Zyklus-Temperatur  $T_c$  erhöht, die den Meßparameter des Experiments darstellt. Nach einer bestimmten Wartezeit bei  $T_c$  wird die Temperatur wieder auf den Wert von  $T_b$  erniedrigt und ein Spektrum gemessen. Die Dauer für einen einzelnen Zyklus liegt bei einigen Minuten. Die Variable des Experimentes ist die Zyklustemperatur, die schrittweise um ca. 1–2 K erhöht wird.

Gemessen werden, im Falle eines spektralen Loches, Änderungen der Lochbreite, der Lochfläche sowie der Lochmitten-Frequenz. Es wird stets bei der Brenntemperatur  $T_b$  gemessen. Somit erfaßt diese Methode ausschließlich irreversible Änderungen der Lochparameter. Falls sich das Loch bei dieser Prozedur verbreitert und wiederauffüllt wird das Experiment dann beendet, wenn bei hohen Zyklus-Temperaturen das Loch sehr flach wird und das Signal-Rausch-Verhältnis unter einen tolerierbaren Wert absinkt.

Im folgenden werden auch sogenannte "Mehrfachzyklen" behandelt. Hierbei wird stets zwischen der Brenn-Temperatur und einer einzigen, festen Zyklus-Temperatur variiert. Dabei soll festgestellt werden, ob sich das Loch nach dem ersten Zyklus noch weiter verändert.

Bei hohen Zyklustemperaturen dauert der Temperatúrausgleich zwischen He-Gas und Probe mehrere Minuten. Deshalb ist es unbedingt erforderlich, einen Meßwiderstand direkt an der Probe zu befestigen. Erst wenn sich dessen Wert gut stabilisiert hat, gilt die Zyklustemperatur als erreicht.

### 3.3 Hydrostatische Druckvariation

Ziel dieser Experimente war es, die Auswirkung hydrostatischen Druckes auf spektrale Löcher bei Helium-Temperaturen zu untersuchen. Dazu wurde von W. Breinl eine mit Indium gedichtete Druckmeßzelle aus Edelstahl mit zwei 3 mm dicken optischen Fenstern konstruiert. Die Proben werden bei Raumtemperatur in die Zelle eingesetzt und diese dann in flüssiges Helium gebracht. Drucküberträger ist He-Gas, das durch eine Kapillare in die Zelle strömt. Der Druck wird durch eine He-Gasflasche aufgebaut, aus der das Gas mittels Ventilsystem entnommen und geregelt wird. In demjenigen Teil des Drucksystems, das sich unterhalb des Helium-Flüssigkeitsspiegels des Bades befindet, kondensiert das Gas ein. Der Druck wird außerhalb des Kryostaten durch einen Präzisions-Drucksensor gemessen. Der Sensor hat eine relative Genauigkeit von 10 hPa bei einem Meßbereich von 10 MPa (\*).

Bisherige Druckexperimente an spektralen Löchern wurden ausschließlich an festen Polymerproben gemacht /11,14/. Die in dieser Arbeit verwendeten Proben waren bei Raumtemperatur flüssig und konnten nicht einfach in die Druckzelle gegeben werden. Sie hätten möglicherweise beim Einfrieren an

---

(\*)  $1 \text{ hPa} \hat{=} 1 \text{ mBar}$  ,  $1 \text{ MPa} \hat{=} 10 \text{ Bar}$

der Innenwand der Zelle oder den Fenstern festfrieren können und würden somit durch das He-Gas nicht isotrop belastet. Außerdem läßt sich auf diese Weise keine definierte Probendicke bzw. Probenform herstellen. Es wurde deshalb ein Verfahren entwickelt, bei dem jeweils ein Tropfen der Flüssigkeit bei Raumtemperatur in einen kleinen, selbstgefertigten Plastikbeutel mit 6 mm Durchmesser und 1 mm Dicke eingeschweißt wurde. Anschließend wurde dieser in der Zelle zentriert. Das flexible und optisch transparente Plastikmaterial gab den Druck gut auf die Probe weiter.

Bei einem Druckexperiment wird zunächst ein Loch bei festem Druck (zumeist Atmosphärendruck) gebrannt und anschließend bei verändertem Druck spektroskopiert. Der maximal verwendete Druck bei  $T=1.5$  K lag bei 2.4 MPa, da Helium bei dieser Temperatur bei 2.5 MPa fest wird. Dies reichte in allen Fällen aus, um deutlich meßbare Änderungen im Lochspektrum zu bewirken. Aufgrund der Schärfe der Löcher begannen sie sich schon bei wenigen 10 hPa zu verändern. Es stellte sich bei allen Messungen heraus, daß nach Wegnahme des Drucks und anschließendem Scan alle Druckeffekte vollkommen reversibel waren. Dies galt sowohl für die Lochbreite als auch für die Lochfläche.

### 3.4 Vorstellung der untersuchten Systeme

#### 3.4.1 Resorufin in Alkohol-Gläsern

Die Abbildungen 3.2 bis 3.4 zeigen Absorptionsspektren von Resorufin in Ethanol/Methanol (Volumenverhältnis 3/1), Ethylenglykol/Wasser (EGH, Volumenverhältnis 1/1) sowie Glyzerin im Bereich der niederenergetischen Singulett-Übergänge. Die Konzentration betrug jeweils ca.  $10^{-4}$  Mol/l. Da an diesen Proben ausschließlich Druckmessungen durchgeführt wurden, werden hier die Brennfrequenzen für diese Messungen mit Pfeilen über den 0-0 Banden markiert. In den Einschüben ist jeweils das Verhalten eines Loches unter Druck zu sehen. Die Spektren werden in der gezeigten Reihenfolge zunehmend strukturlos. Eine Abschätzung der inhomogenen Breiten (FWHM) der längstwelligen Banden sowie deren Zentralfrequenzen führte bei 1.5 K zu folgenden Werten:

Matrix	Zentralfrequenz	FWHM
Ethanol/Methanol:	17295 $\text{cm}^{-1}$	350 $\text{cm}^{-1}$
Ethylenglykol/Wasser:	17480 $\text{cm}^{-1}$	800 $\text{cm}^{-1}$
Glyzerin:	17290 $\text{cm}^{-1}$	1000 $\text{cm}^{-1}$

Ebenfalls eingezeichnet, und mit " $\nu_{\text{vac}}$ " bezeichnet, sind die Vakuum-Absorptionsfrequenzen des Farbstoffes Resorufin, wie sie in Kap. 6.2.1 bestimmt werden, sowie das Molekül Resorufin.

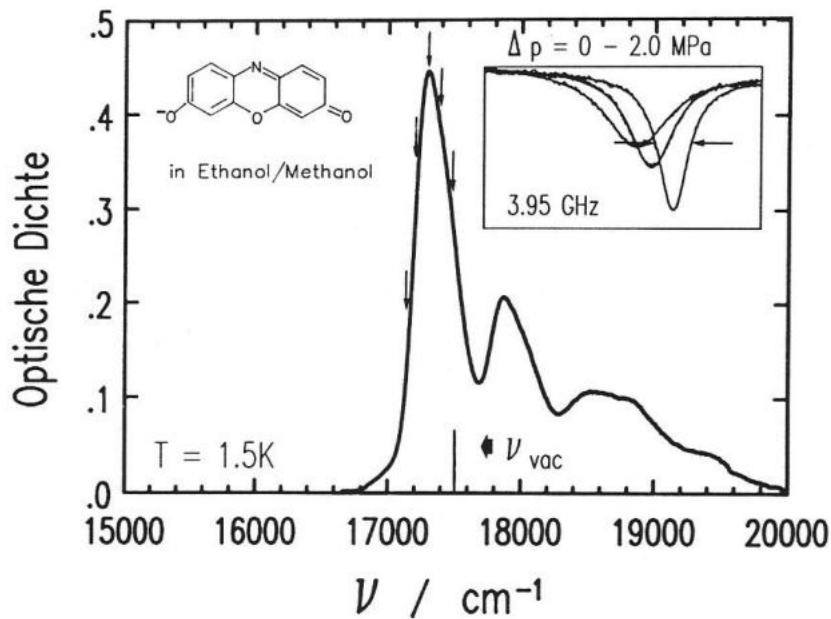


Abb. 3.2: Absorptionsspektrum von Resorufin in Ethanol/Methanol bei 1.5 K. Die Pfeile markieren die Brennpunkten der Druckexperimente. Der Einschub zeigt ein typisches Loch unter Druck an einer bestimmten Position innerhalb der inhomogenen Bande.

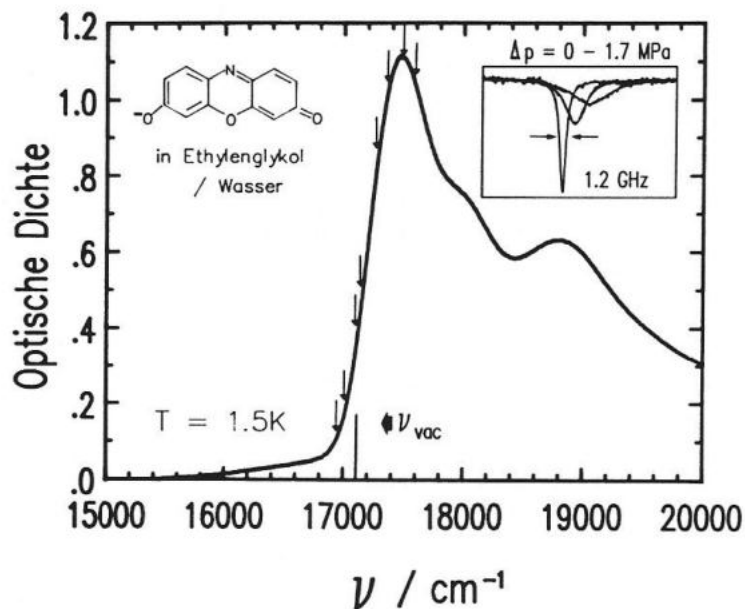


Abb. 3.3: Absorptionsspektrum von Resorufin in Ethylenglykol/Wasser bei 1.5 K. Die Pfeile markieren die Brennpunkten der Druckexperimente. Der Einschub zeigt ein typisches Loch unter Druck an einer bestimmten Position innerhalb der inhomogenen Bande.

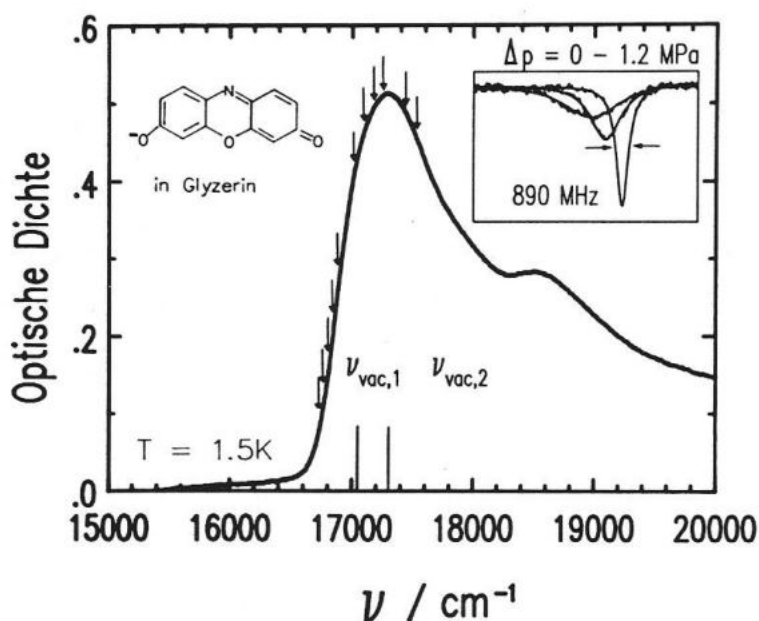


Abb. 3.4: Absorptionsspektrum von Resorufin in Glycerin bei 1.5 K. Die Pfeile markieren die Brennpunkten der Druckexperimente. Der Einschub zeigt ein typisches Loch unter Druck an einer bestimmten Position innerhalb der inhomogenen Bande.

### 3.4.2 Mesoporphyrin IX substituierte Meerrettich-Peroxidase

Bei dem untersuchten Protein handelt es sich um das Isoenzym C von Meerrettich-Peroxidase (MRP). MRP ist ein Häm-Glycoprotein, das die Oxidation einer Reihe von Substratmolekülen in Pflanzenwurzeln katalysiert. Das Molekulargewicht beträgt ca. 34 kD. Um frequenzselektive Photoreaktionen zu ermöglichen, war die Häm-Gruppe durch den Chromophor Mesoporphyrin IX (MP) ausgetauscht worden. Es wurde bereits früher gezeigt, daß das Enzym trotz des Austausches seine Substrat-Bindungseigenschaften beibehält [74] und energiselektive Fluoreszenzspektroskopie möglich ist [75]. Die Proben wurden mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  in 20 mM Acetatpuffer bei pH 5 bzw. pH 8 hergestellt. Für die Messungen wurde zur Gewährleistung der Transparenz 50 Volumenprozent Glycerin zugegeben.



---

Abb. 3.5 zeigt ein Fluoreszenz–Anregungsspektrum von MRP/pH8 bei 1.5 K. Die Spektren der pH8– und pH5–Proben sind praktisch identisch. Die mit B1 und B3 bezeichneten Banden stellen, wie durch Lochbrennexperimente gezeigt wird, die elektronischen 0–0 Übergänge zweier tautomerer Formen dar. B1 liegt bei  $16310\text{ cm}^{-1}$  mit einer Breite von  $60\text{ cm}^{-1}$  (FWHM) und B3 liegt bei  $16090\text{ cm}^{-1}$  mit einer Breite von ebenfalls  $60\text{ cm}^{-1}$ . B3 ist bei der pH5–Probe etwas weniger stark ausgeprägt. Durch Einstrahlen in diese Banden können weitere, davon verschiedene Banden erzeugt werden (Kap. 3.4.4).

### Mesoporphyrin IX in Glycerin

MP ergibt in Glycerin bei einer Konzentration von ca.  $10^{-6}$  Mol/l das in Abb. 3.6 gezeigte Fluoreszenz–Anregungsspektrum. Obwohl es prinzipiell dem von MRP ähnelt, fällt die, verglichen mit dem Protein MRP, größere inhomogene Bandbreite des 0–0 Übergangs von  $220\text{ cm}^{-1}$  auf. Messungen an diesem System dienen vor allem dazu, festzustellen, wie stark der Chromophor im Inneren des Proteins vom Lösungsmittel Glycerin abgeschirmt ist, und inwieweit die Messungen tatsächlich Proteineigenschaften wiedergeben. Untersuchungen der  $\text{O}_2$ –Diffusion in MRP deuten darauf hin, daß der Chromophor sich an einer zentralen Position im Apo–Protein befindet [76].



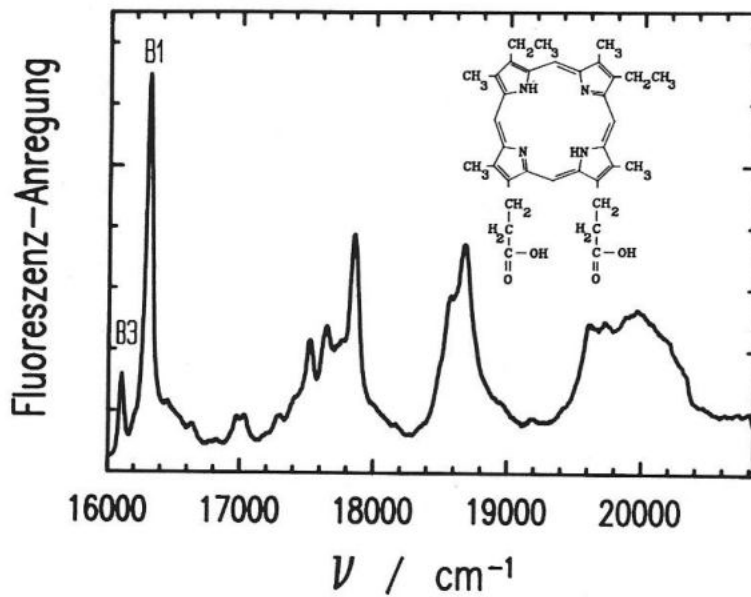


Abb. 3.5: Fluoreszenz-Anregungsspektrum von Mesoporphyrin IX substituierter Meerrettich-Peroxidase (pH8). Die Banden B1 und B3 sind 0-0 Übergänge verschiedener tautomerer Formen.

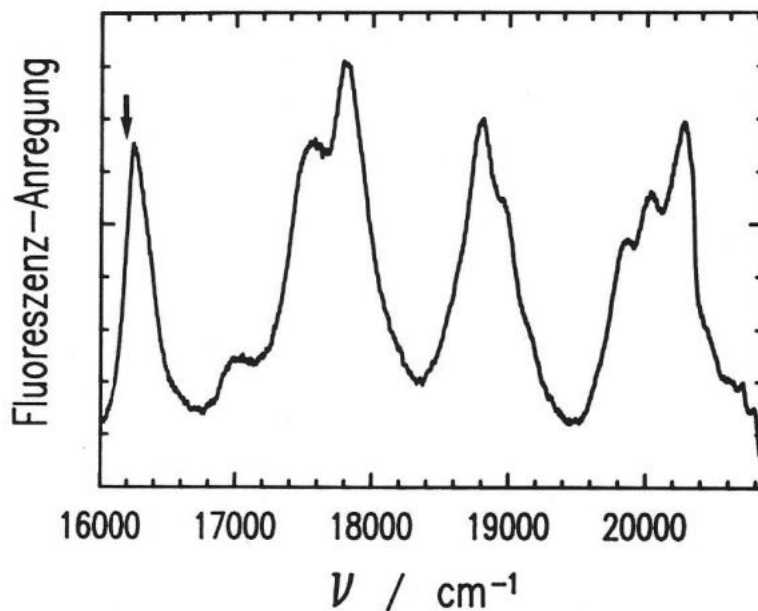


Abb. 3.6: Fluoreszenz-Anregungsspektrum von MP in Glycerin. Die 0-0 Bande ist deutlich verbreitert im Vergleich zum Protein MRP. Der Pfeil zeigt die Position des Lochbrennexperimentes.

### 3.4.3 Carboxy-Myoglobin (MbCO) und substituiertes Myoglobin (MbP)

Myoglobin, das im Muskel von Vertebraten vorkommt, dient als Sauerstoffspeicher und ermöglicht auch den Sauerstofftransport innerhalb des Muskels [77]. Die Skizze in Abb. 3.7 zeigt schematisch den Aufbau von Carboxy-Myoglobin: Es besteht aus dem Apo-Protein Globin sowie der prosthetischen Häm-Gruppe. Das Häm-Molekül setzt sich aus einem organischen Teil und einem Eisenatom zusammen. In biologischen Systemen ist der organische Teil das Isomere Protoporphyrin IX. Das Eisenatom im Häm ist an die vier Stickstoffatome im Zentrum des Protoporphyrinrings angebunden. Die Häm-Gruppe ist in einer Art Tasche im Apo-Protein untergebracht und ist mittels der fünften Koordinationsstelle des Eisenatoms an das proximale Histidin des Globins gebunden. Die sechste Koordinationsstelle bindet den Sauerstoff bzw. Kohlenmonoxid. Die Größe der Proteintasche beträgt etwa  $200 \text{ \AA}^3$  [71].

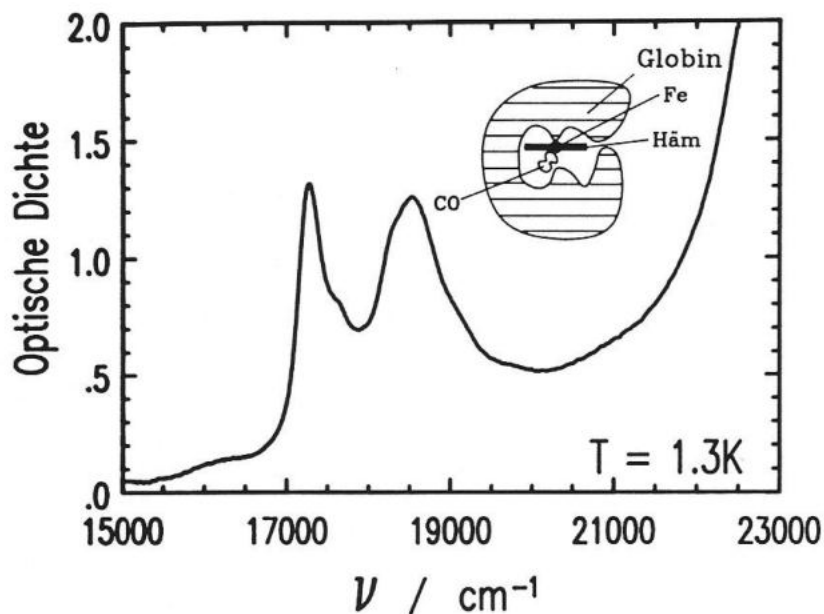


Abb. 3.7: Absorptionsspektrum von Pferde-MbCO bei  $T = 1.3 \text{ K}$ . Die eingefügte Skizze zeigt schematisch den Aufbau des Proteins, wie im Text erläutert.

Im vorliegenden Fall wurde für die Messungen CO-substituiertes Pferdemyoglobin verwendet. Abb. 3.7 zeigt das Absorptionsspektrum von Carboxy-Myoglobin im sichtbaren Spektralbereich bei 1.3 K. Die ansteigende Bande am rechten Rand des Spektrums wird als Soret-Bande bezeichnet. Die Einwaage betrug 30 mg/ml. Für die Experimente wurden 2 ml MbCO mit 6 ml Glycerin verdünnt.

Die Myoglobin-Banden bei  $17270\text{ cm}^{-1}$  und  $18520\text{ cm}^{-1}$  sind nur zum Teil inhomogen verbreitert. Neuere Messungen zeigen /78/, daß der Anteil der homogenen Verbreiterung nahezu 60 % beträgt. Schmalbandiges Lochbrennen ist deshalb nicht möglich. Deshalb wurde die Hämgruppe durch Protoporphyrin IX ersetzt. Einerseits verliert das Protein zwar seine biologische Funktion, andererseits wurde auf diese Weise jedoch schmalbandiges Lochbrennen möglich, und es konnten Messungen durchgeführt werden, die interessante Aussagen über die Chromophor-Protein Wechselwirkung erlauben.

Das Fluoreszenz-Anregungsspektrum von Protoporphyrin IX substituiertem Myoglobin (Abb. 3.8) zeigt im groben die gleiche Struktur wie die oben gezeigten Porphyrin-Spektren. Die optische Dichte der Probe war relativ gering und betrug ca. 0.01. Die Probe bestand aus einer Mischung von 1 ml Protein/Wasser Lösung (3.56 mg des substituierten Myoglobin / 1 ml) mit 3 ml Glycerin. Das Maximum des  $S_1 \leftarrow S_0$  Übergangs liegt bei einer Frequenz von  $16080\text{ cm}^{-1}$ . Bei genauer Betrachtung wird deutlich, daß sich diese Bande aus drei Banden zusammensetzt, die mit (1) bis (3) bezeichnet wurden. Diese Überlappung wurde insbesondere bei den Lochbrennexperimenten unter Druck genauer untersucht (siehe Kap. 6). Die Werte der einzelnen Bereiche dieser Bande sind:

Bereich	Position	Breite (FWHM)
(1)	$15990\text{ cm}^{-1}$	ca. $130\text{ cm}^{-1}$
(2)	$16080\text{ cm}^{-1}$	ca. $130\text{ cm}^{-1}$
(3)	$16300\text{ cm}^{-1}$	(nicht bestimmbar)

Der Einschub in Abb. 3.8 zeigt noch einmal die Banden 1 und 2 mit Markierungen der Lochbrennpositionen für die Druckexperimente.

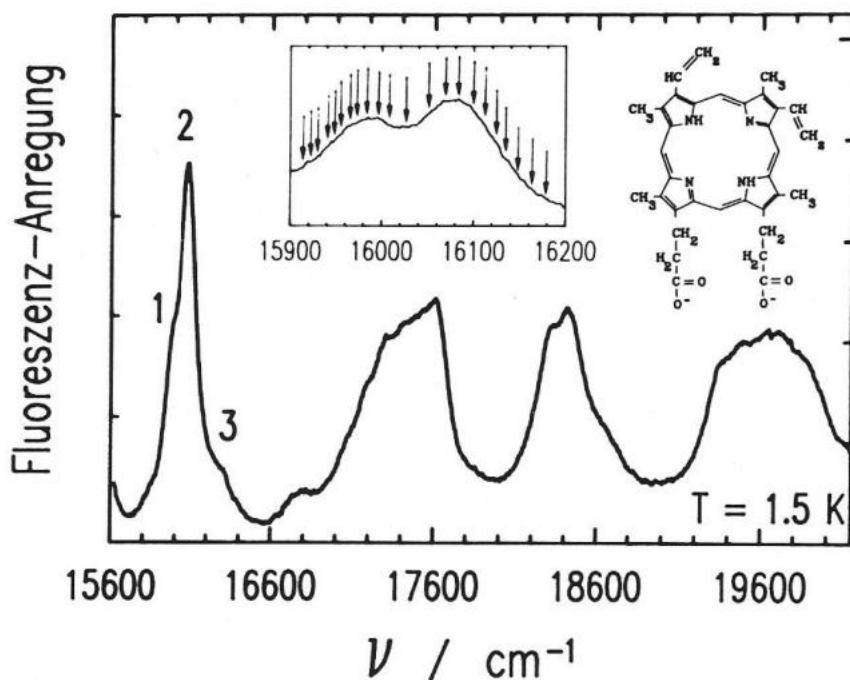


Abb. 3.8: Fluoreszenz-Anregungsspektrum von Protoporphyrin IX substituiertem Myoglobin. Der Einschub zeigt vergrößert den Bereich der Banden 1 und 2. Die Pfeile markieren die Brennpositionen für Druckmessungen.

#### 3.4.4 Charakterisierung der Photoreaktion

Brennt man ein tiefes Loch mit einem nennenswerten Umsatz an Farbstoffmolekülen und bildet anschließend die Differenzspektren vor und nach dem Lochbrennen, so erhält man die Nettobilanz der spektralen Umverteilung durch die Photoreaktion [72].

### a) Resorufin in Alkohol-Gläsern

Ein detailliertes Verständnis der Photoreaktion ist für die an diesen Systemen durchgeführten Druckmessungen nicht notwendig. Neuere Messungen von P. Schellenberg geben jedoch Aufschlüsse über deren Natur /79/. Aus der spektralen Verteilung des Photoproduktes schließt man auf einen photochemischen und einen photophysikalischen Anteil der Photoreaktion. Vermutlich handelt es sich beim photochemischen Anteil um eine lichtinduzierte Protontransferreaktion zwischen Alkohol und Resorufin.

### b) Meerrettich-Peroxidase

Die Photoreaktion in MRP besteht, analog zu der des Porphins /43/, in einer Umlagerung der inneren Protonen des Chromophors MP. Die Messungen haben jedoch klar gezeigt, daß die Photochemie keinesfalls mit einem einfachen Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden kann, sondern daß mindestens vier stabile Photoprodukte vorliegen müssen. Diese Konfigurationen konnten durch Einstrahlen und Temperaturänderungen ineinander überführt werden. Die Barrieren der thermisch aktivierten Umverteilung waren Gegenstand der Untersuchungen in Kapitel 4.

Abb. 3.9 stellt zunächst das Verhalten der pH5-Probe dar. Ein breitbandiges Ausbleichen der Bande bei  $16310\text{ cm}^{-1}$  (B1) führt zur Verstärkung der zuvor schwachen Struktur bei  $16090\text{ cm}^{-1}$  (B3). Die Photoreaktion ist auch in den höherfrequenten Schwingungsbanden erkennbar und erlaubt Aussagen über deren Korrelation mit den 0-0 Übergängen (Pfeile). Außerdem entsteht bei  $16200\text{ cm}^{-1}$  eine schwache Bande (B2). Ein weiteres Phänomen sieht man in Abb. 3.10: Auf Kosten von B2 und B3 entsteht bei Temperaturerhöhung auf ca. 30 K eine neue Bande bei  $16000\text{ cm}^{-1}$  (B4).

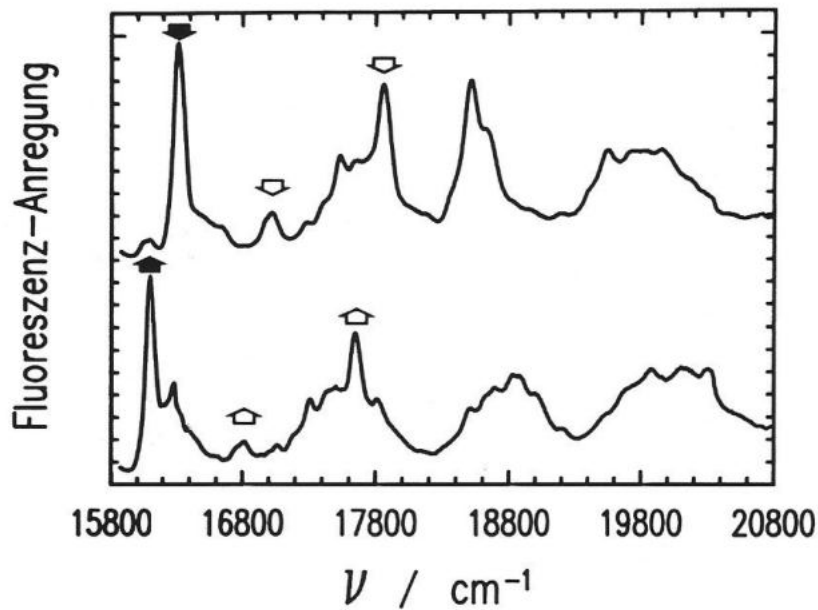


Abb. 3.9: Fluoreszenz-Anregungsspektrum von MRP/pH5 vor (oben) und nach (unten) einer "breitbandigen" Einstrahlung bei  $16310 \text{ cm}^{-1}$  mit dem Monochromator.

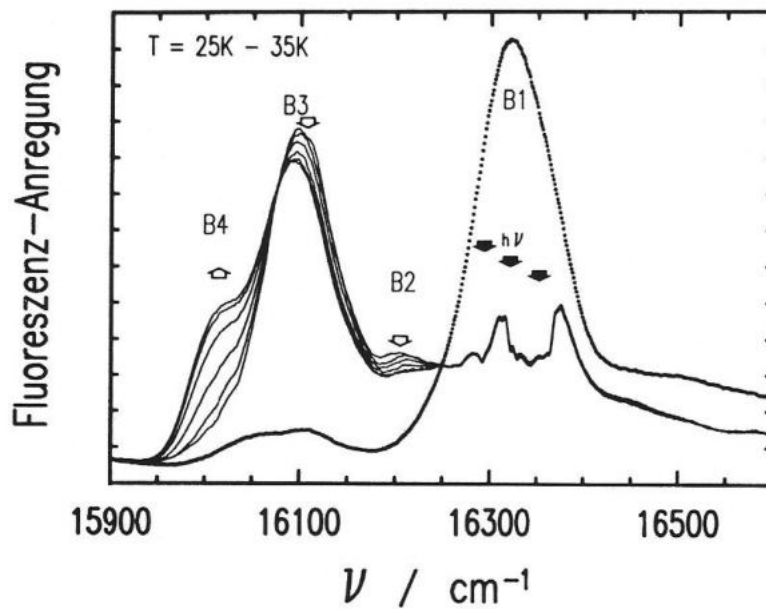


Abb. 3.10: Thermisch induzierte Erzeugung einer Bande bei  $16000 \text{ cm}^{-1}$  (B4) unter Rückgang der  $16090 \text{ cm}^{-1}$  Bande (B3) und der schwachen  $16200 \text{ cm}^{-1}$  Bande (B2).

Anders ist das Verhalten der pH8-Probe. Wie Abb. 3.11 zeigt, wird bei Einstrahlung in die B1-Bande hauptsächlich die Bande B2 erzeugt. Hier kann man thermisch *keine* B4-Bande erzeugen, es erfolgt lediglich eine Transformation von B2 nach B3.

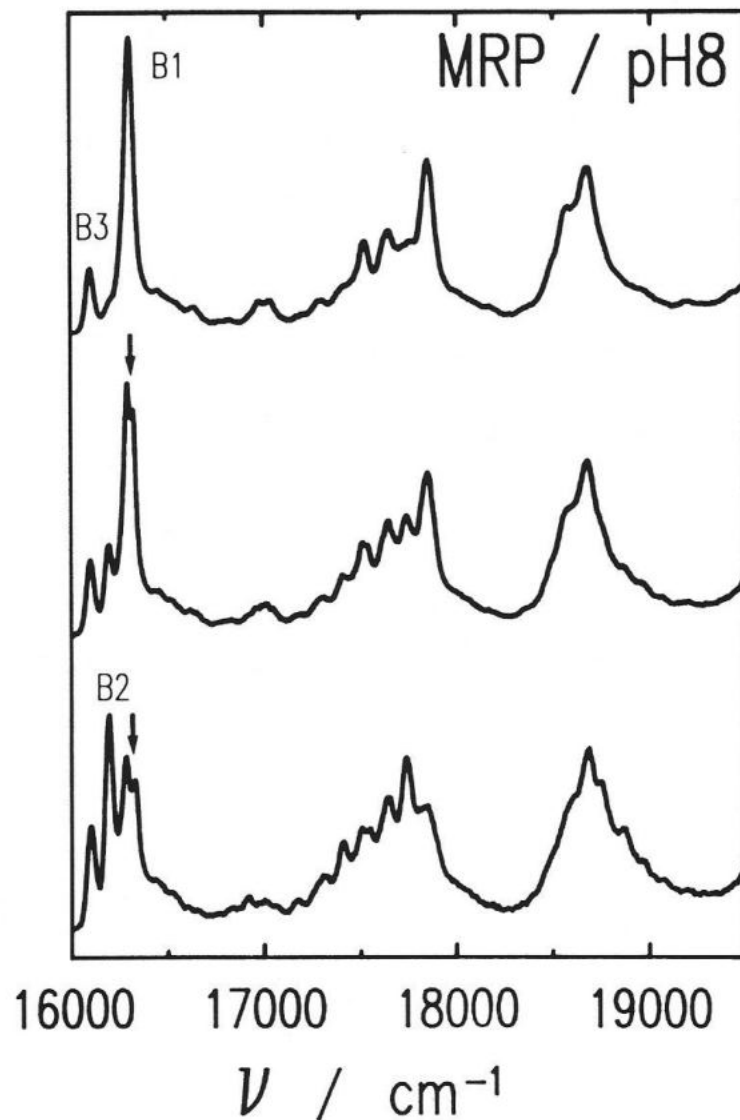


Abb. 3.11: Die Bildfolge zeigt, wie durch fortgesetztes Einstrahlen bei B1 die Bande B2 erzeugt wird. Probe: MRP/pH8.



Für breitbandige Photoreaktionen wurde mit dem Monochromator eingestrahlt. Bei einem Bandpaß von  $30 \text{ cm}^{-1}$  und einer Intensität von ca.  $70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  reichten dafür 30 min aus.

Thermozyklische Lochbrenn-Experimente wurden in den Banden B1, B3 und B4 der pH5-Probe durchgeführt, Druckexperimente in der B1-Bande der pH5-Probe sowie in den Banden B1 bis B3 der pH8-Probe. Die Löcher hatten bei 1.5 K Linienbreiten von weniger als 350 MHz ( $10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ ). Dies liefert eine untere Abschätzung für die Lebensdauer des angeregten Zustandes von 0.9 nsec. Diese Zeiten sind typisch für rein elektronische  $S_1 \leftarrow S_0$  Übergänge ist und schließen aus, daß es sich bei den verschiedenen Übergängen um Schwingungszustände handelt.

Seiner biologischen Funktion entsprechend /74/ kann MRP Substratmoleküle aufnehmen, was sich im Spektrum deutlich bemerkbar macht. Abb. 3.12 zeigt die, durch Zugabe von Naphthalincarbonsäurehydroxyamid (NHCA) verursachten spektralen Änderungen. Ausgehend vom reinen MRP-Spektrum entstehen zwei Banden bei  $16260 \text{ cm}^{-1}$  (FWHM  $95 \text{ cm}^{-1}$ ) und  $16176 \text{ cm}^{-1}$  (FWHM  $130 \text{ cm}^{-1}$ ). An dieser Probe wurden ausschließlich Druckmessungen durchgeführt.

Verschiedene Aspekte dieser hier gezeigten Proteinspektren demonstrieren, daß Proteine sich an der Grenze zwischen Ordnung und Unordnung befinden. Zunächst gibt es, wie in Kristallen, diskrete 0 – 0 Energien die verschiedene tautomere Zustände charakterisieren und auf relativ geordnete Bereiche innerhalb der Proteintasche hindeuten. Zweitens sind diese diskreten Energien, wie in Gläsern, inhomogen verbreitert. Die Verbreiterung (ca.  $60 \text{ cm}^{-1}$ ) ist zwar merklich stärker als in Kristallen, auf der anderen Seite jedoch deutlich schmaler als ein typischer Wert von einigen hundert Wellenzahlen, wie man ihn in Gläsern findet.

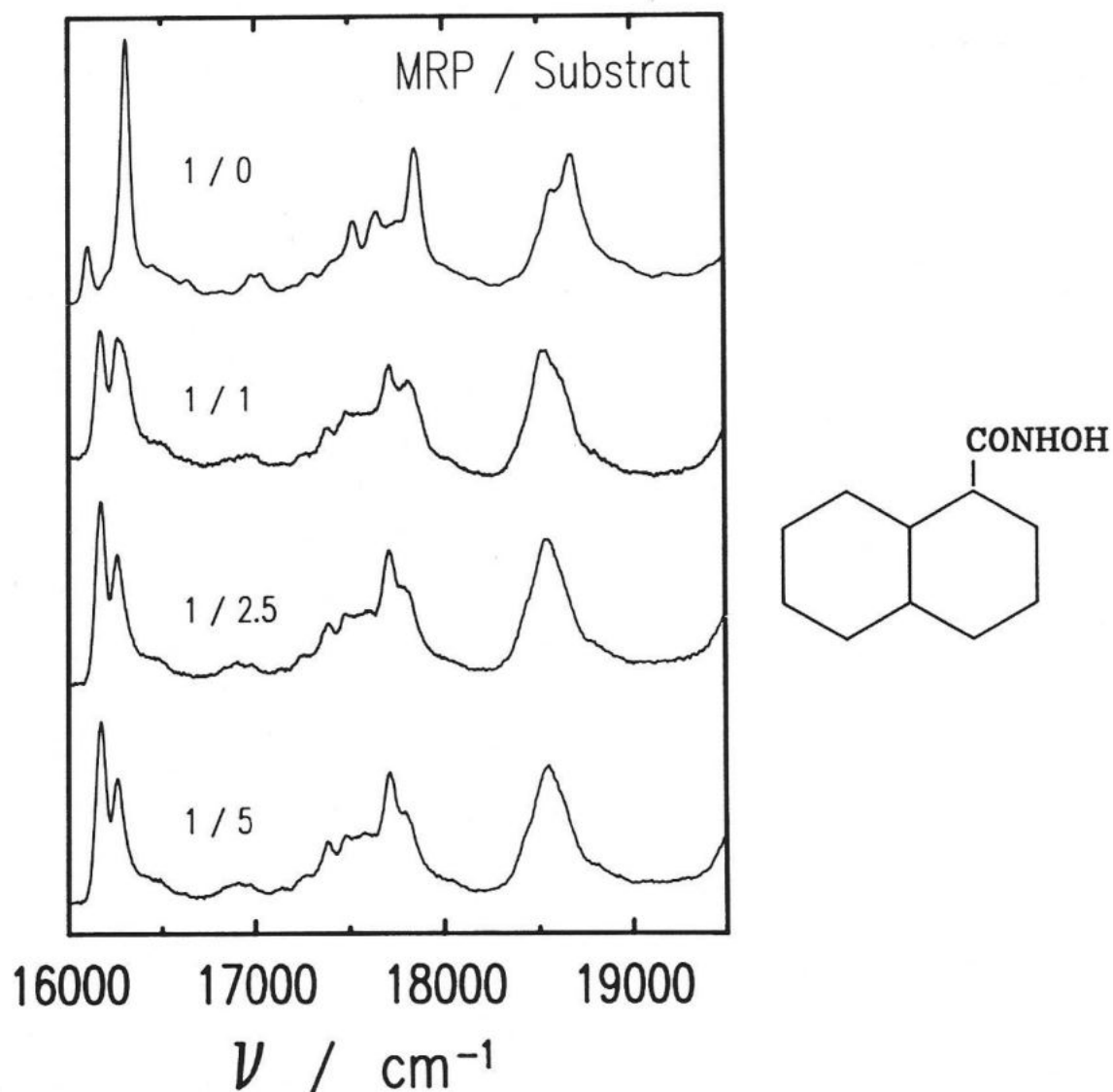


Abb. 3.12: Fortgesetzte Zugabe des Substratmoleküls NCHA zu MRP/pH5 (von oben nach unten). Die Zugabe führt zu deutlichen Änderungen im Bereich des 0-0 Übergangs. Die Struktur von NCHA wird ebenfalls gezeigt.

### c) Carboxy-Myoglobin und substituiertes Myoglobin

In MbCO konnten keine scharfen spektralen Löcher gebrannt werden. Jedoch findet bei Einstrahlung von Licht eine breitbandige Änderung des Spektrums statt. In diesem Falle besteht die Photoreaktion in einem Abspalten des CO vom Häm-Molekül. Bei tiefen Temperaturen bleibt das CO dabei innerhalb der Protein-Tasche /80/. Der deligierte Zustand ist durch eine Reaktionsbarriere gegenüber dem gebundenen Zustand stabilisiert. Diese hängt ihrerseits von der Konformation des Proteins ab. Abb. 3.13 verdeutlicht die durch fortgesetztes Einstrahlen erzeugten Änderungen im Spektrum. Sie sind praktisch unabhängig von der Einstrahl-Frequenz.

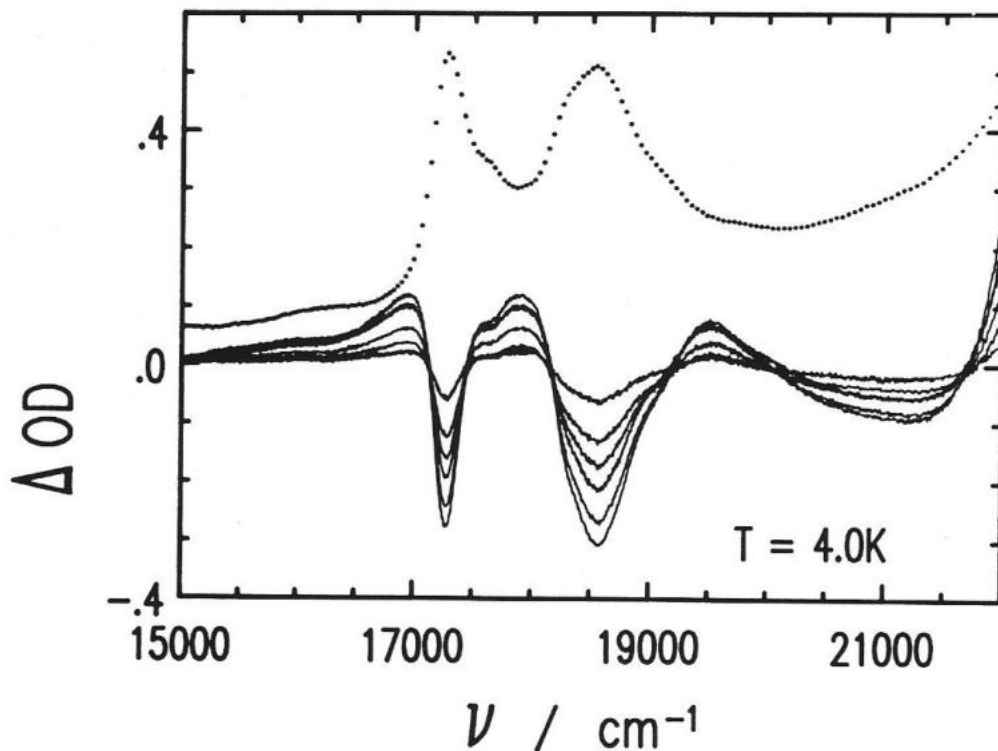


Abb. 3.13: Differenzspektren von MbCO unter fortgesetzter Lasereinstrahlung. Die Frequenz des eingestrahnten Lichtes ist praktisch beliebig. Punktiert: Absorption in bel. Einheiten.

---

Wird die Häm-Gruppe durch Protoporphyrin IX ersetzt, so betrachtet man natürlich eine vollkommen andere Photoreaktion, nämlich wie bei MRP eine Protonentransferreaktion. Allerdings wurde bei dieser Probe keine Untersuchung des Photoproduktes vorgenommen.

### 3.5 Hinweise zur Auswertung spektraler Löcher

Spektrale Löcher sind im Grenzfall kleiner Brennenergien lorentzförmig /2/. Eine numerische Anpassung (Fit) lieferte Werte für Breite, Fläche sowie Lochmitten-Frequenz. Für Messungen der spektralen Diffusion ( Kap. 5 ) interessierten *Änderungen* der Lochbreite. Da der Diffusionskern der spektralen Diffusion im Falle dipolarer Wechselwirkung ebenfalls lorentzförmig ist, kann man diesen durch einfache Subtraktion der Breiten erhalten. Anders verhält es sich bei der Druck-Verbreiterung (Kap. 6). Hier ist die Änderung der Lochbreite gaußförmig und muß durch Entfaltung des Voigt-Profiles mit dem lorentzförmigen Ausgangsloch berechnet werden. Dazu wurde die numerisch gewonnene Korrekturkurve aus Abb. 3.14 benutzt. Die gepunktete Linie dient zum Vergleich und gilt für die Faltung zweier Lorentzkurven. Der Einschub zeigt die Differenz der beiden Kurven. Der Fehler F (in %), den man macht, wenn man anstatt der Entfaltung eine Subtraktion der Lochbreiten verwendet, ist im Anfangsstadium der Verbreiterung am größten. Zur Verdeutlichung dient das in Abb. 3.15 gezeigte Beispiel einer druckinduzierten Lochverbreiterung (siehe Kap. 6). Die beiden Kurven zeigen die tatsächlichen Meßpunkte (einzelne Punkte) sowie die durch Entfaltung berechnete Änderung der Lochbreiten (interpolierte Punkte). Der Einschub zeigt die Abweichung der beiden Kurven voneinander.

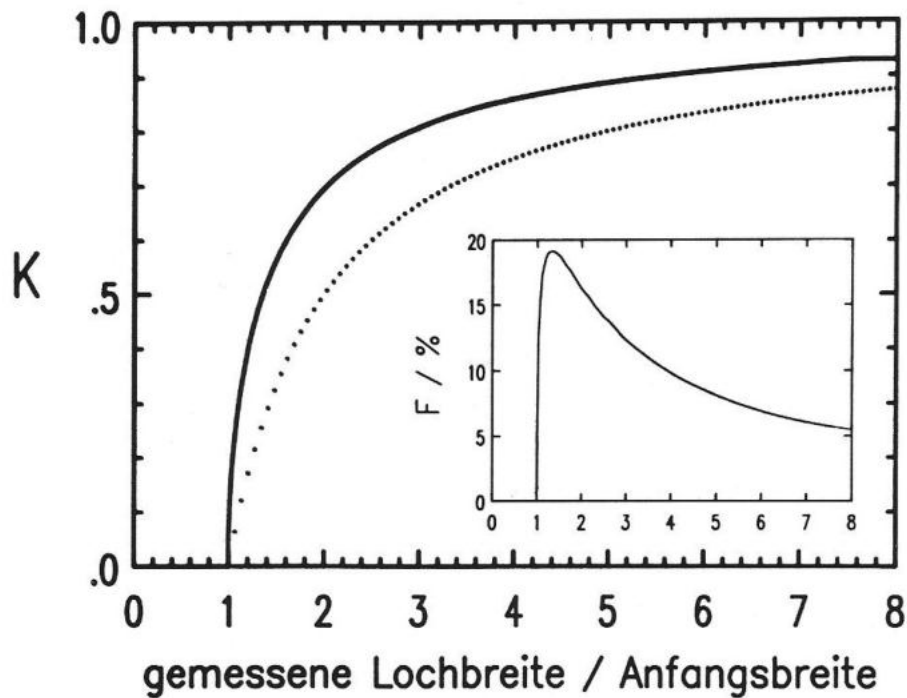


Abb. 3.14: Numerisch gewonnener Korrekturfaktor  $K$  zur Bestimmung des Gaußanteils bei der Druckverbreiterung (durchgezogene Linie):  
 Verbreiterung =  $K \cdot$  gemessene Lochbreite. Weitere Erläuterungen im Text.

Da bei den Messungen stets die Änderung von Lochparametern betrachtet wurde, waren Breite und Tiefe des Ausgangsloch unerheblich. Während Lochbreite und Lochmitten-Frequenz auch noch bei schlechtem Signal/Rausch Verhältnis auswertbar sind, ist der Wert für die Fläche insbesondere bei flachen Löchern mit einem großen Fehler behaftet. Lorentzkurven fallen in den Flanken relativ langsam ab. Die Scan-Breite sollte deshalb mindestens das zehnfache der Lochbreite betragen.

Da alle Lochspektren mit dem Laser aufgenommen wurden, traten keine Auflösungsprobleme auf: Die Lochbreiten lagen in allen Fällen um einen Faktor 100 bis 1000 über der Auflösungsgrenze des Lasers (Kap. 3.1). Das gleiche gilt für, mit dem Monochromator aufgenommene, breitbandige Spektren.

Bei den Messungen zur Bestimmung der Barrierenverteilungen (Kap. 4) mußten Flächen im  $\Delta OD$ -Spektrum ausintegriert werden. Dies wurde numerisch gemacht, wobei isosbestische Punkte die Integrationsgrenzen bildeten. Anschließend wurden die Flächen auf einen Maximalwert normiert.

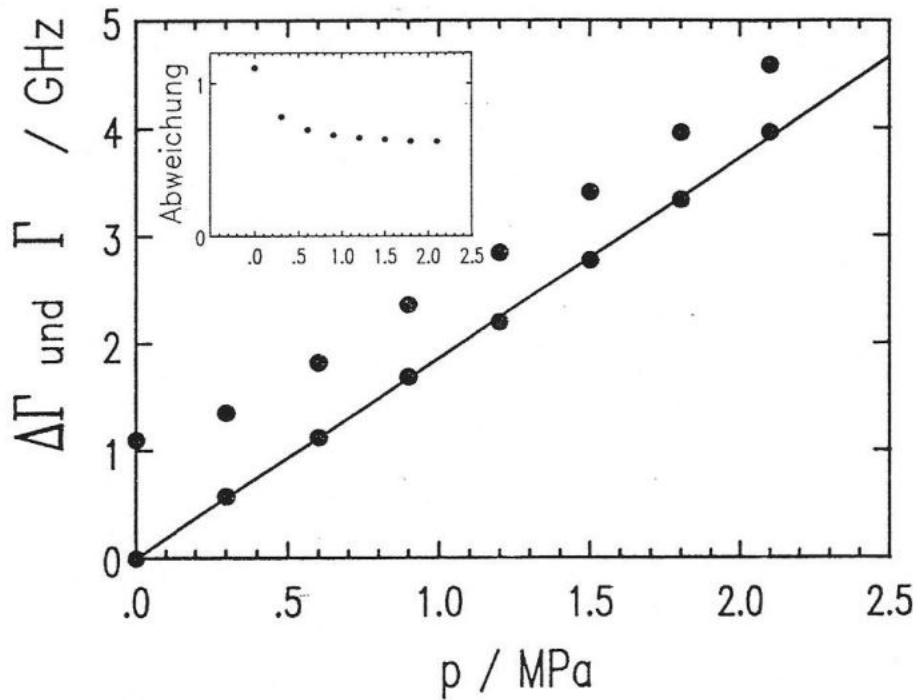


Abb. 3.15: Beispiel für die Korrektur der Lochbreite bei Druckexperimenten. Die nichtverbundenen Punkte zeigen die Meßwerte, die interpolierten Punkte die Werte nach der Entfaltung. Der Einschub stellt die Differenz der beiden Kurven dar.

#### 4. Verteilung von Barrieren der Photoreaktion

##### 4.1 Einleitung

Im folgenden wird das Wiederauffüllen eines spektralen Loches bzw. von breitbandigem Photoedukt als Funktion der Temperatur untersucht. Dabei wurde das in Kap. 3.2 beschriebene Verfahren der Temperaturzyklen verwendet, das besondere Vorteile aufweist: Erstens steht ausreichend Meßzeit für ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zur Verfügung, da bei der tiefen Brenn- bzw. Meßtemperatur keine weiteren kinetischen Änderungen erwartet werden. Zweitens verschmälert sich das Loch, wenn man zur Brenntemperatur zurückkehrt. Das Signal/Rausch-Verhältnis wird dadurch verbessert und man kann den untersuchten Temperaturbereich zu höheren Temperaturen hin ausdehnen.

Untersucht wurde das Wiederauffüllen von Löchern im Protein MRP/pH5 sowie von Photoedukt in MbCO. Es zeigt sich, daß das Wiederauffüllen als Funktion der Temperatur in Form von einer oder mehreren Stufen vor sich geht. Die Temperatur-Ableitung der Auffüllkurve liefert die Verteilung der Barrieren zwischen Edukt und Produkt. Gaußverteilungen scheinen eine gute Anpassung der Daten zu ergeben.

Die Untersuchung der Natur einer Photoreaktion und der Barrierenverteilung der thermisch induzierten Rückreaktion stellt für sich ein interessantes Problem dar. Auf der anderen Seite muß jedoch die Frage gestellt werden, inwieweit die Umgebung (in diesem Fall das Apo-Protein) diese Reaktionen beeinflusst, bzw. inwieweit aus dem gemessenen Verhalten Rückschlüsse auf Matriceigenschaften möglich sind. Deshalb wird gezeigt, unter welchen Umständen sich der Einfluß der Matrix in Messungen von Barrierenverteilungen bemerkbar machen kann.



## 4.2 Thermozyklische Experimente an Meerrettich-Peroxidase

### 4.2.1 Messungen mit Lochbrennen

Wie bereits in Kap. 3.4 gezeigt wurde, gibt es in MRP/pH5 mindestens vier Tautomere von MP, die zum Teil erst durch eine Kombination von Lichteinstrahlung und Temperaturänderungen erzeugt werden. In drei dieser Banden wurden Temperaturzyklus-Experimente durchgeführt und das Verhalten der Lochfläche und Lochbreite beobachtet. Die Lochbreite wird in Kap. 5 besprochen. In vielen Messungen wurde gezeigt, daß irreversible Verbreiterung und Wiederauffüllen voneinander unabhängige Prozesse sind /81/.

Abb. 4.1(a) zeigt die bereits nach dem Einfrieren vorliegende Bande bei  $16310\text{ cm}^{-1}$  (B1). Das eingezeichnete Loch ist auf einer um den Faktor 100 vergrößerten Skala dargestellt. Die Linienbreite von 2.5 GHz bezieht sich auf den Zustand vor Beginn der Zyklen. In Abb. 4.1(b) sieht man die relative Änderung der Lochfläche als Funktion der Zyklustemperatur, jeweils gemessen bei der Brenntemperatur von 4 K. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ändert sich die Lochfläche bis zu der erreichten Zyklustemperatur von 29 K nicht.

Abb. 4.2(a) zeigt die Bande bei  $16090\text{ cm}^{-1}$  (B3), die vor dem Lochbrennen durch breitbandige Einstrahlung in B1 erzeugt wurde, zusammen mit einem typischen Loch von 2.7 GHz Breite. Das Loch hatte eine Tiefe von ca. 50%. In diesem Fall geschieht das Auffüllen nach einem komplizierteren Muster (Abb. 4.2(b)): Zunächst wird um 9 K herum ein kleiner Teil des Loches von ca. 20% wieder aufgefüllt. Ein anderer Prozess wird um 20 K aktiv und füllt weitere 50% auf. Die verbleibenden 30% des Loches werden im Temperaturbereich des Experimentes (29 K) nicht weiter aufgefüllt.

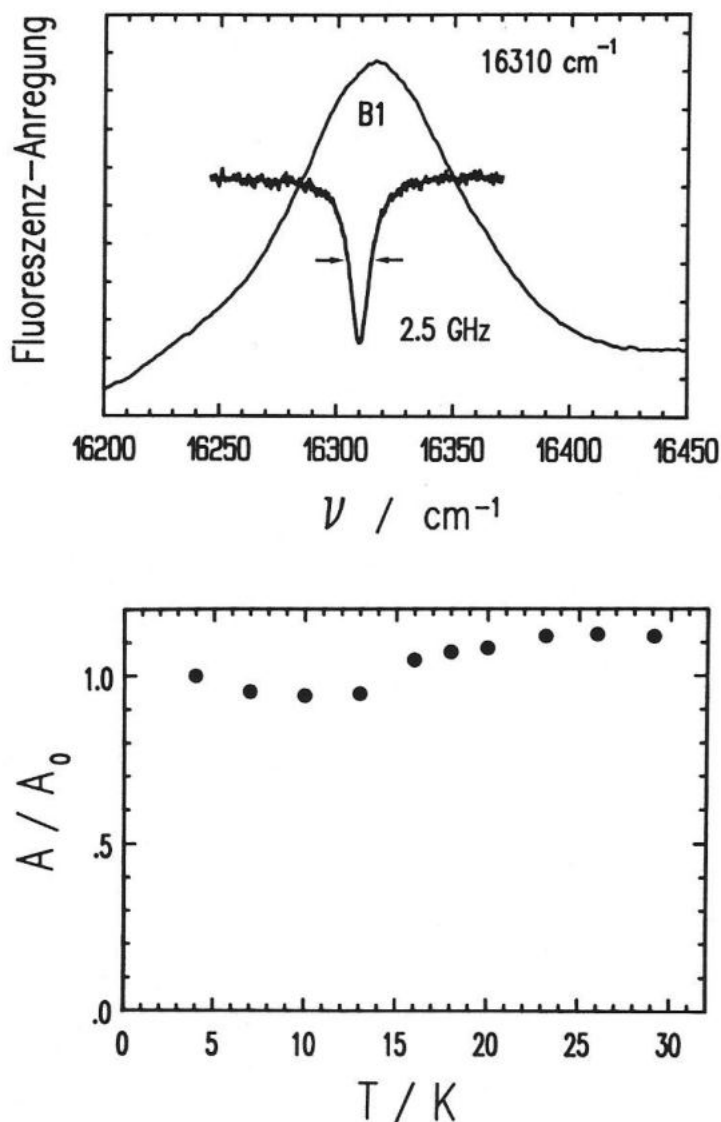


Abb. 4.1: Oben: MRP-Bande bei  $16310 \text{ cm}^{-1}$  (B1). Die Skala des Loches ist um einen Faktor 100 vergrößert. Unten: Die Lochfläche bleibt bis zu Zyklustemperaturen von 29 K praktisch konstant.

Die Daten konnten durch eine bimodale Gaußverteilung für die Barrieren zwischen Edukt und Produkt angepaßt werden. Diese Verteilung ist die Temperatur-Ableitung der Kurve, die die Meßpunkte verbindet. Die Fitfunktion für die Lochfläche  $A(T)$  als Funktion der Zyklustemperatur  $T$  lautet:

$$A(T) = A_0 \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_T^{T_{\max}} \left\{ \frac{A}{\sigma} \exp\left(-2(T' - T_1)^2 / \sigma_1^2\right) + \frac{B}{\sigma} \exp\left(-2(T' - T_2)^2 / \sigma_2^2\right) \right\} dT'. \quad (4.1)$$

Dabei ist:

$A_0$	Lochfläche bei der Brenntemperatur
$T$	Zyklustemperatur
$T_1, T_2$	Schwerpunkte der Verteilungen
$\sigma_1, \sigma_2$	Volle Breite am <i>Wendepunkt</i>
$A, B$	Anteile der Verteilungen
$T_{\max}$	Temperatur, bei der die Verteilungen genügend stark abgefallen sind.

Abb. 4.3(a) stellt die Tautomeren-Bande bei  $16000 \text{ cm}^{-1}$  (B4) dar. Diese Bande wurde durch Einstrahlen in B1 mit anschließender Temperaturerhöhung auf 40 K erzeugt, was im folgenden Kapitel 4.2.2 noch detailliert beschrieben wird. Die Tiefe des eingezeichneten Loches war etwa 50%. Auch hier findet man einen Flächenrückgang in mehreren Stufen: Bis 10 K kehren ca. 50% der Flächen zurück, der restliche Teil scheint sich um 30 K herum aufzufüllen. Die Temperatur-Ableitung der Meßkurve wird ebenfalls ausreichend gut durch Gauß-Verteilungen beschrieben.

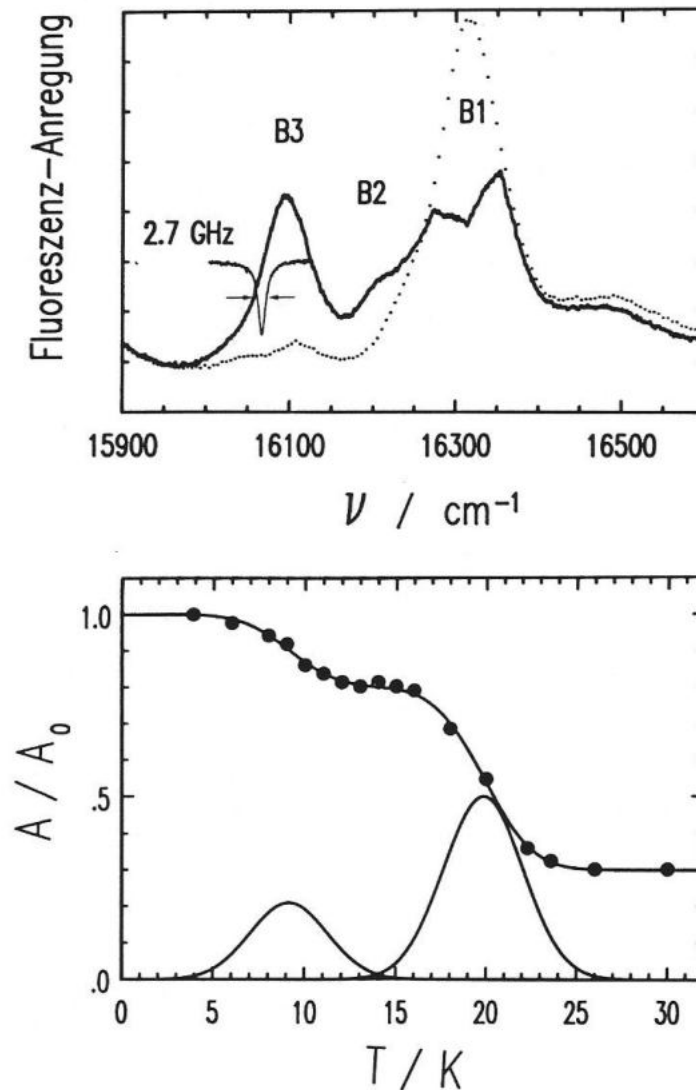


Abb. 4.2: Oben: Bande bei  $16090 \text{ cm}^{-1}$  (B3), die durch vorheriges Einstrahlen in Bande B1 erzeugt wurde, mit einem stark vergrößerten Loch an der gewählten Brennposition. Unten: Flächenrückgang als Funktion der Zyklustemperatur. Durch Temperatur-Ableitung der Meßkurve erhält man die eingezeichnete bimodale Gaußverteilung.

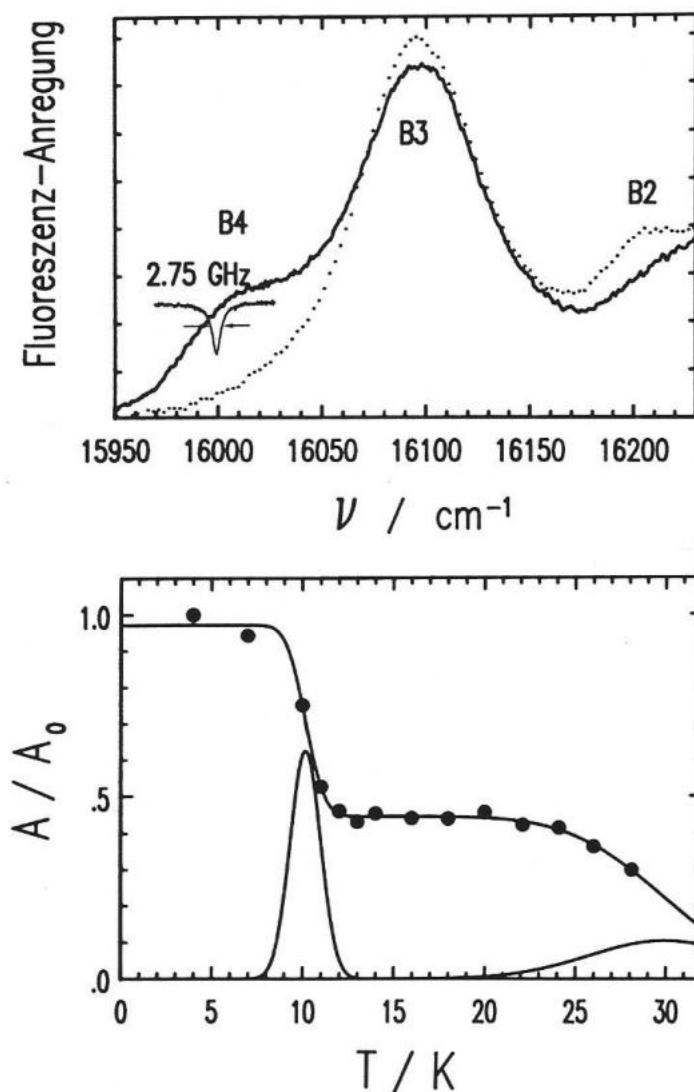


Abb. 4.3: Oben: Bande bei  $16000 \text{ cm}^{-1}$  (B4), die durch Tempern vor Beginn des Lochbrennens erzeugt wurde. Unten: Die eingezeichneten Gaußverteilungen erhält man durch Temperatur-Ableitung der Meßkurve.

In Tabelle 4.1 sind noch einmal die gefitteten Werte für die Barrierenverteilungen in den verschiedenen Banden vom MRP/pH5 zusammengefaßt.

## PARAMETER DER VERTEILUNGEN:

BANDE	MAXIMA	BREITEN
16310 cm <sup>-1</sup>	kein Flächenrückgang bis 29 K	
16190 cm <sup>-1</sup>	9.2 ± 0.5 K (2.3 kJ/mol)	4.2 ± 0.5 K (1.1 kJ/mol)
	19.9 ± 0.5 K (5.0 kJ/mol)	4.4 ± 0.5 K (1.1 kJ/mol)
16000 cm <sup>-1</sup>	10.2 ± 1 K (2.6 kJ/mol)	1.7 ± 0.5 K (0.4 kJ/mol)
	29.9 ± 1 K (7.5 kJ/mol)	8.5 ± 1 K (2.1 kJ/mol)

Tabelle 4.1: Maxima und Breiten (volle Breite am Wendepunkt  $\hat{=} 2\sigma$ ) der ermittelten Gaußverteilungen der Barrieren zwischen Edukt und Produkt in drei verschiedenen Tautomerenbanden von MRP/pH5. Energieumrechnung nach Gleichung (4.4).

## 4.2.2 Breitbandig detektierte Messungen

In Kap. 3.4.4 ist gezeigt worden, daß es möglich ist, durch relativ breitbandige Einstrahlung mit dem Monochromator, die intensivste Bande in MRP bei 16310 cm<sup>-1</sup> (B1) auszubleichen. Dabei entstanden die Banden B2 und B3. Es stellte sich die Frage, bei welcher Temperatur B1 wieder aufgefüllt wird. Der einzige Hinweis aus den Lochbrennmessungen war, daß bis zu einer Zyklustemperatur von 29 K noch keine Rückreaktion stattfindet (vgl. Abb 4.1). Starke spektrale Diffusion verhinderte Untersuchungen zu höheren Temperaturen. Deshalb wurden die Zyklusexperimente unter Beobachtung der gesamten inhomogenen Bande mit dem Monochromator wiederholt. Ausgehend von der Brenntemperatur von 6 K wurde die Temperatur schrittweise erhöht. Zunächst konnte die bereits oben beschriebene Bildung der B4-Bande bei gleichzeitigem Rückgang eines Teiles der B2- und B3-Bande mit guter Temperaturauflösung beobachtet werden (Abb. 4.4). Das eigentliche Ziel der Messung, die Wiederherstellung des Zustandes *vor der Photoreaktion*, findet

im Temperaturbereich zwischen 80 K und 100 K statt. Abb. 4.5 zeigt diesen Vorgang temperaturlaufgelöst in Form eines  $\Delta OD$ -Spektrums: Die Banden B2, B3 und B4 verschwinden, während die B1-Bande vollständig zurückgebildet wird.

Integriert man die Photoeduktflächen und trägt sie, wie auch bei den Lochbrennmessungen, als Funktion der Zyklustemperatur auf (Abb. 4.6), so findet man ein Stufenverhalten: Im Bereich (I) bildet sich Bande B4, und im Bereich (II) kehrt alles vorher erzeugte Photoprodukt (sowohl photochemisch als auch thermisch) wieder in die B1-Bande zurück.

Beide Prozesse lassen sich gut anpassen, wenn man für die Temperatur-Ableitung der Kurven analog zu Gleichung (4.1) Gaußverteilungen annimmt. Diese liegen bei 30.7 K und 91.9 K mit Breiten von 5.2 K und 15.7 K.

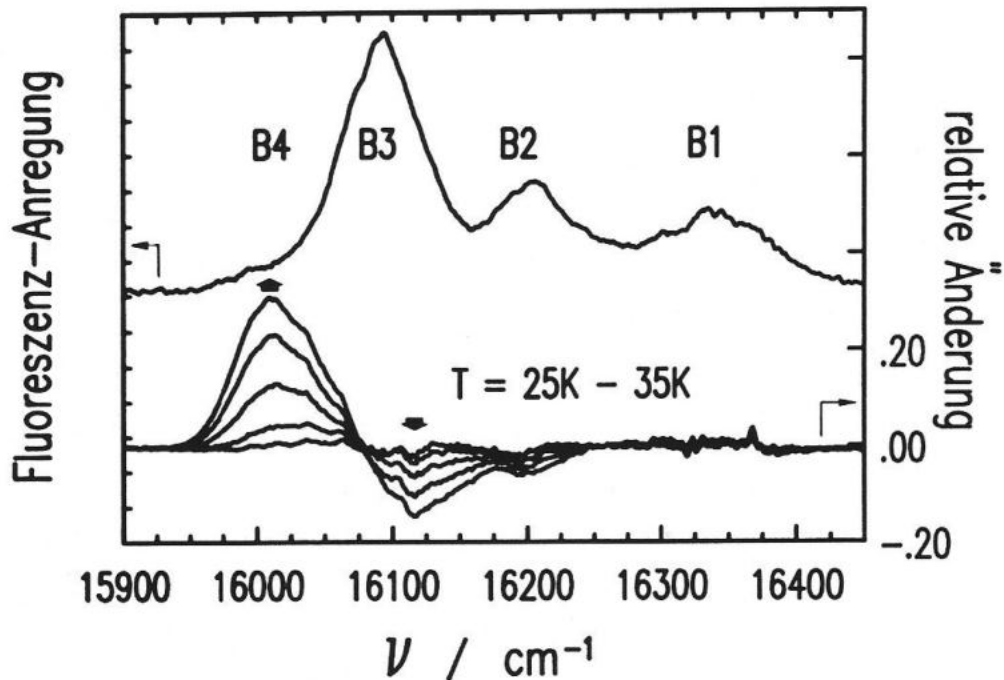


Abb. 4.4: Bildung der B4-Bande unter teilweiseem Rückgang von B2 und B3 im Temperaturintervall von 25K bis 35K (untere Kurven). B2 und B3 waren zuvor durch Einstrahlung in B1 erzeugt worden. Oben: Spektrum vor den T-Änderungen.



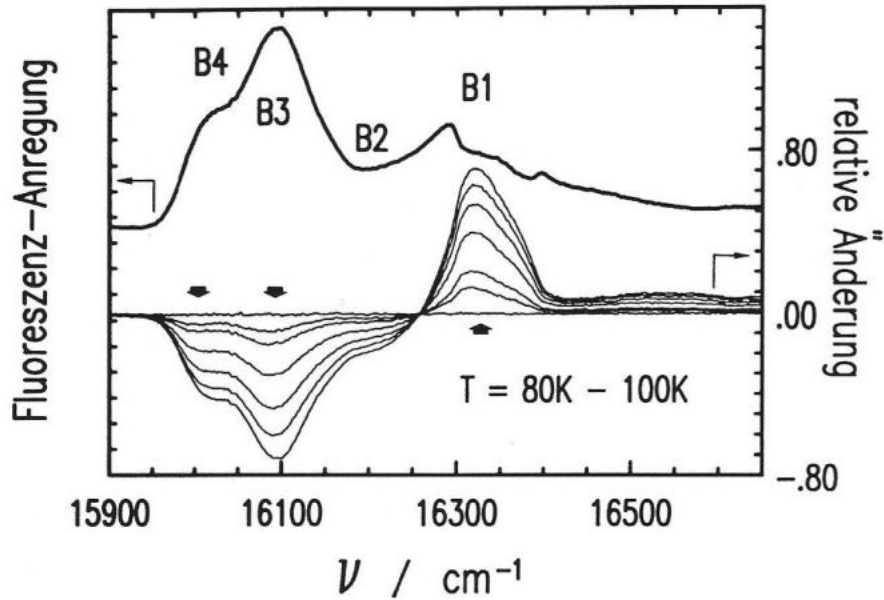


Abb. 4.5: Vollständiges Wiederauffüllen der B1 Bande im Temperaturbereich von 80K bis 100K.

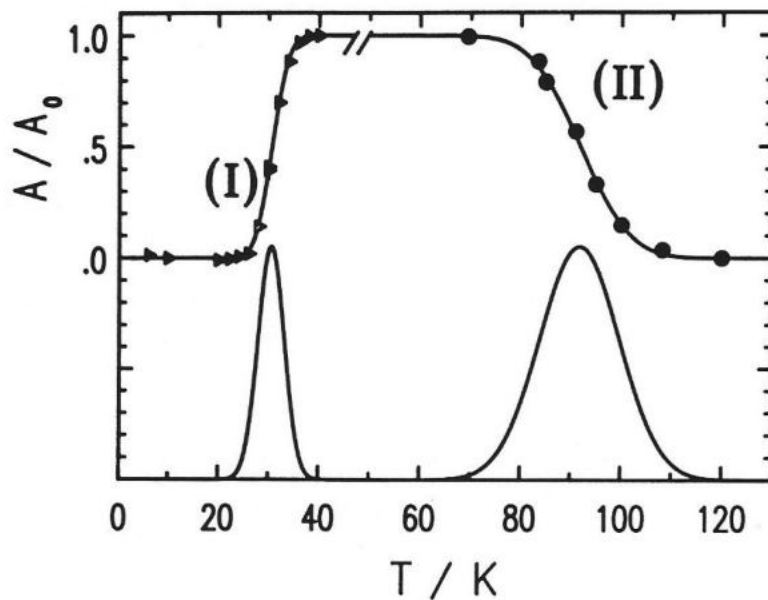


Abb. 4.6: Oben: Relative Änderung der Photoprodukt-Fläche als Funktion der Zyklustemperatur. Bereich (I): Bildung der B4-Bande, wie in Abb 4.4 dargestellt; Bereich (II): Wiederherstellung der ursprünglichen Hauptbande B1. Unten: Die Temperaturableitung der Meßkurve führt zu den jeweils eingezeichneten Gaußverteilungen.

### 4.3 Modellbeschreibung

#### 4.3.1 Zusammenhang zwischen Flächenrückgang und Barrierenverteilung

Die Lochfläche ist ein Maß für die Anzahl der Moleküle im Photoprodukt-Zustand. Wenn die Temperatur auf eine bestimmte Zyklustemperatur  $T$  erhöht wird, wird ein Teil der Photoprodukt-Moleküle aktiviert, überquert die Barriere und kehrt in den Grundzustand zurück. Dies bedeutet, daß sich das Loch auffüllt. Deshalb ist die Änderung der Lochfläche proportional zum Bruchteil der Photoprodukt-Moleküle die während eines bestimmten Zyklus in ihren Eduktzustand zurückgekehrt sind. Wie unten gezeigt wird, ist die Ableitung der Lochfläche nach der Temperatur direkt proportional zur Wahrscheinlichkeitsverteilung  $P(V)$ , eine Barriere mit der Höhe  $V$  zu finden.

Angenommen, die Relaxationsrate  $R$  für einen Übergang vom Produkt- zum Eduktzustand (getrennt durch eine Barriere  $V$ ) ist durch einen aktivierten Prozess bestimmt:

$$R = R_0 (-V/kT) . \quad (4.2)$$

Es gibt dann für eine bestimmte Zyklustemperatur eine relativ gut definierte Grenzbarriere  $V_G$ , die innerhalb einer Zeitskala  $\tau$  gerade noch überquert werden kann.  $\tau$  ist in etwa die Zeitdauer, die für diesen Zyklus benötigt wird. Bei diesem einfachen Ansatz, der auch mit "ideale Glas Näherung" bezeichnet wird, ist die Rate  $R_G$  bei eben dieser Barriere  $V_G$  mit der Meßzeit  $\tau$  über die Beziehung

$$R_G \propto \tau^{-1} \quad (4.3)$$

verknüpft. Die Näherung des idealen Glasses ist immer gültig für den Fall, daß die Dispersion der Relaxationsraten groß ist /3/.  $V_G$  kann nun aus (4.2) und (4.3) bestimmt werden:

$$V_G = kT \ln(R_0 \tau) . \quad (4.4)$$

Dieser Ausdruck spaltet die Barrierenverteilung für jede Temperatur  $T$  in zwei Bereiche: Alle Barrieren im Bereich  $V < V_G$  können im Verlauf des Zyklus überquert werden, während im Bereich  $V > V_G$  kein Überqueren stattfindet. D.h. Produkt–Edukt Systeme im Bereich  $V > V_G$  bilden das verbleibende Loch, diejenigen im Bereich  $V < V_G$  sind verantwortlich für das Auffüllen.  $V_G$  ist in erster Linie von der Zyklustemperatur  $T$  abhängig. Die Abhängigkeit von der Experimentierzeit  $\tau$  ist nur logarithmisch. Deshalb kann man  $V_G$  durch Temperaturvariation ermitteln. Die Anzahl  $N_T$  der Zentren, die bei einer Temperatur  $T$  eine Barriere größer als  $V_G$  haben (und damit das Loch bilden), ist:

$$N_T \propto A_T = \int_{V_G}^{V_{\max}} P(V) dV . \quad (4.5)$$

$A_T$  ist die Lochfläche bei der Temperatur  $T$  und  $V_{\max}$  ist eine angenommene maximale Barrierenhöhe. Aus (4.5) folgt mit (4.4), daß die Temperaturableitung von  $A_T$  der Verteilung  $P(V)$  proportional ist:

$$dA_T/dT = k \ln(R_0 \tau) P(V_G) . \quad (4.6)$$

Dieser Zusammenhang wurde bereits zur Bestimmung von Barrierenverteilungen in Gläsern, Polymeren und Proteinen benutzt /8,9,34/. Allerdings liefert diese Methode die Verteilung nur auf einer relativen Energieskala. Um die Verteilung auf einer absoluten Skala zu bestimmen, muß der Faktor  $\ln(R_0 \tau)$  abgeschätzt werden. Es wurde bereits früher gezeigt /8/, daß ein Wert von 30 eine annehmbare Näherung ist, was bei einer Meßzeit von ca. 100 Sekunden einer Versuchsfrequenz  $R_0$  von  $10^{12}$  Hz entspricht. Wegen der logarithmischen Abhängigkeit ist eine genaue Kenntnis des Wertes von

---

$R_0\tau$  innerhalb einiger Größenordnungen nicht notwendig. Diese Aussage konnte z.B. auch bei einer Temperaturzyklusmessung an Shpolskii-Kristallen durch Vergleich mit NMR-Messungen bestätigt werden /85/.

#### 4.3.2 Zusammenhang zwischen Barrierenverteilung und Art der Photoreaktion

Zahlreiche Arbeiten /8,79,81,82/ zur Bestimmung der Verteilung von Reaktionsbarrieren lassen sich im wesentlichen durch zwei Typen von Verteilungen erklären: der Porter-Thomas Verteilung /83/ sowie der Gauß-Verteilung, bzw. einer Überlagerung von beiden. Im folgenden werden die physikalischen Bedingungen diskutiert, die zum Auftreten der einen oder anderen Verteilung führen.

Ein Vergleich der im Verlauf dieser Arbeit gemachten Ergebnisse mit den eben genannten Messungen an anderen Systemen unterstützen die Hypothese, daß die Art der Barrierenverteilung von der Art der Photoreaktion abhängt /79/. Beim Lochbrennen unterscheidet man photophysikalisches und photochemisches Lochbrennen (vgl. Kap. 2.4). Photochemische Reaktionen zeichnen sich dadurch aus, daß die Reaktionsbarriere eine intrinsische Eigenschaft des Farbstoffmoleküls ist und bereits ohne umgebendes Lösungsmittel vorliegt. Diese Barriere wird deshalb als "Barriere nullter Ordnung" bezeichnet. In photophysikalischen Lochbrennsystemen gibt es keine derartige Barriere nullter Ordnung. Stattdessen wird eine Barriere erst durch kooperative Wechselwirkung der Lösungsmittelmoleküle, ggf. unter Einbeziehung des Farbstoffmoleküles, erzeugt.

Für photochemische Systeme erhält man eine Verteilung der Barrieren, weil die Energien, die mit der Reaktionskoordinate nullter Ordnung verknüpft sind, durch die Wechselwirkung mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen inhomogen verbreitert sind. Diese Situation ist ganz

analog der inhomogenen Verbreiterung von optischen Übergängen. Es wird angenommen, daß die Wechselwirkung zwischen reaktiver Spezies und Lösungsmittel am Maximum und am Minimum der Energie-Hyperfläche *nicht vollständig* korreliert ist. In diesem Fall gelangt man mit Hilfe der Argumentation von Laird und Skinner /84/ auf die Bedingungen, unter denen eine Gaußverteilung der Barrieren beobachtet werden kann:

a)

Es gibt keine räumliche Korrelation zwischen den Lösungsmittelmolekülen. In diesem Fall kann die N-Teilchen Dichteverteilung faktorisiert werden. Die Konsequenz daraus ist, daß alle Lösungsmittel-Konfigurationen voneinander statistisch unabhängig sind, und sie deshalb die Barriere nullter Ordnung in einer *zufälligen* Weise modulieren.

b)

Die Dichte der Lösungsmittelmatrix muß ausreichend groß sein.

Man sieht, daß die erste Bedingung nur von photochemischen Lochbrennsystemen erfüllt werden kann. Für photophysikalische Systeme hingegen wird die Barriere von *kooperativen* Wechselwirkungen der die Sonde umgebenden Lösungsmittelmoleküle erzeugt, d.h. es muß eine räumliche Korrelation zwischen diesen Molekülen geben. Die verschiedenen Glaskonfigurationen können für diesen Fall nicht mehr als statistisch unabhängig angesehen werden. Prinzipiell sollte es möglich sein, die Porter-Thomas Verteilung durch Hinzunehmen höherer Korrelationen der N-Teilchen Dichtefunktion abzuleiten. Man kann jedoch auch durch folgende Argumentation zu einer Art Porter-Thomas Verteilung gelangen:

Man betrachtet dafür nur die dem Farbstoff benachbarten Moleküle des Lösungsmittelkäfigs. Die Photoreaktion soll nur durch *zwei* Zustände bestimmt sein, nämlich den Edukt- und den Produktzustand. Die Annahme ist, daß die Grundzustandsenergie als Funktion der Reaktionskoordinate  $\xi$ , die

zugleich auch alle Moleküle des Lösungsmittelkäfigs umfaßt, ein Maximum durchläuft. (Wäre dies nicht der Fall fände keine Phototransformation statt.) Die Konfigurationen nahe dem Maximum der Energiefläche des Grundzustandes werden aufgrund ihrer Instabilität den größten Beitrag zur Photoreaktion liefern, weshalb man eine Entwicklung um das Maximum  $\xi_0$  vornehmen kann:

$$E \approx E_{\max} - \alpha(\xi - \xi_0)^2 . \quad (4.7)$$

Für glasartige Systeme sollte die Besetzung einer speziellen Konfiguration für alle Konfigurationen gleich groß sein, da die Spezies (d.h. Farbstoff plus Lösungsmittelkäfig), die man selektiv angeregt, relativ gleichförmig über alle möglichen Konfigurationen verteilt sein wird. Für die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $P(\xi)$ , daß die phototransformierte Spezies eine spezielle Konfiguration  $\xi$  einnimmt, gilt deshalb

$$P(\xi) d\xi = \text{const} d\xi = \bar{P} d\xi \quad (4.8)$$

Aus (4.7) folgt für die Aktivierungsbarriere einer bestimmten Konfiguration  $\xi$ :

$$V(\xi) = E_{\max} - E = \alpha(\xi - \xi_0)^2 . \quad (4.9)$$

Daraus und mit (4.8) findet man einen Ausdruck für die Verteilung der Barrierenhöhen:

$$P(V)dV = P(\xi) \left| \frac{d\xi}{dV} \right| d\xi \propto \frac{1}{\sqrt{V}} dV . \quad (4.10)$$

Gleichung (4.10) stellt einen Spezialfall einer Porter-Thomas Verteilung /83/ für den Fall einer großen Breite  $\sigma$  dar:

$$P(\sigma, V) \propto \frac{e^{-V/2\sigma^2}}{\sqrt{V}} \quad (4.11)$$

Es läßt sich demnach folgende Schlußfolgerung ziehen: Wenn eine gaußförmige Verteilung von Barrieren vorliegt, dann wird die zugrundeliegende Reaktion von photochemischer Natur sein. Insbesondere bei Porphyrinderivaten wird man derartige Verteilungen finden, da die Photoreaktion in einem molekulinternem Protonentransfer besteht. Messungen an tertiär-Butylphthalocyanin im Shpolskii-Kristall n-Octan unterstützen diese Aussage /85/. Folgt die Barrieren-Verteilung einer Porter-Thomas Verteilung, liegt demgegenüber im allgemeinen eine photophysikalische Transformation zugrunde. Dies konnte für Tetrazen in Alkohol gezeigt werden, das bekanntermaßen eine photophysikalische Reaktion aufweist /28/.

In den meisten Fällen ist die Natur der Lochbrennreaktion nicht eindeutig bestimmt. Photoproduktmessungen zeigen, daß Reaktionen gleichzeitig sowohl photochemische als auch photophysikalische Anteile haben. Dies wurde z.B. für einen speziellen Bor-Komplex in Alkoholglas /79/ aber auch für Phycobilisom-Proteine /9/ nachgewiesen. Tatsächlich spiegelt sich dies auch in den Messungen der Barrierenverteilungen wider. Sie zeigen in den letztgenannten Fällen deutlich das Vorhandensein beider beschriebenen Arten von Verteilungen.

#### 4.3.3 Interpretation der Messungen an MRP

Mit Hilfe dieser Überlegungen lassen sich die Messungen an MRP wie folgt interpretieren: Die Lochauffüll-Daten legen dar, daß in der B3- und B4-Bande bei bestimmten Temperaturen eine thermische Umkehrung der Photoreaktion einsetzt. Dieser Rückgang geschieht innerhalb wohldefinierter Temperaturbereiche mit Breiten zwischen 2 K und 9 K. Die Photoreaktion besteht in einer Transformation der Pyrrol-Protonen und ist durch eine



Reaktionskoordinate nullter Ordnung charakterisiert. Gemäß dem Modell für photochemische Lochbrennsysteme läßt sich die Barrierenverteilung durch bimodale Gaußverteilungen anpassen.

Die Schwerpunkte der Verteilungen lassen sich gut bestimmen und liegen bei der B3- und der B4-Bande etwa an den gleichen Stellen. Dabei erweist sich eine Art von Photoprodukt als sehr instabil. Es relaxiert bereits bei 9 K (2.3 kJ/mol). Die höheren Barrieren liegen bei ca. 20 K (5.0 kJ/mol) bzw. 30 K (7.5 kJ/mol). Inwieweit die Photoprodukte der verschiedenen Banden identisch sind, läßt sich nicht mit Sicherheit angeben. Die unterschiedlichen Breiten der Verteilungen sprechen eher für verschiedenartige Produkte. Bei den Lochbrennmessungen in der B1-Bande konnte bis 30 K kein Flächenrückgang beobachtet werden, d.h. deren Photoprodukt zeigt eine höhere thermische Stabilität. Tatsächlich ergaben die breitbandigen Messungen eine Barriere bei 92 K (23 kJ/mol), die ebenfalls gaußförmig verteilt ist. Eine Voraussetzung für gaußförmige Barrierenverteilungen war die fehlende Korrelation zwischen verschiedenen Lösungsmittel-Konfigurationen. Ein Aufweichen dieser Einschränkung könnte für gewisse Asymmetrien, z.B. für die niederenergetische Barriere der B4-Bande, verantwortlich sein.

Da mehr als zwei tautomere Formen gefunden wurden, muß das bisherige Bild der Photoreaktion, als einfache 90 Grad Rotation der Protonen erweitert werden: Mögliche weitere Formen sind Positionen der Protonen außerhalb der Molekülebene oder direkt benachbarte Protonen. Letztere wurden bereits in früheren NMR-Studien in Lösung /86/ und zur Interpretation von multimodalen Gaußverteilungen in Shpolskii-Kristallen vorgeschlagen /85/.

#### 4.4 Die Barrieren für die CO-Rückbindung in Carboxy-Myoglobin

##### 4.4.1 Beobachtung der Rückbindung als Funktion der Zyklus-Temperatur

Analog zu den oben gezeigten Messungen im Protein MRP wurden auch Temperaturzyklus-Experimente an Carboxy-Myoglobin gemacht. Die Photoreaktion ist ein Abspalten des CO vom Eisenatom. Dazu wurde zunächst, wie in Kap. 3.4 beschrieben, durch Einstrahlen mit dem Laser in die  $17270\text{ cm}^{-1}$ -Bande bei 4 K Photoprodukt erzeugt und breitbandig gemessen. Abb. 4.7 zeigt in einem  $\Delta OD$ -Spektrum die Rückkehr von Edukt und Produkt bei schrittweiser Erhöhung der Zyklustemperatur im Bereich von 4 K und 66 K. Integriert man die Flächen im  $\Delta OD$ -Spektrum und trägt die relativen Werte gegen die Zyklustemperatur auf (Abb. 4.8), so sieht man einen Rückgang in Form einer breiten Stufe von 15 K bis 80 K. Ferner ist die Temperaturableitung der Interpolationskurve eingezeichnet. Produkt- und Eduktfläche verhalten sich gleich.

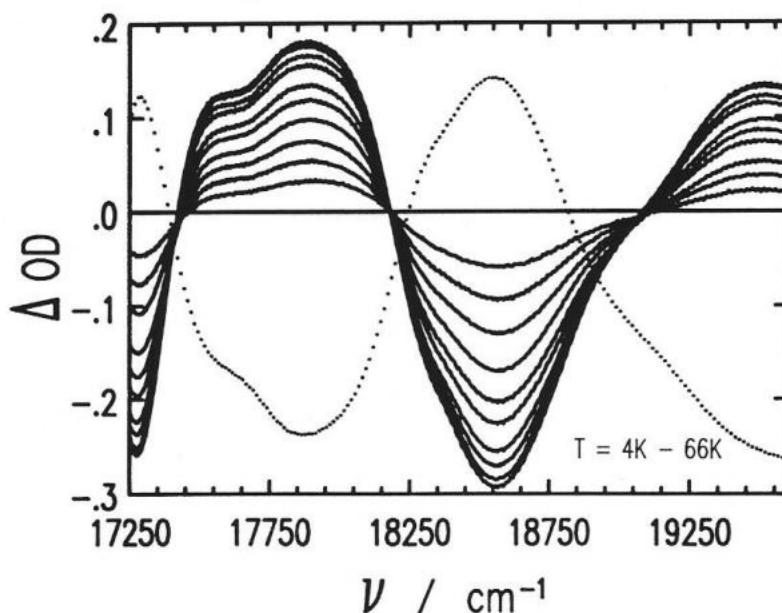


Abb. 4.7:  $\Delta OD$ -Spektrum von deligiertem MbCO als Funktion der Zyklustemperatur. Die gepunktete Linie stellt die Absorption von MbCO dar.

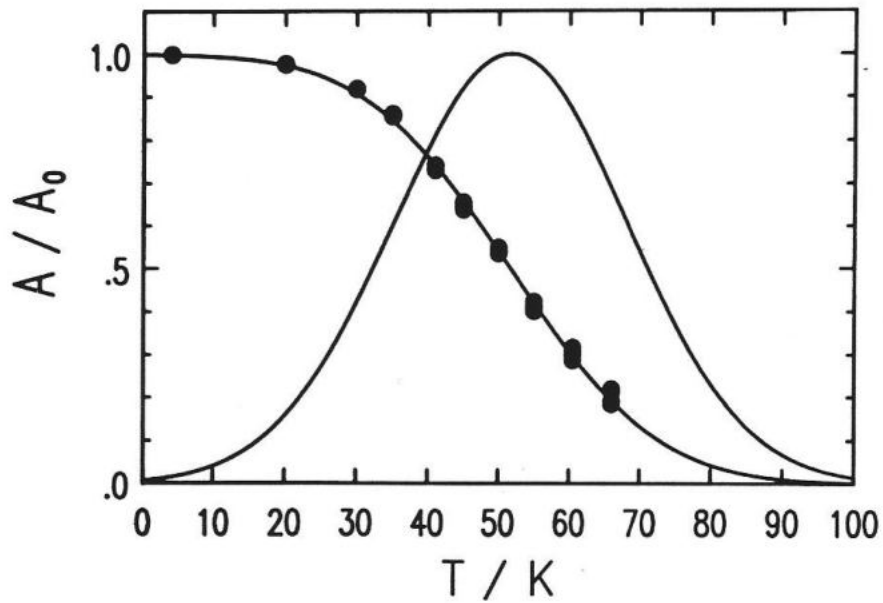


Abb. 4.8: Relativer Rückgang der Photoprodukt- bzw. Photoeduktfläche als Funktion der Zyklustemperatur. Mit eingezeichnet ist die Ableitung der interpolierten Meßkurve nach der Temperatur.

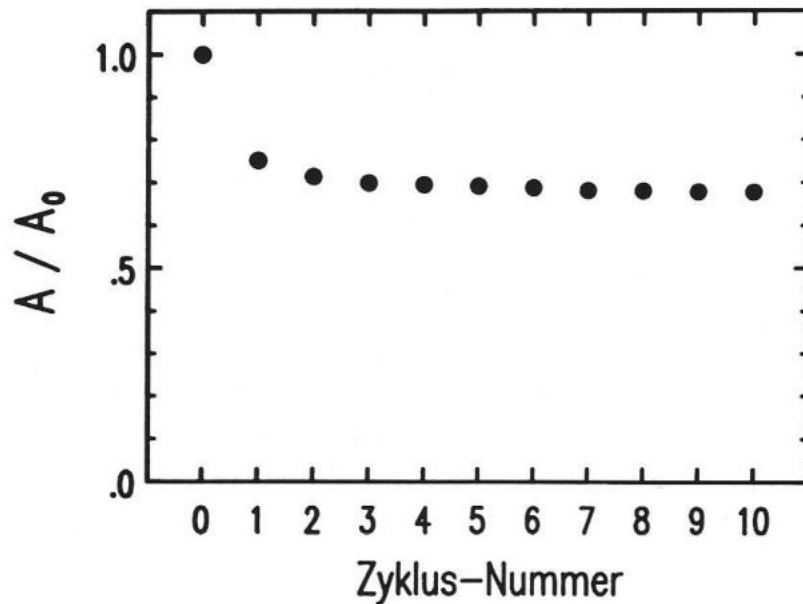


Abb. 4.9: Bei einem Mehrfachzyklus tritt praktisch nur während des ersten Zyklus eine Veränderung auf. Gezeigt ist die relative Photoprodukt-Fläche als Funktion der Zyklusnummer. Meßtemperatur: 4 K, Zyklustemperatur: 40 K.

Für eine Interpretation dieser Messungen ist es wichtig zu wissen, was im Verlaufe eines Mehrfachzyklus geschieht (Abb. 4.9). Es zeigt sich, daß nach dem ersten Zyklus praktisch keine Änderung mehr auftritt. Offenbar ist jede Zyklustemperatur gerade mit einer bestimmten Barrierenhöhe verknüpft, die vom System gerade noch überquert werden kann.

Es wurde auch die Rückbindungskinetik bei *verschiedenen Temperaturen* gemessen. Dabei wurde bei einer tiefen Temperatur (z.B. 4 K) Photoprodukt erzeugt, und der zeitliche Rückgang der Photoproduktfläche bei einer festen, höheren Temperatur gemessen. Die Messungen, die bei Temperaturen von 4 K bis 70 K gemacht wurden, zeigen deutlich eine temperaturabhängige nicht-exponentielle Kinetik. Allerdings reichte der zur Verfügung stehende Zeitbereich für eine sinnvolle, quantitative Auswertung der Daten nicht aus. Die kürzesten meßbaren Änderungen waren durch die Dauer eines Scans von ca. 1 min begrenzt, die längste Meßdauer durch die Aufrechterhaltung tiefer Temperaturen über Stunden hinweg.

#### 4.4.2 Interpretation und Vergleich mit anderen Methoden

Die Messungen zeigen, als grundlegendstes Ergebnis, daß der abgespaltene Zustand von CO in der Proteintasche bei 4 K stabil ist. Es gibt offensichtlich einen wohldefinierten Produktzustand mit einer mittleren Barriere  $V_0$  für die Rückreaktion in den Eduktzustand. Die Barrieren sind verteilt, was die Vielzahl der Konformationszustände des Proteins reflektiert. Die Temperaturableitung des Flächenrückgangs läßt sich durch eine Gaußkurve mit einem Schwerpunkt bei 52 K modellieren. Eine leichte Asymmetrie der Verteilung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine symmetrische Verteilung erhält man genau dann, wenn die Kurve des Flächenrückgangs punktsymmetrisch bezüglich ihrem Wendepunkt ist, was

anhand der Daten nicht mit letzter Sicherheit hervorgeht. Die zum Maximum  $V_0$  der Verteilung gehörende Zyklustemperatur  $T_0$  läßt sich jedoch mit guter Genauigkeit bestimmen.

Gemäß Gleichung 4.4 gilt  $V_0 = kT_0 \ln(R_0\tau)$ .  $V_0$  ist also bis auf den Faktor  $\ln(R_0\tau)$  bestimmt.  $R_0$  kann im Prinzip durch Messung der Kinetik bestimmt werden. Typische Werte für  $R_0$  liegen bei  $10^9 \text{ s}^{-1}$  /80/. Setzt man eine mittlere Meßzeit von 100 s voraus, so ergibt sich  $V_0$  zu  $915 \text{ cm}^{-1}$  (11.0 kJ/mol). Dies stimmt sehr gut mit Ergebnissen aus Kinetik-Messungen anderer Gruppen überein /87/, wo ebenfalls 11 kJ/mol (Soret-Bande) bzw. 12 kJ/mol (760 nm-Bande) gefunden wurden.

Die Temperaturzyklus-Methode ist nur dann anwendbar, wenn die Raten der Rückreaktion eine breite Dispersion aufweisen. Nur dann entspricht jede Zyklustemperatur einer charakteristischen Barriere, die bei dieser Temperatur gerade noch überquert werden kann (vgl. Gl. 4.4). Eine breite Verteilung der Reaktionsraten ist aus Kinetik-Experimenten bekannt /80/. Außerdem hat das Mehrfachzyklusexperiment bestätigt: Nur bei der ersten Temperaturerhöhung findet eine starke Änderung der Photoproduktfläche statt, d.h. der Flächenrückgang hängt im wesentlichen nicht von der Dauer des Temperaturzykluses ab (was durch die Wiederholung simuliert wurde), sondern nur von der Zyklustemperatur selbst.

Alternativ zu dieser Art von Experiment kann man die Temperatur auch ohne Rückkehr zur Brenntemperatur stetig erhöhen. Allerdings muß man dabei die Heizrate messen, bzw. konstant halten, was den experimentellen Aufwand und die Genauigkeit beeinflusst. Außerdem hat man weniger Zeit für die Aufnahmen der Spektren zur Verfügung, die wegen der ständigen Temperaturvariation sehr schnell geschehen muß. Auch bei dieser Methode wurde eine gaußförmige Verteilung der Barrieren gefunden /88/.

In diesem Kapitel wurden Reaktionsbarrieren in Häm-Proteinen untersucht. In der Natur wird die Häm-Gruppe als aktives Zentrum in einer Vielzahl von Proteinen benutzt, deren Aufgabe von der Sauerstoffspeicherung

in Myoglobin bei zu enzymatischen Reaktionen in Cytochrom P450 oder Peroxidasen reicht [77]. Konsequenterweise muß die Proteinstruktur, die die Häm-Gruppe umgibt, in gewisser Weise die Funktion kontrollieren. Die Kenntnis der Verteilung von Reaktionsbarrieren sowie deren Höhe kann wertvolle Informationen über die Beziehung von Struktur, Funktion und spektralen Eigenschaften liefern.

Der Vorteil der Temperaturzyklus-Methode liegt darin, daß man, auch ohne explizite Kenntnis der Verteilung, die Temperaturbereiche ablesen kann, in denen bestimmte Relaxationsprozesse ablaufen. Relativ einfach kann auch abgeschätzt werden, inwieweit die zugrundeliegenden Verteilungen eine Symmetrie aufweisen. Ein weiterer Vorteil ist, daß stets bei der niedrigen Brenntemperatur gemessen wird, wo das Loch relativ schmal und tief ist und damit ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis aufweist. Der numerische Aufwand ist relativ gering und besteht lediglich in einer Integration der Lochflächen.

## 5. Konformationsänderungen in Meerrettich-Peroxidase und Myoglobin

In Proteinen finden, selbst bei Temperaturen in der Größenordnung von 1 K, Konformationsänderungen statt, die mittels Lochbrennspektroskopie nachgewiesen werden können. Die ersten derartigen Messungen wurden an hochorganisierten Antennenpigmenten von Blaualgen gemacht /5/. Konformationsänderungen äußern sich in einer irreversiblen Verbreiterung von spektralen Löchern als Funktion der Temperatur. Wie die folgenden Messungen belegen, findet auch in den vergleichsweise kleinen Proteinen MRP und MbP spektrale Diffusion statt. Ursache für die spektrale Diffusion ist eine dipolare Kopplung zwischen Matrixrelaxationen und dem Chromophor. In drei Gesichtspunkten liefern die Messungen dieser Arbeit neue Informationen: Erstens gibt es diskrete Konformationsänderungen bei bestimmten Temperaturen, zweitens kann die Stärke dieser Änderungen in den verschiedenen Tautomerenbanden (vgl. Kap. 3.4 und 4.2) unterschiedlich sein, und drittens konnte der Einfluß der Glycerin/Wasser Matrix in einem getrennten Experiment quantitativ ermittelt werden und somit zwischen Nah- und Fernfeldkopplung experimentell unterschieden werden.

### 5.1 Messung der irreversiblen Lochverbreiterung in drei verschiedenen Tautomeren von Meerrettich-Peroxidase

Abb. 5.1 (a) bis (c) zeigen die spektrale Diffusion als Funktion der Zyklustemperatur. Aufgetragen ist jeweils die irreversible Änderung  $\Delta\omega_{\text{ir}}$  der Lochbreite, stets gemessen bei der Brenntemperatur von 4 K. Die Brennpositionen stimmen mit denen der Experimente zur Verteilung der Photoprodukt-Barrieren im vorigen Kapitel überein. Sie lagen bei  $16310 \text{ cm}^{-1}$ ,  $16090 \text{ cm}^{-1}$  und  $16000 \text{ cm}^{-1}$ . Es fällt sofort auf, daß die Verbreiterung nicht monoton nach einem Potenzgesetz vor sich geht, sondern bei ca. 12 K eine starke, stufenförmige Zunahme erfährt. Diese ist besonders im Fall (b) gut ausgeprägt. In Fall (c) setzt die Verbreiterung sehr abrupt bei Werten oberhalb von 11 K ein, während hier der obere Teil

der Stufe weniger stark ausgeprägt ist. Mit 5 GHz auf 25 K ist der Absolutwert der Verbreiterung in der  $16310\text{ cm}^{-1}$  Bande ungefähr doppelt so groß wie in den beiden anderen Banden, wo diese im gleichen Temperaturintervall 2 GHz bzw. 2.5 GHz beträgt.

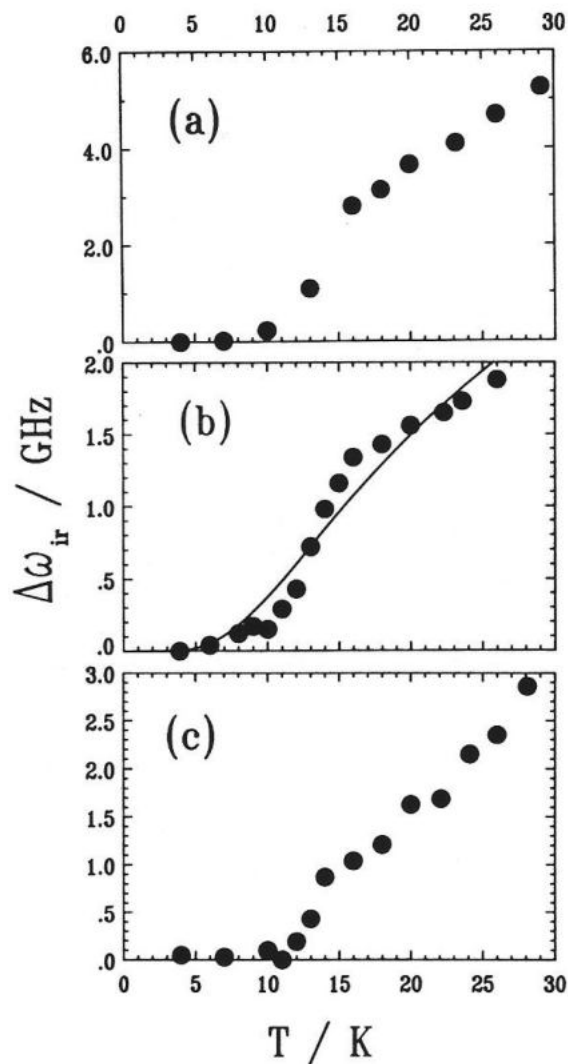


Abb. 5.1: Änderungen der Lochbreite  $\Delta\omega_{\text{ir}}$  als Funktion der Zyklustemperatur in verschiedenen Tautomeren-Banden von MRP/pH5. Der Index "ir" steht für "irreversibel". Die Brennpositionen sind (a)  $16310\text{ cm}^{-1}$ , (b)  $16090\text{ cm}^{-1}$  und (c)  $16000\text{ cm}^{-1}$ . (Fitkurve siehe Text.)



---

Zunächst wurde versucht, den Verlauf mit den in Gleichung 2.11 beschriebenen Beziehung unter Annahme einer festen oberen Grenze für die Energieaufspaltung der TLS anzupassen. Wie man aber in Bild (b) sieht, ist die Übereinstimmung nur gering. Die folgenden Vergleichsmessungen von MP in Glycerin/Wasser führten schließlich zu einer besseren Beschreibung.

Die Messungen der spektralen Diffusion in den drei Banden sind ein Beispiel dafür, daß dieser Prozess mit dem Lochauffüllen (d.h. der thermischen Umkehrung der Photoreaktion) nicht korreliert ist. Während in der B1-Bande bei 12 K eine starke Verbreiterung einsetzt, findet man praktisch keine Änderung der Lochfläche bis 30 K (vgl. Abb. 4.1). Die Breitband-Messungen haben gezeigt, daß eine Flächenänderung erst bei 80 K einsetzt (vgl. Abb. 4.6).

## 5.2 Vergleichsmessung "ohne Apo-Protein":

### Mesoporphyrin IX in Glycerin

In der 0-0 Bande von MP in Glycerin, die der  $16310 \text{ cm}^{-1}$  Bande von MRP entspricht, wurde die spektrale Diffusion gemessen. Wie Abb. 5.2 zeigt, folgen die Meßwerte der irreversiblen Verbreiterung (Dreiecke) einer glatten Kurve. Diese läßt sich durch ein Potenzgesetz  $T^n$  anpassen, wobei  $n = 1.47$  ist. Dieses Verhalten ist charakteristisch für Farbstoff-Glas Systeme und kann im Rahmen des TLS-Modells unter Zuhilfenahme thermisch aktivierter Relaxationsprozesse beschrieben werden (Gl. 2.11). Die Verbreiterung beträgt 4 GHz auf 35 K. Dies ist allerdings wesentlich weniger als in anderen Gläsern, wo man Werte von über 100 GHz im gleichen Temperaturbereich findet /3/.

Gegenübergestellt ist die Protein-Kurve (Kreise). Das Protein/Glas System scheint exakt der gleichen Kurve zu folgen, mit Ausnahme einer ausgeprägten Stufe um 14.5 K. Dort macht das Protein offensichtlich eine

strukturelle Umorganisation. Die Daten zeigen klar, daß diese Stufe ausschließlich durch das Protein verursacht wird. Oberhalb und unterhalb dieser Übergangstemperatur, scheint die Verbreiterungskurve der des Glases zu folgen. Der Verlauf kann fast perfekt durch eine Superposition der "Glaskurve" mit einer diskreten Stufe durch das Protein modelliert werden. Die "Stufenfunktion" wurde geglättet durch ein Integral über eine Gaußfunktion.

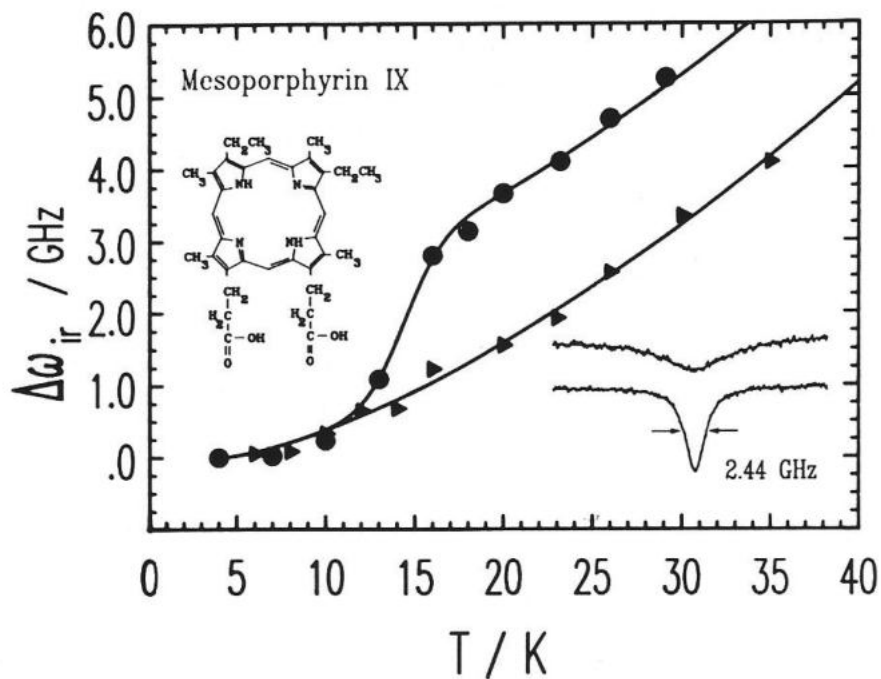


Abb. 5.2: Spektrale Diffusion im Vergleich von MP in Glycerin (Dreiecke) und MRP (Kreise). Die "Glaskurve" wurde mit  $T^{1.46}$  angepaßt, die Kurve für das Protein ist die Superposition der Glaskurve mit einer Stufenfunktion.

### 5.3 Thermisch induzierte Lochverbreiterung in Myoglobin

Bei einer Frequenz von  $16088\text{ cm}^{-1}$  wurde in Protoporphyrin IX substituiertes Myoglobin ein 2.3 GHz breites Loch gebrannt und bei einem Temperaturzyklus bis 46 K die irreversible Verbreiterung gemessen. In Abb. 5.3 sieht man, daß sich das Loch dabei um 3.7 GHz verbreitert. Die Verbreiterung ist im wesentlichen glatt, zeigt aber bei ca. 30 K eine Unregelmäßigkeit. Bei dieser Messung war der Fehler aufgrund eines guten Signal/Rausch-Verhältnisses außergewöhnlich klein. Die Ausbuchtung der Kurve wird deshalb als ein signifikantes Ergebnis gewertet. Insgesamt verläuft die Kurve nach einem Potenzgesetz der Form  $aT^n$ , mit  $n = 1.7$ .

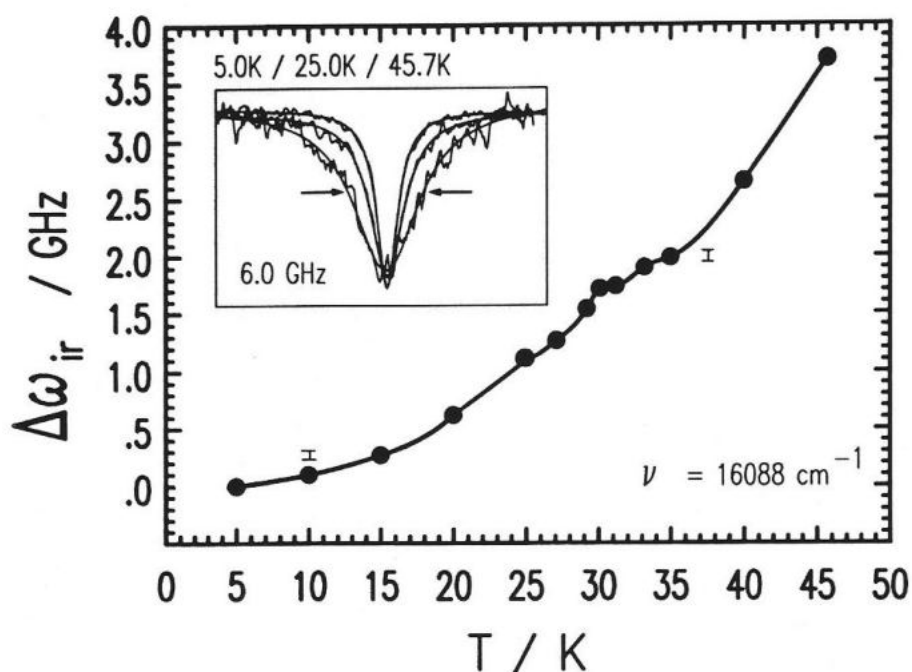


Abb. 5.3 : Irreversible Lochverbreiterung in Protoporphyrin IX substituiertem Myoglobin. Brenn- und Meßtemperatur war 5.0 K. Der Fehler der Messung ist sehr gering.

## 5.4 Diskussion der irreversiblen Lochverbreiterung von Proteinen in Lösung

### 5.4.1 Spektrale Diffusion als Indikator für Konformationsänderungen

Ungeordnete Materialien können selbst bei tiefsten Temperaturen strukturelle Änderungen durchführen, was in der Nichtgleichgewichts-Natur ihres Zustandes begründet liegt. Der wahrscheinlich direkteste und offensichtlichste Nachweis dieser strukturellen Reorganisation ist die als *spektrale Diffusion* bezeichnete *irreversible Verbreiterung* permanenter spektraler Löcher, wie sie bei Temperaturzyklusexperimenten auftritt. Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, basieren alle Theorien der spektralen Diffusion auf einer langreichweitigen Dipol-Dipol Wechselwirkung zwischen einem Sondenmolekül und einem isotropen und homogenen Medium, das von der Wirtsmatrix gebildet wird. Unter diesen Bedingungen bleibt die Linienform des Loches während eines Temperaturzyklus lorentzförmig, die Verbreiterung zeigt einen glatten Verlauf und folgt für thermisch aktivierte Prozesse einem Potenzgesetz mit einem Exponenten von  $3/2$ .

Natürlich erfüllt eine Lösung von Chromoproteinen die Bedingungen der Homogenität und der Isotropie nicht. Der Chromophor kann vom Lösungsmittel durch das Apo-Protein abgeschirmt sein, das immerhin ein Volumen der Größenordnung  $10^4$ – $10^5$  Å<sup>3</sup> hat. Die strukturelle Mobilität eines Proteins kann sich bei tiefen Temperaturen von der des glasartigen Wirtes deutlich unterscheiden. Seine Konformationsbarrieren und die Zustandsdichte der TLS können einer anderen Verteilung folgen. Auf jeden Fall ist die Glasstatistik um jeden Chromophor stark gestört, da dessen Nahumgebung vom Protein gebildet wird. Die Störung sollte umso größer sein, je weiter sich der Chromophor im Inneren des Proteins befindet.

Folgende Fragen sollten durch die Messungen an den beiden Proteinen MRP und Myoglobin geklärt werden:

- a) Gibt es Konformationsänderungen des Proteins bei tiefen Temperaturen, die sich in einer irreversiblen Verbreiterung von spektralen Löchern äußern,
- b) lassen sich Konformationsänderungen des glasartigen Lösungsmittels von denen des Proteins unterscheiden,
- c) gibt es Besonderheiten der strukturellen Mobilität des Proteins verglichen mit Relaxationsphänomenen z.B. in Gläsern.

Globuläre Proteine scheinen ideale Systeme zur Untersuchung von Zwei-Domänen Wechselwirkungen eines Chromophors in glasartigen Lösungsmitteln zu sein: Die Wechselwirkung mit den nahe benachbarten Molekülen des Lösungsmittelkäfigs, der in diesen Fällen durch das Apo-Protein bestimmt ist, und die Wechselwirkung mit weiter entfernten Domänen des Wirtsglasses. Kürzlich wurde von Pack et al. gezeigt /41/, daß eine Abweichung der lokalen Homogenität in der Nachbarschaft des Sondenmoleküls einen drastischen Einfluß auf dessen Verhalten der spektralen Diffusion haben kann. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen haben gezeigt, daß dies für Proteine in glasartigen Lösungsmitteln der Fall ist.

#### 5.4.2 Interpretation mit Hilfe eines Zwei-Domänen Modells

Aus den Messungen an MRP kann man schließen, daß die spektrale Diffusion in Zwei-Domänen Systemen zu ziemlich diskreten Stufen der spektralen Diffusion führen kann. Dafür gibt es zwei Ursachen:

Zum einen kann die Dichte der aktiven Protein-TLS im untersuchten Temperaturbereich sehr gering sein. Höchstwahrscheinlich ist sogar nur ein einzelnes TLS aktiv. Wie spezifische Wärme-Messungen für  $150 \text{ mK} < T < 3 \text{ K}$  gezeigt haben /55/, gibt es z.B. in Metmyoglobin-Kristallen gerade 3 TLS.

Zum anderen scheint es, als wäre dieses TLS in einem relativ engen *räumlichen Bereich* fixiert, so daß man die Annahme der Homogenität fallen lassen muß. Dies hätte zur Folge, daß die Verteilung der charakteristischen TLS-Parameter, wie der Barrierenhöhe  $V$  und der Energie  $E$ , ziemlich schmal sein müßte. Anderenfalls würde man die stufenförmige Zunahme der Lochverbreiterung nicht beobachten. Die Schlußfolgerung ist, daß der Proteinkäfig, verglichen mit der glasartigen Umgebung, einen höheren Ordnungsgrad aufweist. Trotz allem muß betont werden, daß diese Ordnung alles andere als perfekt ist, denn die Stufe in der Verbreiterung ist über einen Bereich von einigen Kelvin verschmiert.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Tatsache, daß die gemessene spektrale Diffusion in MRP durch eine einfache *Superposition* eines Proteinanteils und eines Glasanteils modelliert werden kann. Dies demonstriert deutlich, daß relativ kleine Proteine den Chromophor letztendlich nicht vollständig von den Einflüssen des Lösungsmittels abschirmen. MRP ist ein globuläres Protein mit einem Radius von ca. 30 Å. Wenn die Matrix trotzdem deutlich sichtbaren Einfluß auf die spektrale Diffusion nimmt, müssen die verantwortlichen Wechselwirkungen relativ langreichweitig sein. Diese Schlußfolgerung steht in Einklang mit der Annahme, daß eine Dipol-Dipol Wechselwirkung die spektrale Diffusion auslöst dominiert.

Es bleibt noch die Frage zu klären, wieso der Einfluß der "wenigen" Protein-TLS in etwa genauso groß wie der der umgebenden Matrix-TLS ist. Es kann nämlich mit Hilfe von Modellrechnungen gezeigt werden, daß sich die Löcher schnell verschmälern, wenn der Durchmesser eines von TLS befreiten Lösungsmittelkäfigs zunimmt. Die plausibelste Erklärung für die Kopplung zwischen Wirt-TLS und Protein-TLS ist, daß die Konzentration der TLS im Wirtsglas gering ist. Demnach wäre die Wahrscheinlichkeit, ein Glas-TLS innerhalb eines Volumens der Größe des Proteins zu finden, ebenfalls verschwindend gering. In der Tat ist der Absolutbetrag der gemessenen spektralen Diffusionsverbreiterung im Glyzeringlas mit 4 GHz auf 35 K sehr

viel kleiner als z.B. in Alkoholgläsern. Dies unterstützt die Annahme einer geringen TLS-Konzentration.

Dieses Superpositionsverhalten zeigt aber auch die Grenzen der Empfindlichkeit der Methode, die ja im wesentlichen nach TLS-Verteilungen des *Proteins* suchen soll. Nur dann, wenn der Absolutbetrag der spektralen Diffusion des Proteins in der Größenordnung der spektralen Diffusion des Wirtsglasses liegt, wird man die beiden Anteile voneinander trennen können. Es konnte hier gezeigt werden, daß dies bei MRP sehr gut möglich ist.

Bei Myoglobin hingegen ist die Aussage nicht mehr so klar möglich. Die Kurve der spektralen Diffusion folgt einem Verlauf von  $T^n$ , mit  $n=1.7$ . Bei einer Temperatur von ca. 30 K fällt jedoch eine Unregelmäßigkeit auf. Dieser Kurvenverlauf kann nur von einer strukturellen Relaxation des Proteins herrühren. Der Fehler der einzelnen Meßpunkte konnte durch besonders sorgfältige Messung in diesem Fall außergewöhnlich gering gehalten werden.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Messungen zeigen, daß insbesondere in MRP bei einer relativ niedrigen, wohldefinierten Temperatur strukturelle Prozesse im Grundzustand auftreten. Über die Natur dieser Relaxation kann jedoch mit der verwendeten Methode keine Aussage gemacht werden.



---

## 6. Hydrostatische Druckexperimente

### 6.1 Einleitung

Im folgenden werden Messungen gezeigt, die den Einfluß hydrostatischen Druckes auf spektrale Löcher untersuchen. Es zeigt sich, daß sich das Loch bei Druckerhöhung verbreitert und gleichzeitig auf der Frequenzachse verschiebt. Bei Druckerniedrigung ändert sich das Vorzeichen der Verschiebung, der Verbreiterungseffekt bleibt jedoch gleich.

Wird ein Farbstoffmolekül in ein Lösungsmittel eingebaut, so erfahren die Energieniveaus des Farbstoffes eine Verschiebung durch Wechselwirkung mit den Molekülen der Umgebung. Kasha postulierte /89/, daß in polaren Lösungsmitteln anhand der Richtung der Verschiebung auf die Natur des elektronischen Übergangs geschlossen werden kann: Farbstoffmoleküle mit  $n \rightarrow \pi^*$  Übergängen erfahren eine Verschiebung zu größeren Frequenzen (Blauverschiebung), Farbstoffmoleküle mit  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergängen hingegen eine Rotverschiebung. Dieser Zusammenhang wurde von McConnel in einer Reihe von Lösungsmitteln mit zunehmender Polarität empirisch an ca. zwei Dutzend Molekülen bestätigt /90/.

Der Ursprung der Lösungsmittel-Verschiebung wurde in der Literatur sehr intensiv untersucht /91–93/. Er kann verstanden werden als eine Störung des umgebenden Mediums, die für Grund- und Anregungszustand des Farbstoffmoleküls spezifisch ist. Henke et al. /94/ geben einen Überblick über die Vielzahl der möglichen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, wie permanente Dipole von Lösungsmittel *und* Farbstoff, permanente Dipole in Lösungsmittel *oder* Farbstoff, sowie rein induzierte Wechselwirkungen



---

("dispersiv"). Unter bestimmten Randbedingungen lassen sich konkrete Aussagen ableiten: Betrachtet man lediglich dispersive Wechselwirkung und Lösungsmittelmoleküle mit sphärischer Symmetrie, so findet man, daß der Betrag der einzelnen Lösungsmittelmoleküle zur spektralen Verschiebung additiv ist, und die Stärke im wesentlichen von der Polarisierbarkeit von Grund- und Anregungszustand des Farbstoffmoleküls bestimmt ist. Die Wechselwirkung variiert in diesem Fall proportional zu  $R^{-6}$ , wobei R der Abstand zwischen einem Lösungsmittel- und dem Farbstoffmolekül ist. Prinzipiell verschiebt sich die Absorption bei Dispersionswechselwirkung ins Rote /93/. Für polare Farbstoffe in polaren Lösungsmitteln ist grundsätzlich sowohl Rot- als auch Blauverschiebung möglich.

Die Auswirkung von äußerem Druck auf die Absorptionsfrequenz sowie auf die Linienform wird in o.g. Arbeiten nicht untersucht. Prinzipiell kann man sich jedoch vorstellen, daß kleine Druckänderungen zu einer Variation des Radius des Lösungsmittelkäfigs führen, was als eine Art Störung des Solventshifts betrachtet werden kann /11/.

Ausführlich untersucht wurde der Einfluß von äußerem Druck auf breitbandige Absorptionsspektren im Rahmen von konventionellen Hochdruck-Experimenten /95/. Im folgenden wird ein Modell eingeführt, das eng an eine neuere Veröffentlichung von Laird und Skinner angelehnt ist /84/, die den Effekt von äußerem Druck auf spektrale Löcher im Rahmen einer Linienform-Theorie unter Einbeziehung der relevanten mikroskopischen Parameter beschreibt.

In ungeordneten Medien spiegelt die inhomogene Bande die statischen mikroskopischen Wechselwirkungen der spektralen Sonde (Farbstoffmolekül) mit deren Umgebung wider. Diese Wechselwirkungen bestimmen die Lösungsmittelverschiebung, die Bandenform-Funktion und die Bandenbreite. Die verschiedenen Wechselwirkungen reagieren verschieden und ganz

---

spezifisch auf kleine Störungen, die der Probe aufgezwungen werden. Da die inhomogene Bande jedoch relativ breit ist, sind die hervorgerufenen Änderungen der optischen Eigenschaften auf einer relativen Skala gesehen recht gering. Für den Nachweis einer Verschiebung der gesamten inhomogenen Bande benötigt man in herkömmlichen Hochdruckexperimenten Drücke in der Größenordnung von GPa /12/.

Spektrales Lochbrennen verbessert die Auflösung und damit die Empfindlichkeit dramatisch. Änderungen der optischen Eigenschaften, die durch kleine Störungen induziert werden, können mit hoher Präzision festgestellt werden. Mit anderen Worten, inhomogene Linienverbreiterungseffekte können auf der Skala der homogenen Linie untersucht werden. Kleine Störungen können erzeugt werden durch Änderung der Temperatur /25/, durch Anlegen eines elektrischen Feldes /96,97/ oder durch externen Druck auf die Probe /11,14/.

Der Vorteil der Lochbrennmethode liegt im Kern darin begründet, daß man die Breite der inhomogenen Bande ausnutzt und an verschiedenen Positionen innerhalb der Bande Druckexperimente durchführt. Die unterschiedliche Stärke der Farbstoff-Matrix Wechselwirkung innerhalb der inhomogenen Bande spiegelt sich direkt in der verschiedenen Stärke der Lochverschiebung, abhängig von der Beobachtungsfrequenz, wider. In Verbindung mit existierenden Theorien und Modellen erhält man somit Informationen über eine ganze Reihe von interessanten Systemparametern wie der Vakuum-Absorptionsfrequenz des Farbstoffmoleküls, der isothermen Kompressibilität der Matrix bei tiefen Temperaturen und der Lösungsmittel-Verschiebung.

Es wird gezeigt, daß es möglich ist die Vakuum-Absorptionsfrequenz von Resorufin *im eingebauten Zustand* sowie die Kompressibilität organischer Alkohol-Gläser bei 1.5 K zu bestimmen. Außerdem konnte erstmals die lokale

Kompressibilität von Proteinen gemessen werden, was mit Hilfe anderer Techniken bislang nicht möglich war. Dies erlaubte wiederum eine Abschätzung für die Größe von Volumenschwankungen der Proteine, die für deren biologische Funktion eine wichtige Größe sind.

## **6.2 Druckexperimente an dotierten Alkohol-Gläsern**

### **6.2.1 Der Farbeffekt bei der Lochmitten-Verschiebung**

Bei diesen Experimenten handelt es sich um die ersten Experimente dieser Art an sog. "weichen" organischen Gläsern /15,16/. Die Proben wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben in flexible Plastikbeutel eingeschweißt, wodurch sichergestellt war, daß der angelegte Druck die Proben isotrop belastete.

Die Experimente wurden prinzipiell folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurde an einer bestimmten Frequenz innerhalb der inhomogenen Bande ein Loch bei Atmosphärendruck gebrannt und anschließend aufgenommen. Danach wurde der Druck sukzessive erhöht und wiederum ein Spektrum gemessen. Eine Mittelung über mehrere Scans pro Druckwert verbesserte die Genauigkeit merklich. Abb. 6.1 zeigt, stellvertretend für alle Messungen, wie ein spektrales Loch sich durch Druckerhöhung verschiebt und verbreitert. In diesem Fall wurde der Druck zwischen den einzelnen Scans um 0.2 MPa erhöht. Negative Änderungen der Lochmitten-Frequenz

bedeuten eine Verschiebung "ins Rote". Die druckinduzierten Änderungen sind in allen gemessenen Fällen *vollkommen reversibel*.

Dies wird in Abb. 6.2 deutlich, wo am selben Loch mehrmals Druckänderungen auf 1.5 MPa und wieder zurück auf 0 MPa vorgenommen wurden. Nach Relaxieren des Druckes hatte das Loch im Rahmen der Meßgenauigkeit stets die ursprüngliche Breite und Lochmitten-Frequenz.

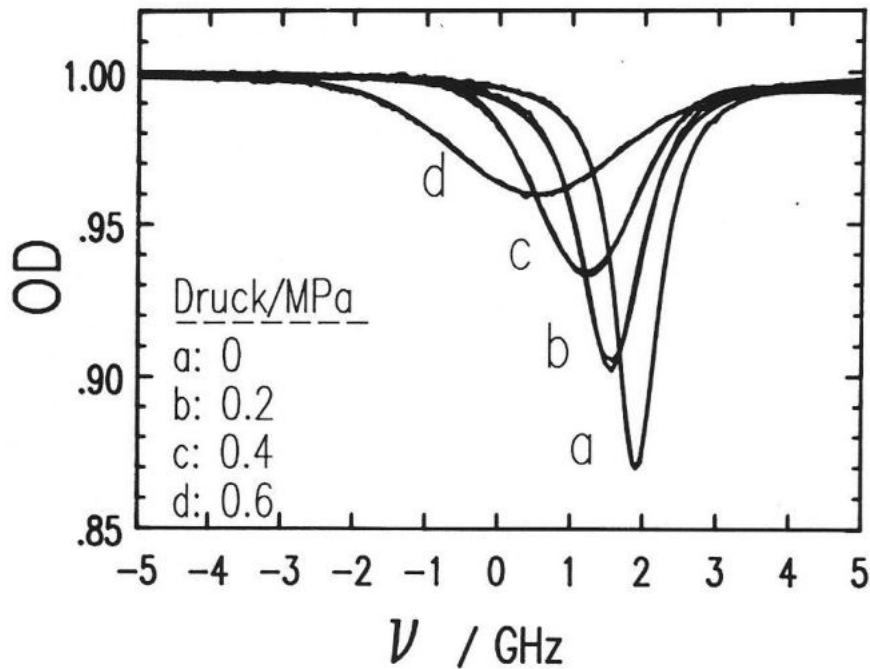


Abb.6.1: Spektrales Loch im System Resorufin/Glyzerin unter dem Einfluß einer äußeren hydrostatischen Druckänderung von jeweils 0.2 MPa.

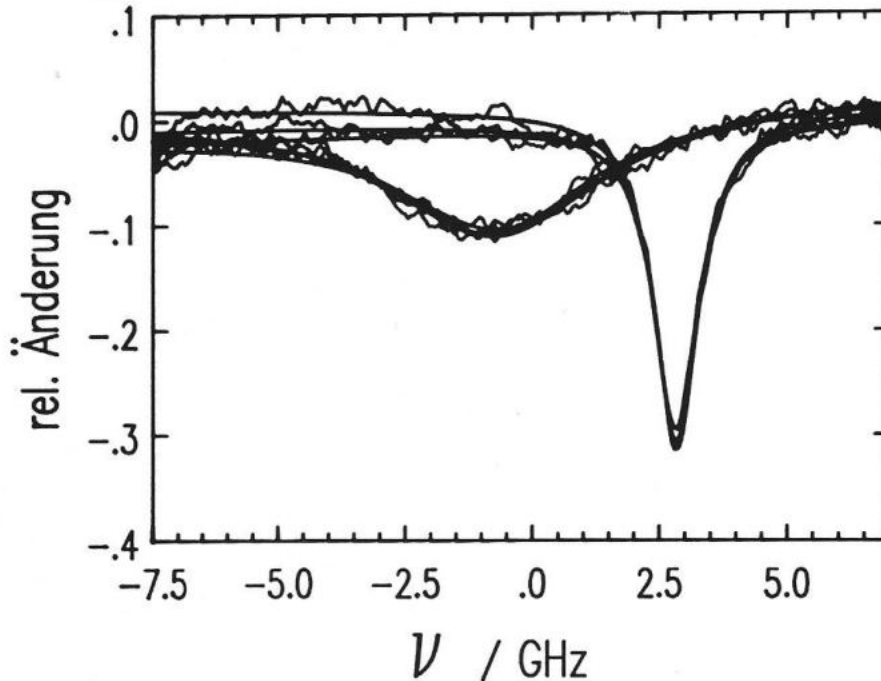


Abb.6.2: Mehrmalige Druckänderung auf den gleichen Wert von 1.5 MPa und anschließendes Wegnehmen des Druckes hinterläßt keine irreversiblen Änderungen. (System: MRP/pH5)

Ein wesentliches Ergebnis dieser Messungen ist der "Farbeffekt" der Lochmitten-Verschiebung. Dies bedeutet, daß die Stärke der Verschiebung abhängig von der Brennposition innerhalb der inhomogenen Bande ist. Abb. 6.3 zeigt dies am Beispiel von Resorufin in Ethanol/Methanol sehr anschaulich: trotz der in beiden Bildern gleichen Druckänderung von 2.4 MPa, verschiebt sich das Loch in der roten Flanke der inhomogenen Bande deutlich stärker als in der blauen Flanke. Eine detaillierte Untersuchung des Druckeffektes an der gleichen Probe führt zu den Ergebnissen in Abb. 6.4. Man sieht zunächst, daß die Verschiebung für alle Brennfrequenzen bis zu Druckänderungen von 2.4 MPa linear mit der Druckänderung geht.

Weiterhin variiert die Stärke der Druckverschiebung sehr deutlich in Abhängigkeit von der Brennfrequenz und nimmt stetig von der roten Seite der Bande zur blauen Seite der Bande hin ab, wo sie nahezu verschwindet (vgl. mit Abb. 3.2, wo die Brennpositionen durch Pfeile markiert wurden).

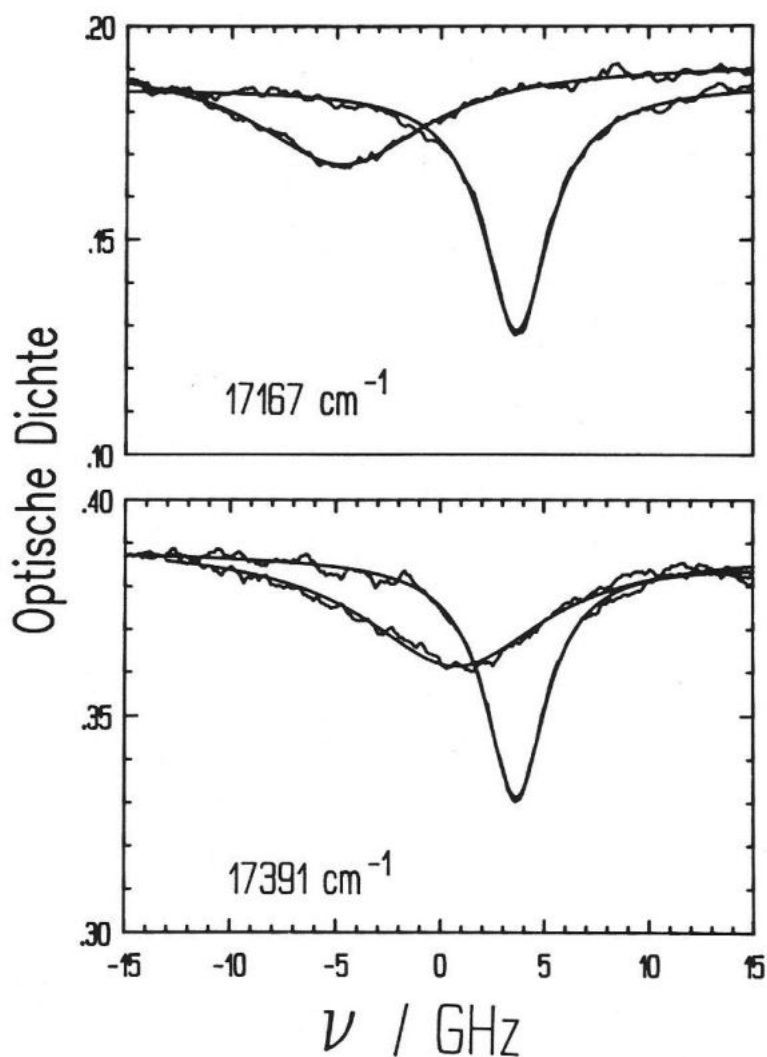


Abb.6.3: Druckeffekt an zwei verschiedenen Positionen der Bande bei jeweils gleichem Betrag der Druckänderung von 2.4 MPa (System: Resorufin in EtOH/MeOH)

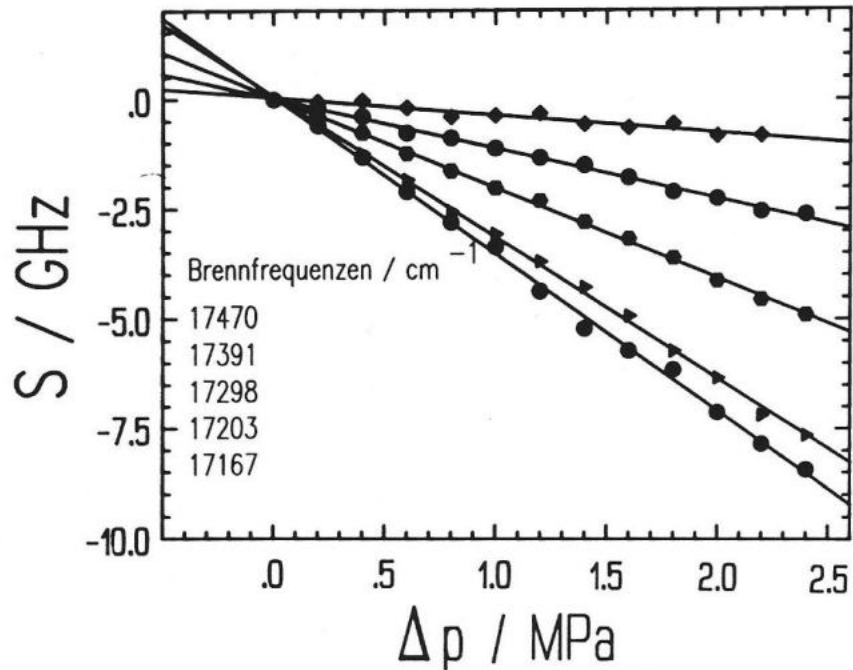


Abb.6.4: Druckverschiebung in Abhängigkeit von der Brennfrequenz an fünf verschiedenen Positionen innerhalb der inhomogenen Bande in Ethanol/Methanol (vgl. Abb.3.2).

Trägt man die Werte der Steigungen  $s/\Delta p$  der Geraden von Abb. 6.4 gegen die Brennfrequenz auf, so erkennt man wiederum einen linearen Zusammenhang (Abb. 6.5). Lineare Extrapolation führt auf einen Schnittpunkt mit der Frequenzachse bei  $17500 \text{ cm}^{-1}$ . Die Extrapolationsgerade hat eine Steigung von  $0.36 \text{ GPa}^{-1}$ .

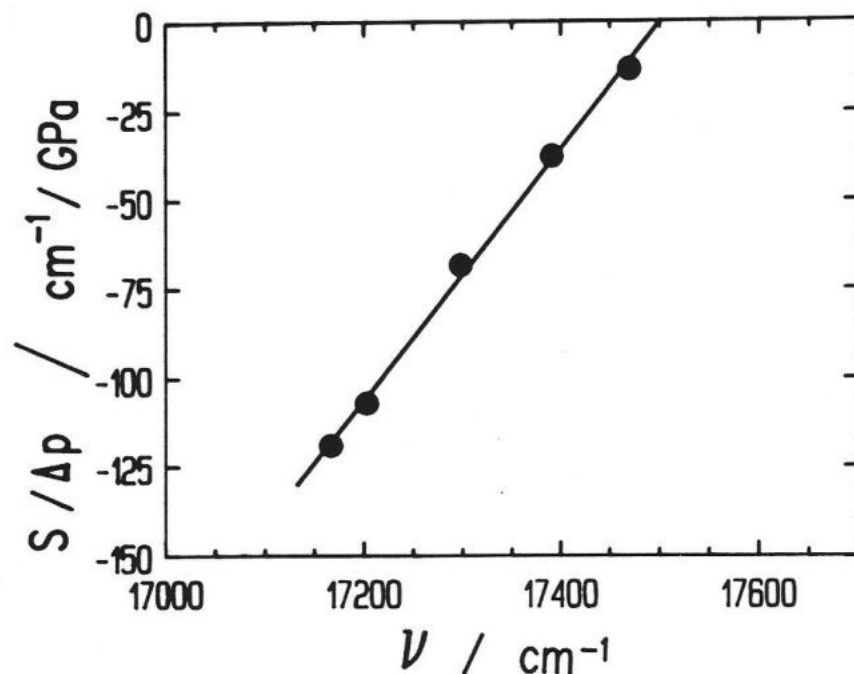


Abb.6.5: Stärke der Druckverschiebung als Funktion der Brennfrequenz in Ethanol/Methanol. Alle Werte sind negativ und liegen auf einer Geraden.

Ganz analog zu den eben beschriebenen Messungen wurden Experimente an Resorufin in EGH und in Glycerin durchgeführt. Für EGH zeigt Abb. 6.6 die Lochverschiebung unter ansteigendem Druck bei den in Abb. 3.3 markierten Positionen innerhalb der inhomogenen Bande. Auch hier geschieht die Verschiebung linear zum angelegten Druck und weist einen ausgeprägten Farbeffekt auf. Zum ersten Mal konnte man hier ein System finden, bei dem sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Blauverschiebung auftritt. Aus der Auftragung von  $s/\Delta p$  gegen die Brennfrequenzen (Abb. 6.7) ergibt sich im Falle von EGH mittels linearer Interpolation ein Vorzeichenwechsel der Verschiebung bei einer Frequenz von  $17100 \text{ cm}^{-1}$  und eine Steigung der Interpolationsgeraden von  $0.24 \text{ GPa}^{-1}$ .



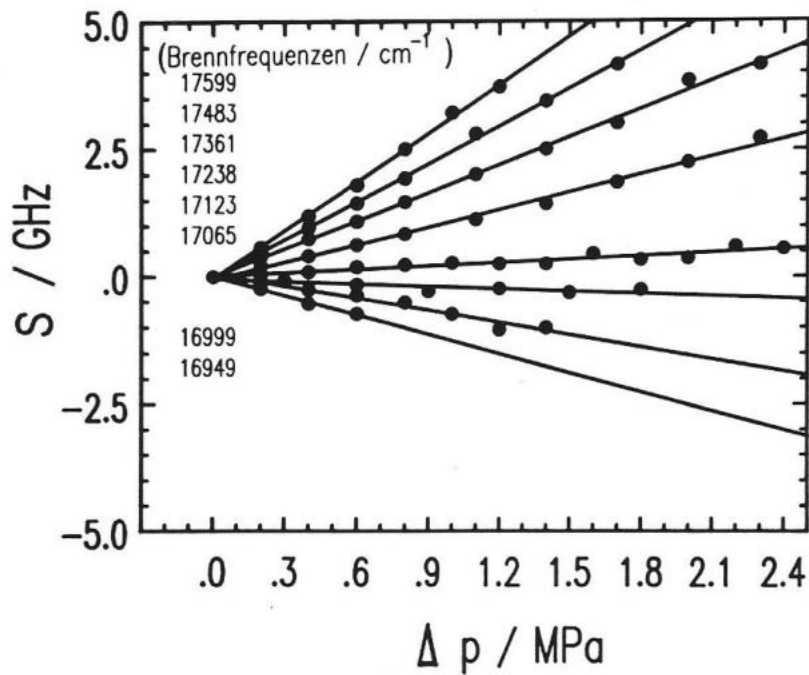


Abb. 6.6: Frequenzverschiebung als Funktion des angelegten Druckes in EGH für die eingetragenen 8 Brennfrequenzen.

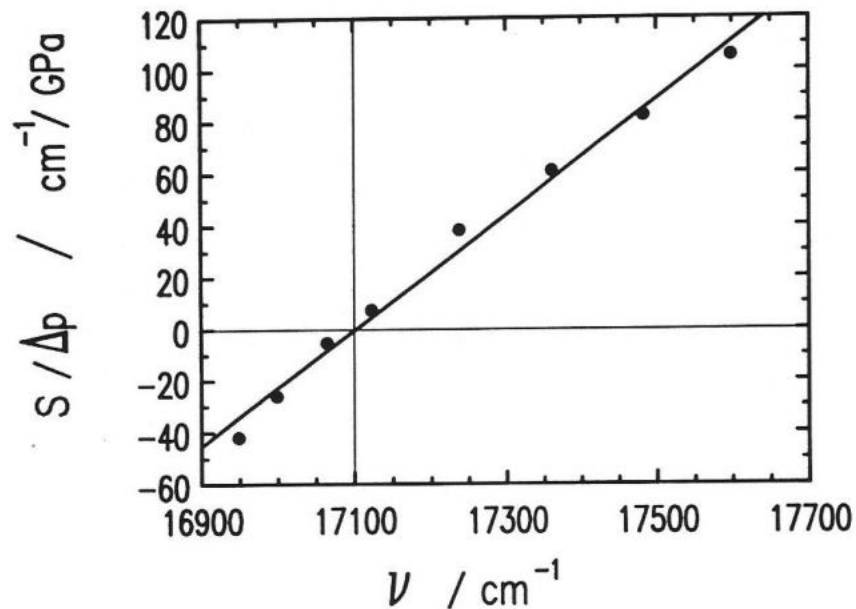


Abb. 6.7: Stärke  $s/\Delta p$  der Druckverschiebung als Funktion der Brennfrequenz in EGH. Die Punkte liegen auf einer Geraden und ändern ihr Vorzeichen.

Resorufin in Glycerin ist ein weiteres System, bei dem die Druckverschiebung ihr Vorzeichen ändert (Abb. 6.8). Allerdings ist der Übergang von Rot- zu Blauverschiebung nicht so glatt wie in dem zuvor gezeigten System: offensichtlich gibt es einen ganzen Frequenzbereich, in dem fast keine Verschiebung beobachtet wird. Die Auftragung in Abb. 6.9 zeigt für diesen Fall drei Frequenzbereiche (I,II und III): Für Frequenzen kleiner als  $17050 \text{ cm}^{-1}$  tritt Rotverschiebung auf, gefolgt von einem ca.  $240 \text{ cm}^{-1}$  breiten Bereich mit nahezu verschwindender Druckverschiebung und Blauverschiebung oberhalb von  $17290 \text{ cm}^{-1}$ . Durch lineare Interpolation der Punkte in den Bereichen I und III bekommt man in beiden Fällen den Wert  $0.2 \text{ GPa}^{-1}$  für die Steigung.

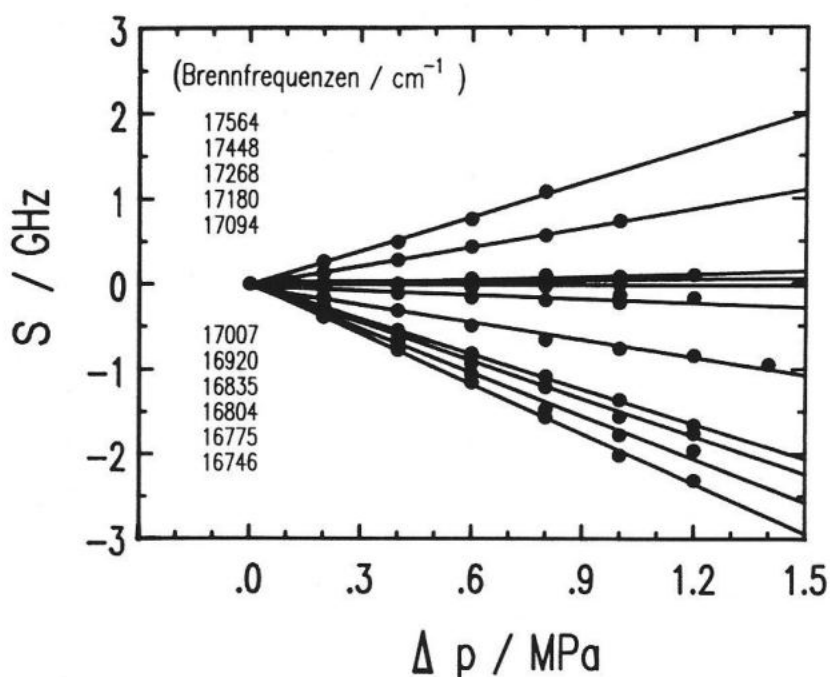


Abb. 6.8: Lochmitten-Verschiebung in Glycerin als Funktion der Druckänderung bei 11 verschiedenen Brennfrequenzen. Bei mehreren Brennfrequenzen verschiebt sich das Loch praktisch nicht.

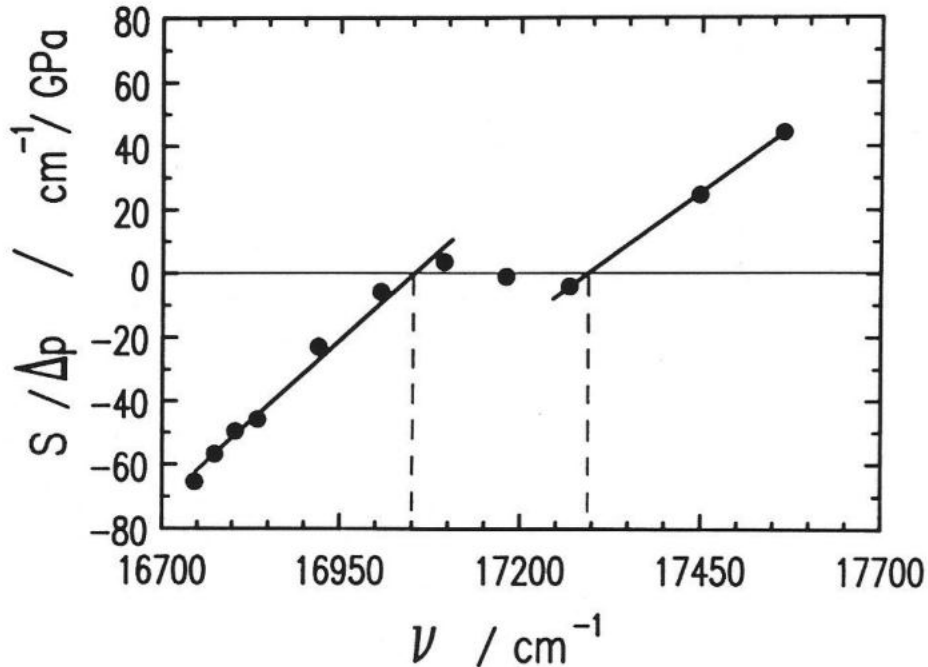


Abb. 6.9: Stärke der Verschiebung als Funktion der Brennposition. Es gibt einen Bereich mit verschwindendem Druckeffekt. (Probe: Resorufin/Glyzerin).

### 6.2.2 Druckverbreiterung

Eine Verbreiterung der spektralen Löcher unter Druck wurde in allen drei Alkoholproben gefunden. Nach Ausführung der in Kapitel 3.5 beschriebenen Entfaltung der Lochverbreiterung findet man, wie auch bei der Lochverschiebung, eine lineare Abhängigkeit von der Druckänderung. Außerdem ist die Stärke der Druckverschiebung abhängig von der Beobachtungsfrequenz (Farbeffekt). Abb. 6.10 zeigt beispielhaft den Verlauf einer Druckverbreiterung in Glyzerin. Die Verbreiterung geht perfekt linear mit dem Druck. Wie in dem Einschub deutlich wird, handelt es sich hierbei um eine Brennposition, bei der keine *Druckverschiebung* vorliegt.

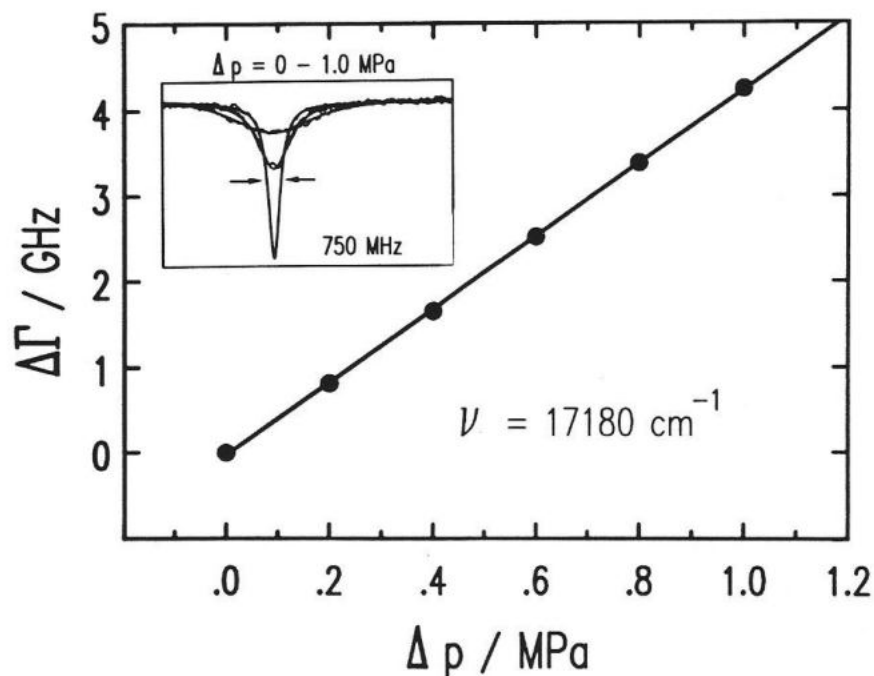


Abb. 6.10: Loch-Verbreiterung als Funktion der Druckänderung in Glyzerin. Der Einschub zeigt, daß sich das Loch bei dieser Brennfrequenz ( $17180 \text{ cm}^{-1}$ ) trotz linearer Verbreiterung nicht verschiebt.

In den untersuchten Gläsern scheint es offenbar eine Korrelation zwischen der Druckverbreiterung und der Druckverschiebung zu geben: Die Druckverbreiterung wird minimal (Ethanol/Methanol, EGH) bzw. maximal (Glyzerin) bei Frequenzen mit verschwindender Druckverschiebung (Abb. 6.11).

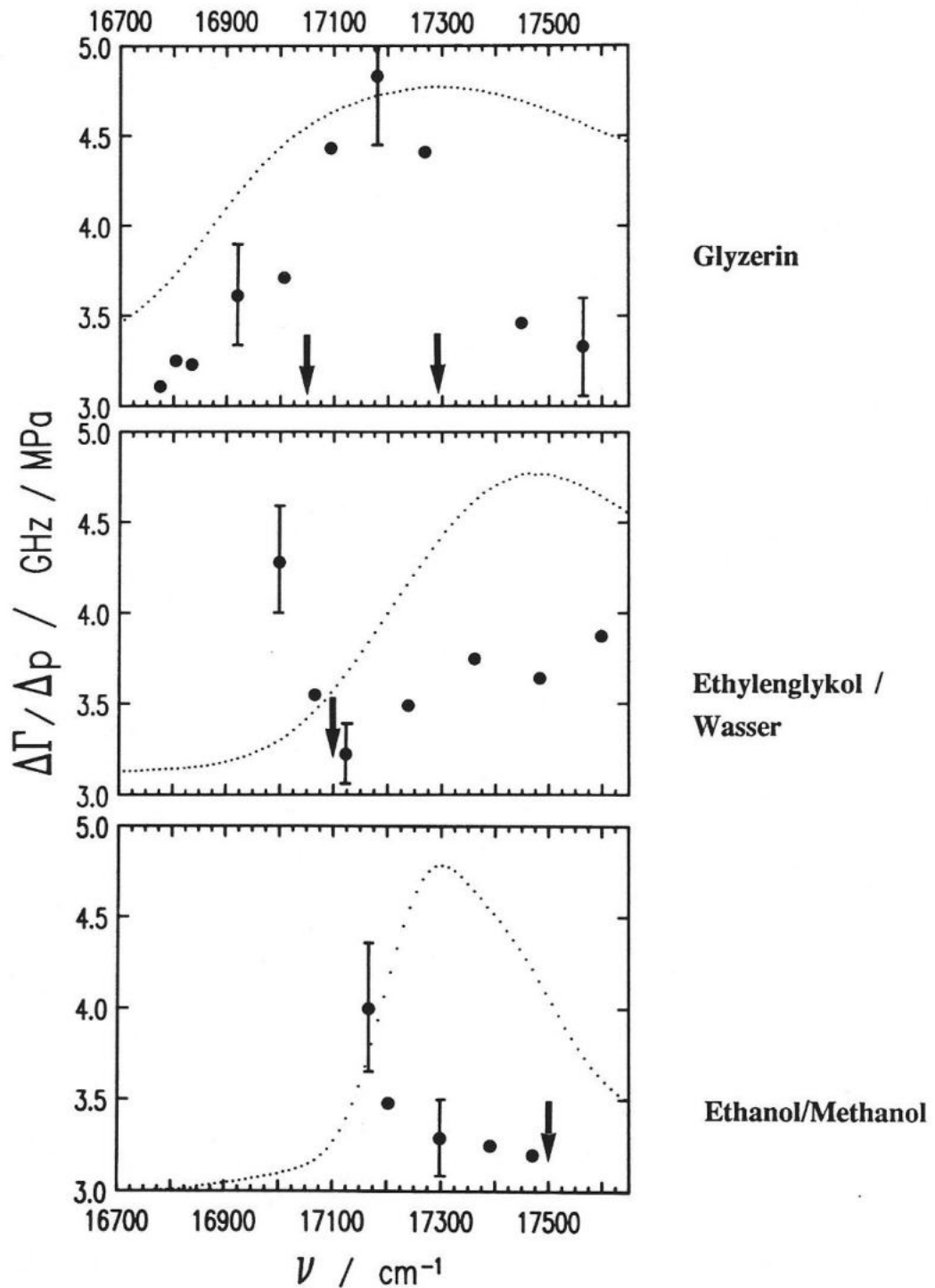


Abb. 6.11: Farbeffekt der Druckverbreiterung in den drei Alkohol-Gläsern. Offenbar besteht eine Korrelation mit der Druckverschiebung. Die Pfeile deuten auf die gemessenen Vakuumfrequenzen.

### 6.3 Druckexperimente an Proteinen

Die Druckexperimente an Gläsern hatten gezeigt, daß die Methode ausgereift war und die Daten sinnvoll interpretiert werden konnten. Es lag deshalb nahe, sie auch auf Proteine anzuwenden. Die dafür gewählten Chromoproteine MRP und MbP haben wegen der Porphyrin-Chromophore gute Lochbrenneigenschaften. Es stellte sich heraus, daß sich auch hierbei die Löcher linear mit der Druckänderung verschieben und dabei breiter werden. Alle Veränderungen sind vollkommen reversibel falls man nach Druckänderungen auf den Ausgangsdruck, der beim Brennen vorlag, zurückkehrt. Ebenfalls ist bei Variation der Brennfrequenz ein Farbeffekt erkennbar.

#### 6.3.1 Mesoporphyrin IX substituierte Meerrettich-Peroxidase

##### a) Proteinlösung mit pH5

In der Tautomerenbande B1 wurden an fünf verschiedenen Positionen die Druckverschiebung gemessen. Abb. 6.12 zeigt die Linearität der Lochmittenverschiebung an verschiedenen Brennpositionen. Im Einschub dieser Abbildung sieht man, daß die Stärke der Druckverschiebung ( $s/\Delta p$ ) linear über die Bande variiert und zu kleineren Brennfrequenzen hin abnimmt. Die Frequenz, bei der die Druckverschiebung verschwindet, liegt außerhalb der inhomogenen Bande und muß durch Extrapolation bestimmt werden. Man findet für diese Frequenz einen Wert von  $16675 \text{ cm}^{-1}$ . Die Steigung der Interpolationsgerade im Einschub von Abb. 6.12 hat einen Wert von  $0.2 \text{ GPa}^{-1}$  ( $\pm 0.01$ ).

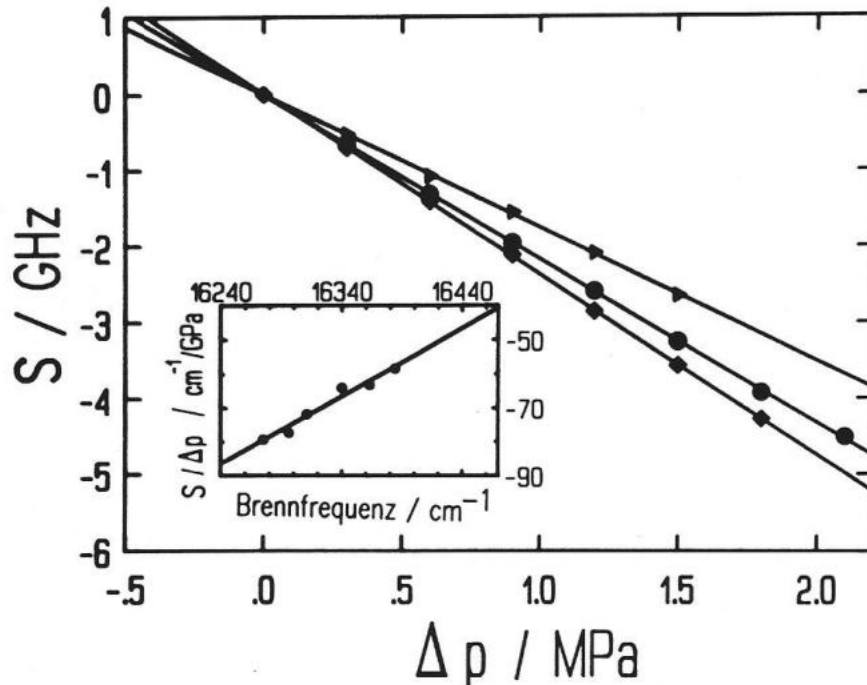


Abb. 6.12: Die Verschiebung der Zentralfrequenz eines Loches bei Druckänderung und bei drei verschiedenen Brennfrequenzen im Chromoprotein Meerrettich-Peroxidase (pH5, B1-Bande). Der Einschub zeigt die Stärke  $s/\Delta p$  des Druckeffektes in Abhängigkeit von der Brennfrequenz.

#### b) Proteinlösung mit pH8

In der pH8-Probe wurden in den Banden B1, B2, und B3 Druckmessungen durchgeführt. Die Bande B2 wurde dazu zunächst, wie in Kap. 3 beschrieben, durch Ausbleichen der Bande B1 künstlich erzeugt. In allen Banden wurde wieder eine perfekt lineare Abhängigkeit der Lochverschiebung vom angelegten Druck gefunden. In der B1-Bande war ein Farbeffekt der Druckverschiebung zu sehen, der jedoch keine eindeutig zu interpretierende Abhängigkeit von der Brennfrequenz aufwies. Deshalb wurde auf eine

Auswertung verzichtet. In der B3-Bande hingegen ist der Farbeffekt gut ausgeprägt und linear: Die extrapolierten Werte liefern eine Steigung von  $0.52 \text{ GPa}^{-1}$ , und bei einer Frequenz von  $16249 \text{ cm}^{-1}$  läuft die Gerade durch Null.

Im einzelnen vorgestellt werden nun, wegen ihres besonders interessanten Verhaltens, die Daten der Druckmessungen in der B2-Bande. Hier wurde erstmals ein Aufspalten des Loches bei Anlegen von Druck beobachtet. In Abb. 6.13 ist dies für verschiedene Brennfrequenzen gezeigt. Das Lochprofil wurde mit der Summe zweier Lorentzkurven angefitet.

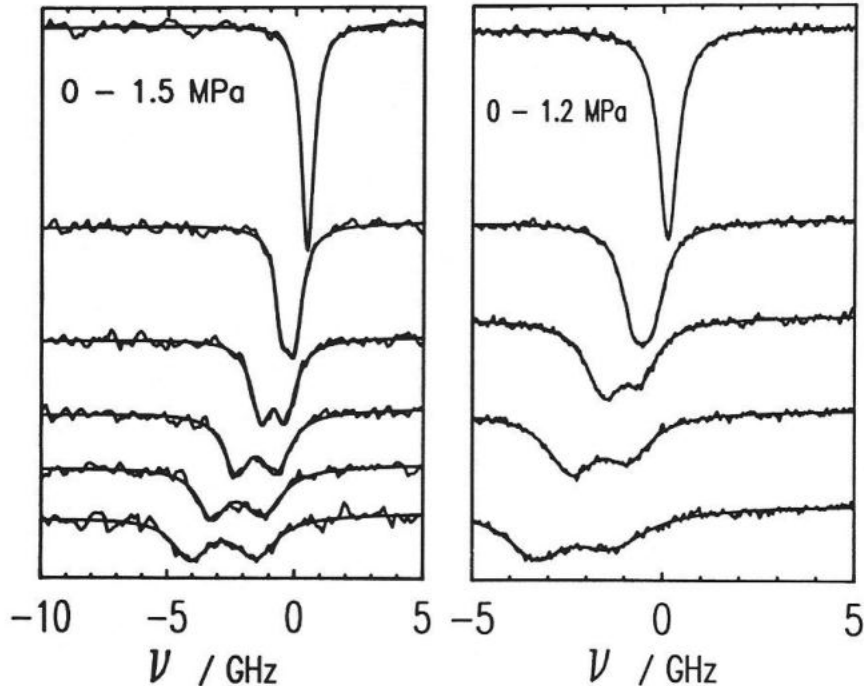


Abb. 6.13: Aufspalten eines Loches als Funktion des Druckes bei zwei verschiedenen Frequenzen ( $16188 \text{ cm}^{-1}$  und  $16195 \text{ cm}^{-1}$ ). Probe: MRP/pH8, B2-Bande.

Wie man in Abb. 6.14 für eine bestimmte Brennfrequenz sieht, verschiebt sich jede der beiden Komponenten linear mit dem angelegten Druck, jedoch mit verschiedener Stärke.



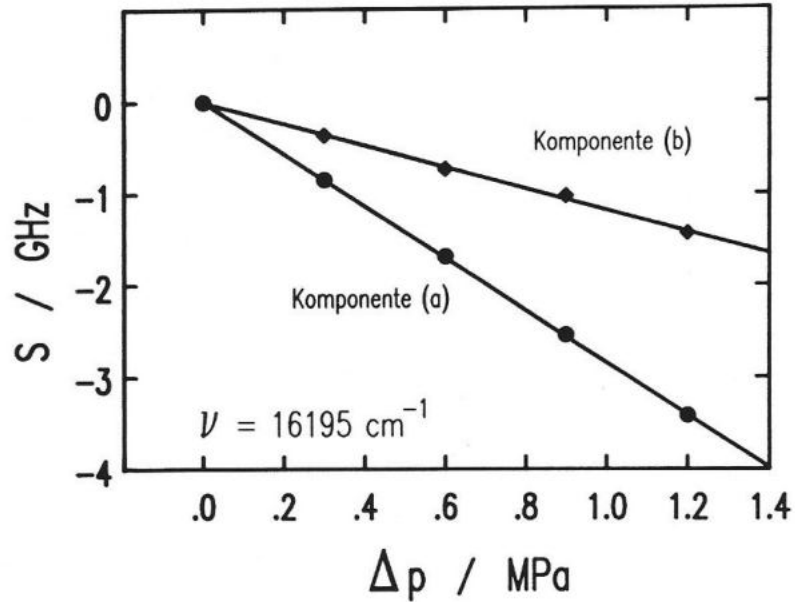


Abb. 6.14: Beispiel für die Linearität der Druckverschiebung der beiden Lochkomponenten in der B2-Bande von MRP/pH8.

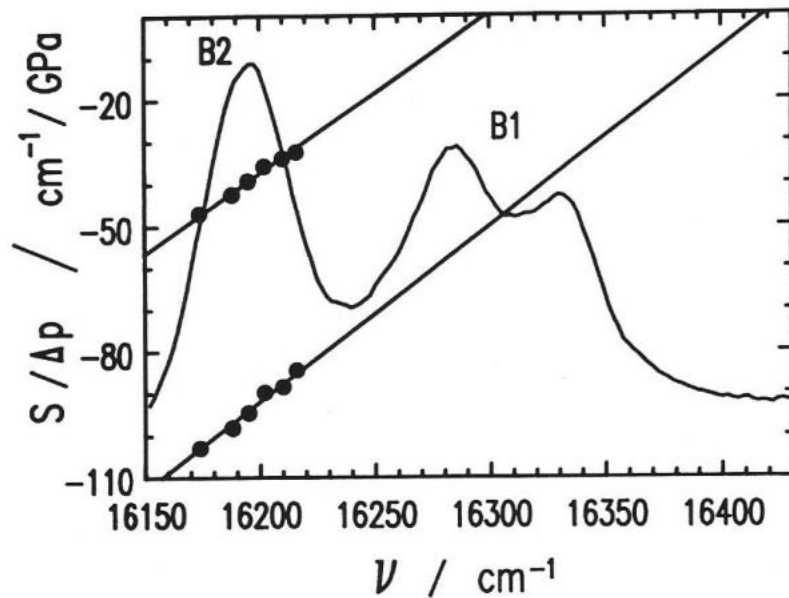


Abb. 6.15: Farbeffekt der Druckverschiebung in der B2-Bande von MRP/pH8. Wegen der Aufspaltung des Loches erhält man zwei Extrapolationsgeraden mit annähernd gleicher Steigung.

Betrachtet man den Farbeffekt (Abb. 6.15), so erkennt man, daß er in beiden Fällen linear verläuft. Die Frequenzen für verschwindenden Druckeffekt liegen bei  $16299 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $16419 \text{ cm}^{-1}$ . Die Steigung der Extrapolationsgeraden ist in beiden Fällen praktisch gleich, und zwar  $0.40 \text{ GPa}^{-1}$  ( $\pm 0.02 \text{ GPa}^{-1}$ ).

c) MRP mit Substratmolekül NCHA

An der niederfrequenten Seite der Singulettbande wurde ein linearer Farbeffekt in der Druckverschiebung gefunden. Mit  $0.80 \text{ GPa}^{-1}$  als Steigung der Extrapolationsgeraden findet man den, im Rahmen dieser Arbeit, größten gemessenen Wert. Die Frequenz für verschwindende Verschiebung ist  $16337 \text{ cm}^{-1}$ .

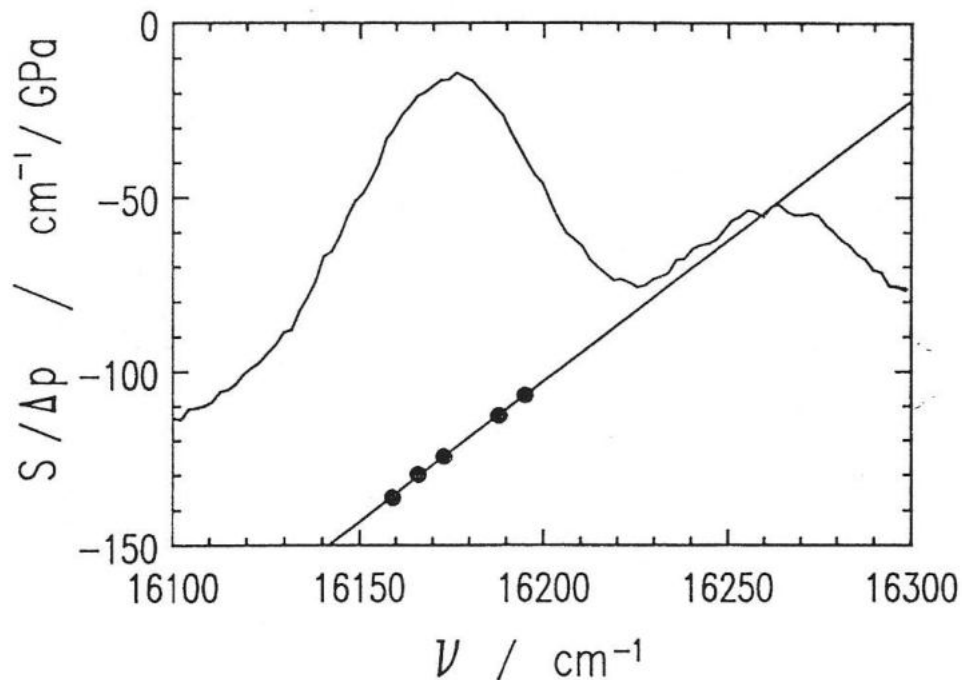


Abb. 6.16: Farbeffekt der Druckverschiebung in der langwelligen 0-0 Bande von MRP/NCHA. Die Steigung hat den größten Wert aller Messungen.

---

Bei allen MRP-Proben verschoben sich die Löcher bei Druckerhöhung zu kleineren Frequenzen, d.h. ins Rote, und zwar unabhängig von pH, Substrat oder Brennfrequenz.

### 6.3.2 *Protoporphyrin IX substituiertes Myoglobin*

Die Druckmessung ( $T=1.5$  K) an diesem System wurde mit besonders hoher Genauigkeit durchgeführt: An 22 Stellen in der inhomogenen 0-0 Bande wurden Löcher gebrannt und deren Druckverschiebung in über 700 Lochspektren gemessen. Dies war nötig, da es sich zeigte, daß  $s/\Delta p$  (d.h. die Stärke des Druckeffektes) nicht linear über die Bande variierte, sondern eine interessante Struktur aufwies. Betrachtet man den Verlauf der Kurve in Abb. 6.17, so erkennt man sofort zwei Bereiche mit im wesentlichen linearer Abhängigkeit und nahezu gleicher Steigung. Extrapoliert man diese Geraden auf  $y$ -Werte für verschwindende Druckverschiebung, so findet man zwei Frequenzen:  $\nu_1$  bei  $15794 \text{ cm}^{-1}$  und  $\nu_2$  bei  $15922 \text{ cm}^{-1}$ . Die Steigungen der Extrapolationsgeraden betragen  $0.15 \text{ GPa}^{-1}$ . Bemerkenswert ist, daß bei dieser Messung die Stärke der Druckverschiebung eine Variation um mehr als einen Faktor 2 aufweist (Abb. 6.18).

Außerdem ist diese Messung ein Nachweis für die hohe Genauigkeit und vor allem Reproduzierbarkeit der Druckmethode. Die Kurve setzt sich aus den Daten von drei Meßreihen an verschiedenen Proben-Präparationen zusammen, was durch die unterschiedlichen Symbole verdeutlicht werden soll. Die Werte von  $s/\Delta p$  sind stets positiv, d.h. unter Druck verschoben sich die Löcher in dieser Probe ins Blaue.

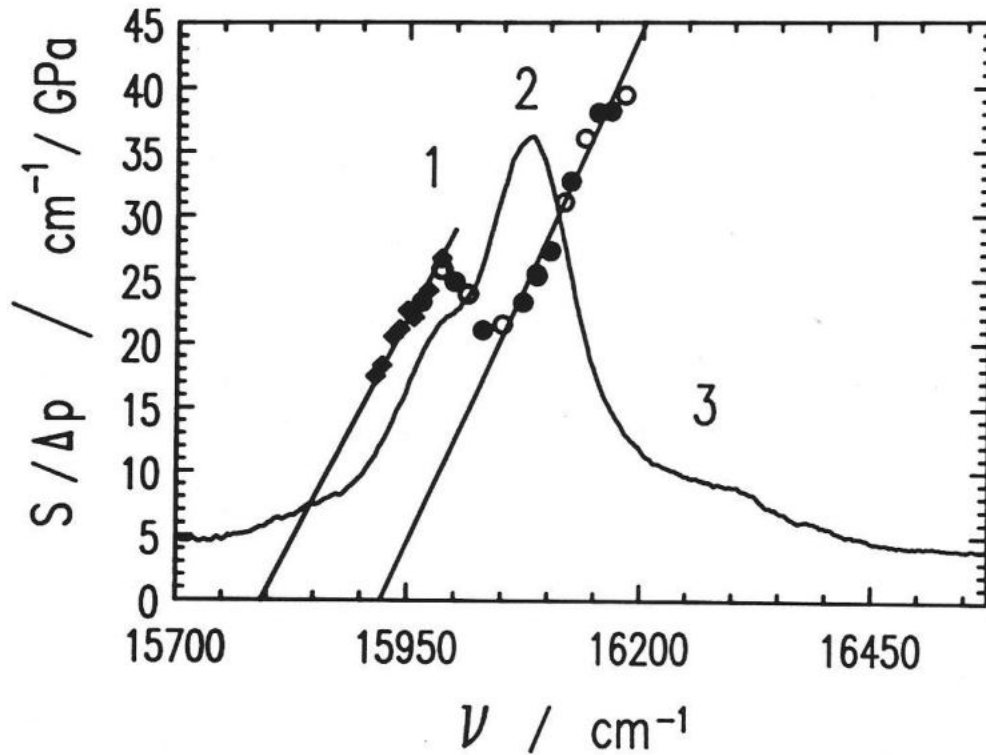


Abb. 6.17: Protoporphyrin IX substituiertes Myoglobin: Frequenzverschiebung pro Druckeinheit als Funktion der Brennfrequenz. Die Punkte wurden auf zwei verschiedene Schnittpunkte mit der Frequenzachse extrapoliert, an denen die Druckverschiebung verschwindet. Verschiedene Symbole stehen für verschiedene Proben-Präparationen.

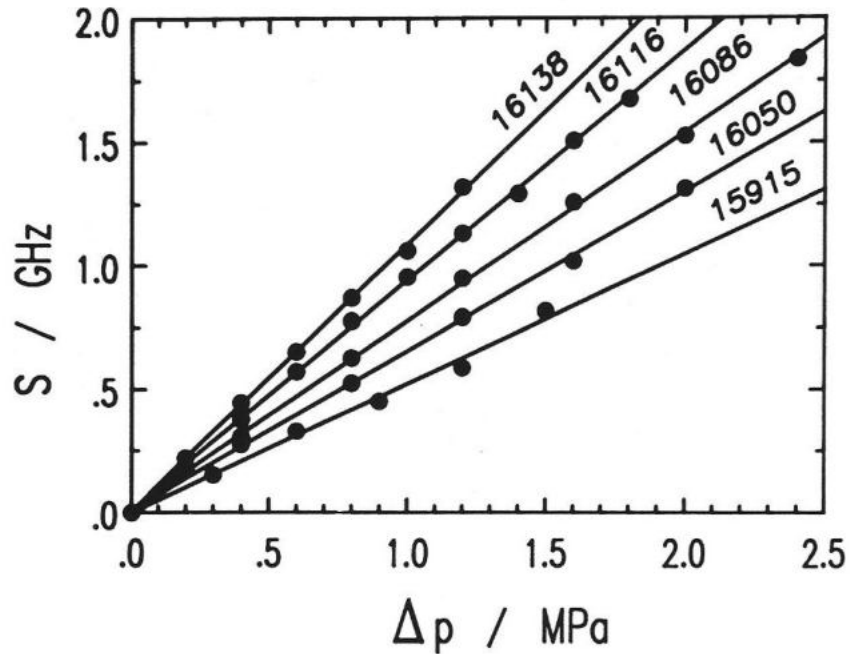


Abb. 6.18: Druckverschiebung der Löcher an verschiedenen Brennpositionen ( $\text{cm}^{-1}$ ). Die Stärke der Verschiebung (Steigung) variiert um mehr als einen Faktor 2.

#### 6.4 Diskussion der Ergebnisse

##### 6.4.1 Ein einfaches Modell für die Druckverschiebung

Wenn ein spektrales Loch isotropem Druck ausgesetzt wird, erfährt es eine Verschiebung und eine Verbreiterung auf der Frequenzachse. In allen untersuchten Gläsern und Proteinlösungen waren diese druckinduzierten Änderungen des Loches vollkommen elastisch, d.h. nach dem Wegnehmen des Druckes hatte das Loch stets wieder seine ursprüngliche Mittenfrequenz sowie die anfängliche Breite. Die Experimente untersuchen demnach die *elastischen* Eigenschaften der Probe. Im folgenden wird zunächst nur die

druckinduzierte Verschiebung des Loches behandelt.

Eine vollständig mikroskopische Theorie der Druckeffekte an spektralen Löchern wurde kürzlich von Laird und Skinner entwickelt /84,98/. Die Messungen der Lochverschiebungen lassen sich mit etwas vereinfachter Argumentation hinreichend genau wie folgt erklären:

Durch den Einbau in eine Matrix erfahren der elektronische Grund- und Anregungszustand eines Farbstoffmoleküls eine Verschiebung. Im allgemeinen ist diese Verschiebung für die beiden Zustände verschieden, d.h. die Absorptionsfrequenz dieses Übergangs erfährt eine Verschiebung gegenüber der des freien Farbstoffmoleküls.  $\nu(R)$  sei die Verschiebung der Absorptionsfrequenz aufgrund eines einzelnen Lösungsmittelmoleküls. Durch Anlegen eines Druckes erfährt  $\nu(R)$  wiederum eine Variation

$$\Delta\nu(R) = \frac{\delta\nu(R)}{\delta R} \frac{\delta R}{\delta p} \Delta p \quad (6.1)$$

Dieser lineare Zusammenhang gilt unter der Voraussetzung, daß die vorkommenden Druckänderungen klein sind. Unter der Annahme, daß die Kompression, die als Folge der Druckänderung eintritt, sowohl isotrop als auch homogen ist, gilt /84/:

$$\frac{\delta R}{\delta p} = \frac{-R}{3} \kappa \quad (6.2)$$

wobei  $\kappa$  die Kompressibilität des Lösungsmittels ist. Wählt man für  $\nu(R)$  eine Dispersionswechselwirkung ( $\propto R^{-6}$ ) so erhält man aus (6.1):

$$\Delta\nu(R) = 2\kappa \nu(R) \Delta p \quad (6.3)$$

d.h. je größer die schon vorhandene Störung  $\nu(R)$  durch ein Lösungsmittelmolekül ist, desto größer wird auch die druckinduzierte Änderung  $\Delta\nu(R)$  sein.

Angenommen, man untersucht nun diese druckinduzierte Verschiebung mit Hilfe eines spektralen Loches, das bei einer bestimmten Frequenz  $\nu_b$  innerhalb der inhomogenen Bande gebrannt wurde. Dann beobachtet man gerade

diejenigen Glaskonfigurationen, die zu einer Absorption bei eben dieser Frequenz  $\nu_b$  beitragen, und erhält als mittlere Verschiebung  $s$ :

$$s \equiv \langle \Delta \nu(R) \rangle_c = 2\kappa \langle \nu(R) \rangle_c \Delta p \quad (6.4)$$

Der Index  $c$  drückt aus, daß spezielle Konfigurationen herausgegriffen werden.  $\langle \nu(R) \rangle_c$  ist die Lösungsmittelverschiebung der durch das Loch (mit der Brennfrequenz  $\nu_b$ ) selektierten Moleküle:

$$\langle \nu(R) \rangle_c = \nu_b - \nu_{vac} \quad (6.5)$$

Dabei ist  $\nu_{vac}$  die Vakuumabsorptionsfrequenz der Farbstoffmoleküle. Damit gilt:

$$s = 2\kappa (\nu_b - \nu_{vac}) \Delta p \quad (6.6)$$

Das gleiche Ergebnis wurde auch von Laird und Skinner in einer Herleitung mit Hilfe der mikroskopischen  $n$ -Teilchen Dichtefunktion erzielt, und beschreibt alle wesentlichen Effekte, die bezüglich der druckinduzierten Lochverschiebung in den Experimenten gefunden wurden:

- a) Das Loch verschiebt sich linear mit dem angelegten Druck.
- b) Die Stärke der Druckverschiebung hängt linear von der Frequenz innerhalb der inhomogenen Bande ab, bei der man mißt.
- c) Falls die inhomogene Bande bezüglich der Vakuumabsorptionsfrequenz zu kleineren Frequenzen hin verschoben ist ("Rotverschiebung"), dann ist  $\nu_b - \nu_{vac}$  negativ, d.h. auch die Druckverschiebung  $s$  geht zu kleineren Frequenzen.

Die spezielle Wahl von  $\nu(R)$ , die zu Gleichung (6.3) führt, bedarf einer näheren Erläuterung. Ein Sondenmolekül erfährt in einer isotropen und homogenen Umgebung eine ganze Reihe von Wechselwirkungen. Da ist zunächst die Lennard-Jones Wechselwirkung mit ihrem kurzreichweitigen abstoßenden Teil, der mit  $R^{-12}$  abfällt, und einem anziehenden Anteil mit mittlerer Reichweite, der als Ursache dispersive Kräfte hat (induzierter Dipol -

induzierter Dipol Wechselwirkung) und einer  $R^{-6}$  Abhängigkeit folgt. Falls das Sondenmolekül von niedriger Symmetrie ist, und das Lösungsmittel polar ist, kommt eine Dipol–Dipol Wechselwirkung hinzu, die mit  $R^{-3}$  variiert. Im Falle von Resorufin, das geladen ist, hat man sogar noch einen weiteren Term zu berücksichtigen, nämlich die Ion–Dipol Wechselwirkung mit einem  $R^{-2}$  Verlauf. Die Dipol–Dipol und die Ion–Dipol Wechselwirkung sind langreichweitig. In homogenen und isotropen Systemen ist ihre Reichweite praktisch unendlich. Geht man jedoch von einer zufälligen Orientierung der Lösungsmittelmoleküle aus, so fluktuieren beide Wechselwirkungsarten räumlich. Sie tragen bei vollständiger Isotropie demnach nicht zu einer Linienverschiebung bei.

Berücksichtigt man jedoch, daß die Farbstoffsonde ihre Nahumgebung polarisieren kann, dann führt auch die Dipol–Dipol–Kopplung zu einer anziehenden Wechselwirkung proportional  $R^{-6}$ :

Es sei  $\epsilon_i(\xi, R)$  die Absenkung des Grundzustandes ( $i=0$ ) bzw. des Anregungszustandes ( $i=1$ ) eines Farbstoffmoleküls durch ein Lösungsmittelmolekül im Abstand  $R$ . Die Orientierungsfreiheitsgrade werden durch  $\xi$  beschrieben. Dann gilt unter Berücksichtigung dispersiver und dipolarer Wechselwirkung:

$$\epsilon_0(\xi, R) = - \frac{C_{0, dis}}{R^6} \xi^2 + \frac{C_{0, dip}}{R^3} \xi. \quad (6.7)$$

Betrachtet man den Mittelwert über alle möglichen räumlichen Orientierungen eines jeden Moleküls, so wird der zweite Term in (6.7) Null. Allgemein gilt, daß es keine mittlere Anziehung zwischen starren Multipolen gibt, wenn alle Orientierungen als gleich wahrscheinlich betrachtet werden /99/. Allerdings erhöht der Boltzmann–Faktor in der Verteilungsfunktion das Gewicht der anziehend wirkenden Orientierungen und liefert einen merklichen Beitrag zur Dipol–Dipol Wechselwirkung. Unter der Annahme, daß die Orientierung durch die Boltzmann–Verteilung am Glaspunkt  $T_g$  festgelegt



wird, findet man /16/:

$$\langle \varepsilon_0(\xi, R) \rangle_{\xi} = - \frac{C_{0, dis}}{R^6} \langle \xi^2 \rangle - \frac{1}{kT_g} \frac{C_{0, dip}^2}{R^6} \langle \xi^2 \rangle. \quad (6.8)$$

Dies führt zu einer Absorptionsfrequenz von

$$\begin{aligned} v(R) &= \langle \varepsilon_1(\xi, R) \rangle_{\xi} - \langle \varepsilon_0(\xi, R) \rangle_{\xi} \\ &= \frac{C_{0, dis} - C_{1, dis}}{R^6} \langle \xi^2 \rangle - \frac{1}{kT_g} \frac{C_{0, dip}^2 - C_{1, dip}^2}{R^6} \langle \xi^2 \rangle. \end{aligned} \quad (6.9)$$

Hierbei wurde angenommen, daß die Orientierung in Grund- und Anregungszustand gleich ist. Dies gilt streng genommen nur in Flüssigkeiten für den vollkommen relaxierten Zustand. Der Fehler den man dabei macht ist jedoch ohne Bedeutung, da er lediglich in den Parameter  $C_{1, dip}^2$  eingeht. Unter Berücksichtigung von Gl. (6.4) erkennt man nunmehr, daß die mittlere Lösungsmittelverschiebung Null werden kann, da  $C_{0, dip}^2 - C_{1, dip}^2$  positiv oder negativ sein kann, je nachdem wie sich das Dipolmoment bei der Anregung ändert. D.h. der zweite Term in (6.9) kann den ersten kompensieren.

Damit konnte gezeigt werden, wie es trotz starker Kopplung mit dem Lösungsmittel zu einem Verschwinden der mittleren Lösungsmittelverschiebung kommen kann. Dies geschieht, wenn es für einen einzelnen Zustand sowohl positive als auch negative Lösungsmittelverschiebungen gibt. Es schließt jedoch nicht aus, daß es für diesen Fall gleichzeitig zu einer großen inhomogenen Verbreiterung der Absorptionsbande kommen kann /16/.

Der Einfachheit halber wird im folgenden  $\bar{v}_0 \equiv \langle \varepsilon_0(\xi, R) \rangle_{\xi}$  und

$\bar{\nu}_1 \equiv \langle \epsilon_1(\xi, R) \rangle_\xi$  gesetzt. Mit Hilfe von Abb. 6.19 kann man folgern, daß man einen blauen Solventshift bekommt, falls

$$\bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_1 \gg (\Gamma_0 + \Gamma_1) / 2, \quad (6.10)$$

und daß ein roter Solventshift gemessen wird, falls

$$\bar{\nu}_1 - \bar{\nu}_0 \gg (\Gamma_0 + \Gamma_1) / 2$$

Für den dazwischenliegenden Fall, bei dem sowohl Rot- als auch Blauverschiebung gefunden wird, muß gelten

$$\frac{1}{2} (\Gamma_0 + \Gamma_1) \gtrsim \bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_1 \gtrsim \frac{-1}{2} (\Gamma_0 + \Gamma_1). \quad (6.11)$$

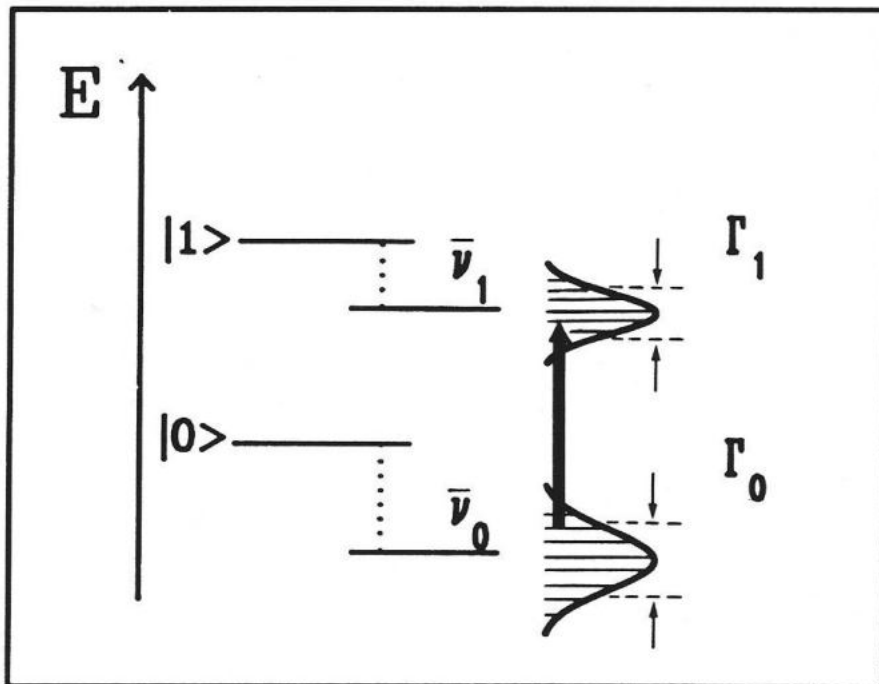


Abb. 6.19: Energieniveaus und inhomogene Verteilungen eines Sondenmoleküls in einem glasartigen Lösungsmittel.

Die Ion-Dipol-Wechselwirkung trägt in niedrigster Näherung nichts zur Lösungsmittel- und Druckverschiebung bei, da die Ladung im angeregten und im Grundzustand gleich ist. Der repulsive Anteil des Lennard-Jones Potentials kann, wie neuere Modellrechnungen zeigen /100/, bezüglich der Linienverschiebung wegen seiner geringen Reichweite mit guter Näherung vernachlässigt werden.

Die Bestimmung der Vakuumfrequenz ist für ein  $1/R^n$ -Potential unabhängig von  $n$ , d.h. von der Art der Wechselwirkung. Man erhält sie, wenn die Druckverschiebung  $s$  Null wird, also  $\nu_b = \nu_{vac}$ . Der Parameter  $n$  ist gemäß Gleichung (6.6) allerdings ausschlaggebend für den Wert der Kompressibilität.

#### 6.4.2 Interpretation der Messungen an den Alkohol-Gläsern

##### a) Resorufin in Ethanol

In Übereinstimmung mit dem Modell der druckinduzierten Lochverschiebung findet man, daß sich die Löcher linear mit dem angelegten Druck verschieben. Die Stärke der Verschiebung nimmt linear von der roten Seite der inhomogenen Bande hin zur blauen Seite ab. Durch Extrapolation erhält man die Vakuumabsorptionsfrequenz bei  $17500 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ ). Sie liegt demnach noch innerhalb der kurzwelligen Flanke der entsprechenden Absorptionsbande. Daraus ergibt sich ein Solventshift von  $205 \text{ cm}^{-1}$ . Die Steigung der Geraden in Abb. 6.5 ist gemäß Gleichung (6.6) gerade  $2\kappa$ . Die Tieftemperatur-Kompressibilität der Ethanol/Methanol Matrix beträgt demnach  $0.18 \text{ GPa}^{-1}$  ( $\pm 0.02$ ).

---

*b) Resorufin in Ethylenglykol/Wasser*

Hierbei handelt es sich um die erste derartige Messung, bei der sowohl eine Rot- als auch eine Blauverschiebung der Löcher gefunden wurde, d.h. man kann quasi über die Vakuumabsorptionsfrequenz "hinwegmessen". Wie aus Abb. 6.7 hervorgeht, liegt die Vakuumabsorptionsfrequenz hier bei  $17100 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ ). An dieser Stelle verschwindet der Steigungsfaktor  $s/\Delta p$ . Die Kompressibilität beträgt  $0.12 \text{ GPa}^{-1}$  ( $\pm 0.01$ ). Aus der Position der Vakuumfrequenz, die innerhalb der roten Flanke der Absorptionsbande liegt, muß man folgern, daß es sowohl positive als auch negative Solventshifts für einen einzelnen Zustand gibt. Dieser Fall wurde im vorhergehenden Kapitel erläutert, d.h. hier leistet der dispersive Anteil der Dipol-Dipol Wechselwirkung einen merklichen Beitrag.

*c) Resorufin in Glyzerin*

Aus einem Vergleich der Absorptionsspektren der drei Alkoholproben kann man schließen, daß sich die Wechselwirkung zwischen Sonde und Lösungsmittel in dem hier vorliegenden System von den beiden anderen Systemen unterscheidet. Das Spektrum ist relativ unstrukturiert (Kap. 3.4.1).

Der auffälligste Unterschied äußert sich jedoch in der Tatsache, daß es einen Bereich von ca.  $250 \text{ cm}^{-1}$  gibt, innerhalb dessen die Druckverschiebung praktisch verschwindet. Die plausibelste Erklärung dafür ist, daß das Farbstoffmolekül in diesem Lösungsmittel in zwei unterschiedlichen Formen vorkommt, z.B. als Anion und in einer neutralen, protonierten Form. Diese beiden Formen sollten sich bezüglich ihrer Vakuumfrequenz unterscheiden. Die in Abb. 6.9 gezeigten Messungen lassen sich wie folgt interpretieren:

Interpoliert man die Punkte mit negativer Druckverschiebung durch eine

---

Gerade, so durchläuft diese den Wert Null bei einer Frequenz von  $17050 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 20 \text{ cm}^{-1}$ ), die mit  $\nu_{\text{vac},1}$  bezeichnet wird. Dieser Wert ist im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch mit dem entsprechenden Wert für EG. Daraus wird geschlossen, daß Resorufin in dieser Form sowohl in Glycerin als auch in EG vorkommt (sie wird mit Form I bezeichnet).

Für Frequenzen  $\nu > \nu_{\text{vac},1}$  wird die positive Verschiebung von Form I durch eine negative Verschiebung einer anderen Form (bezeichnet mit Form II) kompensiert. Als Folge davon erhält man den bereits beschriebenen Bereich mit verschwindender Druckverschiebung. Offenbar überlappen hier die beiden inhomogenen Banden der einzelnen Formen stark. Form II hat eine Vakuumfrequenz  $\nu_{\text{vac},2}$  von  $17290 \text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 20 \text{ cm}^{-1}$ ). Oberhalb dieser Frequenz dominiert wieder Form II, und die Druckverschiebung wird ausschließlich positiv. Man sieht, daß beide Geraden in etwa die gleiche Steigung haben, aus der eine Kompressibilität von  $0.1 \text{ GPa}^{-1}$  ( $\pm 0.015$ ) abgeleitet wird. Dieser Wert ist der kleinste von allen drei Alkoholproben. Die Kompressibilität von Ethanol/Methanol ist um ca. 80% größer. Trotz der auftretenden Fehler bei der Bestimmung der Steigung sind die Unterschiede signifikant.

*d) Anmerkungen zum Begriff der "Vakuumabsorptionsfrequenz" und zur Kompressibilität*

Die Vakuumabsorptionsfrequenz eines Farbstoffmoleküls ist normalerweise eine experimentell nur sehr schwer zugängliche Größe. Überlicherweise wird dazu das Molekül in einen mit Überschall expandierenden molekularen Jet von Edelgasatomen gebracht. Dadurch erreicht man eine starke Abkühlung der Moleküle und eine annähernd wechselwirkungsfreie Umgebung /19,20/. Die Methode ist jedoch wegen der experimentellen Rahmenbedingungen bisher nur auf relativ wenige Moleküle

angewendet worden. Für bestimmte Molekülvarianten ist es sogar unmöglich, diese Methode anzuwenden, da sie nur in Lösung vorkommen (z.B. eine protonierte oder deprotonierte Form). Andere Moleküle werden durch ihre Umgebung strukturell modifiziert, wie z.B. Chromophore in Proteintaschen. Zusätzlich können Moleküle auch Aggregate bilden /101,102/, was bedeutet, daß derartige Spezies im Vakuum gar nicht existieren können.

Hier liegt nun die Stärke der vorgestellten Methode: Die Vakuumfrequenz des *eingebauten* Moleküls kann, im Rahmen des vorgestellten Modells, durch Ausnutzung des Farbeffektes bei der druckinduzierten Lochverschiebung gemessen werden. Mit Vakuumfrequenz meint man dabei diejenige Frequenz, bei der das Molekül absorbieren würde, wenn es von allen Lösungsmittelmolekülen befreit wäre. Wurde das Molekül zuvor durch den Einbau chemisch oder strukturell modifiziert, so ist diese Frequenz sehr wahrscheinlich nicht mit der im ultrakalten Gas-Jet identisch. Es ist anzunehmen, daß die Kenntnis der Absorptionsfrequenz des isolierten Chromophoren wichtig für Molekülrechnungen an Sondenmolekülen in einer wechselwirkenden Umgebung ist.

Für Moleküle, bei denen man aufgrund ihrer Struktur keine wesentliche Modifikation bei einem Einbau in eine Matrix erwartet, sollten die Werte für die Vakuumfrequenz aus Jet-Messungen und aus Lochbrenn-Messungen übereinstimmen. Diese Aussage wurde am System Tetrazen in Ethanol/Methanol überprüft /15/. Aus experimentellen Gründen konnte nur bei einer einzigen Frequenz in der Bande gebrannt werden. Allerdings war die Kompressibilität der Matrix aus der Messung mit Resorufin bekannt, und so war gemäß Gleichung (6.6) die Durchführung eines Druckexperiments bei lediglich einer Brennfrequenz  $\nu_b$  ausreichend. Als Ergebnis erhält man auf diese Weise einen Solventshift von  $900 \text{ cm}^{-1}$  für Tetrazen in Ethanol/Methanol. Der Literaturwert aus einer Jet-Messung liegt bei  $1322 \text{ cm}^{-1}$  /20/. Berücksichtigt man den Fehler, den die Kompressibilität beinhalten kann, so ist die Übereinstimmung zufriedenstellend.

Die aus optischen Experimenten gewonnenen Werte für die

---

Kompressibilität organischer Gläser müssen im Prinzip natürlich anhand mechanischer Messungen bei entsprechend tiefen Temperaturen überprüfbar sein. Für die hier verwendeten Gläser standen keine Vergleichswerte zur Verfügung, jedoch haben Sesselmann et al. /11,14/ die Kompressibilitäten von PMMA, Polystyrol und Polyethylen mit einer Lochbrenn-Messung ermittelt, und eine gute Übereinstimmung mit mechanisch bestimmten Werten gefunden.

#### 6.4.3 Verwendete Näherungen und Grenzen des Modells

Das mikroskopische Modell von Laird und Skinner für Druckeffekte an spektralen Löchern, und auch die in Kap. 6.4.1 gezeigten Ableitungen, beinhalten im Prinzip die gleichen Annahmen, die schon von Stoneham /103/ zur Beschreibung inhomogener Banden benutzt wurden. Zum einen werden nur Zweiteilchenkorrelationen zugelassen (d.h. zwischen den Matrixmolekülen besteht keine Wechselwirkung), zum anderen wird für die Zweiteilchenkorrelationsfunktion ein gaußscher Ansatz gemacht. Als weitere Annahme wird Homogenität und Isotropie der Matrix bei Druckänderungen vorausgesetzt, d.h. bezüglich Kompression und Ausdehnung. Dies ist für organische Gläser sicherlich hinreichend gut erfüllt. Mit diesen Annahmen lassen sich alle Effekte bezüglich der *Druckverschiebung* zufriedenstellend erklären.

Nach wie vor unklar ist das Ergebnis der Messungen bezüglich der Druckverbreiterung. Das mikroskopische Modell von Laird und Skinner /84/ beschreibt richtig, daß sich das Loch linear mit dem angelegten Druck verbreitert, und zwar unabhängig vom Vorzeichen der Druckänderung. Probleme tauchen beim Farbeffekt auf: Im Rahmen der Gaußschen Approximation der Korrelationsfunktion ist die Stärke der Druckverbreiterung ( $\Delta\Gamma/\Delta p$ ) von der Brennfrequenz unabhängig. Neuere Arbeiten von Kador /100/, die über die Gaußsche Approximation hinausgehen, liefern zwar einen in etwa linearen



---

Farbeffekt, können aber die Ergebnisse von Kapitel 6.3 nicht erklären. Diese erwecken den Eindruck, als sei die Druckverbreiterung bis zu einem gewissen Grad mit der Vakuumfrequenz korreliert. Schließlich wird die Interpretation durch die Auswirkungen der Überlagerung verschiedener Banden erschwert. Zu einer Aufklärung der tatsächlichen Zusammenhänge sind weitere Messungen z.B. an anderen Farbstoff-Matrix Kombinationen erforderlich.

#### 6.4.4 Interpretation der Druckmessungen an Proteinen

##### a) *Substituiertes Myoglobin (MbP)*

Bereits anhand der Form der 0-0 Bande von MRP konnte man erkennen, daß sich diese Bande aus mindestens zwei unterschiedlich intensiven Anteilen zusammensetzt. Dies steht in Einklang mit den Druckmessungen, bei denen man zwei verschiedene Vakuumfrequenzen findet. Sie liegen bei  $15794\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $15922\text{ cm}^{-1}$  ( $\pm 10\text{ cm}^{-1}$ ). Daraus ergibt sich ein Solventshift von  $200\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $160\text{ cm}^{-1}$ , und zwar zu größeren Frequenzen. Somit läßt sich im Rahmen des Modells folgern, daß durch den Einbau in das Apo-Protein, der Grundzustand von Protoporphyrin IX stärker abgesenkt wird als der Anregungszustand. Als Wert für die Kompressibilität findet man  $0.07\text{ GPa}^{-1}$  ( $\pm 0.01\text{ GPa}^{-1}$ ). Es wird noch einmal betont, daß dies für den Fall von Wechselwirkungen proportional  $R^{-6}$  gilt.

Der gefundene Wert von  $0.07\text{ GPa}^{-1}$  fällt in etwa in den Bereich der Tieftemperaturkompressibilitäten der gemessenen organischen Gläser und von Polymeren (vgl. Tabelle am Ende des Kapitels). Eine interessante Beobachtung ist, daß die Kompressibilität von Proteinen sehr unempfindlich auf Temperaturänderungen zu sein scheint, während sich die Werte für organische Flüssigkeiten merklich zwischen Raumtemperatur und 1.5 K ändern. Obwohl Proteine auch eine Glastransformation durchlaufen /105/, hat



diese offenbar keinen merklichen Einfluß auf deren Kompressibilität. Gläser zeigen am Glasübergangspunkt eine sprunghafte Abnahme der Kompressibilität /21/.

Eine wichtige Frage ist in diesem Zusammenhang jedoch, ob in der Tat die Eigenschaften des Proteins und nicht die des Wirtsglasses gemessen wurden. Um diese Frage zu beantworten, muß man sich eine spezielle Eigenschaft der optischen Technik vor Augen führen: Mit der optischen Technik werden Änderungen des Gitters über spektrale Eigenschaften des Chromophors detektiert. Der Chromophor spürt jedoch nur die Änderungen von solchen Molekülen, die innerhalb der Reichweite der in Frage kommenden Wechselwirkungskräfte liegen. Was die Dispersionskräfte betrifft, so fällt deren Wechselwirkung, integriert über den gesamten Raum, mit  $R^{-3}$  ab. Angenommen die Distanz zwischen den nächsten Nachbarn liegt in der Größenordnung von ungefähr 3 Å, so wird eine Schale von Atomen im Abstand von 3 oder 4 Gleichgewichtsabständen einen nur noch vernachlässigbar kleinen Beitrag liefern. Das bedeutet, daß die optische Technik eine lokale Kompressibilität mißt, d.h. die Kompressibilität einer Sphäre von etwa 15 Å Durchmesser um den Farbstoff herum. Im Falle von MbP ist aus Röntgenmessungen gut bekannt, daß das Protoporphyrin IX so im Apo-Protein sitzt, daß die beiden Propionatketten in das umgebende Lösungsmittel ragen. Trotzdem scheint es angemessen zu sein, anzunehmen, daß der Porphyrinring hauptsächlich die druckinduzierten Änderungen des Apo-Proteins und nicht die des Lösungsmittel spürt, und daß der Beitrag des Lösungsmittels verglichen mit dem des Apo-Proteins stark reduziert ist.

*b) Meerrettich-Peroxidase (MRP)*

Die erste Druckmessung in diesem System wurde in der B1-Bande bei pH5 durchgeführt, und liefert als Vakuumfrequenz einen Wert von  $16675 \text{ cm}^{-1}$

---

( $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ ). Der Solventshift beträgt demnach ca.  $365 \text{ cm}^{-1}$  und geht zu kleineren Frequenzen, also ins Rote. Dieser Wert entspricht etwa dem Sechsfachen der inhomogenen Bandbreite. Als Kompressibilität erhält man für dieses Protein einen Wert von  $0.10 \text{ GPa}^{-1}$  ( $\pm 0.01 \text{ GPa}^{-1}$ ), der nur geringfügig größer als der Wert von Myoglobin ist. Von MRP nimmt man an, daß der Chromophor relativ zentral im Inneren des Apo-Proteins sitzt /76/. Bei einem Proteindurchmesser von  $40 \text{ \AA}$  sollte der Einfluß des Lösungsmittels hier also praktisch keine Rolle spielen.

Ein weiterer interessanter Effekt war die Lochaufspaltung unter Druck in der B2-Bande von MRP/pH8, die sich wie folgt erklären läßt:

Bei der Erzeugung der B2-Bande durch Einstrahlung in die B1-Bande entstehen zwei Chromophor-Spezies, die im Apo-Protein zufällig energetisch entartet sind, jedoch verschiedene Vakuumfrequenzen haben. Durch Anlegen von Druck wird die Entartung aufgehoben. Die Steigung der Extrapolationsgeraden des Farbeffektes ist praktisch für beide Spezies identisch (Abb. 6.15). Deshalb hat die lokale Umgebung beider Chromophor-Spezies, d.h. das Apo-Protein, in beiden Fällen die gleiche Kompressibilität von ca.  $0.2 \text{ GPa}^{-1}$ . Die unterschiedlich starke Verschiebung der Löcher führt somit auf zwei verschiedene Vakuumfrequenzen, und zwar bei  $16299 \text{ cm}^{-1}$  und bei  $16419 \text{ cm}^{-1}$ . Zu erklären bleibt jedoch der um den Faktor 2 größere Wert der Kompressibilität im Vergleich zur B1-Bande. Die B2-Bande liegt nach dem Einfrieren praktisch noch nicht vor, ist also eine thermodynamisch ungünstigere Anordnung von Apo-Protein und Chromophor als bei der B1-Bande. Eventuell ist sogar die lokale Proteinstruktur in beiden Fällen verschieden. Bei der durch Einstrahlung hervorgerufenen Photoreaktion kann diese Änderung des Proteins in der Nähe des Chromophors möglicherweise herbeigeführt werden, was zu der gefundenen Vergrößerung der Kompressibilität beitragen könnte.

Der Effekt der Lochaufspaltung sollte prinzipiell in allen

Spektralbanden beobachtbar sein, die durch eine Überlagerung der Absorption von Chromophoren mit verschiedener Vakuumfrequenz zustande kommen (wie z.B. in Myoglobin). Möglicherweise wurde dies hier aber nur deshalb beobachtet, weil der Effekt der Aufspaltung der beiden Löcher größer ist als die druckinduzierte Lochverbreiterung. Bei starker Lochverbreiterung wird die Aufspaltung "verschmiert".

Daß es möglich ist, die lokale Kompressibilität eines Apo-Proteins in der Umgebung des Chromophoren zu ändern, wird sehr eindrücklich mit der Messung im mit Substrat versetzten MRP gezeigt. Hier lieferten die Druckexperimente einen Kompressibilitätswert von  $0.4 \text{ GPa}^{-1} (\pm 0.02 \text{ GPa}^{-1})$ , also das Vierfache des Wertes von "ungestörtem" MRP. Offenbar muß sich die Proteintasche bei der Aufnahme des Substratmoleküls aufweiten und wird damit weicher. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, bestätigt es doch, daß das Experiment eine lokale Proteinkompressibilität und nicht das Wirtsglas mißt. Gemäß Gleichung 2.12<sup>14</sup> gilt, daß die Vervierfachung der Kompressibilität eine Verdopplung der relativen Volumenschwankungen nach sich zieht, was gut mit dem Prozess der Aufnahme und Abgabe von Substratmolekülen durch das Protein in Einklang zu bringen ist. Als Absolutbetrag für die relativen Volumenschwankungen ergeben sich je nach Protein Werte zwischen 0.5 % und 1 %, extrapoliert auf Raumtemperatur.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit der hier erstmals erprobten optischen Methode das bislang einzige Verfahren zur Bestimmung lokaler Kompressibilitäten in Proteinen zur Verfügung steht. Man findet gute Übereinstimmung mit Werten, die mittels akustischer Experimente gemessen worden sind /67/. Es zeigte sich, daß Änderungen der Chromophorumgebung, z.B. durch Substratzusatz, die lokale Kompressibilität merklich verändern können.

Unter Ausnutzung des Farbeffektes kann man auch ohne genaue Kenntnis der spezifischen Wechselwirkungskräfte die Vakuumfrequenz der Chromophore bestimmen. Wie bei den Gläsern ist auch hier zu betonen, daß es sich um

Werte handelt, die bislang durch keine andere Methode zugänglich sind, und die spezifisch für die bestimmte Farbstoff-Protein Kombination sind. Leider kennt man von den verwendeten Chromophoren die Jet-Vakuumfrequenzen nicht. Es wäre interessant, diese mit den hier gewonnenen Werten zu vergleichen und daraus Informationen über die Wechselwirkung zwischen Chromophor und Protein abzuleiten.

#### 6.4.5 Suche nach irreversiblen Effekten

Da mit Druck und Temperatur zwei unabhängige Parameter vorlagen, gab es verschiedene Möglichkeiten, die Probe einzufrieren. In Abb. 6.19 wird dies veranschaulicht: Ausgangspunkt ist stets die Probe bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck (1). Im einfachen Fall wurde die Probe bei diesem Druck auf 4.2 K abgekühlt (2). Dabei durchfährt man den Bereich des Glasübergangs, der z.B. für Glycerin bei 190 K liegt /104/. Für alle bisher beschriebenen Messungen wurde dann ein spektrales Loch gebrannt, gefolgt von Druckänderungen um 8 MPa und mehr (4), bei konstanter Temperatur von 4.2 K. Obwohl sich das Loch während dieser Prozedur stark verbreiterte und praktisch nicht mehr zu messen war, wurde bei einer anschließenden Wegnahme des Druckes auf den Ausgangsdruck (2) in keinem Fall eine irreversible Änderung des Loches beobachtet, und zwar bezüglich aller Lochparameter (Lochbreite, Lochmitte, Lochfläche). Offenbar bewirken Druckänderungen unter diesen Anfangsbedingungen keine Konformationsänderungen in der Matrix.

Eine weitere Möglichkeit bestand in der Einhaltung eines anderen Pfades: Ausgehend von (1) wurde zunächst bei Raumtemperatur der Druck auf 8 MPa erhöht (3) und anschließend, bei Durchfahren der Glastemperatur, auf 4.2 K abgekühlt (4). Mit Hilfe eines spektralen Loches wurde dieser Zustand

markiert, der einem festen Punkt im Phasenraum des Systems entspricht. Es gab nun Grund zu der Annahme, daß sich das System bei einer Relaxation des Druckes anders verhalten könnte als zuvor bei der Druckerhöhung. Dem System sollten durch Wegnehmen des Druckes nach Punkt (2) neue Freiheitsgrade eröffnet werden, d.h. es könnte eine neue Position im Phasenraum einnehmen. Dies würde sich bei einer Rückkehr zu Punkt (4) in einer irreversiblen Veränderung der Lochparameter bemerkbar machen. Wie jedoch die Lochspektren in Abb. 6.19 zeigen, war dies auch bei dieser Art der Druck/Temperatur-Änderungen nicht der Fall. Das Loch hatte, obwohl es während der Prozedur vollkommen verschwand (Kurve 2), praktisch keine bleibende Änderungen erfahren (Vergleich von Kurve 4 (unten) und 4 (oben)). Die Interpretation dieses Verhaltens ist, daß auch in diesem Fall keine Konformationsänderungen geschehen.

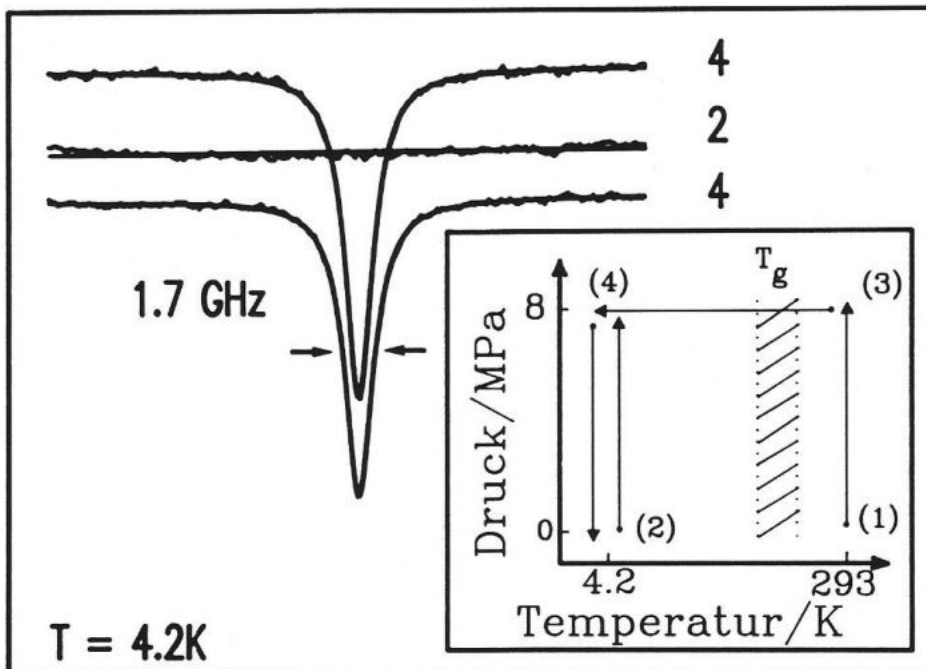


Abb. 6.19: Überprüfung der Reversibilität: Der Ausgangszustand für die eigentliche Messung kann auf verschiedenen Pfaden erreicht werden (Erläuterung im Text).

Letztlich mußte noch überprüft werden, ob sich die *elastischen* Eigenschaften der Probe am Punkt (2) ändern, je nachdem ob er über den direkten Weg (1)→(2) oder über den indirekten Weg (1)→(3)→(4)→(2) erreicht wurde. Für Resorufin in Glycerin war der Wert der druckinduzierten Verschiebung, was den direkten Weg betrifft, bereits bekannt: Bei einer Frequenz von  $16775 \text{ cm}^{-1}$  betrug er  $57 \text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$  (vgl. Abb. 6.9). Das Kontrollexperiment über den indirekten Weg ergab einen entsprechenden Wert von  $59 \text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$ . Innerhalb von 3 % ist die Stärke der Druckverschiebung bei einer bestimmten Frequenz praktisch gleich, egal ob zuvor der direkte oder der indirekte Weg nach Punkt (2) gewählt worden war. Die elastischen Eigenschaften der Probe sind also unabhängig vom Einfrierweg, zumindest bei Druckänderungen der gewählten Größenordnung von 8 MPa.

Besonders interessant erschien es, den Einfluß der Reihenfolge der Druck- und Temperaturänderungen beim Einfrieren in Myoglobin zu untersuchen. Ähnliche Messungen von Frauenfelder et al. /71/ zeigten nämlich sehr wohl unterschiedliches Verhalten, je nachdem, wie Punkt (2) erreicht wurde. Allerdings wurden dort Druckänderungen von 200 GPa verwendet, also um einen Faktor 25000 größere Drücke als in den hier vorgestellten Messungen. Rechnet man den Wert für die irreversible Druckverschiebung aus /71/ auf den hier verwendeten Druckbereich von 8 MPa um, erhält man eine irreversible Verschiebung von über 20 GHz. Dies entspräche dem Vielfachen der Breite der spektralen Löcher, die etwa 1 GHz betrug, und wäre ein unübersehbarer Effekt. Tatsächlich zeigen die eigenen Myoglobin-Messungen keinerlei irreversible Lochveränderungen. Dabei können Verschiebung von 10 % der Lochbreite detektiert werden. Dieses Ergebnis führt zu der Schlußfolgerung, daß die in /71/ gefundenen irreversiblen Effekte wohl weniger den nichtergodischen Charakter des Proteins untermauern, als möglicherweise eine Folge des relativ hohen verwendeten Druckes sind.

Abschließend sei angemerkt, daß auch sogenannte "Drucksprung-Experimente", also möglichst rasche Druckänderungen durchgeführt wurden.

Die kürzeste realisierbare Zeit für eine Druckrelaxation von etwa 8 MPa lag bei ca. 0.5 s. Das anschließende Aufnehmen des Spektrums dauerte 30 s. Es wurde keine Zeitabhängigkeit der Lochverschiebung oder Lochverbreiterung nach derartigen Drucksprüngen gefunden. Dieses Verhalten steht im Einklang mit Messungen von Frauenfelder et al [71], die unterhalb von 150 K ebenfalls keine Zeiteffekte finden konnten. Allerdings fand diese Gruppe nichtexponentielle Zeiteffekte im Temperaturbereich zwischen 170 K und 205 K. Dabei wurden, als Folge eines Drucksprunges, Bandenverschiebungen im Bereich von Sekunden bis Stunden gemessen.



Tabelle: Kompressibilitäten

System	Kompressibilität / GPa <sup>-1</sup>		Ref.
	T ≈ 1.5K	T ≈ 293K	
Ethanol / Methanol	0.18 (± 0.01)	----	/15/
Ethanol	----	1.12	/106/
Methanol	----	1.22	/106/
Glyzerin	0.10	0.22	/16/, /107/
Ethylen Glykol / Wasser	0.12	----	/16/
Ethylen Glykol	----	0.37	/106/
Wasser	----	0.46	/106/
Polystyrol	0.15	0.33	/11/, /108/
Polymethylmetacrylat	0.15	0.24	/108/
Meerrettich Peroxidase	0.10	----	/17/
MRP mit Substrat (NCHA)	0.40	----	diese Arbeit
Substituiertes Myoglobin	0.07	----	/18/
Verschiedene Proteine	----	0.06 – 0.12	/67/



## 7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit hochauflösender optischer Tieftemperatur-Spektroskopie und -Photochemie an organischen Gläsern und Proteinen. Als spezielle Verfahren wurden Temperaturzyklen und hydrostatische Druckvariationen verwendet.

Spektrale photochemische Löcher eignen sich als sehr empfindliche Sonden zur Untersuchung struktureller Relaxationen und inhomogener Effekte. Durch Lochbrennen wird ein "scharfer" Ausgangszustand markiert. Im Falle von Temperaturzyklen erhält man irreversible Veränderungen der Lochparameter, wobei stets bei der Brenntemperatur gemessen wird, um reversible Effekte abzuseparieren. Allgemein findet man eine Abnahme der Lochfläche und eine Zunahme der Lochbreite. Die Ursache für diese beiden Prozesse sind verschieden und nicht miteinander korreliert. Aus dem Verhalten des Rückgangs der Lochfläche läßt sich die Verteilung der Reaktionsbarrieren bestimmen, die den thermisch instabilen Produktzustand vom Eduktzustand trennen. Demgegenüber wird die Lochverbreiterung durch spektrale Diffusion der nicht gebrannten Moleküle aufgrund thermisch induzierter struktureller Änderungen in der Matrix verursacht.

Untersucht wurden auf diese Weise zwei Proteine, nämlich das Enzym Meerrettich-Peroxidase und das Speicherprotein Myoglobin. Unter Zuhilfenahme eines einfachen Modells konnte in Carboxy-Myoglobin eine gaußförmig verteilte Barriere bei ca.  $900\text{ cm}^{-1}$  gefunden werden. In MRP ist die Verteilung ebenfalls gaußförmig, jedoch bimodal oder höhermodal. Je nach Tautomerform, die sich durch ihre Spektralbanden deutlich unterscheiden, liegen die Maxima der Verteilungen bei Werten zwischen  $190\text{ cm}^{-1}$  und  $1900\text{ cm}^{-1}$ . Außerdem stellte es sich heraus, daß Mesoporphyrin IX in mehreren Formen in MRP vorliegt, die sowohl durch Strahlung als auch thermisch ineinander übergeführt werden können. Bislang

war man der Meinung, daß Porphyrine in Matrizen lediglich zwei diskrete Formen, mit jeweils um 90 Grad vertauschten Protonen, einnehmen. Offenbar sind aber auch benachbarte Positionen oder "out of plane"-Anordnungen möglich.

Chromoproteine in Lösung scheinen ein ideales System für das Studium von Zweidomänenwechselwirkungen von Farbstoffmolekülen mit deren Umgebung zu sein. Es wurde gezeigt, daß die Verbreiterung aufgrund spektraler Diffusion tatsächlich ein stufenartiges Verhalten zeigen kann. Dieses außergewöhnliche Phänomen wird auf das Vorhandensein von, möglicherweise, gerade einem einzigen aktiven TLS im Protein zurückgeführt, das in einem ziemlich engen Bereich räumlich fixiert ist. Bezüglich des Proteins ergibt sich folgendes Bild, das Ähnlichkeiten und Unterschiede im Vergleich zu Gläsern aufzeigt: Es ist ein endliches System und ist stärker geordnet. Es gibt keine räumlich homogene Verteilung von strukturellen Freiheitsgraden (TLS). Jedoch ist die Ordnung weit davon entfernt, perfekt zu sein, weshalb auch glasartige Phänomene beobachtet werden können.

Eindeutig zeigte sich, daß in Meerrettich-Peroxidase in einem relativ engen Bereich um 15 K herum strukturelle Relaxationsprozesse ablaufen. In substituiertem Myoglobin gibt es möglicherweise um 30 K herum Prozesse, deren Beitrag zur spektralen Diffusion jedoch weniger stark ausgeprägt ist und vom breiten Untergrund der spektralen Diffusion des Lösungsmittels verdeckt wird.

Zur Untersuchung der statischen Wechselwirkungen von Chromophoren mit der Matrix wurden hydrostatische Druckexperimente durchgeführt. Dabei handelt es sich um die ersten derartigen Messungen an organischen Gläsern und Proteinen. Wegen der hohen spektralen Auflösung der Lochbrennmethode können inhomogene Effekte auf der Skala der homogenen Linienbreite gemessen werden. Meßgröße war in erster Linie die Frequenzverschiebung spektraler Löcher unter isotropem äußeren Druck im Bereich von 0–2.4 MPa. Ausgenutzt

wurde dabei insbesondere der Farbeffekt, d.h. die Stärke der Verschiebung in Abhängigkeit von der Brennfrequenz. Zur Interpretation der Daten wird ein einfaches Modell verwendet, das ein Wechselwirkungspotential proportional  $R^{-6}$  zwischen Sonde und Matrixmolekül annimmt. Außerdem soll die Matrix bei Druckeinwirkung keine Vorzugsrichtung aufweisen.

Sowohl in organischen Gläsern als auch in Proteinen sind alle Druckeffekte im untersuchten Druckbereich vollkommen reversibel. Dabei spielt es keine Rolle, auf welchem Pfad im  $pT$ -Diagramm die Ausgangsbedingungen für das Experiment hergestellt werden. Als Ergebnis der Druckmessungen erhält man die Tieftemperatur-Kompressibilität der Probe sowie die Absorptionsfrequenz des isolierten Chromophoren, bzw. den Solventshift in der entsprechenden Matrixumgebung. Insbesondere für Proteine stellt diese Methode eine ideale Möglichkeit zur Bestimmung der lokalen Proteinkompressibilität in der Umgebung des Chromophoren dar. Bei Kenntnis der Kompressibilität kann man wiederum Rückschlüsse auf den Betrag der relativen Gleichgewichts-Volumenschwankungen der Proteine ziehen. Sie liegen bei Werten von 0.5 %, was ein realistischer Wert für biologisch notwendige Fluktuationen ist.

---

**8. Literatur**

- /1/ *Persistent spectral hole-burning: Science and applications*, Editor: W.E. Moerner, Springer, Heidelberg (1988).
- /2/ Friedrich, J., und D. Haarer, *Angew. Chemie*, 96 (1984) 96.
- /3/ Köhler, W., J. Zollfrank, und J. Friedrich, *Phys. Rev. B* 39 (1989) 5414.
- /4/ Anderson, P.W., B.I. Halperin, und C.M. Varma, *Philos. Mag.* 25 (1972) 1.
- /5/ Köhler, W., und J. Friedrich, *J. Chem. Phys.* 90 (1989) 1270.
- /6/ Zollfrank, J., J. Friedrich, J. Fidy, und J.M. Vanderkooi, *Biophys. J.* 59 (1991) 305.
- /7/ Zollfrank, J., J. Friedrich, J. Fidy, und J.M. Vanderkooi, *J. Chem. Phys.* (1991), im Druck.
- /8/ Köhler, W., und J. Friedrich, *Phys. Rev. Lett.* 59 (1987) 2199.
- /9/ Köhler, W., J. Friedrich, und H. Scheer, *Phys. Rev. A* 37 (1988) 660.
- /10/ Fidy, J., J.M. Vanderkooi, J. Zollfrank, und J. Friedrich, *Biophys. J.*, 1991, eingereicht.
- /11/ Sesselmann, Th., W. Richter, und D. Haarer, *J. Lumin.* 36 (1987) 263.
- /12/ Politis, T.G., und H.G. Drickamer, *J. Chem. Phys.* 74 (1981) 263.
- /13/ Ellervie, A.R., R. Jaaniso, J. Kikas, A. Laisaar, A. Suisalu, und V. Shcherbakov, *Chem. Phys. Lett.* 176 (1991) 472.
- /14/ Sesselmann, Th., W. Richter, und D. Haarer, *Phys. Rev. B* 36 (1987) 7601.
- /15/ Gradl, G., J. Zollfrank, W. Breinl, und J. Friedrich, *J. Chem. Phys.*, 94 (1991) 7619.
- /16/ Zollfrank, J., und J. Friedrich, *J. Chem. Phys.*, (1991) eingereicht.
- /17/ Zollfrank, J., J. Friedrich, J. Fidy, und J.M. Vanderkooi, *J. Chem. Phys.* 94 (1991) 8600.
- /18/ Zollfrank, J., J. Friedrich, und F. Parak, *Biophys. J.* (1991) eingereicht.
- /19/ Fitch, P.S., C.A. Haynam, und D.H. Levy, *J. Chem. Phys.* 73 (1980) 1064.

- 
- /20/ Amirav, A., U. Even, und J. Jortner, *J. Chem. Phys.* 75 (1981) 3770.
- /21/ *The physics of amorphous solids*, Editor: R. Zallen, Wiley, New York (1983).
- /22/ Pohl, R.O., in *Amorphous solids*, Editor: W.A. Phillips, Springer, Heidelberg (1981) 27.
- /23/ Zeller, R.C., und R.O. Pohl, *Phys. Rev. B* 4 (1971) 2029.
- /24/ Phillips, W.A., *J. Low. Temp. Phys.* 7 (1972) 351.
- /25/ Schellenberg, P., J. Zollfrank, J. Friedrich, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 5642.
- /26/ Völker, S., in *Excited-state spectroscopy in solids*, XCVI Corso Soc. Italiana di Fisica, Bologna (1987).
- /27/ Breinl, W., J. Friedrich, und D. Haarer, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3915.
- /28/ Köhler, W., J. Meiler, und J. Friedrich, *Phys. Rev. B* 35 (1987) 4031.
- /29/ Schulte, G., W. Grond, und D. Haarer, *J. Chem. Phys.* 88 (1988) 679.
- /30/ Friedrich, J., und D. Haarer, in *Optical spectroscopy of glasses*, Editor: I. Zschokke, Reidel, Dordrecht (1986) 149 .
- /31/ Köhler, W., und J. Friedrich, *J. Chem. Phys.* 88 (1988).
- /32/ Friedrich, J., H. Wolfrum, und D. Haarer, *J. Chem. Phys.* 77 (1982) 2309.
- /33/ Guitierrez, A.R., J. Friedrich, D. Haarer, und H. Wolfrum, *IBM. J.* 26 (1982) 198.
- /34/ Zollfrank, J., J. Friedrich, und T. Tani, *Polymer* 30 (1989) 231.
- /35/ Hunklinger, S., und W. Arnold, in *Physical Acoustics*, Vol. XII, Editoren: W.P. Mason, und R.N. Thurston, Academic Press, New York (1976).
- /36/ Jäckle, J., *Z. Physik* 257 (1972) 212.
- /37/ Black, J.L., und B.I. Halperin, *Phys. Rev. B* 16 (1977) 2879.
- /38/ Klauder, R., und P.W. Anderson, *Phys. Rev.* 125 (1962) 912.
- /39/ Reinecke, T.L., *Solid State Commun.* 32 (1979) 1103.

- 
- /40/ Köhler, W., und J. Friedrich, *Europhys. Lett.* 7 (1988) 517.
- /41/ Pack, D.W., L.R. Narasimhan, und M.D. Fayer, *J. Chem. Phys.* 92 (1990) 4125.
- /42/ Narasimhan, L.R., K.A. Littau, D.W. Pack, Y.S. Bai, A. Elschner, und M.D. Fayer, *Chem. Rev.* 90 (1990) 439.
- /43/ Völker, S., und J.H. van der Waals, *Mol. Phys.* 32 (1976) 1703.
- /44/ Hayes, J.M., R. Jankowiak, und G.J. Small, in /1/ 153.
- /45/ Breinl, W., J. Friedrich, und D. Haarer, *Chem. Phys. Lett.* 106 (1984) 487.
- /46/ Posener, D.W., *Aust. J. Phys.* 12 (1959) 184.
- /47/ Frauenfelder, H., *Helvetica Physica Acta* 57 (1984) 165.
- /48/ Richards, F.M., *Spektrum der Wissenschaft* 3 (1991) 72.
- /49/ Kendrew, J.C., *Science* 139 (1963) 1259.
- /50/ Perutz, M.F., *Science* 140 (1963) 863
- /51/ Deisenhofer, J., H. Michl, *Ang. Chemie* 101 (1989) 872.
- /52/ Hartmann, H., F. Parak, W. Steigemann, G.A. Petzko, D. Ringe Ponzi, und H. Frauenfelder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4967.
- /53/ Austin, R.H., K.W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, und I.C. Gunsalus, *Biochemistry* 14 (1975) 5355.
- /54/ Di Iorio, E.E., U.R. Hiltbold, D. Filipovic, K.H. Winterhalter, E. Gratton, E. Vitrano, A. Cupane, M. Leone, und L. Cordone, *Biophys. J.* 59 (1991) 742.
- /55/ Singh, G.P., H.J. Schink, H. v.Löhneysen, F. Parak, und S. Hunklinger, *Z. Phys.* B55 (1984) 23.
- /56/ Alberding, N., R.H. Austin, K.W. Beeson, S.S. Chan, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, und T.M. Nordlund, *Science* 192 (1976) 1002.
- /57/ Ormos, P., A. Ansari, D. Braunstein, B.R. Cowen, H. Frauenfelder, M.K. Hong, I.E.T. Iben, T.B. Sauke, P.J. Steinbach, und R.D. Young, *Biophys. J.* 57 (1990) 191.

- 
- /58/ Ormos, P., D. Braunstein, H. Frauenfelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 8482.
- /59/ Friedrich, J., H. Scheer, B. Zickendraht-Wendelstadt, und D. Haarer, J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 1030.
- /60/ Köhler, W., J. Friedrich, R. Fischer, und H. Scheer, Chem. Phys. Lett. 146 (1988) 280.
- /61/ Zollfrank, J., J. Friedrich, und F. Parak, unveröffentlichte Ergebnisse.
- /62/ Zipp, A., G.B. Ogunmola, R.C. Newmann, und W. Kauzmann, J. Am. Chem. Soc. USA, 94 (1972) 2541.
- /63/ Ogunmola, G.B., A. Zipp, C. Franklin, und W. Kauzmann, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 1.
- /64/ Marden, M.C., G. Hui Bon Hoa, und F. Stetzkowski-Marden, Biophys. J. 49 (1986) 619.
- /65/ Gekko, K., und H. Noguchi, J. Phys. Chem. 83 (1979) 2706.
- /66/ Eden, D., J.B. Matthew, J.J. Rosa, und F.M. Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 (1982) 815.
- /67/ Gavish, B., E. Gratton, und C.J. Hardy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 (1983) 751.
- /68/ Karplus, M., und J.A. McCammon, Sci. Amer. 254 (1986) 30.
- /69/ Reif, F., *Physikalische Statistik und Physik der Wärme*, de Gruyter, Berlin (1976).
- /70/ Cooper, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 (1976) 2740.
- /71/ Frauenfelder, H., et. al., J. Phys. Chem., 94 (1990) 1029.
- /72/ Köhler, W., Dissertation (1988) Univ. Bayreuth.
- /73/ Schulte, G., W. Grond, und D. Haarer, J. Chem. Phys. 88 (1988) 679.
- /74/ Horie, T., J. M. Vanderkooi, und K.-G. Paul, Biochemistry 24 (1985) 7935.
- /75/ Fidy, J., und J. M. Vanderkooi, J. Chem. Phys. 93 (1989) 2253.



- 
- /76/ Brunet, J. E., C. Julian, und D. M. Jameson, *Photochem. Photobiol.* 51 (1990) 487.
- /77/ Stryer, L., *Biochemistry*, Editor: W.H. Freeman, 2. Auflage (1981).
- /78/ Pahapill, J., und L. Rebane, *Chem. Phys. Lett.* 158 (1989) 283.
- /79/ Schellenberg, P., und J. Friedrich, *J. Chem. Phys.* 95 (1991) 189.
- /80/ Ansari, A., J. Berendzen, D. Braunstein, B.R. Cowen, H. Frauenfelder, et al., *Biophys. Chem.* 26 (1987) 337.
- /81/ Köhler, W., J. Zollfrank, und J. Friedrich, *J. Appl. Phys.* 66 (1989) 3232.
- /82/ Zollfrank, J., R. Hirschmann, und J. Friedrich, in *Dynamical processes in condensed molecular systems*, Editoren: A. Blumen, J. KLafter, D. Haarer. World Scientific, London (1990) 21.
- /83/ Porter, C.E., und R.G. Thomas, *Phys. Rev.* 104 (1956) 483.
- /84/ Laird, B.B., und J.L. Skinner, *J. Chem. Phys.* 90 (1989) 3274.
- /85/ Zollfrank, J., und J. Friedrich, *J. Chem. Phys.* 93 (1990) 8586.
- /86/ Abraham, R.J., G.E. Hawkes, und K.M. Smith, *Tetrahedron Lett.* 16 (1974) 1483.
- /87/ Frauenfelder, H., G.U. Nienhaus, J.B. Johnson, *Ber. Bunsenges. Chem.* 95 (1991) 272.
- /88/ Berendzen, J., und D. Braunstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 1.
- /89/ Kasha, M., *Disc. Faraday Soc.* 9 (1950) 14.
- /90/ McConnel, H., *J. Chem. Phys.* 20 (1952) 700.
- /91/ Bayliss, N.S., und E.G. McRae, *J. Phys. Chem.* 58 (1954) 1002.
- /92/ Longuett-Higgins, H.C., und J.A. Pople, *J. Chem. Phys.* 27 (1957) 192.
- /93/ Liptay, W., *Z. Naturforschg.* 20a (1965) 1441.
- /94/ Henke, W.E., W. You, H.L. Selzle, E.W. Schlag, *Chem. Phys.* 97 (1985) 205.
- /95/ Slichter, C.P., und H.G. Drickamer, *Phys. Rev. B* 22 (1980) 4097.
- /96/ Maier, M., *Appl. Phys.* B41 (1986) 73.



- 
- /97/ Kador, L., S. Jahn, D. Haarer, und R. Silbey, *Phys. Rev.* B41 (1990) 12215.
- /98/ Sevian, M.H., und J.L. Skinner, *Theor. Chim. Acta* (1991) im Druck.
- /99/ Margenau H., und N.R. Kestner, *Theory of intermolecular forces*, Pergamon (1969) New York.
- /100/ Kador, L., *J. Chem. Phys.* (1991) eingereicht.
- /101/ Hirschmann, R., und J. Friedrich, *J. Chem. Phys.* 91 (1989) 7296.
- /102/ Hirschmann, R., und J. Friedrich, *J. Chem. Phys.* 91 (1989) 7988
- /103/ Stoneham, A.M., *Rev. Mod. Phys.* 41 (1969) 82.
- /104/ Littau, K.A., A. Elschner, und M.D. Fayer, *Chem. Phys. Lett.* 175 (1990) 149.
- /105/ Iben, I.E.T., 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, *Phys. Rev. Lett.* 62 (1989) 1916.
- /106/ *Handbook of Chemistry and Physics*, R.C. Weast, Editor. CRC Press, Ohio (1977) F-16.
- /107/ Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Band 1, D'Ans Lax, Editor. Springer, Heidelberg (1967) 802.
- /108/ *Properties of Polymers*, Editoren: D.W. Krevelen und P.J. Hofzeyer, Elsevier, London (1972) 150.