

ZEITAUFGELÖSTE FTIR DIFFERENZSPEKTROSKOPIE:

Eine neue Methode zur Bestimmung molekularer Reaktionsmechanismen von Proteinen

Klaus Gerwert und Georg Souvignier

Institut für Biophysik, Biologie, Ruhr-Universität Bochum

EINFÜHRUNG

Proteine zählen zu den Grundbausteinen des Lebens (1). Die Aufklärung ihrer Struktur und ihrer Funktion ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis physiologischer Prozesse. Mit modernen biophysikalischen Methoden ist man heute in der Lage, die Struktur und den molekularen Reaktionsmechanismus von Proteinen auf der kleinstmöglichen, der atomaren Ebene zu untersuchen. Die Strukturen können mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse und der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie bis hin zu atomarer Auflösung bestimmt werden (2). In der Regel liefern diese in Kombination mit biomathematischen Methoden ein atomares Modell des ruhenden Proteingrundzustandes (3). Um die molekularen Reaktionsmechanismen, d.h. das "Funktionieren" der Proteine, zu untersuchen, müssen Methoden angewendet werden, die zeitaufgelöst die Veränderungen während der Proteinaktivität wiedergeben. Eine gute Möglichkeit, Proteinreaktionen mit hoher Zeitauflösung nicht-invasiv aufzunehmen, bieten spektroskopische Methoden. Die Reaktionskinetik von Chromoproteinen, wie z.B. photosynthetischen Proteinen, kann mit zeitaufgelöster Differenzspektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich bestimmt werden, da sich deren Reaktionsintermediate durch die Lage ihrer Absorptionsmaxima unterscheiden. Die zeitlichen Änderungen der Absorptionen im sichtbaren Spektralbereich, die das kinetische Verhalten der chromophoren Gruppen widerspiegeln, können daher als Basis für kinetische Reaktionsmodelle dienen. Die entsprechenden Photolyse-Techniken sind experimentell sehr weit vorangetrieben worden. Die Primärprozesse bei photosynthetischen Proteinen sind mit einer Zeitauflösung von Femtosekunden (10^{-15} s) gemessen worden (4). Mit Hilfe der Vibrationsspektroskopie können die Reaktionen darüber hinaus auch molekular aufgelöst werden. Die Resonanz-Raman und FT-Raman Spektroskopie sind in der Lage, die Reaktionen einzelner Chromophorbindungen wiederzugeben. Zum Beispiel wurden bei verschiedenen Retinalproteinen anhand charakteristischer Bandenverschiebungen lichtinduzierte Isomerisierungen um bestimmte Retinal-C=C

Bindungen identifiziert (5). Da die Chromoproteine im sichtbaren Spektralbereich absorbieren, wird bei der Streuung sichtbarer Strahlung ein elektronisch angeregter Zustand erzeugt und damit das Streusignal der Chromophore um ein Vielfaches verstärkt ("Resonanz"). Aus diesem Grund detektiert die Resonanz-Raman Spektroskopie allerdings nur die Reaktionen der chromophoren Gruppe. Die FTIR-Differenzspektroskopie ermöglicht weiterführend neben den Chromophorreaktionen auch Reaktionen von Proteinseitengruppen und vom Proteingerüst molekular- und zeit aufgelöst nachzuweisen (6). Im folgenden möchten wir kurz das Meßprinzip und exemplarisch die Anwendung der Methode auf die Untersuchung des lichtgetriebenen Protonenpumpmechanismus des Bakteriorhodopsins beschreiben (7).

FTIR-SPEKTROSKOPIE AN PROTEINEN

Ein Spektrum eines Proteins im mittleren infraroten Spektralbereich wird dominiert durch die Banden des Proteingerüsts, den sogenannten Amid I (C=O; 1680-1620 cm^{-1}) und Amid II (CNH; 1550-1520 cm^{-1}) Banden der Peptidbindungen (Abb. 1a). Die Bandenlagen des Proteingerüsts sind indikativ für die Sekundärstruktur eines Proteins und können für Strukturvorhersagen genutzt werden (8). Diese klassische Applikation der IR-Spektroskopie ist in unseren Arbeiten aber von untergeordneter Bedeutung. Neben dem Proteingerüst absorbiert noch Wasser stark im infraroten Spektralbereich (OH bei 1650 cm^{-1}). Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Signalqualität insbesondere im Bereich der OH Bande. Ein ausreichender Wassergehalt ist aber eine unabdingbare Voraussetzung für die Aktivität der meisten Proteine. Daher können die Proben nicht einfach getrocknet werden. Um die Wasserabsorption dennoch zu reduzieren, arbeiten wir mit dünnen zu 100% hydratisierten Proteinfilmen von ca. 2-10 μm Schichtdicke. Alternativ kann auch die ATR-(attenuated total reflection)Technik eingesetzt werden. Dabei werden Proteinfilme auf einen sogenannten ATR-Kristall aufgetragen und können somit in einer wässrigen Umgebung gemessen werden. (Details sind in ref 9 beschrieben). Um aus der Gesamtabsorption des Protein-Wasser-Gemisches nur die Absorptionsbanden der Gruppen zu selektieren, die eine Reaktion durchlaufen, werden Differenzen zwischen dem Grundzustand und den Reaktionsintermediaten gebildet. In Abb 1b ist ein Beispiel für ein solches Differenzspektrum gezeigt. Da die Absorptionsänderungen sehr klein ($\Delta A/A = 10^{-4}$) gegenüber der Hintergrundabsorption sind reicht die Meßgenauigkeit konventioneller dispersiver Infrarot-Spektrometer nicht aus. Nutzt man allerdings die Vorteile von Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometern, ist man in der Lage, auch so kleine Absorptionsänderungen noch zuverlässig zu bestimmen (6). Diese Vorteile gegenüber konventionellen dispersiven Geräten sind:

- i) der sogenannte Multiplexvorteil: da man statt sequentiell, wie es in dispersiven Geräten geschieht, alle Wellenzahlen parallel mißt, benötigt man eine sehr viel kürzere Meßzeit.
- ii) der sogenannte Jaquinot-Vorteil: da man keine dispersiven Elemente einsetzt, benötigt man weder Ein- noch Austrittsspalte und erhält somit einen größeren Lichtdurchfluß durch die Meßanordnung im Vergleich zu dispersiven Geräten. Dies wirkt sich in einem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis aus.

In Abb. 2 ist schematisch der Aufbau eines FTIR-Gerätes gezeigt. In dem interferometrischen Aufbau nach Michelson fällt das vom Globar ausgestrahlte Licht auf einen Strahlteiler, der im Idealfall 50% der einfallenden Strahlung auf einen festen und 50% auf einen beweglichen Spiegel lenkt. Die von den Spiegeln reflektierte Strahlung fällt auf den Detektor (MCT). Je nach Gangunterschied, abhängig von der Position des beweglichen Spiegels (=Scanner), interferieren die reflektierten Strahlen am Detektor und man erhält in Abhängigkeit von dem zurückgelegten Spiegelweg X eine Intensitätsänderung der infraroten Strahlung, ein sogenanntes Interferogramm. Da das Interferogramm diskret und digitalisiert vorliegt, wird die diskrete Fouriertransformation (DFT) verwendet. Auf die Details und Randbedingungen, die bei der diskreten Fouriertransformation zu beachten sind, soll hier nicht eingegangen werden. Eine gute Beschreibung findet sich in ref. (10). Befindet sich eine Probe im Strahlengang, repräsentiert das Interferogramm die Fouriertransformierte des Einkanalspektrums der Probe. Eine inverse Fourier-Transformation des Interferogramms liefert dann das Einkanalspektrum. Um ein wie in Abb. 1 gezeigtes Absorptions-Spektrum zu erhalten, nimmt man erst ein Einkanalspektrum der Probe auf, dann eines ohne Probe und subtrahiert die beiden Einkanalspektren voneinander.

Zeitaufgelöste Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Ein Schemabild unseres experimentellen Aufbaus ist in Abb.3 gezeigt: Um die Spektren der Reaktionsintermediate aufzunehmen, setzen wir verschiedene Techniken ein.

- i) "statische FTIR": hierbei werden die bei Raumtemperatur sehr schnell entstehenden Reaktionsprodukte durch Einfrieren bei tiefen Temperaturen (bis zu 77 K) über mehrere Minuten stabilisiert, so daß die Spektren mit konventioneller Geschwindigkeit des Scanners aufgenommen werden können (11).
- ii) "rapid scan Technik": hierbei werden während eines Reaktionsablaufs in sehr schneller Folge Spektren aufgenommen. Dazu muß der Scanner an den Umkehrpunkten extrem beschleunigt werden. Die Interferogramme werden mit Geschwindigkeiten von ca 7 cm /s aufgenommen. Mit der von uns benutzten Anordnung können komplette Spektren von 1800 bis 800 cm^{-1} in 12 ms bei 4 cm^{-1} spektraler Auflösung detektiert werden, d.h. es werden 250 Spektralelemente mit der geforderten hohen Amplitudenauflösung in 12 ms gemessen (12).
- iii) "Stroboskoptechnik": hierbei werden die Interferogramme zunächst mit der "rapid-scan" Technik aufgenommen. Allerdings sind dabei die Anforderungen an die Geschwindigkeitskonstanz des Scanners und die Stabilität der Meßanordnung sehr viel größer als im konventionellen "rapid scan" Betrieb. Nach der Datenaufnahme werden die verschiedenen Interferogramme mit Hilfe einer geeigneten Software in einzelne Segmente geteilt und diese Segmente dann zu neuen Interferogrammen in der in Abb 4 beschriebenen Weise zusammengesetzt. Danach werden die Interferogramme fouriertransformiert. Durch die Neuordnung der Segmente erzielen wir Verbesserung um den Faktor 500 d.h. eine Zeitauflösung von 20 μs . Die Grenze der Zeitauflösung liegt bei 10 μs (13,14)

Will man noch höhere Zeitaufösungen erzielen, bietet sich die sogenannte "step-scan" Technik an (15). Bei dieser Technik wird der Scanner an den einzelnen Interferogrammpunkten angehalten und schrittweise ("step-scan") jeweils an diesen Interferogrammpunkten die Intensitätsänderungen während einer Reaktion gemessen. Die so gewonnenen Daten müssen dann ebenfalls rechnerisch bearbeitet werden. Die Intensitätsänderungen an den einzelnen Interferogrammpunkten müssen nach der Zeit sortiert und so neu arrangiert werden, daß man komplette Interferogramme zu bestimmten Zeiten erhält. Damit wurde eine Zeitauflösung im sub- μs Bereich erzielt (15). Im Prinzip erlauben die MCT-Detektoren eine Zeitauflösung von 10 ns. Allerdings muß der Scanner während der Datenaufnahme bis auf wenige nm genau an einer Position anhalten. Dies macht die experimentelle Realisierung der "step-scan"

Technik bei der Aufnahme sehr kleiner Absorptionsänderungen im Vergleich zur Stroboskoptechnik schwieriger und anfälliger gegen Störungen (z.B. Trittschall).

Beschränkt man sich auf die Bestimmung der Kinetik bei nur wenigen ausgesuchten Wellenzahlen, kann wie im sichtbaren Spektralbereich im Photolyseaufbau gemessen werden. Dabei wurden auch im infraroten Spektralbereich bereits ps Zeitaufösungen erzielt (für eine Übersicht eignet sich (17)). Man muß allerdings anmerken, daß für die Bandenzuordnung die Aufnahme kompletter Spektren meist nützlicher ist, als eine extrem hohe Zeitauflösung bei nur wenigen Wellenzahlen.

ZUORDNUNGEN DER ABSORPTIONSBANDEN

Für die Bestimmung molekularer Reaktionsmechanismen ist die Zuordnung der IR-Banden der entscheidende Schritt. Um die Absorptionsbanden molekularen Gruppen zuzuordnen, muß die biophysikalische Methode mit molekularbiologischen Methoden kombiniert werden, um die Gruppen zu markieren. Es werden dann die Differenzspektren von unmarkierten Proteinen mit denen von markierten verglichen. Durch Isotopenmarkierung wird die Absorptionsbande der markierten Molekülgruppe frequenzverschoben und kann so identifiziert werden. Hierbei wird die Struktur des Proteins nicht beeinflusst. Isotopenmarkierte Aminosäuren lassen sich in Bakterien biosynthetisch inkorporieren (16). Bei diesem Verfahren werden allerdings alle Aminosäuren gleicher Art in dem Protein markiert und eine eindeutige Zuordnung ist nicht möglich. Der Einsatz ortsspezifisch-mutierter Proteine erlaubt eine eindeutige Identifizierung, da nur die Absorptionsbande der mutierten Gruppe fehlt (23). Allerdings ändert möglicherweise eine spezifische Mutation die Struktur des Proteins, insbesondere wenn geladene Gruppen ausgetauscht werden. Der Vergleich des Wildtyp Differenzspektrums mit dem Mutanten Differenzspektrum zeigt aber zusätzlich mögliche Strukturveränderungen an. Weicht das Differenzspektrum der Mutante stark von dem des Wildtyps ab, liegt eine Strukturveränderung vor. Fehlt dagegen nur eine Bande und stimmen die übrigen Banden in beiden Differenzspektren relativ gut überein, ist davon auszugehen, daß die Struktur trotz Mutation weitgehend intakt geblieben ist. Da die Isotopenmarkierung im Gegensatz zur Mutation eine nicht-invasiv Technik ist, wird für die Zukunft eine ortsspezifische Isotopenmarkierung angestrebt (18).

BAKTERIORHODOPSIN

Im folgenden soll die Anwendung der Stroboskoptechnik auf die Untersuchung des molekularen Reaktionsmechanismus eines Proteins beschrieben werden. Ein ideales

Modellsystem für biophysikalische Untersuchungen ist das Membranprotein Bakteriorhodopsin, eine lichtgetriebene Protonenpumpe (für eine detaillierte Einführung ist 19,20 empfohlen). Das 27.000 Dalton große Protein durchspannt in sieben 40 Å langen α -Helices die Membran. Der Chromophor, all-trans Retinal, ist über eine protonierte Schiff'sche Base an das Lys 216 des Opsins gebunden. Im Verlauf des Bakteriorhodopsin Photozyklus werden ausgehend vom Grundzustand BR die Intermediate J,K,L,M,N und O durchlaufen, die sich durch verschiedene Absorptionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich unterscheiden. Die Primärreaktion findet in 450 fs statt und der komplette Zyklus ist in wenigen ms abgeschlossen. Die lichtinduzierten IR-Absorptionsänderungen können mit Hilfe der zeitaufgelösten Stroboskop-FTIR Spektroskopie ab dem Intermediat L gemessen werden. In Abb. 5 sind in einer 3D Darstellung die Absorptionsänderungen zwischen 1800 und 1000 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen (21). Die Zeitauflösung bei der Messung beträgt 20 Mikrosekunden, die spektrale Auflösung 4 cm^{-1} . Die Absorptionsänderungen lassen sich durch die Überlagerung mehrerer Exponential-Funktionen beschreiben. In Abb.5 sind bereits die Ergebnisse der Fitanalyse dargestellt. Verschiedene spektrale Bereiche der Differenzspektren reflektieren die Reaktionen verschiedener Gruppen des Proteins. In der sogenannten Fingerprintgegend zwischen 1300 und 1100 cm^{-1} können die Chromophorreaktionen beobachtet werden. Die verschwindenden BR-Banden bei 1213, 1202 und 1167 cm^{-1} sind indikativ für die all-trans Konfiguration des Retinals im Grundzustand (vgl auch Abb 1b). Die lichtinduzierte all-trans nach 13-cis Isomerisierung des Retinals wird durch das Entstehen der Bande bei 1186 cm^{-1} angezeigt. Das Entstehen der Bande in fs ist nicht zeitaufgelöst. Die Banden wurden verschiedenen C-C Streckschwingungen mit Hilfe isotoopenmarkierter Retinale zugeordnet (22); z.B repräsentiert die Bande bei 1202 cm^{-1} die C_{14} - C_{15} Streckschwingung. Als Beispiel für eine Kinetik ist die Bande bei 1186 cm^{-1} , ist in Abb 6a gezeigt. Das Verschwinden ist indikativ für die Deprotonierung der Schiff'schen Base in der L nach M Reaktion, das Wiedererscheinen für die Reprotonierung in der M nach N Reaktion und das Zurückgehen für die Rückisomerisierung in den BR Grundzustand. Simultan beobachtet man in der Carbonylgegend zwischen 1800 und 1700 cm^{-1} Protonierungsänderungen interner Asparaginsäuren. Als Beispiel für eine solche Protonierungsänderung ist die Bande bei 1762 cm^{-1} gezeigt, die die Protonierung der internen Asparaginsäure asp 85 reflektiert (Abb 6 b)(23). Man erkennt, daß die Schiff'sche Base mit der gleichen Kinetik deprotoniert wird, mit der asp 85 protoniert wird. In Abb 7 sind einmal für die Carbonylgegend (1800 -1700 cm^{-1}) die experimentellen Daten (a) und die Ergebnisse der mathematischen Analyse (b)

gegenüber gestellt. In der Gegend der Amid I Bande um 1650 cm^{-1} beobachtet man in Abb. 5 das Entstehen einer starken Differenzbande. Die Bande ist indikativ für eine strukturelle Änderung des Proteingerüsts im M-Zerfall (14,24) in Übereinstimmung mit Ergebnissen von zeitaufgelösten Röntgenbeugungsexperimenten (30). Basierend auf den detaillierten FTIR-Untersuchungen konnten Protonierungsreaktionen interner Asparaginsäuren, strukturellen Veränderungen einzelner Peptidbindungen des Proteingerüsts und Isomerisierungsreaktionen des Retinals identifiziert werden (14,23,24). Diese konnten mit Hilfe einer detaillierten Analyse bestimmten Intermediaten zugeordnet werden (21). Diese Ergebnisse unter Berücksichtigung der Resultate aus anderen Arbeitsgruppen sind in dem in Abb (8) gezeigten Modell zusammengefaßt und dort detailliert beschrieben. Die vorhergesagten Positionen der katalytischen Protonenbindungsstellen asp 85 und asp 96 stimmen mit dem kürzlich veröffentlichten atomaren Struktur-Modell des Bakteriorhodopsins gut überein (19). Bei entsprechenden Mutationen von asp 85 (bei allerdings gestörter Proteinstruktur) und asp 96 wird die Pumpaktivität inhibiert. Dies zeigt der Vergleich von Messungen der elektrischen Ladungsverschiebung in den entsprechenden Mutanten und dem Wild-Typ. Für eine detaillierte Übersicht dieser Arbeiten ist Ref (20) empfohlen.

AUSBLICK

Die zeitaufgelöste FTIR Differenzspektroskopie erlaubt aber auch die Untersuchung intramolekularer Proteinreaktionen in sehr großen Proteinen wie den bakteriellen Reaktionszentren (120.000 Dalton). Dies zeigen die Untersuchungen der lichtinduzierten Elektronentransfer-Reaktionen. Hierbei konnten die einzelnen ladungsgetrenten Zustände in infraroten Spektralbereich charakterisiert werden (25,26). Es konnten dabei sogar Messungen an Proteinkristallen durchgeführt werden. (27). Eine interessante neue Möglichkeit mit Hilfe der FTIR-Differenzspektroskopie auch Proteine zu untersuchen, die keinen intrinsischen Chromophor besitzen, ergibt sich durch den Einsatz photolabiler Triggersubstanzen. Kürzlich haben wir zeigen können, das der GTP-Hydrolyse Mechanismus von h-ras p21 (28) durch den Einsatz von caged GTP mit Hilfe der FTIR Spektroskopie untersucht werden kann (Cepus, Scheidig, Goody, Gerwert, in press). Ein weiteres Beispiel ist die Untersuchung des Acetylcholinrezeptors mit caged Carbamoylcholin.(9, 29).

Zum Schluß sei noch auf zwei kürzlich erschienene Übersichtsartikel hingewiesen (31,32).

Danksagung

Unsere hier beschriebenen Arbeiten wurden durch die finanzielle Beihilfe der deutschen Forschungsgemeinschaft (Heisenbergstipendium an K.G. und Ge 599/7-1) und des Boehringer- Ingelheim Fonds ermöglicht. Prof. Benno Hess sei herzlich für sein Interesse und seine Unterstützung gedankt. Die Abb 5-7 wurden mit Software der Fa GfS, Aachen von G.S. erstellt.

REFERENZEN

- 1) Mathews, C.K. and van Holden, K.E.
Biochemistry (1990)
Benjamin, Cummings, Rockwood City, USA
- 2) Cantor, C.R., Schimmel, P.R.
1980, Biophysical Chemistry, Freeman and Company
- 3) Bernstein, T.F., Koetzle, J.B., Williams, E.F., Meyer, Jr, Brice, M.D. Rodgers, J.R., Kennard, T. Shimanouchi, Tasumi, M., The protein data bank: a computer based Archival File for macromolecular structures, J.Mol.Biol., 1977, 112, 535-542
- 4) Finkle, U., Lauterwasser, C., Struck, A., Scheer, H. and Zinth, W.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9514-9518 (1992)
- 5) Lugtenburg, J. Mathies, R.A., Griffin, R.G. and Herzfeld, J.
TIBS, 13, 388 (1988)
- 6) Braiman, M.S. and Rothschild, K.
Ann. Rev. Biophys. Chem. 17, 541-570 (1988)
- 7) Gerwert, K.
Biochimica et Biophysica Acta 1101, 147-153 (1992)
- 8) Haris, P.I. and Chapman, D.
TIBS, 1992, 17, 328-333
- 9) Baenziger, J.E., Miller, K.W., Rothschild, K.J.
Biophysical J., 1992, 61, 983-992
- 10) Griffith, P.
Chemical Infrared Fourier Transform Spectroscopy (Wiley, New York) (1975)
- 11) Siebert, F., Mäntele, W. and Gerwert, K.
Eur. J. Biochemistry 136, 119-127 (1983)
- 12) Gerwert, K.
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 92, 978-982 (1988)
- 13) Souvignier, G., Dissertation, 1991, MPI Dortmund, (Universität Bochum)
- 14) Souvignier, G. and Gerwert, K.
Biophys. J., 1992, 63, 1393-1405
- 15) Uhmann, W., Becker, A., Taran, C., Siebert, F.
Applied Spectroscopy, 45, 390-397 (1991)
- 16) Engelhard, M., Gerwert, K., Hess, B., Kreutz, W. and Siebert, F.
Biochemistry 24, 400-407 (1985)

- 17) Stoutland, P.O., Dyer, P.O., Woodruff, W.H.
Science, 1992, 257, 1913-1917
- 18) Ellman, J.A., Volkman, B.F., Mendel, D., Schultz, P.G. and Wemmer, D.E.
J. Am. Chem. Soc. 4, 7959-7961 (1992)
- 19) Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K.H.
J. Mol. Biol. 213, 899-929 (1990)
- 20) Oesterhelt, D., Tittor, J. and Bamberg, E.
J. Bioenergetics and Biomembranes, 24 (1992)
- 21) Heßling, B., Souvignier, G., Gerwert, K.
Biophysical Journal, in press
- 22) Gerwert, K. and Siebert, F.
EMBO Journal 5, 805-811 (1986)
- 23) Gerwert, K., Hess, B., Soppa, J. and Oesterhelt, D.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 4943-4947
- 24) Gerwert, K., Souvignier, G., Hess, B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 9774-9778
- 25) Mäntele, W.G., Wollenweber, A.M., Navedryk, E. and Breton, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8468-8472 (1988)
- 26) Buchanan, S., Michel, H. and Gerwert, K.
Biochemistry 31, 1314-1322 (1992)
- 27) Gerwert, K., Hess, B., Michel, H. and Buchanan, S.
FEBS Lett. 232, 303-307 (1988)
- 28) Schlichting, I., Almo, S., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E., F. Petsko, G., Goody, R.S.
Nature, 1990, 345, 309-315
- 29) Görne-Tschelnokow, U., Hucho, F., Naumann, D., Barth, A., Mäntele, W.,
FEBS, 1992, 2, 213-217
- 30) Koch, M.H.J., Dencher, N., Oesterhelt, D., Plöhn, H.J., Rapp, G., Büldt, G.
EMBO J., 1991, 10, 521-525
- 31) Mäntele, W.
TIBS, 1993, 18, 197-202
- 31) Gerwert, K.

ABBILDUNGEN

Abb 1 a zeigt das Übersichtsspektrum einer hydratisierten Purpurmembran, die als einziges Protein Bakteriorhodopsin enthält. Das Spektrum wird dominiert durch die Amid I Bande bei 1658 cm^{-1} , Wasser bei 1650 cm^{-1} und die Amid II Bande bei 1546 cm^{-1} . Zum Vergleich ist in b ein Differenzspektrum zwischen dem Grundzustand BR und dem Intermediat L gezeigt.

Abb 2 zeigt schematisch den FTIR Meßaufbau mit Lichtquelle G, Strahlteiler BS, festem Spiegel FM, beweglichem Spiegel, Probe und MCT-Detektor. Das bei Durchlaufen des Weges X erhaltene Interferogramm wird auf einem PC diskret Fourier-transformiert (DFT) und man erhält das Spektrum.

Abb 3 zeigt schematisch unseren Meßaufbau bestehend aus einem modifizierten FTIR Gerät (Bruker IFS 88) konventioneller Photolyseanordnung (sichtbares Meßlicht VIS, 2 Filter, Photodiode und Digitaloszilloskop) zur Messung der Absorptionsänderungen im sichtbaren Spektralbereich. Die Lichtanregung erfolgt, gesteuert über konventionelle Triggererlektronik, mit Hilfe eines Excimerlaser gepumpten Farbstofflasers (Lambda Physik) Die Daten werden auf Workstations (Sun) und einer Convex C2 analysiert.

Abb 4: Prinzip der Stroboskop-Technik: Aus (in diesem Beispiel 10) Interferogrammen, die jeweils in der Meßzeit T aufgenommen werden, werden die Segmente A2 B3,C4...K11 entnommen. Diese Segmente sind in der kürzeren Zeit $\Delta t=T/10$ aufgenommen. Durch die Verschiebung der Reaktionsinitiierung relativ zur Interferogrammaufnahme erhält man in den aufeinanderfolgenden Experimenten die passenden Segmente, um ein neues Interferogramm (=Stroboskopinterferogramm) zusammensetzen zu können. In dem Beispiel wird eine Verbesserung der Zeitauflösung um den Faktor 10 erzielt. Prinzipiell ist eine Verbesserung um den Faktor 1000 möglich.

Abb 5 zeigt eine dreidimensionale Darstellung der Infrarotabsorptionsänderungen während des Bakteriorhodopsin-Photozyklus. Das erste Differenzspektrum

repräsentiert ein BR-L Differenzspektrum (vgl Abb 1b). Verschiedene Bereiche reflektieren Reaktionen verschiedener Gruppen: die fingerprint-Gegend ($1300-1100\text{ cm}^{-1}$) wird durch die Retinalschwingungen dominiert, die Amid I Gegend ($1680-1640\text{ cm}^{-1}$) spiegelt Bewegungen des Proteingerüsts wieder und die Carbonylgegend ($1800-1700\text{ cm}^{-1}$) reflektiert Protonierungsänderungen interner Asparaginsäuren

Abb. 6 zeigt zwei Kinetiken aus Abb 5; wiedergegeben sind die Meßdaten, die Fitkurve und die einzelnen Exponentialverläufe aus denen sich die gefittete Kurve zusammensetzt. a) der Verlauf bei 1186 cm^{-1} spiegelt die Deprotonierung der Schiff'schen Base (Rate k_1 und k_2) die Reprotonierung (mit der Rate k_3) und die Relaxation zu all-trans Retinal (mit den Raten k_4 und k_5) wieder. Bei 1762 cm^{-1} beobachtet man die transiente Protonierung der internen Asparaginsäure asp 85. Sie wird mit der gleichen Kinetik protoniert mit der die Schiff'sche Base deprotoniert.

Abb. 7 zeigt noch einmal die Carbonylgegend vergrößert: in a) die Original-Meßdaten und in b) die Ergebnisse der Global-Fitanalyse. Man beobachtet die Umgebungsänderung von asp 85 durch das Verschieben der Carbonylbande von 1762 cm^{-1} nach 1755 cm^{-1} .

Abb 8: Protonenpumpmodell des Bakteriorhodopsins: nach Lichtanregung isomerisiert das Retinal von all-trans nach 13-cis. In der L nach M Reaktion wird asp 85 transient protoniert und ein Proton vom Protein abgegeben von einer weiteren Gruppe AH. Durch eine Bewegung einer alpha-Helix wird die Schiff'sche Base in der M nach N Reaktion zum Protondonor asp 96 orientiert und von diesem reprotoniert. Dieser Schritt bestimmt die Vektorialität der Pumpe. Beim Protonentransfer von asp 96 zur Schiff'schen Base spielen Wasserstoffbrücken-Netzwerke eine wichtige Rolle.

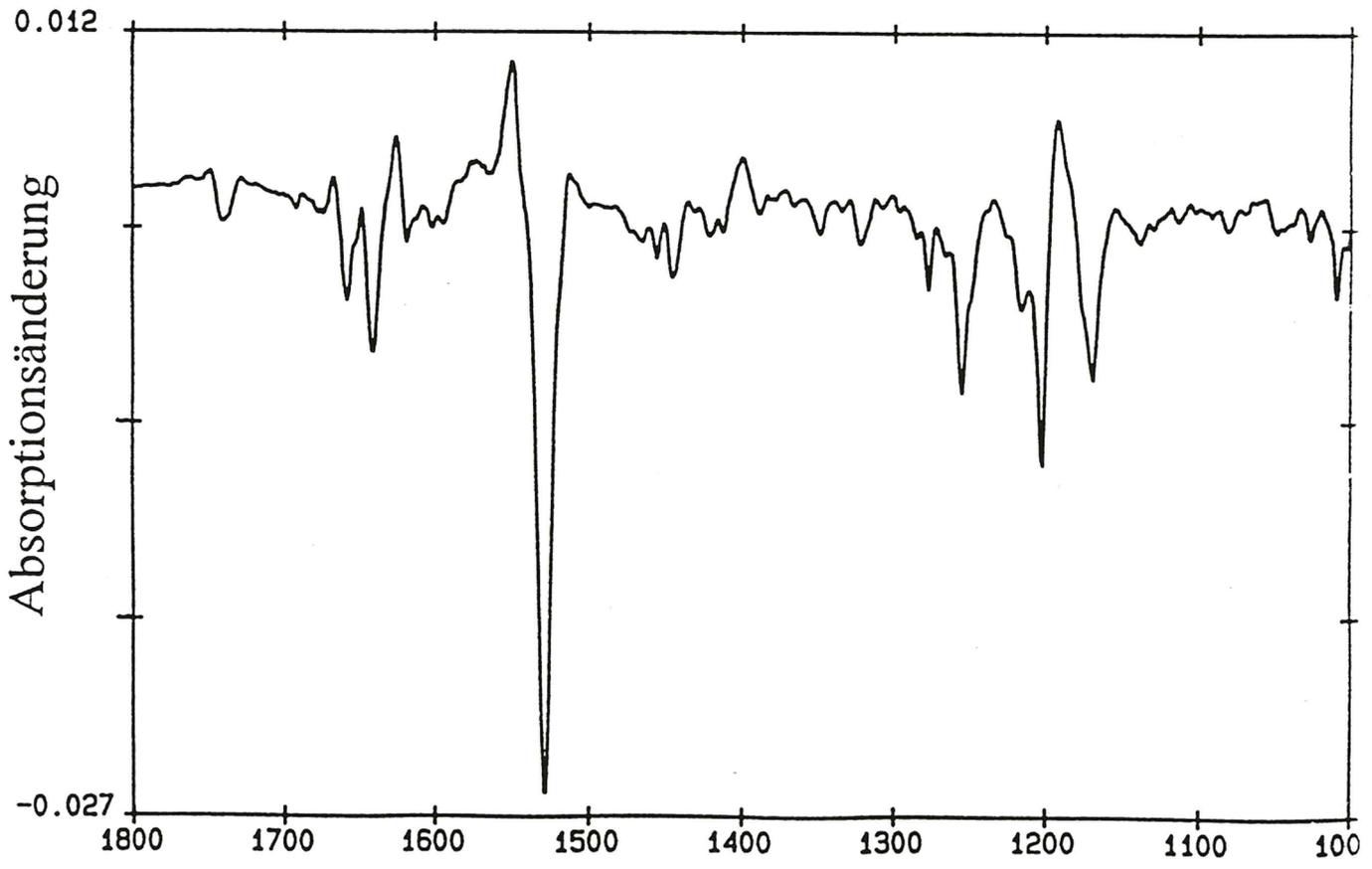
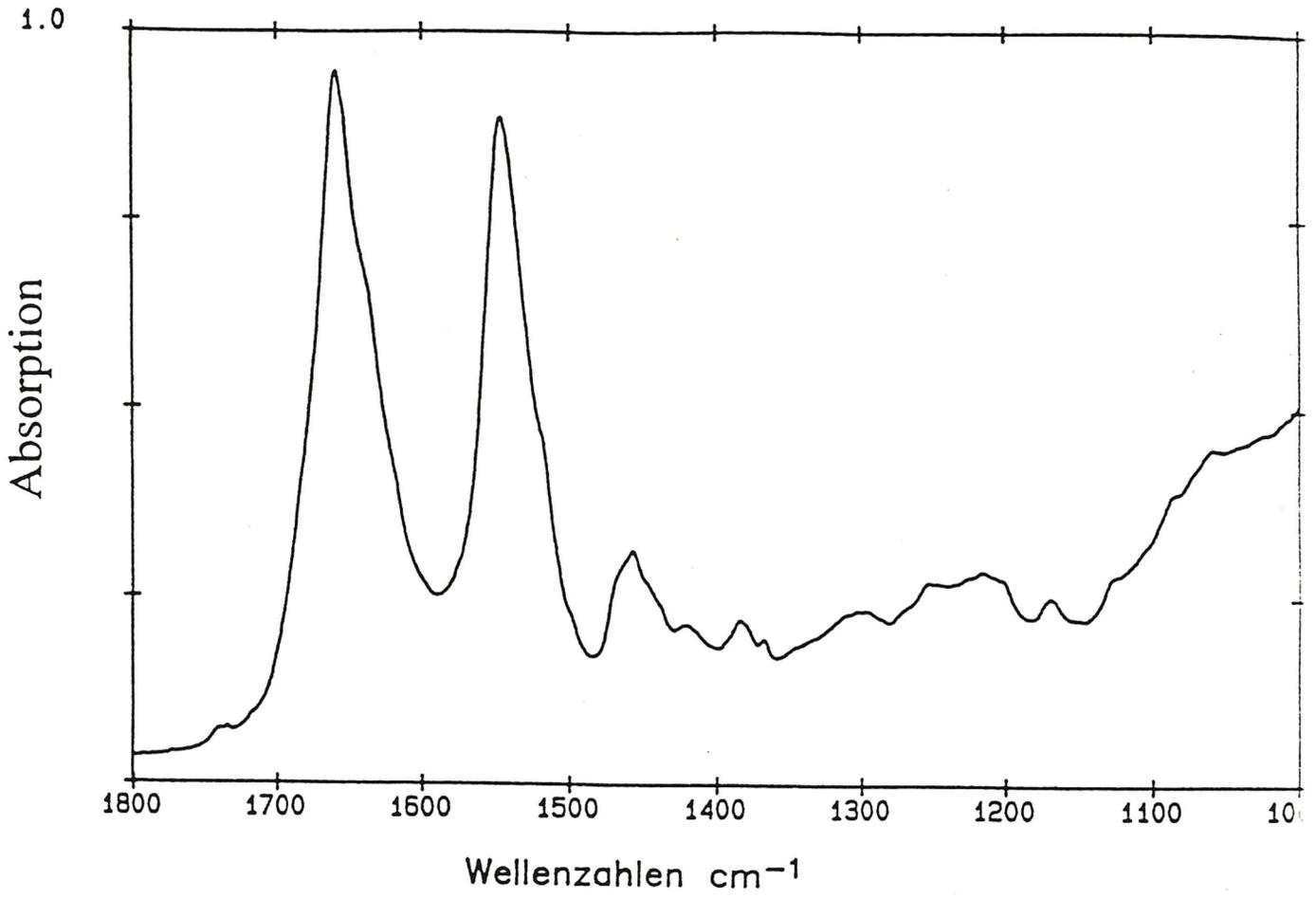
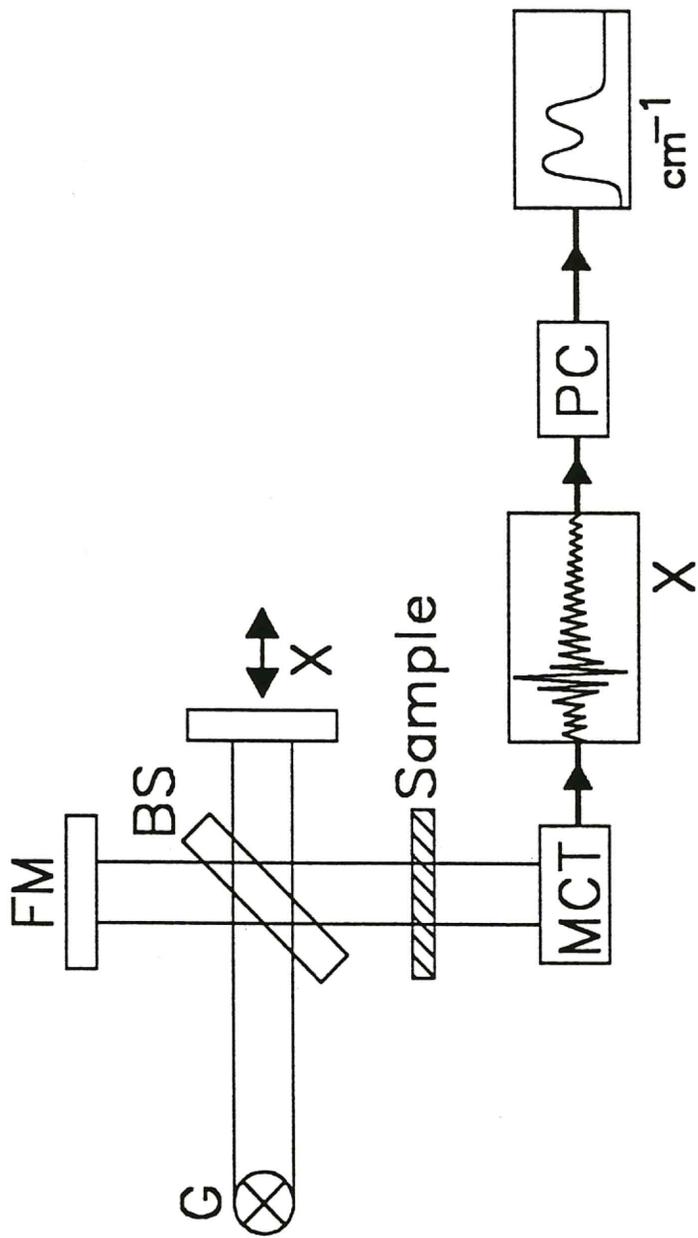


Abb 1, a, b



Detector Interferogram DFT Spectrum

A662

time resolved FTIR — Fast Scan
 ΔA — VISBLE — Stroboskop

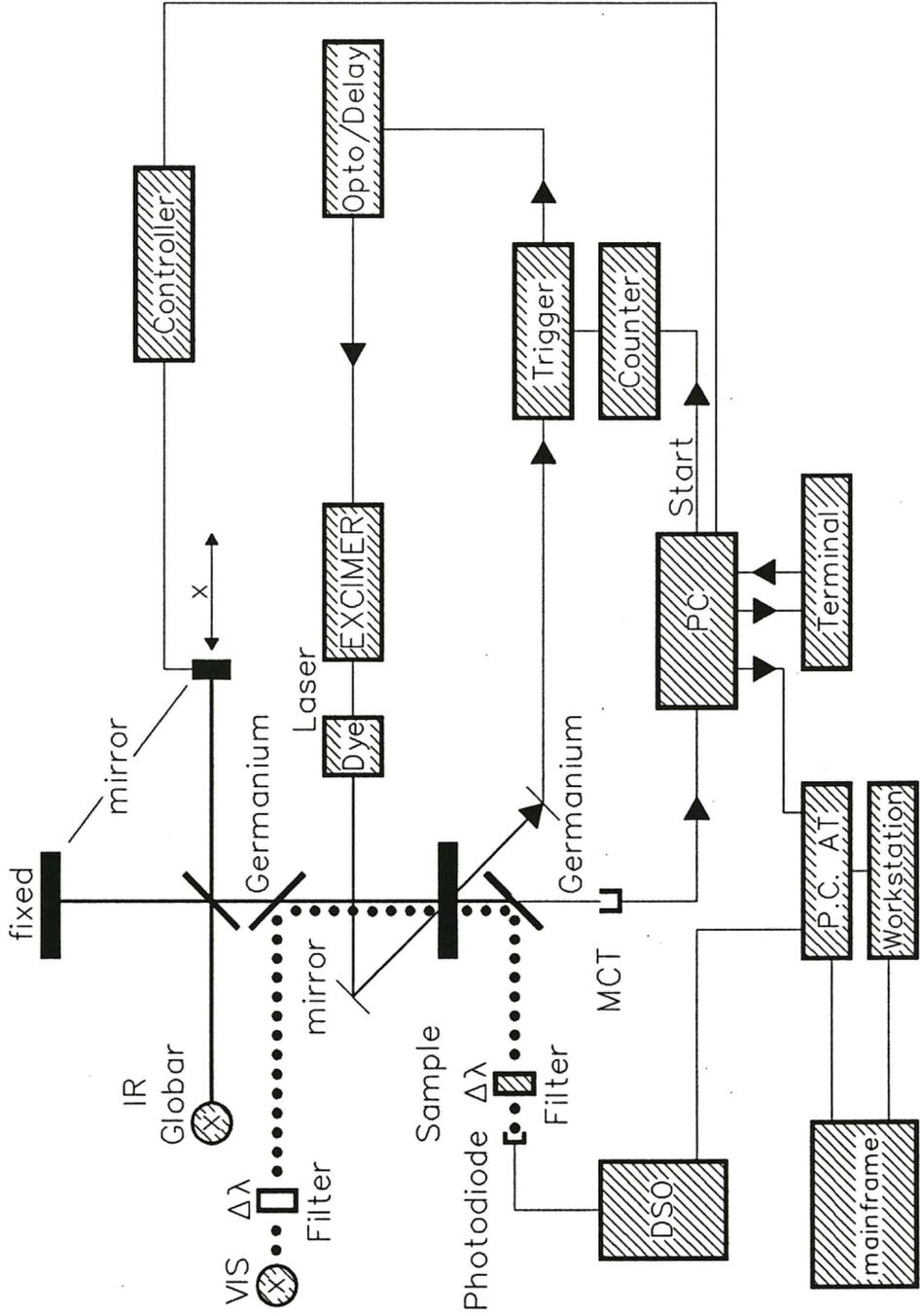
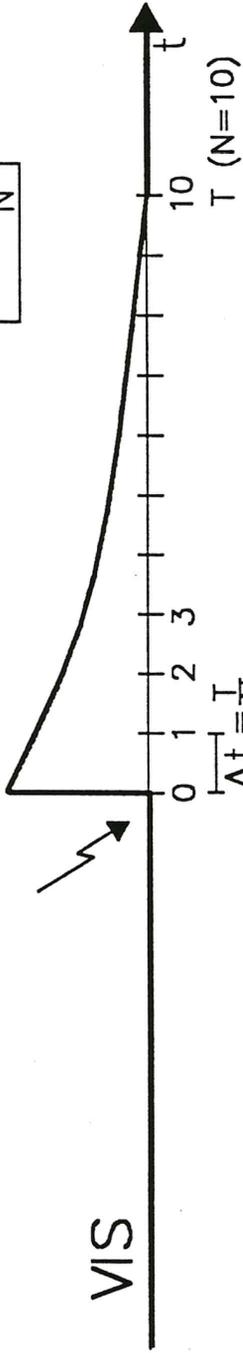


Abb. 3

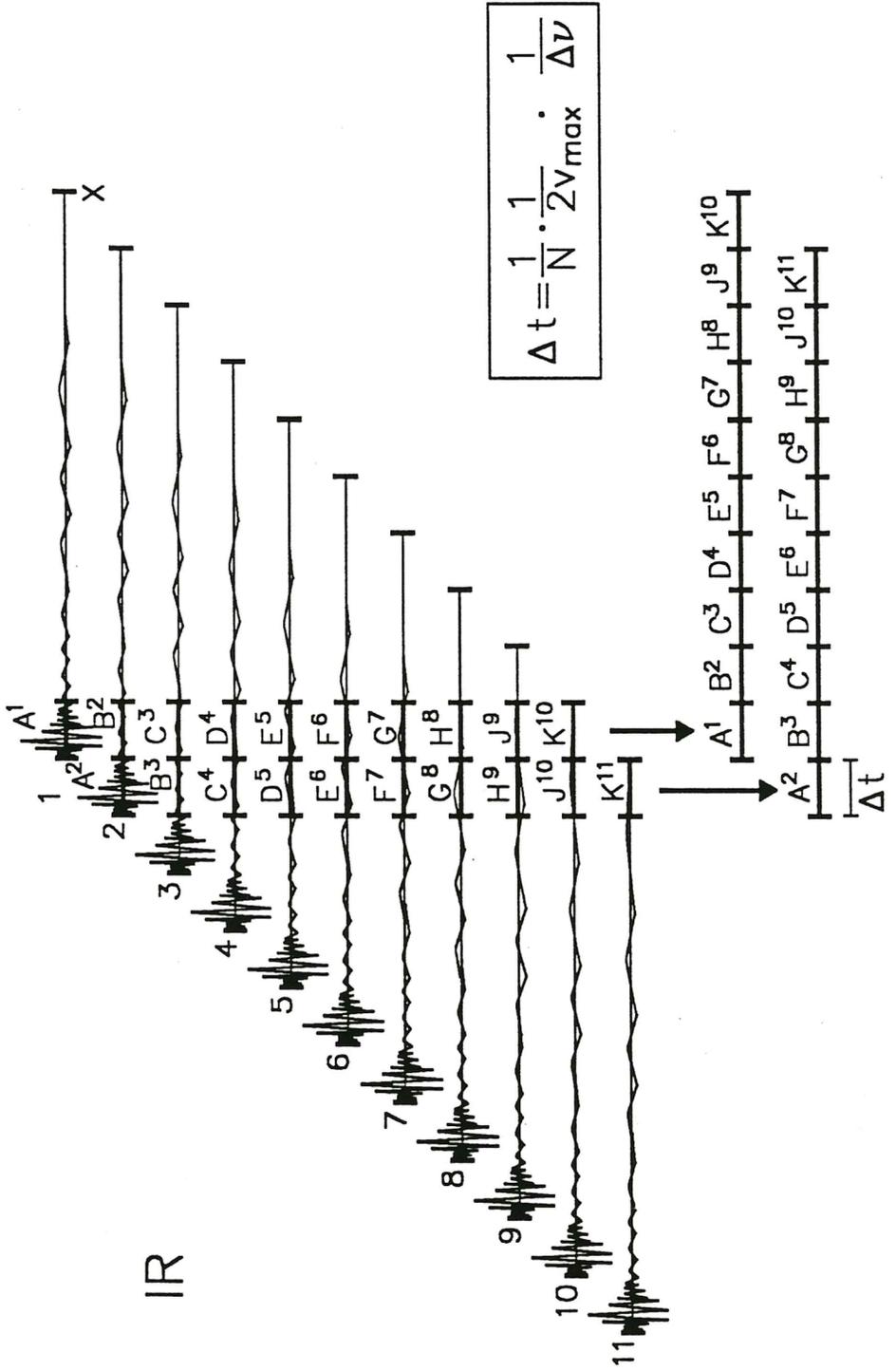
Stroboscope

$$\Delta t = \frac{x}{N}$$



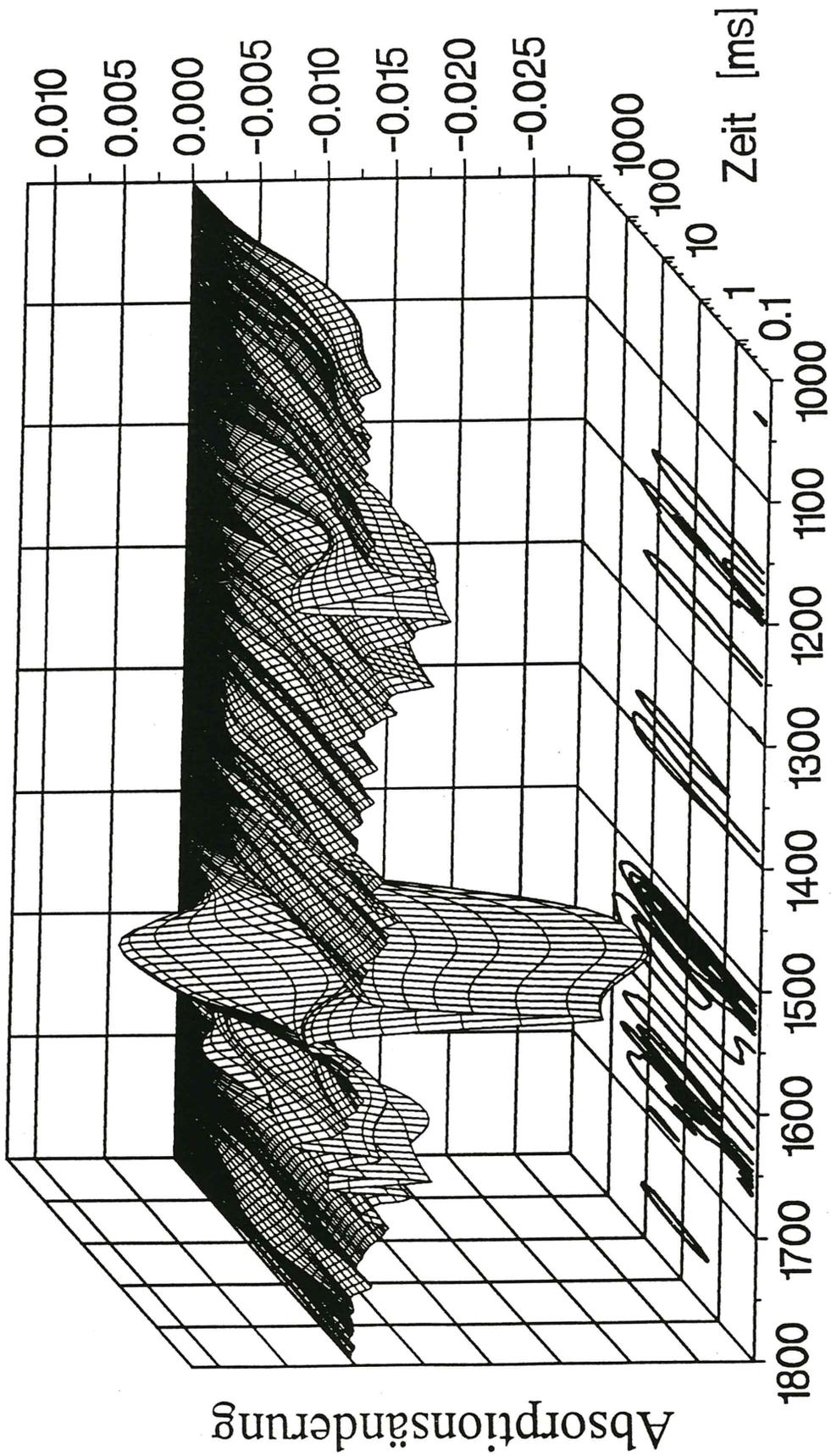
VIS

IR



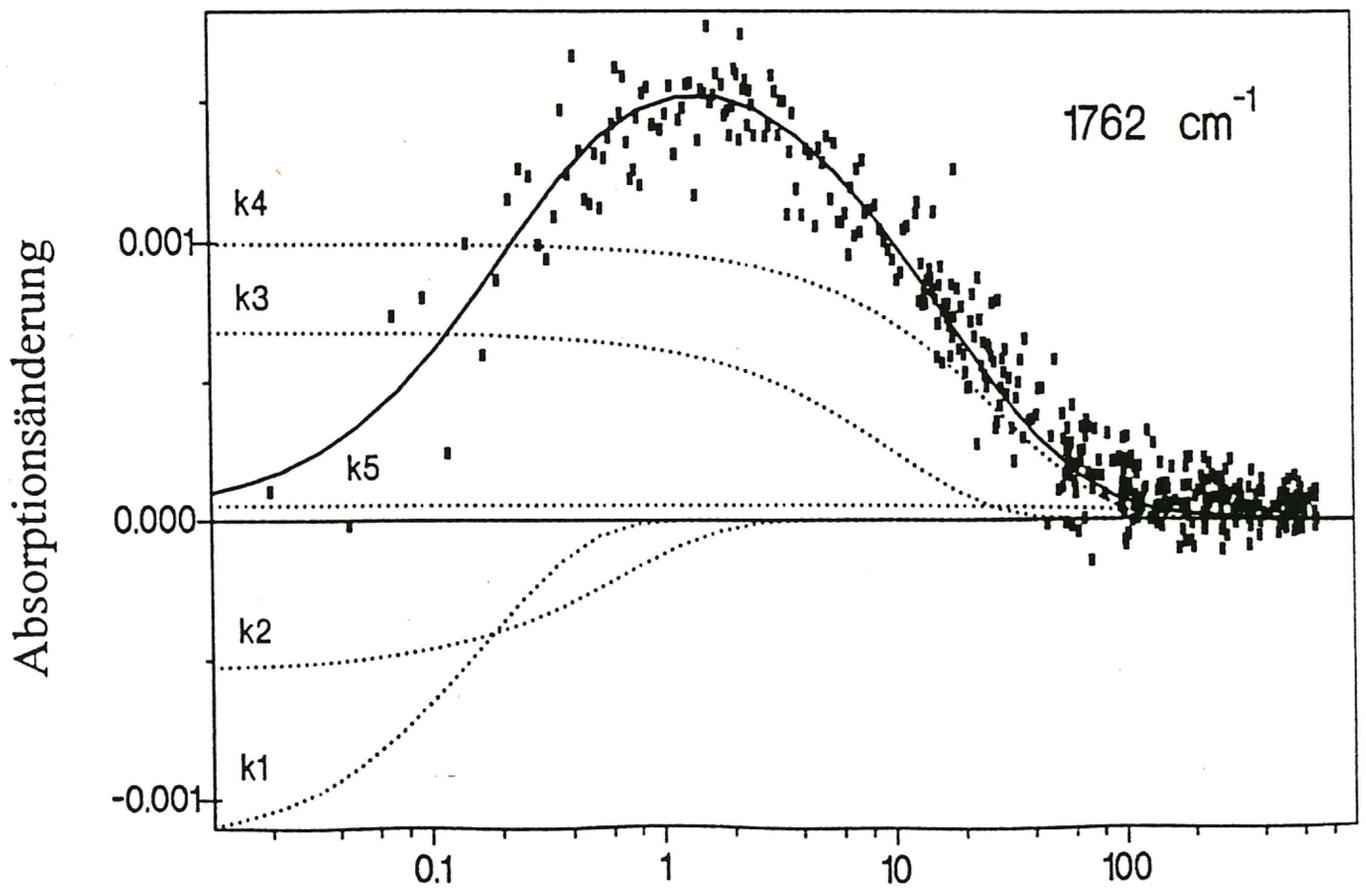
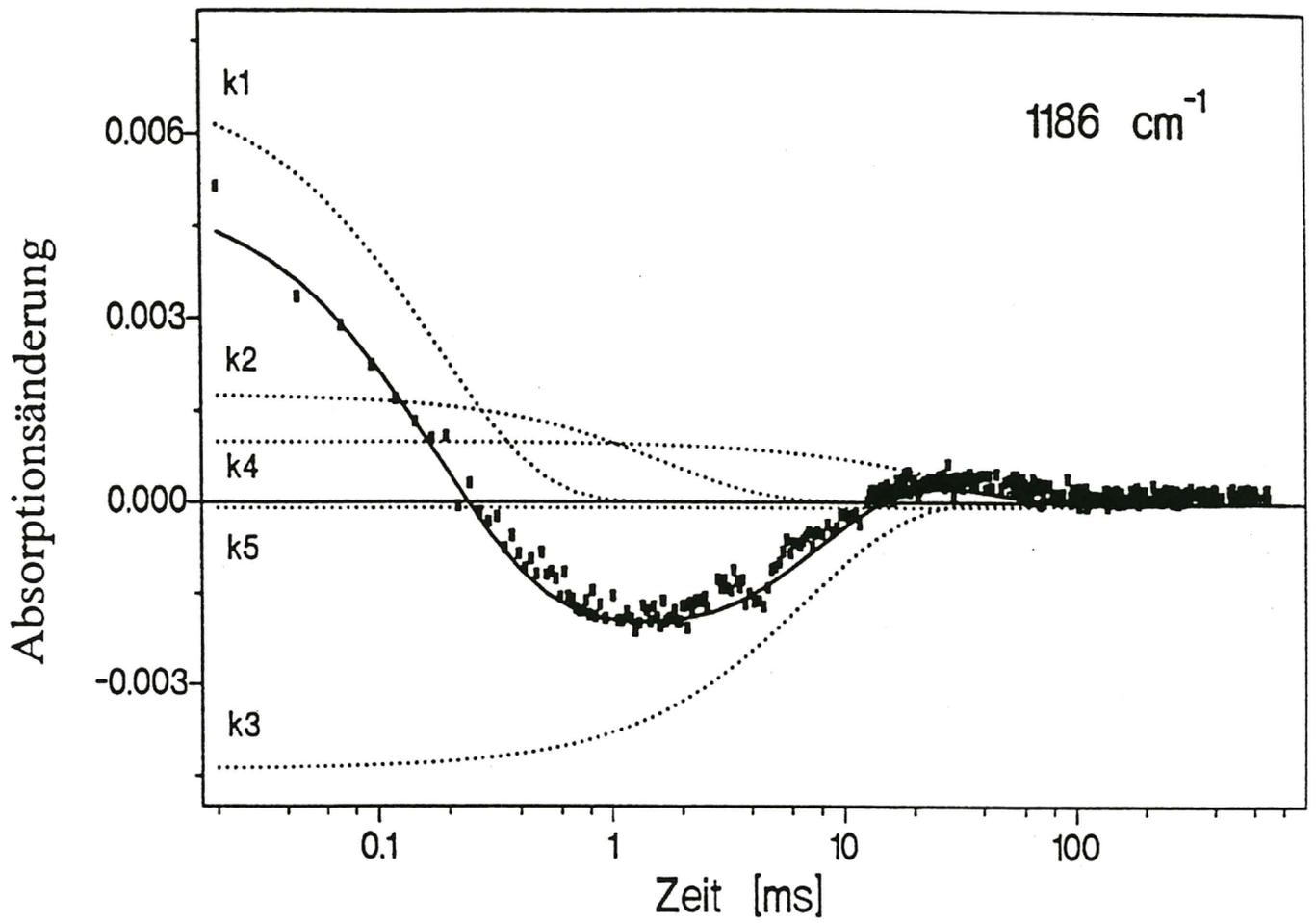
$$\Delta t = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{2V_{\max}} \cdot \frac{1}{\Delta \nu}$$

A6664

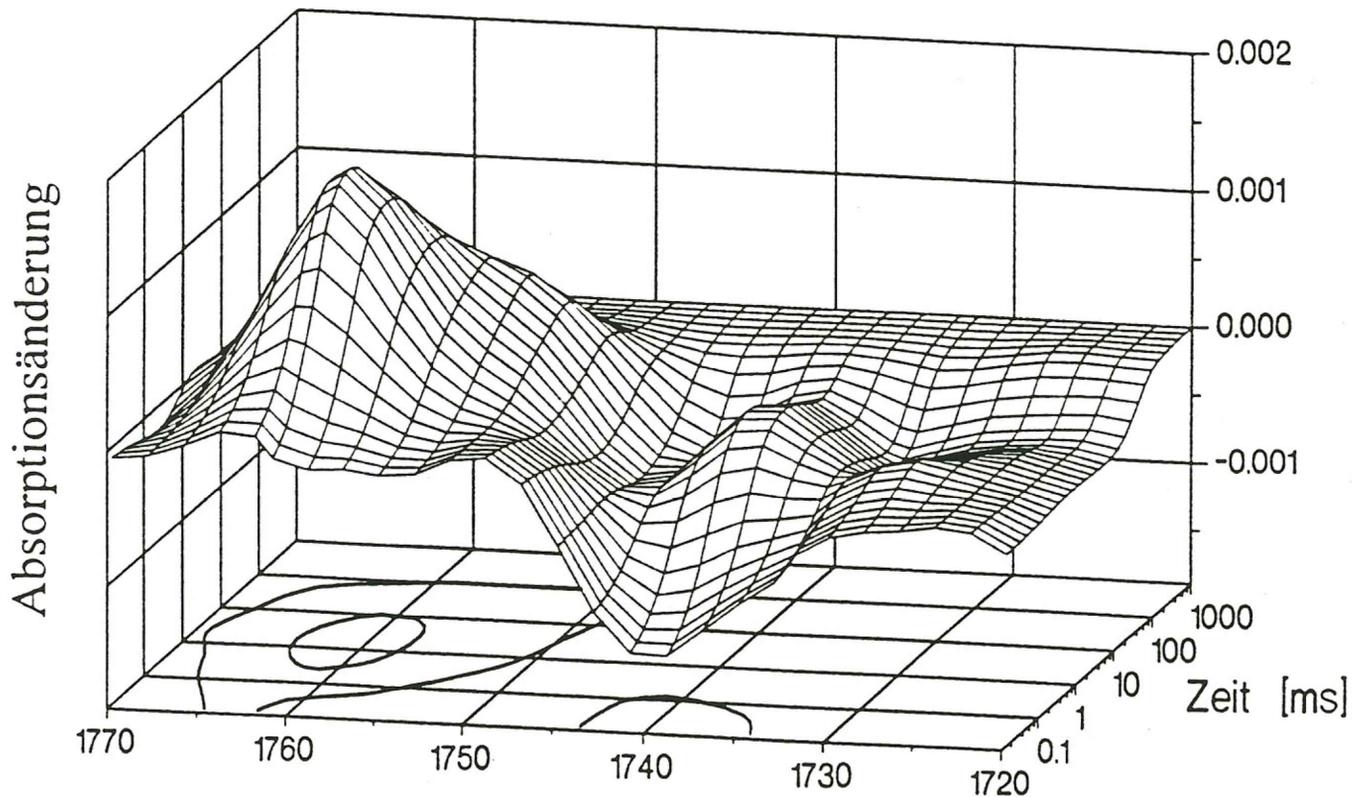
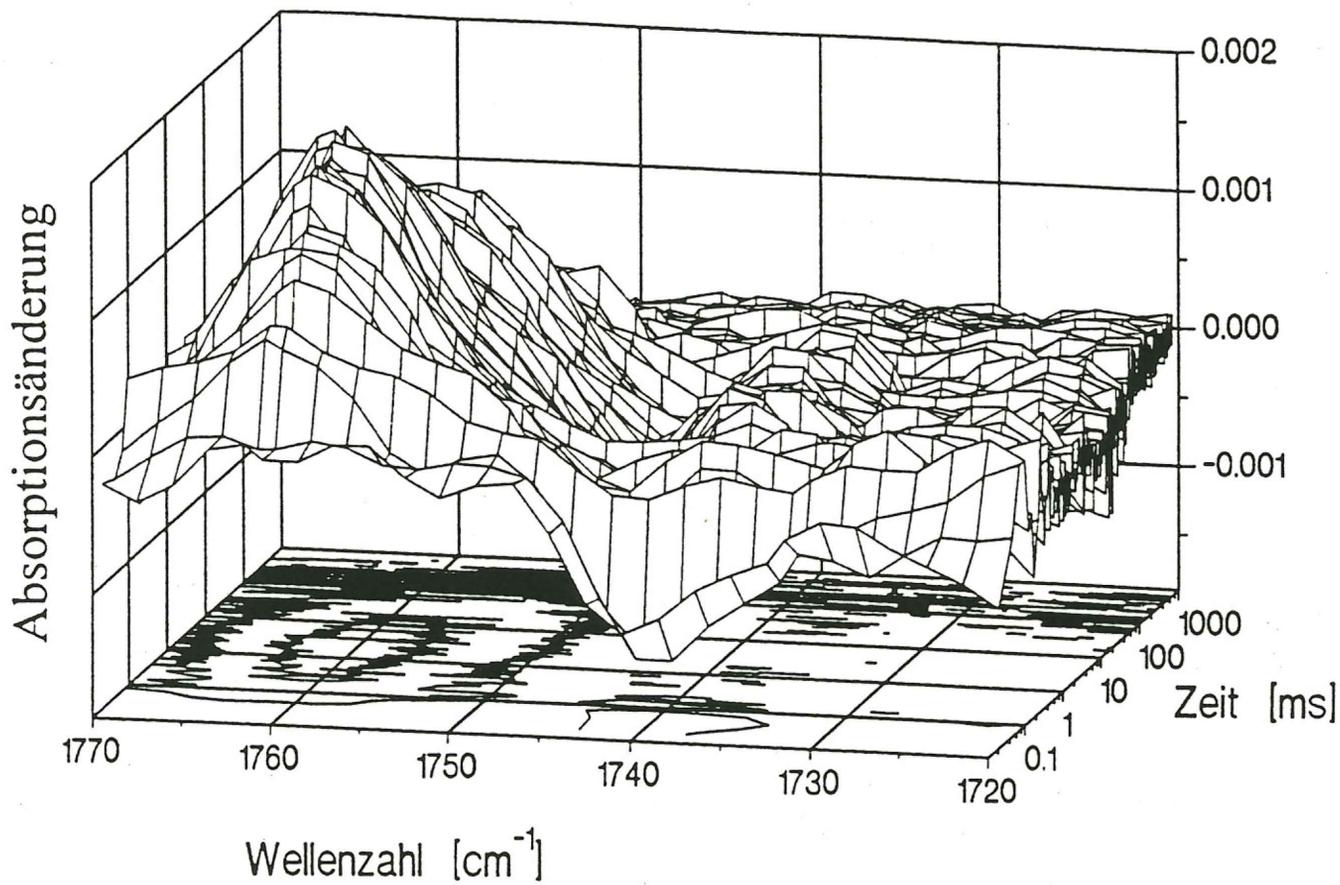


Wellenzahl [cm⁻¹]

A655

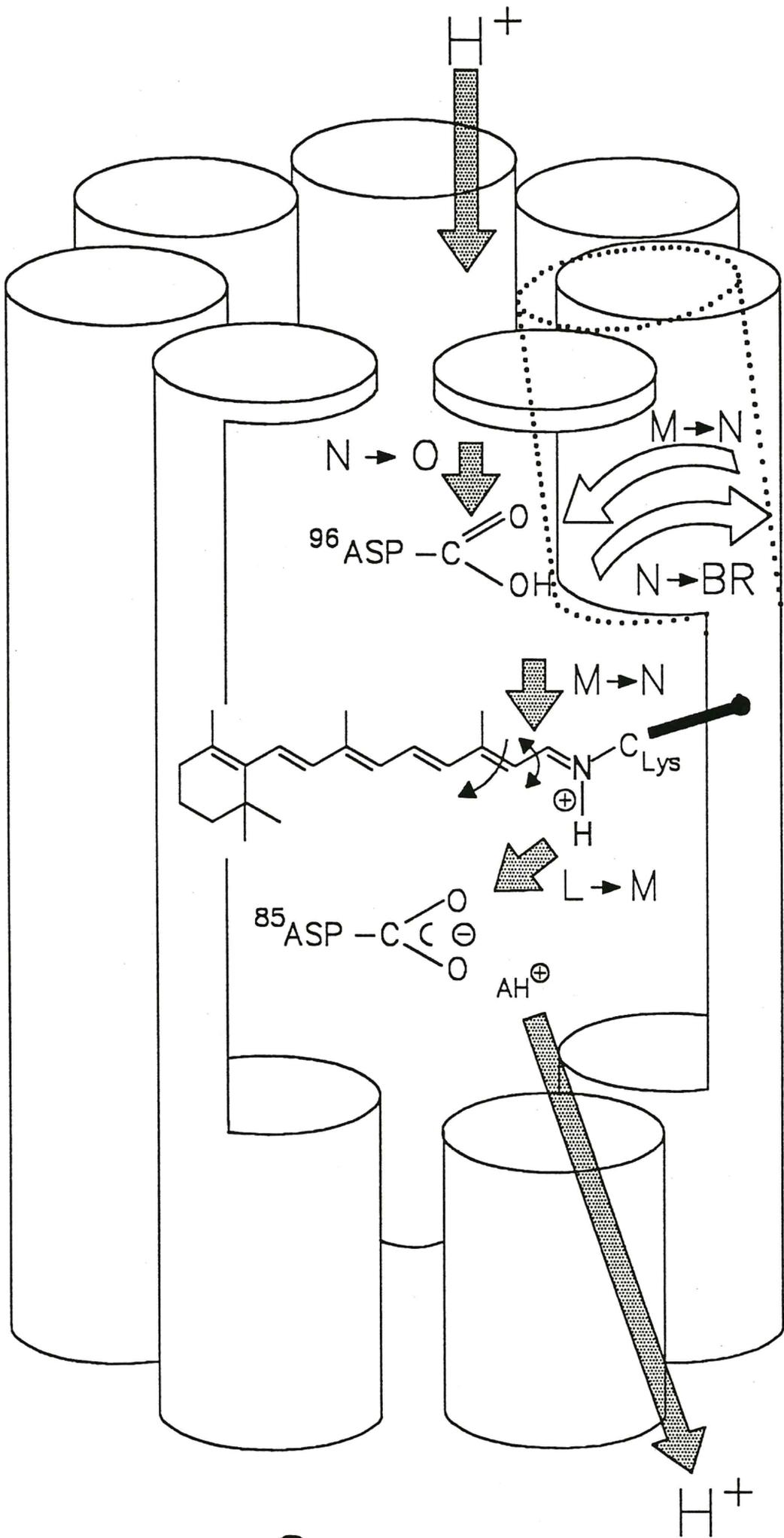


A 5.6 a, b



ASL 7 a, b

in



A66 8

H^+ out