



# Kapitel 1

## Einleitung

Proteine gehören zu den wichtigsten Bausteinen des Lebens. Als essentielle Bestandteile aller Organismen nehmen sie an praktisch jedem Prozess in Zellen teil. Sie verleihen der Zelle nicht nur Struktur, sondern sind die molekularen “Maschinen”, welche Stoffe transportieren, Ionen pumpen, chemische Reaktionen katalysieren und Signalstoffe erkennen. Wegen ihrer besonderen Bedeutung sind Proteine und ihre Eigenschaften und Funktionen Untersuchungsgegenstand vieler wissenschaftlicher Disziplinen.

Proteine sind Heteropolymere (Polypeptide), die aus einzelnen Aminosäuren aufgebaut sind. Die genaue Sequenz der verschiedenen Aminosäuren innerhalb der Proteinkette bestimmt dabei, in welche spezielle Struktur sich ein Protein faltet [1]. Eine langgestreckte oder ungeordnete Polypeptidkette hat keine biologische Aktivität, die Funktion ergibt sich erst aus der Konformation, der dreidimensionalen Anordnung der Polypeptide in einer Struktur. Doch obwohl eine solche Struktur eines Proteins schon vor geraumer Zeit erstmals durch ein Röntgenbeugungs-Experiment entschlüsselt werden konnte [2, 3], ist man auch heute noch weit von einem vollständigen Verständnis dieser Molekülgattung entfernt.

Obwohl von vielen Proteinen hochaufgelöste Röntgenbeugungsstrukturen bekannt sind, also Proteinkristalle mit hinreichend ähnlichen Einheitszellen erzeugt werden können, muss ihre dreidimensionale Struktur flexibel genug sein, um ih-

re biologischen Aufgaben zu erfüllen [4]. Die biologische Funktion vieler Proteine erfordert oft Strukturänderungen im gefalteten Zustand. Solche Strukturänderungen können beispielsweise beim Binden von Proteinen an andere Proteine oder kleinere Moleküle auftreten. Jeder Funktion eines Proteins ist damit auch eine Konformation zugeordnet. Diese strukturelle Flexibilität von Proteinen spiegelt Reorganisationen von Atomgruppen wieder und kann durch Fluktuationen des Proteins zwischen verschiedenen Konformationen beschrieben werden.

Ein Protein kann neben seinen Konformationen oder funktionellen Zuständen auch noch in einer großen Zahl von Konformations-Unterzuständen (conformational substates, CS) existieren [5]. In allen Unterzuständen einer Konformation hat ein Protein die gleiche, zur jeweiligen Konformation gehörende biologische Funktion. In einem für die Röntgenstrukturanalyse verwendeten Proteinkristall liegen alle Proteine in der gleichen Konformation, aber nicht im gleichen Unterzustand vor. Die genaue Molekülstruktur, obwohl im Wesentlichen identisch, zeigt deshalb von Protein zu Protein kleine Abweichungen, abhängig vom jeweiligen CS. Ein Atom kann somit in verschiedenen Proteinen an geringfügig unterschiedlichen Positionen sitzen, die Abweichung der Atome von ihrem "mittleren Aufenthaltsort" ist also relativ groß. Das wesentliche Kennzeichen des "Materiezustands Protein" ist daher die gleichzeitige Existenz einer festen Ordnung, zu sehen in den ästhetischen (mittleren) Molekülstrukturen, wie sie aus Röntgenbeugungs-Experimenten abgeleitet werden und einer Unordnung auf kleinerem Maßstab, die sich aus der Existenz der CS ergibt.

Wegen der enormen Zahl der verschiedenen möglichen Konformationszustände besitzen Proteine eine komplizierte Potentiallandschaft mit einer großen Zahl an Minima und einer breiten Verteilung dazwischen vorhandener Barrieren [6]. Diese Barrieren werden bei Konformationsänderungen entweder durch thermische Aktivierung oder durch Tunnelprozesse überwunden. Sogar bei tiefen Temperaturen erzeugen Relaxationsprozesse, also Übergänge zwischen diesen Minima, eine reichhaltige Dynamik, die viele Größenordnungen in der Zeit umfasst [7]. Ein experimenteller Zugang zu dieser Dynamik wird durch die Tatsache ermöglicht, dass

die Energien eines in ein ungeordnetes Material, wie es ein Protein ist, eingebetteten Farbstoffes sehr empfindlich auf Veränderungen seiner lokalen Umgebung reagieren. Dadurch bietet sich die optische Spektroskopie von Farbstoffen in Proteinmatrizen als geeignetes Mittel an, um die mikroskopische Struktur und die Relaxations-Dynamik der Proteinmatrix durch die spektralen Veränderungen der Gastmoleküle zu untersuchen. Dieser spektroskopierte Farbstoff kann dabei entweder natürlicher Bestandteil des Proteins sein, oder künstlich eingebracht werden.

Eine Strukturfluktuation eines Proteins, also ein Übergang in einen anderen CS, führt im allgemeinen zu einer geänderten Wechselwirkung zwischen Protein und Chromophor und damit zu einer Änderung der Absorptionsfrequenz des Chromophors. Dieser Vorgang wird als *spektrale Diffusion* bezeichnet. Die Untersuchung der spektralen Diffusion einzelner Anregungen in Lichtsammelkomplexen als Modellsystem für in Proteine natürlich eingebettete Farbstoffe ist das Thema dieser Arbeit. Ziel der Experimente ist es, die Natur der im Protein ablaufenden dynamischen Prozesse aufzudecken, was aber nicht auf direktem Weg möglich ist. Man benötigt vielmehr eine Modellvorstellung, die bestimmte strukturelle Vorgänge im Protein postuliert und daraus das Verhalten der spektralen Diffusion ableitet. Dieses kann dann mit den experimentellen Ergebnissen verglichen werden.

Spektrale Diffusion wird nicht nur in Proteinen beobachtet, sondern auch in Systemen wie etwa Gläsern oder Polymeren. Zur Erklärung der spektralen Diffusion in Gläsern wird gewöhnlich das sog. TLS-Standardmodell [8, 9] herangezogen, das ursprünglich eingeführt wurde, um thermodynamische Besonderheiten von amorphen Tieftemperatursystemen zu erklären. Die wesentliche Idee dieses Modells ist es, alle in einem ungeordneten System stattfindenden Relaxations- oder Fluktuationsprozesse als Tunnelübergänge lokalisierter Zwei-Niveau-Systeme (Two Level Systems, TLS) zu beschreiben. Proteine und Gläser zeigen bei tiefen Temperaturen in vielen Belangen ein sehr ähnliches Verhalten. Es ist daher naheliegend, das aus der Theorie der Gläser stammende TLS-Standardmodell auch zur Interpretation der spektralen Diffusion in Proteinen heranzuziehen. Lochbrenn-

und Photon-Echo-Experimente an der in Myoglobin enthaltenen Häm-Gruppe haben aber auch gezeigt, dass die Gesetzmäßigkeiten, durch welche die spektrale Diffusion beschrieben wird, sich in Proteinen und Gläsern unterscheiden können [10]. Daraus ergibt sich die naheliegende und noch ungeklärte Frage, ob das Wechselspiel von Ordnung und Unordnung, welches eine spezifische Eigenschaft von Proteinen ist, zu neuen Eigenschaften der strukturellen Dynamik von Proteinen führt.

Zum Vergleich der Dynamik von Gläsern und Proteinen werden in Kap. 5 zunächst die Vorhersagen des TLS-Standardmodells für einzelne in Gläser eingebettete Farbstoffe hergeleitet und diese mit den experimentellen Ergebnissen von einzelnen, in Lichtsammelkomplexen von Purpurbakterien enthaltenen BChl *a*-Molekülen verglichen. Durch eine Kumulantenanalyse der spektralen Trajektorien einzelner Anregungen kann in Kap. 5.5 gezeigt werden, dass das TLS-Standardmodell keine adäquate Beschreibung der spektralen Diffusion der eingebetteten Farbstoffe liefert.

In Kap. 5.6 wird das TLS-Standardmodell erweitert, indem die mit dem Farbstoff wechselwirkenden TLS in zwei Klassen eingeteilt werden, die sich durch ihren TLS-Farbstoff-Abstand und die Anzahl der in den Klassen enthaltenen TLS unterscheiden. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wird in Kap. 6.1 gezeigt, dass mit der in dieser Arbeit verwendeten Kumulantenanalyse erstmals der spektrale Diffusionskern eines *einzelnen* Proteins gewonnen werden kann. Aus den bei der Kumulantenanalyse gewonnenen und durch die TLS-Klassen verursachten spektralen Verstimmungen wird dann eine Abschätzung der TLS-Farbstoff-Abstände durchgeführt. Diese Abstände werden in Kap. 6.2 mit den Proteinstrukturen der Lichtsammelkomplexe verglichen. In Kap. 6.3 wird zusätzlich versucht die Zeitabhängigkeit der gemessenen spektralen Diffusionskerne zu bestimmen. Dieses Ergebnis wird mit dem in [7] beschriebenen Diffusionsmodell verglichen, welches die dynamischen Prozesse in einem Protein als Diffusionsbewegung in dessen Konformationsraum auffasst und zu einem charakteristischen Potenzgesetz für die zeitliche Entwicklung des spektralen Diffusionskerns führt.

Die Unterschiede der spektralen Diffusion und der Linienformen einzelner Anregungen bei peripheren Lichtsammelkomplexen verschiedener Spezies von Purpurbakterien werden in Kap. 7.1 untersucht. Um einen Einfluß der zur Immobilisierung verwendeten Matrizen auszuschließen, werden Referenzexperimente mit in einer Bilipidschicht eingebetteten Lichtsammelkomplexen analysiert. Die Elektron-Phonon-Kopplung von einzelnen, in Proteine aus verschiedenen Spezies von Lichtsammelkomplexen eingebetteten Farbstoffen wird in Kap. 7.3 durch eine multivariate statistische Analyse der Spektren beschrieben. Durch einen Vergleich mit den Kristallstrukturen von *Rps. acidophila* und *Rsp. molischianum* kann damit ein vorläufiges Strukturmodell der Bindungstasche von *Rb. sphaeroides* abgeleitet werden.

Kap. 8 gibt schließlich eine Zusammenfassung der theoretischen und experimentellen Ergebnisse.