

JOSEF WACHTVEITL, INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE UND THEORETISCHE CHEMIE

Femtosekunden-zeitaufgelöste Spektroskopie zur Untersuchung molekularer Dynamik und Funktion

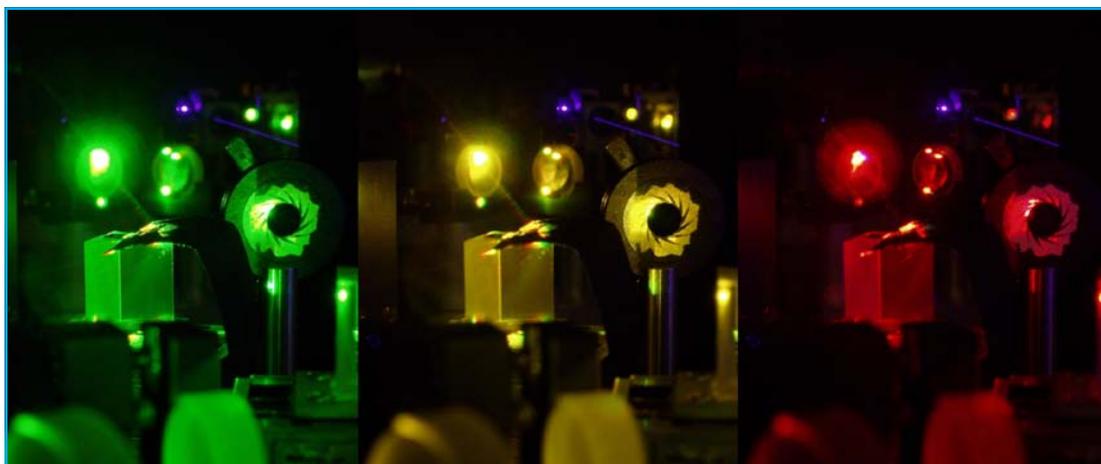
Die Echtzeitbeobachtung schnellster chemischer und biologischer Reaktionen mit Hilfe von ultraschneller transients Anreg-Abtast-Spektroskopie ist der Forschungsschwerpunkt unserer Gruppe. Von besonderem Interesse ist dabei die Reaktionsdynamik molekularer Systeme, wie z.B. optischer Schalter, natürlicher und artifizierter photosynthetischer Systeme und bioaktiver Modellsysteme zur Peptid- und Proteinfaltung. Fundamentale Prozesse der molekularen Physikalischen Chemie, wie z.B. Photoisomerisierung, Energie- und Elektrontransfer, Konformationsdynamik von Biomakromolekülen oder Reaktionsdynamik an Grenzflächen sind hierbei Gegenstand der aktuellen Forschung. Dazu werden moderne Methoden der Quantenoptik zur Erzeugung von spektral abstimmbaren Femtosekunden-Lichtimpulsen mit massgeschneiderten Pulsformen im sichtbaren und infraroten Spektralbereich entwickelt und eingesetzt.

JOSEF WACHTVEITL, INSTITUTE OF PHYSICAL AND THEORETICAL CHEMISTRY

Femtosecond Time Resolved Spectroscopy to Study Molecular Dynamics and Function

The focus of our group is to observe fastest chemical and biological reactions in real-time by transient ultrafast pump probe spectroscopy on a great variety of molecules from small organic compounds to complex enzymes. This includes molecular systems like optical switches, natural and artificial photosynthetic systems, membrane protein complexes and bioactive model peptides for folding studies. Fundamental processes in molecular physical chemistry like photoisomerization, energy and electron transfer and reaction dynamics at surfaces are investigated. Modern methods in quantum optics for the generation of properly shaped and widely tunable femtosecond pulses in the visible and infrared spectral range are employed and further developed.

Abb. 1: Blick in ein Femtosekundenspektrometer: Der NOPA (Nichtlinearer Optischer Parametrischer Verstärker), der zum Erzeugen der Anregungspulse verwendet wird, kann auf verschiedene Wellenlängen abgestimmt werden. Dadurch können verschiedenste Systeme untersucht werden. Ein aus Prismen aufgebauter Kompressor (hier gezeigt) ist Teil des NOPAs und notwendig um auch ultraschnelle Dynamiken beobachten zu können. Damit kann eine Zeitauflösung von wenigen zehn Femtosekunden erreicht werden.



Damit kann eine Zeitauflösung von wenigen zehn Femtosekunden erreicht werden.

Fig. 1: View into a femtosecond-spectrometer: The NOPA (Nonlinear Optical Parametric Amplifier) for generating excitation pulses can be tuned to different wavelengths in order to analyze different systems. To observe ultrafast dynamics a compressor based on prisms (shown here) is employed in the NOPA. A time resolution of a few ten femtoseconds can be achieved.

SCHNELLE KONFORMATIONS-DYNAMIK IN BIOMOLEKÜLEN, PROTEINFALTUNG

Die Beobachtung schnellster Prozesse der Proteinfaltung wird durch das Auslösen des Faltungsprozesses auf der ultraschnellen Zeitskala ermöglicht. Die schnelle Bildung von lokalen Sekundärstrukturelementen, den wesentlichen Bausteinen der Proteinarchitektur, kann mit photoschaltbaren Chromopeptiden direkt untersucht werden. In diesen schnell reagierenden, bistabilen Modellsystemen (Abb. 2) wird die Bewegung des optischen Schalters direkt auf das Peptidrückgrat übertragen und spektroskopisch verfolgt. Das modulare Design der Moleküle erlaubt die systematische Analyse von Konformationsbibliotheken, die Photomodulation struktureller Präferenzen und somit der entsprechenden Bioaktivitäten.

FAST CONFORMATIONAL DYNAMICS IN BIOMOLECULES, PROTEIN FOLDING

The observation of the fastest events in protein folding requires the initiation of the folding process on an ultrafast timescale. Reversible photocontrol of peptide conformation is the most direct approach to study the mechanisms underlying the elementary reactions. Recently, photoresponsive chromopeptides were shown to act as fast reacting model system for peptide folding (Fig. 2), where the motion of the trigger molecule is directly transmitted to the cyclic peptide and the peptide response can be monitored spectroscopically. The modular design of the systems allows the analysis of structural preferences, the scanning of conformational libraries and the photomodulation of bioactivities.

Abb. 2: Schnellste Konformationsänderungen können in einem zyklischen Peptid durch einen in die Peptidkette (blau) integrierten optischen Schalter (rot) ausgelöst werden. Spektral und zeitlich aufgelöste Untersuchungen im Sichtbaren und Infraroten zeigen die strukturellen Änderungen mit Pikosekunden-Zeitauflösung.

Fig. 2: Ultrafast conformational transitions of a cyclic peptide can be induced by an optical switch (red) incorporated in the peptide chain (blue). Frequency and time resolved studies in the visible and mid-infrared reveal structural changes starting on the picosecond time scale.

ELEKTRONTRANSFER AN HALBLEITEROBERFLÄCHEN

Die Effizienz neuartiger, nasschemischer photovoltaischer Zellen beruht auf einer ultraschnellen Elektrontransfer-Reaktion zwischen Farbstoffadsorbaten und nanokristallinen Festkörperoberflächen (Abb. 3). Die Geschwindigkeit dieser Reaktion vom einem System mit diskreten Energieniveaus in ein Quasi-Kontinuum von Akzeptorzuständen liegt im Bereich weniger Femtosekunden und somit jenseits des bisher bekannten schwingungsvermittelten molekularen Ladungstransfers. Ein komplettes molekulares Bild beinhaltet die Dynamik von Oberflächenzuständen, Schwingungskohärenzen und -relaxationen sowie die Erzeugung von Festkörperphononen. Die definierte Anregung molekularer Schwingungen erlaubt neuartige Versuche zur Quantenkohärenz und zeigt das Potential dieser Systeme für Logikschaltkreise und Speicheranwendungen.

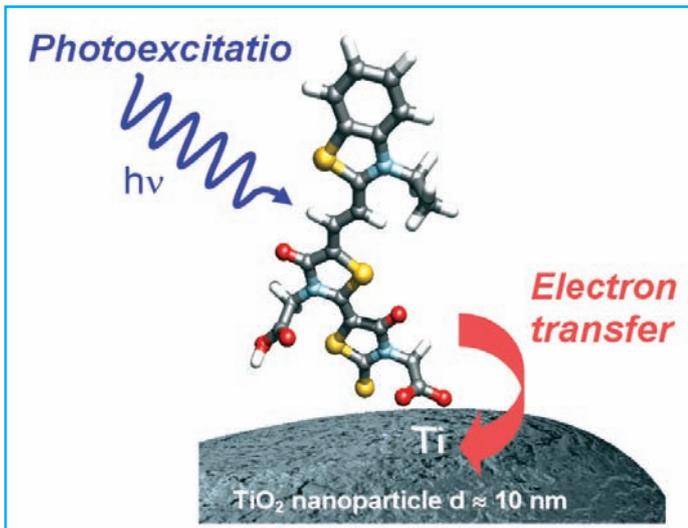
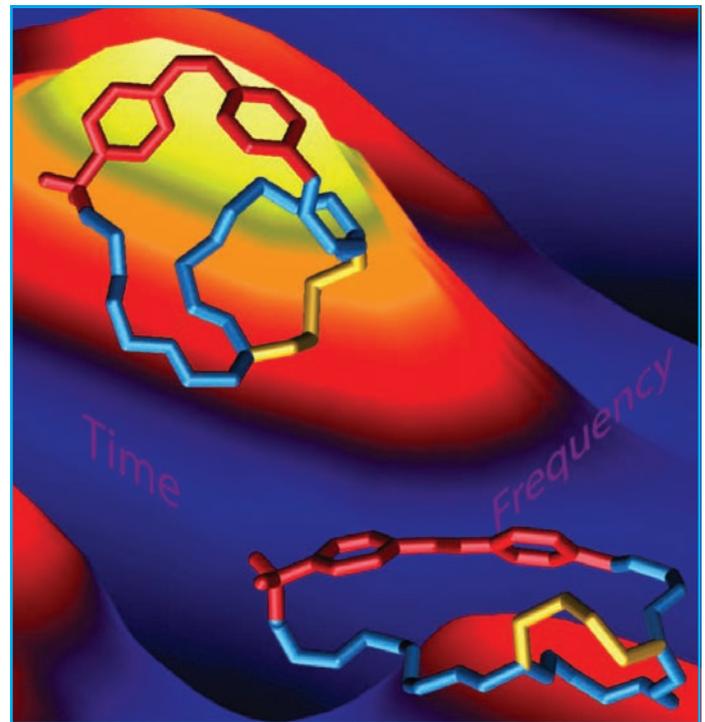


Abb. 3: Prinzip der photoelektrochemischen Solarzelle: Nach Photoanregung wird ein Elektron aus dem angeregten Zustand des Farbstoffmoleküls (hier Merocyanin) in das Leitungsband des Halbleiter-Kolloids (TiO_2) injiziert. Die Verwendung von Nanopartikeln als Elektronen-Akzeptor mit ihrem hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis garantiert eine hohe Anzahl an adsorbierten Farbstoffmolekülen. Damit wiederum kann ein hohes Photon-zu-Strom-Verhältnis erreicht werden, was den Einsatz in einer alternativen Art von Solarzellen (Grätzel-Zellen) möglich macht.

FUNKTIONELLE DYNAMIK VON PROTEINEN

Die vergleichende Analyse der Primärreaktionen in Retinalproteinen, z.B. in archaebakteriellen Photo-rezeptoren (sensorische Rhodopsine) oder bakteriellen Protonenpumpen (Proteorhodopsin) erlaubt die Entwicklung eines allgemeingültigen molekularen Modells der Photoisomerisierung des Retinal-Chromophors (Abb. 5).



ELECTRON TRANSFER TO SEMICONDUCTOR SURFACES

The electron transfer from organic dye molecules into semiconductor nanoparticles (Fig. 3) is the key feature of novel wet solar cells. The underlying charge transfer from a system with discrete energy levels into a quasi-continuum of acceptor states is not well understood and represents a theoretical and experimental challenge. The almost infinite number of acceptor states leads to extremely short transfer times on the order of a few femtoseconds which cannot be resolved by standard femtosecond setups. In our group we developed a pump-probe setup enabling to directly time resolve these reactions over a broad spectral range (UV-NIR). For the first time the influence of surface states on the transfer process could be demonstrated with this device, furthermore vibrational coherences and injection times were directly observed. The selective excitation of molecular vibrations may be utilized for the development of novel logical circuits and storage devices.

Fig. 3: Schematics of a photoelectrochemical solar cell: Upon photoexcitation an electron is injected from the excited state of the dye molecule (merocyanine) into the conduction band of a semiconductor colloid (typically TiO_2). The use of nanoparticles as acceptors with their high surface-to-volume ratio guarantees a sufficiently large number of coupled dye molecules. A high photon-to-current ratio can be achieved and employed in an alternative kind of solar cell (Grätzel cell).

FUNCTIONAL PROTEIN DYNAMICS

The comparative analysis of primary reactions in retinal proteins, e.g. various archaeal photoreceptors (sensory rhodopsins) or bacterial proton pumps (proteorhodopsin) allowed to develop a unifying molecular model for retinal photoisomerization (Fig. 5).



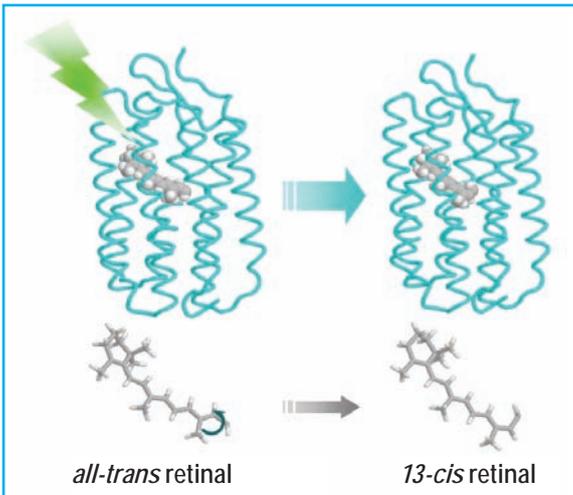


Abb. 4: Die Primärreaktion in Retinalproteinen: Nach Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge durch den Chromophor Retinal beginnt in Retinalproteinen der mehrstufige Photozyklus bei dem im Falle von Bakteriorhodopsin und Proteorhodopsin ein Proton transportiert wird. Auslöser dieser Reaktionen ist die lichtinduzierte **trans-cis** Isomerisierung des Retinals. Mittels Ultrakurzzeitspektroskopie konnte der auf Zeitskalen von Pikosekunden ablaufende Prozess in Proteorhodopsin beobachtet werden.

Fig. 4: Primary reaction in retinal proteins: The absorption of light by the chromophore retinal induces a series of reactions – the photocycle of retinal proteins. In bacteriorhodopsin and proteorhodopsin a proton is translocated during this process, which is triggered by the light induced **trans-cis** isomerisation of retinal. These initial reactions on timescales of picoseconds have been investigated by ultrashort timeresolved spectroscopy for proteorhodopsin.

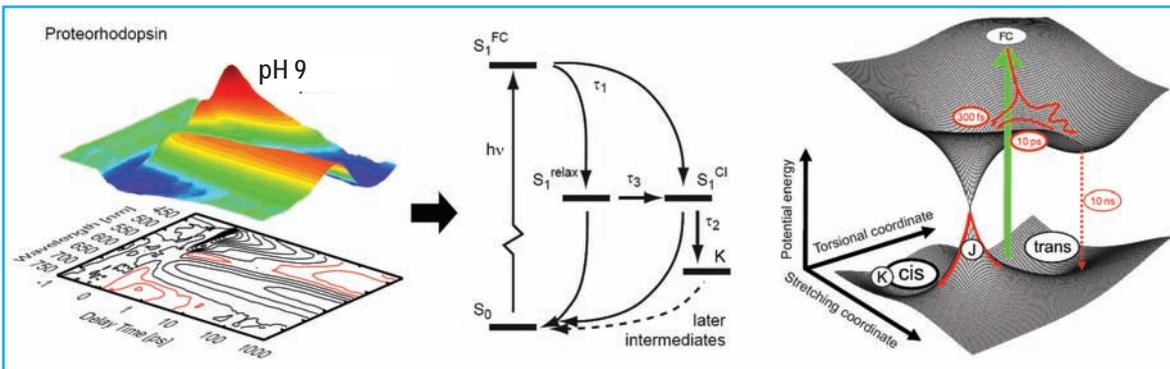
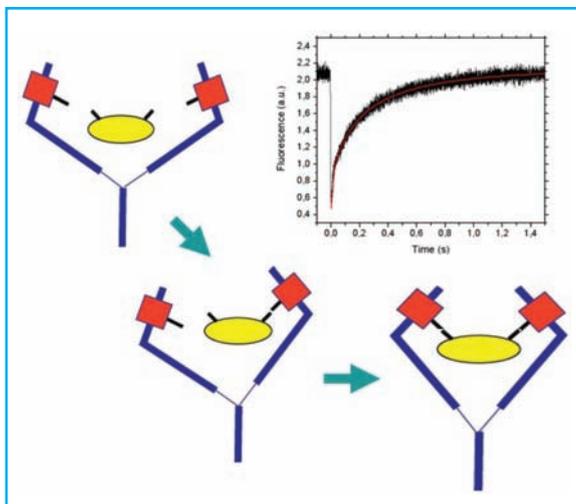


Abb. 5: Von der Messung zum Modell: Transiente Absorptionsänderungen von Proteorhodopsin, einer Protonenpumpe aus Proteobakterien, nach Anregung des Retinals bei 520 nm bei pH 9 (links). Klar zu erkennen ist das Ausbleichen des Grundzustandes (blau, um 520 nm), der Zerfall des angeregten Zustandes (rot, um 400nm) und die schnelle Bildung des Photoproduktes (rot, um 600 nm). Diese Messungen wurden sowohl in saurer als auch in alkalischer Umgebung durchgeführt und daraus dann ein Modell für die Dynamik der Isomerisierung des Retinals nach Photoanregung entwickelt (rechts).

und die schnelle Bildung des Photoproduktes (rot, um 600 nm). Diese Messungen wurden sowohl in saurer als auch in alkalischer Umgebung durchgeführt und daraus dann ein Modell für die Dynamik der Isomerisierung des Retinals nach Photoanregung entwickelt (rechts).

RNA-MODELLSYSTEME

Einzel- und doppelsträngige RNA mit exzitonic gekoppelten Fluorophoren liefern direkte Informationen zur Ent-/Faltungsdynamik. Spiropyran-basierte molekulare Schalter werden für lichtsteuerbare RNA-Modellsysteme eingesetzt, z.B. um die funktionelle Dynamik von photoschaltbaren Riboswitches oder "caged" micro RNAs mit hoher Zeitauflösung zu untersuchen.



RNA MODEL SYSTEMS

Single and double stranded RNA carrying excitonically coupled fluorophores are examined in order to obtain information on un/folding dynamics. Designed optical switches for spiropyran-based photoresponsive RNA constructs are analysed for the study of functional dynamics of light-responsive riboswitches and light-triggerable "caged" micro RNAs. The conformational dynamics of RNA and RNA-switches are observed with high time resolution.

Abb. 6: Funktionelle Dynamik eines RNA Aptamers: RNA-Ligand-Wechselwirkungen werden mit der stopped-flow-Fluoreszenztechnik untersucht. Die Ligandenbindung führt zu einer Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute, die Anlagerung an die beiden Bindungsstellen kann zeitlich aufgelöst werden.

Fig. 6: Functional dynamics of a RNA aptamer: RNA-ligand interaction can be monitored via stopped flow fluorescence spectroscopy. The binding of the ligand yields a rise in fluorescence quantum efficiency and can be divided into two separate steps corresponding to the two attachment sites on the aptamer.

LITERATUR / REFERENCES

Kusebauch, U., Cadamuro, S.A., Musiol, H.-J., Lenz, M.O., Wachtveitl, J., Moroder, L. and Renner, C. (2006).

Photo-controlled folding and unfolding of a collagen triple helix. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 7015-7018.

Matylytsky V.V., Dworak, L., Breus, V., Basché, T., Wachtveitl, J. (2009). Ultrafast Charge Separation in Multiexcited CdSe Quantum Dots Mediated by Adsorbed Electron Acceptors, *JACS*, 131, 2424-2425.

Amarie, S., Standfuss, J., Barros, T., Kühlbrandt, W., Dreuw, A. and Wachtveitl, J. (2007). Carotenoid Radical Cations as a Probe for the Molecular Mechanism of Nonphotochemical Quenching in Oxygenic Photosynthesis. *J. Phys. Chem. B*, 111, 3481-3487.

Grininger, M., Staudt, H., Johansson, P., Wachtveitl, J., Oesterhelt, D. (2009). Dodecin is the key player in flavin homeostasis of Archaea. *J. Biol. Chem.*, 284, 13068-13076.

Grünewald C., Kwon T., Piton N., Förster U., Wachtveitl J. and Engels J.W., (2008). RNA as scaffold for pyrene excited complexes. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 19-26

Neumann, K., Verhoefen, M.-K., Weber, I., Glaubitz, C. and Wachtveitl, J. (2008). pH dependent photoisomerization of retinal in proteorhodopsin. *Biophys. J.*, 94, 4796-4807.

KONTAKT / CONTACT:

Prof. Dr. Josef Wachtveitl

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Max von Laue-Str. 7
D-60438 Frankfurt am Main

Tel.: ++49 (0)69 798-29351

Fax: ++49 (0)69 798-29708

E-Mail: wveitl@theochem.uni-frankfurt.de

<http://www.theochem.uni-frankfurt.de/femtochem/>

CSL Behring ist weltweit einer der bedeutendsten Hersteller und Anbieter von lebensrettenden Arzneimitteln aus Humanplasma sowie verwandten Therapeutika. Das Unternehmen beschäftigt weltweit etwa 8.000 Mitarbeiter / innen, davon rund 1.900 in Deutschland. Der größte Produktions- und Forschungsstandort von CSL Behring befindet sich in Marburg.



Hochschulabsolventen (w/m)

- Ingenieurwissenschaften
- Naturwissenschaften

Wir suchen motivierte Talente, die sich in Form von **Praktika**, **Abschlussarbeiten**, unserem **Trainee Programm** oder **Direkteinstieg** in einem dynamischen, internationalen Umfeld entwickeln möchten und bereit sind Spitzenleistungen zu erbringen.

Auf unserer Internetseite finden Sie weitere Informationen über uns und interessante Herausforderungen für Sie:
www.cslobehring.com

Wir freuen uns auf Ihre Kontaktaufnahme!

CSL Behring GmbH

Human Resources, Nadine Cloos
Emil-von-Behring-Straße 76
35041 Marburg
Nadine.Cloos@cslobehring.com

Biotherapies for Life™ **CSL Behring**

