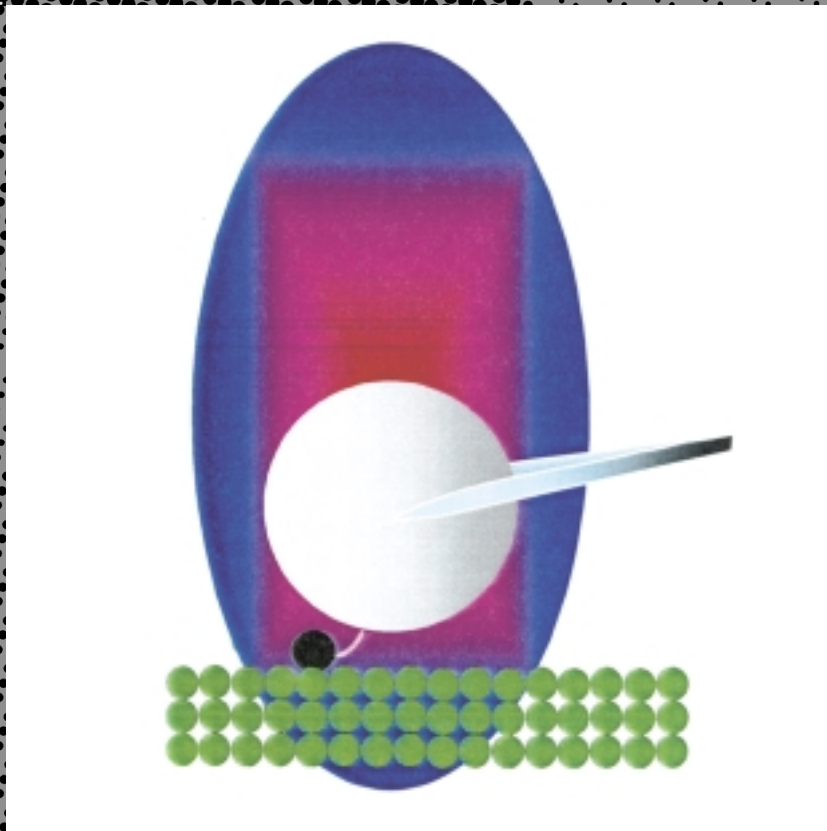


Jörg Wrachtrup

Biologische Physik

Stürmische Entwicklung und lange Tradition





Die Angewandte Physik hat die Biologie entdeckt (oder wiederentdeckt) – so könnte man die Entwicklung der letzten Jahre beschreiben. Kaum ein Gebiet der Physik hat in der jüngsten Vergangenheit so viele Wissenschaftler angezogen wie die Biologische Physik. Dabei blickt die Biophysik auf eine lange Tradition zurück – Physiker wie Arnold Sommerfeld (1848 – 1951) haben sich wissenschaftlich mit Fragestellungen auseinandergesetzt, die wir heute eindeutig der Biologie zuordnen würden /1/. Allerdings hat die stürmische Entwicklung insbesondere der Molekular- und Strukturbiologie in den letzten Jahren dazu geführt, daß wir immer detailliertere Fragen, zum Beispiel nach der Struktur beziehungsweise Funktion bestimmter Proteine, stellen.

Die Beantwortung dieser Fragen erfordert neue Meßmethoden, die von Physikern entwickelt werden, und die dabei neu entdeckten Phänomene müssen im Rahmen von Theorien interpretiert werden, die ebenfalls aus der Physik stammen. Gerade dieser letzte Aspekt ist neu in der Beziehung zwischen der Biologie und der Physik. In der Vergangenheit waren es vor allem apparative Entwicklungen, die ihren Weg von der Physik in die Biologie gefunden haben (beispielsweise das optische beziehungsweise das Elektronenmikroskop). Gegenwärtig finden aber auch Untersuchungsobjekte aus der Biologie Eingang in die Physik. Ein gutes Beispiel ist die Nanotechnologie beziehungsweise die Nanostrukturphysik. Hier interessiert man sich für die Untersuchung und Anwendung von Objekten mit Abmessungen im Bereich weniger Nanometer. Da viele biologisch wichtige „Funktionseinheiten“, wie beispielsweise Motorproteine, sich gerade in diesem Größenbereich befinden, werden sie daher zu Untersuchungsobjekten der Physik, die aus ihrer Sicht die Funktionsweise dieser kleinen molekularen Maschinen untersucht. Aus dem breiten Feld, das die Biologische Physik mittlerweile umfaßt, soll in diesem Beitrag nur von denjenigen Gebieten berichtet werden, mit der sich die Stuttgarter Arbeitsgruppe beschäftigt.

Photosynthese

Die Photosynthese ist eine der wichtigsten metabolischen Prozesse. Nahezu die gesamte Biomasse auf der Erde basiert letztendlich auf der Konversion von Solarenergie durch die Photosyntheseapparate von grünen Pflanzen, Algen und Bakterien. Obwohl sich im Lauf der Evolution diverse unterschiedliche Photosyntheseapparate entwickelt haben, sind die prinzipiellen Komponenten und Funktionsweisen ähnlich. Grundsätzlich weisen alle Photosyntheseeinheiten zwei Komponenten auf: Einerseits die Antennenkomplexe, die für die Absorption von Photonen aus dem Strahlungsfeld der Sonne verantwortlich sind, andererseits die sogenannten Reaktionszentren, in denen die Anregungsenergie der Photonen in eine Ladungstrennung umgewandelt wird, die alle weiteren Schritte der Photosynthese bis hin zur Synthese von ATP (Adenosintriphosphat) initiiert.

Jörg Wrachtrup ■
Biologische Physik ■

Der wahrscheinlich komplizierteste Photosyntheseapparat findet sich in Pflanzen. Im Verlauf der pflanzlichen Photosynthese wird Wasser gespalten; der dabei freiwerdende Sauerstoff ist letztendlich Grundlage für alles aerobe Leben (Sauerstoff benütigend) auf der Erde. Eine einfache, aber sehr elegant konstruierte Photosyntheseeinheit findet man in Purpurbakterien. Diese nicht-wasserspaltende Einheit besteht aus zwei Untereinheiten (Abb. 1. /2/), einem peripheren Antennenkomplex (LH2: light harvesting complex 2) und dem primären Antennenkomplex (LH1), in dessen Mitte das Reaktionszentrum untergebracht ist /2/. Die Anzahl dieser beiden Komplexe variiert je nach den Lichtbedingungen, im Mittel gibt es ca. acht bis zehn LH2 pro LH1, so daß das absorbierte Anregungslicht unter Umständen über einige LH2-Komplexe zum primären Antennenkomplex transportiert werden muß. Da alle Komplexe in einer Membran untergebracht und damit relativ beweglich sind, erfordert ein effizienter Energieübertrag eine spezielle Konstruktion der einzelnen Antennenkomplexe. Die LH1- und 2-Komplexe nutzen dabei auf elegante Weise physikalische, das heißt quantenmechanische Prinzipien, um eine Energietransfereffizienz von nahezu 100 Prozent zum LH1- und Reaktionszentrum zu erreichen. Dies soll im folgenden erläutert werden.

Abbildung 2 zeigt die Struktur von LH2 /4/. Die in grün dargestellten Chlorophylle sind für die Absorption von Licht verantwortlich. Die Proteine dienen lediglich dazu, die Chlorophyllmoleküle zu fixieren und in ihrer gegenseitigen Anordnung zu halten. Wie im weiteren gezeigt wird, ist es nämlich die Wechselwirkung der einzelnen Chlorophyllmoleküle untereinander, die die speziellen Eigenschaften des LH2- und LH1-Komplexes hervorruft. Zunächst zeigt ein Blick auf die Struktur des LH2, daß alle Chlorophylle in Form von zwei Ringen angeordnet sind (Abb. 2). Der untere Ring umfaßt neun Chlorophyllmoleküle, während der obere Ring 18 Chlorophyllmoleküle enthält. Die Chlorophyllmoleküle im unteren Ring absorbieren Licht einer Wellenlänge um 800 Nanometer (nm), während im oberen Ring die Absorption bei 850 nm er-

folgt. Sobald ein Photon von einem der Chlorophylle im unteren Ring absorbiert wird, findet ein rascher Energietransfer zu den Chlorophyllen im oberen Ring statt. Die Zeitskala, auf der dies geschieht, beträgt etwa 10^{-11} s. Der gravierende Unterschied zwischen den beiden Ringen liegt nun an der verschiedenen Zahl von Chlorophyllmolekülen pro Ring. Da im oberen Ring doppelt so viele Moleküle unterge-

bracht sind wie im unteren, rücken die einzelnen Chlorophylle näher aneinander. Dadurch treten sie stärker miteinander in Wechselwirkung, als dies im unteren Ring der Fall ist. Betrachtet man die photo-physikalischen Eigenschaften des Rings, so muß man diese Wechselwirkung der Moleküle in Betracht ziehen. (s. Informationskasten „Vom Molekül zum Aggregat“).

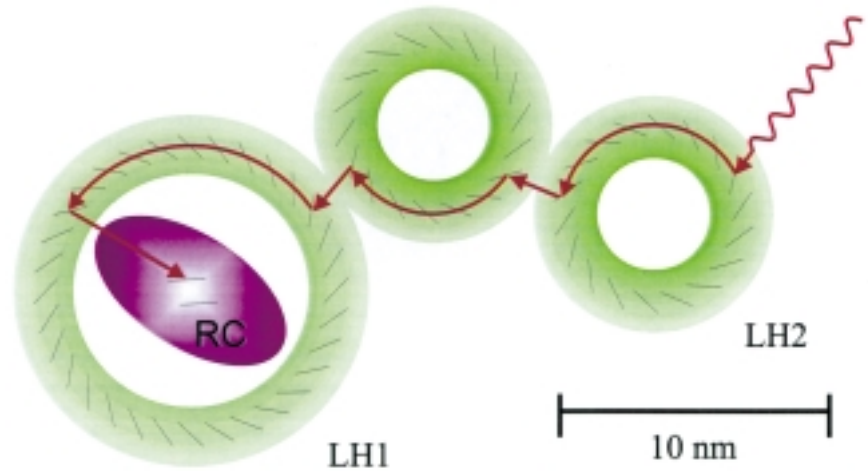


Abb. 1: Schematische Darstellung des Photosyntheseapparats von Purpurbakterien. LH2: light harvesting complex 2; RC: reaction center. Die roten Pfeile symbolisieren den gedachten Fluß von Anregungsenergie, beginnend bei der Absorption von Photonen, über den (exzitonischen) Transport innerhalb der Antennenkomplexe bis hin zum RC. Gezeigt ist eine Aufsicht auf die Antennenkomplexe in der Membran.

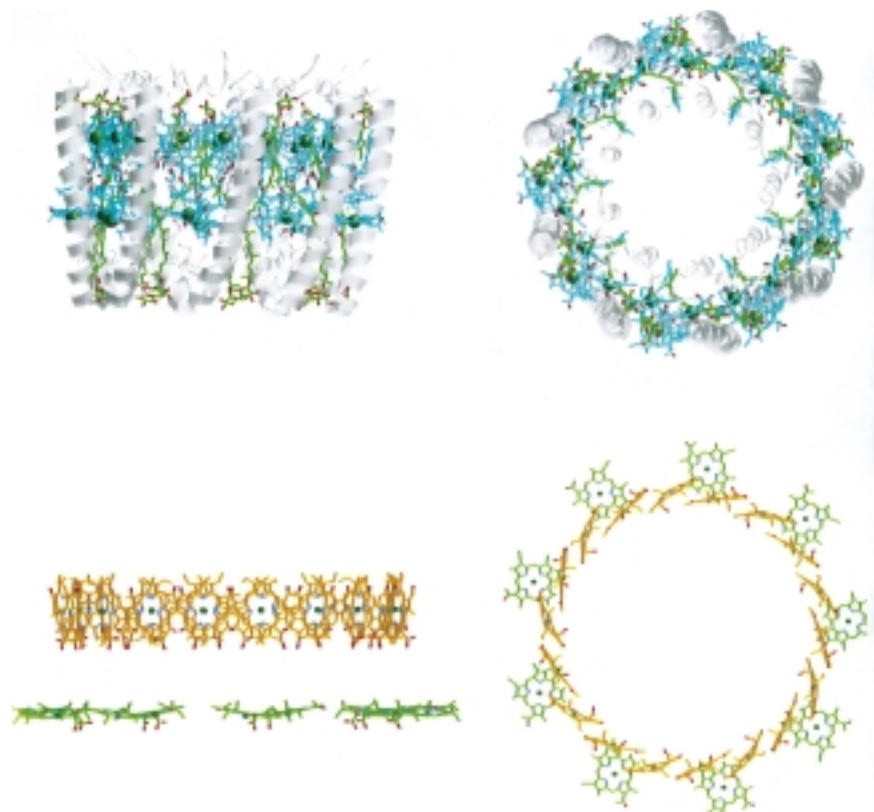


Abb. 2: Die Struktur von LH2 (Rhodospseudomonas Acidophila). Der obere Teil zeigt die Gesamtstruktur des Komplexes einschließlich Proteinen, Karotenoiden und Chlorophyllen. Der untere Teil zeigt lediglich die beiden Chlorophyllringe.

Abbildung 3 veranschaulicht, wie sich die Absorptions- und Energieeigenschaften des Rings gegenüber denen der einzelnen Moleküle ändern. Die Absorptionswellenlänge entspricht in dieser vereinfachten Darstellung der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem niedrigsten angeregten Zustand. Die bereits diskutierte Wechselwirkung der Chlorophyllmoleküle führt dazu, daß man von der Betrachtung der einzelnen Moleküle im Ring zu einer Betrachtung eines ringförmigen „Supermoleküls“ übergehen muß. Entscheidend ist, daß – wie in Abbildung 3 dargestellt – die einzelnen Energieniveaus im linken und im rechten Teil der Abbildung unterschiedlich sind und damit das Absorptionsspektrum dieses Rings gegenüber den einzelnen Molekülen modifiziert ist. Statt 18 isoenergetischer optisch erster angeregter Zustände spricht man hier von einem Energieband. Für einen Ring mit 18 Molekülen und einer neunfachen Symmetrieachse senkrecht zur Ringebene ergibt sich genau ein niedrigster angeregter Zustand, acht Paare zweifach entarteter angeregter Zustände und ein höchster (1.) angeregter Zustand. Man findet hier also ein Band von Zuständen, wie es für Molekülaggregate typisch ist, und das bereits den Weg vom isolierten Molekül zum Festkörper vorzeichnet. Entsprechend der geänderten Energieniveaustruktur ändert sich auch das optische beziehungsweise das Absorptionsverhalten des Rings. Um dieses Verhalten modellhaft zu beschreiben, muß man die einzelnen Oszillatorstärken für optische Übergänge von den Energieniveaus im Band erster angeregter Zustände zum Grundzustand berechnen. Nur solche Übergänge sind optisch aktiv und führen damit zur Absorption von Photonen aus dem Strahlungsfeld der Sonne oder eines optischen Spektrometers, dessen elektrisches Übergangsdipolmoment ungleich Null ist. Dieses Übergangsdipolmoment des Gesamtrings verschwindet nur dann nicht, wenn die Beiträge der einzelnen Moleküle phasenrichtig addiert werden und damit zu konstruktiver Interferenz führen.

Neben der Exzitonenzahl k spielt hierbei die Orientierung der Moleküle im Ring eine wichtige Rolle. Man findet ganz allgemein für ringförmige Aggregate, bei denen die Übergangsdipolmomente in der Ringebene liegen, daß nur die beiden Exzitonenzustände $k = \pm 1$ ein nicht verschwindendes Übergangsmoment haben. Mit der Annahme

„Vom Molekül zum Aggregat“

Alle Funktionseinheiten im Photosyntheseapparat, die für das Einsammeln von Licht und den Transport von Anregungsenergie verantwortlich sind, nutzen die kontrollierte Wechselwirkung von Molekülen in Molekülaggregaten aus. Das einfachste Molekülaggregat ist eines aus identischen Molekülen. Abbildung 3 zeigt eine Situation, in der das Molekül α angeregt ist (die Kugel ist bei $E = E_0$). Dieser Zustand ist durch nichts von einem Zustand zu unterscheiden, bei dem das Molekül 1, 2, oder sonst eines der 18 anderen Moleküle angeregt ist. Die Eigenzustände des Aggregats entsprechen daher Linearkombinationen dieser Zustände. Das System wird mit einem Hamiltonoperator der Form

$$H = \sum_{i=1}^N E_0 |n\rangle\langle n| + \sum_{n \neq m} W_{nm} |n\rangle\langle m|$$

beschrieben. W_{nm} bezeichnet die Wechselwirkung zwischen nächsten Nachbarn. Die Eigenzustände lauten

$$|k\rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{n=1}^N e^{2\pi i k \frac{n}{N}} |n\rangle,$$

wobei $k = 0, \dots, N-1$. Wie die Bloch-Zustände in der Festkörperphysik werden diese neuen Zustände mit einer Quantenzahl k beschrieben. Die Energien der k -Zustände lassen sich durch $E(k) = E_0 + 2W \cos k \frac{2\pi}{N}$ berechnen.

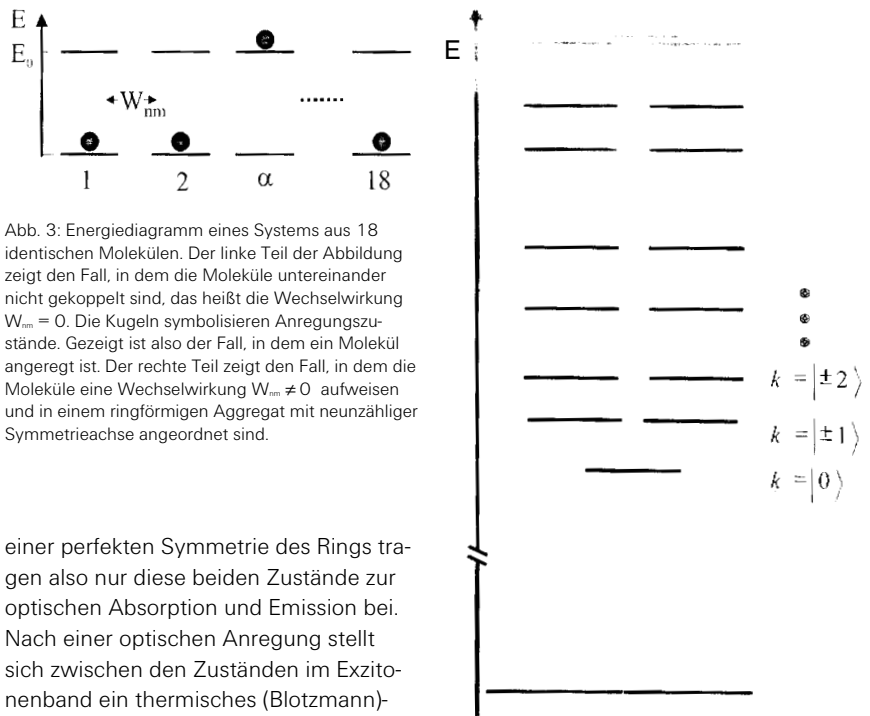


Abb. 3: Energiediagramm eines Systems aus 18 identischen Molekülen. Der linke Teil der Abbildung zeigt den Fall, in dem die Moleküle untereinander nicht gekoppelt sind, das heißt die Wechselwirkung $W_{nm} = 0$. Die Kugeln symbolisieren Anregungszustände. Gezeigt ist also der Fall, in dem ein Molekül angeregt ist. Der rechte Teil zeigt den Fall, in dem die Moleküle eine Wechselwirkung $W_{nm} \neq 0$ aufweisen und in einem ringförmigen Aggregat mit neunzähliger Symmetrieachse angeordnet sind.

einer perfekten Symmetrie des Rings tragen also nur diese beiden Zustände zur optischen Absorption und Emission bei. Nach einer optischen Anregung stellt sich zwischen den Zuständen im Exzitonenzustand ein thermisches (Boltzmann)-Gleichgewicht ein. Dies bedeutet, daß die relative Bevölkerungszahl zweier Niveaus mit einem Energiezustand ΔE entsprechend $e^{-\Delta E/kT}$ berechnet werden kann. Für die drei untersten Zustände im Exzitonenzustand heißt dies bei einem ΔE von ca. 300 cm^{-1} , daß die beiden fluoreszierenden $k = \pm 1$ -Zustände lediglich mit einer Wahrscheinlichkeit von 30 Prozent bevölkert werden. Entsprechend unwahr-

Diffusion von einzelnen Molekülen in Zellen

Biologische Systeme, beispielsweise Zellen oder auch Teile von Zellen, zeichnen sich durch eine bestimmte vom Ort abhängige Viskosität aus. Unter physiologischen Bedingungen finden ständig Transportvorgänge statt, deren Kenntnis Voraussetzung für ein Verständnis vieler Funktionen ist. Da sowohl die Viskosität als auch die Art des Transportvorgangs vom Ort abhängen, besteht die einzige Möglichkeit, detailliert Auskunft über Transport- oder Diffusionsvorgänge zu erhalten darin, daß man die Viskosität mi-

kroskopisch bestimmt. Idealerweise würde man versuchen, einzelne Zielmoleküle auf ihrem Weg beispielsweise durch die Zelle oder in der Zellmembran zu verfolgen. Dazu muß es zunächst gelingen, dieses Molekül gegenüber allen anderen kenntlich zu machen. In der Regel geschieht dies durch Anbringen eines Farbstoffmarkers, dessen Fluoreszenz nach optischer Anregung nachgewiesen werden kann. Schränkt man das zu beobachtende Volumen ein, so daß sich bei vorgegebener Verdünnung des Zielmoleküls im Mittel kein fluoreszierendes Molekül mehr im Beobachtungsvolumen befindet, so erwartet man keine Fluoreszenz. Erst

scheinlich ist es, daß nach der Absorption eines Photons dieses sofort wieder emittiert wird. Die ringförmige Struktur des Molekülaggregats führt also dazu, daß der Ring praktisch als „Anregungsenergiespeicher“ funktioniert und damit die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung der Anregungsenergie auf einen benachbarten Ring entsprechend zunimmt /5/. Daß die oben dargestellte sehr einfache Berechnung des Exzitonenbandes in der Tat die Verhältnisse sehr gut beschreibt, soll hier kurz anhand des LH1-Rings, für den eine analoge Betrachtung gilt, erläutert werden.

Abbildung 4 zeigt ein Fluoreszenzanregungsspektrum eines einzelnen LH1-Rings. Es läßt sich genau *eine* Anregungslinie bestimmen, die auch polarisationsabhängig ist – genau wie vom Modell vorhergesagt. Wären die Moleküle im Ring ungekoppelt oder nur schwach gekoppelt, so würde man eine Anzahl von Spektrallinien erwarten, die mit der Anzahl der Moleküle korreliert. Dies ist nur der Fall, wenn der LH1-Ring im Lauf der Präparation teilweise beschädigt wird, wie dies in Abbildung 4b zu sehen ist /6/. Mittels spektral hoch aufgelöster Messungen an einzelnen Molekülen lassen sich also Details des Energietransfermechanismus in den Antennenkomplexen aufklären. Zwei wichtige Voraussetzungen für diese Untersuchung sind hier zu erwähnen. Zum einen hat es sich in der jüngsten Vergangenheit herausgestellt, daß die spektral hoch aufgelöste optische Spektroskopie an einzelnen Pigment-Protein-Komplexen besonders leistungsfähig ist, weil hier jede Art von Inhomogenität fehlt, die normalerweise zu breiten, unstrukturierten Spektrallinien führt /7/. Und zum anderen sind Experimente auf diesem Gebiet gerade dann besonders erfolgreich, wenn vor Ort Gruppen tätig sind, die in der Biologie präparativ an den entsprechenden Systemen arbeiten. In Stuttgart ist dies die Abteilung Bioenergetik, die uns die LH1-Proben zur Verfügung gestellt hat.

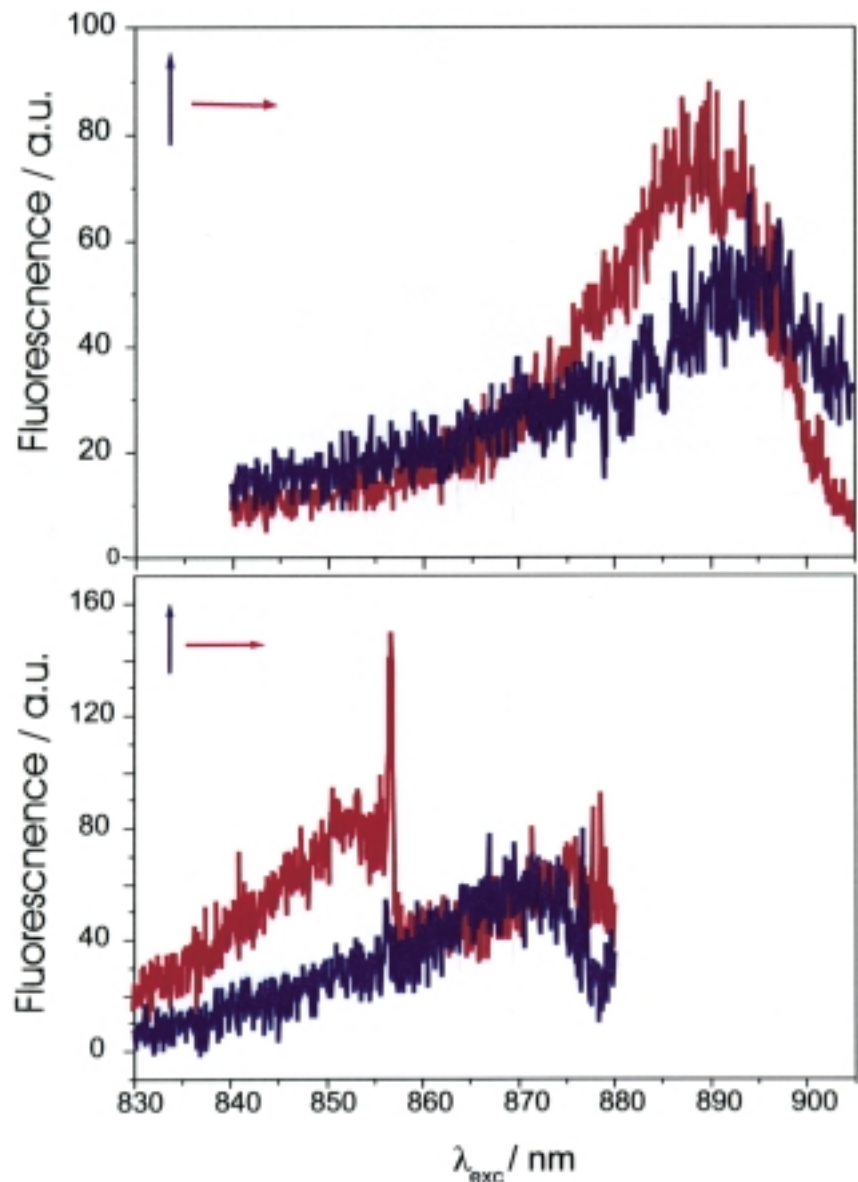


Abb. 4: Fluoreszenzanregungsspektren von LH1. Der obere Teil der Abbildung zeigt das Spektrum eines intakten Rings für zwei unterschiedliche Polarisationen des Anregungslichtes. Die leichte Verschiebung der beiden Anregungslinien deutet auf eine Aufhebung der exakten Entartung der beiden $k = \pm 1$ -Zustände hin, wie dies im Modell angenommen wird. Der untere Teil der Abbildung zeigt das Spektrum eines Rings, der im Verlauf der Probenpräparation zerstört wurde, so daß die Kopplung W_{nm} zwischen einigen Molekülen sehr gering wird. Dies führt zu der Beobachtung von schmalen Spektrallinien.

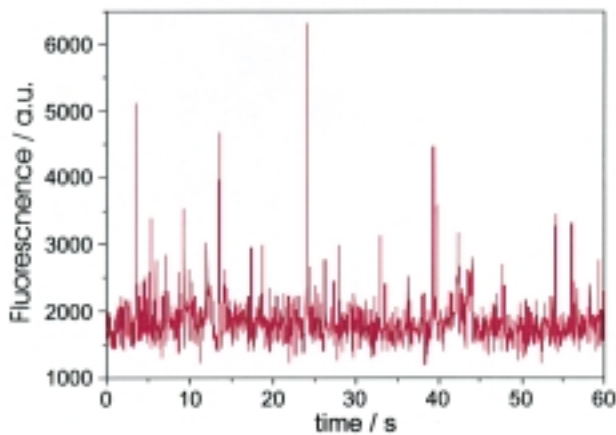


Abb. 5: Oberer Teil: Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit. Der Anregungslaser wurde in eine Membran fokussiert, in der sich mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Lipide befinden. Unterer Teil: Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität.

wenn zufällig ein Zellmolekül durch das Beobachtungsvolumen transportiert wird beziehungsweise diffundiert, registriert man ein Fluoreszenzsignal. Dessen Dauer erlaubt es dann, bei Kenntnis der Abmessung des Probenvolumens, die Transportgeschwindigkeit oder die Diffusionskonstante zu bestimmen [8].

Abbildung 5 zeigt ein Diagramm, bei dem die Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit dargestellt ist. Man erkennt einzelne Intensitätsspitzen, die anzeigen, daß ein Farbstoffmolekül durch das Beobachtungsvolumen diffundiert. Die zeitliche Breite Δt dieser Intensitätsspitzen gibt die Transitzeit an. Die Abmessung des Beobachtungsvolumens wird in diesem Beispiel durch die Strahltaile des Anregungslasers gegeben, der in die Lösung, in der sich die Fluoreszenzmoleküle befinden, fokussiert wird. Üblicherweise analysiert man die durchschnittliche Breite der Intensitätsspitzen, indem man den mittleren Abstand zwischen zwei Photonen in Form eines Histogramms bestimmt. Die sich er-

gebende normierte und gemittelte bedingte Wahrscheinlichkeit

$$g^2(\tau) = \frac{\langle \rho(\tau) \cdot \rho(\tau + t) \rangle}{\langle \rho(\tau) \rangle^2}$$

bezeichnet man als Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität. Die Zerfallszeit dieser Kurve ist ein Maß für die Diffusionskonstante. Allgemein wird diese Methode mit FCS (fluorescence correlation spectroscopy) bezeichnet. FCS läßt sich unmittelbar mit der Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie verbinden und kann somit auch in Zellen durchgeführt werden. Prinzipiell erlaubt es diese Methode, die mikroskopische Heterogenität der Viskosität der Zelle zu erfassen. Allerdings müssen hier zwei Einschränkungen genannt werden. Zellen sind heterogene Systeme mit einer komplizierten mikroviskosen Struktur, die autofluoreszierende Bestandteile enthält. Beispielsweise stellen Zellmembranen eine zweidimensionale Flüssigkeit dar, während das Zytoplasma, läßt man einmal weitere Zellbestandteile unberücksichtigt, eine dreidimensio-

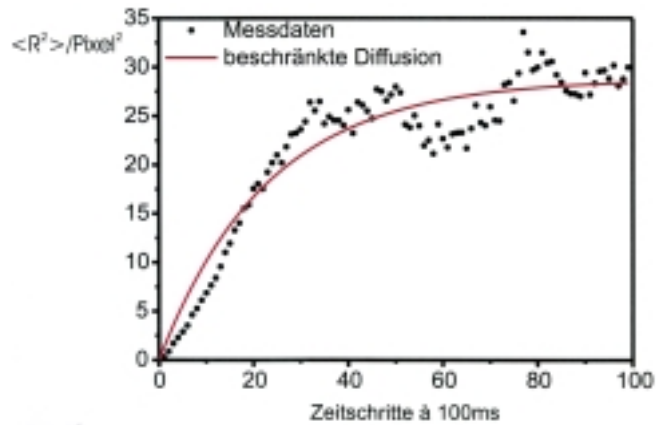


Abb. 6: Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats gegen die Zeit. Bis zu einer Zeit $t = 4\text{s}$ zeigt die Grafik einen linearen Verlauf mit einer Diffusionskonstante $D = 9 \cdot 10^{-10} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$. Danach setzt ein Bereich ein, in dem sich die Diffusionskonstante ändert.

nale Flüssigkeit ist. Entsprechend sollten sich die Diffusionseigenschaften mittels der Stokes-Einstein-Beziehung als $\langle r^2 \rangle = 6Dt$ für den dreidimensionalen Fall verhalten. $\langle r^2 \rangle$ ist das mittlere Verschiebungsquadrat, D die Diffusionskonstante und t die Zeit. Tatsächlich stellt es sich aber heraus, daß das in Zellen anzutreffende Diffusionsverhalten in der Regel nicht einer freien Diffusion entspricht, sondern vielmehr im Langzeitverhalten mit einer gehinderten subnormalen Diffusion beschrieben werden muß. Konkret bedeutet dies, daß das beobachtete Molekül nur einen beschränkten Raumbereich um sich hat, in dem es ungehindert diffundieren kann. Jenseits dieses Bereiches bestehen Diffusionsschranken. Trägt man das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle r^2 \rangle$ gegen die Zeit t auf, so läßt sich die Größe des „freien“ Raumbereichs ermitteln (Abb. 6).

Darüber hinaus erlaubt es die Technik, molekulare Assoziation beziehungsweise Dissoziation zu verfolgen. Nach einer einfachen hydrodynamischen Beziehung hängt die Diffusionskonstante mit dem hydrodynamischen Radius über $D = \frac{k_B T}{12\pi\eta r}$ zusammen. Dabei ist η die Viskosität, r der hydrodynamische Radius. Bei der molekularen Assoziation beziehungsweise

Dissoziation ändert sich der hydrodynamische Radius, was zu einer entsprechenden Änderung in D führt. Ein Beispiel für eine Veränderung von D aufgrund unterschiedlicher hydrodynamischer Radien ist in Abbildung 7 dargestellt. Untersucht wurden hier HeLa-Zellen. In Zelle 1 befindet sich grün fluoreszierendes Protein (GFP), in Zelle 2 ist dieses GFP mit einem weiteren Protein TRAF2 (TRAF: Tumor Necrosis Receptor Associated Factor) verbunden. Deutlich ist die verlangsamte Diffusion und die dadurch geringere Diffusionskonstante zu erkennen. TRAF 2 ist eine Komponente in der Signalkette des durch den Tumornekrosefaktor (TNF) induzierten Zelltodes. Im Verlauf der Apoptose bildet TRAF 2 mit dem TNF-Rezeptor 2 auf der zytoplasmischen Seite des Rezeptors dann einen Signalkomplex, wenn zuvor der Rezeptor durch Bindung von TNF zu einem Trimer zusammengefaßt worden ist. Die Bindung von TRAF 2 an den TNF-Rezeptor führt in der Folge zur Rekrutierung weiterer Komponenten und damit zum programmierten Zelltod. Eine attraktive Möglichkeit der FCS-Messungen an lebenden Zellen besteht nun darin, die Assoziation von TRAF 2 anhand der Veränderung der Diffusionskonstante zu verfolgen. Das zuvor erwähnte Problem der zellulären Autofluoreszenz besteht darin, daß nicht nur die mit Fluoreszenzmarkern versehenen Komponenten zur Fluoreszenz beitragen, sondern auch andere Bestandteile. Teilweise läßt sich diese Autofluoreszenz dadurch vermindern, daß man nicht-lineare optische (Zwei-Photonen-) Mikroskopie einsetzt [9]. Diese Arbeiten werden derzeit im Rahmen des SFB 495 „Topologie und Dynamik von Signalprozessen“ in enger Kooperation mit dem Institut für Zellbiologie und Immunologie durchgeführt.

Molekulare Motoren

Kontraktile Zellen enthalten Proteine, die durch die Hydrolyse von ATP Arbeit verrichten. Diese sogenannten Motorproteine werden seit ca. 50 Jahren intensiv untersucht. Die Kenntnis der Struktur der Motorproteine (im Fall von kontraktile Zellen handelt es sich um Myosin, das an

Actin bindet) in verschiedenen Bewegungsstadien sowie biophysikalischer Messungen zur Funktion, zu den Leistungsparametern und zur chemomechanischen Kopplung der Motorproteine haben ein detailreiches Bild von der Funktionsweise einiger Motorproteine wie Myosin 1 und 2 sowie Kinesin entstehen lassen. Besonders hilfreich waren dabei zwei Entwicklungen: Einerseits ist es gelungen, die Motorproteine aus ihrem Proteinaggregat und der Zelle zu isolieren und die gereinigten Proteine dann funktionsfähig auf Oberflächen zu immobilisieren. In diesen Mobility Assays vermögen die Motorproteine dann wieder, an ihre natürlichen Bindungspartner (zum Beispiel Kinesin an die Mikrotubuli) zu binden, und sie treten unter ATP-Zugabe in Funktion. Die Oberfläche, an der beispielsweise das Kinesin gebunden wird, kann die einer Kugel sein, während der Mikrotubulus auf einer Glas- oder Glimmeroberfläche immobilisiert wird. Die Kugel, mit der das Motorprotein verbunden wird, kann einige 100 nm groß sein und ist somit in einem optischen Mikroskop gut sichtbar. Es läßt sich also die Bewegung von Motorproteinen (Abmessung von Kinesin etwa zehn nm) in einem optischen Mikroskop anhand seiner Marker-kugel leicht verfolgen.

Die zweite Entwicklung macht es möglich, mittels der Kugel die Kraft, die der Motor entwickeln kann, zu bestimmen. Dazu wird die Kugel in einem optischen Gradientenfeld gefangen. Auf eine Kugel

mit einem Brechungsindex, der größer als der des umgebenden Mediums ist, lassen sich unter geeigneter Wahl der Strahlparameter (Leistung und Divergenz) Kräfte ausüben, die dazu führen, daß die Kugel in den Fokus des Laserstrahls gezogen wird. In harmonischer Näherung wird diese optische Falle mit einer von der Laserleistung abhängigen Federkonstante charakterisiert. Typische Federkonstanten betragen $4 \cdot 10^{-3} \frac{\text{N}}{\text{m} \cdot \text{mW}}$. Bei einer Laserleistung von ca. 100 Milliwatt (mW) führt eine Kraft von zehn Piconewton (pN) zu einer Auslenkung der Kugel von 1 Å (Angström). Dies läßt sich bequem nachweisen, indem man die Position der Kugel durch die Reflexion auf einem Quadrantendetektor nachweist. Für Kinesin auf Mikrotubuli ergeben sich so schrittweise Auslenkungen mit einer Schrittweite von ca. acht nm / 10/(Abb. 8). Der Motor entwickelt dabei eine Kraft von ca. fünf pN, wobei man gegenwärtig davon ausgeht, daß pro Schritt genau ein ATP-Molekül hydrolysiert wird. Dies ergibt eine Effizienz von ca. 20 Prozent.

Eine andere Proteinmaschine, die keine kontraktile Funktionen hat oder Transportaufgaben übernimmt, aber dennoch periodisch arbeitende bewegliche Teile aufweist, ist die ATP-Synthase. Die ATP-Synthase ist eine Rotationsmaschine, deren Funktion darin besteht, einen Protonengradienten über einer Zellmembran, der zum Beispiel im Verlauf der Photosynthese aufgebaut wird, dazu zu nutzen, ATP zu synthetisieren. Die ATP-

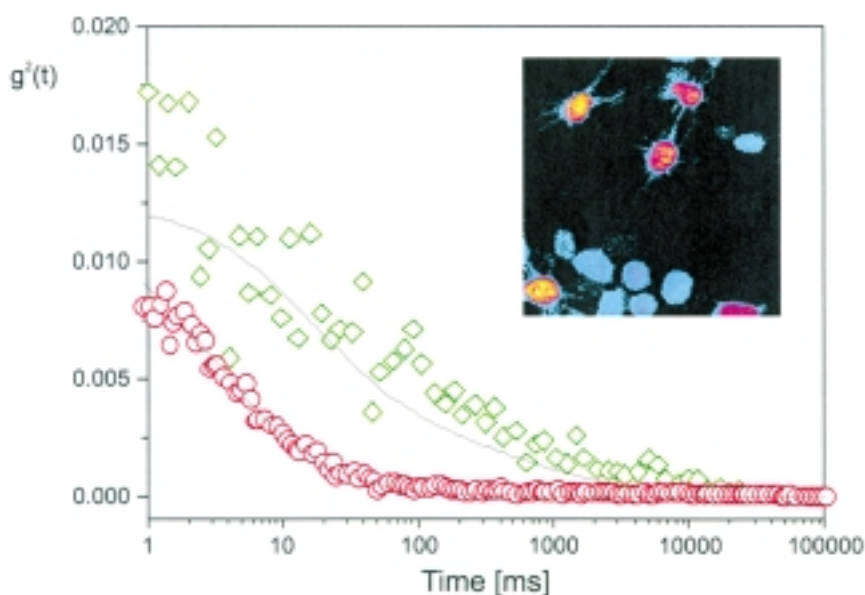


Abb. 7: FCS-Messungen in lebenden Zellen. Die Grafik zeigt zwei Autokorrelationskurven. Kurve a wurde in Zellen gemessen (HeLa), die das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren, während b eine Messung an dem Molekül GFP-TRAF2 darstellt.

Schrittweite/Angström

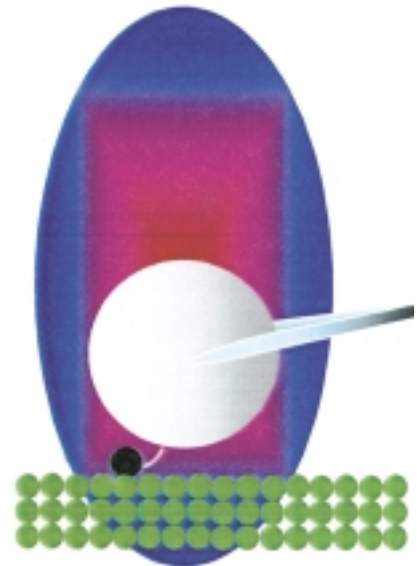
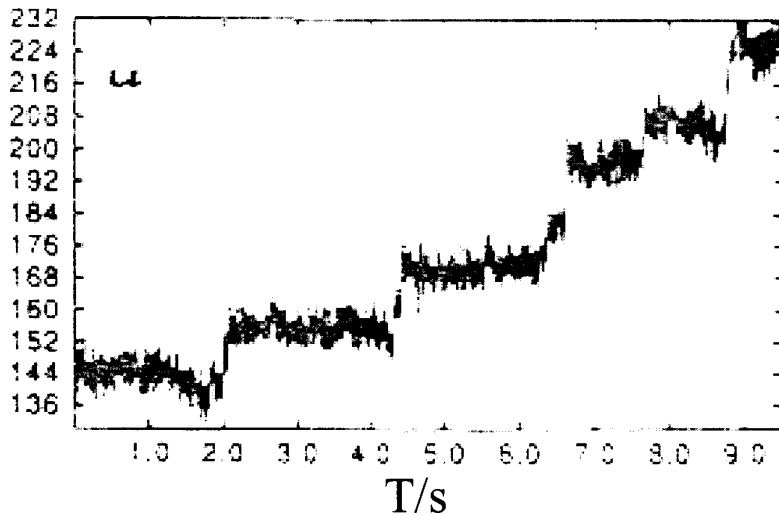


Abb. 8: Der linke Teil der Abbildung zeigt schematisch den experimentellen Aufbau zur Bestimmung der Schrittweite und die Kraft einzelner Kinesin-Motorproteine. Der rechte Teil zeigt die Auslenkung der Kugel als Funktion der Zeit /10/.

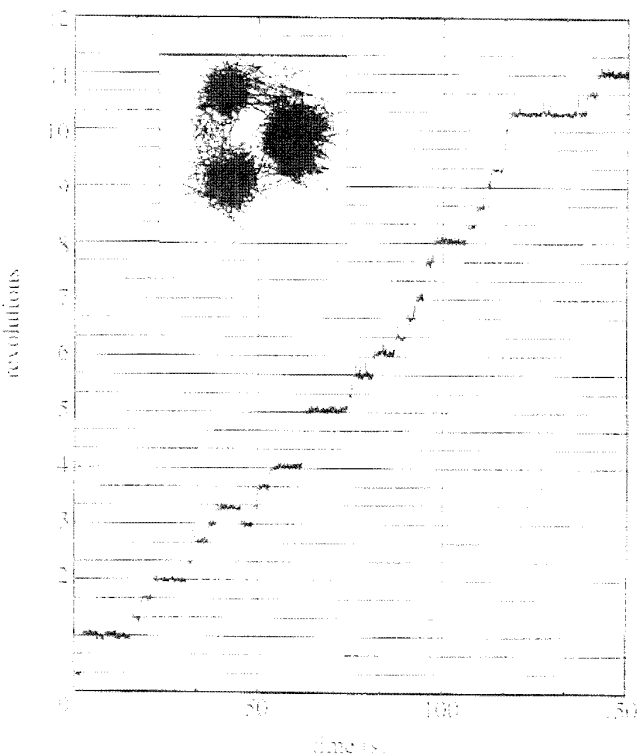
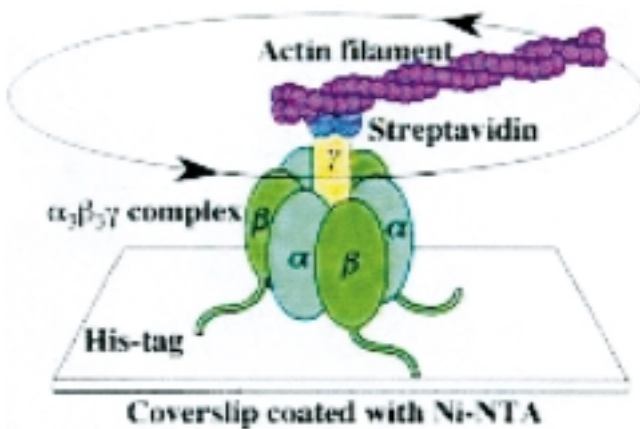


Abb. 9: Mittels Untersuchungen an einzelnen ATP-Synthasen läßt sich zeigen, daß das Protein tatsächlich eine Rotationsmaschine ist. Der rechte Teil zeigt schematisch die experimentelle Realisierung, während der linke Teil der Abbildung das experimentelle Resultat zeigt. Dargestellt ist einerseits die Häufigkeit der Zeigerendpositionen an einer Polarwinkel-darstellung, andererseits die Einzelschritte der Zeigerdrehung als Funktion der Zeit /11, 12/.

Synthese besteht aus zwei Untereinheiten. Der FO-Teil befindet sich unter physiologischen Bedingungen in der Zellmembran. Durch diesen Teil fließen die Protonen und bewirken, daß eine Proteineinheit, die diesen Teil mit der zweiten Untereinheit, dem F1-Teil, verbindet, in Drehbewegung versetzt wird. Diese Drehbewegung führt wiederum zu Konformationsänderungen in F1 und bewirkt so die Synthese von ATP aus ADP und Phosphatgruppen. Lange Zeit war diese Rotation zunächst eine Hypothese. Zwar konnten verschiedene Konformationen des F1-Teils mittels Röntgenstrukturuntersuchungen sichtbar gemacht werden, allerdings wurden der direkte Beweis der Rotation erst durch Kinosita et al. /11/ bei der Untersuchung des F1-Teils der ATP-Synthase erbracht. Der Prozeß der

ATP-Synthese durch F1 ist reversibel. Führt man ATP zu, so beginnt sich die γ -Untereinheit (Abb. 9) in Rückwärtsrichtung zu drehen. Die Drehbewegung läßt sich sichtbar machen, indem F1 über Histidinanker auf einer Oberfläche immobilisiert wird. Die γ -Untereinheit wird mit einem Actinfilament versehen, das wie der Zeiger einer Uhr die Stellung und damit die Drehbewegung anzeigt. Das Actinfilament kann so lang sein, daß seine Orientierung direkt in einem optischen Mikroskop nachgewiesen werden kann. Abbildung 9 zeigt ein entsprechendes Histogramm der Endposition des Actin-

zeigers. Wie deutlich zu sehen ist, nimmt der Zeiger drei Positionen mit einem Zwischenwinkel von 120 Grad ein /12/, wie dies auch durch die dreizählige Symmetrie des F1-Teils nahegelegt wird. Auch hier läßt sich die Effizienz des Motors aus dem bekannten Drehwinkel und aus der aus anderen Experimenten abgeleiteten Schlußfolgerung, daß genau drei ATP-Moleküle pro 360°-Drehung hydrolysiert werden, ableiten. Im Fall der F1-ATP-Synthase beträgt sie nahezu 100 Prozent.

„Der Connexinzyklus“

Connexine sind Transmembranproteine, die in allen höheren Zellen vorkommen und, wie der Name schon vermuten läßt, diese untereinander vernetzen. Dabei steht nicht die strukturelle Vernetzung im Vordergrund, sondern der Austausch von Informationen zwischen den Zellen in Form von kleinen Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von einem Kilodalton (kDa), die als Informationsträger dienen. Ein in dieser Weise verbundenes Zellkollektiv vermag beispielsweise einen konstanten pH Wert zu realisieren oder gemeinsam auf eine Hormonnachricht zu reagieren. Um diese Funktion erfüllen zu können, bilden sechs Connexinproteine in der Membran ein ringförmiges Hexamer und formen so ein Connexon (oder Halbkanal), das nun an der Oberfläche einer benachbarten Zelle ein Pendant finden muß, um sich mit diesem zu einem kompletten interzellulären Kanal zu vereinigen. Diese Kanäle aggregieren leicht, so daß es zur Bildung von makroskopisch beobachtbaren Gap-Junctions kommt (Abb. 11).

Nun ist der Lebenszyklus dieses Proteins bis auf den Aufenthalt in der Gap-Junction unbekannt. Ein Arbeitsmodell von Falk et al. zeigt Abbildung 12: Das Protein wird im Endoplasmatischen Reticulum gebildet und wandert von dort im sekretorischen Pfad über den Golgi Apparat in die Zellmembran. Auf dem Weg formt sich dabei irgendwo der Halbkanal. Dieser kommt nun zur Gap-Junction und vergrößert diese durch Bindung an einen Partner in der Nachbarzelle, wobei es zwei mögliche Wege gibt, entweder eine direkte Ankopplung des Transportvesikels an das bestehende Aggregat oder die Fusion des Vesikels mit der Zellmembran an einer beliebigen Stelle mit nachfolgender Diffusion der Halbkanäle zu ihrem Einsatzort. Nicht minder interessant ist der zweite „Lebensabschnitt“ des Proteins. Nach einiger Zeit als interzelluläre Brücke kommt es zu Fehlern in der Funktion des Kanals. Er könnte beispielsweise irreversibel an ein großes Molekül binden und so „verstopfen“, oder aber er ändert seine Konformation, initiiert durch Temperaturfluktuationen. In beiden Fällen ist er für die Zelle wertlos geworden und muß entsorgt werden. Möglicherweise wird er dazu aus dem Aggregat herausgezogen und in ein Vesikel verbracht, in dem er dann zu den Proteinabbaustellen der Zelle dem Lysosom oder Proteasom transportiert und dort anschließend in seine Aminosäurebestandteile zerlegt wird.

Die Connexinzyklushypothese mit Indizien zu bestätigen oder zu widerlegen ist das Ziel der Zusammenarbeit des Biologischen Instituts, Abteilung Bioenergetik, mit dem 3. Physikalischen Institut. Dazu benutzen wir eine spezielle Form der Fluoreszenzmikroskopie zur Beobachtung einzelner diffundierender Connexone in der Zellmembran, die Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy). Den schematischen Aufbau eines solchen Mikroskopes zeigt Abbildung 13: Ein Anregungslaserstrahl wird auf die Unterseite der Grundfläche eines Zylinderprismas fokussiert und bei einem Einfallswinkel (zum Lot), der größer als der Grenzwinkel der Totalreflexionswinkel $\theta_{\text{tot}} = \arcsin(n_1/n_2)$, mit den Brechungsindizes n_1 für Wasser und n_2 für das Prismenmaterial, reflektiert. Oberhalb des Prismas bildet sich ein evaneszentes Lichtfeld, das nach oben exponentiell abfällt und somit nur einen sehr dünnen Schnitt der sich dort befindlichen Zellen beleuchtet (typisch 100nm). In diesem beleuchteten Bereich befindet sich die untere Zellmembran mit den Halbkanälen. Die Proteine fluoreszieren, wenn man sie mit UV-Licht beleuchtet, allerdings ist diese Fluoreszenz unspezifisch, da alle anderen Membranproteine ebenfalls autofluoreszieren. Daher versehen wir die Connexine mit einem Fluorophor, der die Fluoreszenzanregung in einen weitaus spezifischeren Teil des Spektrums verlegt. Eine solche Färbung benutzte schon Robert Koch vor über einhundert Jahren, um den Kontrast in seinen Präparaten zu erhöhen, in seinem Falle allerdings mit absorptiven Farbstoffen.

Die Markierungsmethoden in der Biologie beinhalten natürlich immer eine Störung des Systems, die so gering wie möglich ausfallen sollte. In unserem Falle der Messung von Diffusion in der Zellmembran sollte der Farbstoff klein sein und das Diffusionsmedium, die Membran der lebenden Zelle, nicht verändern. Die Wahl fiel auf das Grün Fluoreszierende Protein GFP, das die Zelle selbst bei der Produktion der Connexine an diese kovalent anbindet. Das vom GFP emittierte Licht sammelt ein Objektiv ein und erreicht, nach dem Herausfiltern von gestreutem Anregungslicht, die intensivierte CCD-Kamera, die dann die Bilder zur Weiterverarbeitung im Computer digitalisiert. Nach einer automatischen Punkterkennung und Verfolgung über mehrere Bilder errechnet der Computer Trajektorien (Abb. 14) oder trägt die Werte in anschaulicher Weise auf (Abb. 6 im Haupttext).

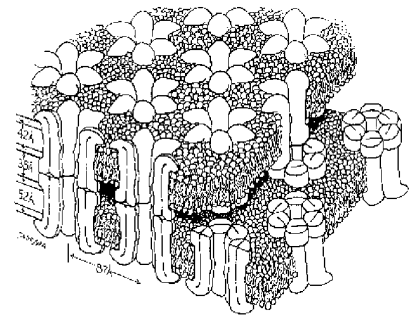


Abb. 11: Sechs Connexine in der Zellmembran bilden ein Connexon (Halbkanal), das sich mit einem Pendant aus der Nachbarzelle zu einem interzellulären Kanal verbindet.

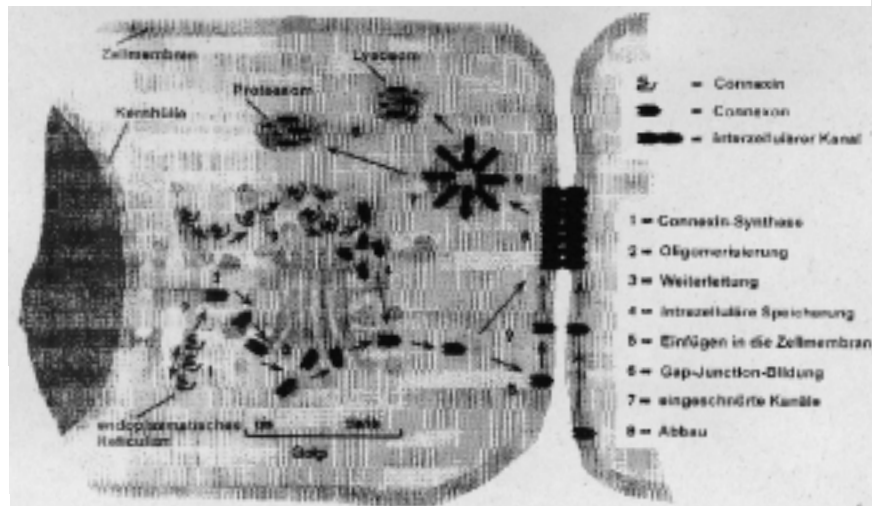


Abb. 12: Connexinzyklushypothese von Falk et al.

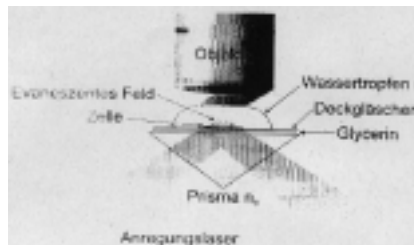


Abb. 13: Schematischer TIRFM Aufbau. Erläuterungen siehe Text.

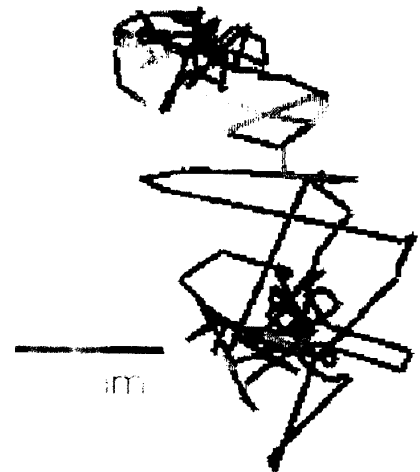


Abb. 14: Trajektorie eines Connexons in der Zellmembran. Farbcodiert ist hier die Zeit.

Biologische Physik und Nanotechnologie

Die vorangegangenen Beispiele haben schon gezeigt, wie eng die Beziehungen der Physik zur Nanotechnologie sind. So sind beispielsweise molekulare Motoren die kleinsten bekannten elektromechanischen Funktionseinheiten. Die Abmessungen liegen bei ca. zehn Nanometern. Die kleinsten derzeit herstellbaren Elektromotoren haben dagegen Abmessungen von ca. 100 nm. Das Studium von Proteinmotoren wird uns also möglicherweise verraten, welche Konstruktionsprinzipien Motoren im Nanometerbereich zugrunde liegen. Eines der großen technischen Probleme wird nämlich die Reibung sein, die bei der Funktion kleiner Maschinen aufgrund des ungünstigen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses von entscheidender Bedeutung sein wird. Anhand der F1-ATP-Synthase läßt sich zeigen, wie weit inzwischen die Integration von gewöhnlichen Mikrostrukturen und Bionanosystemen fortgeschritten ist. Mittlerweile gelingt es, mit Histidinankern versehene F1-ATP-Synthase auf mit Nickel versehene Siliziumposten zu immobilisieren und die γ -Untereinheit mit einem Siliziumstab zu versehen. Der so behandelte F1-Teil bleibt unter ansonsten physiologischen Bedingungen funktionsfähig, und die Rotation des Siliziumzeigers kann beobachtet werden. Nächste Schritte werden dahin gehen, daß der Protonenfluß durch den elektromechanischen Teil (FO) beeinflusst werden kann und somit die Funktion des Motors steuerbar ist. Molekulare Motoren sind nur *ein* Beispiel für Proteinmaschinen im Nanometer-Bereich, deren Untersuchung dem Gebiet der Nanotechnologie zugeordnet werden kann.

Andere Biomoleküle stellen gute Modellsysteme für eine bestimmte Molekülklasse dar, die sich zu nanotechnologischen Zwecken nutzen lassen. Ein gutes Beispiel ist DNA. DNA ist biochemisch außerordentlich gut zu kontrollieren und stellt gegenwärtig das Polymer mit dem am präzisesten einstellbaren Parametern wie beispielsweise Länge dar. Als polyelektrolytisches Polymer verfügt es über eine gewisse Leitfähigkeit, die zum Beispiel durch das Anbringen zwischen nanostrukturierte Goldkontakte bestimmt werden kann. Das Molekül kann darüber hinaus als Konstruktionsmaterial für weitere Strukturen genutzt werden und bilden so die Grundlage für ein eigenständi-

ges Arbeitsgebiet, die DNA-Nanotechnologie.

Auch die biochemische Analytik ist auf dem Weg in die Nanotechnologie. Screeningverfahren mit hohem Durchsatz verlangen nach einer ständigen Miniaturisierung von Probenvolumina. Führt die Entwicklung zu Volumina, die kleiner als ein μm^3 sind, so müssen einerseits kleine dreidimensionale Strukturen geschrieben werden, andererseits Flüssigkeiten von einigen Femtolitern kontrolliert werden können. Derzeit werden intensive Anstrengungen im Bereich der Grundlagenforschung gemacht, um das Verhalten solcher kleiner Flüssigkeitsvolumina auf Oberflächen zu untersuchen. Auch an dieser Stelle werden sich Physik und Biologie ergänzen.

Literatur

- /1/ E. Schrödinger, Was ist Leben?, Piper Verlag, München, 1999
- /2/ S. Karrasch, P.A. Bullough, R. Ghosh, EMBO Journal 14 (1995) 631
- /3/ W. Kühlbrandt, Nature 374 (1995) 497
- /4/ G. McDermott et al., Nature 374 (1995) 517
- /5/ X. Hu, K. Schulten, Physics Today, August 1997, S. 28
- /6/ U. Gerken, Manuskript in Vorbereitung
- /7/ s. z.B. J. Köhler, Physik. Bl. 56 (2000) 47
- /8/ Fluorescence Correlation Spectroscopy, Theory and Applications, R. Rigler, E. S. Elson (Eds.), Springer Verlag, Berlin 2001
- /9/ P. Schwille et al., Biophys. J. 77 (1999) 2251
- /10/ K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, S. M. Bloch, Nature 365 (1993) 721
- /11/ H. Noji, R. Yasuda, H. Yoshida, K. Kinosita, Nature 386 (1997) 299
- /12/ K. Kinosita, R. Yasuda, H. Noji, S. Ishiwata, M. Yoshida, Cell 93 (1998) 21



Prof. Dr. Jörg Wrachtrup

studierte bis 1991 an der Freien Universität Berlin Physik, wo er 1994 ebenfalls promovierte. Nach dem Wechsel an die Technische Universität Chemnitz erlangte er dort 1998 die Lehrbefugnis im Fach Experimentalphysik. Die Arbeiten in dieser Zeit wurden mit dem Ernst-Reuter-Preis der Freien Universität und dem Gustav-Hertz-Preis der Deutschen Physikalischen Gesellschaft ausgezeichnet. 1998 und 1999 erfolgten Rufe an die Universitäten Hamburg, Göttingen, Leipzig und Stuttgart. Seit 1. Januar 2000 leitet Jörg Wrachtrup das 3. Physikalische Institut der Universität Stuttgart. Zu seinen Forschungsschwerpunkten gehören die Biologische Physik, Spektroskopie organischer Materialien und die Quantenoptik.