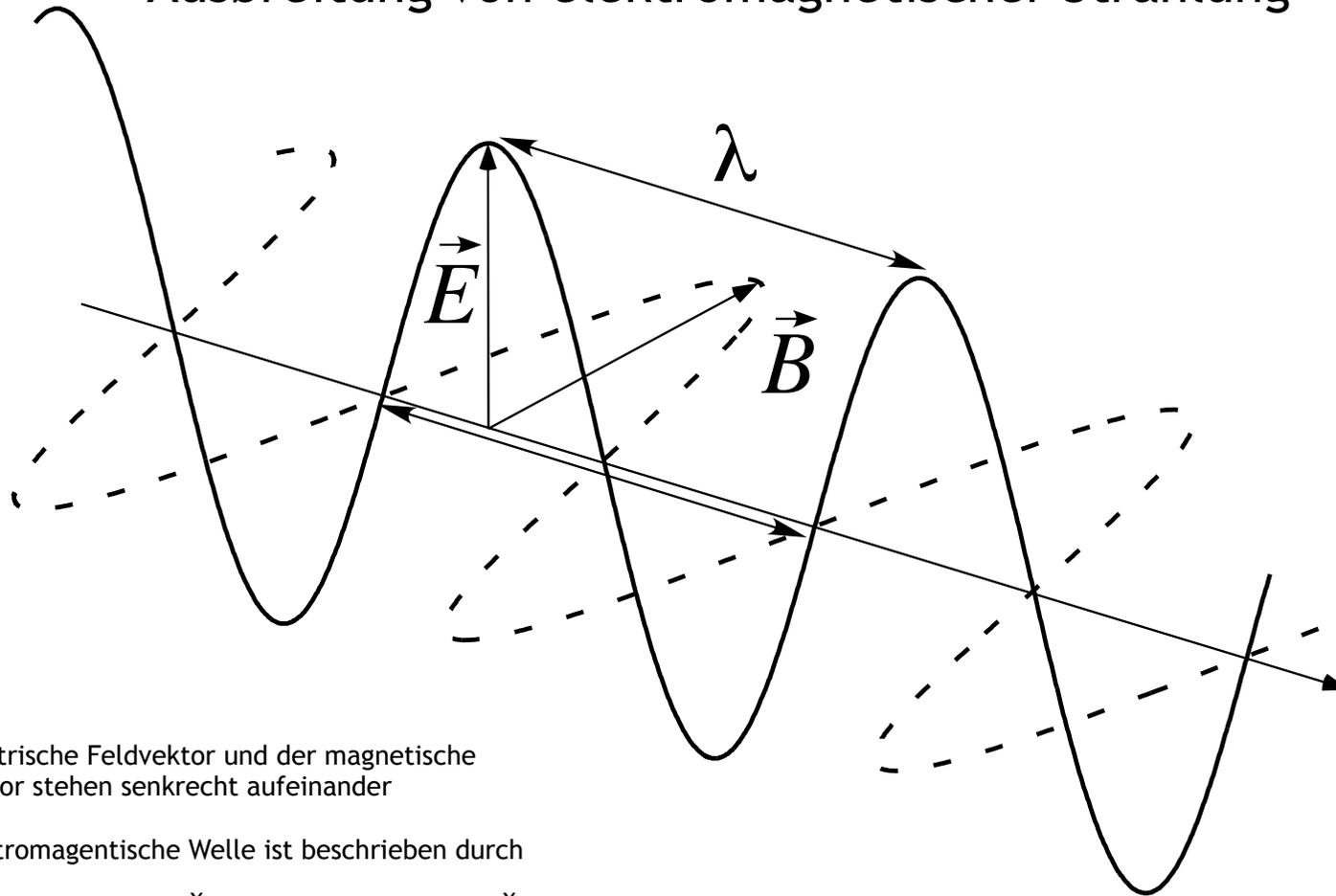


# Ausbreitung von elektromagnetischer Strahlung



Der elektrische Feldvektor und der magnetische Feldvektor stehen senkrecht aufeinander

Die elektromagnetische Welle ist beschrieben durch

$$E = E_0 \sin(2\pi\nu t - \frac{x}{v}) \text{ bzw. } B = B_0 \sin(2\pi\nu t - \frac{x}{v}),$$

$\nu$ : Frequenz: die Anzahl Wellenlängen die die Strahlung in 1 s zurücklegt.

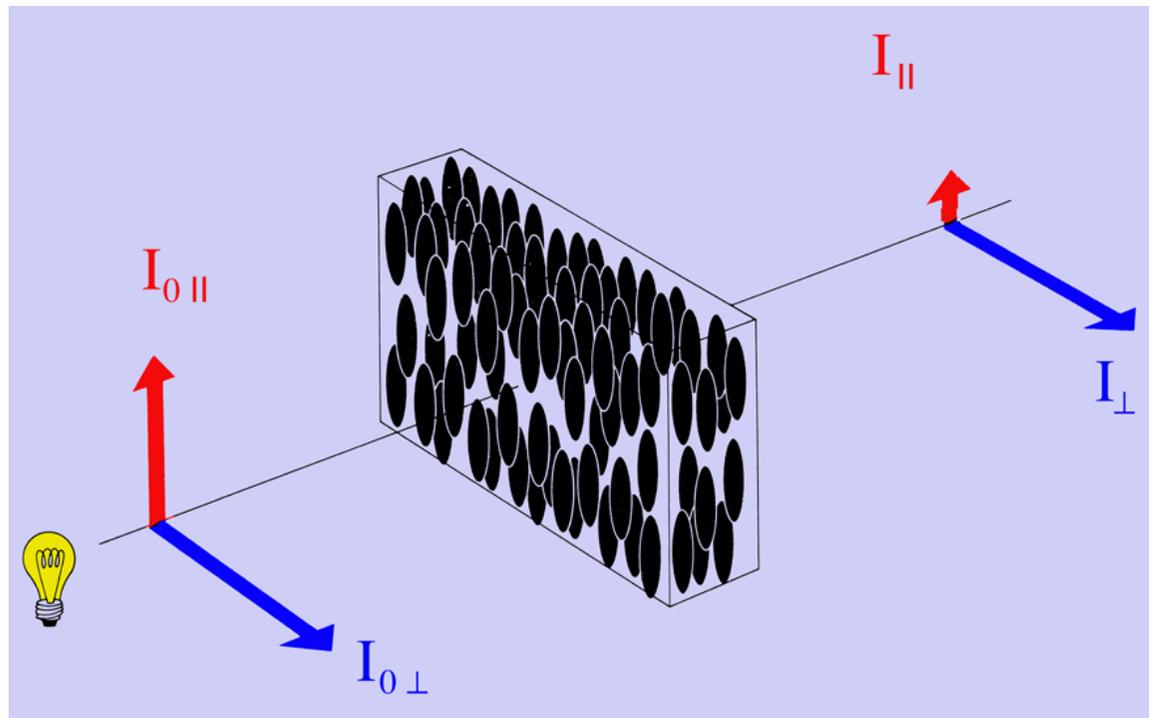
$t$ : Zeit

$x$ : Ort an dem E und B beobachtet werden

$v$ : Ausbreitungsgeschwindigkeit

$E_0, B_0$ : Amplitude

# Spektroskopie und Optische Aktivität



Schematisches Diagramm eines Linear-Dichroismus-Experimentes.

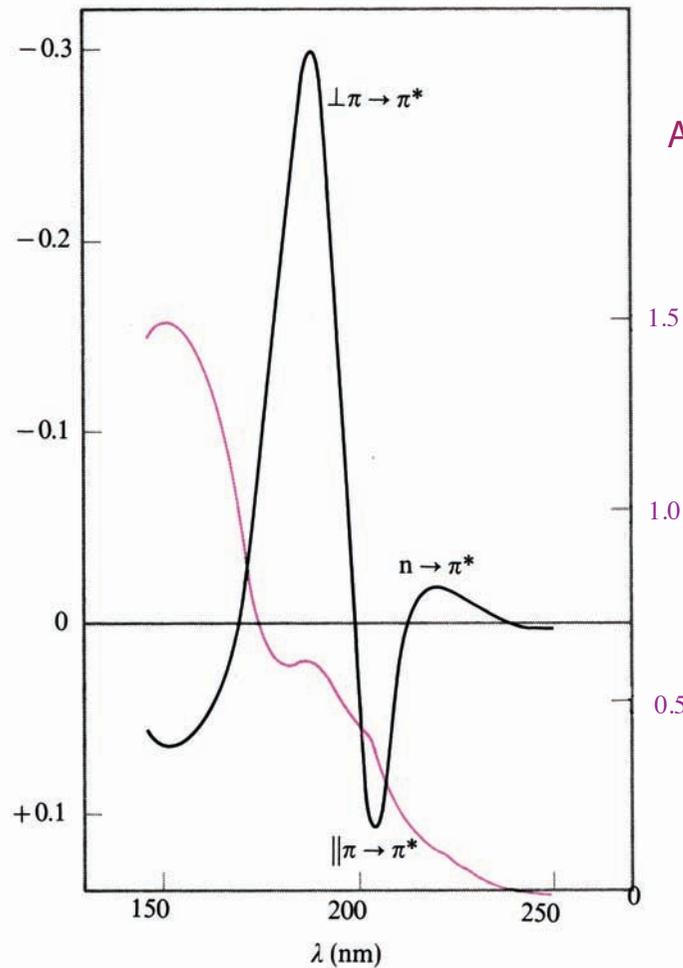
Die Moleküle einer Polymerfolie sind relativ zueinander und mit ihre Längsachse parallel (||) zu Lichtkomponente  $I_{||}$  orientiert. Diese wird durch das Polymer stärker absorbiert als die relative zu den Polymermolekülen senkrechte ( $\perp$ ) Lichtkomponente  $I_{\perp}$ . Nach Durchtritt durch die Polymerfolie ist das Licht linear polarisiert.

# Die unterschiedliche Absorption von Licht mit elektrischem Feldvektor parallel bzw. senkrecht durch Materie bezeichnet man als Lineardichroismus

Linear Dichroismus eines Polypeptids  
(Poly-L-glutaminsäurefilm).

Linear  
Dichroismus

$$\frac{\frac{I_{\parallel,0}}{I_{\parallel}} - \frac{I_{\perp,0}}{I_{\perp}}}{\frac{I_{\parallel,0}}{I_{\parallel}} + \frac{I_{\perp,0}}{I_{\perp}}}$$



Absorption

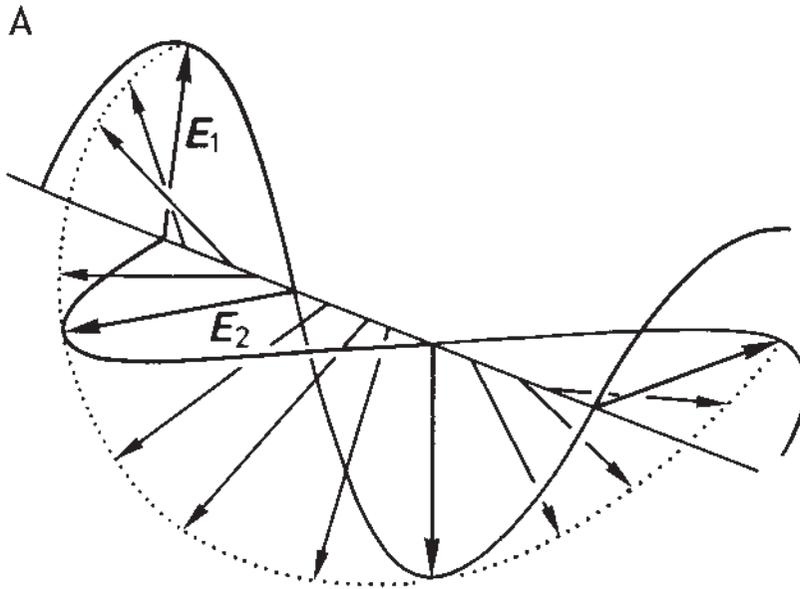
Der Lineardichroismus ist definiert durch

$$D = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{\parallel} + A_{\perp}} = \frac{\log\left(\frac{I_{\parallel,0}}{I_{\parallel}}\right) - \log\left(\frac{I_{\perp,0}}{I_{\perp}}\right)}{\log\left(\frac{I_{\parallel,0}}{I_{\parallel}}\right) + \log\left(\frac{I_{\perp,0}}{I_{\perp}}\right)}$$

Während die Absorption positiv ist kann das Vorzeichen des Lineardichroismus positiv oder negativ sein

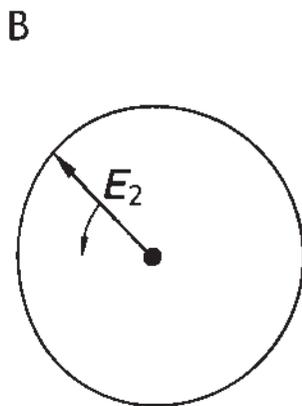
## Generierung von zirkularpolarisiertem Licht durch Superposition zweier linearpolarisierter Lichtwellen mit Phasendifferenz $\lambda/4$ .

---



A. Links-zirkularpolarisiertes Licht kann durch Überlagerung (Superposition) von linearpolarisiertem Licht erhalten werden.

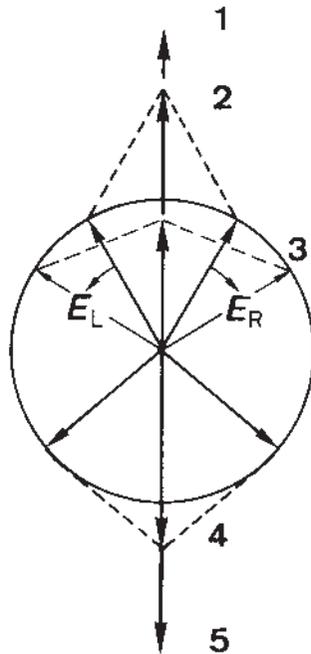
Die elektrischen Feldvektoren der Lichtwellen stehen senkrecht zueinander und die Lichtwellen haben eine Phasendifferenz von  $\lambda/4$ , wobei  $E_1$  gegenüber  $E_2$  vorausläuft.



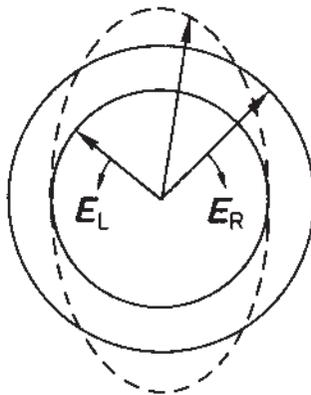
B. Zirkularpolarisiertes Licht in Projektion auf die Ausbreitungsrichtung

Wenn  $E_2$  vorauslaufen würde, dann entstünde rechtszirkular polarisiertes Licht.

# Beziehung zwischen linear-, zirkular-, und elliptisch-polarisiertem Licht

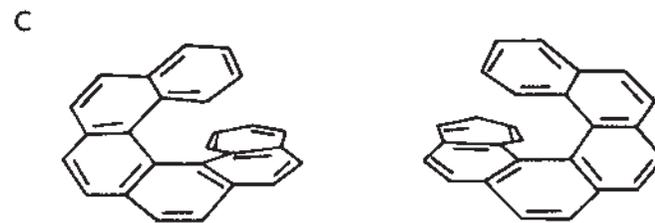
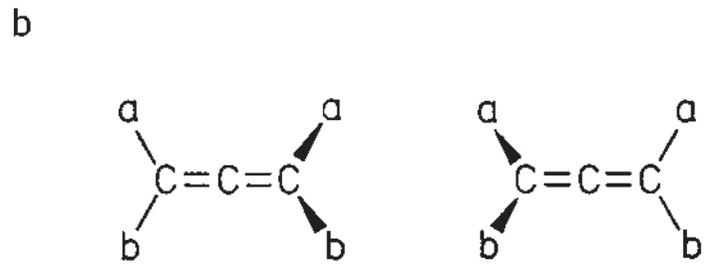
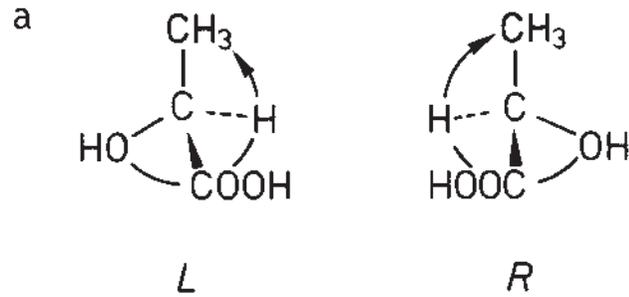


Die Kombination aus links- und rechtszirkular polarisiertem Licht von gleicher Amplitude, Wellenlänge und Phase ergibt linear polarisiertes Licht. Die Amplitude des linear polarisierten Lichtes oszilliert zwischen Position 1 und 5.



Elliptisch polarisiertes Licht entsteht aus der Superposition von zwei zirkular polarisierten Wellen von verschiedenen Amplituden.

# Chirale Moleküle

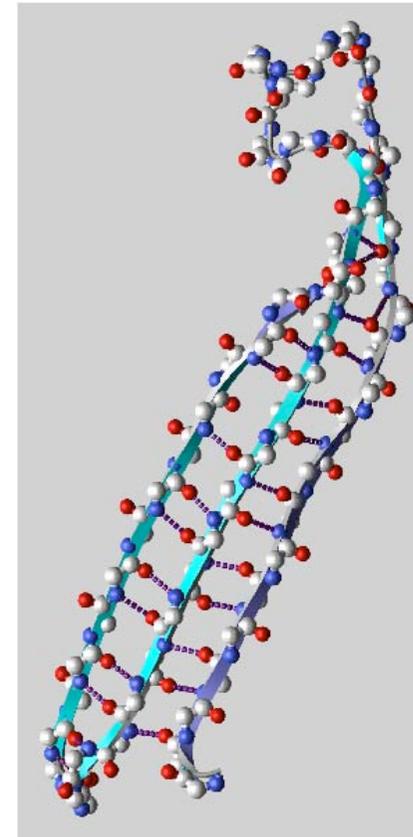
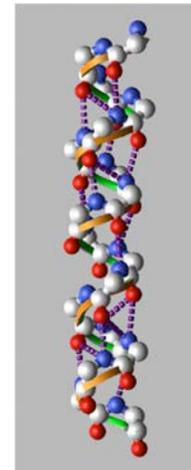
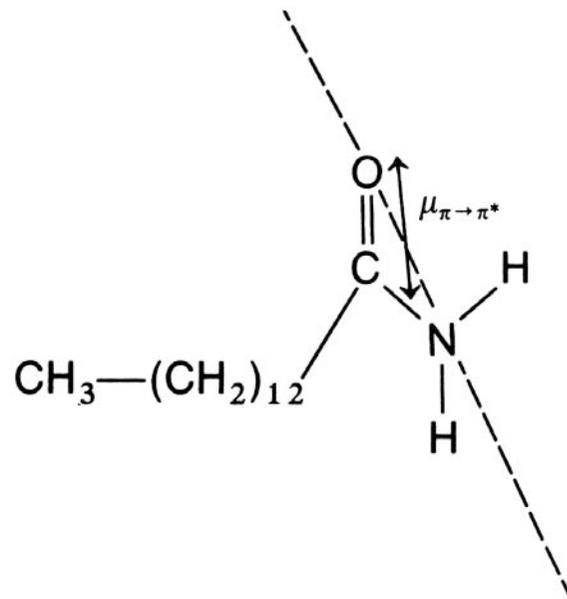


# Die Peptidbindung absorbiert im fernen UV (< 250 nm)

Zwei Hauptabsorptionsbanden werden beobachtet:

$n \rightarrow \pi^*$  (210-220 nm, schwach)

and  $\pi \rightarrow \pi^*$  (um 190 nm, stärker)



$\alpha$ -Helices und  $\beta$ -sheets sind chiral und deshalb optisch aktiv

## Optische Rotationsdispersion (ORD)

In einer optisch aktiven Substanz ist die Lichtgeschwindigkeit für rechts- und linkszirkularpolarisiertes Licht verschieden.

$$n = \frac{c}{c_0}$$

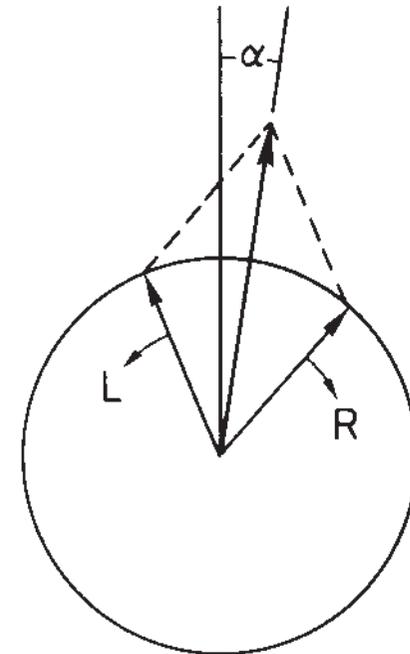
Nach dem Durchtritt besteht eine Phasendifferenz zwischen beiden zirkularpolarisierten Lichtwellen. Die vektorielle Addition des austretenden Lichtes ergibt eine Drehung der Polarisations Ebene.

$$\alpha_{(\lambda)} = \frac{180^\circ \cdot d}{\lambda} (n_L - n_R) \quad (\text{Grad})$$

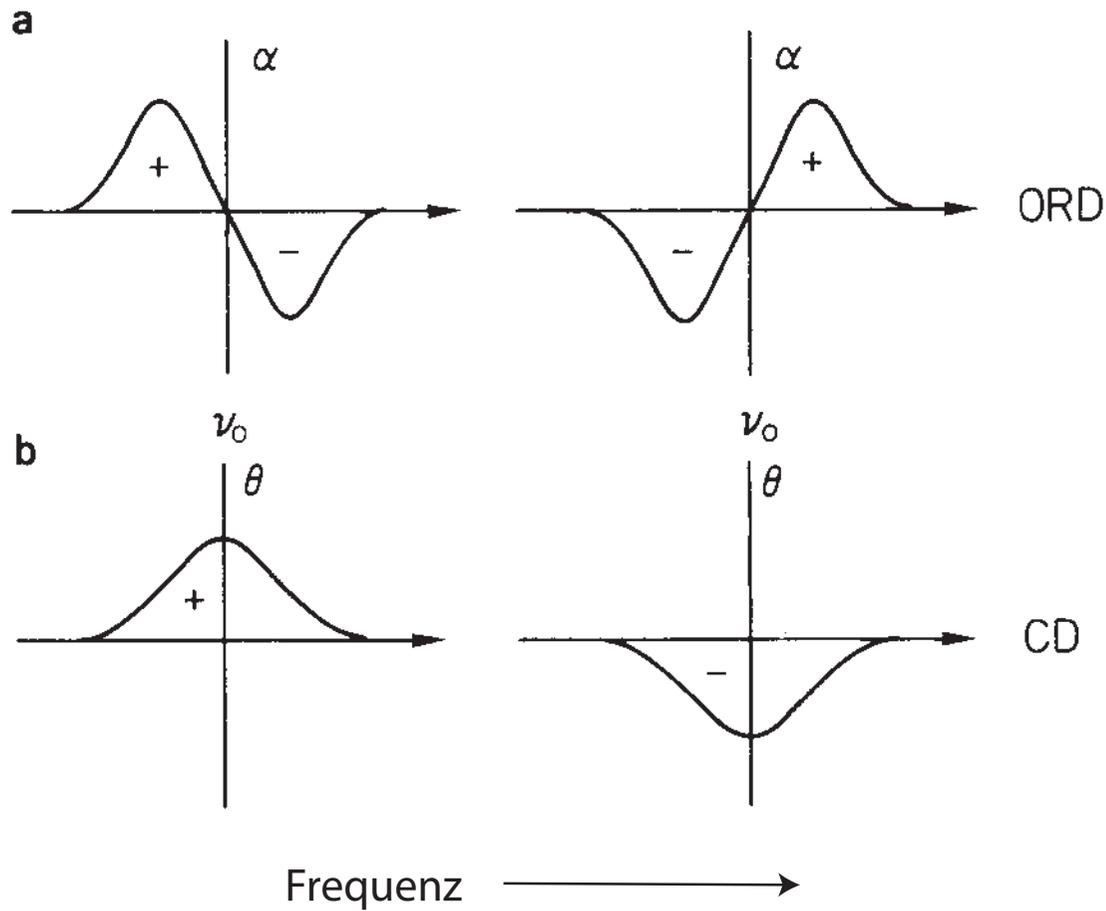
Der Drehwinkel  $\alpha$  ist von der Pfadlänge  $d$  des Lichtes durch die Probe und von der Konzentration  $c$  abhängig.

$$[\alpha]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda}{c \cdot d} \quad \left( \frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{g}} \right) \quad \text{spezifische Drehung}$$

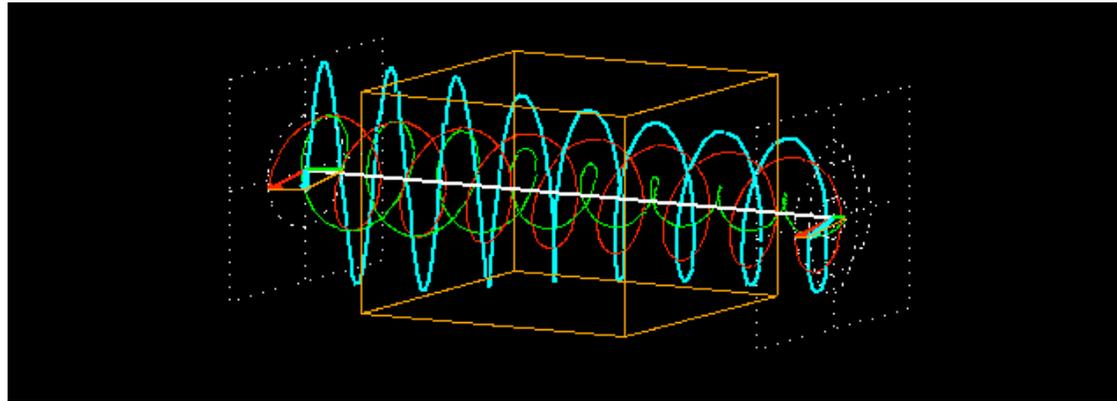
$$[M]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda \cdot M_r}{10 \cdot d \cdot c} \quad \left( \frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{mol}} \right) \quad \text{molare Drehung}$$



# Konformationsänderungen und CD-Spektren von Poly-L-lysine in wässriger Lösung



# Entstehung von zirkular oder elliptisch polarisiertem Licht

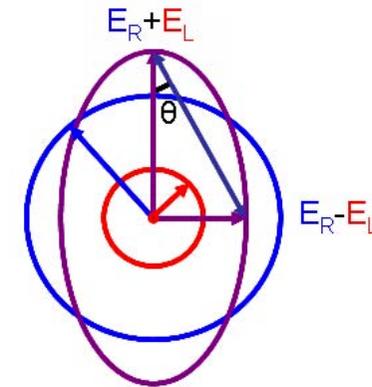


Zirkular or Elliptisch polarisiertes Licht entsteht, wenn linear polarisiertes Licht durch eine optisch aktives (chirales) Material tritt.

# Elektrischer Feld Vektor ( $\vec{E}$ ), Intensität (I) und Elliptizität ( $\Theta$ )

Elliptizität des austretenden Lichtes:

$$\Theta_\lambda \text{ (Bogenmaß)} \approx \tan(\theta) = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} = \frac{I_R^{1/2} - I_L^{1/2}}{I_R^{1/2} + I_L^{1/2}}$$



Intensität und Absorption

$$I_R = I_0 \cdot 10^{-A_R} = I_0 e^{-A_R \ln(10)}$$

$$\Theta_\lambda \text{ (Bogenmaß)} \approx \frac{e^{-\frac{A_R}{2} \ln(10)} - e^{-\frac{A_L}{2} \ln(10)}}{e^{-\frac{A_R}{2} \ln(10)} + e^{-\frac{A_L}{2} \ln(10)}} = \frac{e^{\frac{A_L - A_R}{2} \ln(10)} - 1}{e^{\frac{A_L - A_R}{2} \ln(10)} + 1}$$

Entwicklung in eine Taylorreihe, Umwandlung von Bogenmaß in Grad

$$\Theta_\lambda \text{ (Grad)} \approx \frac{180^\circ}{\pi} \left( \frac{\ln(10)}{4} \right) \cdot \Delta A_\lambda \approx 32.98^\circ \cdot (\varepsilon_{L,\lambda} - \varepsilon_{R,\lambda}) \cdot c \cdot d$$

## Molare Elliptizität und Normierung der Elliptizität für Proteine

Die Konstanten können zur Vereinfachung zusammengefasst werden, sodass man für die Elliptizität erhält:

$$\Theta_{\lambda} \text{ (Grad)} \approx \frac{180^{\circ}}{\pi} \left( \frac{\ln(10)}{4} \right) \cdot \Delta A_{\lambda} \approx \text{const} \cdot (\epsilon_{L,\lambda} - \epsilon_{R,\lambda}) \cdot c \cdot d \quad \text{const} = \frac{180^{\circ}}{\pi} \left( \frac{\ln(10)}{4} \right) \approx 33^{\circ}$$

$$\boxed{\Theta_{\lambda} \text{ (Grad)} \approx 32.98^{\circ} \cdot (\epsilon_{L,\lambda} - \epsilon_{R,\lambda}) \cdot c \cdot d} \quad c \text{ in g/cm}^3, \quad d \text{ in cm, } \epsilon \text{ in cm}^2/\text{g}$$

Normiert auf die Stoffkonzentration und die Schichtdicke der Küvette:

$$[\Theta]_{\lambda} = \frac{M_r \Theta_{\lambda}}{d \cdot c} \left( \frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{mol}} \right)$$

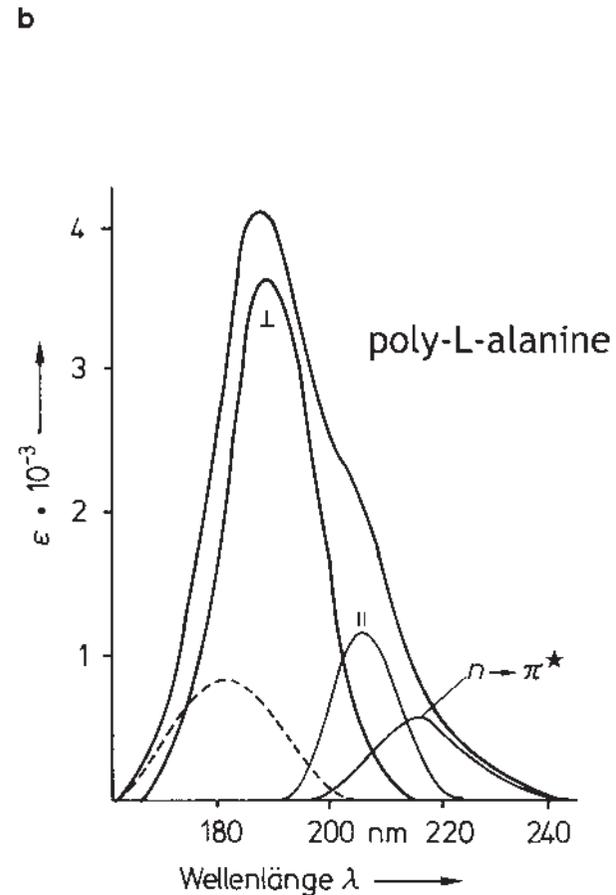
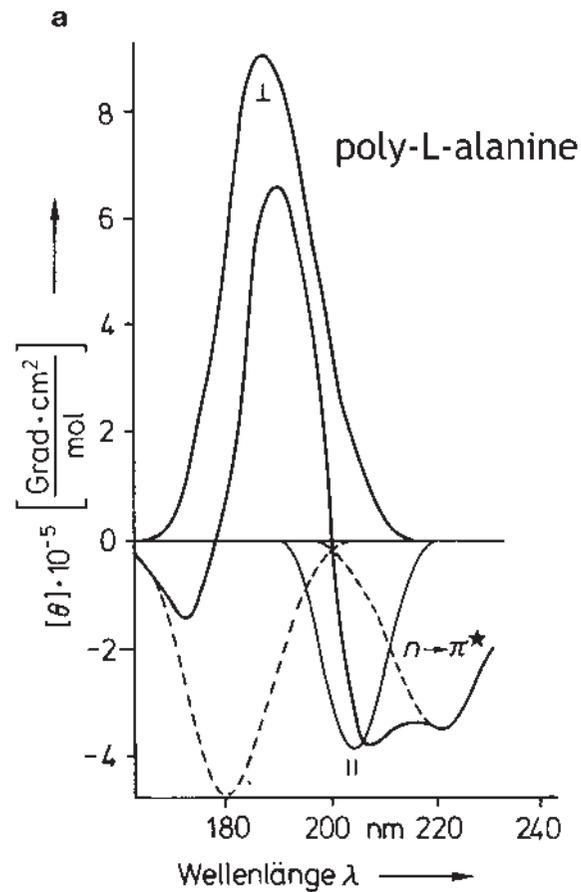
Mißt man die Stoffkonzentration in mol/l statt in g/cm<sup>3</sup>, so folgt:

$$[\Theta]_{\lambda} = 1000 \frac{\Theta_{\lambda}}{d \cdot c} \left( \frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{mol}} \right)$$

Für Proteine aus  $n$  Aminosäuren bezieht man das auf einen Aminosäurerest und gibt die "Mittlere molare Elliptizität pro Rest in der Einheit "Grad cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>" an:

$$\boxed{[\Theta]_{\lambda} = 100 \frac{\Theta_{\lambda}}{n \cdot d \cdot c} \left( \frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right)}$$

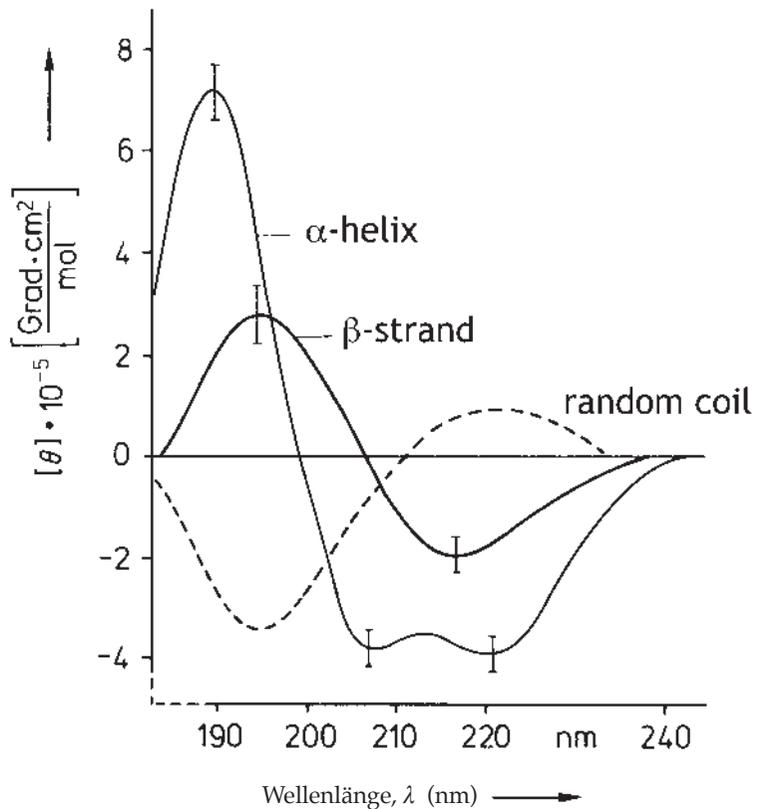
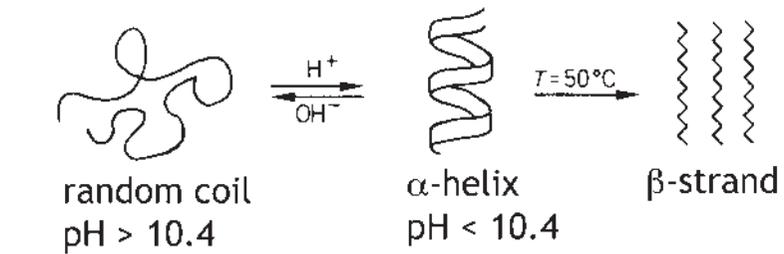
# Absorptions- und Circular dichroismus Spektrum eines $\alpha$ -helicalen Polypeptids

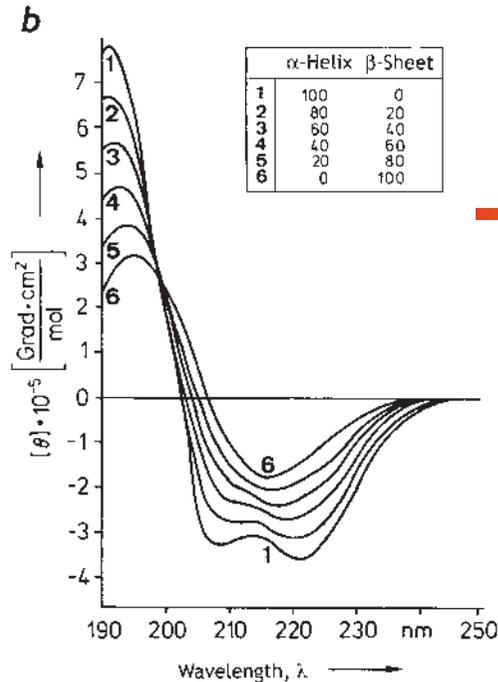
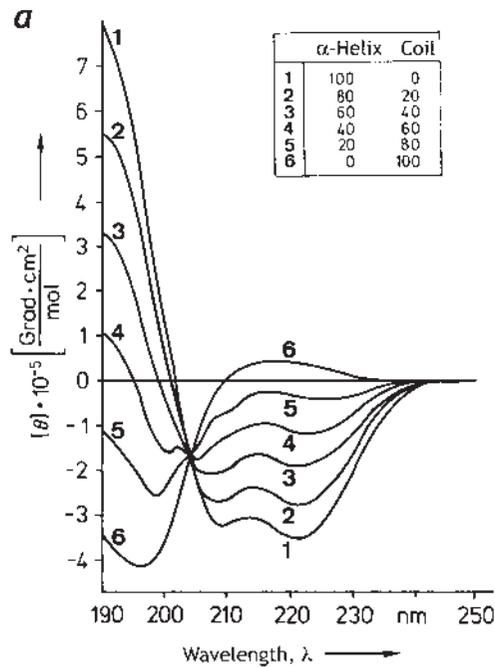


CD-Spektrum (a) und Absorptionsspektrum (b) von Poly-L-alanin in  $\alpha$ -Helix Konformation. Die Absorptionsbanden sind den Übergängen  $n \rightarrow \pi^*$  bei 220 nm und zu den  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergängen bei 204 und 190 nm zugeordnet.

(Nach Quadrifoglio, F., Urry, D.W. (1968) J. Am. Chem. Soc. 90, 2755-2760)

# Konformationsänderungen und CD-Spektren von Poly-L-lysine in wässriger Lösung





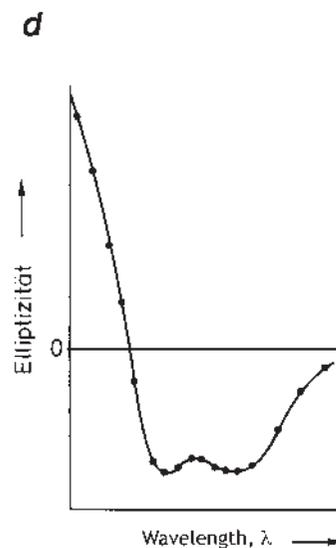
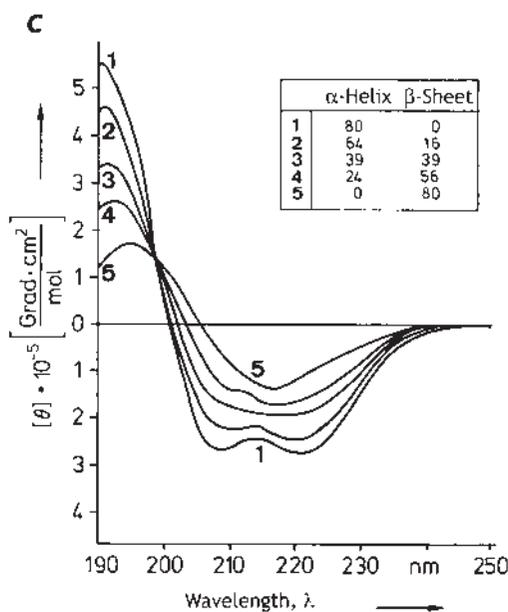
### Berechnete CD-Spektren mit verschiedenem Gehalt an $\alpha$ -Helix, $\beta$ -Faltblatt und ungeordneter Struktur

Prozentuale Anteile von  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Zufallsknäuel Struktur sind in den Tabellen gelistet

**a** variabler Anteil of  $\alpha$ -Helix und Zufallsknäuel

**b** variabler Anteil of  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt

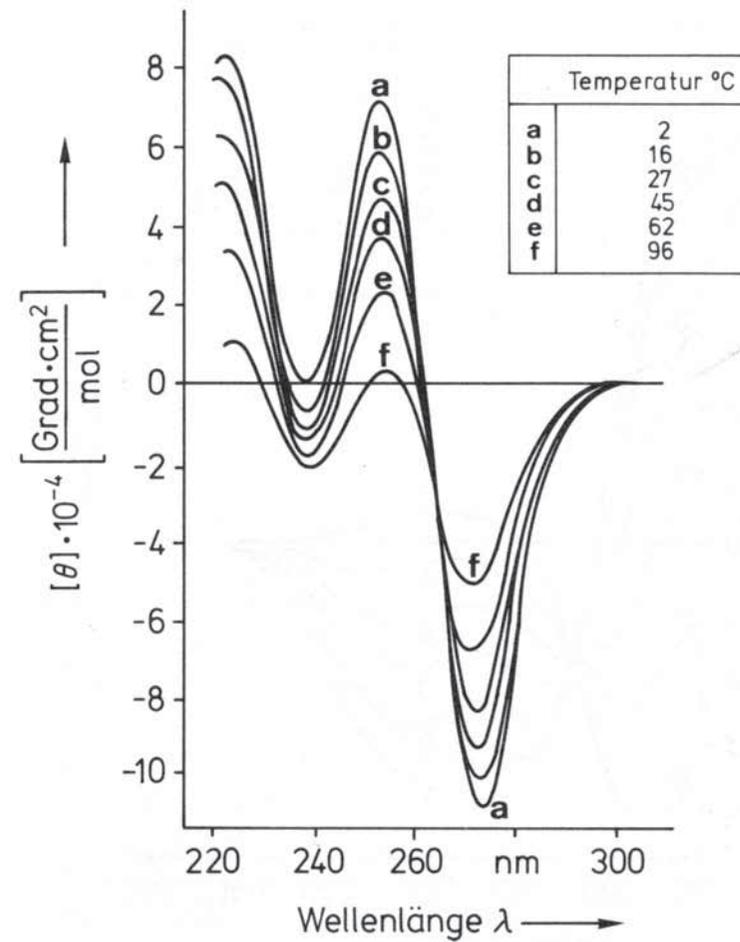
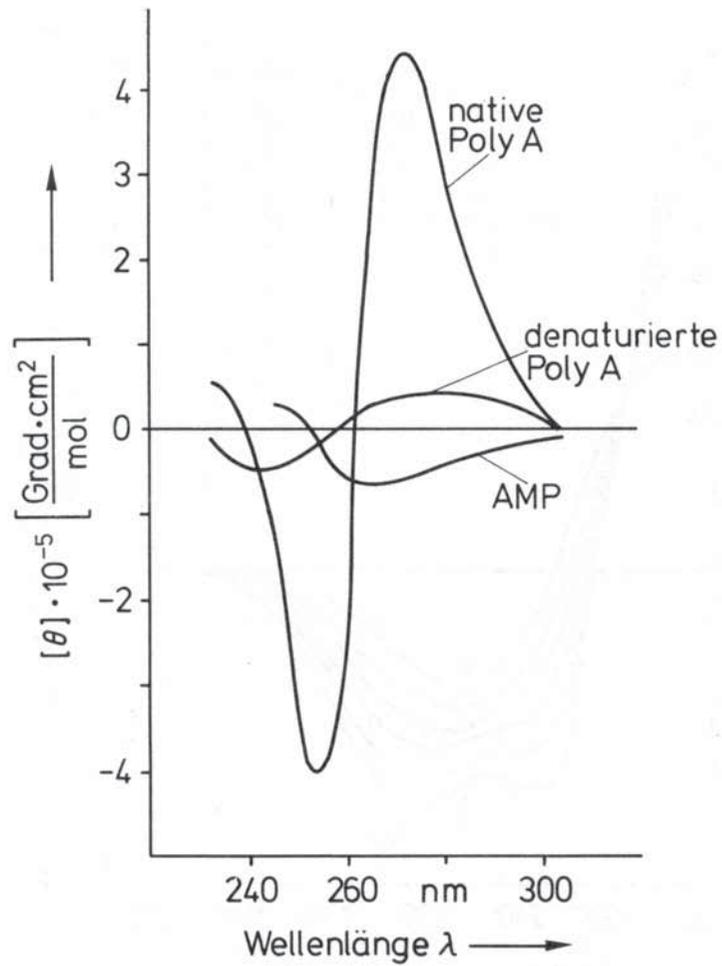
**c** variabler Anteil of  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt bei 20% Zufallsknäuel.



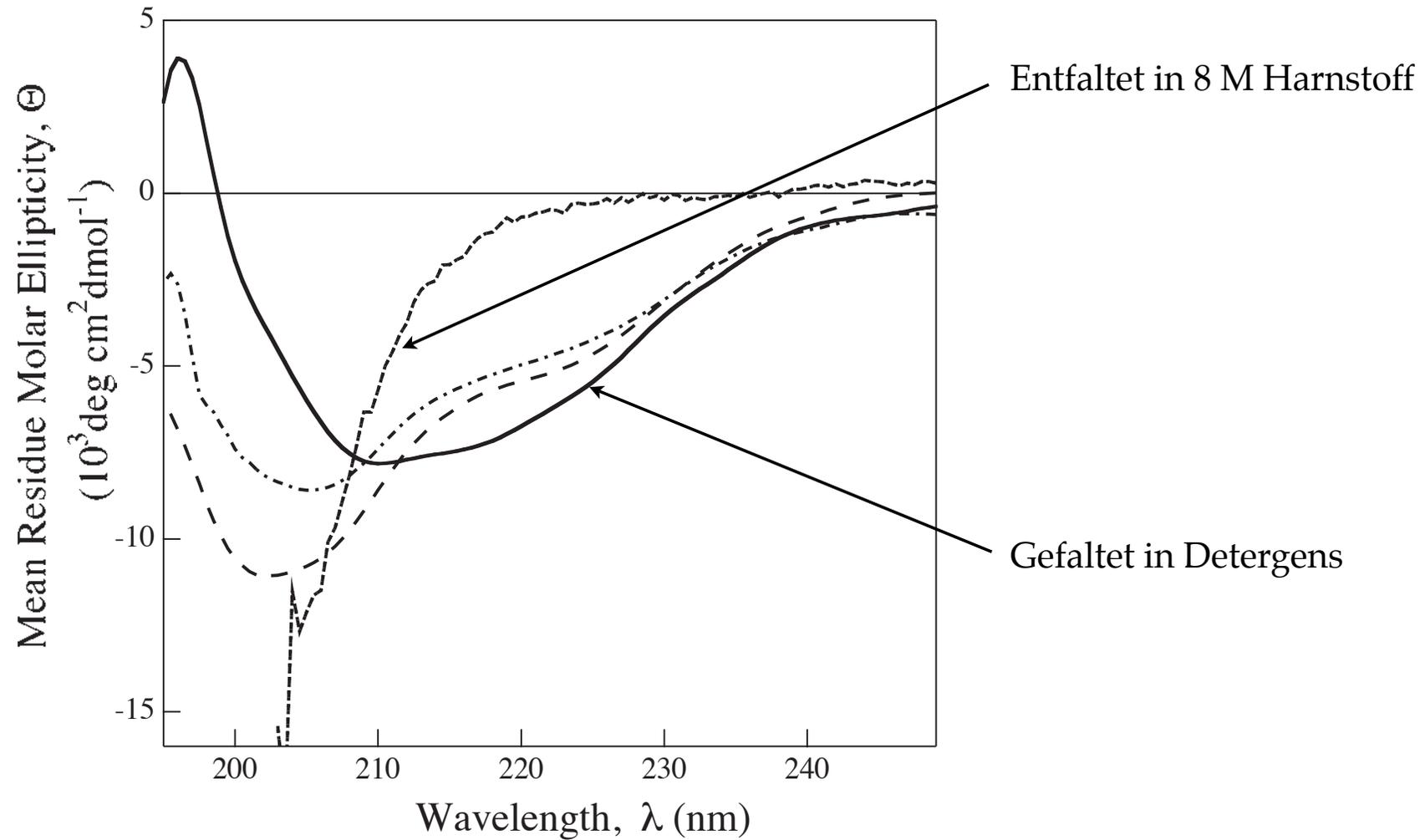
**d** CD-Spektrum von Myoglobin: Die ausgefüllten Kreise wurden berechnet aus Spektren des Poly-L-lysins und ergaben einen Anteil von 68.3%  $\alpha$ -Helix, 4.7 %  $\beta$ -Faltblatt und 27% Zufallsknäuel.

(Nach Greenfield and Fasman, 1969 Biochemistry 8, 4108).

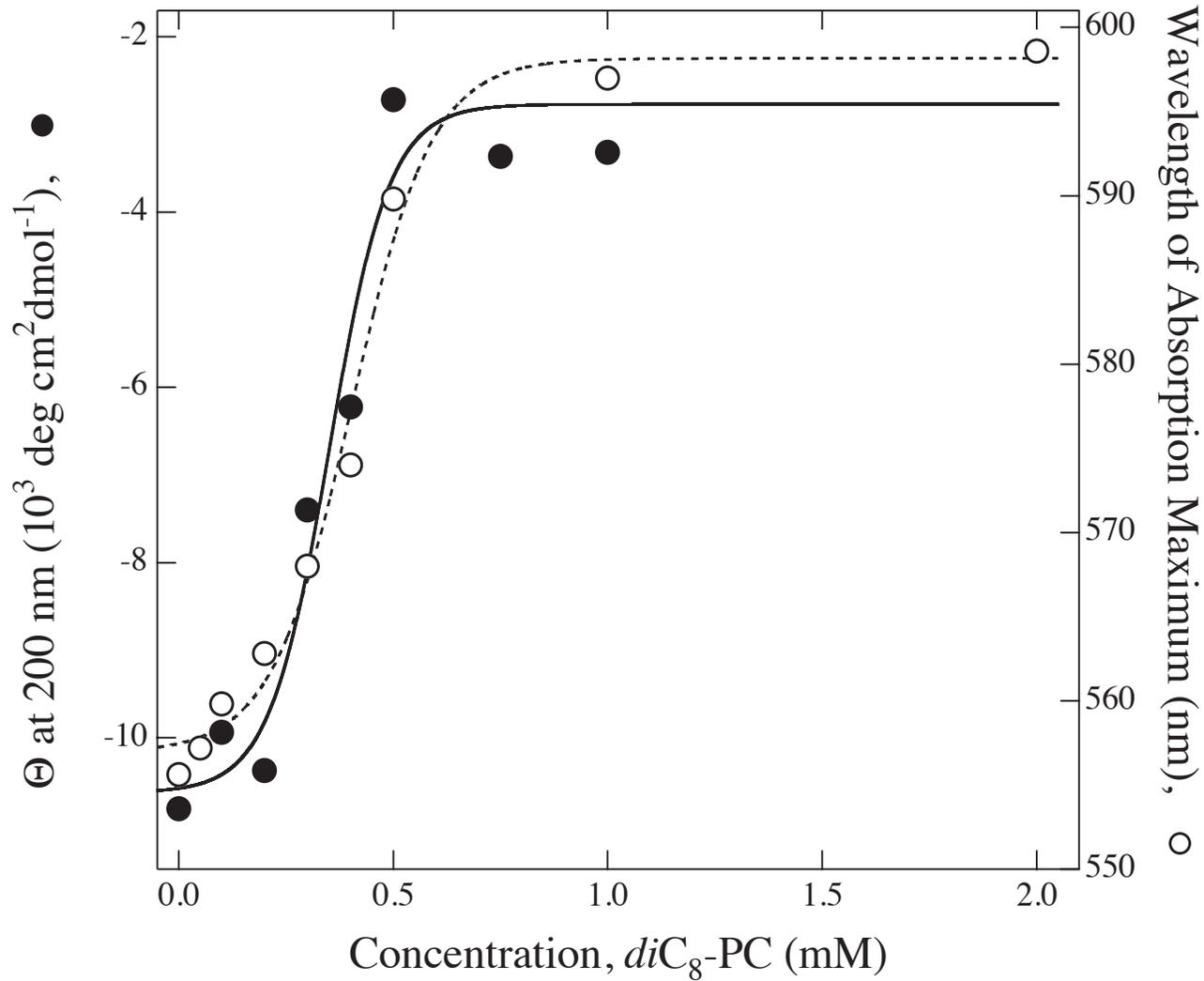
# CD-Spektren von Adenosinmonophosphat nativem Poly-AMP und denaturiertem PolyAMP



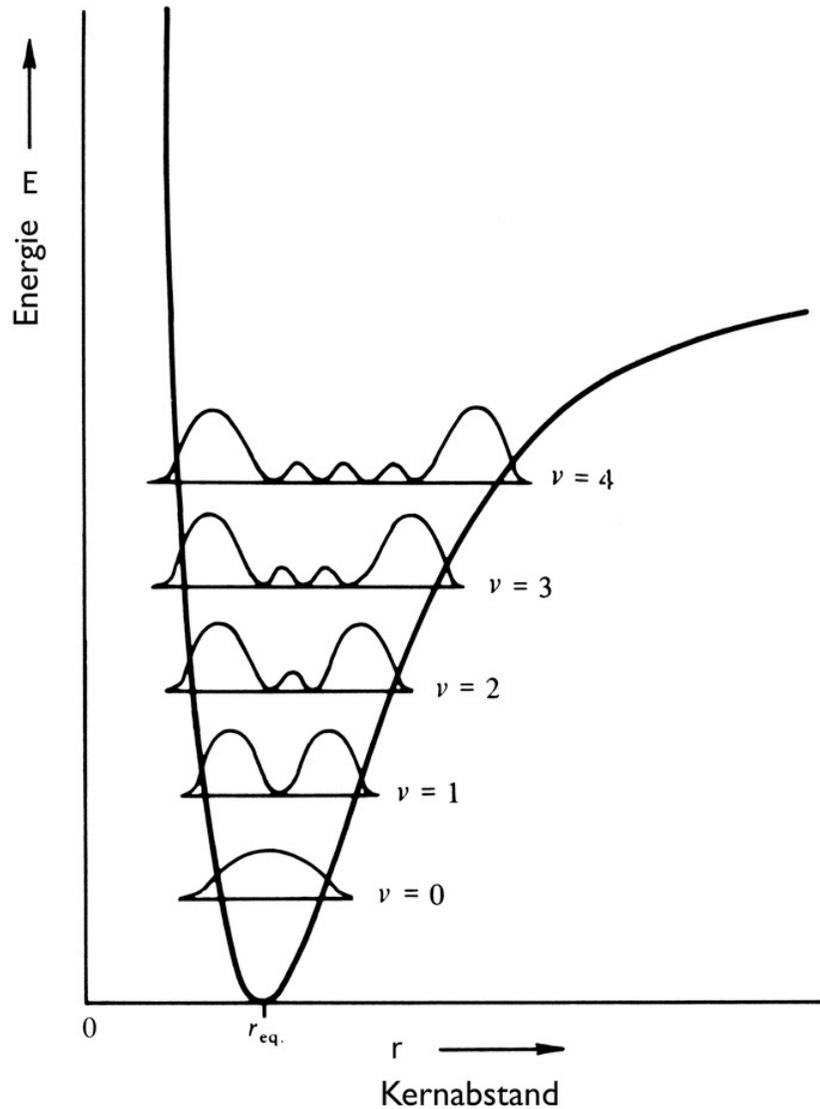
## Beispiel: Renaturierung eines Membranproteins



# Die Renaturierung hängt von der Konzentration an Detergensmicellen ab.

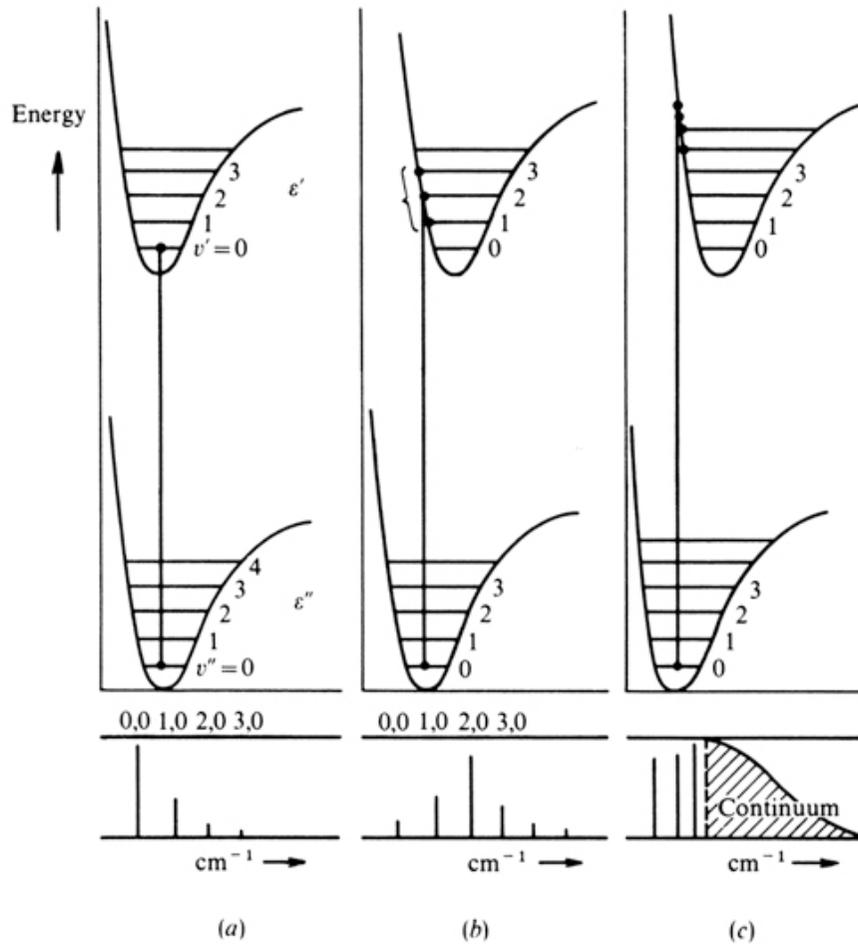


## Kernabstände und Schwingungszustände



Die Wahrscheinlichkeitsverteilung für ein zweiatomiges Molekül wie durch die Quantentheorie vorhergesagt. Die Kerne werden am wahrscheinlichsten bei einem Abstand gefunden, der durch die Maxima der Abstands-Verteilungen bei jedem Schwingungszustand gegeben ist.

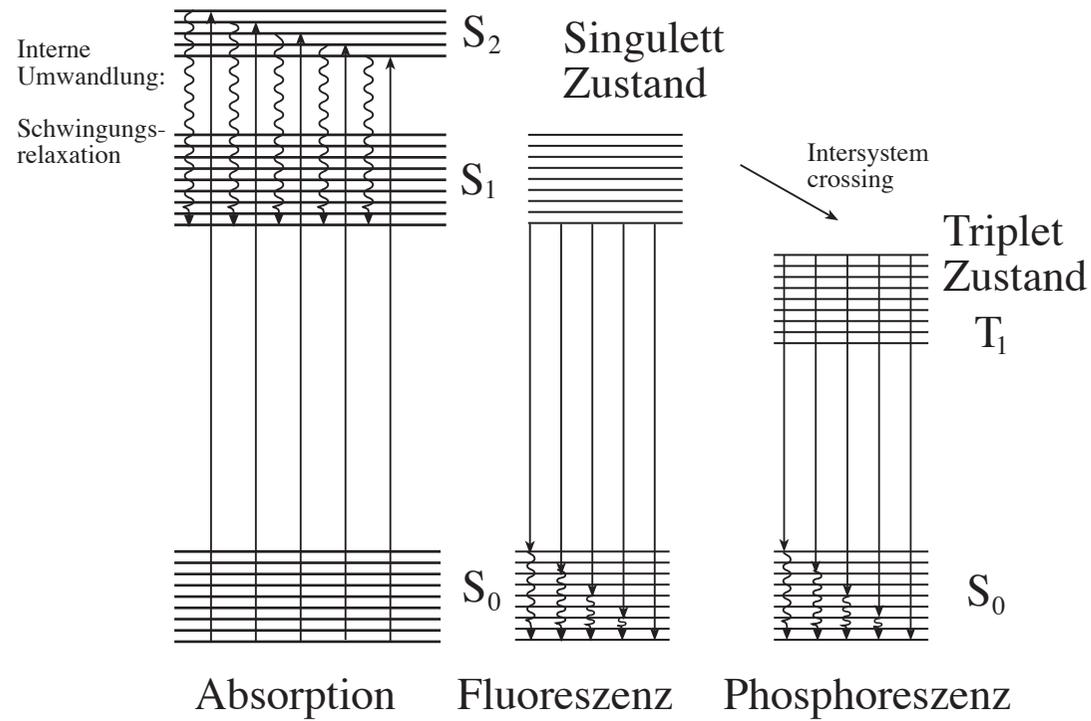
## Elektronische Übergänge und Schwingungszustände



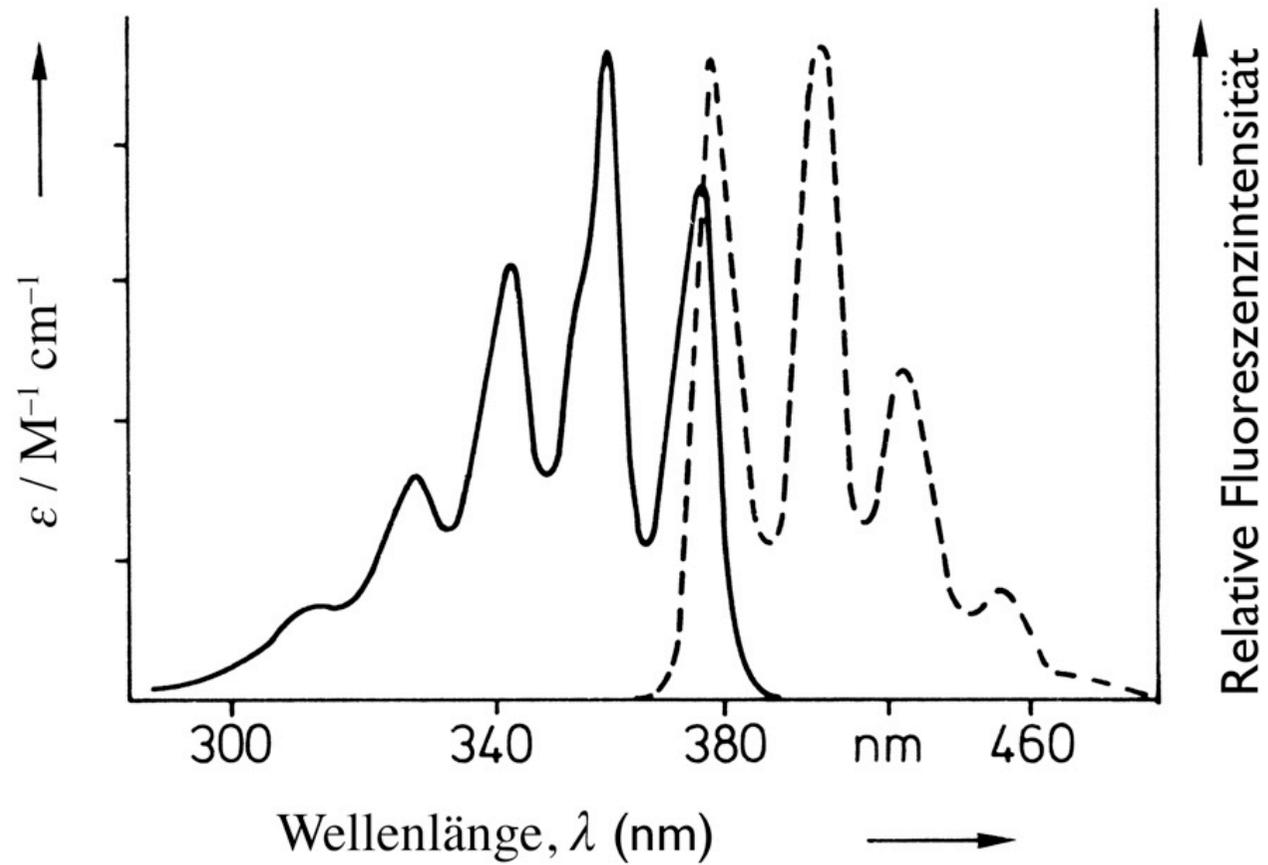
Franck-Condon Prinzip, elektronische Übergänge erfolgen ohne Änderung des *momentanen* Kernabstandes:

- (a) Gleichgewichts-Kernabstände sind im elektronisch angeregten und im elektronischen Grundzustand etwa gleich
- (b) der Gleichgewichts-Kernabstand des angeregten Zustandes ist etwas größer als der Kernabstand des elektronischen Grundzustandes
- (c) der Gleichgewichts-Kernabstand des angeregten Zustandes ist etwas kleiner als im Grundzustand.

# Jablonski Diagram



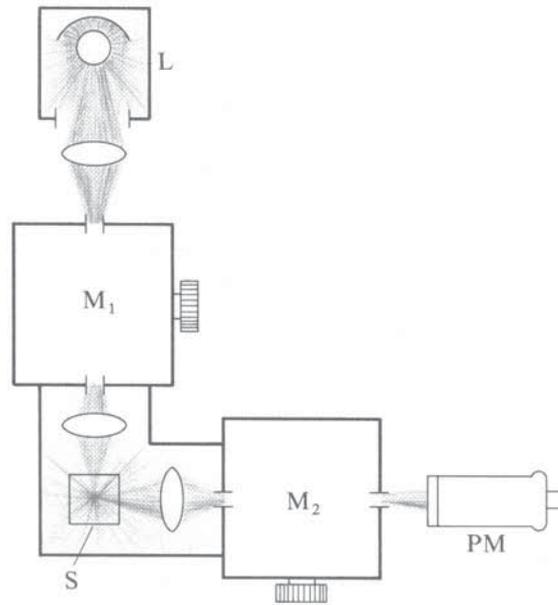
- Schwingungsübergänge sind dargestellt durch 
- Elektronische Übergänge sind dargestellt durch 
- Elektronische Übergänge in den Grundzustand sind durch die Emission von Fluoreszenzstrahlung charakterisiert. Wenn der angeregt Zustand ein Triplettzustand war, durch Emission von Phosphoreszenz.



Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Anthracen in Cyclohexan. Absorptions- und Fluoreszenzspektrum verhalten sich beinahe wie Bild und Spiegelbild.

# Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

**A**



Stationäre Fluoreszenzmessungen

L ist eine Lichtquelle

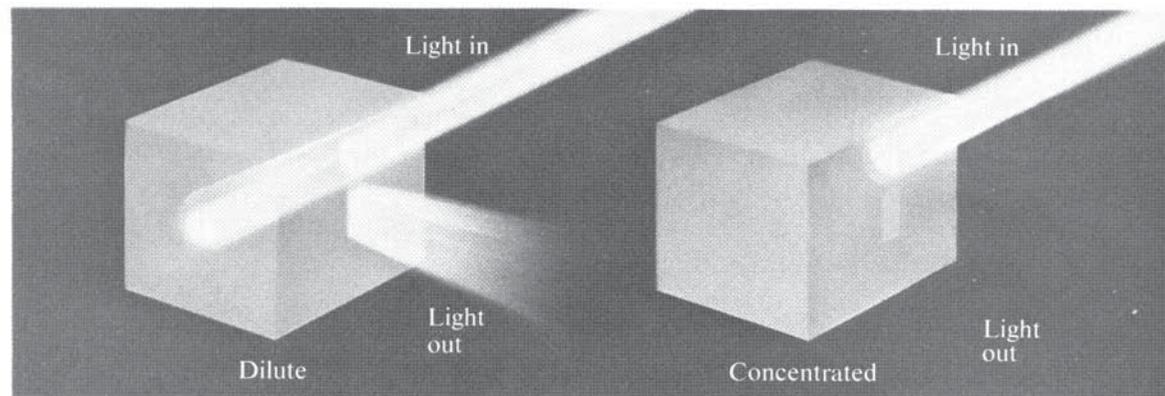
M1 ist der  
Anregungsmonochromator

M2 der Emissionsmonochromator

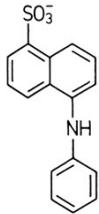
PM ist ein Photomultiplier

S die Probe

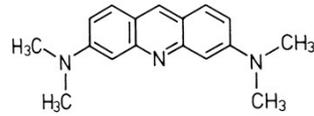
**B**



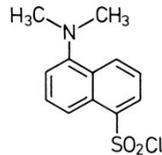
# Strukturen einiger in Fluoreszierender Farbstoffe



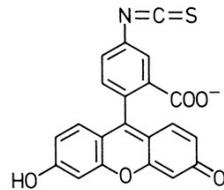
1-Anilino-8-Naphthalinsulfonat (ANS)



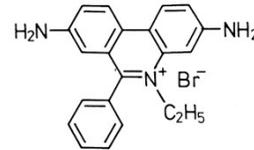
Acridinorange



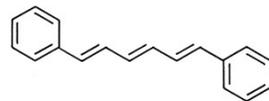
1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid)



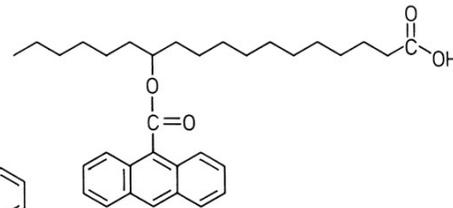
Fluoreszein-Isothiocyanat



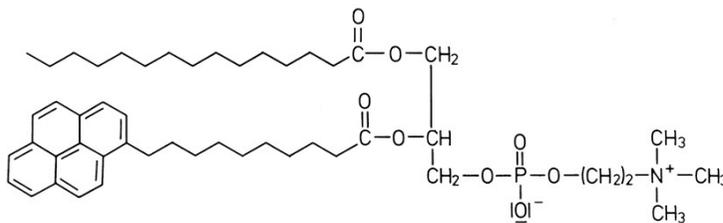
Ethidiumbromid



Diphenylhexatrien

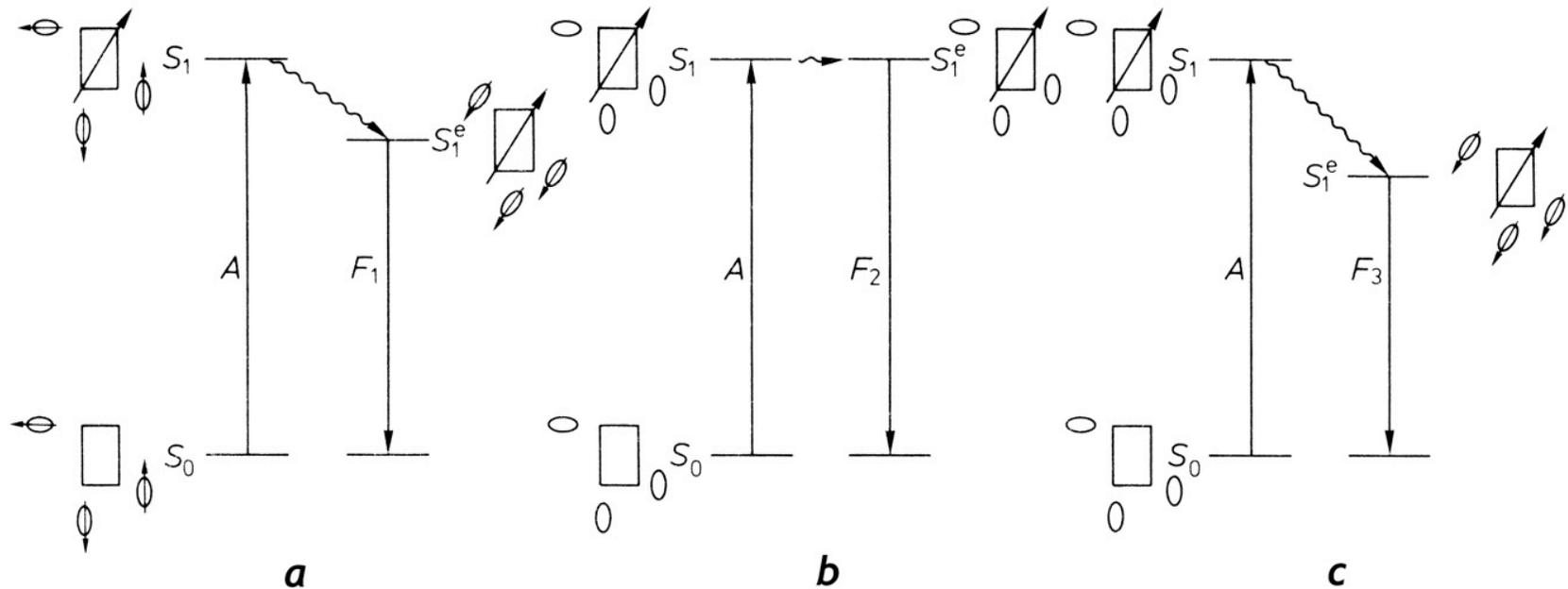


12-(9-Anthroyl)-Stearinsäure



1-Acyl-2-10-(1-Pyren)dekanoyl-glycero-3-phosphocholin

# Lösungsmittelleffekte auf die Lage des Fluoreszenzmissionsmaximums



Lösungsmittelleffekte auf die Fluoreszenzemission. A=Absorption, F=Fluoreszenz,  $S_1$ =Energie des Fluorophors direkt nach der Anregung (angeregter Franck-Condon-Zustand).  $S_1^e$ =Schwingungsgleichgewichtszustand, **a** polares Lösungsmittel, **b** apolares Lösungsmittel mit niedriger, **c** mit hoher Polarisierbarkeit.